



**HAL**  
open science

# Diagnostic de la dengue : trois solutions pour améliorer la prise en charge des patients et faciliter les études épidémiologiques

Anne-Claire Andries

## ► To cite this version:

Anne-Claire Andries. Diagnostic de la dengue : trois solutions pour améliorer la prise en charge des patients et faciliter les études épidémiologiques. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier; Institut Pasteur du Cambodge (Phnom-Penh), 2015. Français. NNT : 2015MONTTS146 . tel-01990524

**HAL Id: tel-01990524**

**<https://theses.hal.science/tel-01990524>**

Submitted on 23 Jan 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

**Délivré par l'Université de Montpellier**

**Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE  
Et de l'Institut Pasteur du Cambodge**

**Spécialité : MP- Microbiologie et Parasitologie**

**Présentée par Anne-Claire ANDRIES**

**TITRE DE LA THESE :**

**Diagnostic de la dengue: trois solutions pour  
améliorer la prise en charge des patients et  
faciliter les études épidémiologiques**

**Soutenue le 17 décembre 2015 devant le jury composé de**



**Dr Philippe BUCHY  
Pr Xavier DE LAMBALLERIE  
Dr Isabelle LEPARC-GOFFART  
Pr Emmanuel CORNILLOT  
Pr Christian DEVAUX  
Dr Roger FRUTOS  
Dr Marc GRANDADAM**

**Directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Invité**

**Diagnostic de la dengue: trois solutions  
pour améliorer la prise en charge des  
patients et faciliter les études  
épidémiologiques**

Dengue diagnosis: three solutions to improve patients' management  
and to facilitate epidemiological studies

**Travail effectué à :**

Institut Pasteur du Cambodge  
Unité de Virologie  
5 Monivong boulevard  
PHNOM PENH - CAMBODGE

## Résumé

La dengue est une maladie virale des régions tropicales et subtropicales, transmise par les moustiques du genre *Aedes*. Le virus de la dengue (DENV) appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus*. Si la plupart des infections sont asymptomatiques ou se traduisent par un syndrome fébrile sans gravité, le virus peut aussi causer une maladie plus sévère caractérisée par une fuite plasmatique, avec ou sans hémorragie. Sans prise en charge adéquate, les formes les plus sévères peuvent évoluer vers un syndrome de choc, potentiellement mortel. Il n'existe pas de traitement spécifique de la dengue mais une réhydratation adaptée et débutée précocement permet de réduire la survenue de formes sévères de la maladie. Malheureusement, les symptômes initiaux de la dengue avant la survenue des éventuelles complications ne sont pas spécifiques et seul un diagnostic biologique basé sur la détection du génome viral, de l'antigène NS1 ou des anticorps anti-DENV dans le sang des patients permet de confirmer la nature exacte de l'infection. La dengue constitue à l'heure actuelle un problème majeur de santé publique du fait de son expansion mondiale et de l'augmentation annuelle du nombre de cas sévères. Pour assurer la surveillance épidémiologique et le contrôle de la maladie, il est indispensable de développer des outils diagnostiques performants et faciles à mettre en œuvre, à la fois utilisables par les médecins de toutes les structures médicales, des simples centres de soins de santé primaire aux centres de référence, et utilisables lors d'enquêtes épidémiologiques pour l'investigation de nouvelles épidémies. Le travail de cette thèse a porté sur plusieurs aspects de cette problématique.

Dans une première partie, un test commercial de diagnostic rapide (TDR) permettant la détection simultanée de la NS1 et des IgG et IgM anti-DENV, a été évalué, en laboratoire spécialisé et sur le terrain, afin de comparer, à partir des mêmes échantillons, les performances du test dans deux situations différentes. La sensibilité s'est révélée plus faible lors de l'utilisation sur le terrain que lors de l'utilisation en laboratoire de référence. La majorité des discordances a été observée pour la détection des IgG et des IgM. L'impact de la mise à disposition du test sur la prise en charge des patients a également été évalué et il s'est avéré qu'au cours de cette étude les pédiatres cambodgiens ont ignorés les résultats du test rapide et ont préféré suivre leur instinct clinique.

Un second volet a porté sur la faisabilité d'utiliser les urines et la salive en remplacement du sang veineux pour les tests employés en routine pour le diagnostic de la dengue. Les urines et la salive sont des fluides biologiques plus faciles à prélever que le sang veineux ce qui présente un avantage majeur pour les enquêtes épidémiologiques mais peut également secourir les médecins lorsqu'un prélèvement de sang veineux est difficile à obtenir, par exemple chez les enfants. Bien que les performances des différentes méthodes de diagnostic ne soient pas aussi bonnes avec de l'urine et la salive qu'avec du plasma, les résultats obtenus par PCR en temps réel et avec les ELISAs de détection des anticorps anti-DENV démontrent l'intérêt potentiel de ces deux fluides biologiques pour détecter les infections par le DENV lorsqu'il est difficile d'obtenir du sang veineux. Plusieurs TDR commerciaux développés pour permettre la détection de la NS1 et des anticorps anti-DENV (IgM, IgG et IgA) dans les urines et la salive ont été évalués mais les performances obtenues se sont révélées peu satisfaisantes.

Une dernière partie du travail a été consacrée à l'étude de la protéinurie comme marqueur pronostic potentiel de sévérité de la dengue. Ce marqueur biologique ne s'est pas révélé être utile pour diagnostiquer précocement les formes sévères de la maladie.

## Mots clés

Dengue, diagnostic, urine, salive, marqueur de sévérité, test de diagnostic rapide



## Summary

Dengue is a viral disease transmitted by *Aedes* species mosquitoes, in tropical and subtropical regions. Dengue virus (DENV) belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. Although most DENV infections are asymptomatic or result in a self-limited febrile illness, severe diseases characterized by plasma leakage, with or without hemorrhage, can also occur. Patients with a severe dengue can rapidly progress into a life-threatening shock syndrome if no efficient clinical management is provided. There is no specific treatment available for dengue but an accurate and early fluid therapy substantially reduces the occurrence of severe forms of the disease. Dengue symptoms are typically non-specific until or unless complications develop. Only a biologic diagnosis based on DENV genome, NS1 antigen or anti-DENV antibodies detection enables to confirm dengue cases. Dengue is now a major public health problem due to both its geographical spread and the increase in the number of severe cases. New diagnostic tools are necessary to ensure epidemiological surveillance and control of the disease. These tools need to be effective and easy to use in every medical settings, from the smallest primary health centers to the biggest reference centers, and also usable for epidemiologic studies, e.g. for epidemic investigations. The work presented in this thesis was dedicated to this problematic.

In a first part of the work, a rapid diagnostic test (RDT), designed to detect NS1 antigen, anti-DENV IgG and IgM, was evaluated, both in a specialized laboratory and in the field, in order to compare the test performances in two different settings, with the same samples. Interestingly, sensitivity was lower when the test was used in the field compared to the sensitivity of the test when performed in the specialized laboratory. Discordances were mainly observed for IgM and IgG detection. Impact of the use of the RDT on clinical management was also assessed during the field study and it revealed that Cambodian pediatricians ignored the results of the RDT and followed their clinical instinct.

A second part of the work was dedicated to the assessment of the usefulness of urine and saliva for dengue diagnostic. Dengue diagnostic normally requires a venous blood sample that can be difficult to obtain in certain conditions such as in children or during epidemiological studies. Urine and saliva are easier to collect as the procedure is non-invasive. We showed that, although the performances of the different diagnostic methods were not as good in saliva and urine as in plasma specimens, the results obtained by qRT-PCR and by anti-DENV antibody ELISA could well justify the use of these two body fluids to detect dengue infection in situations when the collection of blood samples is difficult. Performances of commercial RDTs developed for NS1 and anti-DENV antibodies (IgM, IgG and IgA) detection in urine and saliva specimens were not satisfactory.

In the last part of the thesis, the potential of use proteinuria as a prognostic marker of severity was assessed but it didn't prove to be a useful marker for risk prediction.

## Key-words

Dengue, diagnosis, urine, saliva, severity marker, rapid diagnostic test

# Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements

**au Dr Med. PhD Philippe Buchy,**

précédent responsable de l'unité de Virologie de l'Institut Pasteur du Cambodge,

pour m'avoir accueillie au sein de son unité,

pour avoir accepté le rôle de directeur de thèse,

et pour m'avoir dirigée et soutenue en toutes circonstances ;

**au Pr Vincent Deubel,**

précédent directeur de l'Institut Pasteur du Cambodge,

pour m'avoir accueillie au sein de l'IPC,

et pour son soutien et ses encouragements

dans la conduite de mes travaux ;

**au Pr Didier Fontenille,**

directeur de l'Institut Pasteur du Cambodge,

pour ses encouragements au cours de ma dernière année de thèse ;

**au Dr Pharm. PhD Philippe Dussart,**

responsable de l'unité de Virologie de l'Institut Pasteur du Cambodge,

pour son soutien durant les derniers mois de ma thèse ;

**au Dr PhD Roger Frutos,**

du CIRAD,

pour son aide dans les démarches administratives auprès de l'université,

sa présence lors de tous mes comités de thèse,

pour ses conseils et encouragements,

et pour avoir accepté de participer à mon jury.

**au Réseau International des Instituts Pasteur,**  
pour m’ avoir accordé la bourse doctorale Calmette,  
et pour m’ avoir ainsi permis de faire ma thèse ;

**au Dr PhD Isabelle Leparc-Goffart,**  
de l’ Institut de Recherche Biomédicale des Armées,  
pour avoir accepté le rôle de rapporteur de ce travail ;

**au Pr Xavier de Lambellerie,**  
de l’ université Aix-Marseille,  
pour avoir accepté le rôle de rapporteur de ce travail ;

**au Pr Christian Devaux,**  
de l’ Institut pour la Recherche et le Développement,  
pour avoir accepté de participer à mon jury ;

**au Dr PhD Marc Grandadam,**  
de l’ Institut Pasteur du Laos,  
pour avoir accepté de participer à mon jury ;

**au Pr Emmanuel Cornillot,**  
de l’ université de Montpellier,  
pour avoir accepté de faire parti de mon jury ;

**au Dr PhD Marie Flamand,**  
de l’ Institut Pasteur de Paris,  
pour sa participation à mes comités de thèse,  
et ses conseils précieux ;

**au Dr Med. PhD Anavaj Sakuntabhai,**  
de l’ Institut Pasteur de Paris,  
pour avoir participé à chacun de mes comités de thèse,  
et pour m’ avoir accueilli trois mois au sein de son unité ;

**au Dr PhD Julien Cappelé,**

du CIRAD,

pour sa grande aide dans l'analyse de mes résultats ;

**à tout le personnel de l'Unité de Virologie de l'IPC,**

et plus particulièrement au personnel travaillant sur les projets dengue,

Veasna, Mme Sivuth, Saraden, Sreymom et Sotheaom ;

**au personnel de l'Unité d'Epidémiologie-Santé publique**

impliqué dans l'étude DENFREE,

pour le travail remarquable qu'ils ont fait sur le terrain,

lors de la collecte des échantillons ;

**à Pheaktra,**

sans qui je ne suis pas sûre que j'aurais réussi à venir au bout de cette aventure

qu'est la thèse ;

**et à toutes les personnes qui ont croisé ma route au Cambodge**

**au cours de ces quatre années de thèse**

**et qui m'ont encouragée et soutenue.**

*A ma grand-mère paternelle,  
à ma grand-mère maternelle,  
à mon grand-père maternel,  
tous trois décédés au cours de mon cursus de thèse  
et auxquels je n'ai pu rendre un dernier hommage.*

# Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	9
<b>Tables des illustrations</b> .....	11
<b>Liste des tableaux</b> .....	12
<b>Liste des articles</b> .....	13
<b>Liste des abréviations</b> .....	14
<b>Introduction</b> .....	15
<b>PREMIERE PARTIE</b> .....	18
<b>Introduction sur la dengue et le virus de la dengue</b> .....	18
1. Le virus de la dengue.....	19
1.1. Présentation du virus .....	19
1.2. Organisation du génome viral .....	20
1.3. Les protéines virales.....	21
1.3.1. Les protéines structurales.....	21
1.3.2. Les protéines non structurales.....	22
1.4. Le cycle viral.....	25
2. La transmission virale .....	28
2.1. Les vecteurs.....	28
2.2. Les cycles du virus .....	30
3. Les pathologies associées au virus de la dengue.....	31
3.1. Les différentes formes de la maladie.....	31
3.1.1. Les formes asymptomatiques et pauci-symptomatiques .....	31
3.1.2. Les formes non compliquées.....	32
3.1.3. Les formes sévères.....	32
3.2. Les facteurs de risque d'une forme hémorragique de la maladie .....	34
3.2.1. Les facteurs liés à l'hôte.....	34
3.2.2. Les facteurs viraux .....	36
3.3. Les classifications cliniques de l'OMS .....	38
4. L'épidémiologie de la dengue .....	39
4.1. Historique .....	39
4.2. La situation épidémiologique mondiale actuelle.....	40
4.3. La situation épidémiologique au Cambodge .....	43
5. Le diagnostic biologique de la dengue .....	44

5.1.	Le diagnostic direct .....	45
5.2.	Le diagnostic indirect .....	47
5.3.	Les marqueurs biologiques prédictifs d'une infection sévère .....	50
5.3.1.	<i>Les marqueurs viraux</i> .....	50
5.3.2.	<i>Les marqueurs biochimiques</i> .....	51
5.3.3.	<i>Les marqueurs immunitaires</i> .....	54
6.	Le traitement de la dengue .....	54
7.	La recherche d'un vaccin .....	55
7.1.	Les vaccins en cours d'essais cliniques .....	55
7.1.1.	<i>Les vaccins vivants atténués simples et recombinants</i> .....	56
7.1.2.	<i>Les vaccins purifiés inactivés</i> .....	60
7.1.3.	<i>Les vaccins à ADN et les vaccins sous-unitaires</i> .....	61
7.2.	Les questions posées par les résultats des essais cliniques de phase II et III .....	62
	<b>DEUXIEME PARTIE</b> .....	64
	<b>Evaluation de l'utilisation d'un test rapide de diagnostic de la dengue sur le terrain</b> .....	64
1.	Contexte et objectifs de l'étude .....	65
2.	Principaux résultats .....	66
3.	Article .....	68
4.	Conclusion et perspectives .....	79
	<b>TROISIEME PARTIE</b> .....	81
	<b>L'urine et la salive pour le diagnostic biologique de la dengue</b> .....	81
1.	Contexte et objectifs de l'étude .....	82
2.	Principaux résultats .....	83
3.	Articles .....	85
4.	Résultats complémentaires .....	157
5.	Conclusion et perspectives .....	158
	<b>QUATRIEME PARTIE</b> .....	160
	<b>La protéinurie : un potentiel marqueur de sévérité?</b> .....	160
1.	Contexte et objectifs de l'étude .....	161
3.1.	Principaux résultats .....	162
3.2.	Article .....	163
3.3.	Conclusion et perspectives .....	194
	<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	197
	<b>Bibliographie</b> .....	201
	<b>Annexes</b> .....	217

# Tables des illustrations

Figure 1 : Arbre phylogénétique regroupant les différents virus du genre <i>Flavivirus</i> .....	19
Figure 2 : Représentation schématique du virus de la dengue .....	20
Figure 3 : Représentation du génome du virus de la dengue.....	21
Figure 4 : Schéma du cycle réplicatif du virus de la dengue dans la cellule hôte .....	26
Figure 5 : Topologie membranaire de la polyprotéine et site de clivage entre les différentes protéines .....	27
Figure 6 : Représentation schématique du complexe de réplication .....	27
Figure 7 : Distribution géographique d' <i>Aedes aegypti</i> (A) et d' <i>Aedes albopictus</i> (B).....	29
Figure 8 : Schématisation des différents cycles des virus de la dengue .....	30
Figure 9 : Modèle de la facilitation immunologique.....	35
Figure 10 : Différentes formes cliniques de la dengue, (A) selon la classification OMS de 1997 et (B) selon la classification OMS de 2009 .....	39
Figure 11 : Répartition mondiale de la dengue .....	41
Figure 12 : Nombre annuel moyen de cas de dengue classique et de dengue hémorragique rapportés à l'OMS et nombre de pays déclarant les cas, entre 1955 et 2007.....	42
Figure 13 : Nombre de cas de dengue enregistrés dans le cadre du programme de surveillance de la dengue au Cambodge .....	43
Figure 14 : Comparaison des avantages et inconvénients des différentes méthodes de diagnostic de la dengue .....	44
Figure 15: Principaux marqueurs utilisés pour le diagnostic d'une infection par le DENV et cinétique des IgM et IgG.....	48
Figure 16 : Différentes stratégies pour la formulation d'un vaccin tétravalent contre le virus de la dengue .....	58
Figure 17 : Comparaison du ratio protéine/créatinine urinaire dans les urines .....	157
Figure 18 : Différentes phases et complications possibles au cours de la dengue .....	196



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition des degrés de sévérité des formes hémorragiques de la dengue selon la classification de l’OMS de 1997 .....	38
Tableau 2 : Vaccins contre la dengue en cours d’essais cliniques .....	56

## Liste des articles

Article 1: Field Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic .....	68
Article 2: Value of routine dengue diagnostic tests in urine and saliva specimens.....	85
Article 3: Evaluation of six commercial kits designed for NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens.....	129
Article 4: Study of proteinuria in dengue fever cases .....	163

# Liste des abréviations

Ae	Aedes
ADE	<i>Antibody Dependant Enhancement</i> ou théorie des anticorps facilitants
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
BRT	<i>Boosted Regression Tree</i>
C	Capside
DENV	<i>Dengue Virus</i> pour Virus de la dengue
DO	Densité optique
DF	<i>Dengue Fever</i> pour dengue classique
DHF	<i>Dengue Hemorrhagic Fever</i> pour dengue hémorragique
DSS	<i>Dengue Shock Syndrome</i> pour dengue avec syndrome de choc
E	Enveloppe
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IHA	Inhibition de l'hémagglutination
IPC	Institut Pasteur du Cambodge
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i> pour virus de l'encéphalite japonaise
M	Membrane
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
prM	Précurseur de la protéine de membrane
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RE	Réticulum endoplasmique
REG	Réticulum endoplasmique granuleux
RT	<i>Reverse Transcriptase</i> pour transcription inverse
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UPCR	<i>Urine Protein:Creatinine ratio</i> pour ratio protéine/créatinine
VPN	Valeur prédictive positive
VPP	Valeur prédictive négative
WNV	<i>West-Nile Virus</i> pour virus du Nil Occidental
YFV	<i>Yellow Fever Virus</i> pour virus de la fièvre jaune
ZIKV	<i>Zika Virus</i> pour virus Zika

# Introduction

---

Le virus de la dengue (DENV) est un arbovirus, de la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus*. Il est transmis à l'homme par les moustiques du genre *Aedes* [1]. Il existe quatre sérotypes majeurs du virus (DENV-1, -2, -3 et -4) et récemment un 5<sup>ème</sup> sérotype, dont la circulation est restée très limitée géographiquement, a été mis en évidence en Malaisie [2]. Si la plupart des infections par le DENV sont asymptomatiques ou se traduisent par un syndrome fébrile sans gravité, le virus peut aussi causer une maladie plus sévère caractérisée par une fuite plasmatique, avec ou sans hémorragie. Sans prise en charge adéquate, les formes les plus sévères de la maladie peuvent évoluer vers un syndrome de choc, potentiellement mortel.

L'épidémiologie de la dengue est très dynamique, aussi bien en terme d'expansion géographique qu'en terme d'intensité. La maladie tend à émerger ou à réémerger dans des régions où elle était autrefois absente tandis que la situation s'aggrave là où elle était déjà présente. Certaines régions passent ainsi d'une situation endémo-épidémique à l'hyperendémicité. Une augmentation des formes sévères de la maladie est aussi observée. Au cours des 50 dernières années, le nombre de cas rapportés à l'Organisation Mondiale de la Santé a ainsi été multiplié par 30 [3]. La dengue sévit aujourd'hui dans environ 140 pays tropicaux ou subtropicaux et une étude récente estime à 96 millions le nombre des infections symptomatiques et à 294 millions celui des infections asymptomatiques [4]. La dengue est aujourd'hui considérée comme la plus grave des maladies virales humaines transmises par les arthropodes et constitue un problème majeur de santé publique.

Ce travail de thèse a porté sur la problématique du diagnostic biologique de la dengue. Les symptômes initiaux de la dengue étant peu spécifiques et partagés par de nombreuses autres maladies infectieuses, le diagnostic biologique est nécessaire pour confirmer ou orienter le diagnostic. D'un point de vue clinique, un diagnostic biologique précoce de la dengue est important pour assurer une bonne prise en charge des patients. Bien qu'il n'existe pas de traitement spécifique de la dengue, une prise en charge simple et précoce, basée essentiellement sur la réhydratation du patient, permet de prévenir la survenue de complications éventuelles et ceci quel que soit le degré de sévérité de la maladie. La

confirmation biologique d'une dengue permet aussi d'éviter la prescription inutile d'un traitement antibiotique. Du point de vue de la santé publique, dans un contexte de diffusion globale de la maladie, des outils fiables permettant d'identifier rapidement les épidémies sont nécessaires. L'identification rapide d'une épidémie permet, en effet, de mettre en place des mesures de contrôle vectoriel et de protection individuelle qui contribuent à limiter la propagation de la maladie.

Au cours de ces dernières années, de nombreux tests de diagnostic rapide (TDR), reposant habituellement sur une approche de type immunochromatographie, ont été développés. Ces tests ont l'avantage de ne nécessiter que très peu de matériel et de permettre l'obtention d'un résultat rapide, très souvent en moins de 30 minutes. Ils sont donc utilisables dans tous les types de structures médicales, des plus rudimentaires aux mieux équipées. Une première partie du travail a été consacrée à l'évaluation d'un TDR permettant la détection simultanée de l'antigène NS1, des IgM et des IgG dirigées contre le DENV dans le sang. L'originalité de ce travail a résidé dans le fait que cette évaluation était la première à être basée sur une étude prospective avec un test évalué dans des conditions de terrain, au chevet du patient, dans une structure de soin peu équipée, représentative de la réalité de beaucoup de pays d'endémie de la dengue. Ce travail a fait l'objet d'un premier article publié dans PLOS Neglected Tropical Diseases (**publication 1:** [Andries AC](#), Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, Te V, Y B, Try PL, Buchy P. Fiel Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detect Dengue NS1, IgM and IgG. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(12):e1993).

Dans une deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des urines et de la salive pour le diagnostic de la dengue. Les différentes techniques de diagnostic de la dengue requièrent habituellement un échantillon sanguin. Néanmoins, l'obtention de sang peut être compliquée dans certaines conditions, notamment chez les enfants ou lors d'enquêtes séro-épidémiologiques et d'investigations d'épidémie. Les cinétiques d'excrétion du virus, de l'ARN viral, de la protéine NS1 et des anticorps anti-DENV (IgM, IgA, IgG) dans ces deux fluides biologiques ont ainsi été étudiées et comparées à celles observées dans le plasma afin de déterminer l'intérêt de l'utilisation de l'urine et de la salive. Ce travail a fait l'objet d'un article, publié dans PLOS Neglected Tropical Diseases (**publication 2:** [Andries AC](#), Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, Lorn Try P, Ros S, Ong S, Huy R, Horwood P, Flamand M, Sakuntabhai A, Tarantola A, Buchy P. Value of routine

dengue diagnostic tests in urine and saliva specimens. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 25;9(9):e0004100). Une évaluation de six TDR destinés à la détection de l'antigène NS1 et des anticorps anti-DENV (IgM, IgA, IgG) dans l'urine et la salive a aussi été réalisée. Un manuscrit présentant les résultats de ce travail a été soumis BMC Infectious Diseases en novembre 2015 (**publication 3:** Andries AC, Duong V, Ong S, Ros S, Horwood P, Dussart P, Buchy P. Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens).

La dernière partie du travail de thèse a porté sur l'étude de la protéinurie comme potentiel marqueur biologique de sévérité de la maladie. Un biomarqueur, simple à mesurer, qui permettrait de différencier les patients qui risquent d'évoluer vers une forme sévère de la maladie de ceux qui vont guérir sans complication, serait d'une grande utilité pour les cliniciens car cela permettrait notamment de n'hospitaliser que les patients devant bénéficier d'une surveillance accrue en raison d'un risque plus élevé d'évolution vers une forme sévère. L'étude de la protéinurie fait l'objet d'un manuscrit qui a été soumis BMC Infectious Diseases en décembre 2015 (**publication 4:** Andries AC, Duong V, Cappelle J, Ong S, Kerleguer A, Ly S, Tarantola A, Horwood P, Dussart P, Buchy P. Proteinuria in paediatric dengue fever cases).

## **PREMIERE PARTIE**

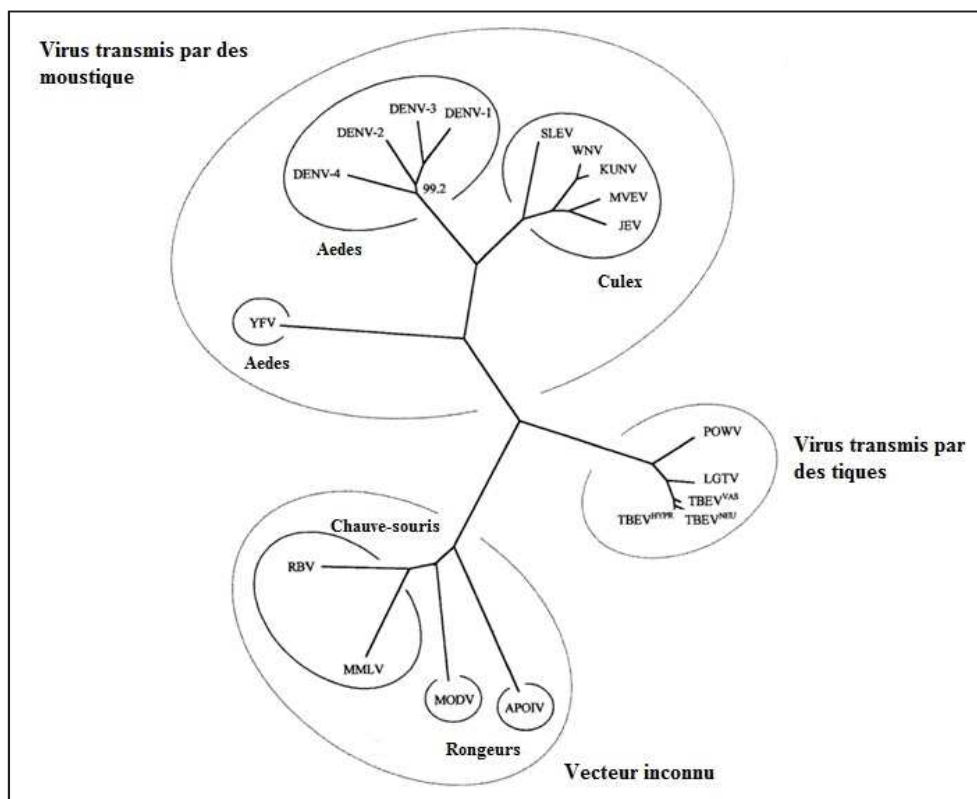
### **Introduction sur la dengue et le virus de la dengue**

---

# 1. Le virus de la dengue

## 1.1. Présentation du virus

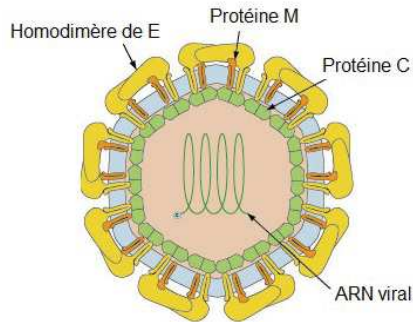
Le virus de la dengue (DENV), comme le virus de la fièvre jaune (YFV), le virus West Nile (WNV) ou encore le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), est un arbovirus, appartenant à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus* [1]. Le genre *Flavivirus* regroupe des virus transmis par des moustiques ou des tiques, ainsi que certains virus sans aucun vecteur arthropode connu (figure 1). Les flavivirus ont une morphologie semblable avec une organisation du génome viral similaire et des déterminants antigéniques communs.



**Figure 1 : Arbre phylogénétique regroupant les différents virus du genre *Flavivirus* [5]**

SLEV : Virus de l'encéphalite de Saint-Louis, WNV : Virus West-Nile, KUNV : Virus Kunjin, MVEV : Virus de l'encéphalite de la Murray Valley, JEV : Virus de l'encéphalite japonaise, POWV : Virus Powassan, LGTV : Virus Langat, TBVE : Virus de l'encéphalite à tiques, VAS : souche Vasilchenko, NEU : souche Neudoerfl, HYPR : souche Hypr, RBV : Virus Rio Bravo, MMLV : virus de la leuco-encéphalite des myotis du Montana, MODV : Virus Modoc, APOIV : Virus Apoi





**Figure 2 : Représentation schématique du virus de la dengue**

La particule virale est enveloppée par une double couche lipidique, issue du réticulum endoplasmique (RE) de l'hôte, dans laquelle sont ancrées les protéines de membrane (M) et d'enveloppe (E). Le virion mature a un diamètre d'environ 50 nm. La nucléocapside, de forme icosaédrique, est formée par des protéines de capsid (C) associées au génome viral (figure 2).

Jusque récemment, quatre sérotypes de dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4), affectant l'homme et engendrant la même symptomatologie clinique, étaient connus. En 2013, un 5ème sérotype, à l'origine d'une épidémie humaine en Malaisie, a été mis en évidence [2]. Les sérotypes se subdivisent ensuite en différents génotypes. Les sérotypes ont environ 65% de leur génome en commun.

## 1.2. Organisation du génome viral

L'information génétique du DENV est portée par un ARN linéaire simple brin de polarité positive (ARN+) d'environ 11 000 nucléotides. Comme tous les virus à ARN positif, l'ARN du DENV est infectieux et peut générer un cycle complet de réplication dès sa libération dans le cytoplasme de la cellule infectée. Cet ARN contient un unique cadre de lecture ouvert codant une polyprotéine d'environ 3 400 acides aminés clivée co- ou post- traductionnellement par des protéases cellulaires ou virales. Le clivage de cette polyprotéine génère trois protéines de structure, C (protéine de capsid), prM (précurseur de la protéine de membrane) et E (protéine d'enveloppe) ainsi que sept protéines non structurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 (figure 3) [6].

Le cadre ouvert de lecture est flanqué de deux régions non-codantes. En 5', la région non codante contient environ 100 nucléotides et possède une coiffe de type 1 (N7meGpppA2'Ome-RNA) permettant à l'ARN viral d'échapper à une dégradation par des exonucléases lorsqu'il est libéré dans le cytoplasme des cellules infectées. L'extrémité 3' contient, quant à elle, entre 400 et 700 nucléotides

et n'est pas polyadénylée. Ces deux régions ont des structures secondaires en épingle à cheveux et sont impliquées dans la réplication du génome. Outre les structures secondaires, chaque extrémité contient des séquences complémentaires à l'autre extrémité qui permettent une cyclisation du génome lors de la réplication [7].

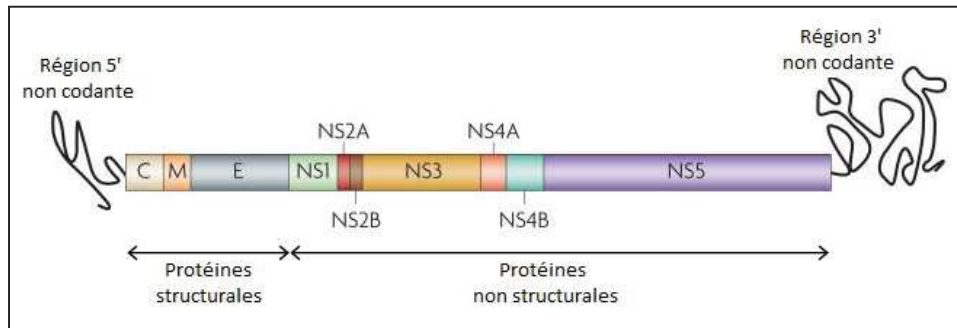


Figure 3 : Représentation du génome du virus de la dengue (d'après Guzman *et al.* [8])

## 1.3. Les protéines virales

### 1.3.1. Les protéines structurales

La **protéine C**, ou protéine de capsid, est une protéine d'environ 12 kDa. Elle contient environ 25% d'acides aminés basiques qui permettent son association à l'ARN génomique pour former un complexe ribonucléoprotéique. Outre son rôle majeur dans l'assemblage des virions, il semblerait que cette protéine ait d'autres fonctions importantes. En effet, une grande partie des protéines de capsid synthétisées lors de la réplication du virus se retrouve dans le noyau de la cellule infectée, alors que l'encapsidation de l'ARN viral a lieu dans le cytoplasme. La translocation dans le noyau est permise grâce à la présence au sein de la protéine de trois signaux de localisation nucléaire. Dans le noyau, la protéine C est capable de se fixer à plusieurs protéines nucléaires, notamment la protéine Daxx qui intervient dans une voie d'apoptose de la cellule [9]. Il semblerait aussi que la protéine C puisse se fixer sur les histones et ainsi perturber la machinerie génétique de la cellule hôte en faveur de la réplication et du cycle viral [10].

La **protéine M**, ou protéine de membrane, est dans un premier temps synthétisée sous une forme immature glycosylée prM, de 26 kDa. Le clivage de la protéine prM en protéine M (environ 8 kDa) arrive très tardivement dans le processus de maturation du virus lors du transit dans le réseau trans-golgien avant la libération des particules virales matures. Le clivage est réalisé par des protéases

cellulaires, les furines. A la surface des virions immatures, la protéine prM est associée à la protéine E et il semblerait que même après clivage, le peptide « pr » reste associé à la protéine E. Ce peptide ne se détacherait que lors de la libération du virus dans le milieu extracellulaire du fait du changement de pH. Le rôle du peptide « pr » serait donc de couvrir le peptide de fusion de la protéine E, empêchant ainsi la fusion prématurée du virus avec les membranes intracellulaires, avant sa libération dans le milieu extracellulaire [11]. La protéine M mature se compose d'un ectodomaine, côté N terminal de la protéine, et de deux domaines transmembranaires qui assurent son ancrage membranaire, côté C terminal [12]. L'ectodomaine contient une séquence de neuf acides aminés, nommée ApoptoM, capable d'activer la voie apoptotique dépendante de la mitochondrie [13,14]

La **protéine E**, ou protéine d'enveloppe, est une glycoprotéine d'environ 53 kDa. Le virus est couvert de 180 monomères de protéine E dont l'arrangement dépend du pH. A pH neutre, les protéines sont groupées en dimères alors qu'à pH acide le virus change de conformation et les protéines E sont groupées en trimères. Cette protéine se compose de trois ectodomains (EDI, EDII et EDIII) et d'un domaine transmembranaire. Le domaine EDII contient l'interface permettant la dimérisation. Son extrémité forme une boucle hydrophobe qui constitue le peptide de fusion. Le domaine EDIII a une structure de type immunoglobuline et est hautement immunogénique. Il semblerait que ce domaine porte le site de fixation du virus aux cellules cibles. Les deux domaines EDII et EDIII sont chacun liés au domaine EDI par des boucles flexibles permettant des rotations entre les différents domaines. Le changement de conformation déclenché par l'acidification est lié à ces rotations entre domaines.[15]

### ***1.3.2. Les protéines non structurales***

La **protéine NS1** est une glycoprotéine de poids moléculaire compris entre 46 kDa et 55 kDa selon le niveau de glycosylation. Cette protéine existe sous une forme intracellulaire et une forme extracellulaire [16]. La forme intracellulaire, ancrée en dimère dans la membrane interne du réticulum endoplasmique (RE), joue un rôle essentiel lors de la réplication du virus. Cette forme de la NS1 fait en effet parti du complexe de réplication et certaines mutations de la protéine altèrent le processus de réplication [17]. Néanmoins, son rôle précis reste inconnu. Un des rôles envisagés serait un rôle d'ancrage du complexe de réplication dans la membrane du RE avec l'aide de la protéine NS4A. La forme extracellulaire circulante est un hexamère, ou plus exactement un trimère de dimère, en forme

de tonneau d'environ 10 nm de diamètre. Dans la cavité formée, se trouvent des lipides (triglycérides, esters de cholestérol, phospholipides) qui stabilisent l'hexamère de NS1 [18]. Cette forme de la protéine est détectable dans le sang de la personne infectée à des concentrations allant de quelques nanogrammes à plusieurs microgrammes par millilitre [19–22]. La protéine NS1 ainsi que les anticorps anti-NS1 semblent être impliqués dans la pathogénèse [23–26]. Une étude récente menée *in vivo* sur un modèle murin a montré que la NS1 seule induit une perméabilité vasculaire, symptôme caractéristique de la dengue, ainsi que la production de TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) et d'IL-6 (Interleukine 6) [26]. La production de ces deux cytokines serait le résultat d'une activation du système immunitaire inné par la NS1, via les TLRs (Toll-Like Receptors) [24,25].

La **protéine NS2A** est une protéine hydrophobe d'environ 22 kDa, contenant plusieurs domaines transmembranaires. Cette protéine semble jouer un rôle essentiel dans l'assemblage du virus lors de la réplication du DENV. Grâce à sa capacité à fixer l'ARN viral, au niveau de la région 3' non traduite, la protéine NS2A est probablement responsable du transport de l'ARN viral néo-synthétisé, au sein des vésicules de réplication, vers les sites adjacents d'assemblage du virus.[27]

La **protéine NS2B** est une petite protéine de 14 kDa contenant un centre hydrophile qui permet l'interaction avec la partie protéase de la protéine NS3 dont elle est le cofacteur. Cette partie hydrophile est encadrée par 2 régions hydrophobes, contenant chacune deux hélices  $\alpha$ , qui permettent un ancrage du complexe NS2B-NS3 dans la membrane du RE [28].

La **protéine NS3** est une protéine cytoplasmique multifonctionnelle de 70 kDa. Cette protéine contient diverses activités enzymatiques l'impliquant notamment dans la réplication de l'ARN, la synthèse et la maturation des protéines virales. Le tiers de l'extrémité N terminale de la protéine, lorsqu'il est associé à son cofacteur NS2B, a une fonction de sérine-protéase qui va permettre de cliver en parti la polyprotéine formée suite à la traduction de l'ARN viral. Le complexe NS2B-NS3 intervient pour le clivage des jonctions NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A et NS4B-NS5. La protéase intervient aussi plus tard lors de la maturation des protéines C, NS2A, NS3 et NS4A. La partie C terminale de la NS3 possède trois autres fonctions enzymatiques nécessaires pour la réplication du génome viral : une fonction 5' ARN-triphosphatase, une fonction nucléosidetriphosphatase et une fonction hélicase. La fonction hélicase permettrait de défaire les structures secondaires contenues dans les régions non

codantes du génome viral permettant ainsi l'initiation de la synthèse des brins d'ARN de polarité négative (ARN-) par la protéine NS5. Les activités triphosphatases serviraient quant à elles à déphosphoriler l'extrémité des ARNs de polarité positive néo-synthétisés avant l'ajout de la coiffe par la protéine NS5.[29]

Les **protéines NS4A et NS4B** sont deux petites protéines hydrophobes d'environ 16 kDa et 27 kDa, respectivement. L'interaction de la protéine NS4A avec la protéine NS1 montre l'implication de cette protéine dans la réplication de l'ARN [30], probablement indirectement, comme protéine d'ancrage membranaire du complexe de réplication. Elle semblerait aussi être un élément important dans l'altération des membranes intracellulaires qui se produit lors de l'infection. Elle semble notamment être impliquée dans la formation des vésicules de réplication [31]. La fonction de la protéine NS4B dans le cycle de réplication est mal définie. Il semblerait que la NS4B interagisse avec la partie hélicase de la protéine NS3 et elle pourrait servir à maintenir les brins d'ARN complémentaires séparés suite à l'action de l'hélicase [32].

La **protéine NS5** est la plus grosse protéine codée par le génome du DENV (103 kDa) et la protéine la plus conservée parmi les *Flavivirus*. On retrouve au sein de cette protéine deux domaines fonctionnels majeurs. Le premier domaine d'environ 33 kDa, côté N-terminal de la protéine, est un domaine S-adenosylmethioninemethyltransferase qui permet l'addition de la coiffe sur les ARNs viraux néo-synthétisés. A l'extrémité C-terminale de la protéine, se trouve l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) nécessaire à la réplication du génome viral. Cette polymérase n'a pas besoin d'amorces pour initier la réplication. Entre les deux domaines fonctionnels se trouve une région permettant à la protéine NS5 d'interagir avec l'hélicase de la protéine NS3.[29]

En plus d'être directement impliquée dans le cycle de réplication du virus, la majorité des protéines non structurales semble servir à contourner la réponse immunitaire innée de l'hôte, et plus particulièrement l'interféron de type 1 [33]. Ainsi le complexe NS2B/NS3 semble inhiber la production de l'interféron de type 1 alors que les protéines NS2A, NS4A, NS4B et NS5 pourraient intervenir en bloquant certaines étapes dans les voies de réponse à l'interféron de type 1. La NS1 semble quant à elle intervenir au niveau du système du complément.

## 1.4. Le cycle viral

Le cycle du virus de la dengue est principalement cytoplasmique. Il se décompose en plusieurs étapes: l'adsorption et la pénétration du virion dans la cellule, la réplication du génome viral, la synthèse et la maturation des protéines virales, et enfin la formation et la libération de nouvelles particules virales (figure 4).

Le DENV pénètre dans les cellules cibles (cellules dendritiques, monocytes ou macrophages) par endocytose après s'être fixé sur son récepteur cellulaire. A l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus concernant le ou les récepteur(s) permettant l'attachement du DENV aux cellules cibles. Plusieurs molécules ont été identifiées comme des récepteurs possibles du virus sur la membrane de cellules de mammifères, notamment des molécules d'adhésion de type aminoglycane telles que l'héparane sulfate, des récepteurs de type lectines tels que le récepteur CD209 (DC-SIGN) ou les récepteurs du mannose, le récepteur CD14, les protéines TIM et TAM et de nombreuses autres molécules. La fixation du virus à la cellule cible pourrait nécessiter plusieurs interactions successives avec plusieurs récepteurs différents. Le récepteur DC-SIGN et les glycoaminoglycanes seraient les facteurs d'attachement de première ligne. Une seconde ligne de récepteurs de plus haute affinité interviendrait ensuite et permettrait l'entrée du virus dans la cellule [34]. Il est possible que le processus d'entrée du virus dans la cellule cible ne fasse pas intervenir les mêmes récepteurs pour tous les sérotypes [35].

Le virus entre dans les cellules cibles par endocytose clathrine-dépendante. Dans le cas d'une infection secondaire (seconde infection par le virus de la dengue, mais de sérotype différent de celui de la primo-infection encore appelée infection primaire), un second mécanisme, indépendant du récepteur viral, viendrait fortement favoriser l'infection des monocytes. Ce phénomène, appelé ADE pour « Antibody Dependant Enhancement » ou « phénomène de facilitation immunologique », serait lié à la présence d'anticorps hétérologues, appelés anticorps facilitant, induits au cours de la primo-infection, et présents à des taux non neutralisants au moment de l'infection secondaire. Ces anticorps, en formant des complexes avec le virus, faciliteraient l'entrée du virus dans les monocytes via un mécanisme d'endocytose dépendant de récepteurs pour le domaine Fc des IgG (Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RII) [36].

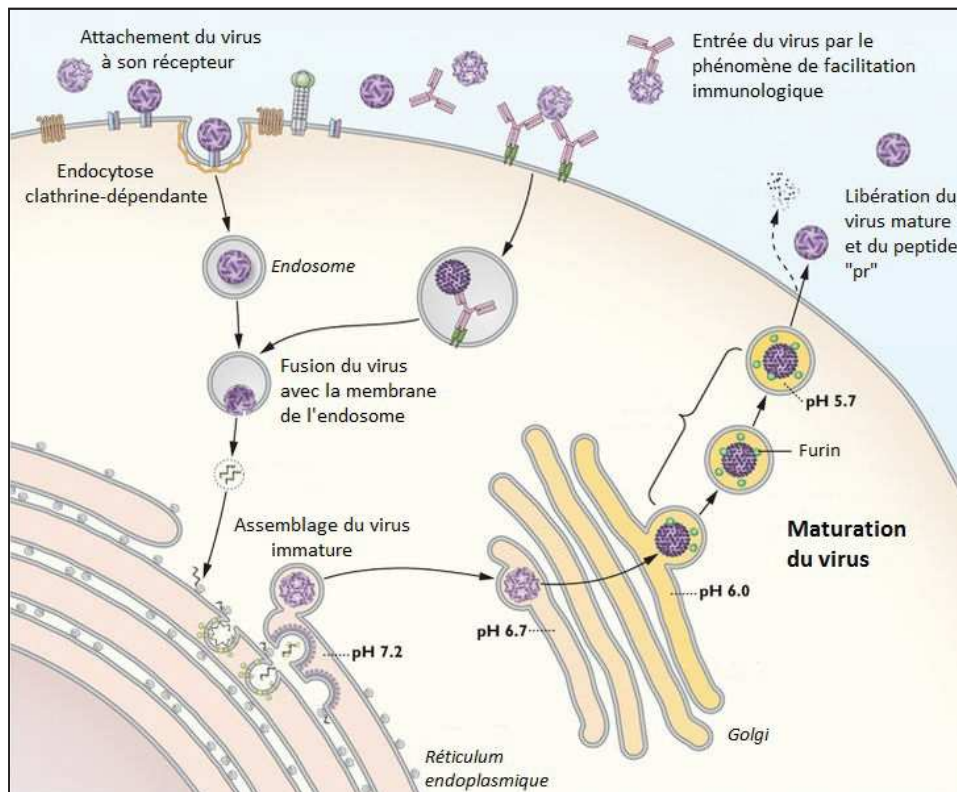
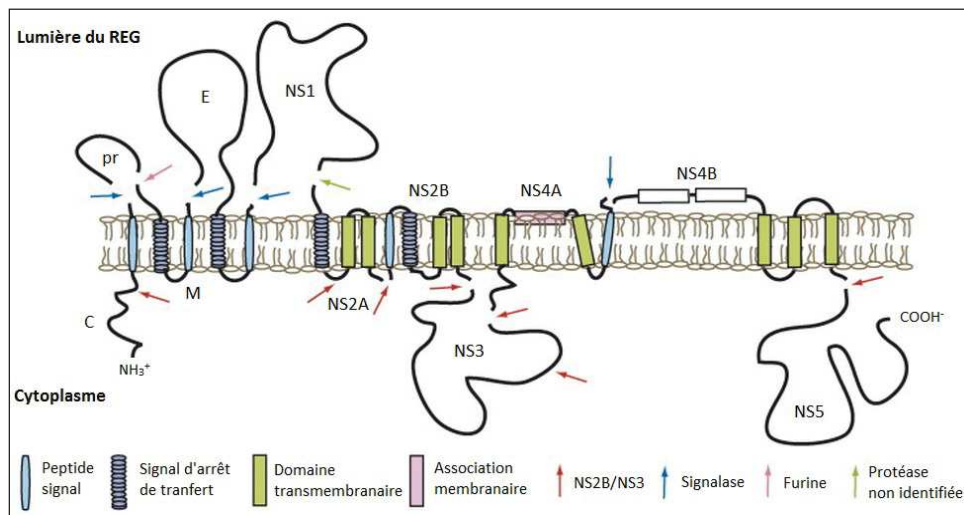


Figure 4 : Schéma du cycle réplcatif du virus de la dengue dans la cellule hôte [15]

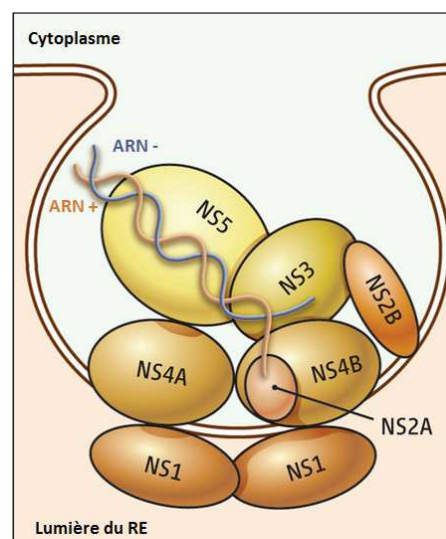
L'acidification de l'endosome formé lors du processus d'endocytose entraîne un réarrangement structural irréversible de la glycoprotéine E. Cette protéine passe d'une structure homodimérique à une structure homotrimérique, favorisant alors l'exposition d'un peptide hydrophobe de la protéine E. Ce peptide permet d'initier la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome d'origine cellulaire, entraînant ainsi la libération de la nucléocapside dans le cytosol. Les protéines de capsid se dissocient alors de l'ARN viral. Ce dernier est transporté jusqu'au réticulum endoplasmique granuleux (REG) où il va être traduit en une polyprotéine. Cette polyprotéine, associée en plusieurs points à la membrane du REG, est ensuite clivée co- et post-traductionnellement par des protéases virales (complexe NS2B-NS3) et cellulaires pour donner les protéines structurales et non structurales. Les sites de clivage et la topologie de la polyprotéine dans la membrane du réticulum REG sont représentés figure 5. Les protéines non structurales produites vont alors servir à la réplication du génome.





**Figure 5 : Topologie membranaire de la polyprotéine et site de clivage entre les différentes protéines [37]**  
REG : Réticulum endoplasmique granuleux

La réplication a lieu au niveau de vésicules de réplication formées par invagination de la membrane du REG sur laquelle est ancré le complexe de réplication, probablement formé des sept protéines non-structurales (figure 6). La réplication a lieu selon un mode semi-conservatif, asymétrique. L'ARN viral engagé dans le complexe de réplication sert d'abord à la synthèse du brin complémentaire d'ARN<sup>-</sup>. Ce brin de polarité négative permet ensuite la synthèse de nouveaux brins d'ARN<sup>+</sup> [6]. Pour la synthèse du brin d'ARN<sup>-</sup>, il semblerait que la protéine NS5 vienne dans un premier temps se fixer au niveau de la zone 5' non codante de l'ARN viral. Ensuite, la cyclisation du génome permettrait de mettre en contact la polymérase RdRp de la NS5 avec l'extrémité 3' de l'ARN viral, entraînant alors le début de la polymérisation du brin d'ARN<sup>-</sup> [38].



**Figure 6 : Représentation schématique du complexe de réplication [39]**  
RE : Réticulum endoplasmique



Les brins d'ARN<sup>+</sup> synthétisés sont ensuite transportés dans le cytoplasme où ils vont interagir avec les protéines de capsid. Le complexe ARN/protéine C s'associe à la membrane du REG dans laquelle sont ancrées les protéines prM et E. La membrane se déforme alors pour envelopper la nucléocapside néoformée donnant naissance à des virions immatures à l'intérieur du REG. Les virions subissent ensuite une maturation au cours de leur transport vers la membrane de la cellule infectée dans le réseau trans-golgien. Le pH acide du réseau trans-golgien va en effet permettre le changement de conformation de la protéine E. Suite à ce changement de conformation, la jonction pr/M est clivée grâce à une furine présente dans le réseau trans-golgien. Néanmoins le peptide « pr » reste associé à la protéine E. Arrivé à la membrane cellulaire, le virion est libéré dans l'environnement extracellulaire par exocytose. Le peptide « pr » se détache alors du virion qui devient infectieux.

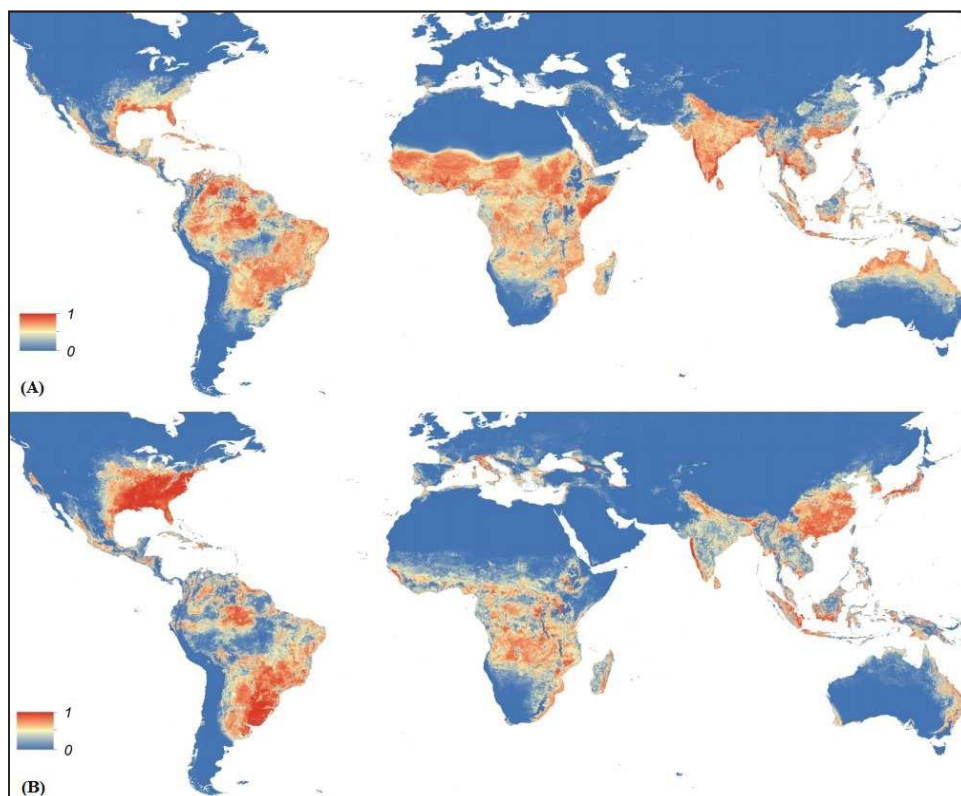
## 2. La transmission virale

### 2.1. Les vecteurs

Le principal vecteur du DENV est *Aedes aegypti*, une espèce de moustique anthropophile très bien adaptée à l'environnement urbain. Il constitue un très bon vecteur du fait de ses préférences de vie : préférence pour des gîtes larvaires dans des conteneurs d'eau propre et artificielle de type jarres, barriques, citernes, vases, pots, etc., que l'on trouve dans les maisons ou aux alentours proches ; préférence trophique sur l'homme ; et préférence à se reposer à l'intérieur des maisons plutôt qu'à l'extérieur. De plus, les femelles *Ae. aegypti* étant très craintives, il est fréquent qu'elles interrompent leur repas sanguin si l'hôte sur lequel elles se nourrissent bouge légèrement. Elles reviennent ensuite un peu plus tard finir leur repas, sur le même hôte ou un hôte différent. Elles se nourrissent donc souvent sur plusieurs personnes au cours d'un même repas sanguin et peuvent ainsi, si elles sont infectées par le DENV, infecter plusieurs personnes très rapidement [1]. Initialement originaire d'Afrique, cette espèce de moustique a aujourd'hui colonisé tous les territoires des zones tropicales et intertropicales, entre les isothermes 10°C de janvier dans l'hémisphère nord et 10°C de juillet dans l'hémisphère sud (figure 7A).

*Aedes albopictus* est un vecteur secondaire du virus. Ce moustique, forestier à l'origine, s'est adapté à l'environnement humain sans pour autant acquérir le même degré de domestication qu'*Ae. aegypti*. Cet insecte peut choisir comme gîtes larvaires aussi bien des conteneurs naturels tels que des trous

d'arbres, des aisselles de plantes, des branches de bambous etc. que des récipients artificiels comme *Ae. aegypti*. Bien qu'il ait une préférence pour l'homme, *Ae. albopictus* peut aussi se nourrir sur des animaux. Cette diversité d'habitat et d'hôte nourricier explique la présence de ce vecteur en milieu rural, péri-urbain et urbain. Les préférences d'*Ae. albopictus* ne suffisent néanmoins pas à expliquer pourquoi ce moustique n'est qu'un vecteur secondaire. Aux différences comportementales entre *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, s'ajoute aussi une différence de compétence entre ces deux espèces pour le DENV. Si les cellules mésentériques d'*Ae. albopictus* sont plus sensibles à l'infection par le DENV que celles d'*Ae. aegypti*, le virus diffuse ensuite moins bien vers les glandes salivaires chez *Ae. albopictus* que chez *Ae. aegypti*. *Ae. albopictus* est donc moins efficace à disséminer le virus et moins susceptible de déclencher des épidémies [40,41]. Certaines souches d'*Ae. albopictus* ont la capacité de rentrer en diapause hivernale, expliquant la présence de ce moustique jusqu'à l'isotherme  $-5^{\circ}\text{C}$ , soit une distribution beaucoup plus au nord que celle d'*Ae. aegypti* (figure 7B) [42].



**Figure 7 : Distribution géographique d'*Aedes aegypti* (A) et d'*Aedes albopictus* (B) [43]**

L'espèce *Ae. polynesiensis* ainsi que d'autres espèces du groupe des *Ae. scutellaris* sont aussi des vecteurs du virus [42]. Ces différentes espèces sont néanmoins des vecteurs mineurs de la maladie du fait de leur répartition géographique très restreinte.

## 2.2. Les cycles du virus

Il existe deux cycles majeurs de transmission des virus de la dengue (figure 8). Le premier, le cycle ancestral selvatique, fait intervenir le moustique et les primates non humains vivant dans la canopée des forêts humides, en Afrique et en Asie. Le second, le cycle urbain, fait intervenir le moustique et l'homme. Les 2 cycles sont aujourd'hui complètement indépendants.

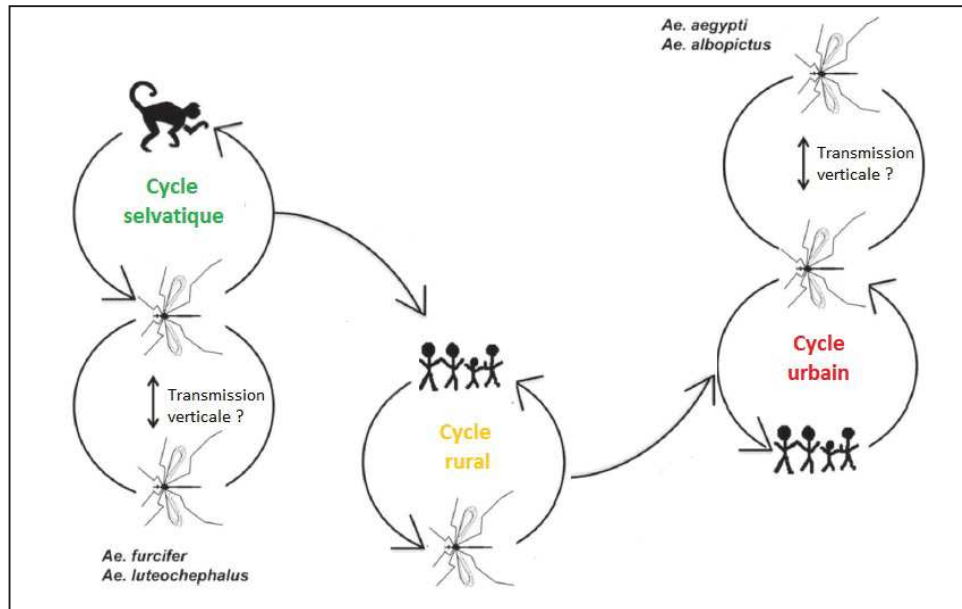


Figure 8 : Schématisation des différents cycles des virus de la dengue (d'après Weaver et Vasilakis [44])

Il existe un 3<sup>ème</sup> cycle, devenu aujourd'hui mineur, le cycle rural, qui entrainerait le passage du virus d'un singe du cycle selvatique à un homme (figure 8). Le virus engendre alors une épidémie qui prend fin lorsque la majorité de la population présente dans la zone de circulation du virus a été infectée. Néanmoins, c'est au cours d'un tel cycle que le virus peut s'installer dans un cycle urbain. L'existence du 3<sup>ème</sup> cycle a récemment été illustrée lors d'une épidémie à Bornéo au cours de laquelle un nouveau sérotype de la dengue a été identifié. A l'heure actuelle, il semblerait que le nouveau sérotype n'ait pas réussi à se maintenir dans un cycle humain mais il semble continuer à circuler dans les populations de primates de Bornéo [2].

Lors de la piqûre, le virus est inoculé dans l'espace sous-cutané ou intradermique de l'hôte vertébré par injection de salive par une femelle moustique *Aedes* infectée, au cours de son repas sanguin. L'incubation chez l'homme, ou cycle d'amplification intrinsèque, débute après la piqûre du moustique infectant et dure de 3 à 14 jours (en moyenne 4 à 7 jours). A l'issue de cette incubation, l'homme

développe une phase de virémie qui précède les premiers signes cliniques de un à deux jours et qui peut durer jusqu'à une dizaine de jours après l'apparition de la fièvre. Au cours de cette période où le virus circule dans le sang périphérique, l'homme est infectieux pour un moustique vecteur compétent qui viendrait prendre son repas sanguin [1].

Après ingestion du virus par le moustique, les particules virales arrivent au niveau de l'estomac puis infectent les cellules mésentériques de l'insecte. Le virus va ensuite pouvoir se multiplier et diffuser dans tous les organes du moustique, notamment au niveau des glandes salivaires. La période comprise entre l'ingestion du virus et son apparition dans les glandes salivaires du vecteur est appelée cycle d'amplification extrinsèque. Elle dure entre 8 et 15 jours. Cette durée varie en fonction des conditions climatiques (température, pluviométrie, hygrométrie) [45]. Lorsque cette répllication virale s'est opérée, la femelle moustique devient à son tour infectante et le restera tout au long de son existence. Au cours de l'amplification extrinsèque a lieu le cycle gonotrophique du moustique. En effet, le repas sanguin permet à la femelle d'assimiler les protéines nécessaires au développement de ses œufs. La femelle moustique passe d'un stade gorgé, à un stade semi-gravide puis gravide. Cette étape dure trois à quatre jours à l'issue desquels elle va être capable de pondre ses œufs. Bien que le mécanisme ne soit pas complètement élucidé, le moustique femelle pourrait transmettre le virus de la dengue à sa descendance par transmission verticale [46,47].

### **3. Les pathologies associées au virus de la dengue**

#### **3.1. Les différentes formes de la maladie**

L'infection par le virus de la dengue peut se traduire de manières très variées, allant de formes asymptomatiques ou pauci-symptomatiques à des formes graves potentiellement mortelles.

##### ***3.1.1. Les formes asymptomatiques et pauci-symptomatiques***

L'infection par le DENV n'entraîne pas forcément des symptômes importants. Il existe des formes a- et pauci-symptomatiques de l'infection mais la proportion de telles formes reste encore aujourd'hui mal connue. L'importance des formes asymptomatiques est difficile à estimer et varie beaucoup selon les différentes études réalisées. On rapporte généralement dans la littérature 42% à 93% d'infections asymptomatiques [48]. Beaucoup de ces infections asymptomatiques seraient en fait des formes pauci-

symptomatiques dans lesquelles les symptômes seraient mineurs et ne justifieraient ni de consultation médicale ni d'interruption des activités quotidiennes (travail, scolarisation, etc.).

### ***3.1.2. Les formes non compliquées***

La dengue classique est de courte durée (2 à 7 jours). Elle est caractérisée par un syndrome pseudo-grippal de début brutal associant principalement une forte fièvre ( $> 38,5^{\circ}\text{C}$ ), des céphalées, des myalgies, des arthralgies et des douleurs rétro-orbitaires. Après les deux à quatre premiers jours de maladie, une éruption maculo-papuleuse généralisée, un érythème, ou encore un purpura peuvent apparaître. Des saignements mineurs ainsi que des symptômes gastro-intestinaux (nausées, vomissements) peuvent aussi être observés. D'un point de vue biologique, une dengue non compliquée s'accompagne habituellement d'une leucopénie, d'une neutropénie, d'une thrombopénie modérée, et d'une élévation discrète des transaminases sériques. L'hématocrite et le taux d'hémoglobine sont généralement normaux.

### ***3.1.3. Les formes sévères***

La forme sévère de la maladie la plus couramment observée est la forme dite hémorragique. Les formes hémorragiques de la maladie débutent comme une dengue classique puis, après deux à sept jours et une fois le retour à la normale de la température, l'infection se complique. La principale anomalie observée est une augmentation de la perméabilité vasculaire qui mène à des hémorragies ou à des accumulations liquidiennes (épanchement pleural, épanchement péricardique, ascite, etc.), à une hémococoncentration, une hypoprotéinémie et une diminution de la pression artérielle. Dans les cas les plus graves, une diminution de plus 20% du volume plasmatique peut être observée. Sans prise en charge adéquate, un choc hypovolémique peut survenir et entraîner la mort du patient dans les 24-48 heures après le début de la phase critique. Les signes d'alerte de la dengue hémorragique sont : une sensation de malaise, des douleurs abdominales, des vomissements persistants, une gêne respiratoire et des manifestations hémorragiques (saignements du nez ou des gencives, méléna, hématurie). Lors de la survenue d'un choc, des signes de défaillance circulatoire s'associent aux signes de la forme hémorragique : hypothermie, peau moite, cyanose, somnolence ou agitation, pouls rapide et faible, pincement de la tension différentielle.

Les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la perméabilité vasculaire ne sont à l'heure actuelle toujours pas complètement élucidés. La compréhension de la pathogénie est entravée par l'absence d'un modèle animal satisfaisant qui reproduirait la fuite plasmatique observée au cours d'une infection humaine par le DENV. Bien qu'il soit possible d'infecter *in vitro* des cellules endothéliales par le DENV, il n'existe aucune preuve que le virus puisse infecter ces cellules *in vivo*. Des études histopathologiques sur des biopsies post-mortem n'ont montré que des changements mineurs non-spécifiques du système microvasculaire [49,50]. Cette absence d'altération vasculaire spécifique de l'endothélium et le fait que le virus soit majoritairement retrouvé dans les cellules du système réticulo-endothélial suggèrent que l'augmentation de la perméabilité vasculaire est induite par un ou plusieurs médiateurs solubles de nature immune, d'où son caractère réversible. Plusieurs mécanismes d'altération de la perméabilité de la barrière endothéliale ont été proposés. Les deux principaux suggèrent pour l'un un dysfonctionnement des jonctions entre cellules endothéliales et pour l'autre une modification du glycocalyx endothélial. La sécrétion importante de MCP-1 (monocytic chemoattractant protein-1) par les monocytes et les lymphocytes infectés par le virus perturberait les jonctions serrées entre les cellules endothéliales en changeant la distribution de la protéine ZO-1 (zonula occludens-1) [51]. La sécrétion de MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) par les cellules dendritiques infectées entraînerait, quant à elle, une redistribution des molécules d'adhésion PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) et VE-cadherin (vascular endothelium-cadherin) à la membrane basale des cellules endothéliales ainsi qu'une redistribution des fibres d'actine dans ces cellules, ce qui engendrerait une augmentation de la perméabilité vasculaire [52]. La sécrétion d'IL-8 pourrait aussi intervenir dans la désorganisation des structures qui modulent la perméabilité vasculaire. En effet, il a été décrit, *in vitro*, que la libération d'IL-8 lors d'une infection par le DENV-2 contribuerait à un réarrangement du cytosquelette et des jonctions serrées des cellules endothéliales microvasculaires humaines du derme (HMEC-1), augmentant la perméabilité [53]. Le glycocalyx endothélial pourrait aussi jouer un rôle important dans la fuite capillaire. Cette matrice anionique, située à la surface apicale des cellules endothéliales et constituée de protéoglycanes, repousse les protéines de même charge et contribue ainsi à filtrer leur passage à travers l'endothélium. La liaison préférentielle de la protéine NS1 à l'héparane sulfate ou à la chondroïtine sulfate E, composants majeurs du glycocalyx de l'endothélium des micro-vaisseaux, suivie d'une réponse anticorps anti-NS1

est un mécanisme original pouvant expliquer la fuite capillaire sélective au cours de la dengue sévère [54,55].

Si la forme hémorragique de la dengue est la forme sévère la plus couramment observée, d'autres formes plus atypiques et plus rares peuvent également survenir : encéphalopathie ou encéphalite, hépatite aiguë avec ou sans insuffisance hépatocellulaire, rhabdomyolyse, cholécystite et/ou pancréatite et, chez l'enfant, hépatomégalie, myocardite, insuffisance rénale aiguë, insuffisance respiratoire aiguë, atteinte oculaire [56–58].

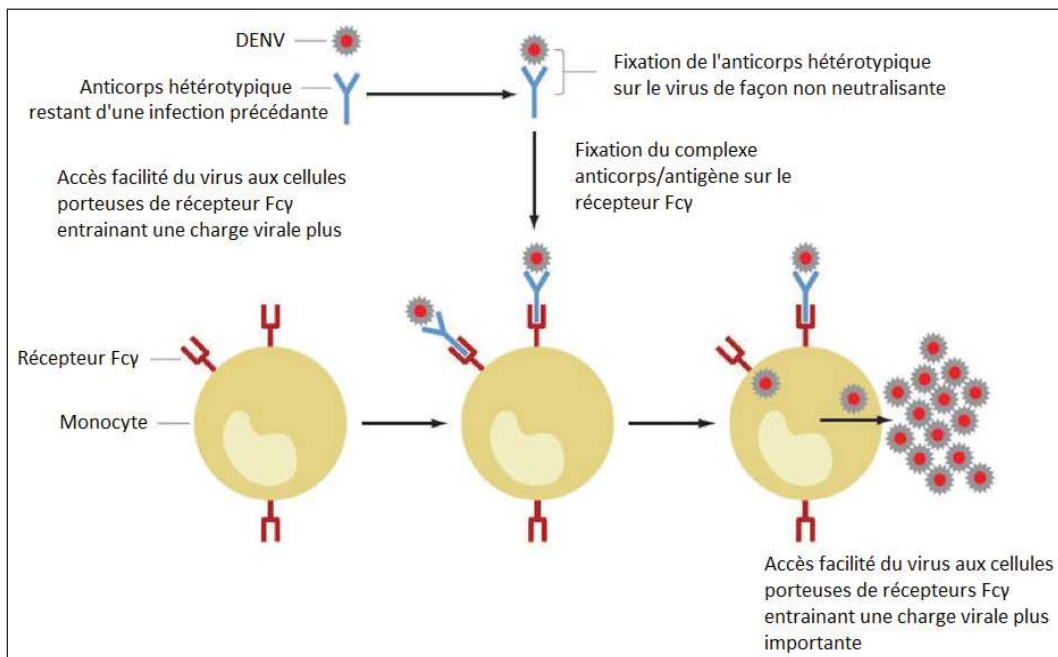
## 3.2. Les facteurs de risque d'une forme hémorragique de la maladie

### 3.2.1. Les facteurs liés à l'hôte

- *Statut immunitaire*

Si les formes graves peuvent survenir au cours d'une infection primaire, de nombreuses études épidémiologiques ont montré un risque accru en cas d'infection secondaire. Cette association, juxtaposée à l'observation de formes sévères lors d'infections primaires chez des enfants entre six mois et un an, ont attiré l'attention sur la possibilité d'un effet délétère de la présence d'anticorps hétérotypiques à des taux non neutralisants au moment d'une infection (anticorps induits lors de l'infection primaire pour les cas d'infection secondaire ou présence d'anticorps d'origine maternelle chez les enfants de moins d'un an). La théorie de la « facilitation immunologique » ou de l'ADE a été proposée pour expliquer ces observations (figure 9). Les anticorps hétérotypiques, présents à une concentration insuffisante pour neutraliser systématiquement les virus circulant dans le sang, se fixent sur le virus d'un nouveau sérotype. Le complexe formé interagit alors avec un monocyte par le biais d'un récepteur Fcγ et le virus est internalisé dans le monocyte où il pourra ensuite se répliquer. Ce phénomène favoriserait l'infection d'un plus grand nombre de cellules, entraînant donc une augmentation de la virémie et une dissémination accrue du virus vers différents organes cibles (foie, rate, ganglions lymphatiques).





**Figure 9 : Modèle de la facilitation immunologique [59]**

En 2003, la théorie du « péché antigénique originel » a vu le jour et a tenté d'expliquer comment la réponse immunitaire cellulaire pourrait aussi participer à la sévérité des infections secondaires [60]. Selon cette théorie, lors d'une infection secondaire, les lymphocytes T mémoires spécifiques du sérotype rencontré précédemment, lors de l'infection primaire, seraient réactivés. L'activation de ces lymphocytes T de faible affinité pour le nouveau sérotype empêcherait le développement d'une réponse immunitaire cellulaire spécifique contre le nouveau sérotype et empêcherait donc une élimination efficace du virus du fait d'une production insuffisante d'IFN $\gamma$  (interféron gamma) et de TNF.

- *Susceptibilité génétique*

L'existence de polymorphismes génétiques chez l'hôte pourrait aussi expliquer la susceptibilité de certaines personnes à développer des formes hémorragiques de la maladie.

Une première preuve indirecte de la susceptibilité génétique a été observée lors de plusieurs épidémies hémorragiques à Cuba, entre 1981 et 2001. Il a été montré qu'au cours de ces épidémies les personnes ayant des racines africaines avaient moins de risque de développer une forme hémorragique de la maladie que les personnes d'origine caucasienne [61].

Plusieurs facteurs génétiques et immunogénétiques ont déjà été identifiés. Le phénotype HLA (Human Leucocyte Antigen) a été beaucoup étudié et semble avoir une importance, certains polymorphismes



du gène HLA étant associés à une protection alors qu'au contraire d'autres sont associés à une augmentation du risque de développer une dengue sévère. Certaines associations trouvées sont spécifiques à un ou deux sérotypes alors que d'autres semblent se vérifier pour tous les sérotypes [62]. En dehors des études concernant le polymorphisme du gène HLA, plusieurs études cas-témoins de taille importante se sont intéressées à des SNPs (single nucleotide polymorphism) dans les gènes de plusieurs protéines pouvant avoir un impact sur la pathogenèse des formes hémorragiques de la dengue. Ainsi, des polymorphismes des gènes codant les protéines TNF- $\alpha$ , Fc $\gamma$ RII, CTLA-4, TGF- $\beta$ 1, HPA, DC-SIGN, TAP, MBL2, JAK-1, OAS et triptase alpha seraient associés à un risque accru d'évolution vers une forme grave de la maladie [63–65]. Le groupe sanguin AB a aussi été décrit comme étant un facteur de sévérité lors d'infections secondaires [66]. Au contraire, certains polymorphismes du gène du récepteur de la vitamine D seraient associés à une protection contre la dengue hémorragique [63].

- *Age et santé de l'hôte*

Il semblerait que l'âge soit aussi un facteur important dans le risque d'évolution de la maladie vers une forme hémorragique. Les enfants de moins de 15 ans seraient plus exposés à une forme hémorragique que les adultes dans certaines régions endémiques. Cette différence pourrait être liée au fait que l'endothélium vasculaire est intrinsèquement plus perméable chez les enfants que chez les adultes. Les maladies chroniques telles que l'asthme bronchique, le diabète ou l'anémie falciforme pourraient aussi être des facteurs de risque [29].

### ***3.2.2. Les facteurs viraux***

Bien que les cas de dengue hémorragique surviennent plus fréquemment lors d'une infection secondaire que lors d'une primo-infection pour les raisons expliquées précédemment, la dengue hémorragique peut aussi survenir lors d'une primo-infection. Ceci suggère que les différences entre souches virales pourraient aussi contribuer au développement des formes hémorragiques de la maladie.

La preuve la plus éclatante de l'impact des différentes souches virales sur l'évolution clinique de la maladie a été apportée lors de l'épidémie de dengue à Cuba, en 1981, la première à rapporter des formes hémorragiques dans les Amériques. Ces épidémies de dengue hémorragique ont été attribuées

à une souche DENV-2 appartenant au génotype « Sud-Est asiatique », alors que le génotype original « Américain » présent auparavant n'était associé qu'à des formes non-hémorragiques de la maladie [67]. L'émergence de la souche DENV-3, sous-type III, groupe B, au Sri Lanka en 1989 est un autre exemple démontrant les variations de virulence entre les souches du virus. Avant 1989, le Sri Lanka ne recensait que très peu de cas de formes hémorragiques de la maladie alors que le pays était complètement endémique. A partir de 1989, la situation épidémiologique a évolué avec l'apparition d'épidémies de dengue hémorragique, sans changement apparent dans l'intensité de transmission du virus et ni dans l'abondance relative de chaque sérotype. Le séquençage de la souche de DENV-3 a permis d'attribuer l'émergence des formes hémorragiques à un changement de clade du DENV-3 circulant au Sri Lanka [68,69].

Des différences structurales entre différentes souches de DENV-2 associées à des formes classiques de la dengue et des souches ayant le potentiel de causer des formes hémorragiques, ont été décrites par Leitmeyer *et al.* [70]. L'analyse de 11 génomes complets a permis de mettre en évidence des mutations structurales entraînant le remplacement d'un acide aminé par un autre ayant des propriétés de charge ou de polarité différentes, dans les gènes des protéines prM, E, NS4b et NS5 ainsi que des mutations responsables de changements de structures secondaires dans les régions 3' et 5' non codantes entre souches virulentes et souches moins virulentes.

Il a aussi été montré qu'il était possible de différencier phénotypiquement et génétiquement des souches de DENV isolées à partir de prélèvements de patients présentant différents degrés de sévérité de la maladie. En culture cellulaire, des souches isolées à partir de patients ayant fait un choc, ont montré une capacité moindre à se répliquer dans des cellules VERO par rapport à des souches provenant de patients avec des formes non hémorragiques de la maladie. Ces mêmes souches, inoculées à des cellules de moustiques C6/36, ont entraîné des taux d'apoptose plus importants que les souches de patients présentant des formes moins graves, sans qu'il y ait de différence de répllication. L'analyse génétique des différentes souches a montré des différences responsables de substitutions dans la séquence d'acide aminé des protéines E, NS1, NS5 et NS2A [71]. *In vivo*, avec des souris BALB/c, il a été démontré qu'une souche DENV-1 isolée chez un patient en état de choc persistait plus longtemps et avait un tropisme pour le système nerveux que n'avaient pas des souches isolées de cas humains moins sévères [72].

### 3.3. Les classifications cliniques de l'OMS

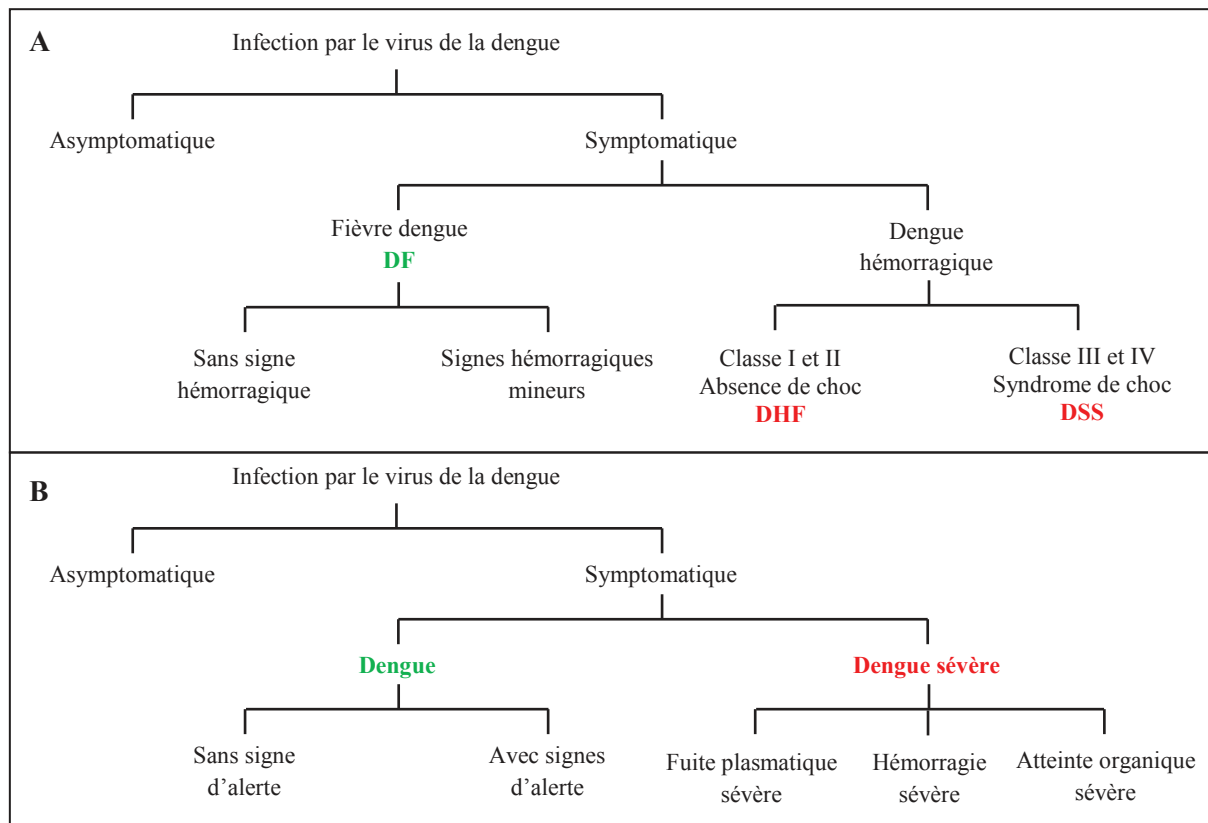
La première classification de l'OMS date de 1997. Cette classification distingue deux types de dengue symptomatiques : la dengue classique bénigne (dengue fever ou DF) et la dengue hémorragique avec ou sans syndrome de choc (dengue hemorrhagic fever ou DHF et dengue shock syndrome ou DSS) (figure 10A). Un cas de dengue hémorragique est défini par l'association des quatre symptômes suivants : (i) fièvre, ou antécédent de fièvre ayant duré 2 à 7 jours ; (ii) manifestations hémorragiques mises en évidence par un test du tourniquet positif ou un saignement spontané ; (iii) taux de plaquettes inférieur à  $100 \times 10^9/L$  ; (iv) fuite plasmatique mise en évidence par une hémococoncentration (hématocrite augmenté de 20% par rapport à la valeur normale pour l'âge, le sexe et la population, ou hématocrite diminué d'au moins 20% après remplissage vasculaire), par la présence d'épanchements séreux ou par une hypoprotidémie. Les cas de dengue hémorragiques sont classés selon quatre degrés de gravité (I, II, III et IV) selon les symptômes observés (tableau 1). Les degrés III et IV définissent la dengue avec syndrome de choc.

**Tableau 1 : Définition des degrés de sévérité des formes hémorragiques de la dengue selon la classification de l'OMS de 1997 [73]**

Degré de sévérité	Tableau clinique
Degré I	Fièvre accompagnée de symptômes généraux non spécifiques ; la seule manifestation hémorragique est un test du tourniquet positif et/ou une fragilité cutanée aux traumatismes
Degré II	Manifestations du degré I avec en plus des saignements spontanés, généralement sous forme d'hémorragies cutanées
Degré III	Défaillance circulatoire attestée par un pouls rapide et faible, un pincement de la tension différentielle ou une hypotension, une peau froide et moite et de l'agitation
Degré IV	Choc profond avec tension artérielle et pouls imperceptibles

De nombreux cliniciens se plaignaient que cette classification était trop complexe, que de nombreux cas sévères ne remplissaient pas les quatre critères de dengue hémorragique et que les formes atypiques de l'infection n'étaient pas prises en compte. La classification de 1997 ne correspondant donc pas à la réalité de la situation vue par les cliniciens dans leur exercice quotidien, et suite à une étude multi-centrique, l'OMS a proposé une révision de la classification des cas de dengue en 2009 (figure 10B). La nouvelle classification comporte deux catégories : dengue normale et dengue sévère, la première catégorie étant subdivisée en deux sous-catégories : dengue sans signes d'alerte et dengue

avec signes d'alerte. Les signes d'alertes sont : douleur ou sensibilité abdominale, vomissements persistants, accumulation de fluides, saignement des muqueuses, léthargie ou agitation, augmentation du volume du foie (> 2 cm) et augmentation de l'hématocrite concomitante à une baisse rapide des plaquettes. Les cas de dengue sévère sont les patients présentant une fuite plasmatique sévère (patients avec syndrome de choc ou détresse respiratoire liée à l'accumulation de fluides dans les poumons), des saignements importants ou une atteinte organique sévère (foie, système nerveux central, cœur, etc).



**Figure 10 : Différentes formes cliniques de la dengue, (A) selon la classification OMS de 1997 et (B) selon la classification OMS de 2009**

## 4. L'épidémiologie de la dengue

### 4.1. Historique

Il n'existe pas de consensus datant la première émergence de la dengue dans la population humaine. Cette difficulté à retracer l'histoire de la dengue est principalement liée au fait que les symptômes de la maladie ne sont pas spécifiques.

Les plus anciennes descriptions cliniques compatibles avec un diagnostic de dengue ont été retrouvées dans des encyclopédies médicales chinoises datant des dynasties Chin (265-420), Tang (610) et Song (992). Ces rapports parlent d'une maladie qui serait associée à la présence d'insectes volants vivant à

proximité de plans d'eau. Les symptômes décrits sont : fièvre, éruption cutanée, arthralgie, myalgie et hémorragies [1]. Les descriptions suivantes compatibles a posteriori avec la dengue datent de 1635 et 1699 et décrivent deux épidémies d'une maladie fébrile à convalescence longue dans les Caraïbes et au Panama. Un siècle plus tard, entre 1779 et 1788, des épidémies d'une maladie ressemblant à la dengue sont décrites à Jakarta, au Caire, à Philadelphie et en Espagne, suggérant alors que la dengue est devenue pandémique [74].

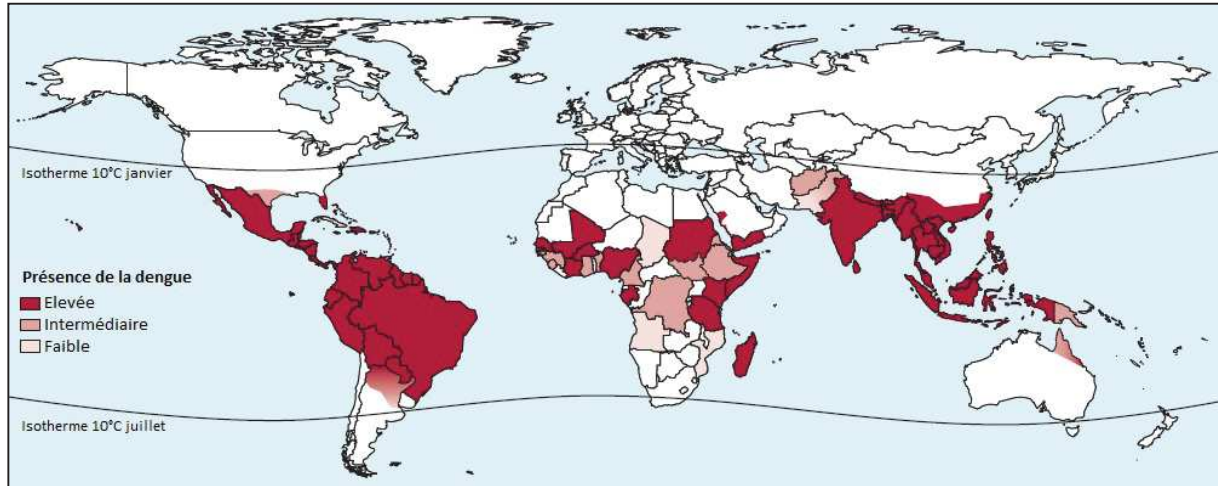
Ce n'est qu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle que l'origine virale de la dengue est démontrée. L'agent de la dengue est alors qualifié d'« agent filtrant » [75]. A la même période, Bancroft démontre que la transmission de la maladie à l'homme implique les moustiques du genre *Aedes*. Le rôle d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* dans la transmission de la dengue est confirmé respectivement en 1926 et en 1931 [42]. Il faut ensuite attendre 1943, pendant la seconde guerre mondiale, pour que la première souche DENV-1 soit isolée par des scientifiques japonais [76]. Peu après, une autre souche DENV-1 et une souche DENV-2 sont isolées par Sabin à partir d'échantillons cliniques provenant de soldats américains revenant d'Inde, d'Hawaï et de Nouvelle Guinée [77].

La seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle est marquée par l'émergence d'une nouvelle forme de la maladie: la dengue hémorragique. Bien que connues depuis les premières épidémies, les formes hémorragiques étaient néanmoins relativement rares. La première épidémie de dengue hémorragique a eu lieu à Manille entre 1953 et 1954. C'est d'ailleurs durant cette période que sont identifiés les sérotypes 3 et 4 du virus. En 1958, une 2<sup>ème</sup> épidémie de dengue hémorragique, de plus grande ampleur, a lieu en Thaïlande. Les formes hémorragiques s'observent ensuite dans toute l'Asie du Sud-Est, puis dans le Pacifique, avant de toucher le continent américain dans les années 80 [42].

#### **4.2. La situation épidémiologique mondiale actuelle**

La dengue sévit aujourd'hui dans environ 140 pays tropicaux ou subtropicaux (figure 11). Elle représente une des infections les plus importantes en termes de mortalité et de morbidité chez l'homme. Trois milliards et demi de personnes vivent dans une région à risque [4]. En 2009, l'OMS estimait que plus de 50 millions d'individus étaient touchés annuellement par la maladie entraînant environ 500 000 hospitalisations, principalement chez les enfants, suite à une forme grave de la maladie [3]. Néanmoins en raison des faiblesses des systèmes nationaux de surveillance, d'un faible

niveau de notification des cas, d'un relativement faible taux de mortalité, de difficultés de diagnostic, la vraie incidence et l'impact de la dengue sont très probablement sous-estimés. Une étude plus récente estime à 96 millions le nombre des infections symptomatiques et à 294 millions celui des infections asymptomatiques [4].

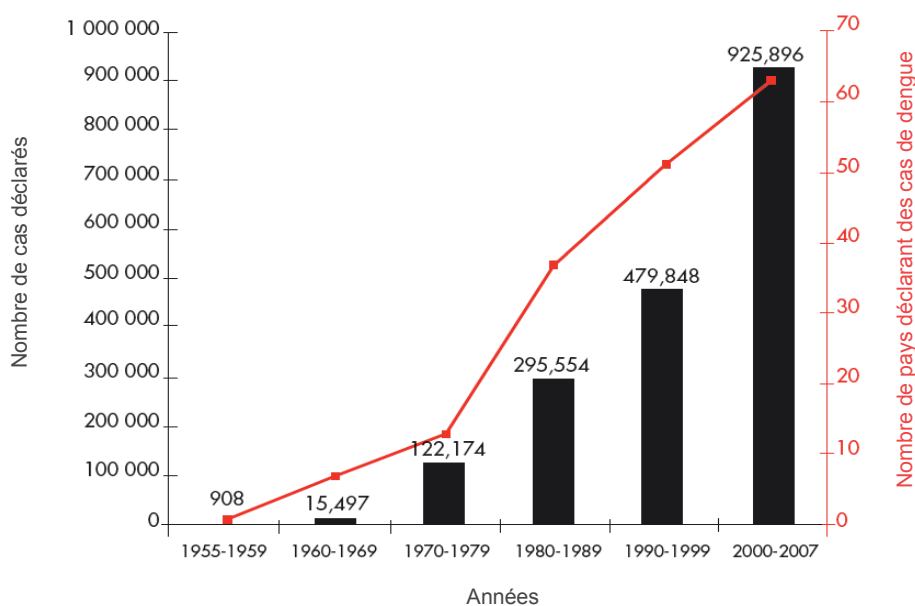


**Figure 11 : Répartition mondiale de la dengue (d'après Guzman et Harris [78])**

L'Asie du Sud-Est est la région du monde la plus touchée par la dengue avec près de 70% de la population à risque vivant dans cette zone. Cette région est dite d'hyper-endémie avec une fréquence d'épidémie élevée et une circulation concomitante de plusieurs sérotypes. C'est aussi dans cette zone que l'on observe le plus de formes graves de la maladie. Le continent Américain, après 10 ans d'interruption de transmission du virus dans les années 60 et le début des années 70 suite à des mesures drastiques d'éradication des moustiques, est de nouveau très touché par la maladie. La dengue est devenue hyper-endémique dans la majorité des pays de la zone PAHO (Pan American Health Organisation) de l'OMS. Des épidémies d'ampleur ont en effet lieu tous les trois à cinq ans. L'Afrique est également affectée par la dengue mais il est encore difficile à l'heure actuelle d'estimer l'impact de l'infection en raison de la mauvaise connaissance de la maladie par les professionnels de santé, de l'importante circulation d'autres maladies fébriles (et plus particulièrement du paludisme), et de l'absence de disponibilité de tests de diagnostic et de surveillance systématique [79]. Les dernières estimations concernant la distribution mondiale de la dengue réalisées par Bhatt et collaborateurs indique que le continent africain serait aussi touché que le continent américain [4]. La région ouest du Pacifique est aussi fréquemment affectée par des épidémies de dengue.

Sans prise en charge thérapeutique des formes sévères, le taux de mortalité peut dépasser 20% alors qu'il est réduit à moins de 1% lorsqu'un traitement adapté peut être administré dans un service de soins intensifs.

Cette arbovirose est considérée comme ré-émergente du fait de l'augmentation rapide et importante du nombre d'épidémies et de cas au cours des 50 dernières années et de son expansion géographique (figure 12).



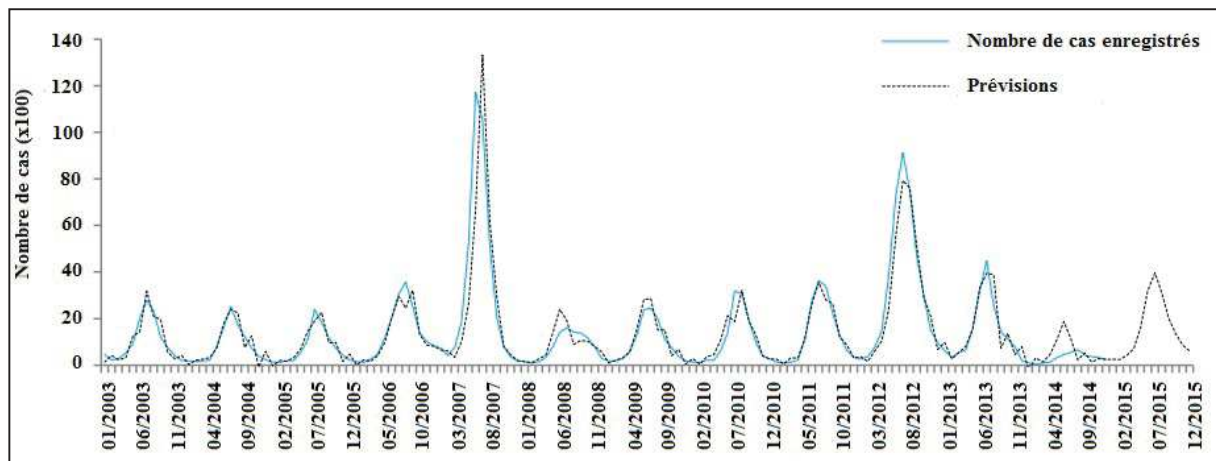
**Figure 12 : Nombre annuel moyen de cas de dengue classique et de dengue hémorragique rapportés à l'OMS et nombre de pays déclarant les cas, entre 1955 et 2007 [3]**

Quatre facteurs majeurs contribuent à expliquer la propagation de la maladie et l'augmentation de l'incidence : la mondialisation, les changements de mode de vie, l'urbanisation mal contrôlée et le manque de contrôle vectoriel [80]. Bien qu'*Ae. albopictus* soit un moins bon vecteur qu'*Ae. aegypti*, il contribue aussi à l'expansion de la maladie vers des zones plus tempérées non colonisables par *Ae. aegypti*. Plusieurs épidémies dans des zones où le virus de la dengue ne circulait pas ou plus, attribuées à *Ae. albopictus*, ont en effet été rapportées au cours de la dernière décennie (Ile Maurice, 2000 ; Ningbo, Chine, 2004 ; Madagascar, 2006 ; Gabon, 2007 ; Japon, 2014) [81–85]. Depuis 2010, des cas autochtones isolés sont régulièrement détectés pendant la période estivale dans le sud de l'Europe continentale où *Ae. Albopictus* est maintenant bien implanté (France, Croatie). Cela confirme la possibilité de voir survenir un jour une épidémie dans cette région du monde [86–89].



### 4.3. La situation épidémiologique au Cambodge

Au Cambodge, comme dans la majorité des pays de l'Asie du Sud-Est, la dengue est endémique et affecte majoritairement les enfants. Des cas surviennent tout au long de l'année avec une augmentation importante lors de la saison des pluies, entre mai et novembre (figure 13). Entre 2001 et 2010, les sérotypes majoritaires du virus étaient les sérotypes 2 et 3, avec en 2007 une épidémie d'ampleur liée au sérotype 3. A partir de 2011, la situation a changé et le sérotype 1 est devenu prédominant entraînant une épidémie importante en 2012.



**Figure 13 : Nombre de cas de dengue enregistrés dans le cadre du programme de surveillance de la dengue au Cambodge (données du Centre National de Malariologie)**

En 1980, un programme national de surveillance de la dengue, le NDCP (National Dengue Control Program), fonctionnant par déclaration passive des cas suspects par les centres de santé et les hôpitaux publics a été mis en place. En 2000 le programme a bénéficié d'une amélioration avec la mise en place d'un système de surveillance virologique dans cinq hôpitaux et en 2001, le programme s'est profondément restructuré avec la création d'un réseau sentinelle. Ce réseau est constitué de trois hôpitaux publics et trois hôpitaux privés à but non lucratif, dans quatre provinces du pays. Les cas rapportés par le réseau sentinelle sont les enfants de moins de 16 ans. Depuis 2001, les données de surveillance sont donc obtenues à la fois de façon passive et de façon active [90]. L'Institut Pasteur du Cambodge (IPC) est le centre national de référence du programme de surveillance. Entre 2001 et 2012, le NDCP a rapporté des incidences annuelles entre 0,7 et 3 pour 1000 habitants, soit environ 9000 à 40 000 cas par an. Depuis 2008 et la mise en place d'un nouveau protocole de prise en charge des patients, le taux de mortalité n'a plus dépassé 1% (données du NDCP non publiées). Les enfants de moins de un an et entre quatre et six ans sont les plus touchés [90]. La comparaison entre les

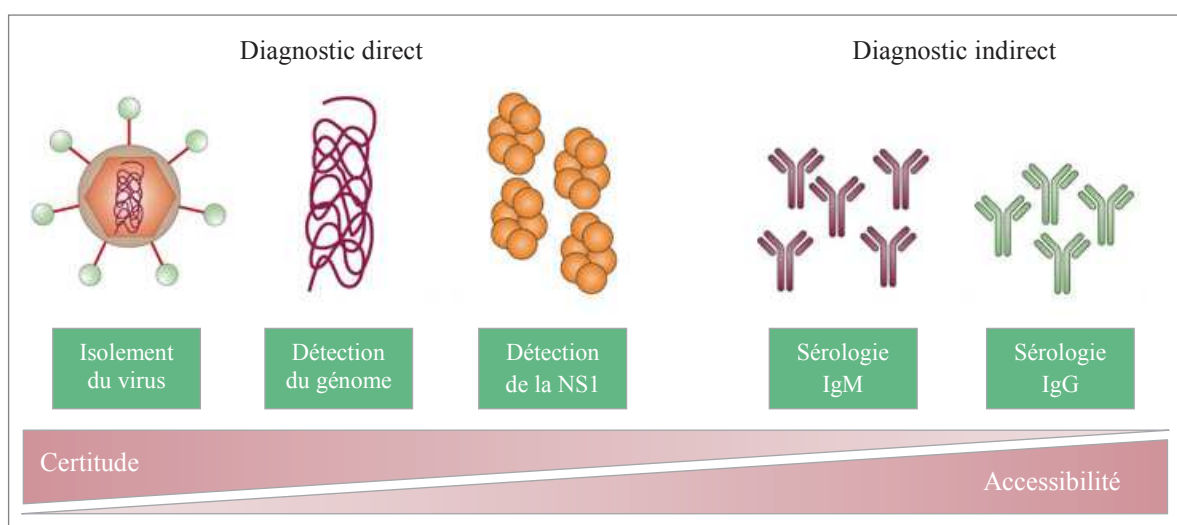


données du NDCP et une étude de surveillance active a néanmoins montré que le système de surveillance mis en place ne reflète pas la réalité avec des incidences sous-estimées d'un facteur 4 à 30 selon les années [91]. Les différences entre les taux d'incidence sont notamment liées au fait que le système de surveillance ne fonctionne qu'avec des hôpitaux. Une grande majorité des cas non graves qui ne sont pas pris en compte par le système public de santé ne sont donc pas inclus dans la surveillance.

Deux études prospectives de trois ans sur l'étiologie des maladies fébriles aiguës dans des zones rurales et périurbaines du Cambodge ont permis d'incriminer les virus de la dengue dans 8,9% et 6,3% des cas [92,93]. Une autre étude a montré que les zones rurales du Cambodge sont aussi affectées que les zones urbaines [94].

## 5. Le diagnostic biologique de la dengue

Il est primordial de pouvoir diagnostiquer la dengue de façon efficace et sûre, non seulement pour une bonne prise en charge des patients mais aussi pour les activités de surveillance, le contrôle des épidémies, la recherche, les essais cliniques ou encore le développement de vaccins. Il existe de nombreuses méthodes de diagnostic qui présentent chacune des avantages et des inconvénients, résumés dans la figure 14.



**Figure 14 : Comparaison des avantages et inconvénients des différentes méthodes de diagnostic de la dengue (d'après Peeling et al [95])**

## 5.1. Le diagnostic direct

L'isolement viral est la technique de diagnostic direct la plus ancienne. Aujourd'hui, la technique d'isolement la plus utilisée, car la plus facile à mettre en œuvre, est l'isolement sur culture cellulaire. L'isolement peut être réalisé à partir d'un sérum ou d'un plasma mais aussi à partir de leucocytes ou de broyats de tissus provenant de biopsies. Les lignées cellulaires les plus couramment utilisées sont les lignées de moustiques C6/36, issues d'*Ae. albopictus* et AP61, issues d'*Ae. pseudoscutellaris*. Il est aussi possible d'utiliser des lignées de cellules de mammifères telles les cellules Vero, BHK21 ou LLC-MK2 [96]. Après une incubation d'une à deux semaines, la présence de particules virales est révélée par une technique d'immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-dengue spécifiques de chacun des quatre sérotypes. Les isolements peuvent aussi être réalisés après inoculation par voie intracrâniale à des souris nouveau-nés ou par voie intrathoracique à des moustiques. La présence du virus est ensuite détectée par marquage des cerveaux de souris ou des têtes de moustiques broyés avec des anticorps anti-DENV ou par biologie moléculaire.

Si l'isolement viral est la technique de référence pour le diagnostic de la maladie, son utilisation reste limitée pour plusieurs raisons pratiques. Tout d'abord, étant donnée la courte période de virémie, cette technique n'est utilisable que pour des échantillons collectés très précocement après l'apparition des premiers symptômes. De plus, le DENV étant thermosensible, il est nécessaire de conserver les échantillons au froid immédiatement après leur collecte. Enfin, le DENV étant un agent biologique de classe 2 ou 3, il est nécessaire lors de sa mise en culture de disposer d'un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 voire 3 selon la réglementation du pays. L'isolement viral ne peut donc être réalisé que dans des laboratoires spécialisés.

Avec l'essor de la biologie moléculaire, la détection par RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) du génome du DENV est devenue une méthode de choix pour poser rapidement un diagnostic précoce d'infection. Cette technique tend désormais à supplanter la détection par culture cellulaire. A partir du schéma classique en quatre étapes (extraction et purification de l'ARN, transcription inverse, amplification de l'ADN complémentaire, détection et caractérisation des produits d'amplification), plusieurs protocoles ont été développés. Le plus ancien et longtemps utilisé, mis au point par Lanciotti *et al.* en 1992 [97], fait intervenir deux amplifications. La première étape

permet d'amplifier une partie de la région codant la protéine C et la protéine M, grâce à un couple d'amorces consensuelles et communes aux quatre sérotypes. Une amplification semi-nichée avec quatre amorces spécifiques de chaque sérotype est ensuite réalisée afin d'amplifier une région interne du produit de la première PCR. Cette amplification génère des produits de taille variable en fonction du sérotype.

Récemment des techniques de PCR en temps réel ont été développées [98–100]. Ces techniques permettent de s'affranchir des étapes post-PCR et peuvent être réalisées en une seule étape permettant de gagner du temps et de diminuer les risques de contamination avec les produits d'amplification. De plus ces techniques permettent de mesurer la charge virale contenue dans l'échantillon. Plusieurs kits de PCR sont aujourd'hui commercialisés. Les premières évaluations de ces kits montrent des performances très variables d'un kit à l'autre et parfois d'un sérotype à l'autre avec le même kit [101–103].

De la même façon que pour la culture cellulaire, ces différentes techniques moléculaires nécessitent un environnement spécial pour éviter les contaminations croisées et sont donc elles aussi réservées à des laboratoires spécialisés et bien équipés.

La détection d'antigènes viraux est la méthode la plus récemment développée pour le diagnostic direct. Pendant longtemps on ne détectait que les antigènes de dengue sur des tissus fixés (foie, poumons, etc.) à l'occasion de l'examen de pièces d'autopsie. La découverte de la circulation de la protéine NS1 à de fortes concentrations dans le sérum des patients infectés, à des temps très précoces de la maladie et jusqu'à plus de neuf jours après le début de la maladie dans certains cas [19,20], a permis de mettre au point des tests plus simples d'utilisation et avec des applications beaucoup plus larges. Ainsi, en 2006, un premier test ELISA basé sur la détection de l'antigène NS1 par immunocapture a été commercialisé. Aujourd'hui plusieurs tests ELISA ainsi que des tests rapides immunochromatographiques, sont disponibles. Les différentes évaluations de ces tests ont permis de démontrer une très bonne spécificité. La sensibilité varie, quant à elle, de 37% à 93% selon les kits utilisés et les études. Elle dépend notamment du statut immunitaire du patient et du sérotype du virus [104]. La sensibilité des tests est en effet plus faible dans le cas d'infections secondaires. Cela est probablement dû à la capture rapide de la protéine NS1 par les IgG rendant impossible la fixation des anticorps du test de diagnostic à la NS1. En termes de sérotype, une meilleure sensibilité est

généralement observée avec les sérotypes 1 et 3. Cette différence peut être le résultat des caractéristiques intrinsèques des différents tests (meilleure affinité des anticorps utilisés dans les ELISA pour les sérotypes 1 et 3). La meilleure sensibilité pour le sérotype 1 peut aussi être expliquée par le fait que l'infection par un virus de sérotype 1 entraîne une virémie habituellement plus importante chez les sujets infectés [105,106].

## 5.2. Le diagnostic indirect

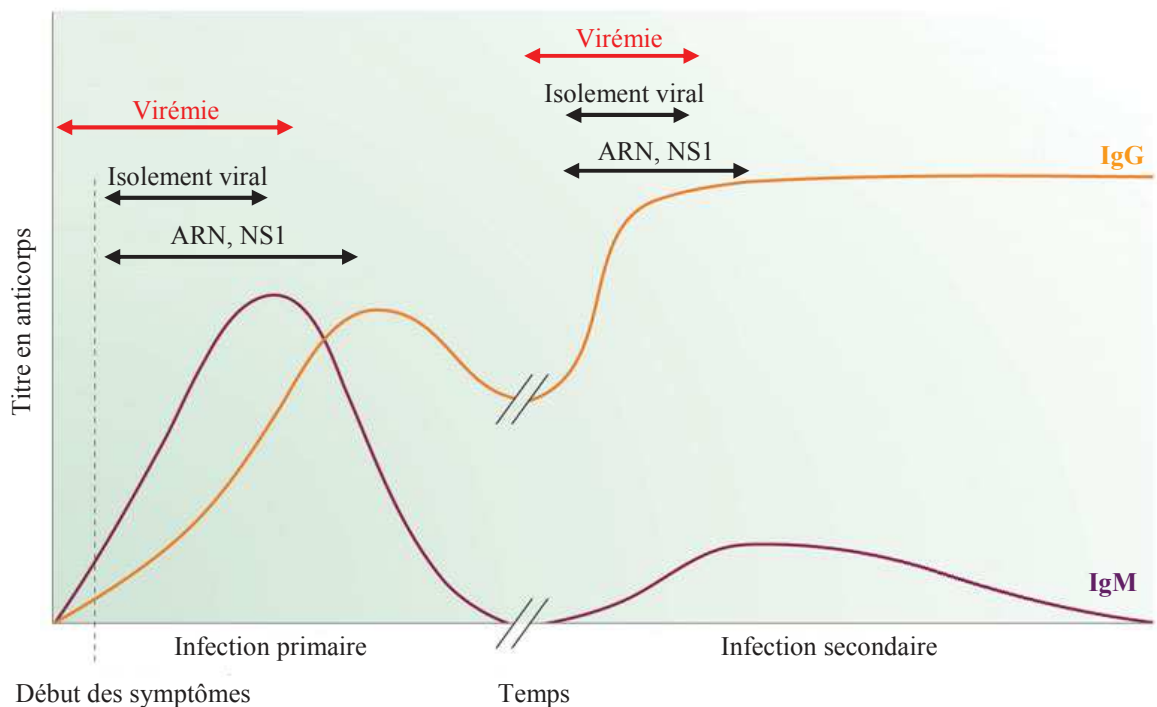
Le diagnostic indirect permet d'établir un diagnostic plus tardif basé sur détection des anticorps induits par le DENV.

La cinétique des anticorps dépend du statut immunitaire du patient. Chez un patient infecté pour la première fois (dengue primaire), la réponse humorale est plus tardive que lors d'une réinfection (dengue secondaire, tertiaire ou quaternaire). Lors d'une première infection, les premières immunoglobulines à apparaître sont les IgM, entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour après le début de la fièvre (J3-J5). Un pic est atteint environ deux semaines après le début de la fièvre puis le titre commence à baisser pour redevenir indétectable dans les deux à six mois après le début de la maladie. Les IgG anti-DENV apparaissent plus tardivement, vers la fin de la première semaine de maladie, et le titre augmente lentement. Les anticorps pourraient persister toute la vie, selon la méthode utilisée pour les détecter (figure 15). Au contraire, un patient qui subit une deuxième ou troisième infection développe une réponse IgG importante et rapide (vers J3-J4). Le titre en IgG augmente durant les deux semaines qui suivent le début de la maladie. La réponse IgM, quasiment concomitante, est faible, voire parfois même absente et dure moins longtemps que dans les cas d'infection primaire (figure 15) [8].

Les tests les plus utilisés aujourd'hui pour le diagnostic indirect sont les tests immuno-enzymatiques (ELISA) pour la détection des IgM et des IgG anti-dengue.

La détection des IgM est réalisée par immunocapture. On parle donc de MAC-ELISA (IgM Antibody-Capture ELISA). Le but de cette technique est de capturer les IgM présentes dans le sérum du patient grâce à des anticorps fixés sur un support solide (microplaque) et dirigés contre les chaînes  $\mu$  des IgM humaines. L'ajout d'antigènes viraux permet ensuite la formation d'un complexe immunitaire anticorps/antigène. La révélation est faite par ajout d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux

conjugués à une enzyme (peroxydase ou phosphatase alcaline) qui permettra de transformer un substrat non coloré en un produit coloré. La détection des IgM dirigées contre le DENV témoigne d'une infection récente par le virus. Toutefois, le terme d'«infection récente» doit être utilisé avec prudence dans les régions où plusieurs sérotypes de dengue circulent de façon concomitante. En effet, les IgM anti-DENV peuvent persister jusqu'à plus de trois mois après l'infection. Leur présence peut donc être le reflet d'une infection, éventuellement asymptomatique, contractée plusieurs mois auparavant par un virus de sérotype différent. Une alternative à la détection des IgM peut donc être la détection par la même approche des IgA (AAC-ELISA). En effet, les IgA dirigées contre le DENV et sécrétées très rapidement après l'apparition des IgM, ne persistent qu'une quarantaine de jours après l'infection et un pic sécrétoire est observé entre le 8<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour de l'infection [107].



**Figure 15: Principaux marqueurs utilisés pour le diagnostic d'une infection par le DENV et cinétique des IgM et IgG (d'après Peeling et al [95])**

La détection des IgG peut être réalisée de deux façons différentes, soit par immunocapture sur le même principe que la détection des IgM et des IgA, soit par un test ELISA indirect. Pour le test indirect, un support solide est sensibilisé avec l'antigène viral. Après fixation des IgG contenues dans l'échantillon, celles-ci sont révélées par des anticorps dirigés contre les IgG humaines couplées à de la peroxydase ou de la phosphatase alcaline. Les IgG anti-DENV étant présentes très longtemps après la fin de la maladie, un diagnostic d'infection récente ne peut être posé que si deux échantillons sont

disponibles, l'un prélevé en phase aiguë de la maladie et l'autre en phase de convalescence. Le patient a été infecté par la dengue si entre les deux prélèvements, une séroconversion IgG est observée ou si le titre des IgG augmente de façon significative [73].

Le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est une technique de diagnostic indirect plus ancienne. Cette technique est basée sur la capacité des antigènes du virus à agglutiner certains types d'hématies (hématies d'oie ou humaines du groupe O). En présence d'anticorps anti-DENV, les antigènes agglutinants du virus sont masqués et la réaction d'hémagglutination par ces derniers n'a pas lieu. Cette technique permet de mesurer le titre d'anticorps inhibant l'hémagglutination, sans distinction entre les isotypes d'immunoglobulines. Du fait des différences de cinétiques des anticorps entre infection primaire et infection secondaire, le test IHA va surtout refléter la réponse IgM pour les prélèvements précoces dans le cas d'infection primaire alors que dans le cas d'une infection secondaire le test reflètera plutôt la réponse IgG. La mise en œuvre de cette technique est plus complexe que celles des tests immuno-enzymatiques et elle est donc uniquement utilisée dans des laboratoires spécialisés. L'intérêt de cette technique par rapport aux tests immuno-enzymatiques est de pouvoir déterminer si le patient est infecté pour la première fois ou s'il fait une dengue secondaire. Cependant pour cela, il est nécessaire de disposer de deux sérums, le premier obtenu lors de la phase aiguë de la maladie et le second lors de la phase de convalescence, les deux prélèvements ayant été réalisés à au moins une semaine d'intervalle l'un de l'autre.

L'inconvénient majeur de ces différentes techniques sérologiques est le manque de spécificité. De nombreuses réactions croisées sont observées avec d'autres arboviroses à flavivirus. Ces réactions croisées sont dues à la présence d'épitopes communs entre les différents flavivirus. En raison de l'existence de cette réactivité croisée, le diagnostic sérologique de la dengue ne peut pas à lui seul constituer un diagnostic de certitude dans les zones où co-circulent plusieurs flavivirus.

L'existence de réactions croisées entre sérotypes de la dengue rend impossible le sérotypage par méthode sérologique. Seule la technique de séroneutralisation par réduction des plages de lyse, qui a souvent été recommandée pour les enquêtes séro-épidémiologiques, peut être utilisée pour identifier le sérotype infectieux impliqué lors d'un premier contact avec le virus grâce à la persistance d'anticorps monotypiques détectables chez les patients en phase de convalescence. Cependant, dans le cas d'une

dengue secondaire, la détermination du sérotype viral responsable de l'infection est plus difficile en raison du phénomène de « péché antigénique originel » [108].

### 5.3. Les marqueurs biologiques prédictifs d'une infection sévère

Il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de prédire avec certitude l'évolution de la dengue vers une forme grave. Néanmoins, plusieurs marqueurs biologiques ont été proposés.

#### 5.3.1. Les marqueurs viraux

##### *La charge virale*

Le marqueur de sévérité idéal serait un marqueur viral qui permettrait à la fois de confirmer l'infection par le DENV et de prédire un risque d'évolution de la maladie vers une forme sévère ou non. Selon la théorie de l'ADE, la sévérité observée chez les cas de dengue secondaire serait liée à une virémie plus importante du fait d'un nombre plus élevé de cellules infectées. Dans les cas de dengue primaire, la virulence accrue de certaines souches du virus pourrait aussi être liée à une plus grande capacité du virus à se répliquer. La charge virale, estimée par PCR quantitative, semble donc être un marqueur de sévérité intéressant. Néanmoins, des résultats contradictoires ont été décrits. Une étude prospective menée en Thaïlande a pu mettre en évidence une corrélation entre charge virale élevée au cours d'une infection par DENV-3 et formes hémorragiques de la maladie au cours de ses quatre premiers jours après l'apparition de la fièvre [109]. Cette même corrélation a ensuite été rapportée chez des patients infectés par le DENV-2 [22,110]. Wang *et al.* ont pu établir qu'une charge virale  $\geq 7,5$  log copies d'ARN/mL, un jour avant la défervescence, avait une valeur prédictive positive (VPP) de 71% et une valeur prédictive négative (VPN) de 91% pour prédire les cas de DHF [110]. Il a ensuite été montré que la virémie liée à une infection par le DENV-1 était plus élevée chez les patients avec une DHF que chez des patients avec une DF le 3<sup>ème</sup> jour après l'apparition de la fièvre mais qu'ensuite, elle était plus élevée chez les patients avec une infection primaire par rapport à ceux avec une infection secondaire, que la maladie soit sévère ou non sévère [105]. Duong *et al.* ont quant à eux montré une virémie plutôt plus élevée chez les patients DHF que chez les patients DF durant les trois premiers jours après le début de la fièvre mais une virémie plus faible chez les patients avec une DHF entre quatre et huit jours après le début de la maladie [111]. Dans une étude réalisée au Mexique, il a été montré que la charge virale au cours des cinq premiers jours après l'apparition de la fièvre était plus élevée chez les patients

DF que chez les patients DHF, qu'ils soient infectés par une souche DENV-1 ou une souche DENV-2 [21].

### *La protéine NS1*

L'excrétion dans le sang de l'antigène NS1 étant partiellement corrélée à la virémie [111,112], la quantité de NS1 circulante a aussi été envisagée comme un potentiel marqueur de sévérité. Une étude portant sur 32 patients hospitalisés suite à une infection secondaire par le DENV-2 a montré que la concentration de NS1 circulante était en moyenne plus élevée chez les patients avec une forme hémorragique de la maladie (n=18) par rapport à celle mesurée chez des patients avec une forme non sévère (n=14). Dans cette étude il a été déterminé qu'une concentration en NS1 supérieure 600 ng/ml, dans les premières 72h de la maladie, permettait de prédire de façon satisfaisante une évolution vers une forme hémorragique de la maladie chez des patients avec une infection secondaire (sensibilité: 72%, spécificité: 79%, VPP: 81%, VPN: 69%) [22]. Une étude réalisée par Avirutnan *et al.*, avec une population de 163 patients (DF : 49 patients et DHF : 114 patients), a confirmé que la concentration moyenne en NS1 était plus élevée chez les patients avec des formes hémorragiques de la dengue, avant la défervescence thermique. Dans cette étude, 90,8% de patients avaient été diagnostiqués avec une infection secondaire [113]. Plus récemment, une autre étude a partiellement confirmé ce résultat mais uniquement pour les patients infectés par le DENV-1 alors qu'aucune différence n'a été observée avec les patients infectés par le DENV-2 [21]. Néanmoins, plusieurs études contredisent l'hypothèse d'une corrélation entre concentration en NS1 circulante élevée et survenue de formes sévères de la maladie [111,114,115].

### **5.3.2. Les marqueurs biochimiques**

#### *Les transaminases hépatiques : ASAT et ALAT*

Le foie est l'un des organes cibles du DENV et son infection peut se traduire par une augmentation dans le sang de certaines enzymes, comme l'alanine aminotransférase (ALAT) ou l'aspartate aminotransférase (ASAT). Dans une population de 60 patients atteints de dengue, Kalayanarooj *et al.* ont montré que la concentration moyenne en ASAT était significativement plus élevée dans les premières 72h après l'apparition des symptômes chez les patients avec un diagnostic final de DHF comparés à ceux avec une DF (DHF : 98 U/ml et DF : 57 U/ml) alors que la concentration moyenne en



ALAT était légèrement plus élevée mais de façon non significative chez les patients DHF (DHF : 46 U/ml et DF : 29 U/ml) [116]. Des résultats semblables ont été décrits avec des patients testés dans les 48 à 96 heures après le début de la fièvre [117]. Une étude incluant 1585 patients atteints de dengue a, quant à elle, permis de montrer que les concentrations des deux transaminases, ASAT et ALAT, étaient significativement plus élevées chez les patients avec des formes sévères de la maladie que chez ceux avec une forme non compliquée. [118]. Il a néanmoins été démontré par Lee *et al.* que bien que les valeurs moyennes des ALAT et d'ASAT sont plus élevées chez les patients ayant une forme sévère de la dengue par rapport à ceux ayant une forme non sévère, ces deux indicateurs ne sont pas adaptés pour identifier précocement les patients risquant d'évoluer vers une forme grave de la maladie. En effet les valeurs sont extrêmement variables d'un patient à l'autre et en réalisant des analyses statistiques à l'aide de courbes ROC, aucune valeur seuil permettant de discriminer de façon satisfaisante les deux groupes de patients n'a pu être déterminée [119]. En fixant une valeur seuil à 60 U/ml pour les ASAT, Kalayanarooj *et al.* ont obtenu une VPP des formes sévères de 52% et une VPN de 91% [116].

#### *Les lipides*

Plusieurs études se sont intéressées aux concentrations de différents lipides sanguins et ont montré des différences entre patients atteints de forme non sévères et ceux atteints de formes sévères [117,120–122]. Ainsi, la concentration en cholestérol et en triglycérides est d'autant plus basse que la maladie est sévère [117,120,121,123]. Une concentration en triglycérides inférieure à 150 mg/dL a été associée à un risque quatre fois plus important de développer un choc [120]. Il a aussi été décrit, par Suvarna *et al.*, que la concentration en lipoprotéines de très basse densité (VLDL ou Very-Low Density Lipoprotein) est significativement diminuée chez les cas DSS par rapport aux cas DF. Si la concentration en VLDL est plus faible en cas de DHF que lors de DF, la différence n'est pas significative statistiquement [120]. Tout récemment, Biswas *et al.* ont aussi rapporté une association entre diminution de la concentration en LDL et sévérité de la maladie [123].

#### *La ferritine*

La ferritine est une protéine globulaire qui sert au stockage et au transport du fer. Sous sa forme libre, elle est toxique pour les cellules. L'hyperferritinémie est un processus non spécifique de défense de

l'organisme contre une infection et elle est donc souvent retrouvée lors de maladies infectieuses. Néanmoins, plusieurs études ont montré que la concentration en ferritine était plus élevée chez les patients infectés par le DENV par rapport à des patients souffrant d'autres infections fébriles [124–126] et qu'elle tendait à être plus élevée chez les patients avec une forme sévère de la dengue par rapport à ceux présentant une forme non-sévère [124–127]

En fixant une valeur de ferritine supérieure à 1200 ng/ml comme marqueur prédictif de risque de développement de formes hémorragiques, Chaiyaratana *et al.* ont déterminé une sensibilité de 81,5%, 84,4% et 89,9% lorsque cette mesure était réalisée le cinquième, sixième et septième jour après le début de la fièvre, respectivement. Les spécificités étaient par contre faibles : 42,4%, 39% et 36,4%, respectivement [127]. Plus récemment, Soundravally *et al.* ont réalisé des analyses statistiques à l'aide de courbes ROC afin de déterminer la meilleure valeur seuil à utiliser. Avec des échantillons prélevés à l'admission des patients, une valeur seuil de 866,5 ng/ml (AUC=0,783) permettrait d'obtenir une sensibilité de 76,9% et une spécificité de 83,3% tandis qu'une valeur seuil de 723 ng/ml (AUC=0,958) aboutirait à une sensibilité de 90% et une spécificité de 91,7% avec des échantillons prélevés au moment de la défervescence [125]. Dans l'étude menée par Fragnoud *et al.* avec 49 échantillons prélevés avant la phase de défervescence thermique chez des patients présentant une dengue secondaire (19 DF et 20 DHF), un seuil compris entre 750 et 1000 ng/ml serait associé à une sensibilité de 80% (16/20) et une spécificité de 68,4% (13/19) [124].

Une association entre hyperferritémie (ferritine  $\geq$  500 ng/ml) et thrombocypénie, élévation des transaminases hépatiques et activation des systèmes fibrinolytique et de coagulation a été montrée par van de Weg *et al.* chez les malades infectés par le virus de la dengue [126].

L'hyperferritémie observée au cours de la dengue est probablement multifactorielle, liée en partie à la cytolyse hépatique, les hépatocytes étant un lieu de synthèse de la ferritine, et à l'infection des monocytes et des macrophages, cellules elles aussi productrices de ferritine. Les différentes études menées montrent que la mesure de la ferritinémie est un outil intéressant pour le suivi des patients avec la dengue et qu'une valeur élevée (supérieure à 700 ng/ml) est un facteur de risque d'évolution vers une forme sévère de la maladie.

### 5.3.3. Les marqueurs immunitaires

Les concentrations plasmatiques de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et vasoactives sont élevées dans les cas de dengue hémorragique, avant et au moment de l'apparition de la fuite plasmatique [128]. Il a notamment été démontré que les concentrations moyennes en IL-10 [129–131], et en VCAM-1 [132–134] sont plus élevées chez les patients avec une forme sévère de la maladie que chez ceux avec une forme non compliquée. [53]. Néanmoins, aucune valeur seuil permettant d'utiliser la concentration d'une de ces cytokines comme marqueur pronostic n'a pu être déterminée du fait de la trop grande hétérogénéité des valeurs obtenues entre les groupes de patients [134,129].

Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est une cytokine qui avec ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 intervient dans l'angiogenèse et dans la préservation de l'intégrité vasculaire. Des études contradictoires ont été publiées concernant cette cytokine. Certaines études ont révélé une concentration plus élevée chez des patients ayant développé une forme hémorragique par rapport aux patients avec une forme classique de la dengue [135–137]. D'autres, plus récentes, n'ont pas mis en évidence de différence [138–140]. Récemment, il a été montré qu'une concentration en VEGFR-1 soluble, un des récepteur du VEGF, supérieure à 350 pg/ml permettait de prédire une évolution vers une forme hémorragique de la dengue, avec une sensibilité de 79%, une spécificité de 78%, une VPP de 76% et une VPN de 81% [138].

Ferreira *et al.* ont aussi décrit que la chimiokine CXCL10/IP10 mesurée entre le 5<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour après le début de la fièvre était plus élevée chez les patients présentant une forme sévère de la maladie. Des concentrations plus élevées en CXCL10/IP10 ont été observées chez les patients souffrant d'une hépatomégalie douloureuse ou d'épanchements cavitaires par rapport à ceux qui ne présentaient pas ces symptômes [130].

## 6. Le traitement de la dengue

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique visant à inhiber le virus de la dengue. La prise en charge thérapeutique des patients atteints de dengue est donc uniquement symptomatique. Elle est relativement simple, peu coûteuse et efficace sous réserve d'être correctement et le plus rapidement possible mise en place après le début de l'infection. Elle est basée sur l'administration d'antalgiques et d'antipyrétiques de type paracétamol - l'usage de salicylés étant à proscrire afin de ne pas aggraver les

problèmes hémorragiques - et sur une réhydratation pour compenser les pertes liquidiennes. Un patient pouvant être réhydraté précocement et correctement par voie orale avec des solutions de réhydratation orales, ou plus simplement avec des jus de fruits ou des liquides sucrés et riches en électrolyte, aura moins de chance de devoir être hospitalisé. Si la réhydratation à domicile n'est pas suffisante du fait de vomissements persistants, d'une fièvre trop élevée ou de l'apparition d'une fuite plasmatique importante, une hospitalisation est nécessaire afin de compenser les pertes liquidiennes par des perfusions de solutés. Néanmoins, afin de limiter le risque de surcharge liquidienne, la perfusion parentérale doit être maintenue au minimum nécessaire pour maintenir une stabilité hémodynamique jusqu'à ce que la perméabilité vasculaire revienne à la normale [3,55].

Le diagnostic précoce de l'infection est donc un enjeu majeur du dispositif de prise en charge de la maladie.

## **7. La recherche d'un vaccin**

La recherche d'un vaccin contre la dengue a débuté il y a presque 80 ans. Depuis lors, plus de 25 vaccins candidats ont été testés lors d'essais cliniques. Un premier vaccin est en cours d'enregistrement dans de nombreux pays, en vue d'une commercialisation courant 2016.

Le développement d'un vaccin contre la dengue est complexe, en particulier en raison de l'absence de modèle animal qui reproduise la maladie humaine, d'une compréhension incomplète des phénomènes physiopathologiques qui sous-tendent la pathogénèse de la maladie, de l'absence de corrélat immunologique de protection, de la nécessité d'avoir un vaccin protégeant complètement contre les quatre sérotypes du virus afin d'éviter le péché antigénique originel et le risque de voir se développer des formes sévères de la maladie suite à l'ADE.

### **7.1. Les vaccins en cours d'essais cliniques**

De nombreux candidats vaccins, utilisant des approches très différentes, sont en cours de développement. Pour certains d'entre eux, les essais cliniques ont débuté ou sont même déjà bien avancés (tableau 2).

**Tableau 2 : Vaccins contre la dengue en cours d'essais cliniques**

Nom	Développeur	Type de vaccin	Phase
ChimeriVax Dengue	Sanofi Pasteur	Vivant atténué chimérique YFV/DENV	III
TetraVax-DV (TV003 et TV005).	NIH/NAID/Butantan Institute	Vivant atténué avec mutagenèse dirigée, chimérique DENV/DENV	III
DENVax	Takeda Pharmaceutical/Inviragen	Vivant atténué, chimérique DENV/DENV	II
TDEN-LAV	GSK/WRAIR	Atténué vivant	II
DPIV	GSK/WRAIR/Fiocruz	Purifié inactivé	I/II
V180	Hawaii Biotech/Merck	Sous-unitaire Protéine E recombinante	I
TVDV	NMRC/Vical	ADN Gènes PrM et E DENV-1	I

NAID: National Institutes of Allergy and Infectious Diseases

WRAIR: Walter Reed Army Institute for Research

NMRC: Naval Medical Research Center

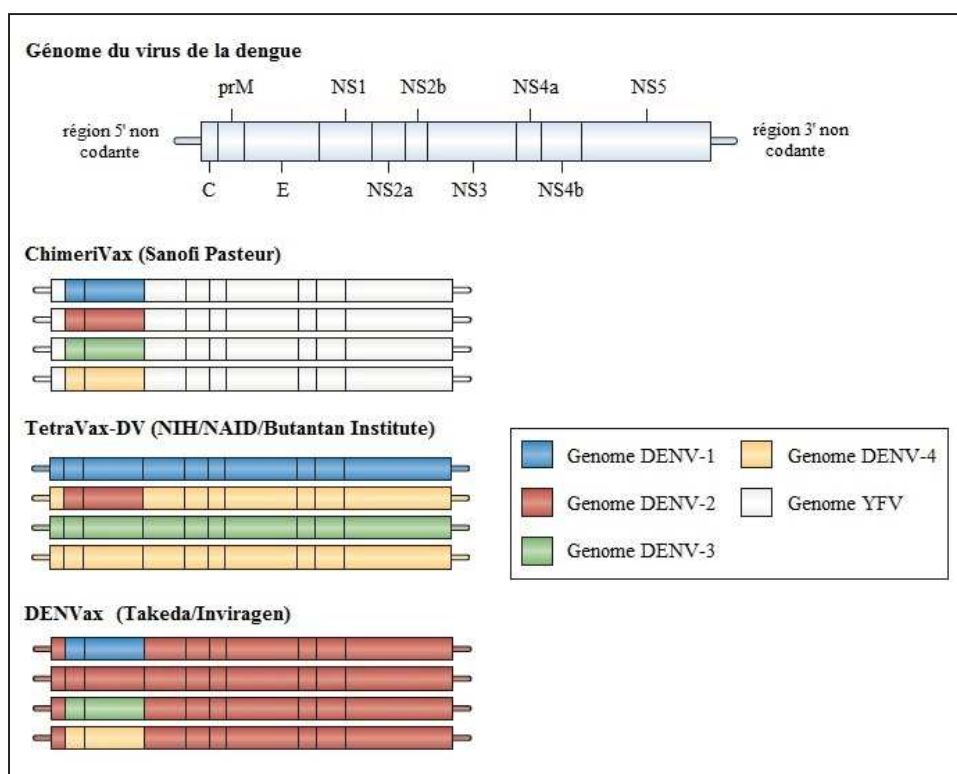
### **7.1.1. Les vaccins vivants atténués simples et recombinants**

L'approche du vaccin vivant atténué est la première approche qui a été envisagée pour un vaccin contre le virus de la dengue puisque cette technique a très bien fonctionné pour le virus de la fièvre jaune. L'atténuation se fait par passage successif des virus sur des cellules non humaines. Il ne reste à l'heure actuelle plus qu'un seul candidat vaccin tétravalent de ce type développé par le WRAIR aux Etats-Unis sous licence GlaxoSmithKline (TDEN-LAV). L'atténuation a été réalisée par passages successifs sur des cellules de reins de chien (PDK). Comme d'autres candidats vaccins abandonnés, les premières formulations de ce vaccin ont montré des problèmes d'immunogénicité déséquilibrée entre les quatre sérotypes ainsi qu'une réactogénécité trop importante. De nouvelles formulations ont néanmoins donné de bons résultats lors d'essais cliniques de phase I/II et II, aux Etats-Unis, en Thaïlande et à Porto-Rico. L'innocuité du vaccin ainsi qu'une immunogénécité acceptable ont été montrées, chez des adultes aussi bien que chez des enfants [141–144]. L'efficacité de la protection doit maintenant être évaluée. Néanmoins face à la complexité du processus de production d'un tel vaccin, il se pourrait que le développement de ce candidat n'aille pas plus loin [145].

Une approche plus moderne d'atténuation par mutagenèse dirigée du génome a été envisagée. Une délétion de 30 nucléotides ( $\Delta 30$ ) dans la région 3' non traduite du DENV-4 a permis d'obtenir un virus

atténué, nommé DEN4Δ30 [146,147]. Ce virus atténué a alors été utilisé lors d'une étude clinique de phase I au cours de laquelle l'innocuité et l'immunogénicité ont été démontrées permettant d'envisager de reproduire le même processus de mutagenèse avec les autres sérotypes afin de mettre au point un vaccin tétravalent. Si cette stratégie a permis une atténuation du DENV1 (DEN1Δ30) tout en conservant l'immunogénicité [148], des résultats peu satisfaisants ont été obtenus pour les sérotypes 2 et 3. D'autres stratégies d'atténuation ont donc été envisagées pour ces deux sérotypes. Dans la formulation tétravalente aujourd'hui utilisée dans les essais cliniques de phase II et III (TetraVax-DV, figure 16), le sérotype 3 a été atténué grâce à la mutation Δ30 originale à laquelle une délétion supplémentaire d'un 31<sup>ème</sup> nucléotide dans la partie non traduite du génome, 55 nucléotides en amont de la délétion Δ30, a été ajoutée. Concernant le sérotype 2, une forme chimérique (DEN2/4 Δ30) a été adoptée. Cette souche chimérique utilise le DENV4 Δ30 comme squelette dans lequel les gènes prM et E ont été remplacés par ceux du sérotype 2 [149]. Au cours des premiers essais cliniques de phase I (NCT01072786 et NCT01436422), menés avec des participants n'ayant jamais été précédemment exposés à un flavivirus, deux formulations du vaccin ont été évaluées : la première formulation (TV003) est composée de 1000 unités formant plages (UFP) de chaque sérotype alors que la seconde formulation (TV005) contient dix fois plus de DENV-2. L'innocuité a été démontrée pour les deux formulations. Une bonne immunogénicité a été obtenue avec des taux de séroconversion de 92%, 76%, 97% et 100% pour les sérotypes 1 à 4 avec une dose unique de la formulation TV003 et 92%, 97%, 97% et 97% avec une dose unique de la formulation TV005. Une séroconversion contre les quatre sérotypes a été obtenue chez 74% et 90% des participants avec les formulations TV003 et TV005, respectivement. Une seconde dose de vaccin, six mois après la première, s'est révélée sans danger mais peu utile pour l'augmentation de la réponse humorale, déjà très bonne avec une dose unique [150]. Un essai similaire a été réalisé mais avec des patients ayant déjà été infectés par un flavivirus ou ayant été vaccinés contre un flavivirus (NCT01506570). L'essai est terminé mais les résultats ne sont pas encore publiés. Un autre schéma vaccinal, avec deux doses de TV003, administrées à 0 et 12 mois, a été évalué au cours d'un essai clinique de phase I aux Etats-Unis (NCT01782300). Les résultats n'ont pas encore été publiés. Deux essais cliniques de phase II sont en cours, l'un en Thaïlande (NCT022332733) et le second au Brésil (NCT01696422), avec respectivement, 266 et 300 participants. L'essai Thaïlandais est un essai classique afin d'évaluer

l'innocuité et l'immunogénicité de deux doses du vaccin TV003, administré à 0 et 6 mois, tandis que l'essai brésilien a pour but de comparer la formulation TV003 liquide à une formulation lyophilisée. Une étude de phase III a été démarrée en juin 2015 (NCT02406729) au Brésil avec la formulation TV003 lyophilisée du vaccin, administré en dose unique. Au cours de cet essai, environ 17 000 sujets, âgés de 24 mois à 59 ans, seront recrutés sur plusieurs sites. Cet essai s'achèvera en novembre 2021 mais les premiers résultats devraient être connus courant 2017. La formulation actuelle du vaccin utilisée pour les essais cliniques de phase II et III pourrait être modifiée puisqu'une souche atténuée non chimérique de DENV2 (DEN2Δ30-7169) est actuellement en cours d'essai clinique (phase I, NTC01931176).



**Figure 16 : Différentes stratégies pour la formulation d'un vaccin tétravalent contre le virus de la dengue (adapté de Rothman *et al.* [128])**

Une stratégie originale de chimérisation a été adoptée par Accambis, sous licence Sanofi Pasteur, afin de créer un vaccin recombinant vivant atténué. Le vaccin, nommé ChimeriVax Dengue, est constitué de quatre vaccins monovalents possédant la machinerie répliquative du virus vaccinal fièvre jaune 17D (YF17D), et exprimant les gènes prM et E de chacun des quatre sérotypes du virus de la dengue (figure 16). Les différents essais cliniques menés pour évaluer l'innocuité et l'immunogénicité du vaccin ont donné de bons résultats. L'administration de trois doses de vaccins à six mois d'intervalle permet d'obtenir une réponse humorale équilibrée contre les quatre sérotypes, sans entraîner d'effets

secondaires graves [151–156]. Ce candidat vaccin est le candidat le plus avancé à ce jour avec deux essais cliniques de phase III de très grande ampleur terminés. Au cours de ces essais cliniques, le même protocole vaccinal a été utilisé. Trois doses de vaccins ou de placebo ont été administrées, à 0, 6 et 12 mois, avec un ratio vaccin:placebo de 2:1. La première évaluation de l'efficacité du vaccin a eu lieu lors d'un essai clinique de phase III dans cinq pays d'Asie du Sud-Est (Indonésie, Malaisie, Philippines, Thaïlande, Vietnam) sur une population de 10 275 enfants âgés de 2 à 14 ans suivis pendant un an après la fin du protocole de vaccination. Au cours de cette étude, une efficacité vaccinale globale de 56,5% a été obtenue mais la protection dépend du sérotype avec des efficacités de plus de 75% pour les sérotypes 3 et 4, de 50% pour le sérotype 1 et de seulement 35% pour le sérotype 2. L'analyse statistique a montré une efficacité non significative du vaccin pour le sérotype 2 par rapport au placebo [157]. Un tel résultat avait déjà été obtenu au cours d'une étude d'efficacité de phase IIb en Thaïlande [158]. Le second essai de phase III s'est, quant à lui, déroulé dans cinq pays d'Amérique Latine (Colombie, Brésil, Mexique, Porto Rico et Honduras). Au cours de cet essai, 20 896 enfants âgés de 9 à 16 ans ont été inclus et une efficacité vaccinale globale de 60,8% a été observée. De la même façon que lors de l'essai asiatique, des efficacités supérieures ont été obtenues pour les sérotypes 3 et 4 par rapport aux sérotypes 1 et 2. Dans cet essai, le vaccin s'est révélé efficace contre les quatre sérotypes [159]. Malgré les problèmes d'efficacité avec le sérotype 2, la commercialisation de ce vaccin est prévue pour 2016.

Un autre candidat chimérique, nommé DENVax, a été développé par l'entreprise pharmaceutique Takeda. Ce candidat vaccin est composé d'un mélange d'une souche DENV-2 vivante atténuée (DENVax-2) et de trois souches DENV-1, 3 et 4 chimériques, construites à partir de la souche DENV-2 atténuée en remplaçant les gènes prM et E par ceux de souches sauvages DENV-1, 3 ou 4 (figure 16). La souche DENVax-2 a été développée dans les années 80 en Thaïlande par l'université Mahidol, à partir d'une souche sauvage DENV-2 isolée chez un patient symptomatique. L'atténuation a été obtenue après 53 passages successifs sur des cellules de reins de chien (PDK) [160]. Plusieurs essais cliniques de phase I et II sont en cours ou achevés. L'administration de deux doses de vaccins (0 et 3 mois) à différents dosages, par différentes voies (sous-cutanée ou intramusculaire) a été évaluée au cours de deux essais de phases I, l'un réalisé aux Etats-Unis (NCT01110551) et l'autre en Colombie (NCT01224639). Les deux formulations du vaccin et les deux voies d'administration se sont révélées



sans danger et des anticorps neutralisants ont été obtenus pour les quatre sérotypes [161,162]. Deux études de phase I (NCT01728792 et NCT01765426) ont aussi été réalisées afin d'évaluer et comparer l'administration du vaccin par seringue classique à l'administration avec des injecteurs sans aiguille. Ce candidat vaccin est à l'heure actuelle en cours d'essais cliniques de phase II. Le premier essai de phase II a débuté en novembre 2011 et s'achèvera en avril 2016 (NCT01511250). Au cours de cet essai multicentrique, 344 participants, enfants et adultes, ont été recrutés en Colombie, à Porto-Rico, à Singapour et en Thaïlande, afin d'évaluer l'innocuité et l'immunogénicité du vaccin, administré en deux doses, à 0 et 3 mois. Un deuxième essai de phase II est en cours aux Etats-Unis afin d'évaluer, avec 1000 participants adultes, l'équivalence des formes liquide et lyophilisé du vaccin (NCT02193087). En décembre 2014, un essai important a débuté afin d'évaluer la réponse humorale à trois différents schéma vaccinaux (dose unique, double dose à 0 et 3 mois et double dose à 0 et 12 mois), chez des enfants vivants dans des pays endémiques pour la dengue (Colombie, République Dominicaine, Panama, Philippines, Thaïlande) (NCT02302066). Une dernière étude de phase II a débuté en juin 2015 à Singapour afin de comparer la réponse humorale développée contre chaque sérotype après vaccination avec deux formulations différentes du vaccin, administré en dose unique (NCT02425098).

### ***7.1.2. Les vaccins purifiés inactivés***

L'Institut Walter Reed, en collaboration avec GSK, a développé un vaccin tétravalent purifié, inactivé. Les différents sérotypes ont été cultivés sur des cellules VERO, purifiés par ultracentrifugation avec gradient de saccharose et inactivés avec du formaldéhyde. Un premier essai clinique de phase I avec une formulation monovalente (DENV-1 PIV, NCT01502735) a déjà eu lieu aux Etats-Unis avec 20 participants adultes n'ayant pas d'antécédents d'infection passée par un flavivirus. L'innocuité de deux dosages différents a été évaluée. A l'heure actuelle, deux essais cliniques de phase I (NCT01666652 et NCT017002857) et un essai de phase I/II (NCT02421367) sont en cours avec des formulations tétravalentes du vaccin, nommé DPIV. Les deux essais cliniques de phase I ont pour but d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de différentes formulations du vaccin, avec différents adjuvants (hydroxyde d'aluminium, AS01E et AS03B), administrés en deux fois (0 et 1 mois), aux Etats-Unis et à Porto-Rico. L'essai de phase I/II a débuté en juin 2015 aux Etats-Unis. Le recrutement de 140 adultes est prévu. Plusieurs schémas d'administration de la formulation tétravalente contenant

l'adjuvant AS03B par voie intramusculaire sont évalués: un rappel à 1 mois ou 3 mois et deux rappels à 1 et 3 mois après l'injection initiale. Une étude de phase I a débuté en novembre 2014 afin d'étudier la synergie entre le vaccin purifié inactivé DPIV et le vaccin atténué vivant TDEN-LAV (NCT02239614). Un groupe de patients recevra le vaccin purifié inactivé en premier puis recevra un rappel avec le vaccin atténué vivant et un second groupe de patient recevra le vaccin atténué vivant en premier puis recevra un rappel avec le vaccin purifié inactivé.

### ***7.1.3. Les vaccins à ADN et les vaccins sous-unitaires***

Un vaccin à ADN, développé par le Naval Medical Research Center, aux Etats-Unis, est aujourd'hui au stade des premiers essais cliniques. Ce vaccin est constitué d'un plasmide possédant un gène promoteur du cytomégalo virus humain, le plasmide VR1012, dans lequel ont été clonés les gènes prM et E. Un plasmide différent est construit pour chaque sérotype. Un premier prototype monovalent DENV-1 (DIME<sup>100</sup>) a été évalué sur 24 participants au cours d'un essai clinique de phase I (NCT00290147). Deux dosages ont été évalués (1 mg et 5 mg). Le vaccin prototype a montré une bonne innocuité mais une immunogénicité insuffisante après trois injections (0, 1 et 5 mois). En effet, le vaccin à 1 mg n'a induit des anticorps neutralisants chez aucun participant et seul 42% des participants ayant reçu le vaccin avec un dosage à 5 mg ont développé des anticorps [163]. Une étude sur des primates non humains d'une forme tétravalente du vaccin avec un adjuvant lipidique a permis de montrer que l'addition de l'adjuvant permettait d'obtenir de meilleurs titres d'anticorps neutralisants que la formulation sans adjuvant [164]. Cette même formulation est en cours de phase I (NCT01502358) avec 40 participants adultes.

Merck, en collaboration avec Hawaii Biotech, a développé le vaccin V180 sous-unitaire. Ce vaccin est composé de protéines E recombinantes des quatre sérotypes tronquées de 20% dans la région C terminale. La production des protéines E a été faite dans des cellules de drosophile S2 transformées pour exprimer les gènes prM et 80% de la protéine E. Le premier essai clinique de phase I (NCT01477580) s'est achevé en janvier 2015. Au cours de cet essai, 98 participants adultes ont été recrutés et l'innocuité et l'immunogénicité de plusieurs formulations, différents dosages combinés à différents adjuvants, administrées en trois doses (0, 1 et 2 mois), ont été évaluées. Les résultats ne sont pas encore publiés. L'utilisation du vaccin V180, avec ou sans adjuvant, comme rappel après une

vaccination avec le vaccin TetraVax (TV003 ou TV005) est en cours d'évaluation en essai de phase I (NCT02450838).

## 7.2. Les questions posées par les résultats des essais cliniques de phase II et III

Les mauvais résultats obtenus avec le vaccin ChimeriVax Dengue pour le sérotype 2 au cours des essais cliniques de phase IIb en Thaïlande [158] et III en Asie [157], soulèvent plusieurs questions, notamment concernant le corrélat de protection. A l'heure actuelle, la présence d'anticorps neutralisants contre les quatre sérotypes, mesurée par test de séroneutralisation, est considérée comme le meilleur indicateur de protection. Ce corrélat de protection a néanmoins montré ses limites au cours de ces deux essais cliniques. En effet, les différents essais cliniques menés pour démontrer l'immunogénicité du vaccin ont montré l'apparition d'anticorps neutralisants contre les quatre sérotypes chez les sujets vaccinés, qu'ils aient ou non déjà été en contact avec des flavivirus, sauvages ou vaccinaux, avant la vaccination avec le ChimeriVax. Or, l'efficacité du vaccin s'est révélée insuffisante pour les souches DENV-2 circulant en Asie, et particulièrement en Thaïlande. D'autres corrélats de protection pourraient être nécessaires afin d'évaluer l'immunogénicité du vaccin lors des phases pré-cliniques et cliniques. Il a été montré récemment un rôle protecteur des lymphocytes T CD8+ dirigés contre les protéines non structurales NS3, NS4B et NS5 [165]. Or, le vaccin ChimeriVax ne peut pas induire de réponse cellulaire T dirigée contre les protéines non structurales des différents sérotypes du virus de la dengue puisque les virus recombinants expriment les protéines non structurales du virus vaccinal de la fièvre jaune. En effet, il semble ne pas y avoir de réaction CD8 croisée entre les antigènes du virus de la dengue et du virus de la fièvre jaune YF17D [166]. La réponse immunitaire cellulaire T CD8+ induite par le vaccin concurrent DENVax contre les protéines non structurales a fait l'objet d'une publication récente. Ce vaccin induit une réponse T CD8+ dirigée majoritairement contre la protéine NS3 et caractérisée principalement par la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . Les lymphocytes T CD8+ initialement dirigés contre les protéines non structurales du sérotype 2 pourraient aussi reconnaître les protéines non structurales des autres sérotypes. Ce résultat reste néanmoins à confirmer sur un plus grand nombre de sujets [167]. Deux autres hypothèses seraient : (1) que la quantité d'anticorps neutralisants dirigés contre le DENV-2 induite par la vaccination n'est pas

suffisante pour neutraliser les souches de DENV-2 qui circulent à l'heure actuelle en Asie ou (2) que les monocytes sont infectés trop rapidement par le DENV-2, ne laissant pas le temps aux anticorps d'agir [168].

La clé du problème pourrait aussi se trouver dans la différence entre anticorps homotypiques et anticorps hétérotypiques. Les anticorps homotypiques qui permettent la protection à vie contre le sérotype contre lequel ils sont dirigés ne seraient produits que lorsqu'il y a eu réplique du virus. Or il semblerait que la souche vaccinale de sérotype 2 du vaccin ChimeriVax ne se réplique pas. La protection contre le DENV-2 ne se ferait donc que grâce à des anticorps hétérotypiques et cette protection ne serait pas suffisante. [168]

Les résultats obtenus avec le vaccin ChimeriVax mettent en avant l'intérêt de mener des essais cliniques avec une infection expérimentale à l'aide de souches virales atténuées à la suite du processus de vaccination [169]. De telles études pourraient permettre d'aider à l'identification des candidats vaccins avant les études d'efficacité de grande ampleur. Deux essais de phase I de ce type ont été menés pour le développement du vaccin TetraVax. Au cours de ces deux essais cliniques, 48 patients ont été vaccinés avec une dose unique de la formulation TV003 (NCT02021968) ou TV005 (NCT02317900) puis ont reçu six mois après la vaccination une injection d'une souche DENV-2 atténuée, différente de la souche vaccinale. Le premier essai clinique, avec la formulation TV003, s'est achevé en mai 2015 mais les résultats n'ont pas encore été rendus publics. Le second essai s'achèvera en janvier 2016.

L'armée américaine a développé une souche de DENV-1 atténuée, nommée DENV-1 Live Virus Human Challenge (DENV-1-LVHC), destinée à être utilisée pour les infections humaines expérimentales faisant suite à une vaccination. Une étude clinique de phase I visant à vérifier que cette souche n'entraîne que des formes asymptomatiques ou bénignes de la maladie va débuter en octobre 2015 (NCT02372175).

## **DEUXIEME PARTIE**

### **Evaluation de l'utilisation d'un test rapide de diagnostic de la dengue sur le terrain**

---

## 1. Contexte et objectifs de l'étude

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique de la dengue. L'obtention de bons résultats cliniques passe donc par l'administration de soins de soutien, basés essentiellement sur une réhydratation du patient afin de compenser les pertes liquidiennes. La survenue de formes graves dues à la dengue peut être significativement réduite en assurant en temps opportun une prise en charge clinique appropriée reposant sur un diagnostic clinique et en laboratoire précoce ainsi que des soins de soutien adaptés et rapidement dispensés. Les symptômes de la dengue étant peu spécifiques et communs à certaines maladies bactériennes (leptospirose, thyphoïde, rickettsioses, infection à méningocoque, etc.), un diagnostic précoce d'infection par le DENV permet aussi d'éviter la mise en place d'une antibiothérapie. A l'heure actuelle, la meilleure façon de diagnostiquer la dengue est la PCR et avec les techniques en temps réel, il est désormais possible d'obtenir un résultat en deux heures environ. Néanmoins cette technique n'est réalisable que dans des structures de soins disposant de moyens importants. La majorité des patients n'a malheureusement pas accès à de telles structures. Les techniques ELISA, utilisables pour la détection de l'antigène NS1 ou des anticorps anti-DENV, sont techniquement plus simples à mettre en œuvre mais restent tout de même peu utilisées dans les pays en développement, comme le Cambodge. Les TDR semblent être une alternative intéressante. Ces tests ne nécessitent en effet aucun matériel compliqué et sont réalisables par tous les personnels de santé, dans n'importe quelles structures de soin.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le test rapide SD Bioline Dengue Duo, commercialisé par la société coréenne Standard Diagnostic, de la façon la plus complète possible en associant une étude rétrospective à une étude prospective. Le test évalué est intéressant car il combine détection de l'antigène NS1 - marqueur de certitude d'infection par le DENV - et détection des IgM et IgG anti-DENV - marqueurs probabilistes d'infection - dans le sérum, le plasma ou le sang complet. Les brochures commerciales décrivant le test et son utilisation sont fournies en annexe (annexes 1 et 2).

Le test SD Bioline Dengue Duo a déjà été évalué auparavant [104,170–172], mais jamais de façon prospective, dans des conditions de terrain, au chevet des patients. L'évaluation prospective a été menée pendant la période épidémique de la maladie dans deux hôpitaux provinciaux du Cambodge, tous deux équipés d'un laboratoire d'analyse rudimentaire. Les tests ont dans un premier temps été

réalisés dans les laboratoires des hôpitaux, à l'admission des patients, puis les échantillons de ces mêmes patients ont été de nouveau testés à l'IPC, centre de référence du programme national de surveillance de la dengue, afin de comparer les performances. Une étude rétrospective a aussi été réalisée avec un panel d'échantillons de contrôle afin de compléter les résultats obtenus au cours de l'étude prospective à l'aide de prélèvements préalablement caractérisés et sélectionnés de manière à refléter le plus grand nombre de situations possibles (quatre sérotypes, nombre plus équilibré d'infections primaires par rapport aux infections secondaires, etc.) et de décrire avec une plus grande précision les caractéristiques intrinsèques du test rapide SD. L'impact de la mise à disposition de ce TDR dans les hôpitaux sur la prise en charge des patients inclus dans l'étude a aussi été évalué.

## 2. Principaux résultats

L'évaluation comparative du test sur le terrain (dans ce cas particulier dans deux hôpitaux de province) et en laboratoire de référence (IPC) a révélée une concordance modérée pour les résultats de détection des IgG et IgM anti-DENV (pourcentage de concordance : 68.8%, coefficient  $\kappa$  : 0,55) alors que la concordance obtenue avec le test NS1 est excellente (pourcentage de concordance : 98.1%, coefficient  $\kappa$  : 0,96).

Sur les 49 résultats discordants obtenus pour la détection des anticorps, 34 (69,3%) sont des résultats positifs à l'IPC mais négatifs à l'hôpital tandis que 13 (26,5%) sont des résultats négatifs à l'IPC mais positifs à l'hôpital. Deux raisons pourraient expliquer ce résultat : soit la lecture du test à l'hôpital est réalisée avant les 15 minutes nécessaires à l'obtention du résultat, soit il y a un problème d'interprétation des résultats liés aux bandes faibles. En effet, la coloration des bandes obtenues en cas de résultat positif varie d'un rose soutenu à un rose très pale. Ces bandes très pales, nommées bandes ou résultats faibles dans ce manuscrit, sont peu visibles, particulièrement en cas de mauvais éclairage. Parmi les 41 résultats positifs à l'IPC mais rapportés négatifs par l'hôpital, 29 (soit 70,7%) sont des résultats jugés faibles à l'IPC. En excluant ces résultats faibles, une meilleure concordance est obtenue (pourcentage de concordance = 82%, coefficient  $\kappa$  = 0,73). Les bandes faibles posent donc effectivement un problème d'interprétation et rendent le résultat partiellement subjectif. L'apparition de bandes faibles peut amener la personne qui utilise le test à se questionner sur la validité du résultat

puis à douter de la qualité du test. Il est donc nécessaire que les entreprises commercialisant des tests rapides fassent un effort afin d'éviter ce type de résultat.

Le problème des résultats discordants entre les hôpitaux et l'IPC pour la partie anticorps du test s'est traduit par une sensibilité du test significativement plus faible sur le terrain par rapport à l'IPC (85,7% versus 94,4%). La spécificité, la VPP et la VPN sont également plus basses mais de façon non significative d'un point de vue statistique.

La partie NS1 est la composante la plus importante du test SD puisque que la détection de cet antigène confirme l'infection par le DENV alors que la détection d'IgM ou d'IgG anti-DENV ne permet que de suspecter une infection par le DENV. Le test NS1 est hautement spécifique (96,8%) mais peu sensible (45%). L'analyse rétrospective a permis de montrer que la sensibilité de ce test est directement liée à la présence d'anticorps anti-DENV dans l'échantillon, et plus particulièrement à la quantité d'IgG. Alors qu'une sensibilité supérieure à 80% est obtenue avec les échantillons ne contenant pas ou peu d'anticorps (titre IHA < 640), elle chute à 36,8% avec les échantillons ayant un titre en anticorps élevé (titre IHA  $\geq$  640).

L'intérêt du test développé par SD est donc d'associer la détection de l'antigène NS1 à la détection des anticorps dirigés contre le DENV (IgM et IgG). Si cette association ne permet plus d'avoir un diagnostic de confirmation avec un prélèvement unique, elle permet d'améliorer de façon importante les performances du test et d'atténuer les effets négatifs liés à la présence des IgG. Dans des conditions optimales d'utilisation, en tenant compte des trois marqueurs de diagnostic, une sensibilité de 94,4%, une spécificité de 90%, une VPP de 97,5% et une VPN de 77,1% ont été obtenues.

Les dossiers médicaux de 129 patients (82,2% des patients inclus) ont été analysés afin d'évaluer l'impact de la mise à disposition du test rapide dans les hôpitaux sur la prise en charge des patients. Cette analyse a montré que les médecins ont peu pris en compte les résultats du test rapide pour traiter les patients. Tous les patients ont reçu un traitement de réhydratation par voie parentérale, que le résultat du test soit positif ou négatif. Parmi les patients avec un test positif, 17,8% (16/90) ont reçu une antibiothérapie tandis que 33,3% (13/39) des patients avec un test négatif ont été traités avec des antibiotiques (p-value=0,067).



### 3. Article

**Article 1: Field Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detect Dengue NS1, IgM and IgG**

Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, Te V, Y B, Try PL, Buchy P. Field Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detect Dengue NS1, IgM and IgG. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(12):e1993

# Field Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detects Dengue NS1, IgM and IgG

Anne-Claire Andries<sup>1</sup>, Veasna Duong<sup>1</sup>, Chantha Ngan<sup>2</sup>, Sivuth Ong<sup>1</sup>, Rekol Huy<sup>2</sup>, Kim Kim Sroin<sup>3</sup>, Vantha Te<sup>4</sup>, Bunthin Y<sup>1</sup>, Patrich Lorn Try<sup>3</sup>, Philippe Buchy<sup>1\*</sup>

**1** Institut Pasteur du Cambodge, Réseau international des Instituts Pasteur, Phnom Penh, Cambodia, **2** National Dengue Control Program, National Center of Parasitology, Entomology and Malaria Control, Ministry of Health, Phnom Penh, Cambodia, **3** Kampong Cham Provincial Hospital, Pediatric Department, Kampong Cham, Cambodia, **4** Takeo Provincial Hospital, Pediatric Department, Takeo, Cambodia

## Abstract

**Background:** Dengue diagnosis is complex and until recently only specialized laboratories were able to definitively confirm dengue infection. Rapid tests are now available commercially making biological diagnosis possible in the field. The aim of this study was to evaluate a combined dengue rapid test for the detection of NS1 and IgM/IgG antibodies. The evaluation was made prospectively in the field conditions and included the study of the impact of its use as a point-of-care test for case management as well as retrospectively against a panel of well-characterized samples in a reference laboratory.

**Methodology/Principal Findings:** During the prospective study, 157 patients hospitalized for a suspicion of dengue were enrolled. In the hospital laboratories, the overall sensitivity, specificity, PPV and NPV of the NS1/IgM/IgG combination tests were 85.7%, 83.9%, 95.6% and 59.1% respectively, whereas they were 94.4%, 90.0%, 97.5% and 77.1% respectively in the national reference laboratory at Institut Pasteur in Cambodia. These results demonstrate that optimal performances require adequate training and quality assurance. The retrospective study showed that the sensitivity of the combined kit did not vary significantly between the serotypes and was not affected by the immune status or by the interval of time between onset of fever and sample collection. The analysis of the medical records indicates that the physicians did not take into consideration the results obtained with the rapid test including for care management and use of antibiotic therapy.

**Conclusions:** In the context of our prospective field study, we demonstrated that if the SD Biotec Dengue Duo kit is correctly used, a positive result highly suggests a dengue case but a negative result doesn't rule out a dengue infection. Nevertheless, Cambodian pediatricians in their daily practice relied on their clinical diagnosis and thus the false negative results obtained did not directly impact on the clinical management.

**Citation:** Andries A-C, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, et al. (2012) Field Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detects Dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis* 6(12): e1993. doi:10.1371/journal.pntd.0001993

**Editor:** Jeremy Farrar, Oxford University Clinical Research Unit, Viet Nam

**Received:** August 6, 2012; **Accepted:** November 16, 2012; **Published:** December 27, 2012

**Copyright:** © 2012 Andries et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study was supported by the French Ministry of Research (<http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>). The funders had no role in 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.

\* E-mail: pbuchy@pasteur-kh.org

## Introduction

The World Health Organization estimates that 50 million dengue infections occur annually and approximately 2.5 billion people live in area at high risk of infection. These areas are located in tropical and sub-tropical regions in South East Asia, Africa, Eastern Mediterranean, Western Pacific, Central and South America. The number of reported cases increased approximately 30 times over the last 50 years [1] and this could be in relation to many factors including population growth, urbanization, failure to control mosquito vectors, etc. [2].

Dengue is a viral disease transmitted by *Aedes* mosquitoes, principally *Ae. aegypti*. Dengue virus (DENV) belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. There are 4 antigenically and genetically distinct serotypes (DENV-1, -2, -3 and -4). In human, the virus can cause a spectrum of illness ranging from asymptom-

atic infection or self-limiting influenza-like illness (dengue fever or DF) to life-threatening disease associated with vascular leakage, hemorrhage (dengue hemorrhagic fever or DHF), potentially leading to vascular shock (dengue shock syndrome or DSS).

There is currently no specific treatment available for dengue. An early diagnosis is nevertheless very important for efficient clinical management in order to cure or prevent life-threatening complications. In addition, accurate and early diagnosis directs clinical attention to warning signs of an evolution to severe forms and avoids unnecessary use of antibiotics. A range of serological and virological diagnostic methods are available but most of them require specialized laboratory equipment, experienced personnel and are time consuming which is not adapted for a field and point-of-care use. Serological diagnosis by ELISA or rapid diagnostic tests (RDTs) is technically easy to perform and provides fast results but requires most of the time paired sera to definitively confirm the diagnosis [1,3].



## Author Summary

Dengue is a potentially life-threatening viral disease. Symptoms are often not specific hence the importance to confirm the diagnosis during the early stage of the disease. Nevertheless, until recently only specialized laboratories were able to confirm dengue diagnosis. The discovery of the NS1 protein as a marker of infection has allowed the development of point-of-care tests for a rapid diagnosis confirmation. These tests have previously been evaluated by laboratories, but their performances have never been assessed in field conditions. In this study we evaluated the performance of SD Bioline Dengue Duo kit when tests were performed by hospital laboratories staff in a dengue hyper-endemic country. We also assessed the impact of the test results on the clinical management decision. The combination of NS1 test with antibodies detection improved the performance, though discordances on IgM and IgG results were observed between the hospitals and the national reference laboratories. Physicians treated patients according to their clinical diagnosis and did not take negative results into consideration.

Detection of the NS1 antigen in the blood is a recent and very popular diagnostic method. This viral protein is secreted in the blood and can be detected by ELISA or immunochromatographic tests from the first day of fever and up to 14 days after infection [4–7].

The purpose of this study was to evaluate a commercial rapid dengue diagnostic kit, the SD Bioline Dengue Duo device (Standard Diagnostic Inc., Korea), in particular in point-of-care applications, and to evaluate the impact of the results of this combined test on the clinical management decision. The SD Bioline Dengue Duo kit is composed of 2 tests designed to detect DENV NS1 antigen (first test) and anti-DENV IgM/IgG (second test) in serum, plasma or whole blood. The kit evaluation was double. Firstly, the use of the test in the field was for the first time evaluated during a prospective study in 2 Cambodian provincial hospitals. The results obtained in the hospital's laboratories were then compared with those reported with the same samples by a national reference laboratory at Institut Pasteur in Cambodia (IPC). We also investigated how the results of this point-of-care test designed to assist clinical management were perceived and subsequently incorporated into the clinical management decision of physicians from 2 hospitals during a dengue epidemic. Secondly, a more usual retrospective case-control evaluation against reference methods was performed at IPC in order to assess the kit performances in the context of a dengue-endemic South-East Asian country.

## Materials and Methods

### Patients' recruitment and samples collection for the prospective evaluation

Patients were enrolled in the pediatric wards of Kampong Cham and Takeo provincial hospitals during the 2011 dengue epidemic in Cambodia i.e. between June and October 2011. Patients presenting spontaneously to these hospitals or referred by health centers with a history of fever during the previous 7 days and at least one of the following symptoms: rash or severe headache or retro-orbital pain or myalgia or joint pain or bleeding, were examined by physicians who decided whether or not the child should be hospitalized. When the number of beds

available was limited, priority was obviously given to the most severe cases. In each hospital, a maximum of 10 hospitalized patients, randomly selected, were enrolled weekly. Patient's information and clinical data were collected by physicians using a specific case report form and blood samples were taken at the time of hospital admission (early/acute specimen) and discharge (convalescent/late specimen). Patients with incomplete test kit results, missing blood samples and incomplete clinical records were excluded.

### Panel of samples used for the retrospective laboratory evaluation

The panel used for the retrospective laboratory evaluation of the kit performances consisted of 157 samples collected in 2011 during the field prospective evaluation and tested negative or positive by the reference methods available at IPC completed with an additional 167 samples selected from IPC's dengue laboratory's biobank (samples collected between 2008 and 2010). Positive samples were selected in order to obtain an evaluation panel as balanced as possible in terms of DENV serotypes, day of collection after onset of fever (DAOF), anti-DENV antibodies titer and immune status (primary/secondary infections). Negative samples were selected from patients presenting with a non-dengue febrile illness and also from pregnant women.

### Ethical aspects

For the field prospective evaluation, a written consent was signed by the children's legal representatives before enrolment. This study was approved by the Cambodian National Ethics Committee. The use of stored samples from IPC's biobank was also approved by the Cambodian National Ethics Committee.

### Dengue diagnosis

The SD Bioline Dengue Duo kits were provided by Standard Diagnostics (Kyonggi-do, Korea) and tests were performed according to the manufacturer's instructions. For the prospective study, only acute blood samples were tested with the kit in hospitals as well as at IPC.

At IPC, laboratory diagnosis was based on RT-PCR, isolation of DENV after inoculation into mosquito cell lines, detection of anti-DENV IgM and measure of an increase of anti-DENV antibodies titer measured by hemagglutination inhibition assay (HIA) between acute and convalescent sera.

RT-PCR was performed after viral RNA extraction from acute serum samples using QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Either a conventional nested RT-PCR according to Lanciotti *et al.* [8] protocol and modified by Reynes *et al.* [9] or a real-time multiplex RT-PCR based on the technique developed by Hue *et al.* [10] was performed.

DENV was isolated on C6/36 cells and the virus serotype identified by immunofluorescence assay using monoclonal antibodies as described previously [11].

An in-house IgM capture Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (MAC-ELISA) was used to detect anti-DENV and anti-Japanese Encephalitis virus (JEV) IgM as describe previously [11]. A result was considered positive for dengue when the optical density (OD) was higher than 0.1 for the DENV IgM and when the OD of the anti-DENV ELISA was higher than the OD of the anti-JEV ELISA.

HIA followed the method described by Clark and Casals [12] adapted to 96-well microtiter plate. Primary or secondary acute dengue infection was determined by HI titer according to criteria established by WHO [13]. In brief, the patient was defined as



having a primary infection when the convalescent serum had a HI titer  $\leq 2560$  associated with a fourfold rise of the titer between the acute and convalescent sera (collected with a time interval of at least 7 days). When the convalescent serum had an HI titer  $> 2560$ , the patient was defined as having a secondary dengue infection.

All early samples were tested by PCR, viral isolation, IHA and MAC-ELISA whereas late samples were only tested by HIA and MAC-ELISA.

Confirmed and suspected dengue cases were defined according to WHO guidelines [1]. A confirmed case was defined by a RT-PCR and/or a culture positive result and/or an IgM seroconversion in paired sera and/or a fourfold antibodies titer increase measured by HIA in paired sera. A probable dengue infection was defined by an HI antibody titer  $> 2560$  in paired sera without a fourfold increase or IgM positive result in the acute serum [1].

At IPC, technicians were blinded for the results of the kit evaluated as well as for the results of gold standard tests. In hospitals, the staff performing rapid diagnostic tests was blinded for the results obtained with these tests as well as for the results of the gold standard assays.

### Hospital case management

Each clinical record contained the complete medical data recorded at the time of admission and the complete follow-up of the patient during the hospitalization (temperature, blood pressure, pulse, diuresis, medical prescriptions, etc.) until discharge. These data were anonymized by the physicians for the purpose of the analysis.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using STATA version 11.0 (StataCorp, College Station Texas, USA). Significance was assigned at  $P < 0.05$  for all parameters and were two-sided unless otherwise indicated. Uncertainty was expressed by 95% confidence intervals (CI95).

For the prospective study, agreement between hospital's laboratories and IPC laboratory's data was measured by agreement percentage and Kappa ( $\kappa$ ) coefficient.

For the prospective study, sensitivity and specificity obtained when tests were performed at hospitals were compared with those obtained at IPC with McNemar test. Positive and negative predictive values (PPV and NPV) were compared with Fisher exact test. For the retrospective laboratory study and for the analysis of medical records Fisher exact test was used.

During the retrospective laboratory evaluation, sensitivity was calculated according to infecting serotype, DAOF, immune status and antibodies profiles. Four different antibodies profiles were arbitrarily defined according to HIA and MAC-ELISA results: profile 1, low HI titer ( $< 640$ ) and negative MAC-ELISA; profile 2, low HI titer and positive MAC-ELISA; profile 3, high HI titer ( $\geq 640$ ) and negative MAC-ELISA; profile 4, high HI titer and positive MAC-ELISA.

## Results

### Prospective evaluation of the SD Duo kit's performances

**Characteristics of the study population.** A total of 162 patients were enrolled (100 patients in Takeo and 62 in Kampong Cham). The NS1 result of one patient and the IgM/IgG results of 4 others patients were not reported by hospitals. These 5 patients were therefore excluded. At IPC, the reference laboratory tests confirmed 85 dengue cases, 41 children were classified as probable dengue infection, and in 31 cases a dengue infection was excluded.

Among the 126 patients with confirmed or probable dengue, 32 were classified as DF, 84 as DHF and 8 as DSS. Clinical, virological and demographical information of the population are summarized in Table 1. All the patients enrolled in this study survived and were discharged without complication or sequelae.

**Comparison of results between hospital laboratories and Institut Pasteur's laboratory.** For the NS1 test, an agreement of 98.1% and a  $\kappa$  coefficient of 0.96 were obtained (Table 2). For the IgM/IgG tests, an agreement of 68.8% and a  $\kappa$  coefficient of 0.55 were observed (Table 3).

In the hospitals, the overall sensitivity, specificity, PPV and NPV of the NS1 test were 44.4%, 96.8%, 98.2% and 30% respectively and were 45.2%, 96.8%, 98.3% and 30.3% respectively at IPC. Results were not statistically different (Table 4).

For the combined test (antibodies and NS1) the overall sensitivity, specificity, PPV and NPV at the hospitals were 85.7%, 83.9%, 95.6% and 59.1% respectively whereas they were 94.4%, 90.0%, 97.5% and 77.1% respectively at IPC. Sensitivity was significantly higher at IPC ( $p$ -value = 0.002). Specificity, PPV and NPV were better at IPC but the differences were not statistically significant (Table 4).

The combination of all the tests significantly improved the sensitivity and NPV of the kit at hospitals ( $p$ -value sensitivity  $< 0.001$ ;  $p$ -value NPV = 0.001) as well as at IPC ( $p$ -values  $< 0.001$ ) with a non-significant decrease of the specificity ( $p$ -value at hospitals = 0.12,  $p$ -value at IPC = 0.5) and of the PPV ( $p$ -value at hospitals = 0.67,  $p$ -value at IPC = 1).

### Retrospective laboratory evaluation of the SD Duo kit's performances

**Samples description.** A total of 166 positive samples and 120 negative samples were included in the retrospective laboratory evaluation of the kit. Eighty five and 81 positive samples as well as 31 and 89 negative samples were obtained from the 2011's prospective study and from the IPC's biobank, respectively. The 41 patients defined as suspect dengue infection by the gold standard methods during the prospective study were also included in the retrospective study. Positive samples included 86 sera with a low HI titer ( $< 640$ ) and 80 sera with a high HI titer ( $\geq 640$ ) (51.8% and 48.2%, respectively). The distinction between low and high HI titer groups was established during a preliminary comparative study between HI titers and SD Duo kit IgG results. In the high HI titer group, the correlation between both tests was over 70% which was considered as acceptable (data not shown). Of note, HIA does not only detect IgG but also other immunoglobulin isotypes and as such some low HI titers measured during the early phase of the infection may not contain or only very low quantities of anti-DENV IgGs. DENV serotype was identified in 87.3% of the positive samples: there were respectively 57, 35, 26 and 27 (34.3%, 21.1%, 15.7% and 16.3%) DENV-1, -2, -3 and -4 cases. Forty seven (28.3%) samples were collected 2 days after onset of fever or earlier, 67 (40.4%) between day 3 and day 4, 41 (24.7%) between day 5 and 6, and 11 (6.6%) after the 7<sup>th</sup> day of illness (Table S1). A total of 19 and 83 patients (11.4% and 50%) were classified as having primary and secondary infections, respectively.

Negative samples included sera obtained from patients infected by a *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* (22/120, 18.4%), *Orientia tsutsugamushi* (13/120, 10.8%), Japanese encephalitis virus (16/120, 13.3%), Chikungunya virus (14/120, 11.7%), Hepatitis C virus (10/120, 8.3%), from patients presenting with meningo-encephalitis (6/120, 5%) or non-specific febrile illness of unknown etiology (30/120, 25%) and from pregnant women (9/120, 7.5%).

**NS1 test.** The overall sensitivity and specificity of the NS1 test against the reference methods was 58.4% (97/166, CI95 = [40.5

**Table 1.** Characteristics of the patients included in the prospective evaluation.

Variables	Confirmed dengue (n=85)	Probable dengue (n=41)	Non-dengue infection (n=31)
Median age (IQR <sup>a</sup> )	8 (5–11)	10 (7–12)	8 (6–13)
Male (%)	49 (57.6%)	24 (58.4%)	20 (64.5%)
Median day of illness (IQR)	3 (2–4)	3 (3–4)	3 (2–4)
<b>Dengue diagnostic</b>			
Virus isolation	21 (24.7%)	0 (0.0%)	-
RT-PCR <sup>b</sup>	72 (84.7%)	0 (0.0%)	-
<b>MAC-ELISA</b>			
Positive in acute serum	48 (56.4%)	40 (97.6%)	-
Seroconversion	19 (22.4%)	0 (0.0%)	-
Negative	18 (21.2%)	1 (2.4%)	-
<b>Hemagglutination-Inhibition assay (titer)</b>			
Fourfold rise in antibodies on pair sera	33 (38.8%)	0 (0.0%)	-
No change or less than fourfold rise	46 (54.1%)	39 (95.1%)	-
Data not available <sup>c</sup>	6 (7.1%)	2 (4.9%)	-
<b>DENV serotypes</b>			
DENV-1	53 (62.3%)	-	-
DENV-2	21 (24.7%)	-	-
DENV-3	1 (1.2%)	-	-
DENV-4	0 (0.0%)	-	-
Unknown <sup>d</sup>	10 (11.8%)	-	-
<b>Clinical manifestation</b>			
DF	23 (27.1%)	9 (22.0%)	11 (35.5%)
DHF	53 (62.4%)	31 (75.6%)	20 (64.5%)
DSS	8 (9.4%)	0 (0.0%)	0 (0%)
Meningo-encephalitis	1 (1.1%)	1 (2.4%)	-
<b>Diagnosis at hospital discharge</b>			
Dengue	63 (74.1%)	34 (83%)	23 (74.2%)
Dengue with co-infection	3 (3.6%)	1 (2.4%)	2 (6.4%)
Bronchiolitis	1 (1.2%)	0 (0%)	0 (0%)
Pharyngitis	1 (1.2%)	0 (0%)	0 (0%)
Typhoid fever	0 (0%)	1 (2.4%)	2 (6.4%)
Nosocomial infection	1 (1.2%)	0 (0%)	0 (0%)
Non dengue	0 (0%)	1 (2.4%)	2 (6.4%)
Meningitis	-	0 (0%)	1 (3.2%)
Typhoid fever	-	1 (2.4%)	0 (0%)
Other viral infection	-	0 (0%)	1 (3.2%)
Unknown <sup>e</sup>	19 (22.3%)	5 (12.2%)	4 (13%)

<sup>a</sup>interquartile range.

<sup>b</sup>72 samples were tested by the conventional nested RT-PCR and 85 were tested by real-time RT-PCR.

<sup>c</sup>Absence of second serum.

<sup>d</sup>Dengue diagnosis based solely on positive serology.

<sup>e</sup>Medical record missing.

doi:10.1371/journal.pntd.0001993.t001

66.0]) and 98.3% (118/120, CI95 = [94.1–99.8]), respectively (Table 5).

Sensitivity was significantly better for DENV-4 than DENV-2 (77.8% vs 48.6%, p-value = 0.01). No differences were observed with the other serotypes (Table 5). Sensitivity was also significantly better in primary than in secondary infections (89.5% vs 43.4%, p-value < 0.001) (Table 5). When considering the various antibodies profiles, the analysis demonstrated that a high HI titer (profiles 3

and 4) was associated with a significant decrease in NS1 test's sensitivity (profile 1 vs 3, p-value = 0.005; profile 1 vs 4, p-value < 0.001; profile 2 vs 3, p-value = 0.014; profile 2 vs 4, p-value < 0.001). The presence of detectable IgM (profiles 2 and 4) did not seem to affect the sensitivity (profile 1 vs 2, p-value = 1; profile 3 vs 4 p-value = 0.185) (Table 6).

The test's sensitivity diminished significantly also when the interval of time between onset of fever and sample collection



**Table 2.** Concordance of the NS1 test between hospitals' laboratories and IPC.

		IPC		
		Negative	Positive	Total
Hospitals	Negative	98	2	100
	Positive	1	56	57
	Total	99	58	157

doi:10.1371/journal.pntd.0001993.t002

increased (overall  $p$ -value = 0.003). This value varied from 76.6% (36/47, CI95 = [62.0 87.7]) for samples collected before the 2<sup>nd</sup> day of illness to 45.5% (5/11, CI95 = [16.7 76.6]) for those collected after the 7<sup>th</sup> day of illness (Figure 1).

Out of the 41 patients with only suspected dengue infection as defined by the reference diagnostic methods used, 12 (29.2%) tested positive by NS1 kit. Out of the 120 negative samples, two weak signals were recorded, one from a patient presenting with a febrile illness of unknown etiology and one from a patient with a JEV infection.

**IgM/IgG tests.** The overall sensitivity and specificity of the IgM/IgG tests were 68.1% (113/166, CI95 = [60.4 75.1]) and 95% (114/120, CI95 = [89.4 98.1]), respectively (Table 5).

The sensitivity was better with DENV-1 than DENV-4 but this difference was at the limit of significance (70.2% vs 48.2%,  $p$ -value = 0.051). No differences were observed with the other serotypes (Table 5). The sensitivity improved significantly when the interval of time between onset of fever and sample collection increased (overall  $p$ -value < 0.001), from 40.4% (18/47, CI95 = [26.4 55.7]) for samples collected before the 2<sup>nd</sup> day of illness to 90.9% (10/11, CI95 = [58.7 99.8]) for those collected after the 7<sup>th</sup> day of illness (Figure 1).

The sensitivity was also significantly better in patients with secondary than primary infections (79.5% vs 42.1%,  $p$ -value = 0.003) (Table 5).

All the 41 patients with a suspicion of DENV infection tested positive either by IgM only (6/41, 14.6%), by IgG only (11/41, 26.8%) or by both IgM and IgG (26/41, 63.4%). In 3 non-dengue febrile cases and 3 anti-JEV IgM positive cases the kit gave non concordant results compared to our reference methods. In 2 non-dengue febrile cases both IgM and IgG were positives. In 1 JEV case the IgG test was positive while in 1 non-dengue febrile and 1 JEV cases, IgG test was weakly positive. In the last JEV case, the IgM test was weakly positive.

**NS1 and IgM/IgG tests combination.** The overall sensitivity of the NS1/IgM/IgG combination tests was 94.6% (157/166, CI95 = [90.0 97.5]) and the specificity was 94.2% (113/120, CI95 = [88.4 97.6]) (Table 5).

The sensitivity did not vary significantly between the serotypes when compared all together ( $p$ -value = 0.868), or 2 by 2, but also not according to the immune status ( $p$ -value = 1) or the time interval between DAOF and sample collection ( $p$ -value = 0.8) (Table 5, Figure 1).

### Impact of the RDTs results on clinical case management in Cambodia

The medical records of 129 patients (82.2% of all patients enrolled) were provided by the two hospitals and subsequently analyzed. All the 66 patients who tested positive for acute dengue infection using the IPC gold standard test were also clinically diagnosed by the physicians as dengue cases, with or without coinfection (63 and 3 patients, respectively). One patient with a laboratory-suspected DENV infection as well as two children who tested negative were clinically diagnosed as non-dengue febrile illness (Table 1).

All patients received a treatment based on WHO 2009 recommendations, i.e., intravenous fluid therapy with 0.9% saline, Ringer's lactate or Ringer's acetate with or without dextrose, paracetamol if fever and oral rehydration solution or other fluids containing electrolytes and sugar when possible. Patients in circulatory shock received dextran, O<sub>2</sub> and blood transfusion when necessary. Twenty-nine patients (27.7%) also received antibiotics. The prescription of antibiotics was justified by the physicians in the medical records of 11 patients because the following diagnoses: 4 dysenteric syndromes with suspicion of typhoid fever, 3 meningitis or meningo-encephalitis, 1 suspicion of nosocomial infection, 2 pharyngitis and 1 bronchiolitis. Among the 90 patients with a positive NS1 and/or IgM and/or IgG test, 17.8% (16/90) were treated with antibiotics. Out of 39 patients who tested negative by the RDT, 13 (33.3%) also received antibiotics. The comparison of antibiotic prescription between both groups was at the limit of significance ( $p$ -value = 0.067). There was no difference in the duration of antibiotic therapy between patients with a positive test and those with a negative test ( $p$ -value = 0.216).

Among the 16 positive patients who received antibiotics, only 7 (43.7%) had their antibiotic therapy stopped once the point-of-care kit tested positive for dengue. Among the 13 patients with a negative result who received antibiotics, 8 (61.5%) had their antibiotic therapy stopped once the test was performed. The decision to maintain or discontinue the antibiotic therapy was not affected by the result of the RDT ( $p$ -value = 0.338).

**Table 3.** Concordance of the IgM/IgG tests between hospitals' laboratories and IPC.

		IPC				
		Negative	IgM positive	IgG positive	IgM and IgG positive	Total
Hospitals	Negative	45	2	9	7	63
	IgM positive	0	10	2	7	19
	IgG positive	0	0	11	9	20
	IgM and IgG positive	3	3	7	42	55
	Total	48	15	29	65	157

doi:10.1371/journal.pntd.0001993.t003

**Table 4.** Performances of the kit against confirmed and probable dengue cases in hospitals and IPC.

Test kit	Place	Sensitivity % [CI95%]	p-value*	Specificity % [CI95%]	p-value*	PPV % [CI95%]	p-value**	NPV % [CI95%]	p-value**
SD Dengue Duo NS1	Hospitals	44.4 (56/126)[35.6–53.6]	1	96.8 (30/31) [83.3–99.9]	1	98.2 (56/57) [90.6–100]	1	30.0 (30/100) [21.2–40]	1
	IPC	45.2 (57/126)[36.4–54.3]		96.8 (30/31) [83.3–99.9]		98.3 (57/58) [90.8–100]		30.3 (30/99) [20.6–39.3]	
SD dengue Duo NS1/IgM/IgG	Hospitals	85.7 (108/126) [78.4–91.3]	0.003	83.9 (26/31) [66.3–94.5]	0.5	95.6 (108/113) [90.0–98.5]	0.49	59.1 (26/44) [43.2–73.7]	0.09
	IPC	94.4 (119/126) [88.9–97.7]		90.0 (27/30) [73.5–97.9]		97.5 (119/122) [93.0–99.5]		77.1 (27/35) [59.9–89.6]	

\*Mc Nemar test.

\*\*Fisher exact test.

doi:10.1371/journal.pntd.0001993.t004

## Discussion

Early management of patients with dengue infection is essential to ensure a favorable evolution of the disease and prevent the occurrence of severe forms. Until recently an early confirmed diagnosis was only achievable in specialized laboratories. The discovery of the NS1 protein as an early marker for DENV infection, especially in RDT format, now allows dengue diagnosis during the early phase of the disease, even in laboratories with limited equipments and human resources. Evaluations are required to ensure that these tests are suitable for diagnosis and clinical management or epidemiological surveillance and outbreak investigations. Different methodologies can be used: laboratory-based evaluations (or retrospective evaluations) and field evaluations (or clinical-based/prospective evaluations) [14]. Retrospective evaluations are easy to perform but tend to overestimate tests accuracy. Prospective evaluations allow determination of PPV and NPV with tests performed on patients in the real clinical settings. However, accuracy of diagnostic tests estimated by prospective evaluations could be biased due to imperfect gold standard in the prospective clinical setting. In our study we combined both prospective and retrospective evaluations. The retrospective part was added in order to better understand the results obtained in the field during the prospective study.

Since the two test kits of the SD Bioline Dengue Duo combo test do not give exactly the same information, the NS1 assay was initially assessed alone in the prospective as well as in the retrospective study. If a positive NS1 test can confirm a dengue diagnosis, this is not the case for IgM and IgG tests as the antibodies remain detectable for months and thus a positive result obtained on a single blood specimen is only suggestive of a dengue infection. Indeed, to confirm an acute dengue infection by serology, an IgM seroconversion or a four-fold increase of IgG antibody titers in paired sera must be demonstrated (which cannot be done with the RDT kit as result is only qualitative) [1]. By evaluating separately, but in parallel, the NS1 test and the serological kit, we estimated the ability of the test to both suggest and confirm a dengue infection.

During the prospective study, the sensitivity of the SD Bioline Dengue Duo NS1 when performed at the hospitals was only 44.5% to confirm dengue infections in children hospitalized for dengue-like illness during the epidemic season. The tests were carried out in laboratories equipped for routine medical biology. Out of the 127 patients included in the prospective evaluation, 70 (54.7%) had an HI titer  $\geq 640$  which could probably explain such a poor sensitivity. The retrospective study helps to understand why the sensitivity was limited. It suggested that the presence of high level of anti-DENV HI antibodies in the sample was a major factor for sensitivity decrease. Indeed, while a sensitivity  $>80\%$  was obtained with samples containing no or low HI antibodies titer ( $<640$ ), the sensitivity dropped to 37% when the HI titer was  $\geq 640$ . Almost 86% of the samples with a high HI titer issued from patients with a secondary infection. Since HI titer reflects mainly IgG response, the poor sensitivity observed during secondary infections is probably directly linked to the high IgG titer. Similar observations were already made by other authors. In Vietnam, the same NS1 test demonstrated a sensitivity of 24.6% for samples positive for IgG by GAC-ELISA and a sensitivity of 77.3% in sera negative for IgG [15]. In Colombia, Osario *et al.* reported an even lower sensitivity (IgG negative: 65.6%, IgG positive: 15.6%) [16]. Of note, the methods used for IgG detection in these evaluations were all different and rather than giving the real performance of the kit, the data indicate a global trend to a lower sensitivity when IgG titers increase.



**Table 5.** Sensitivity of individual and combination of tests according to serotype and immune status.

	Sensitivity % [CI95%]					
	NS1 test	p-value	IgM/IgG test	p-value	NS1 and IgM/IgG tests	p-value
<b>Global</b>	58.4 (97/166) [40.5–66.0]		68.1 (113/166) [60.4–75.1]		94.6 (157/166) [90.0–97.5]	
<b>Serotype</b>						
DENV-1	61.4 (35/57) [47.6–74.0]	0.129	70.2 (40/57) [56.6–81.6]	0.238	91.2 (52/57) [80.7–97.1]	0.868
DENV-2	48.6 (17/35) [31.4–66.0]		68.6 (24/35) [50.7–83.1]		94.3 (33/35) [80.8–99.3]	
DENV-3	65.4 (17/26) [44.3–82.8]		65.4 (17/26) [44.3–82.8]		96.1 (25/26) [80.4–99.9]	
DENV-4	77.8 (21/27) [57.7–91.4]		48.2 (13/27) [25.5–64.7]		100 (27/27) [87.2–100] <sup>a</sup>	
<b>Immune status</b>						
Primary infection	89.5 (17/19) [66.9–98.7]	<0.001	42.1 (8/19) [20.3–66.5]	0.003	100 (19/19) [82.4–100] <sup>a</sup>	1
Secondary infection	43.4 (36/83) [32.5–54.7]		79.5 (66/83) [69.2–87.6]		97.6 (81/83) [91.6–99.7]	

<sup>a</sup>one-side, 97,5% confidence interval.  
doi:10.1371/journal.pntd.0001993.t005

As others [16,17], we observed that the sensitivity of this test decreased when the window of time between onset of fever and sampling increased. This was expected since the IgG titer also increased with the time. Finally, a higher IgG titer also characterizes the secondary dengue infections and the better sensitivity of the NS1 in primary infections was also already reported [15–17].

The performances of the NS1 test reported here as well as by other retrospective studies are close to those observed with other commercial NS1 RDTs [15,18]. A major value of the kit marketed by SD is the combination of the NS1 test with an anti-DENV antibodies detection kit. Indeed, the serological results improved the sensitivity by compensating for the loss of sensitivity usually observed with the NS1 test when used alone in the presence of specific anti-DENV antibodies. During the prospective evaluation, we demonstrated that the addition of IgM and IgG results to the NS1 data was only associated with a slight non-significant decrease of the specificity. However, this result should be interpreted with caution as the number of negative patients included was relatively small. In addition, the relatively low overall performance of the IgM/IgG test could well be partially due to imperfect gold standard tests. In the retrospective study, we did not observe any cross-reactivity with Chikungunya virus, *Orientia tsutsugamushi* or *Plasmodium sp.*. However when evaluating the SD Biotline Dengue Duo kit, Blacksell et al. [18] reported 12.2% (10/82) of cross-reactivity with Chikungunya virus, 12.5% (1/8) with *Orientia tsutsugamushi* and 100% (1/1) with *Plasmodium sp.* When evaluating only the IgM part of the kit, Hunsperger et al. [19] reported around 35% of IgM cross-reactivity with malaria as well as some false positive results with leptospirosis, tuberculosis and West-Nile infections.

During the prospective evaluation, the PPV value of the NS1 test was 98.2%, suggesting that the probability to correctly confirm a dengue infection was very high when the test was positive. When the test was used in combination, the PPV decreased only very slightly (NS1/IgM: 96.9%; NS1/IgM/IgG: 95.6%). Consequently, the NPV observed when the tests were performed in the hospitals was only 29% for the NS1 test alone and 56.8% for the combination test. In other words, the probability of truly exclude a dengue infection when the tests were negatives was low. These PPV and NPV results should be regarded with caution as they depend on the dengue disease prevalence that can be extremely different in other contexts and epidemiological situations. In this prospective study, the prevalence of dengue infection was very high (80.3%, 126/157) because the evaluation was performed during the peak epidemic season and only involved dengue suspect patients. Observing high prevalence of dengue infections in suspect patients hospitalized is common in Cambodia (87.8% of average between 2000 and 2008) and in neighboring countries like Vietnam (86.2% during a DENV-4 epidemic in 2002) [20,21].

On the samples collected during the prospective study, the comparison of the results of the tests performed by technicians in hospital laboratories or by health workers who did not receive any specific training for the use of the kits with the results reported by the staff of the national reference laboratory at IPC demonstrated a moderate agreement with the serological tests and an excellent agreement with the NS1 test. Indeed, 49 discordant results between the hospitals and IPC were observed with the IgM/IgG test out of which 34 (69.3%) were positive at IPC but negative at the hospitals while 13 (26.5%) were negative at IPC but positive at the hospitals. These discrepancies could be explained if the reading was made before the recommended 15 minutes (leading to false negative results) or after the correct time (leading to

**Table 6.** Sensitivity of SD Biotline Dengue Duo NS1 test according to antibodies profile.

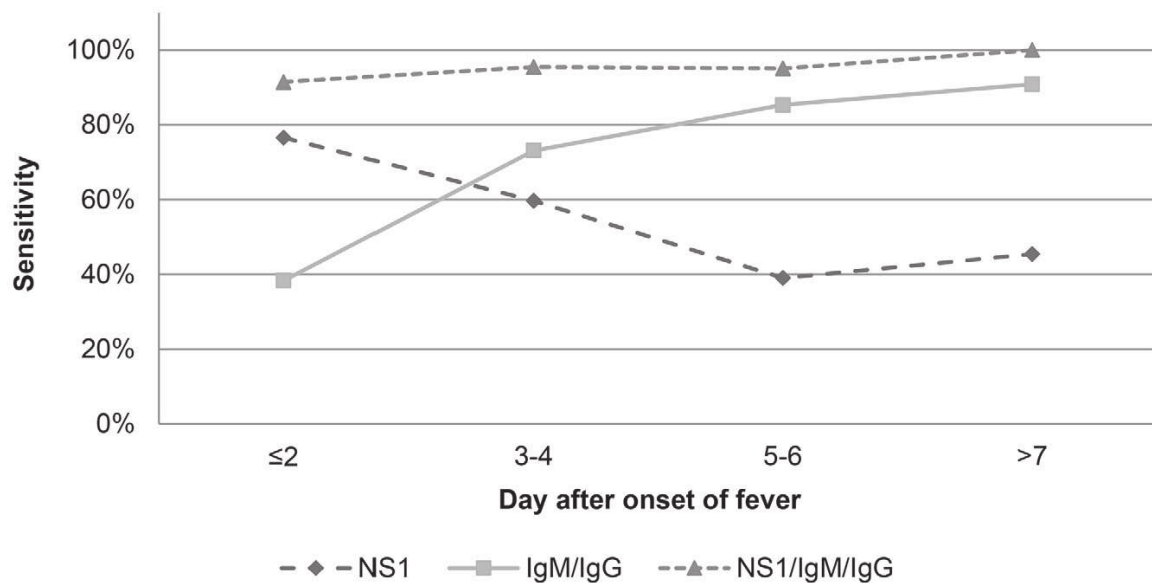
	Profile 1 (Low HI titer/IgM negative)	Profile 2 (Low HI titer/IgM positive)	Profile 3 (High HI titer/IgM negative)	Profile 4 (High HI titer/IgM positive)
<b>Sensitivity % [CI95%]</b>	83.7 (41/49) [70.3–92.7]	83.3 (25/30) [65.3–94.4]	50.0 (9/18) [26.0–74.0]	32.8 (19/58) [21.0–46.3]
<b>p-value</b>	1*		0.185**	

\*P-value refers to the comparison between profile 1 and 2.

\*\*P-value refers to the comparison between profile 3 and 4.

doi:10.1371/journal.pntd.0001993.t006





**Figure 1. Sensitivity of SD Bioline Dengue Duo kit.** Evaluation of the sensitivity of NS1 test, IgM/IgG test and combination of the two tests depending on day of sampling after onset of fever. doi:10.1371/journal.pntd.0001993.g001

apparition of unspecific bands) or because of problems with the interpretation of weak signals (faint bands). To evaluate if the issue was the interpretation of the faint bands, these data were removed from the analysis and a better agreement percentage and Kappa coefficient were obtained (82.0% vs 68.8% and 0.73 vs 0.55). A problem of reproducibility could also have accounted for some of the discrepancies observed. Nevertheless, in the case of bad reproducibility an equal number of discrepancies should have been observed in each laboratory which was not the case in our study. Moreover all tests were from the same manufacturing lot. During a malaria RDTs evaluation, misinterpretation of weak signal in the field had already been reported [22]. It was also reported that health workers in the field tend to read the results before the time recommended by the manufacturer [22,23]. Despite its relative ease to use, the performances of the IgM/IgG RDT are obviously partially person-dependent, hence the importance of providing specific training or at least very clear pamphlets which could guide the health worker in its interpretations and expose the risks of false results when the recommendations are not strictly followed. On the contrary a very good agreement was observed with the NS1 test since the bands in this immunochromatographic device almost always appear very clearly. As the RDTs have a significant cost, promoting the use of these kit does only make sense if the health workers can perform the tests in good conditions, which seems to be sometimes challenging in intensive care units and pediatric wards that are often unable to cope during peak epidemics. Knowing these constraints and limitations, the manufacturer should be encouraged to correct, if possible, the reading issues of the serological test. The outcomes of the patients who were wrongly tested negative by the kit was a matter of concern as RDTs are designed for rapid diagnostic and to assist physicians in their decisions. Dengue is a life-threatening disease that requires specific clinical care. The analysis of the medical records demonstrated that physicians ignored the negative results and followed their clinical instinct as all patients who tested negative by RDT received an intravenous

fluid therapy which is recommended in patients with warning signs [1] but which is also often administrated in mild cases to prevent complications. Similar observations were also made in the context of malaria RDTs use. Between 54% and 85% of the patients with negative malaria RDT results were treated with anti-malaria drugs in Nigeria, Tanzania, Burkina Faso, Philippines and Laos [22–25]. There are probably several reasons that could explain that physicians did not consider the negative results obtained with the RDT: the habit to rely mostly on clinical intuition explained by a frequent limited access to laboratory tests, some mistrust against a new test, the difficulties to understand the kinetic of the immune response during dengue infection and the significance of NS1, IgM and IgG test results, a high confidence in clinical diagnosis when children present to pediatric wards with dengue-like symptoms during the epidemic season (especially since the national virological surveillance confirms usually more than 80% of the dengue clinical diagnosis) [20], the fear that a misdiagnosed dengue infection evolves towards a DHF or a DSS while these complications are pretty easy to prevent with simple clinical management, etc. The SD Bioline dengue Duo test could have a better utility in smaller medical care structures, like health care centers and dispensary where the proportion of dengue among all febrile diseases is lower (e.g., 12% of all the febrile episodes in Kampong Cham province, 2006–2008) [11] and where routine hematology (e.g., hematocrit, platelet count) that could help to orientate the diagnosis are not often available.

One of the advantages to perform a rapid confirmatory diagnostic of dengue in the context of febrile illness is to avoid the unnecessary use of antibiotics. In the context of Cambodia, it seems the RDT results did not have a significant impact on the decision to start or discontinue an antibiotic therapy.

In an endemic country, especially in the context of an epidemic, it seems that the sensitivity of the NS1 RDT alone is too low and that only positive results should be taken into consideration. Nevertheless, the performances of the combined kits are good and these kits appear to be a useful tool for the clinicians as they can

quickly confirm the diagnosis of dengue and therefore contribute to the an optimal clinical management of the cases and avoid an unnecessary use of antibiotics or other drugs which is important in the context of a developing country with limited resources.

In conclusion, we observed that for a patient presenting with dengue-like symptoms in a dengue-endemic/epidemic region, a NS1 positive result obtained with the SD Bioline Dengue Duo kit confirms a dengue diagnosis, an IgM and/or IgG positive result highly suggests dengue infection but a negative result doesn't rule out a dengue infection. We have also demonstrated that the performances of the test in the field were lower than the ones obtained in the more experienced hands of technicians working in a national reference laboratory. This suggest that even for a point of care test theoretically designed to be used by untrained staff, there is still a significant improvement of the performance of the test to expect if a proper training and a quality assurance program can be implemented. With the time, the trust of the physician will probably increase if the accuracy of the test improves. In general, manufacturers should always bear in mind that the ultimate goal of the RDTs is essentially to be used as a point-of-care test or in support of epidemiological investigation and as such should be

easy to use, stable at room temperature but also not posing reading difficulties unless they can provide proper training and organize quality programs. More prospective field evaluations are still necessary now to better assess the interest to use such point-of-care tests in the real conditions that justified their development and to address some of the questions and concerns raised by this study.

## Supporting Information

**Table S1 Composition of the panel of samples used for retrospective evaluation.** Description of the panel of positive samples used for the laboratory retrospective evaluation of SD Bioline Dengue Duo Kit. (DOCX)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ACA VD PB. Performed the experiments: ACA VD SO KKS VT BY PLT. Analyzed the data: ACA VD PB. Contributed reagents/materials/analysis tools: CN RH KKS VT PLT. Wrote the paper: ACA VD PB.

## References

1. WHO/TDR (2009) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 3<sup>rd</sup> edition.
2. Gubler DJ (2011) Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Trop Med Health* 39(4 Suppl):3–11
3. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, et al. (2010) Dengue: A continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology* 8: 7–16
4. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W (2000) An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 38: 1053–1057
5. Alcon S, Talarmin A, Debryne M, Falconar A, Deubel V, et al. (2002) Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 40: 376–381
6. Wang SM, Sekaran SD (2010) Evaluation of a commercial SD dengue virus NS1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for early diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol* 48:2793–7
7. Hu D, Di B, Ding X, Wang Y, Chen Y, et al. (2011) Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virology* 43: 8–17
8. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545–551
9. Reynes JM, Ong S, Mey C, Ngan C, Hoyer S, et al. (2003) Improved molecular detection of dengue virus serotype 1 variants. *J Clin Microbiol* 41: 3864–3867
10. Hue KD, Tuan TV, Thi HT, Bich CT, Anh HH, et al. (2011) Validation of an internally controlled onestep real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Methods* 177:168–73.
11. Vong S, Khieu V, Glass O, Ly S, Duong V, et al. (2010) Dengue Incidence in Urban and Rural Cambodia: Results from Population-Based Active Fever Surveillance, 2006–2008. *PLoS Negl Trop Dis* 4(11): e903. doi:10.1371/journal.pntd.0000903
12. Clarke DH, Casals J (1958) Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 7: 561–573
13. WHO/TDR (1997) Dengue Hemorrhage Fever: diagnosis, treatment prevention and control. 2nd edition.
14. Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. (2010) Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. (12 Suppl):S30–8.
15. Tricou V, Vu HTT, Quynh NVN, Nguyen CVV, Tran HT, et al. (2010) Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis* 10:142
16. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar L, Parra B (2010) Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology* 407: 736–741
17. Wang SM, Sekaran SD (2010) Early Diagnosis of Dengue Infection Using a Commercial Dengue Duo Rapid Test Kit for the Detection of NS1, IGM and IGG. *Am J Trop Med Hyg* 83: 690–695
18. Blacksell SD, Jarman RG, Bailey MS, Tanganuchitcharnchai A, Jenjaroen K, et al. (2011) Evaluation of six commercial point-of-care tests for the diagnosis of acute dengue infections: The need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. *Clin Vaccine Immunol* 18:2095–101
19. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, et al. (2009) Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis* 15: 436–440
20. Huy R, Buchy P, Conan A, Ngan C, Ong S, et al. (2010) National dengue surveillance in Cambodia, 1980–2008: Insights on epidemiological and virological trends and impact of vector control intervention. *Bull WHO* 88(9):650–7.
21. Buchy P, Luong VV, Toan BK, Mai TTX, Glaziou P, et al. (2005) Secondary Dengue virus type 4 infections in Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 178–185.
22. Rennie W, Phetsouvanh R, Lupisan S, Vanisaveth V, Hongvanthong B, et al. (2007) Minimising human error in malaria rapid diagnosis: clarity of written instructions and health worker performance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 9–18
23. Uzochukwu BSC, Onwujekwe E, Ezuma NN, Ezeoke OP, Ajuba MO, et al. (2011) Improving Rational Treatment of Malaria: Perceptions and Influence of RDTs on Prescribing Behaviour of Health Workers in Southeast Nigeria. *PLoS ONE* 6(1): e14627. doi:10.1371/journal.pone.0014627
24. Reyburn H, Mbakilwa H, Mwangi R, Mwerinde O, Olomi R, et al. (2007) Rapid diagnostic tests compared with malaria microscopy for guiding outpatient treatment of febrile illness in Tanzania: randomised trial. *BMJ* 334: 403
25. Bisoffi Z, Sirima BS, Angheben A, Lodesani C, Gobbi F, et al. (2009) Rapid malaria diagnostic tests versus clinical management of malaria in rural Burkina Faso: Safety and effect on clinical decisions. A randomized trial. *Trop Med Int Health* 14: 491–498

**Table S1. Description of the panel of positive samples used for the laboratory evaluation of SD Bioline Dengue Duo test**

HI titer	Serotype	Day after onset of fever				Total
		≤ 2	3 – 4	5 – 6	≥ 7	
<640 (n=79)	DENV-1	14	10	9	1	34
	DENV-2	6	7	3	0	16
	DENV-3	4	6	4	0	14
	DENV-4	3	8	1	0	12
	Unknown	0	0	0	3	3
≥640 (n=87)	DENV-1	5	9	8	1	23
	DENV-2	5	9	4	1	19
	DENV-3	2	8	2	0	12
	DENV-4	5	4	6	0	15
	Unknown	3	6	4	5	18
	<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>67</b>	<b>41</b>	<b>11</b>	<b>166</b>



## 4. Conclusion et perspectives

Cette première étude réalisée en partie sur le terrain permet de montrer que le test SD Bioline Dengue Duo utilisé dans sa globalité, c'est-à-dire en utilisant les résultats NS1, IgM et IgG, est un outil intéressant qui peut permettre aux médecins d'orienter le diagnostic dans de brefs délais autorisant, de ce fait, une prise en charge thérapeutique adaptée et précoce. Cependant ce diagnostic reste un diagnostic probabiliste en l'absence d'un résultat positif pour la détection de l'antigène NS1. Le test, tel qu'il est actuellement, n'est pas adapté au diagnostic de certitude en pays endémique car la sensibilité du test NS1 pris de façon isolée est trop faible. Ce problème de sensibilité lié aux cas de dengue secondaire est commun à tous les tests de détection de la NS1, qu'ils soient en format test rapide ou en format ELISA [104,111,170,173]. Une solution pour remédier à ce problème serait de mettre au point un traitement, simple et rapide, de l'échantillon clinique permettant de dissocier les complexes immuns NS1/IgG et ainsi libérer la NS1. Plusieurs protocoles de traitement ont été proposés [174–177] mais aucun n'a été validé par les entreprises fabriquant et commercialisant les tests.

Malgré les performances limitées des TDR de la dengue, l'OMS recommande leur utilisation dans tous les types de structures médicales, des centres de soins de santé primaire aux centres de référence [178]. Néanmoins le test ne pouvant en aucun cas être interprété de façon binaire, i.e. test positif = cas de dengue, test négatif = non dengue, il serait nécessaire d'encadrer l'utilisation du test et de s'assurer que les personnes qui l'utilisent ont une bonne compréhension du diagnostic de la dengue et de ses limites. Pour la malaria, l'OMS a créé un site internet entièrement dédié aux TDR, donnant des conseils d'utilisation ainsi que du matériel de formation à l'utilisation des tests. Les différentes évaluations des tests existants sont également regroupées sur ce site. Il serait très intéressant de faire la même chose pour la dengue. Deux des principaux fabricants de TDR de la dengue indiquent les limites du test dans leur notice d'utilisation, et particulièrement mentionnent qu'un résultat négatif ne peut exclure une infection récente par le DENV. Malheureusement ces limites ne sont pas suffisamment mises en avant et peuvent facilement être ignorées par les utilisateurs. Il pourrait être utile d'exiger des fabricants qu'ils insèrent dans leurs kits une notice faisant ressortir les avantages et inconvénients de leurs tests. Dans cet objectif, l'OMS soutenue par l'UNICEF et le Dengue Vaccine Initiative avait constitué un groupe de laboratoires experts afin d'évaluer en toute indépendance et

transparence les performances des différents tests commerciaux de diagnostic de la dengue [173,179]. Une telle initiative devrait être poursuivie et étendue à de nombreux autres outils de diagnostic.

Si les TDR sont un concept intéressant pour permettre le diagnostic de la dengue dans les laboratoires peu équipés, le prix de ces outils reste souvent un problème. La dengue touche majoritairement des pays en développement et dans ces pays les frais médicaux sont le plus souvent à la charge des patients. Dans un pays comme le Cambodge, où les habitants gagnent environ 3 USD par jour, réaliser un test qui coûte entre 5 et 10 USD représente une dépense souvent trop importante, surtout s'il se rajoute à des frais d'hospitalisation. Il est donc nécessaire de réfléchir à des solutions pour permettre l'accès des populations les plus pauvres à ce type de technologies, de la même façon qu'il y a des fonds créés pour la prise en charge des vaccins.

## **TROISIEME PARTIE**

### **L'urine et la salive pour le diagnostic biologique de la dengue**

---

## 1. Contexte et objectifs de l'étude

A l'heure actuelle, le diagnostic biologique de la dengue nécessite un échantillon de sang veineux. Néanmoins, réaliser une prise de sang peut s'avérer difficile, notamment chez les enfants qui constituent la population la plus touchée par la maladie dans les régions d'endémie. L'obtention d'un échantillon sanguin peut également représenter un frein dans les études séro-épidémiologiques et lors des enquêtes d'investigation d'épidémie. Il peut, en effet, être difficile d'organiser ou simplement de faire accepter des prises de sang lors des investigations de terrain. Les urines et la salive sont, sauf chez les très jeunes enfants, deux fluides biologiques plus faciles à obtenir puisque le prélèvement ne requière pas de procédure invasive et peut être réalisé par du personnel non médical. De plus, cela ne génère pas de déchets médicaux à caractère infectieux. L'utilisation de ces deux fluides biologiques a déjà été envisagée, en remplacement du sang veineux, pour le diagnostic biologique de plusieurs autres maladies infectieuses, comme les hépatites A, B et C, la rougeole ou encore les infections par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) [180–186]. Des TDR destinés à la détection des anticorps anti-HCV et anti-HIV dans la salive ont été développés et sont aujourd'hui commercialisés. L'urine s'est quant à elle avérée être un fluide biologique intéressant pour le diagnostic des infections par les virus West-Nile (WNV) et Zika (ZIKV), deux autres flavivirus [187,188].

La possibilité d'utiliser des urines ou de la salive pour le diagnostic de la dengue a été démontrée aux cours d'études portant sur un nombre limité d'échantillons [189–200]. L'objectif de la première partie de ce travail (Article 2) était d'approfondir les résultats déjà publiés en décrivant de la façon la plus complète possible l'excrétion des anticorps anti-DENV (IgG, IgM et IgA), de la protéine NS1, du génome viral et du virus dans le plasma, l'urine et la salive, afin de déterminer si l'urine et/ou la salive pourraient être utilisées en remplacement du sang veineux pour le diagnostic de la dengue. Ce travail a été réalisé à partir d'un nombre important d'échantillons prélevés de façon séquentielle chez des enfants cambodgiens avec une infection confirmée par le DENV. Une seconde partie du travail (Article 3) a consisté en l'évaluation de six tests rapides de diagnostic, en cours de développement par l'entreprise Standard Diagnostics, pour la détection de l'antigène NS1 et des anticorps anti-DENV (IgG, IgM et IgA) dans l'urine ou la salive.

## 2. Principaux résultats

Globalement, les cinétiques d'excrétion du génome viral, de l'antigène NS1 et des anticorps dirigés contre le DENV dans la salive sont similaires à celles dans le plasma. Néanmoins, la proportion des échantillons salivaires positifs demeure inférieure à celle des échantillons sanguins. L'analyse multivariée a permis de montrer que la détection des différents marqueurs de diagnostic était majoritairement liée à la quantité de ces mêmes marqueurs dans le plasma. Ces résultats sont cohérents puisque la salive totale contient environ 2,5% de fluide gingival qui n'est autre qu'un transudat du sérum.

Contrairement à la salive, l'urine ne reflète pas exactement ce qui se passe dans le sang en termes de cinétiques des différents marqueurs de diagnostic. Cela est lié aux mécanismes complexes de filtration et de réabsorption qui interviennent au niveau des reins lors de la production de l'urine. Seule la cinétique d'excrétion des IgA anti-DENV s'est révélée similaire à celle de cet anticorps dans le sang, avec néanmoins des taux de détection plus faibles. Les IgM anti-DENV n'ont pas pu être détectées. En effet, la taille importante des IgM (950 kDa) restreint considérablement leur passage à travers la barrière que constituent les glomérules rénaux. S'il est parfois possible de détecter les IgM totales dans l'urine de patients présentant des glomérulopathies sévères, la détection d'IgM spécifiques est très rare. La cinétique des IgG anti-DENV excrétées dans l'urine suit celle des IgG plasmatiques mais uniquement au cours des deux premières semaines suivant l'apparition de la fièvre. Après ces deux semaines, alors que l'excrétion des IgG dans le plasma reste relativement stable, celle des IgG dans l'urine diminue significativement. Ainsi, trois mois après le début de la maladie, les IgG sont détectables dans l'urine d'un quart des patients alors que les trois quarts de ces mêmes patients ont encore des IgG dans leur plasma. Par ailleurs, une étude portant sur différentes protéines urinaires de patients présentant une DSS, réalisée par Wills *et al.*, a montré que la clairance des IgG totales augmentait au cours de l'infection [201]. Nos observations suggèrent que ce qui avait été observé par Wills *et al* chez des patients en choc circulatoire serait généralisable au moins aux patients DHF de notre étude qui ne comptait que peu de cas de DSS.

La cinétique d'excrétion de l'ARN viral dans l'urine s'est révélée bien particulière. Alors que le génome du DENV est détectable de façon très précoce dans le plasma, l'excrétion de l'ARN viral dans



l'urine est retardée. La RT-PCR n'a permis de détecter le génome du DENV que dans 13,6% des urines collectées durant les deux premiers jours de la maladie tandis qu'il était présent dans 66,6% des urines prélevées neuf à dix jours après le début de la fièvre. L'intérêt majeur de ces cinétiques décalées serait de pouvoir détecter l'ARN viral dans l'urine lorsqu'il ne l'est plus dans le sang. De tels cas ont déjà été décrits auparavant chez un nombre limité de patients atteints de la dengue [190,192,194] ainsi que chez des patients infectés par le WNV [187]. Dans notre étude, 32 urines provenant de patients chez lesquels l'ARN viral n'était plus détectable dans le plasma, ont été testées. Seuls trois échantillons d'urine (9,4%), l'un prélevé six jours après le début de la fièvre, les deux autres après dix jours, se sont révélés positifs.

L'excrétion de la protéine NS1 dans l'urine a donné des résultats peu satisfaisants. Les meilleurs taux de détection ont été observés au cours des 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours après le début de la fièvre mais n'ont pas dépassé 25%.

L'utilisation combinée d'urine et de salive, prélevées au même moment, chez un même patient, est apparue intéressante, tout particulièrement pour la détection du génome viral. Elle permet d'augmenter les taux de détection par rapport à ceux obtenus en utilisant l'urine et la salive séparément.

Au cours de ce travail, les tentatives d'isolement du virus en culture cellulaire à partir d'échantillons de salive et d'urine positifs en RT-PCR se sont révélées infructueuses. Deux autres essais d'isolement infructueux du DENV à partir d'échantillons d'urine ont été rapportés dans la littérature [189,192]. Par contre, le WNV ainsi que le ZIKV ont pu être isolés à partir d'urines de patients [202,203]. Le travail réalisé sur l'isolement du WNV a montré que les chances de parvenir à isoler le virus étaient meilleures avec des échantillons d'urine n'ayant jamais été congelés et contenant plus de 6 log<sub>10</sub> copies d'ADNc/ml. Dans notre étude, malgré l'utilisation de colonnes de concentration, le titre maximum obtenu n'a pas dépassé 5,2 log<sub>10</sub> copies d'ADNc/ml. De plus, tous nos échantillons avaient été congelés. Il n'est donc pas possible de conclure quant à la présence ou non de virus infectieux dans les urines à partir de ce travail.

Les tests de diagnostic rapide développés par l'entreprise Standard Diagnostics afin de détecter la protéine NS1 et les différents anticorps dirigés contre le DENV (IgM, IgG et IgA) se sont révélés, dans l'ensemble, peu performants. Seul le test de détection de la protéine NS1 dans l'urine a donné de

bons résultats, comparés à ceux du test ELISA de l'IPC. Un pourcentage de concordance de 97,1% ainsi qu'un coefficient kappa de 0,88 ont en effet été observés. En revanche une moins bonne concordance entre le test rapide et le test ELISA de l'IPC pour la détection de la NS1 de la salive (74,4%) et un mauvais coefficient kappa (0,28) ont été obtenus. Concernant les tests de détection des anticorps dans l'urine aussi bien que dans la salive, un manque de sensibilité a été constaté. Ce problème de sensibilité est probablement lié au faible volume d'échantillon requis pour réaliser le test. Seuls 10 µl d'urine et 5 µl de salive sont nécessaires, alors que le test lorsqu'il est réalisé à partir du sang, qui contient une quantité bien plus importante d'anticorps que l'urine et la salive, nécessite 10 µl.

### 3. Articles

**Article 2: Value of routine dengue diagnostic tests in urine and saliva specimens.**

Andries AC, Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, Lorn Try P, Ros S, Ong S, Huy R, Horwood P, Flamand M, Sakuntabhai A, Tarantola A, Buchy P. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 25;9(9):e0004100

RESEARCH ARTICLE

# Value of Routine Dengue Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens

Anne-Claire Andries<sup>1</sup>, Veasna Duong<sup>1</sup>, Sowath Ly<sup>2</sup>, Julien Cappelle<sup>2,3</sup>, Kim Srorn Kim<sup>4</sup>, Patrich Lorn Try<sup>4</sup>, Sopheaktra Ros<sup>1</sup>, Sivuth Ong<sup>1</sup>, Rekol Huy<sup>5</sup>, Paul Horwood<sup>1</sup>, Marie Flamand<sup>6</sup>, Anavaj Sakuntabhai<sup>7,8</sup>, Arnaud Tarantola<sup>2</sup>, Philippe Buchy<sup>1,9\*</sup>

**1** Institut Pasteur in Cambodia, Virology Unit, Phnom Penh, Cambodia, **2** Institut Pasteur in Cambodia, Epidemiology and Public Health Unit, Phnom Penh, Cambodia, **3** Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité AGIRs, Montpellier, France, **4** Kampong Cham Provincial Hospital, Pediatric Department, Kampong Cham, Cambodia, **5** Ministry of Health, Centre National de Malariaologie, Phnom Penh, Cambodia, **6** Institut Pasteur, Structural Virology Unit & CNRS UMR 3569, Paris, France, **7** Institut Pasteur, Functional Genetics of Infectious Diseases Unit, Paris, France, **8** Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 3012, Paris, France, **9** GlaxoSmithKline Vaccines, Vaccine Value and Health Sciences, Singapore, Singapore

\* [buchyphilippe@hotmail.com](mailto:buchyphilippe@hotmail.com)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Andries A-C, Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, Lorn Try P, et al. (2015) Value of Routine Dengue Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0004100. doi:10.1371/journal.pntd.0004100

**Editor:** Ernesto T. A. Marques, University of Pittsburgh, UNITED STATES

**Received:** April 25, 2015

**Accepted:** August 31, 2015

**Published:** September 25, 2015

**Copyright:** © 2015 Andries 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 paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007/2011) under Grant Agreement n°282 378. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: PB is employed by GlaxoSmithKline. This does not alter our adherence

## Abstract

### Background

Dengue laboratory diagnosis is essentially based on detection of the virus, its components or antibodies directed against the virus in blood samples. Blood, however, may be difficult to draw in some patients, especially in children, and sampling during outbreak investigations or epidemiological studies may face logistical challenges or limited compliance to invasive procedures from subjects. The aim of this study was to assess the possibility of using saliva and urine samples instead of blood for dengue diagnosis.

### Methodology/Principal Findings

Serial plasma, urine and saliva samples were collected at several time-points between the day of admission to hospital until three months after the onset of fever in children with confirmed dengue disease. Quantitative RT-PCR, NS1 antigen capture and ELISA serology for anti-DENV antibody (IgG, IgM and IgA) detection were performed in parallel on the three body fluids. RT-PCR and NS1 tests demonstrated an overall sensitivity of 85.4%/63.4%, 41.6%/14.5% and 39%/28.3%, in plasma, urine and saliva specimens, respectively. When urine and saliva samples were collected at the same time-points and tested concurrently, the diagnostic sensitivity of RNA and NS1 detection assays was 69.1% and 34.4%, respectively. IgG/IgA detection assays had an overall sensitivity of 54.4%/37.4%, 38.5%/26.8% and 52.9%/28.6% in plasma, urine and saliva specimens, respectively. IgM were detected in 38.1% and 36% of the plasma and saliva samples but never in urine.

to all PLOS NTDs policies on sharing data and materials.

## Conclusions

Although the performances of the different diagnostic methods were not as good in saliva and urine as in plasma specimens, the results obtained by qRT-PCR and by anti-DENV antibody ELISA could well justify the use of these two body fluids to detect dengue infection in situations when the collection of blood specimens is not possible.

## Author Summary

Dengue is the most important arthropod-borne disease affecting humans and represents a huge public health burden in affected countries. Symptoms are often non-specific hence the need for an early, sensitive and specific diagnosis of dengue for appropriate management as well as for early epidemic detection. Currently, almost all laboratory diagnostic methods require a blood specimen that may be sometimes be difficult or inconvenient to obtain. In this study, we assessed the possibility to use saliva and urine samples as alternatives to blood specimens in dengue diagnosis. We demonstrated that the performances of the different diagnostic methods (RT-PCR, NS1 antigen detection and anti-DENV IgM/IgG/IgA ELISAs) were in general not as good in saliva and urine as in plasma, but that the use of these body fluids obtained by non-invasive methods could be of value in certain circumstances such as outbreak investigations or in young children (once they are old enough to comply to instructions), in addition to the situations when blood cannot be easily collected (e.g., lack of phlebotomist, refusal of the procedure, etc.).

## Introduction

Dengue virus (DENV; family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*), is a mosquito-borne, enveloped, single stranded positive-sense RNA virus. Until recently, four serologically related but antigenically and genetically distinct dengue viruses (DENV-1, -2, -3, and -4) causing disease in human were known, but a fifth serotype was recently discovered in Malaysia [1,2].

Over the last decades, DENV has become the most important arthropod-borne virus affecting humans. Several factors such as rapid urbanization, failure to control mosquitoes and rapid progress in air transportation have contributed to the emergence of endemic dengue in 128 countries in the world [3,4]. In 2009, the World Health Organization (WHO) estimated that 2.5 billion people were living in areas at high risk for infection, among which 50 million were infected annually [1]. However due to weak disease surveillance, low level of reporting of cases and difficulties in diagnosis, the true incidence and burden of dengue are very likely underestimated. Using new modeling approaches, Bhatt et al. estimated that approximately 3.97 billion people were living in areas where DENV is circulating and that almost 400 million cases of dengue occurred every year worldwide [4].

While most infections are asymptomatic or result in a mild febrile illness, the virus is capable of producing life-threatening dengue hemorrhagic fever, dengue shock syndrome, and non-specific complication of systemic diseases (e.g. encephalitis, hepatitis) [1]. The course of dengue illness can be divided in three main phases: the febrile phase, the critical phase and the recovery phase. Severe clinical disease manifestations such as fluid leakage, bleeding and shock occurs during the critical phase which begins around day 4–7 after the onset of fever, when the temperature drops under 38°C, and lasts usually between 48 to 72 hours. During the critical



phase, the condition of patients experiencing a severe form of the disease worsens as a result of plasma leakage whereas the condition of patients with a non-severe disease improves.

Direct diagnosis of DENV infection is based on virus isolation, detection of the viral genome by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or detection of NS1 antigen. Indirect diagnosis using serological methods to detect anti-DENV IgM and IgG is commonly employed, while IgA tests remain less commonly used. The selection of diagnostic methods depends greatly on the time-point of the sample collection during the course of the disease. RT-PCR and virus isolation require a blood sample collected during the early febrile phase of the disease (0–5 days after the onset of fever) [1]. A sample obtained during the early phase is also preferred for NS1 detection, but in patients experiencing a primary infection the NS1 antigen remains detectable for nine days or more after the onset of fever [5,6]. Serological methods can be used later during the course of the disease. IgM and IgA, however, can persist in blood during several weeks or even months after the infection while IgG may persist for decades. Differentiating between an acute and a recent DENV infection by these methods may therefore be challenging. Currently almost all laboratory diagnostic methods require a blood sample that may be difficult to obtain in children, the population which is most commonly affected by dengue in endemic regions, especially in field conditions or outbreak settings. Saliva and urine samples could be used as surrogates for blood as the collection of these body fluids is non-invasive and better accepted by patients, does not require medically-trained staff and the samples are easier to process as they require only limited laboratory facilities.

Diagnosis using urine and saliva samples has already been explored for several other viral infections such as HIV, Hepatitis A, B and C and rubella [7–13]. Urine specimens seem suitable for the diagnosis of infection by West-Nile virus (WNV) and Zika virus (ZIKV)—two other flaviviruses—as viral genome of both viruses can be detected longer in urine than in serum [14,15] and infectious WNV and ZIKV can be recovered from urine [16–18]. Previous studies conducted on a limited number of samples have demonstrated that urine and saliva could be used as an alternative to blood for serological or virological diagnosis of dengue [19–29].

The purpose of this study was to describe the excretion profiles of the anti-DENV antibodies (IgG, IgM and IgA), the NS1 antigen, the viral genome and of the infectious virus in plasma, saliva and urine specimens obtained from a large number of Cambodian children with a confirmed dengue infection. In this study, we aimed to evaluate the possibility of using saliva and urine as alternatives to serum or plasma samples. We also aimed to assess if urine and/or saliva specimens could contribute to predict progression towards a severe form of the disease, as suggested by Chuansumrit *et al.* [21], or if the use of such specimens increases the time window for DENV infection confirmation as suggested by several previous studies [20,22,24].

## Materials and Methods

### Clinical samples

Plasma, saliva and urine samples used in this study were collected in Cambodia in 2013, during the DENFREE (DENgue research Framework for Resisting Epidemics in Europe) study [30]. Samples were prospectively obtained from children hospitalized with clinically-suspected dengue in one of the three hospitals of the Kampong Cham province participating to the DENFREE study. Dengue infection was confirmed in patients through a combination of: viral RNA detection by quantitative RT-PCR (qRT-PCR); isolation of the virus in cell culture; detection of the NS1 protein in the blood; by evidencing a IgM seroconversion in paired plasma and/or a fourfold increase of the antibody titer measured by hemagglutination inhibition assay (HIA) in paired plasma collected at least seven days apart. Disease severity was assessed for each patient according to the 1997 WHO criteria and to the 2009 WHO guidelines [1, 31] using clinical,

biological and paraclinical examination data recorded at admission and throughout the entire hospitalization period. Patients were classified into 2 groups: non-severe dengue (dengue fever (DF) according to the 1997 guidelines and DF without warning signs according to the 2009 WHO guidelines) and severe dengue (dengue hemorrhagic fever (DHF) and DSS (dengue shock syndrome) according to the 1997 guidelines and dengue with warning signs as well as severe dengue according to the 2009 WHO recommendations). Urine and saliva were collected daily during hospitalization and then one week, two weeks, three weeks, one month and three months after the discharge from hospital. Plasma specimens were collected at three time-points during hospitalization: on admission, during hospitalization and at the time of hospital discharge. If the patient or guardians gave consent, blood was also collected 30 and 90 days after leaving the hospital.

Urine specimens were collected in 50 ml sterile tubes. Due to the large volume of saliva required for the analyses, the saliva specimens were obtained by direct spitting into 1.8 ml sterile tubes. If possible, children were asked to spit into two separate tubes, an empty one and a pre-filled one with 100 µl of viral transport medium (VTM), until minimal volumes of 100 µl and 200 µl were reached in the empty and the pre-filled tubes, respectively. All clinical samples were stored at -80°C prior to testing. In addition to prevent degradation of the RNA and of the virus infectivity, the freezing process was also beneficial to reduce the viscosity of the saliva.

Only patients with well-documented medical records allowing a clear assessment of the disease severity were included in this study.

The clinical specimens obtained from 20 patients hospitalized for a non-dengue febrile illness were also used to assess the specificity of the different diagnostic methods in urine and saliva samples. These controls showed no biological evidences of on-going DENV infection (DENV qRT-PCR negative, NS1 test negative and no anti-DENV antibodies in paired plasma [admission and discharge]).

### Viral genome detection

The viral RNA was extracted from 140 µl of plasma, 280 µl of saliva mixed with VTM and 280 µl of concentrated urine, using the QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Germany). Urine samples were concentrated using the 100K Microsep ultrafiltration device (Pall, USA) to convert an initial volume of 5 ml urine to a final volume of 280 µl of concentrated urine. After extraction, the DENV nucleic acids present in plasma were detected by a serotype-specific quantitative multiplexed real-time RT-PCR (qRT-PCR) as previously described by Hue *et al.* [32]. For urine and saliva, the multiplex qRT-PCR was replaced by a monoplex qRT-PCR as the serotype was already identified in the corresponding plasma. Results were expressed in equivalents to complementary DNA (cDNA) copies per ml. The limit of detection in plasma was 350 copies/ml for DENV-1, 75 copies/ml for DENV-2, 350 copies/ml for DENV-3 and 715 copies/ml for DENV-4. The limit of detection was 200 copies/ml, 50 copies/ml, 200 copies/ml and 350 copies/ml for DENV-1, -2, -3 and -4, respectively, with the qRT-PCR in urine and plasma specimens spiked with quantified synthetic plasmids.

As DENV viremia lasts only a few days after the onset of fever (DAOF), the samples selected for the detection of the viral genome were mainly those collected during hospitalization. Additional urine and saliva specimens collected one to three weeks after discharge from the hospital were also added as some data previously published suggested that the DENV genome could be detected in urine until day 16 after the onset of fever [22].

### Virus isolation in C6/36 cells

C6/36 cells were used in attempt to isolate DENV from urine and saliva samples. Before inoculation, urine samples were dialyzed and concentrated in PBS using the 100K Microsep



ultrafiltration system (Pall, USA) and then filtered through 0.2- $\mu$ m membrane (Nalgene Thermo Scientific, USA). Saliva diluted in VTM as well as urine samples were diluted 1/2 with L15 Leibovitz Medium (Sigma Aldrich, Germany) containing 2% of fetal calf serum (Gibco Life Technology, USA). Final volumes of 300  $\mu$ l of diluted specimens, or controls, were inoculated into 12-well plates containing 100% confluent C6/36 cells and incubated for 1 hour at 28°C. After incubation, 1.7 ml of medium was added to each well and the plates were incubated at 28°C. After 7 days, cells were harvested and DENV was detected by an immunofluorescence assay using serotype-specific monoclonal antibodies as described previously [33]. For samples that tested negative, two additional passages on C6/36 were performed before concluding that DENV did not replicate.

Our positive controls consisted of urine and saliva specimens obtained from healthy individuals as well as VTM spiked with infectious virus at a final concentration of 3 to 7 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml. Spiked urine controls were dialyzed and concentrated as for the patient's urine samples.

### NS1 detection by ELISA

A capture ELISA was used to detect NS1 in plasma, non-concentrated urine and undiluted saliva. In plasma and urine, the NS1 protein was detected by the two-step ELISA method described by Alcon et al. [6] but after replacing polyclonal antibodies by monoclonal antibodies. For the saliva specimens, a one-step capture ELISA was used. All the protocols are detailed in [S1 Table](#). Briefly, in the one-step ELISA developed for NS1 detection in saliva, the sample and the conjugated antibody were incubated together for 2 hours. In the two-step ELISAs (used for plasma and urine specimens), samples were first incubated for one hour and then after a washing step, the conjugated antibody was added and incubated for one hour.

For the patients infected with DENV-1, the NS1 protein was quantified by ELISA using serial two-fold serial dilutions of a solution containing a known concentration of affinity-purified DENV-1 recombinant NS1 protein expressed in HEK293T cells (kindly provided by Dr. Marie Flamand, Institut Pasteur, Paris, France). The standard curve was linear between 0.5 ng/ml and 16 ng/ml for all three NS1 assays. A result was considered positive if the OD was greater than twice the mean OD value measured in 20 negative controls (20 healthy children enrolled during the community study of DENFREE project).

Two positive controls, a weak one and a strong one, and one negative control were used to validate the results of each plate. Inter- and intra-precision of the different ELISAs are shown in [S4](#) and [S5](#) Tables. The samples used for the NS1 protein detection were mainly those collected between DAOF 1 and 10 in hospitalized patients. In addition, 29 urine and 7 saliva specimens collected between DAOF 10 and 16 were tested.

### IgM and IgA detection by MAC-ELISA and AAC-ELISA and IgG detection by indirect ELISA

In-house capture ELISAs were used to detect anti-DENV IgM (MAC-ELISA) and IgA (AAC-ELISA) in plasma, non-concentrated urine and undiluted saliva specimens. For plasma, MAC-ELISA and AAC-ELISA were performed as described previously [33,34]. For urine and saliva samples, minor modifications to MAC-ELISA and AAC-ELISA protocols were adopted. A 100  $\mu$ l/well format was used for plasma and urine samples, but as only a limited volume of saliva was available, a 50  $\mu$ l/well format was used for this body fluid. The protocols used are detailed in [S2](#) and [S3](#) Tables. One negative control, one weakly positive control and one strongly positive control were tested in each plate in order to validate each plate of tests. Inter- and intra-precision of the different assays are shown in [S4](#) and [S5](#) Tables.

Results were expressed as  $\Delta$ ODs (OD of the sample incubated in the presence of antigen—OD of the sample incubated in the absence of antigen). A result was considered as positive when the  $\Delta$ OD was higher than 0.05 for the saliva-based AAC-ELISA and higher than 0.1 for all the other ELISAs. The cut-offs were determined by testing the samples from 20 healthy children who showed no biological evidences of a previous DENV infection (DENV qRT-PCR negative, NS1 ELISA negative and HI titer = 0). Cut-off values are shown in [S1 Fig](#).

In-house indirect ELISAs were used to detect anti-DENV IgG in plasma, non-concentrated urine and undiluted saliva specimens [35]. A 100  $\mu$ l/well format was used for the plasma and urine-based ELISAs, while a 50  $\mu$ l/well format was used for the saliva-based ELISA, due to the limited volume of samples available. The protocols used here are described in [S6 Table](#).

Results were expressed as  $\Delta$ ODs. Results were considered as negative when the  $\Delta$ OD was below 0.2 for the ELISA in plasma (cut-off determined by comparing ELISA results to those obtained by HIA with the same samples) and below 0.1 for the ELISAs in urine and saliva. Cut-off values were determined by testing the samples obtained from 20 healthy children and are described in [S1 Fig](#).

For the evaluation of the antibody detection assays, the samples tested were collected during the hospitalization as well as during the follow-up period after the patient was discharged from the hospital. The panel contained samples collected as early as the day of the onset of fever as well as specimens obtained up to 103 days after the beginning of the disease.

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed using STATA version 11.0 (StataCorp, USA). A significance was assigned at  $P < 0.05$  for all parameters and were two-sided. The statistical differences between various categorical groups were detected using Chi-squared test. Correlation coefficients between two continuous variables were calculated using Spearman's rank correlation test. Uncertainty was expressed by 95% confidence intervals (CI95).

In order to identify explanatory variables associated with the detection of the viral genome, the NS1 antigen or the anti-DENV antibodies in the three different fluids, multivariate analysis using a boosted regression tree (BRT) approach was used. BRT is a method combining regression trees with weak individual predictive performances into a single model with higher performance. We used BRT because it is capable of dealing with complex responses, including non-linear relationships and interactions between explanatory variables [36], and we were expecting such complex relationships between our explanatory and response variables. As part of the final model, the BRT assesses the relative importance (RI) of each explanatory variable based on the number of times a variable is used in all trees and its contribution to the final model improvement. A higher RI of a predictor indicates a stronger influence on the response in question (i.e. the detection of each diagnostic marker, in this study). The effect of each explanatory variable on the response can be visualized by the use of partial dependence plots. For each model with a binary response variable, a Receiver-Operating Characteristic (ROC) curve was constructed and the area under the ROC curve (AUC) was calculated. The AUC ranges between 0.5 for random prediction to 1, the higher the AUC the better the model performance. For models with a continuous response variable, the performance of the model was estimated by a correlation coefficient between observed and predicted datasets. This correlation coefficient ranges between 0 (no correlation) and 1 (perfect correlation), with values superior to 0.5 suggesting a high correlation. The analysis was carried out using the “dismo” package (version 1.0–5) [37] and the “gbm” package (version 2.1) [38] under the R statistical environment (R Foundation, Vienna, Austria). A learning rate of 0.001, a bag fraction of 0.5 and a tree complexity of 3 were used. The explanatory variables used are summarized in [Table 1](#). The dengue



**Table 1. Explanatory variables used in the different BRT models.**

Name	Description	Variable type
daof	Number of day between the onset of fever and the time of sampling	Continuous
status	Immune status of the patient determined by HIA	Categorical (Primary infection / Secondary infection / Unknown)
classif	Disease severity classification according to 1997 WHO guideline	Categorical (Non severe / Severe) <sup>a</sup>
logvir	Viral load measured by qRT-PCR (log10 cDNA copies/ml)	Continuous
logNS1	NS1 concentration in plasma (log10 ng/ml)	Continuous
antibodies	Quantity of anti-DENV antibodies in plasma estimated by optical density in ELISA	Continuous

<sup>a</sup> Non severe disease refers to dengue fever (DF) and severe disease refers to dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue with shock syndrome (DSS)

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.t001

serotype was not included in the analyses as most of the patients included in this study were infected with a DENV-1 strain during the 2013 epidemic in Cambodia.

### Ethical aspects

The children’s legal representatives signed a written consent before the enrolment of the patient. The DENFREE project was approved by the Cambodian National Ethics Committee for Health Research (authorization no. 063NECHR).

### Results

Dengue infection was confirmed in 401 of 574 children hospitalized with clinically-suspected dengue included in the DENFREE study between June and September 2013. In total, 913 plasma, 1555 urine and 1564 saliva samples obtained from 267 patients with confirmed dengue infection and complete records were analyzed. The patients were 3 to 16 years old (median age: 9 years) and 57.3% (153/267) were male. Because of sample volume limitations, all patients may not have been included in each laboratory test evaluation. For each patient, between one to eight urine (median = 4), one to six saliva (median = 3) and one to six plasma (median = 3) samples were collected. Among these samples, a total of 763 matched plasma, urine and saliva samples were obtained from the individual patients at the same time-point during the course of the disease. The number of patients as well as the number and the characteristics of the samples used to evaluate each assay are summarized in [Table 2](#).

### Viral genome detection

Overall, 85.4% (323/378, CI95 = [81.5–88.8]) of the plasma specimens obtained from 144 patients with a confirmed acute DENV infection and sampled from the day of onset of fever until the 10<sup>th</sup> day after fever onset, tested positive. Out of the 442 urine and the 562 saliva samples obtained between the day of fever onset until the 28<sup>th</sup> day after the onset of fever (DAOF 28) from 118 and 132 patients, respectively, 41.6% (n = 184, CI95 = [37.0–46.4]) and 39% (n = 219, CI95 = [34.9–43.1]) tested positive by qRT-PCR. The qRT-PCR results are presented based on days of sampling after the onset of fever ([Fig 1](#), [S7 Table](#), [S9 Table](#)). The proportion of urine samples positive by qRT-PCR increased with time, starting from a minimum of 13.6% during the first 2 days after fever onset to a maximum of 66.6% at DAOF 9–10. At the latest

**Table 2. Characteristics of the samples used in each part of the study.**

	Plasma	Urine	Saliva
<b>Complete study</b>			
Total number of samples	913	1555	1564
Total number of patients	267	267	267
<b>Viral genome detection</b>			
Total number of samples	378	442	562
Total number of patients	144	118	132
<b>Immune status</b>			
Primary infection	107	139	172
Secondary infection	185	206	269
Undetermined <sup>a</sup>	86	97	121
<b>Serotype</b>			
DENV-1	273	369	401
DENV-2	40	44	61
DENV-3	0	0	0
DENV-4	65	29	100
qRT-PCR negative	0	0	0
<b>Disease classification<sup>b</sup></b>			
Non severe	210	228	317
Severe	168	214	245
<b>Sample collection</b>			
At admission and during hospitalization	378	423	551
After hospital discharge	0	19	11
<b>NS1 detection</b>			
Total number of samples	533	859	688
Total number of patients	217	193	197
<b>Immune status</b>			
Primary infection	157	240	201
Secondary infection	267	446	342
Undetermined <sup>a</sup>	109	173	145
<b>Serotype</b>			
DENV-1	365	592	481
DENV-2	44	54	58
DENV-3	9	19	17
DENV-4	86	147	111
qRT-PCR negative	29	47	21
<b>Disease classification<sup>b</sup></b>			
Non severe	341	542	477
Severe	192	317	211
<b>Sample collection</b>			
At admission and during hospitalization	533	839	687
After hospital discharge	0	20	1
<b>Antibodies detection</b>			
Total number of samples	876	1,493	1,489
Total number of patients	255	219	227
<b>Immune status</b>			
Primary infection	253	469	425
Secondary infection	450	735	784

(Continued)

Table 2. (Continued)

	Plasma	Urine	Saliva
Undetermined <sup>a</sup>	173	289	280
<b>Disease classification<sup>b</sup></b>			
Non severe	586	1,005	1,010
Severe	290	488	479
<b>Sample collection</b>			
At admission and during hospitalization	690	1,020	997
After hospital discharge	186	473	492

<sup>a</sup>Immune status is undetermined when the interval between admission and hospital discharge is < 7 days and the HI titer at the time of hospital discharge is ≤2560

<sup>b</sup> non-severe dengue corresponds to dengue fever (DF) according to the 1997 guidelines and to DF without warning signs according to the 2009 WHO guidelines. Severe dengue corresponds to dengue hemorrhagic fever (DHF) and DSS (dengue shock syndrome) according to the 1997 guidelines and dengue with warning signs and severe dengue according to the 2009 WHO recommendations.

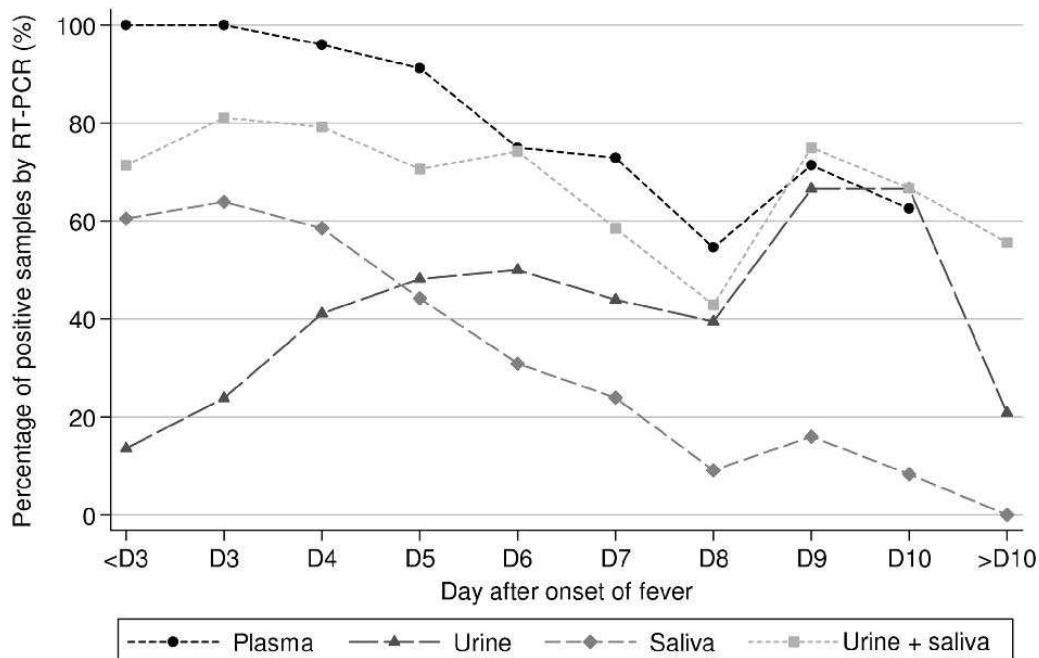
doi:10.1371/journal.pntd.0004100.t002

time-points, the proportion of urine samples positive by qRT-PCR was approximately the same as the proportion of RNA-positive plasma specimens (71.4% and 62.5% at DAOF 9–10, respectively). DENV RNA remained detectable in one urine sample at DAOF 16. The detection rate of viral RNA by qRT-PCR in saliva samples followed the decreasing curve of the RNA detection rate observed in the plasma specimens. The highest proportion of saliva samples that tested positive for DENV RNA was observed between the first day and the 4<sup>th</sup> day of fever (60.5% at DAOF 0–2, 63.9% at DAOF 3 and 58.5% at DAOF 4) whereas plasma samples collected at the same time-points were RNA-positive in 96% to 100% of the cases. The RNA detection rate in saliva decreased thereafter (44.2%, 30.9%, 23.9%, 9.9%, 16% and 8.3% at DAOF 5, 6, 7, 8, 9 and 10, respectively), and all samples tested negative after DAOF 10. By comparison with the percentage of plasma samples positive by qRT-PCR, the sensitivity of qRT-PCR in saliva was on average 46.2% lower, with a minimal difference of 36.1% at DAOF 3 and a maximal difference of 55.4% at DAOF 9.

In total, 57.6% (68/118) of the patients had at least one of their urine samples that tested positive by qRT-PCR and 68.9% of them (92/132) had at least one saliva sample that tested positive.

When only considering the 243 matched plasma, urine and saliva samples (i.e. clinical specimens collected from the same patients at the same time-points) obtained between DAOF 1 and DAOF 12, the proportion of specimens that tested positive by qRT-PCR was 90.5% (220/243, CI95 = [86.1–93.9]), 39.9% (97/243, CI95 = [33.7–46.4]) and 49.8% (121/243, CI95 = [43.3–56.3]) for plasma, urine and saliva, respectively (Table 3). Three urine samples that tested positive had a corresponding matched plasma sample that tested negative. These 3 urine samples were all collected at the time of hospital discharge: one at DAOF 6 and the two others at DAOF 10. Testing by qRT-PCR the urine and the plasma specimens led to an increase of the diagnostic sensitivity: 90.5% of sensitivity if the plasma was tested alone, 91.8% when both urine and plasma specimens were tested in parallel. The diagnostic sensitivity increased from 85% for plasma samples alone to 86.7% for the plasma and urine combination with samples collected at DAOF 6–7 and from 70.7% to 75.6% during the second week after fever onset. All subjects whose saliva samples tested positive also had detectable RNA levels in their corresponding plasma samples. If both the urine and the saliva samples collected at the same time-points were screened for DENV-RNA the diagnostic sensitivity increased to 69.1% (168/243, CI95 = [62.9–74.9]). If saliva and urine specimens were tested in parallel instead of testing the plasma, the





**Fig 1. Detection of DENV RNA by qRT-PCR in plasma, urine and saliva specimens.** Percentage of plasma, urine and saliva specimens that tested positive for DENV RNA, by day of sampling after onset of fever. (n = 144 patients for plasma, 118 for urine and 144 for saliva).

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.g001

overall diagnostic sensitivity decreased by 21.4% (by 16.7% if the samples were collected at DAOF 0–1 or at DAOF 6–7, by 22.4% at DAOF 3–4, by 23% at DAOF 4–5, and by 24.4% for samples obtained during the 2<sup>nd</sup> week after the onset of fever).

All clinical specimens obtained from 20 patients hospitalized for a non-dengue febrile illness tested negative.

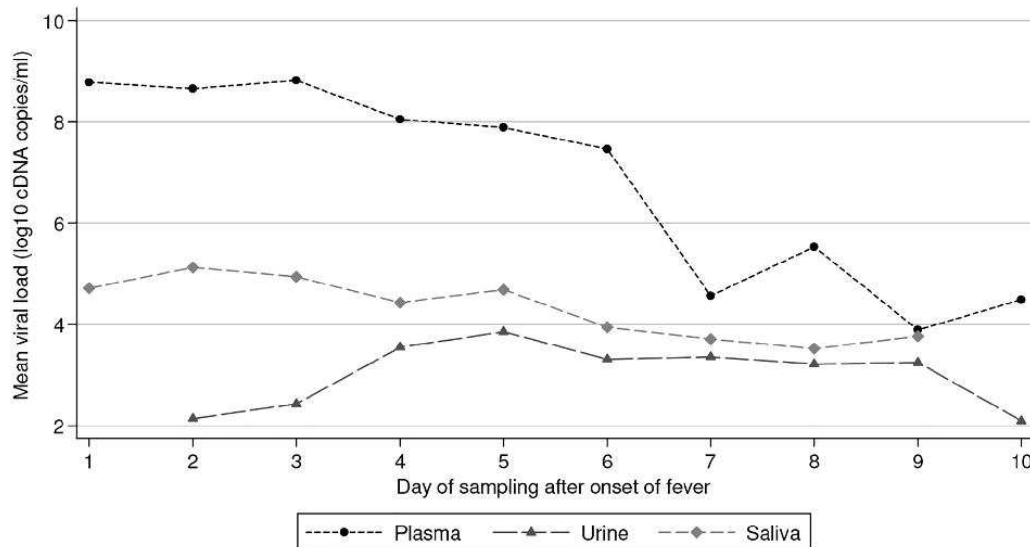
On average, 8.2 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml (min = 2.4 log<sub>10</sub> and max = 9.9 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml) were detected in plasma samples collected between DAOF 0 and 10, 3.5 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml (min = 1 log<sub>10</sub> and max = 5.2 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml) were measured in urine specimens obtained between DAOF 1 and 16, and 4.6 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml (min = 1.1 log<sub>10</sub> and max = 6.1 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml) were detected in saliva specimens collected between DAOF 1 and 10. The results from 261, 167 and 164 sequential positive plasma, urine and saliva samples collected between DAOF 1 and 10 and obtained from 103, 57 and 54 patients, respectively, were used to estimate the mean viral load according to the DAOF. The results are presented in Fig 2. Briefly, before the 4<sup>th</sup> day after the onset of fever, the mean viral load in plasma was at its maximum, at approximately 8.5 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml. Thereafter, the mean viral load in those samples that tested positive progressively decreased over time. The mean viral load in urine increased from 2.1 to 3.8 log<sub>10</sub> cDNA/copies from the 2<sup>nd</sup> day until the 5<sup>th</sup> day after onset of fever. Then it decreased very slowly until DAOF 9 before significantly dropping at DAOF 10. Until DAOF 6, the mean viral load in saliva specimens that tested positive by qRT-PCR was approximately 3.5 log<sub>10</sub> lower than in plasma. From DAOF 7, the mean viral load in saliva continued to only very slightly decrease and at DAOF 9 reached the same level

**Table 3. Results of viral genome and NS1 protein detection in saliva, urine and plasma samples collected from the same patients at the same time-points by time of sampling after onset of fever. Percentage of positivity (number of positive samples/total number of samples tested).**

	D0-1	D2-3	D4-5	D6-7	W2	W3	W4	W5	W6	M3
<b>Plasma</b>										
RNA	100% (6/6)	100% (49/49)	97.7% (85/87)	85% (51/60)	70.7% (29/41)	NA	NA	NA	NA	NA
NS1	83.3% (10/12)	91.6% (76/83)	79% (83/105)	55.9% (33/59)	29.1% (16/55)	NA	NA	NA	NA	NA
IgM	0% (0/11)	5.5% (7/127)	30.5% (47/154)	75.8% (94/124)	82.2% (83/101)	NA	NA	NA	15.7% (11/70)	1.2% (1/86)
IgA	0% (0/9)	2.3% (2/86)	26.7% (32/120)	71.7% (71/99)	91.6% (72/83)	NA	NA	NA	32.3% (20/62)	7.3% (4/55)
IgG	27.3% (3/11)	12.5% (11/88)	39.7% (50/126)	63.3% (62/98)	84.7% (72/85)	NA	NA	NA	82.1% (55/67)	76.1% (67/88)
<b>Urine</b>										
RNA	16.7% (1/6)	20.4% (10/49)	40.2% (35/87)	55% (33/60)	43.9% (18/41)	NA	NA	NA	NA	NA
NS1	0% (0/12)	10.8% (9/83)	28.6% (30/105)	18.6% (11/59)	0% (0/55)	NA	NA	NA	NA	NA
IgA	0% (0/9)	0% (0/86)	12.5% (15/120)	42.4% (42/99)	72.3% (60/83)	46.8% (29/62)	25.4% (17/67)	11.4% (5/44)	3.2% (2/62)	1.8% (1/55)
IgG	0% (0/11)	3.4% (3/88)	26.2% (32/123)	52% (51/98)	75.3% (64/85)	61.7% (37/60)	50.8% (32/63)	41.9% (18/43)	28.4% (19/67)	12.5% (11/88)
<b>Saliva</b>										
RNA	83.3% (5/6)	75.5% (37/49)	60.9% (53/87)	35% (21/60)	12.2% (5/41)	NA	NA	NA	NA	NA
NS1	16.7% (2/12)	33.7% (28/83)	41% (43/105)	28.8% (17/59)	10.9% (6/55)	NA	NA	NA	NA	NA
IgM	0% (0/11)	6.3% (8/127)	26.6% (41/154)	66.9% (83/124)	75.3% (76/101)	NA	NA	NA	7.1% (5/70)	1.2% (1/86)
IgA	0% (0/9)	0% (0/86)	13.3% (16/120)	49.5% (49/99)	68.7% (57/83)	33.9% (21/62)	13.4% (9/67)	15.9% (7/44)	3.2% (2/62)	0% (0/55)
IgG	9.1% (1/11)	9.1% (8/88)	22.2% (28/126)	52% (51/98)	78.8% (67/85)	80% (48/60)	87.3% (55/63)	79.1% (34/43)	68.6% (46/67)	45.5% (40/88)
<b>Plasma + urine</b>										
RNA	100% (6/6)	100% (49/49)	97.7% (85/87)	86.7% (52/60)	75.6% (31/41)	NA	NA	NA	NA	NA
NS1	83.3% (10/12)	91.6% (76/83)	79% (83/105)	55.9% (33/59)	29.1% (16/55)	NA	NA	NA	NA	NA
IgA	0% (0/9)	2.3% (2/86)	28.3% (34/120)	71.7% (71/99)	91.6% (72/83)	NA	NA	NA	32.3% (20/62)	9.1% (5/55)
IgG	27.3% (3/11)	12.5% (11/88)	44.4% (58/126)	67.4% (66/98)	85.9% (73/85)	NA	NA	NA	82.1% (55/67)	78.4% (69/88)
<b>Plasma + saliva</b>										
RNA	100% (6/6)	100% (49/49)	97.7% (85/87)	85% (51/60)	70.7% (29/41)	NA	NA	NA	NA	NA
NS1	83.3% (10/12)	91.6% (76/83)	79% (83/105)	55.9% (33/59)	29.1% (16/55)	NA	NA	NA	NA	NA
IgM	0% (0/11)	7.1% (9/127)	33.1% (51/154)	79% (98/124)	85.2% (86/101)	NA	NA	NA	17.1% (12/70)	1.2% (1/86)
IgA	0% (0/9)	2.3% (2/86)	27.5% (33/120)	72.7% (72/99)	91.6% (76/83)	NA	NA	NA	32.3% (20/62)	7.3% (4/55)
IgG	27.3% (3/11)	15.9% (14/88)	42.9% (54/126)	66.3% (65/98)	85.9% (73/85)	NA	NA	NA	83.6% (56/67)	78.4% (69/88)
<b>Urine + saliva</b>										
RNA	83.3% (5/6)	77.6% (38/49)	74.7% (65/87)	68.3% (41/60)	46.3% (19/41)	NA	NA	NA	NA	NA
NS1	16.7% (2/12)	34.9% (29/83)	49.5% (52/105)	32.2% (19/59)	10.9% (6/55)	NA	NA	NA	NA	NA
IgA	0% (0/9)	0% (0/86)	19.2% (23/120)	56.6% (56/99)	84.3% (70/83)	59.7% (37/62)	29.8% (20/67)	20.5% (9/44)	6.5% (4/62)	1.8% (1/55)
IgG	9.1% (1/11)	11.4% (10/88)	34.9% (44/126)	63.3% (62/98)	82.4% (70/85)	83.3% (50/60)	88.9% (56/63)	81.4% (35/43)	76.1% (51/67)	47.7% (42/88)
<b>All</b>										
RNA	100% (6/6)	100% (49/49)	97.7% (85/87)	86.7% (52/60)	78% (32/41)	NA	NA	NA	NA	NA
NS1	83.3% (10/12)	91.6% (76/83)	79% (83/105)	55.9% (33/59)	29.1% (16/55)	NA	NA	NA	NA	NA
IgA	0% (0/9)	2.3% (2/86)	29.2% (35/120)	71.7% (71/99)	91.6% (76/83)	NA	NA	NA	32.3% (20/62)	9.1% (5/55)
IgG	27.3% (3/11)	15.9% (14/88)	46.8% (59/126)	68.4% (67/98)	87.1% (74/85)	NA	NA	NA	83.6% (56/67)	79.6% (70/88)

NA: No sample Available

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.t003



**Fig 2. Mean viral load measured by qRT-PCR in plasma, urine and saliva.**

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.g002

than in plasma. The viral load measured in saliva correlated with the viral load measured in plasma (Spearman coefficient = 0.51, p-value < 0.001) whereas there was no correlation between viral loads in plasma and in urine (p-value = 0.28).

### Virus isolation in C6/36 cells

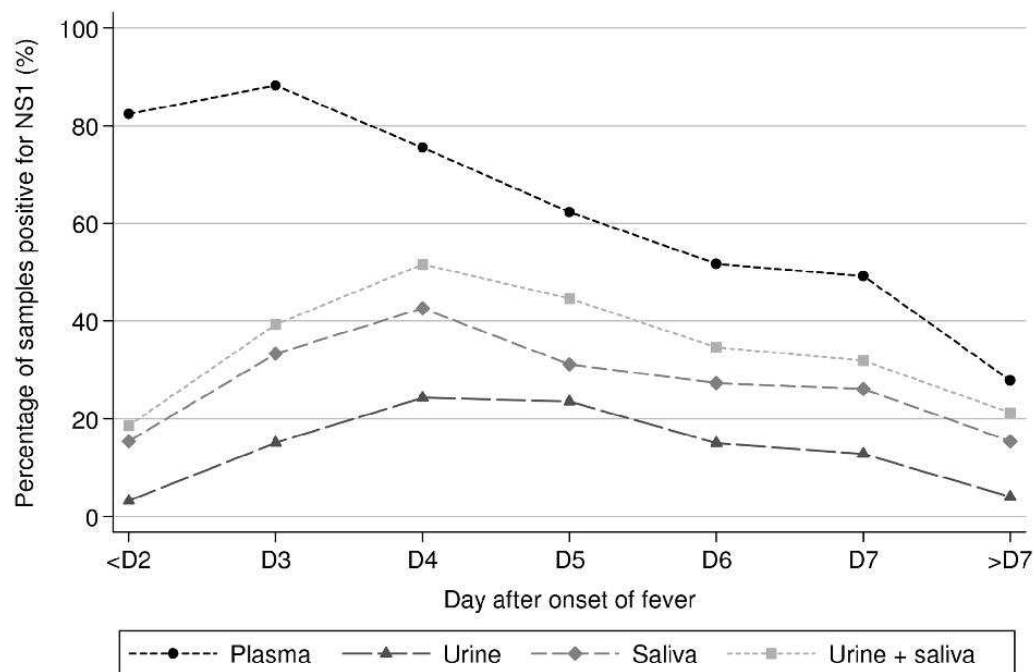
In total, 15 urine and 15 saliva samples that tested positive by qRT-PCR with a high viral load, i.e. between 3.5 and 5 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml, were inoculated onto C6/36 mosquito cells. Even after 3 passages, all cell cultures remained negative by immunofluorescence assay. DENV was isolated only from VTM, urine and saliva controls spiked with virus at a concentration equal to or greater than 4 log<sub>10</sub> cDNA copies/ml but not when the initial virus concentration was lower. No cell death was observed in the wells inoculated with the three different negative controls i.e., cell culture medium, dialyzed urine samples and saliva samples obtained from healthy donors.

### NS1 detection by capture ELISA

A total of 856 urine and 688 saliva samples obtained from 193 and 197 patients with confirmed dengue were tested. In total, 14.5% (n = 124, CI<sub>95</sub> = [12.2–17.0]) of the urine samples and 28.3% (n = 195, CI<sub>95</sub> = [25–31.9]) of the saliva samples tested positive by NS1 ELISA. By comparison, 63.4% (338/533, CI<sub>95</sub> = [59.2–67.5]) of all plasma samples obtained from hospitalized patients and included in this study tested positive for NS1 (S7 Table, S9 Table).

The positivity rates of NS1 antigen detection in plasma, urine and saliva samples by day of sampling after the onset of fever are presented in Fig 3 and S7 Table. The NS1 protein was detected in 15.4% of the saliva and in 3.2% of the urine specimens at the beginning of the disease. This percentage increased to reach a maximum of 42.6% in saliva samples and 24.3% in urine specimens at DAOF 4. The proportion of NS1-positive samples then decreased slowly





**Fig 3. Positivity rates of NS1 protein detection in plasma, urine and saliva.** Percentage of samples that tested positive for NS1 protein by capture ELISA in urine, saliva and plasma, by day of sampling after onset of fever (n = 193, 197 and 217 patients with a confirmed dengue infection included for NS1 detection in urine, saliva and plasma, respectively).

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.g003

until DAOF 10 and no sample tested positive after that time-point. In plasma, the proportion of samples that tested positive for NS1 was the highest (88.2%) at DAOF 3 and then progressively decreased over time. At DAOF 9, the last time-point at which the plasma specimens were tested, 22.2% of the samples tested positive by NS1 ELISA.

In total, 46.2% (91/197) and 37.8% (73/193) of the patients tested positive in NS1 capture ELISA in at least one of their saliva and urine samples. Among the 91 patients that had at least one NS1-positive saliva sample, the first specimen collected at admission tested positive in 67% (n = 61) of the cases. Among the 73 patients that had at least one of their urine samples that tested positive, only 41.1% (n = 30) had a positive urine sample at the time of hospital admission. Using the results obtained by testing the sequential biological samples collected throughout the hospitalization, the median first day of the NS1 detection in urine was determined for 30 patients at DAOF 5 (mean = 5.1), with a minimum at DAOF 3 and a maximum at DAOF 9. Based on a subset of 17 patients, we were able to establish that the median duration of NS1 antigen detection in the urine of a DENV-infected patient was 1 day (mean = 1.5), with a maximum of 3 days.

The NS1 antigen was detected in 70.9% (202/285), 27.4% (46/168) and 47.7% (73/153) of the plasma, urine and saliva specimens that also tested positive by qRT-PCR. The NS1 ELISA was also positive in 20.9% (9/43), 10.7% (21/196) and 20.7% (42/203) of the plasma, urine and saliva samples that tested negative by qRT-PCR.

NS1 ELISA was used to test a total of 314 plasma, urine and saliva samples obtained from the same patients at the same time-points, between DAOF 1 and DAOF 12. The results were positive in 69.4% (218/314, CI95 = [64.0–74.5]), 15.9% (50/314, CI95 = [12.1–20.4]) and 30.6% (96/314, CI95 = [25.5–36.0]) of the plasma, urine and saliva samples, respectively (Table 3). An overall diagnostic sensitivity of 34.4% (108/314, CI95 = [29.2–39.9]) was obtained by combining the NS1 results of urine and saliva. If saliva and urine samples were tested together instead of plasma, diagnostic sensitivity decreased to 16.7%, 34.9%, 49.5%, 32.2% and 10.9%, at day 0–1, 2–3, 4–5, 6–7 and during the second week after the onset of fever, respectively, while sensitivity in plasma was 83.3%, 91.6%, 79%, 55.9% and 29.1% at the same time-points. Each time a saliva or a urine sample tested positive, the NS1 antigen was also detected in the corresponding plasma specimen. All clinical specimens obtained from 20 patients hospitalized for a non-dengue febrile illness tested negative.

Between DAOF 1 and 10, the average concentration of NS1 protein detected in the clinical specimens was 889 ng/ml (min = 0.8 ng/ml and max = 8 µg/ml) in plasma, 7.2 ng/ml (min = 0.5 ng/ml and max = 60 ng/ml) in urine and 3.8 ng/ml (min = 0.5 ng/ml and max = 41.5 ng/ml) in saliva. The mean NS1 concentration in the plasma specimens increased from 800 ng/ml at DAOF 1–2 to reach a maximal mean concentration of 1.2 µg/ml at DAOF 5–6. It then decreased to reach a concentration of 400 ng/ml at DAOF 8–10 (S2 Fig). The mean NS1 concentration in urine was stable between DAOF3 and 5 (7 ng/ml) and increased at DAOF 6 (14 ng/ml) and DAOF 7 (26 ng/ml) (S2 Fig). No significant variation in NS1 concentration was observed over time in saliva samples (S2 Fig).

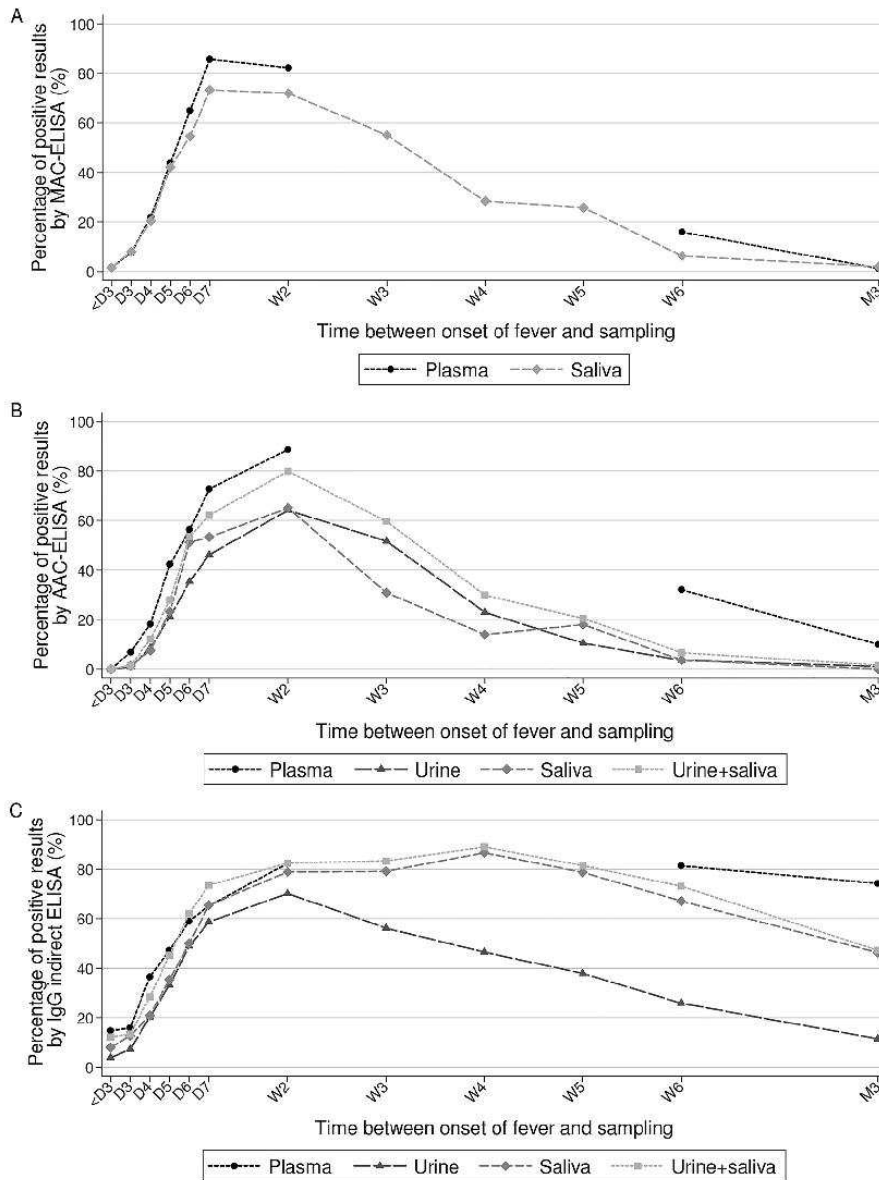
### Detection of anti-DENV antibodies

A total of 100 urine specimens were initially tested by MAC-ELISA and since all of them were negative we decided not to include additional samples to the evaluation panel. A total of 1493 and 1483 urine samples were used to evaluate the performances of the IgG and IgA ELISAs in this biological fluid. Out of the 1489 saliva samples available for serological evaluation, 1123, 1395 and 1101 were used for the IgG, IgM and IgA assays, respectively. A total of 766, 678 and 778 plasma samples were tested by indirect IgG ELISA, MAC-ELISA and AAC-ELISA, respectively.

Anti-DENV IgM were detected in 36% (244/678, CI95 = [32.4–39.7]) and 38.1% (531/1395, CI95 = [35.5–40.7]) of all the plasma and saliva samples, respectively, while none of the urine specimens (0/100) tested positive by MAC-ELISA. Overall 37.4% (291/778, CI95 = [34.0–40.9]) of the plasma, 26.8% (397/1483, CI95 = [24.5–29.1]) of the urine samples and 28.6% (315/1101, CI95 = [26.0–31.4]) of the saliva samples tested positive by AAC-ELISA. In total, 54.4% (417/766, CI95 = [50.8–58.0]) of the plasma samples, 38.5% (575/1493, CI95 = [36.0–41.0]) of the urine samples and 52.9% (594/1123, CI95 = [49.9–55.8]) of the saliva specimens tested positive by indirect IgG ELISA.

Fig 4 and S7 Table show the percentage of positive results obtained for anti-DENV IgM, IgA and IgG detection in urine, saliva and plasma samples according to DAOF. The positivity rates obtained for IgM, IgA and IgG antibodies detection in the saliva samples were slightly lower than the ones observed for these antibodies in plasma specimens, but both kinetics were in general very similar. MAC-ELISAs sensitivity increased until DAOF 7, to reach 86% and 73% in plasma and saliva, respectively. The sensitivity remained stable during the second week of the disease and then decreased gradually over the following weeks. Six weeks after the onset of the fever, 16% and 6% of the plasma and saliva samples tested positive. At three months, less than 2% of the plasma and saliva samples still contained detectable levels of anti-DENV IgM.





**Fig 4. Detection of anti-DENV antibodies in plasma, urine and saliva.** Percentage of samples that tested positive by MAC-ELISA (A), AAC-ELISA (B) and IgG indirect ELISA (C) in urine, saliva and plasma samples according to time after onset of fever (D for day, W for week and M for month).

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.g004

The profiles of the sensitivity kinetic curves for anti-DENV IgA were similar in plasma, urine and saliva specimens. The sensitivity increased until the second week after the onset of fever to reach a maximum of 90% in the plasma and 65% in both the urine and the saliva

specimens. The detection rates in urine and saliva then decreased and six weeks after the beginning of the infection only 3% of the urine and saliva samples still tested positive. The anti-DENV IgA antibody was detected in 30% and 10% of the plasma samples collected six weeks and three months after the onset of fever, respectively.

All of the three kinetic curves of the anti-DENV IgG antibodies detection also had a similar overall profile. The proportion of plasma samples that tested positive for IgG quickly increased after the onset of the disease and between the three last collection points the values varied only slightly from 82% at week 2 to 74% at month 3 after fever onset. The percentage of urine samples that tested positive for IgG during the first week was on average 11% lower compared to the percentage of plasma samples that were IgG-positive. Globally both kinetic curves followed the same trend. After a peak at 70.2% during the second week of the disease, the curve demonstrated a regular decrease. In total, 25.9% of the samples tested positive one month after the infection and only 10% after three months. The IgG detection rate in saliva increased continuously from the 1<sup>st</sup> day of fever until the second week when it reached a plateau around 80%. The sensitivity of the IgG test in saliva samples during the first two weeks of the disease was on average 7% lower compared to the sensitivity of the assay in plasma specimens. From week 5, the detection rate began to decrease and three months after the infection, 46% of the saliva samples remained positive for anti-DENV IgG.

A total of 514 matched plasma, urine and saliva samples collected between DAOF 1 and DAOF 103 were tested by AAC-ELISA. The results were positive in 39.9% (205/514, CI95 = [35.6–44.3]), 23.3% (120/514, CI95 = [19.8–27.2]) and 24.1% (124/514, CI95 = [20.5–28.1]) of the plasma, urine and saliva samples, respectively (Table 3). Concurrent testing of urine and saliva specimens by AAC-ELISA increased sensitivity by 6.7% and 5.9% compared to testing the urine or saliva samples alone and resulted in an overall decrease of the sensitivity to detect anti-DENV IgA by 10%, compared to AAC-ELISA in plasma (decrease by 2.3% for samples collected at day 2–3, by 7.5% at day 4–5, by 15.1% at day 6–7, by 7.3% during the 2<sup>nd</sup> week, by 25.8% six weeks after and by 5.5% three months after the onset of fever).

A total of 563 plasma, urine and saliva samples obtained from the same patients at the same time-points, between DAOF 1 and DAOF 103, were tested by IgG indirect ELISA. Anti-DENV IgG were detected in 56.8% (320/563, CI95 = [52.6–61.0]), 32.1% (181/563, CI95 = [28.3–36.2]) and 42.8% (241/563, CI95 = [38.7–47.0]) of the plasma, urine and saliva samples, respectively (Table 3). An overall detection rate of 49.7% (280/563, CI95 = [45.5–53.9]) was obtained by combining the IgG results of paired urine and saliva specimens. The difference between the sensitivity of the IgG test in plasma and in urine and saliva samples varied from a minimum of 9.1% (DAOF 2–3) and 3.4% (DAOF 2–3) to a maximum of 63.6% (month 3) and 30.6% (month 3), respectively. The difference between the sensitivity of the assay in plasma and the one obtained by combining results of paired urine and saliva was below 10% at all time-points (minimal difference: 0% at DAOF 6–7; maximal difference: 7.5% at DAOF 4–5), except at DAOF 0–1 and 3 months after the onset of fever when the difference reached 18.2% and 28.4%, respectively.

### BRT analyses

The BRT analyses demonstrated that the three explanatory variables (“daof”, “status” and “classif”) used in the study had a significant effect on the detection of DENV genome in plasma by qRT-PCR. The variable “daof” (number of days after the onset of fever) had the higher relative importance (RI = 57.4%), followed by the immunological status (primary or secondary infection) (RI = 25.8%) and then by the severity of the disease (RI = 16.8%) (Table 4). The partial dependence plots suggested that there was a higher probability of detecting DENV-RNA in

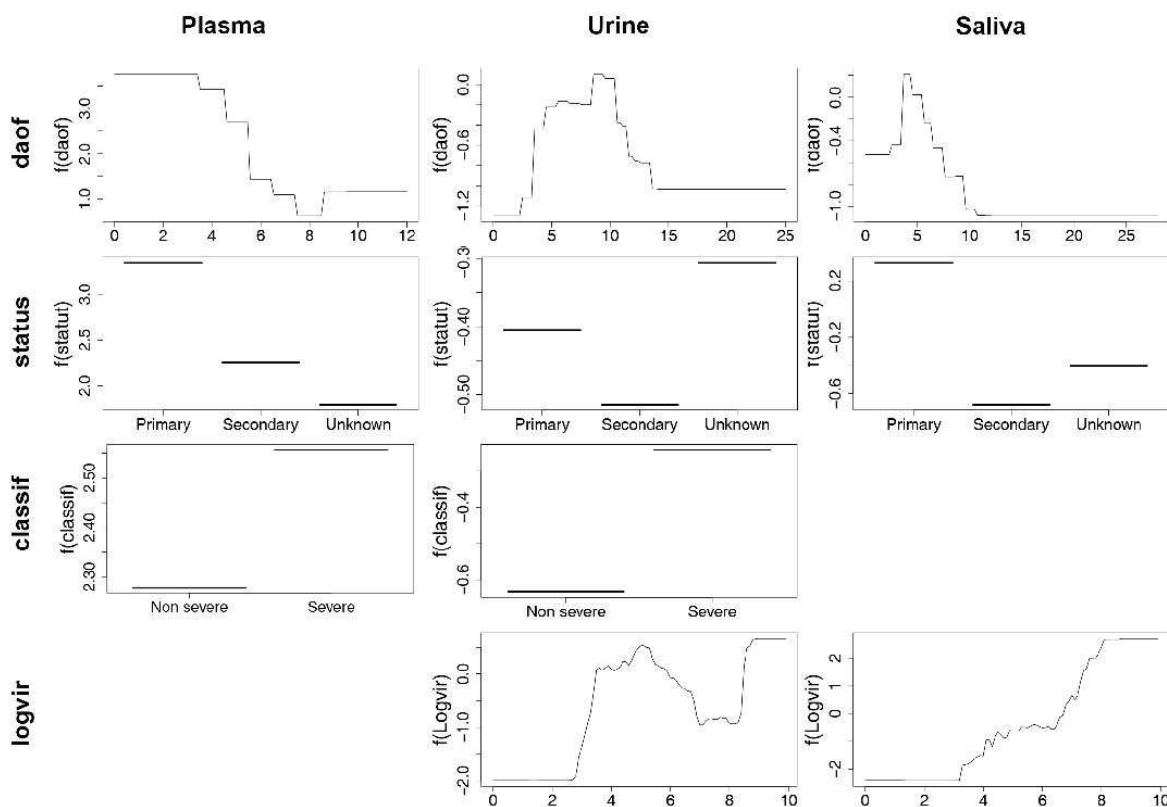
**Table 4. Results of the Boosted Regression Trees analysis for the detection of viral genome in plasma, urine and saliva.**

Sample	Mean Relative Importance (Standard deviation)				Mean AUC* (Standard deviation)
	daof	status	classif	logvir	
Plasma	57.36 (0.30)	25.80 (0.25)	16.84 (0.26)	-	0.853 (0.007)
Urine	26.79 (0.22)	14.44 (0.19)	6.18 (0.15)	52.60 (0.31)	0.720 (0.008)
Saliva	18.49 (0.20)	14.05 (0.12)	3.22 (0.10)	64.24 (0.26)	0.820 (0.005)

daof: number of days between the onset of the fever and the time of sampling  
 status: immune status of the patient (primary versus secondary infection) determined by HIA  
 classif: disease classification according to the 1997 and the 2009 WHO guidelines  
 logvir: viral load measured by qRT-PCR (log<sub>10</sub> cDNA copies/ml)  
 \*Estimate of the model performance

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.t004

the plasma specimens obtained during the early febrile phase of the infection, in the samples obtained from patients with a primary infection and in patients presenting with a severe form of the disease (Fig 5). Models with four variables (“daof”, “status”, “classif” and “logvir” [viral load in plasma]) were applied for the analysis of the qRT-PCR results in saliva and urine



**Fig 5. Partial dependence plots for the most influential variables explaining viral genome detection in plasma, urine and saliva.**

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.g005



**Table 5. Results of the Boosted Regression Trees analysis for the detection of NS1 antigen in plasma, urine and saliva.**

Sample	Mean Relative Importance (Standard deviation)					Mean AUC*(Standard deviation)
	daof	status	classif	IgG	logNS1	
Plasma	52.59 (0.19)	43.36 (0.30)	4.04 (0.23)	-	-	0.826 (0.004)
Plasma	8.02 (0.16)	-	2.71 (0.08)	89.27 (0.20)	-	0.895 (0.003)
Urine	25.38 (0.29)	7.67 (0.28)	2.32 (0.15)	-	64.63 (0.34)	0.751 (0.006)
Saliva	20.94 (0.75)	9.93 (0.50)	1.83 (0.24)	-	67.30 (0.13)	0.730 (0.004)

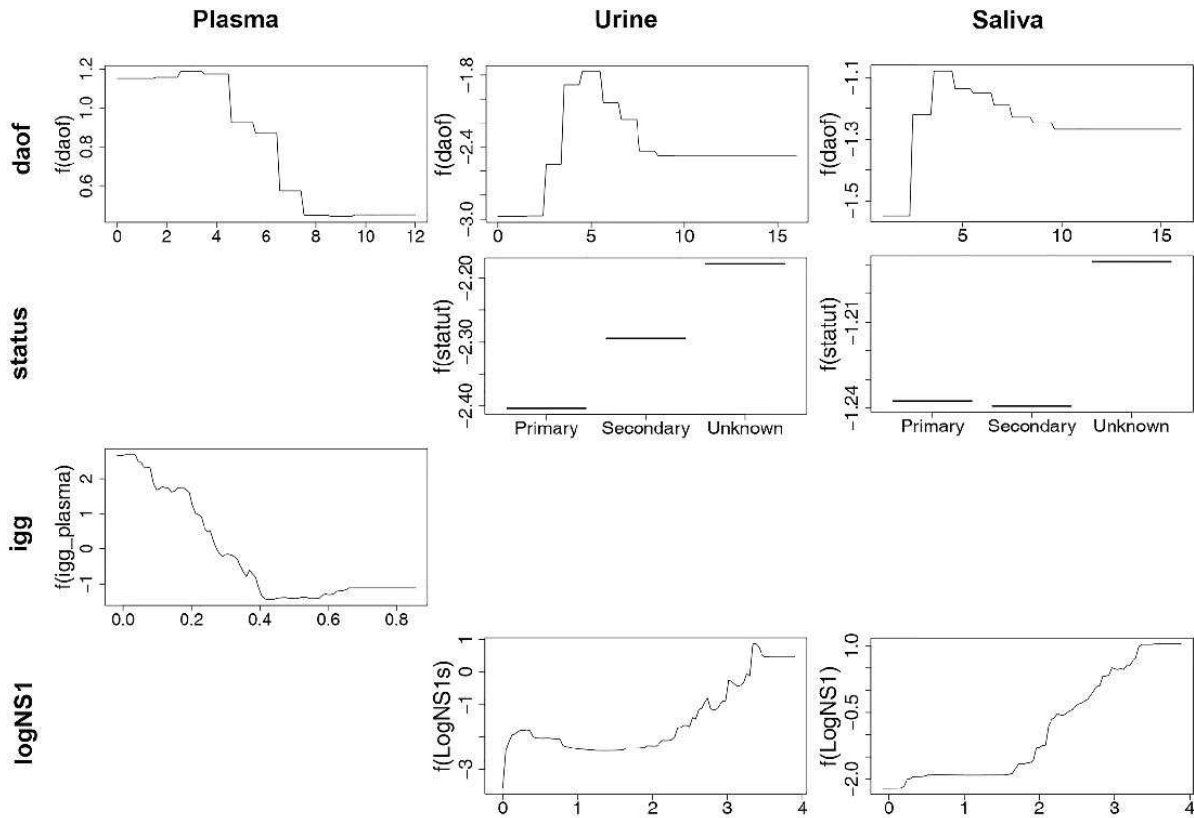
daof: number of day between onset of fever and sampling  
 status: immune status of the patient determined by HIA  
 classif: disease classification according to the 1997 and the 2009 WHO guidelines  
 IgG: anti-DENV IgG quantity in plasma estimated by optical density in indirect ELISA  
 logNS1: NS1 concentration in plasma (log10 ng/ml)  
 \*Estimate of the model performance

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.t005

samples. The variable “logvir” was the main explanatory variable (RI saliva = 64.2% and RI urine = 52.6%) in both models, followed by “daof” (RI saliva = 18.5% and RI urine = 26.8%) and “status” (RI saliva = 14.1% and RI urine = 14.4%) (Table 4). The model applied for saliva specimens demonstrated a positive association between the RNA load measured in plasma and the detection of the dengue genome in saliva. With the model used for urine specimens, a more complex relationship with two maxima was observed: the first one for a viral load between 4 and 6 log10 cDNA copies/ml and the second one for a viral load greater than 8 log10 cDNA copies/ml. The detection of the virus genome in saliva and urine samples was better during primary infections (Fig 5). The RI for the variable “classif” was only 3.2% and 6.2% in saliva and urine specimens, respectively (Table 4). The partial dependence plots suggested a slightly better detection of DENV-RNA in the urine of patients experiencing a severe form of the disease (Fig 5).

The best BRT model for NS1 detection in plasma was obtained by using the variables “daof”, “classif” and by replacing the variable “status” by the continuous variable “IgG” (level of IgG antibodies in the plasma specimens estimated by the ELISA OD value). The relative importance of the variable “IgG” was 89.3% and the partial dependence plot demonstrated a nearly linear decreasing association with the detection of NS1 protein (Table 5, Fig 6). The variables “daof” and “classif” had a RI of 8.0% and 2.7%, respectively. The severity of the disease (variable “classif”) can be considered as having a negligible effect on the detection of the NS1 protein in the plasma samples. The BRT models used for NS1 antigen detection in saliva and urine specimens were built with the variables “daof”, “status”, “classif” and “logNS1” (NS1 protein concentration in plasma). The higher RI in both models was obtained for the continuous variable “logNS1” (RI = 67.3% and 64.6% for the saliva and urine models, respectively) (Table 5). The partial dependence plots demonstrated a positive association between NS1 protein concentration in plasma samples and detection of NS1 antigen in saliva and urine specimens (Fig 6). The second main explanatory variable identified was “daof” (RI = 20.9% and 25.4% for the saliva and the urine models, respectively) with an optimal detection of the NS1 protein being between the 3<sup>rd</sup> and the 8<sup>th</sup> day after the onset of fever, in both the saliva and the urine samples (Table 5, Fig 6). The contribution to the models of the variables “status” and “classif” was very low (Table 5).

In all of the BRT models generated for anti-DENV antibodies detection in the three different body fluids, the impact of the explanatory variable “classif” (severe versus non-severe dengue) was negligible. The detection of IgG in plasma specimens was explained by the variables



**Fig 6. Partial dependence plots for the most influential variables explaining NS1 antigen detection in plasma, urine and saliva.**

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.g006

“daof” and “status” with a close relative importance (47.2% and 49.3%, respectively) (Table 6). The partial dependence plots showed that the detection of IgG in plasma was associated with secondary infection and that IgG antibodies were detected from one week until the end of the follow-up period (Fig 7). For the detection of IgM in plasma specimens, the variable “daof” appeared to be the only explanatory variable and was associated with a RI of 95.4%. The RIs of the variables “status” and “classif” were negligible at 3.3% and 1.4% (Table 6). The detection of anti-DENV IgA antibodies in plasma samples was mainly explained by the variable “daof” (RI = 69.8%) and was the highest between one and four weeks after the onset of fever (Table 6, Fig 7). The immune status of the patient (secondary infection) also contributed to explain the ability to detect IgA antibodies (RI = 26.2%) (Table 6, Fig 7). The detection of antibodies in saliva samples was linked mainly to the level of the corresponding class of immunoglobulin in plasma (IgG detection: RI = 50.8%; IgM detection: RI = 68.5%; IgA detection: RI = 58.4%). Similarly, the detection of IgA antibody in urine samples correlated with the titer of IgA in plasma (RI = 60.2%). The relative importance of plasmatic IgG level appeared to be only 20.3% for the detection of IgG in urine specimens. The main variables associated with the presence of IgG in urine samples were the immunological status (RI = 42.1% in secondary infections) and the date of sampling (RI = 36%) (Table 6, Fig 7).

**Table 6. Results of the Boosted Regression Trees analysis for the detection of anti-DENV antibodies in plasma, urine and saliva.**

Antibody	Sample	Mean Relative Importance (Standard deviation)				Mean AUC*(Standard deviation)
		daof	status	classif	antibodies	
IgG	Plasma	47.26 (0.10)	49.31 (0.12)	3.43 (0.06)	-	0.910 (0.002)
	Urine	36.00 (0.12)	42.05 (0.18)	1.66 (0.03)	20.29 (0.16)	0.895 (0.001)
	Saliva	23.49 (0.14)	24.42 (0.14)	1.33 (0.04)	50.76 (0.23)	0.908 (0.002)
IgM	Plasma	95.37 (0.28)	3.26 (0.27)	1.37 (0.11)	-	0.883 (0.003)
	Saliva	26.49 (0.13)	4.62 (0.08)	0.39 (0.03)	68.51 (0.17)	0.878 (0.002)
IgA	Plasma	69.76 (0.20)	26.24 (0.09)	4.00 (0.17)	-	0.907 (0.002)
	Urine	23.68 (0.03)	15.59 (0.10)	0.55 (0.07)	60.18 (0.10)	0.904 (0.002)
	Saliva	26.94 (0.11)	11.54 (0.06)	3.08 (0.05)	58.44 (0.135)	0.899 (0.002)

daof: number of days between the onset of the fever and the day of sampling

status: immune status of the patient determined by HIA (primary versus secondary infection)

classif: severity of the disease according to the 1997 and the 2009 WHO guidelines

antibodies: level of the corresponding immunoglobulin isotype in the plasma estimated by the measure by ELISA of the optical density

\*Estimate of the model performance

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.t006

Two BRT models were used to identify factors influencing NS1 concentration (NS1 model, variable “logns1”) and the RNA load (RNA model, variable “logvir”) in plasma samples during the acute febrile phase of the disease (DAOF 0–5). Both models were built with the explanatory variables “daof”, “classif” and “igg”. In both models the higher RI was obtained for the variable “igg” (RI = 85.2% and 77.3% for the NS1 and the viral RNA models, respectively), followed by the variable “daof” (RI = 8.5% and 20.9% for the NS1 and the viral RNA models, respectively) and the variable “classif” (RI = 6.3% and 1.8% for the NS1 and viral RNA models, respectively) (S8 Table). The partial dependence plot analysis demonstrated that higher NS1 concentrations and RNA loads were associated with very low level of anti-DENV IgG (OD<0.15) (S3 Fig).

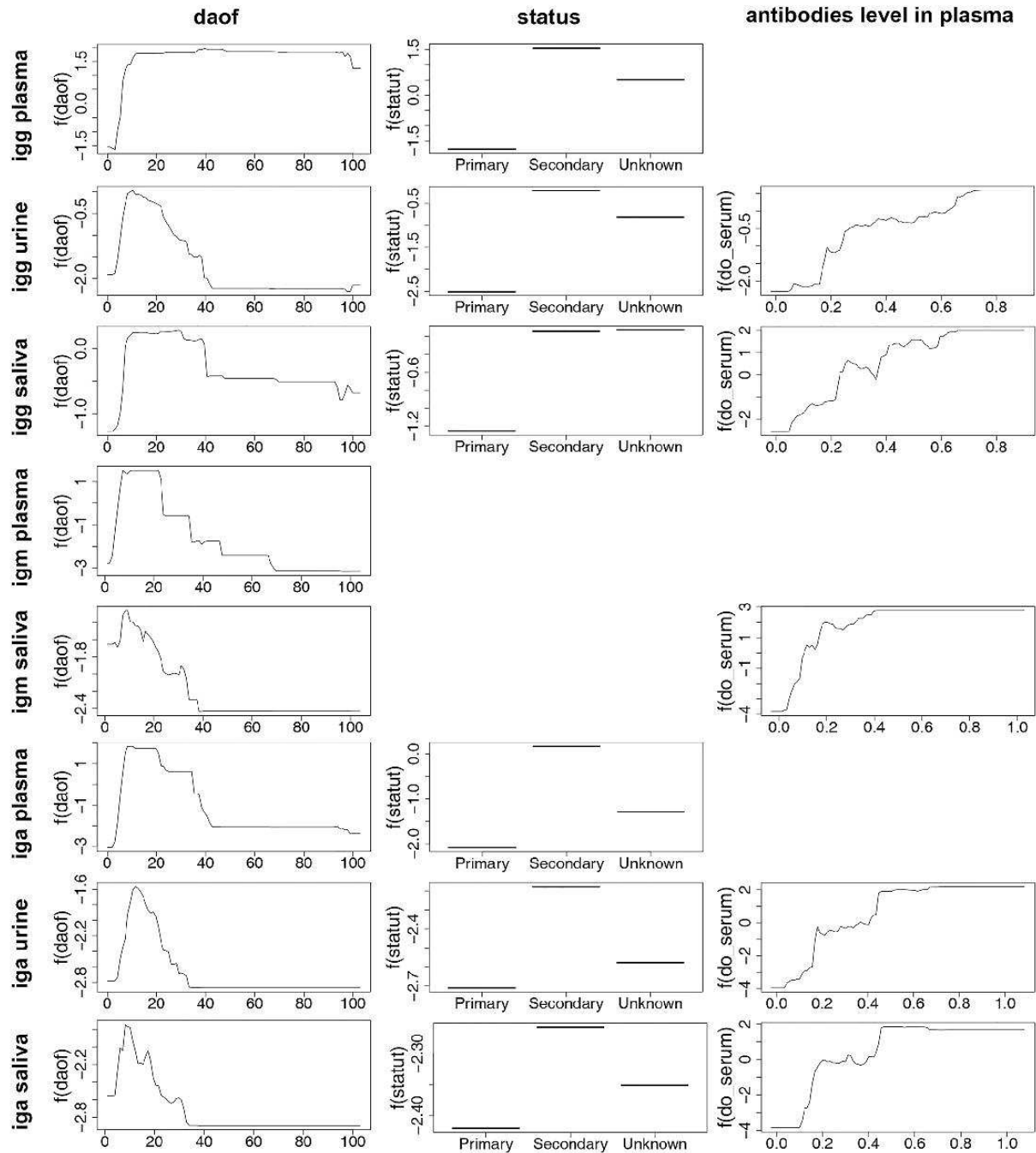
## Discussion

One of the objectives of this study was to assess the possibility to use saliva or urine specimens instead of blood for the diagnosis of dengue infections in specific situations. The evaluation included the assays most routinely used for dengue diagnosis: viral genome detection by qRT-PCR, virus isolation in mosquito cell lines, NS1 antigen and anti-DENV antibody detection by ELISA methods. In order to generate the strongest data possible, a large number of samples obtained from children hospitalized in Cambodia for dengue of varying degrees of severity were tested. This is the first study in which plasma, urine and saliva obtained from the same patients, at the same time-points, were tested in parallel and the results compared to estimate the performances of the various dengue diagnostic assays.

Saliva and urine specimens are obtained through non-invasive procedures that require the patient’s participation. If devices for urine sampling in infants exist and if saliva can be collected with small specific swabs, one may consider that in the youngest children the collection of capillary blood on filter paper after a finger-prick could be a better alternative to venipuncture than urine or saliva sampling.

This is the first study that aimed to detect the DENV genome in such a large number of saliva samples and to comprehensively describe the kinetics of DENV genome detection in this body fluid. Previously, Anders *et al.* attempted to detect the DENV genome in saliva swab specimens obtained from six patients with confirmed DENV infection but all samples tested





**Fig 7. Partial dependence plots for the most influential variables explaining anti-DENV antibodies detection in plasma, urine and saliva.**

doi:10.1371/journal.pntd.0004100.g007

negative [26]. The DENV genome was successfully detected from saliva samples in only few instances and described in some cases reports [20,23] as well as in one very recent study performed on only 14 patients [19]. We demonstrated here that, as in the plasma, the sensitivity of the genome detection in saliva specimens was the highest during the early acute phase of the infection (i.e., 63.9% at day 3 post-fever; approximately 60% during the four first days of the disease) and then decreased over time before the RNA became undetectable 10 days after the onset of fever. The curves of the sensitivity of the RNA detection in plasma and saliva specimens had very similar profiles over time. Nevertheless, the sensitivity of the qRT-PCR in saliva was on average 40% lower than in plasma when the specimens were tested between DAOF0 and DAOF8. The BRT analysis indicated that the higher the RNA load in plasma, the higher the probability of detecting the viral RNA in saliva samples was.

Some authors showed in a limited number of patients and samples that the DENV genome could be detected in urine specimens [19,20,22–24]. Hirayama *et al.* described the results obtained with 77 urine samples collected from 53 patients and described DENV genome excretion kinetics similar to the one we report here, i.e. a delayed excretion of the viral genome in urine by comparison to blood [22]. In some cases, the DENV genome was still detectable in urine samples while the serum already turned negative by qRT-PCR [20,22,24]. In our study, we observed this pattern in three patients whose plasma collected at the time of hospital discharge (up to 10 days after onset of fever) tested negative, whereas their urine collected at the same time was positive. The sensitivity of the confirmation of the dengue infection by viral genome detection improved from 79.6% to 82.6% when qRT-PCR was performed in both urine and plasma samples collected after the 5<sup>th</sup> day of fever, compared to qRT-PCR in plasma alone. Nevertheless, even after DAOF 5, plasma remained the best biological fluid to use for dengue diagnosis. Indeed, out of the 116 pairs of urine and plasma samples collected during the early convalescent phase of the disease from the same patients, 63.8% were concordant (i.e., both urine and plasma samples tested positive or both urine and plasma samples tested negative). Only three pairs demonstrated discordant results with an advantage for urine over plasma whereas 39 pairs gave discordant results in favor of plasma (i.e. the urine sample tested negative whereas the corresponding plasma sample tested positive). After discharge from the hospital, the urine sample of three other patients still tested positive (two patients at DAOF 13 and one patient at DAOF 16) but the comparison with plasma was not possible as blood samples were unavailable for these time points. All patients whose saliva samples tested positive also had detectable levels of RNA in the plasma samples collected at the same time-points. Thus, testing saliva in addition to the plasma samples did not significantly improve diagnostic sensitivity. When it is not possible to get blood samples, testing concurrently both urine and saliva specimens by qRT-PCR could offer an interesting alternative as the overall diagnostic sensitivity was 76.1% during the acute phase of the disease (DAOF 0–5) and 59.4% during the early convalescent phase (DAOF 6–12). Alternatively, the analysis of sequential urine or saliva specimens could also provide, in specific situations, some acceptable results as 57% of the patients had at least one positive urine sample and almost 69% of them had a least one saliva sample that tested positive in the course of the disease.

To date, DENV has never been isolated from urine or saliva. Two unsuccessful attempts to isolate the DENV from urine and one attempt to isolate the virus from saliva were previously reported by Hirayama *et al.* and Korhonen *et al.* [19,22]. The low RNA loads in urine and saliva observed in our study could provide one explanation to the inability to isolate the virus after inoculation of the samples onto C6/36 or Vero E6 cells [39]. Nevertheless, the absence of infectious DENV particles from urine and saliva specimens will be attested only after unsuccessful inoculation of the RNA-positive samples into mosquitoes, as this method is recognized as the most sensitive for DENV isolation [40]. Direct toxicity on C6/36 or Vero E6 cells of some urine



and saliva components could also explain the inability to isolate the virus from those samples. In our study, urine samples were dialyzed before inoculation in order to eliminate potentially toxic components and saliva samples were inoculated after dilution with culture media to avoid excessive direct toxicity. Furthermore, the controls included in the series of culture plates provided evidence that a premature cell death was not responsible for the absence of virus detection. It rather appeared that a low viral load was at the origin of an absence of detection of infectious virus in saliva and urine specimens. But it is also possible that the DENV RNA detected by qRT-PCR in urine was “free” viral RNA that was able to go through the glomeruli while virus particles, especially those embedded in large immune complexes, were stopped.

The detection of NS1 protein in saliva and/or urine samples has already been reported in three studies bearing on a limited number of patients [19,21,26] and recently in a larger study including urine samples from 96 patients [41]. Here, we demonstrate that the sensitivity of NS1 detection in saliva and urine samples follow a similar trend over time. Diagnostic sensitivity increased progressively until DAOF 4 to reach a maximum of 25% in urine and 40% in saliva samples, and then decreased until NS1 became undetectable, ten days after fever onset. The sensitivity NS1 antigen detection in urine and saliva samples observed in our study was lower than the one reported previously. Anders *et al.* reported 64.7% (55/85) of saliva samples positive for NS1 protein when testing patients with a positive NS1 antigenemia [26]. In our study, only 25.8% (99/383) of the paired plasma and saliva samples tested both positive, at the same time-point. Chuansumrit *et al.*, Korhonen *et al.* and Saito *et al.* previously evaluated the sensitivity of NS1 detection in urine using the same commercial ELISA kit. Chuansumrit *et al.* and Korhonen *et al.* reported sensitivities of 65.6% and 54.2%, respectively [19,21]. Saito *et al.* described a positive detection rate of NS1 ranging from 13% to 43% according to days after disease onset. The highest detection rate was obtained on days 6–10 after disease onset [41]. As observed for the RNA load, NS1 protein concentrations measured in urine and saliva samples were much lower than those measured in plasma specimens. The multivariate analysis using BRT identified the NS1 concentration in plasma as the main factor explaining the possibility of detecting the viral protein in urine and saliva. Korhonen *et al.* also showed that the NS1 concentration in urine positively correlated with the concentration in urine of the total proteins [19]. In their study, Chuansumrit *et al.* reported a higher NS1 detection rate in urine samples obtained from patients with DHF than in patients presenting with a mild DF [21]. Our statistical analysis performed in a large patient series did not evidence a higher probability of detecting NS1 in the urine of patients experiencing a severe form of the disease (DHF and DSS) than in those presenting with a mild infection. We decided not to concentrate urine specimens before testing for NS1 in order to keep the ELISA protocol as easy and cheap as possible to meet the “real-life” conditions of most endemic countries which are also often developing countries. Saito *et al.* investigated the benefit of urine concentration prior to NS1 capture by ELISA with 37 paired concentrated and non-concentrated urine samples. Concentration allowed the detection of NS1 antigen in three samples that tested negative before concentration [41]. For well-equipped laboratories that may be willing to use urine as a replacement to blood for DENV infection confirmation, it would be important to further develop of a fast and simple method for NS1 protein concentration.

Our study also shows that 2/3 of the plasma samples that tested positive by qRT-PCR also tested positive for NS1 detection; that half of the saliva samples that tested positive by qRT-PCR also tested positive by NS1 capture ELISA, but that NS1 was detected in less than 30% of the urine samples that tested positive by qRT-PCR. The discrepancy between the RNA and NS1 detection in urine samples obtained from patients with detectable viremia suggests that these two biological markers of dengue infection are potentially released in urine through different mechanisms that remain to be clarified.

Similarly to Vasquez *et al.*, we were unable to detect anti-DENV IgM in urine specimens [25]. The sensitivity of the IgM and the IgG assays in saliva was close to those obtained in plasma samples. The sensitivity of the IgA serology in both urine and saliva was 65% at the peak point when it was almost 90% in plasma. This is in agreement with the data previously described by Vasquez *et al.* as well as by Balmaseda *et al.* [25,27,42]. Multivariate analysis demonstrated that the probability of detecting antibodies in saliva specimens depended essentially on antibodies titers in the plasma. Cuzzubbo *et al.* reported previously that salivary IgG levels correlated well with serum HI titer [43]. This study also showed that IgG detection in saliva could be used to distinguish between primary and secondary DENV infection. Our BRT analysis confirms this result. Balmaseda *et al.* investigated the use of IgG and IgM detection in saliva to evaluate DENV infection incidence during a serological survey and demonstrated that anti-DENV IgG detection in saliva was a good tool to measure the incidence of dengue in a community cohort [27]. The anti-DENV IgG antibody urinary excretion curve follows the same trend than that of IgG in plasma during the first week of the disease. Subsequently, urinary excretion of IgG decreases over time while it remains stable in plasma. Three months after disease onset, 76.1% of the patients had detectable anti-DENV IgG in their plasma whereas only 12.5% of them still tested positive in their urine. The present study is the first to document the kinetics of anti-DENV antibodies until the third month after fever onset. Multivariate analysis showed that the detection of anti-DENV IgG in urine was not primarily associated with antibody titers in plasma but with the immune status of the patient and with the time of sampling after the onset of the disease. Antibodies are high-molecular-weight (HMW) proteins. In physiologic conditions, these proteins are almost completely restricted from filtration by the glomerular barrier and only a very small quantity of it can normally be detected in urine. The presence of macromolecules such as IgG and IgA in urine could reflect an alteration of the glomerular barrier, with or without tubular cells impairment. IgM is a pentameric immunoglobulin of very high molecular weight (950 kDa) and its detection in urine would reflect a severe glomerular injury [44]. This probably explains why IgM were not detected in the patients included in this study as none of them had any record of severe renal impairment during the course of their illness.

In this study, as in most of those reported previously, saliva specimens were collected by direct spitting. Only Anders *et al.* collected saliva using swabs and reported results significantly different from ours [26]. These authors were unable to detect DENV genome by RT-PCR but obtained a higher sensitivity for NS1 (i.e., 64.7%). Michishige *et al.* demonstrated that saliva samples collected by different methods of sampling were not equivalent in terms of total proteins and secretory IgA concentrations [45]. These different methods of saliva sampling should be compared in order to better define which one is the most suitable to perform each test.

The early identification of an ongoing DENV infection and a rapid implementation of specific clinical management procedures are key to ensure the best clinical outcome [1]. The current lack of simple and reliable prognostic marker to predict the risk of evolution of the patient towards a severe form of the disease makes the clinical management of the DENV infections extremely challenging, especially during epidemics and in countries with weak health systems. Among all the parameters evaluated within this study, the NS1 protein would theoretically be the ideal candidate for early diagnosis as this antigen is a marker of acute dengue infection that is easy and fast to detect. Anti-DENV antibodies usually appear only after the patient has already progressed toward the critical phase of infection. Conflicting results have been reported on a possible association between the concentration of free NS1 circulating in plasma and the disease severity. Although several studies reported a positive association [46,47], other studies have not [48–50]. In our study, which included a large number of patients experiencing primary and secondary infections, the multivariate analysis using BRT suggested that disease



severity does not influence NS1 concentration in plasma during the acute phase of the disease but that plasmatic titers of anti-DENV IgG was the most important factor to explain free NS1 protein concentration in blood. Indeed, undetectable or very low levels of anti-DENV IgG antibodies were associated with higher concentrations of free NS1, the only fraction that is detected by the assays, while the NS1 fraction that is trapped into the immune-complexes is not captured in the diagnostic tests.

A potential association between the DENV-RNA load measured during the acute phase of the disease and disease severity has also been suggested, but the scientific literature reports conflicting findings [46,48,51,52]. Our BRT analysis suggests that the severity of infection was not associated to the RNA load in plasma during the acute phase of the disease (DAO of 0–5). The level of anti-DENV IgG was the main parameter explaining the RNA load in the plasma specimens during the acute phase of the disease, with an inverse relationship like the one observed for NS1. The present report is the first to investigate the relationship between the NS1 concentration and the RNA load in plasma and the severity of the disease by using a multivariate analysis that included the anti-DENV IgG level. These findings require to be confirmed during other epidemics involving more patients and other infecting serotypes as this factor may affect both the RNA load and the NS1 concentration [53,51].

Our study shows that urine and saliva could be considered for the diagnosis of dengue infection in some situations when optimal sensitivity is not necessarily required. These two body fluids provide different type of information. The saliva essentially mirrors what happens in the blood, which is not surprising as approximately 2.5% of the whole saliva is composed of gingival fluid, a protein-rich serum transudate, therefore reflecting the protein pattern in the serum. Antibodies titers in saliva are thus a few orders of magnitude lower compared to those in serum [54]. It was estimated that the IgA, IgG and IgM levels in saliva specimens were approximately 1/10, 1/800 and 1/400 of those measured in serum [55]. In urine, the detection of macromolecules such as IgGs (150 kDa), IgAs (320 kDa) and NS1 protein (300 kDa) most likely reflects an alteration of the glomerular filtration barrier which has three major components: the glomerular endothelial cells (GECs), the glomerular basement membrane and the podocytes. One of the characteristics of GECs is the presence of numerous fenestrations, which in theory should allow the passage of large molecules. GECs, however, are coated by a glycocalyx layer composed of glycosaminoglycans, which in normal conditions impedes the leakage of macromolecules. Abnormal disruption of the glycocalyx restores the passage of big molecules through the fenestration of the GECs [56]. High-molecular-weight proteins cannot pass through the podocytes barrier in normal conditions, but the accumulation of such macromolecules probably induces an alteration of this structure, which in turn leads to a proteinuria [57]. It has been suggested that during dengue infection, impairment of the glycocalyx layer on endothelial cells could occur. Both the virus itself and the NS1 antigen are known to fix heparan sulfate, a major glycosaminoglycan of the glycocalyx [58,59]. Moreover Wills *et al.* observed an increased urinary heparan sulfate excretion in children with severe dengue infection compared to healthy control subjects, suggesting that an alteration of the glycocalyx layer may occur in severe dengue infections [60]. The presence of circulating immune complexes formed to eliminate the virus and the NS1 antigen may provide another possible explanation to the alteration of the glomerular barrier. Cases of glomerulonephritis with glomerular immune complex-type deposits have been reported during DENV infections [61]. Jessie *et al.* also described the presence of viral antigen suggestive of the presence of immune complexes in the kidney tubular cells from dengue-infected patients [62]. Further investigations are needed on the potential interactions of dengue virus, immune complexes, and other components of the immune response with heparan sulfate and other glycosaminoglycan of the glycocalyx but

also with the other kidney cells to determine if subclinical kidney lesions do not occur more often during DENV infection.

In this study we were not able to evaluate the performances of the different diagnostic methods for all four dengue virus serotypes as it was conducted using well-characterized and sequential clinical samples prospectively collected during a DENV-1 epidemic, when the DENV-2 and DENV-4 were circulating at lower level and no DENV-3 was detected.

The results of our study demonstrate that the diagnosis of dengue infection in urine and saliva specimens is possible but we believe that there is certainly still a room for improvement of these assays. Existing commercial rapid diagnostic tests (RDTs) designed to be used with blood samples would probably require significant adjustments, as urine and saliva specimens are very different from whole blood, plasma or serum. One of the main differences resides in the huge difference in protein concentration. A Singaporean group has recently developed a rapid test for the detection of anti-DENV IgG in saliva. The device gave good results in saliva samples spiked with IgG but requires further optimization to detect IgG from the clinical samples of dengue-infected patients [63]. Recently, saliva samples were tested using a commercial ELISA initially developed for IgG detection in blood and demonstrated 100% sensitivity and specificity [64].

In conclusion, although the performances of the different diagnostic methods evaluated here were not as good in saliva and urine as in plasma, results obtained with qRT-PCR and with antibody detection could justify the use of these two body fluids for the diagnosis of dengue infection for instances such as outbreak investigations or in young children (once they are old enough to comply to instructions), in addition to the situations when blood cannot be easily collected (e.g., lack of phlebotomist, refusal of the procedure, etc.). The disadvantage resulting from a slight decrease in the diagnostic confirmation performances when using molecular and serological tests in urine and saliva samples instead of blood is partially balanced by the ease to obtain these specimens and by the better compliance of the patient or by the number of individuals that can be investigated during studies when non-invasive sample collection methods are used. Moreover, the modest sensitivity of the test can be offset by high prevalence during the peak of an outbreak and/or when guided by competent clinicians. It results in high predictive positive value, making this test a useful addition for biological diagnosis in field conditions.

## Supporting Information

### S1 Checklist. STARD checklist.

(DOCX)

### S1 Fig. Validation of the cut-off values of the saliva-based MAC-ELISA (A), AAC-ELISA (B), the urine-based AAC-ELISA (C), the saliva-based IgG indirect ELISA (D) and the urine-based IgG indirect ELISA (E).

(PDF)

### S2 Fig. Mean NS1 concentration measured by capture ELISA in plasma, urine and saliva.

(PDF)

### S3 Fig. Partial dependence plots for the most influential variables explaining NS1 concentration and RNA load in plasma.

(PDF)

**S1 Table. Detailed protocols used in the NS1 capture ELISAs designed for plasma, urine and saliva specimens testing.**

(DOC)

**S2 Table. Protocols of the plasma-, urine- and saliva-based anti-DENV IgM capture ELISAs (MAC-ELISAs).**

(DOC)

**S3 Table. Protocols of the plasma-, urine- and saliva-based anti-DENV IgA capture ELISAs (AAC-ELISAs).**

(DOC)

**S4 Table. Intra-assay precision of the different ELISAs used in the study.**

(DOC)

**S5 Table. Inter-assay precision of the different ELISAs used in the study.**

(DOC)

**S6 Table. Protocols of the plasma-, urine- and saliva-based Indirect ELISAs for anti-DENV IgG detection.**

(DOC)

**S7 Table. Detection rate of viral genome, NS1 protein, anti-DENV antibodies in plasma, urine and saliva by time of sampling after onset of fever.**

(DOC)

**S8 Table. Results of the Boosted Regression Trees analysis for factors associated with NS1 concentration and viral RNA load.**

(DOC)

**S9 Table. Raw data.**

(XLSX)

## Acknowledgments

We would like to thank the patients, nurses and doctors who participated in this study at Kampong Cham reference hospital and at the 2 district hospitals of Tbong Khmum and Prey Chhor. We also thank the field teams of the Epidemiology Unit of Institut Pasteur of Cambodia who went all over Kampong Cham province to collect the clinical specimens during the patient's follow-up after hospital discharge.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ACA VD AS AT PB. Performed the experiments: ACA VD SR SO. Analyzed the data: ACA VD SL JC PH AT PB. Contributed reagents/materials/analysis tools: ACA VD SL KSK PLT SO RH MF AS AT PB. Wrote the paper: ACA VD JC PH MF AS AT PB.

## References

1. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. New ed. Geneva: TDR : World Health Organization; 2009.
2. Normile D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. *Science*. 2013; 342: 415–415. doi: [10.1126/science.342.6157.415](https://doi.org/10.1126/science.342.6157.415) PMID: [24159024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24159024/)



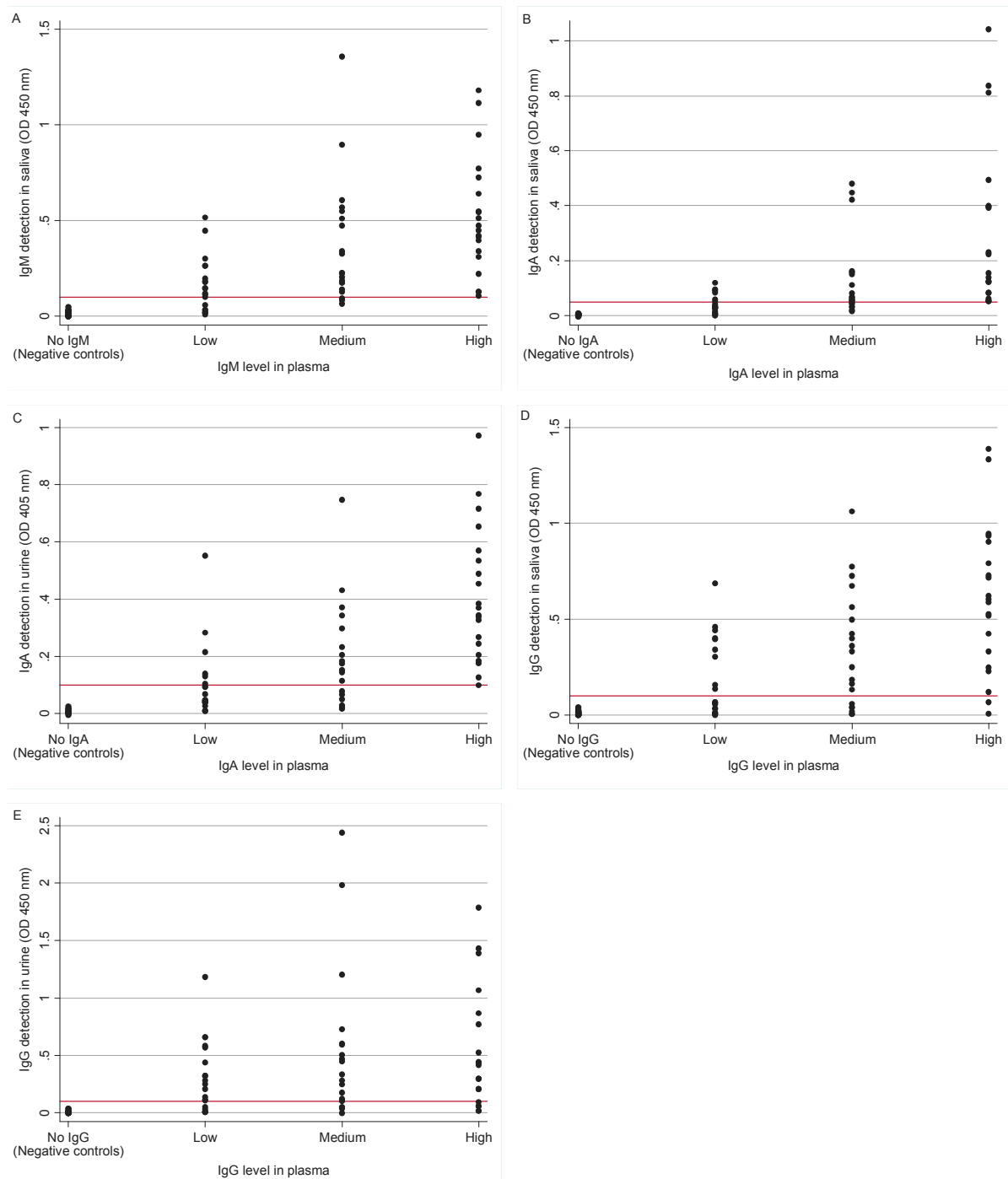
3. Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health*. 2011; 39: 3–11. doi: [10.2149/tmh.2011-S05](https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05)
4. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496: 504–507. doi: [10.1038/nature12060](https://doi.org/10.1038/nature12060) PMID: [23563266](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563266/)
5. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 1053–1057. PMID: [10698995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10698995/)
6. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 376–381. PMID: [11825945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11825945/)
7. Perry KR, Parry JV, Vandervelde EM, Mortimer PP. The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to hepatitis A and hepatitis B core antigens. *J Med Virol*. 1992; 38: 265–270. PMID: [1474376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1474376/)
8. Terada K, Niizuma T, Kataoka N, Niitani Y. Testing for rubella-specific IgG antibody in urine. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19: 104–108. PMID: [10693994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10693994/)
9. Frerichs RR, Silarug N, Eskes N, Pagcharoenpol P, Rodklai A, Thangsupachai S, et al. Saliva-based HIV-antibody testing in Thailand. *AIDS Lond Engl*. 1994; 8: 885–894.
10. Elsana S, Sikuler E, Yaari A, Shemer-Avni Y, Abu-Shakra M, Buskila D, et al. HCV antibodies in saliva and urine. *J Med Virol*. 1998; 55: 24–27. PMID: [9580882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9580882/)
11. Joshi MS, Chitambar SD, Arankalle VA, Chadha MS. Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis a. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9: 840–845. PMID: [12093683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12093683/)
12. Numata N, Ohori H, Hayakawa Y, Saitoh Y, Tsunoda A, Kanno A. Demonstration of hepatitis C virus genome in saliva and urine of patients with type C hepatitis: usefulness of the single round polymerase chain reaction method for detection of the HCV genome. *J Med Virol*. 1993; 41: 120–128. PMID: [8283173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8283173/)
13. Luo W, Masciotra S, Delaney KP, Charurat M, Croxton T, Constantine N, et al. Comparison of HIV oral fluid and plasma antibody results during early infection in a longitudinal Nigerian cohort. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2013; 58 Suppl 1: e113–118. doi: [10.1016/j.jcv.2013.08.017](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.08.017)
14. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis*. 2013; 208: 1086–1092. doi: [10.1093/infdis/jit290](https://doi.org/10.1093/infdis/jit290) PMID: [23821721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23821721/)
15. Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21: 84–86. doi: [10.3201/eid2101.140894](https://doi.org/10.3201/eid2101.140894) PMID: [25530324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25530324/)
16. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Sinigaglia A, Ulbert S, et al. Isolation of West Nile virus from urine of patients with acute infection. *J Clin Microbiol*. 2014; doi: [10.1128/JCM.01328-14](https://doi.org/10.1128/JCM.01328-14)
17. Papa A, Testa T, Papadopoulou E. Detection of West Nile virus lineage 2 in the urine of acute human infections. *J Med Virol*. 2014; doi: [10.1002/jmv.23949](https://doi.org/10.1002/jmv.23949)
18. Fonseca K, Meatherall B, Zarra D, Drobot M, MacDonald J, Pabbaraju K, et al. First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 91: 1035–1038. doi: [10.4269/ajtmh.14-0151](https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0151) PMID: [25294619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25294619/)
19. Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala A-MK, Kantele A, Vapalahti O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: Exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. *J Clin Virol*. 2014; doi: [10.1016/j.jcv.2014.08.021](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.021)
20. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007; 101: 738–739. doi: [10.1016/j.trstmh.2007.02.007](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.02.007) PMID: [17418320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17418320/)
21. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnaratchakit K, Yoksan S, Flamand M, Sakuntabhai A. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 71: 467–469. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.020](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.020) PMID: [21996098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21996098/)
22. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2047–2052. doi: [10.1128/JCM.06557-11](https://doi.org/10.1128/JCM.06557-11) PMID: [22442323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22442323/)
23. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virology*. 2010; 7: 22. doi: [10.1186/1743-422X-7-22](https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-22) PMID: [20105295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20105295/)

24. Ma X, Zhen W, Yang P, Sun X, Nie W, Zhang L, et al. First confirmation of imported dengue virus serotype 2 complete genome in urine from a Chinese traveler returning from India. *Virol J.* 2014; 11: 56. doi: [10.1186/1743-422X-11-56](https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-56) PMID: [24666930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24666930/)
25. Vázquez S, Cabezas S, Pérez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int J Infect Dis.* 2007; 11: 256–262. doi: [10.1016/j.ijid.2006.05.005](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.05.005) PMID: [16914345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16914345/)
26. Anders KL, Nguyet NM, Quyen NTH, Ngoc TV, Tram TV, Gan TT, et al. An Evaluation of Dried Blood Spots and Oral Swabs as Alternative Specimens for the Diagnosis and Screening for Past Dengue Virus Exposure. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87: 165–170. doi: [10.4269/ajtmh.2012.11-0713](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0713) PMID: [22764309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22764309/)
27. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, Mercado JC, Pérez L, Hammond SN, et al. Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *J Clin Virol.* 2008; 43: 287–291. doi: [10.1016/j.jcv.2008.07.016](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.07.016) PMID: [18783984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18783984/)
28. Chakravarti A, Matlani M, Jain M. Immunodiagnosis of dengue virus infection using saliva. *Curr Microbiol.* 2007; 55: 461–464. doi: [10.1007/s00284-007-9040-5](https://doi.org/10.1007/s00284-007-9040-5) PMID: [17899259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17899259/)
29. Yap G, Sil BK, Ng L-C. Use of Saliva for Early Dengue Diagnosis. Lopes da Fonseca BA, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5: e1046. doi: [10.1371/journal.pntd.0001046](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001046) PMID: [21572982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21572982/)
30. Jaenisch T, IDAMS, Sakuntabhai A, DENFREE, Wilder-Smith A, DengueTools. Dengue Research Funded by the European Commission-Scientific Strategies of Three European Dengue Research Consortia. Halstead SB, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7: e2320. doi: [10.1371/journal.pntd.0002320](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002320) PMID: [24349584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24349584/)
31. World Health Organization. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control.* 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997.
32. Hue KDT, Tuan TV, Thi HTN, Bich CTN, Anh HHL, Wills BA, et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Methods.* 2011; 177: 168–173. doi: [10.1016/j.jviromet.2011.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.08.002) PMID: [21843553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21843553/)
33. Vong S, Khieu V, Glass O, Ly S, Duong V, Huy R, et al. Dengue Incidence in Urban and Rural Cambodia: Results from Population-Based Active Fever Surveillance, 2006–2008. Harris E, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4: e903. doi: [10.1371/journal.pntd.0000903](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000903) PMID: [21152061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21152061/)
34. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1189–1192. PMID: [9574674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9574674/)
35. Buchy P, Vo VL, Bui KT, Trinh TXM, Glaziou P, Le TTH, et al. Secondary dengue virus type 4 infections in Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36: 178–185. PMID: [15906664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15906664/)
36. Elith J, Leathwick JR, Hastie T. A working guide to boosted regression trees. *J Anim Ecol.* 2008; 77: 802–813. doi: [10.1111/j.1365-2656.2008.01390.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01390.x) PMID: [18397250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18397250/)
37. Hijmans RJ, Phillips S, Leathwick J, Elith J. Species distribution modeling [Internet]. 2014. Available: <http://cran.r-project.org/web/packages/dismo>
38. Ridgeway G. Generalized Boosted Regression Models [Internet]. 2013. Available: <http://cran.r-project.org/web/packages/gbm>
39. Jarman RG, Nisalak A, Anderson KB, Klungthong C, Thaisomboonsuk B, Kaneechit W, et al. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84: 218–223. doi: [10.4269/ajtmh.2011.09-0798](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.09-0798) PMID: [21292887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292887/)
40. Guzmán MG, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2004; 8: 69–80.
41. Saito Y, Moi ML, Kotaki A, Ikeda M, Tajima S, Shiba H, et al. Detection of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) in Urine Samples using ELISA as a Laboratory Diagnostic Method for Dengue Virus Infection. *Jpn J Infect Dis.* 2015; doi: [10.7883/yoken.JJID.2014.441](https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.441)
42. Balmaseda A, Guzmán MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Téllez Y, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10: 317–322. PMID: [12626461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12626461/)
43. Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3737–3739. PMID: [9817913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9817913/)
44. Bakoush O, Torffvit O, Rippe B, Tencer J. High proteinuria selectivity index based upon IgM is a strong predictor of poor renal survival in glomerular diseases. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc—Eur Ren Assoc.* 2001; 16: 1357–1363.
45. Michishige F, Kanno K, Yoshinaga S, Hinode D, Takehisa Y, Yasuoka S. Effect of saliva collection method on the concentration of protein components in saliva. *J Med Investig JMI.* 2006; 53: 140–146.

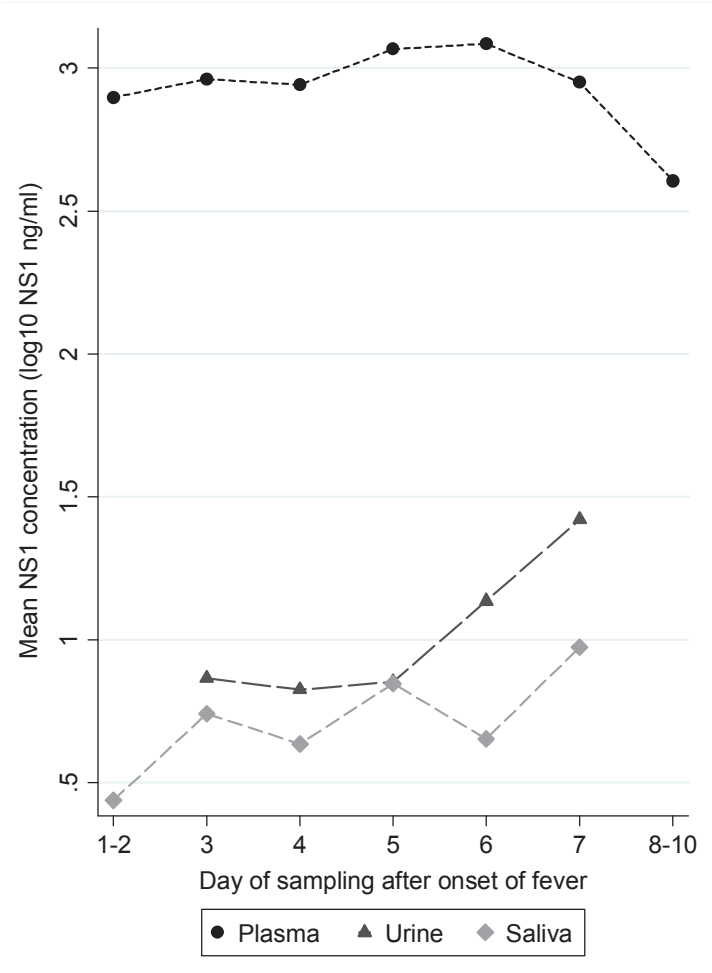


46. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1165–1168. doi: [10.1086/343813](https://doi.org/10.1086/343813) PMID: [12355369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12355369/)
47. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006; 193: 1078–1088. doi: [10.1086/500949](https://doi.org/10.1086/500949) PMID: [16544248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16544248/)
48. Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeueng N, et al. Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5: e1244. doi: [10.1371/journal.pntd.0001244](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001244) PMID: [21811645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21811645/)
49. Chau TNB, Anders KL, Lien LB, Hung NT, Hieu LTM, Tuan NM, et al. Clinical and virological features of Dengue in Vietnamese infants. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4: e657. doi: [10.1371/journal.pntd.0000657](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000657) PMID: [20405057](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20405057/)
50. Allonso D, Meneses MDF, Fernandes CA, Ferreira DF, Mohana-Borges R. Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2014; 9: e113634. doi: [10.1371/journal.pone.0113634](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113634) PMID: [25412084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25412084/)
51. De la Cruz-Hernández SI, Flores-Aguilar H, González-Mateos S, López-Martínez I, Alpuche-Aranda C, Ludert JE, et al. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 88: 446–454. doi: [10.4269/ajtmh.12-0023](https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0023) PMID: [23339203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23339203/)
52. Thomas L, Najjoulah F, Verlaeten O, Martial J, Brichler S, Kaidomar S, et al. Relationship between nonstructural protein 1 detection and plasma virus load in Dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83: 696–699. doi: [10.4269/ajtmh.2010.10-0138](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0138) PMID: [20810841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20810841/)
53. Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5: e1309. doi: [10.1371/journal.pntd.0001309](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001309) PMID: [21909448](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21909448/)
54. Patidar KA, Parwani RN, Wanjarí SP. Correlation of salivary and serum IgG, IgA levels with total protein in oral submucous fibrosis. *J Oral Sci.* 2011; 53: 97–102. PMID: [21467820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21467820/)
55. Parry JV, Perry KR, Mortimer PP. Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum. *Lancet.* 1987; 2: 72–75. PMID: [2885575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2885575/)
56. Menon MC, Chuang PY, He CJ. The glomerular filtration barrier: components and crosstalk. *Int J Nephrol.* 2012; 2012: 749010. doi: [10.1155/2012/749010](https://doi.org/10.1155/2012/749010) PMID: [22934182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22934182/)
57. Toblli JE, Bevione P, Di Gennaro F, Madalena L, Cao G, Angerosa M. Understanding the mechanisms of proteinuria: therapeutic implications. *Int J Nephrol.* 2012; 2012: 546039. doi: [10.1155/2012/546039](https://doi.org/10.1155/2012/546039) PMID: [22844592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22844592/)
58. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhant C, Kasinrerak W, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* 2007; 3: e183. doi: [10.1371/journal.ppat.0030183](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030183) PMID: [18052531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18052531/)
59. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen van VC, Wills B. Dengue. *N Engl J Med.* 2012; 366: 1423–1432. doi: [10.1056/NEJMra1110265](https://doi.org/10.1056/NEJMra1110265) PMID: [22494122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22494122/)
60. Wills BA, Oragui EE, Dung NM, Loan HT, Chau NV, Farrar JJ, et al. Size and charge characteristics of the protein leak in dengue shock syndrome. *J Infect Dis.* 2004; 190: 810–818. doi: [10.1086/422754](https://doi.org/10.1086/422754) PMID: [15272410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15272410/)
61. Lizarraga KJ, Nayer A. Dengue-associated kidney disease. *J Nephropathol.* 2014; 3: 57–62. doi: [10.12860/jnp.2014.13](https://doi.org/10.12860/jnp.2014.13) PMID: [24772398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24772398/)
62. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 2004; 189: 1411–1418. doi: [10.1086/383043](https://doi.org/10.1086/383043) PMID: [15073678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15073678/)
63. Zhang Y, Bai J, Ying JY. A stacking flow immunoassay for the detection of dengue-specific immunoglobulins in salivary fluid. *Lab Chip.* 2015; 15: 1465–1471. doi: [10.1039/c4lc01127a](https://doi.org/10.1039/c4lc01127a) PMID: [25608951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25608951/)
64. Ravi Banavar S, G S V. Diagnostic efficacy of saliva for dengue—a reality in near future? A piloting initiative. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2014; 8: 229–232. doi: [10.7860/JCDR/2014/7521.4169](https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7521.4169) PMID: [24783144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24783144/)

**S1 Figure. Validation of the cut-off values of the saliva-based MAC-ELISA (A), AAC-ELISA (B), the urine-based AAC-ELISA (C), the saliva-based IgG indirect ELISA (D) and the urine-based IgG indirect ELISA (E). OD values for the different assays in saliva and urine specimens are divided into negative control and three other groups (low, medium, high) based on the titer of the corresponding antibody that was measured in the plasma of the patients. Cut-off values are indicated by the horizontal red line.**

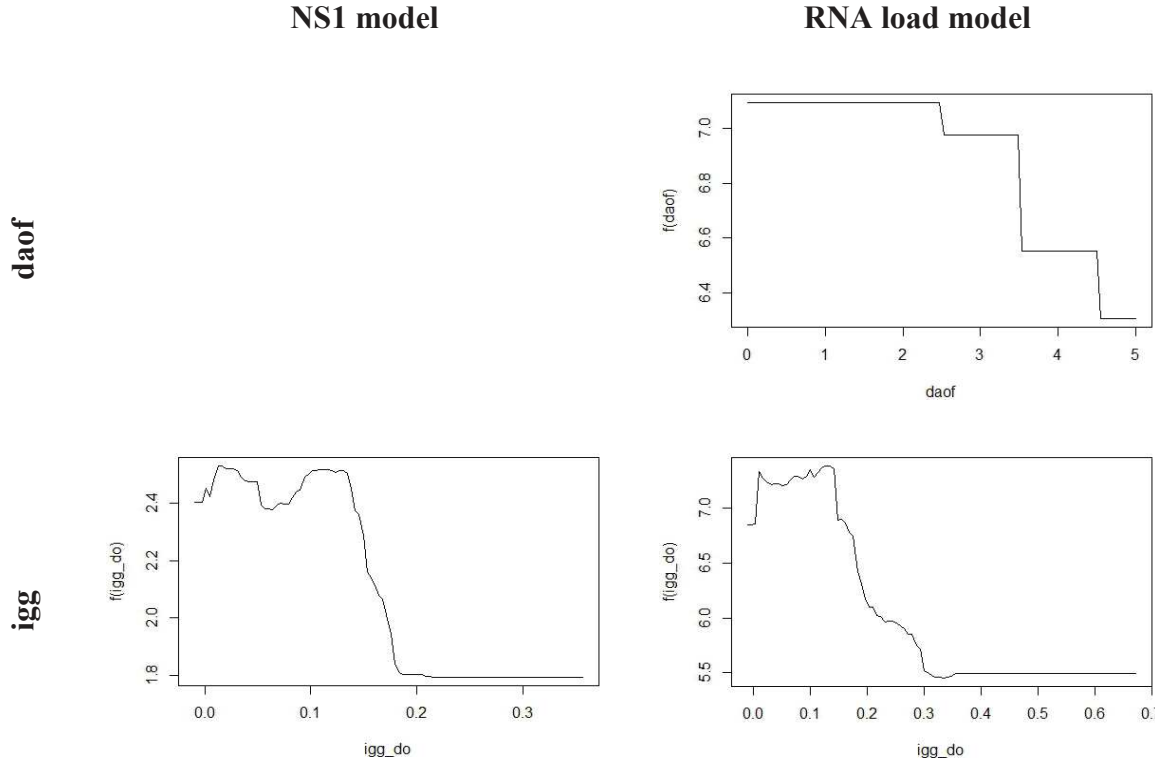


S2 Figure. Mean NS1 concentration measured by capture ELISA in plasma, urine and saliva.





**S3 Figure. Partial dependence plots for the most influential variables explaining NS1 concentration and RNA load in plasma.**



**S1 Table. Protocols of the NS1 capture ELISAs designed for the testing of plasma, urine and saliva specimens.**

Step	Details	Plasma	Urine	Saliva
Coating	Reagent	In house monoclonal anti-NS1 antibody	In house monoclonal anti-NS1 antibody	In house monoclonal anti-NS1 antibody
	Dilution	2 µg/ml in PBS	2 µg/ml in PBS	2 µg/ml in PBS
	Plate	Maxisorp (Nunc, Denmark)	Maxisorp (Nunc, Denmark)	Maxisorp (Nunc, Denmark)
	Incubation (duration/temperature)	4 hours/room temperature	4 hours/room temperature	4 hours/room temperature
	Volume per well	100 µl	100 µl	100 µl
Blocking	Reagent	Dilution buffer (PBS-M-T)	Dilution buffer (PBS-M-T)	Dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	30 minutes/room temperature	30 minutes/room temperature	30 minutes/room temperature
Samples	Dilution	Non quantitative: 1/2 in PBS-M-T ; Quantitative : 1/2, 1/10 and 1/100 in PBS-M-T	1/2 in PBS-M-T	1/2 in PBS-M-T
	Volume	100 µl	100 µl	50 µl
	Incubation (duration/temperature)	1 hour/37°C	1 hour/37°C	- * -
	Conjugated antibody*	Peroxidase-conjugated in house monoclonal anti-NS1 antibody	Peroxidase-conjugated in house monoclonal anti-NS1 antibody	Peroxidase-conjugated in house monoclonal anti-NS1 antibody
	Dilution	2 µg/ml in dilution buffer (PBS-M-T)	2 µg/ml in dilution buffer (PBS-M-T)	2 µg/ml in dilution buffer (PBS-M-T)
	Volume	100 µl	100 µl	50 µl
	Incubation (duration/temperature)	1 hour/37°C	1 hour/37°C	2 hour/37°C
Substrate	Reagent	TMB (KPL, USA)	TMB (KPL, USA)	TMB (KPL, USA)
	Incubation	10 min	10 min	10 min
Stop solution		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N

Dilution buffer (PBS-M-T): PBS containing 3% of skimmed milk and 0.1% of Tween 20

Between each step: 4 washes with a PBS solution containing 0.05% Tween 20

\* For saliva testing, samples and conjugated antibody are distributed at the same step.

**S2 Table. Protocols of the plasma-, urine- and saliva-based anti-DENV IgM capture ELISAs (MAC-ELISAs).**

Step	Details	Plasma*	Urine*	Saliva**
Coating	Reagent	Goat anti-human IgM immunoglobulins (Sigma Aldrich, Germany)	Goat anti-human IgM immunoglobulins (Sigma Aldrich, Germany)	Goat anti-human IgM immunoglobulins (Sigma Aldrich, Germany)
	Dilution	1 µg/ml in PBS	2 µg/ml in PBS	2 µg/ml in PBS
	Plate	Maxisorp (Nunc, Denmark)	Maxisorp (Nunc, Denmark)	Maxisorp (Nunc, Denmark)
Blocking	Incubation (duration/temperature)	4 hours/room temperature	4 hours/room temperature	4 hours/room temperature
	Reagent	Dilution buffer (PBS-M-T)	Dilution buffer (PBS-M-T)	Dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	30 minutes/room temperature	30 minutes/room temperature	30 minutes/room temperature
Samples***	Dilution	1/100 in PBS-M-T	1/5 in PBS-M-T	1/5 in PBS-M-T
Antigen	Reagent	Positive antigen : sucrose-acetone extracted DENV-1, DENV-2 and DENV-3 antigens; Negative antigen: brain of non infected mice	Positive antigen: sucrose-acetone extracted DENV-1, DENV-2 and DENV-3 antigens; Negative antigen: brain of non infected mice	Positive antigen: sucrose-acetone extracted DENV-1, DENV-2 and DENV-3 antigens; Negative antigen: brain of non infected mice
	Dilution	16 Hemagglutination units in dilution buffer (PBS-M-T)	16 Hemagglutination units in dilution buffer (PBS-M-T)	16 Hemagglutination units in dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	Overnight/4°C	Overnight/4°C	Overnight/4°C
Antibody 1	Reagent	Mouse hyper-immune ascitis	Purified Mouse anti-Pan Dengue envelope protein, Clone D1-11 (ICL, USA)	Purified Mouse anti-Pan Dengue envelope protein, Clone D1-11 (ICL, USA)
	Dilution	1/1000 in dilution buffer (PBS-M-T)	2 µg/ml in dilution buffer (PBS-M-T)	2 µg/ml in dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	1 hour/37°C	1 hour/37°C	1 hour/37°C
Antibody 2	Reagent	Peroxidase-conjugated Fab anti-mouse IgG H+L (supplier)	Peroxidase-conjugated Fab anti-mouse IgG H+L (supplier)	Peroxidase-conjugated Fab anti-mouse IgG H+L (supplier)
	Dilution	1/5000 in dilution buffer (PBS-M-T)	1/15000 in dilution buffer (PBS-M-T)	1/15000 in dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	1 hour/37°C	1 hour/37°C	1 hour/37°C
Substrate	Reagent	ABTS (KPL, USA)	TMB (KPL, USA)****	TMB (KPL, USA)****
	Incubation	10 min	10 min	10 min

Dilution buffer (PBS-M-T): PBS containing 5% of skimmed milk and 0.5% of Tween 20

Between each step: 4 washes with a PBS solution containing 0.05% Tween 20

\*Distribution of 100 µl/well at each step

\*\* Distribution of 50 µl/well at each step

\*\*\* Each sample is tested twice: in one well with positive antigen and in one well with negative antigen

\*\*\*\* Addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N at the end of the incubation

**S3 Table. Protocols of the plasma-, urine- and saliva-based anti-DENV IgA capture ELISAs (AAC-ELISAs).**

Step	Details	Plasma*	Urine*	Saliva**
Coating	Reagent	Goat anti-human IgA immunoglobulins (Sigma Aldrich, Germany)	Goat anti-human IgA immunoglobulins (Sigma Aldrich, Germany)	Goat anti-human IgA immunoglobulins (Sigma Aldrich, Germany)
	Dilution	2 µg/ml in PBS	2 µg/ml in PBS	2 µg/ml in PBS
	Plate	Maxisorp (Nunc, Denmark)	Maxisorp (Nunc, Denmark)	Maxisorp (Nunc, Denmark)
	Incubation (duration/temperature)	4 hours/room temperature	4 hours/room temperature	4 hours/room temperature
Blocking	Reagent	Dilution buffer	Dilution buffer	Dilution buffer
	Incubation (duration/temperature)	30 minutes/room temperature	30 minutes/room temperature	30 minutes/room temperature
Samples***	Dilution	1/100 in PBS-M-T	1/5 in PBS-M-T	1/5 in PBS-M-T
Antigen	Reagent	Positive antigen : sucrose-acetone extracted DENV-1, DENV-2 and DENV-3 antigens; Negative antigen: brain of non infected mice	Positive antigen : sucrose-acetone extracted DENV-1, DENV-2 and DENV-3 antigens; Negative antigen: brain of non infected mice	Positive antigen : sucrose-acetone extracted DENV-1, DENV-2 and DENV-3 antigens; Negative antigen: brain of non infected mice
	Dilution	16 Hemagglutination units in dilution buffer (PBS-M-T)	16 Hemagglutination units in dilution buffer (PBS-M-T)	16 Hemagglutination units in dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	Overnight/4°C	Overnight/4°C	Overnight/4°C
Antibody 1	Reagent	Mouse hyper-immune ascitis	Mouse hyper-immune ascitis	Mouse hyper-immune ascitis
	Dilution	1/1000 in dilution buffer (PBS-M-T)	1/1000 in dilution buffer (PBS-M-T)	1/1000 in dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	1 hour/37°C	1 hour/37°C	1 hour/37°C
Antibody 2	Reagent	Peroxidase-conjugated Fab anti-mouse IgG H+L (supplier)	Peroxidase-conjugated Fab anti-mouse IgG H+L (supplier)	Peroxidase-conjugated Fab anti-mouse IgG H+L (supplier)
	Dilution	1/5000 in dilution buffer (PBS-M-T)	1/15000 in dilution buffer (PBS-M-T)	1/15000 in dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	1 hour/37°C	1 hour/37°C	1 hour/37°C
Substrate	Reagent	ABTS (KPL, USA)	ABTS (KPL, USA)	TMB (KPL, USA)****
	Incubation	10 min	10 min	10 min

Dilution buffer (PBS-M-T): PBS containing 5% of skimmed milk and 0.5% of Tween 20

Between each step: 4 washes with a PBS solution containing 0.05% Tween 20

\*Distribution of 100 µl/well at each step

\*\* Distribution of 50 µl/well at each step

\*\*\* Each sample is tested twice: in one well with positive antigen and in one well with negative antigen

\*\*\*\* Addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N at the end of the incubation



**S4 Table. Protocols of the plasma-, urine- and saliva-based Indirect ELISAs for anti-DENV-ELISA.**

Step	Details	Plasma*	Urine*	Saliva**
Coating	Reagent	Positive antigen: mixture of the 4 serotypes of DENV cell culture lysate antigens; Negative antigen: non-infected cell culture lysate	Positive antigen: mixture of the 4 serotypes of DENV cell culture lysate antigens; Negative antigen: non-infected cell culture lysate	Positive antigen: mixture of the 4 serotypes of DENV cell culture lysate antigens; Negative antigen: non-infected cell culture lysate
	Dilution	1/8000 in PBS	1/8000 in PBS	1/8000 in PBS
	Plate	Polysorp (Nunc, Denmark)	Polysorp (Nunc, Denmark)	Polysorp (Nunc, Denmark)
	Incubation (duration/temperature)	Overnight/4°C	Overnight/4°C	Overnight/4°C
Blocking	Reagent	Dilution buffer (PBS-M-T)	Dilution buffer (PBS-M-T)	Dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature))	30 minutes/room temperature	30 minutes/room temperature	30 minutes/room temperature
Samples***	Dilution	1/100 in PBS-M-T	1/5 in PBS-M-T	1/5 in PBS-M-T
Antibody	Reagent	Peroxidase-conjugated anti-human IgG goat IgG (Sigma Aldrich, Germany)	Peroxidase-conjugated anti-human IgG goat IgG (Sigma Aldrich, Germany)	Peroxidase-conjugated anti-human IgG goat IgG (Sigma Aldrich, Germany)
	Dilution	1/8000 in dilution buffer (PBS-M-T)	1/8000 in dilution buffer (PBS-M-T)	1/15000 in dilution buffer (PBS-M-T)
	Incubation (duration/temperature)	1 hour/37°C	1 hour/37°C	1 hour/37°C
Substrate	Reagent	ABTS (KPL, USA)	TMB (KPL, USA) ****	TMB (KPL, USA)****
	Incubation	10 min	10 min	10 min

Dilution buffer (PBS-M-T): PBS containing 5% of skimmed milk and 0.5% of Tween 20

Between each step: 4 washes with a PBS solution containing 0.05% Tween 20

\*Distribution of 100 µl/well at each step

\*\* Distribution of 50 µl/well at each step

\*\*\* Each sample is tested twice: in one well with positive antigen and in one well with negative antigen

\*\*\*\* Addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N at the end of the incubation

**S5 Table. Intra-assay precision of the different ELISAs used in the study.** Intra-assay precision (repeatability) was assessed by testing one negative sample and three positive samples 10 times during the same assay.

	Negative sample	Positive sample 1	Positive sample 2	Positive sample 3
<b><u>NS1 plasma</u></b>				
Mean OD	0.033	0.322	1.224	2.539
SD	0.001	0.017	0.031	0.045
<b><u>NS1 urine</u></b>				
Mean OD	0.030	0.220	1.074	2.523
SD	0.003	0.008	0.024	0.043
<b><u>NS1 saliva</u></b>				
Mean OD	0.024	0.130	0.495	1.260
SD	0.001	0.014	0.015	0.081
<b><u>MAC-ELISA plasma</u></b>				
Mean OD	0.009	0.299	0.816	0.956
SD	0.002	0.009	0.028	0.015
<b><u>MAC-ELISA saliva</u></b>				
Mean OD	0.015	0.099	0.698	1.063
SD	0.002	0.003	0.020	0.014
<b><u>AAC-ELISA plasma</u></b>				
Mean OD	0.001	0.450	0.631	1.094
SD	0.002	0.007	0.016	0.015
<b><u>AAC-ELISA urine</u></b>				
Mean OD	0.005	0.354	0.558	0.714
SD	0.003	0.023	0.036	0.020
<b><u>AAC-ELISA saliva</u></b>				
Mean OD	0.004	0.110	0.952	1.420
SD	0.003	0.004	0.018	0.018
<b><u>IgG indirect ELISA plasma</u></b>				
Mean OD	0.002	0.249	0.517	0.574
SD	0.002	0.017	0.016	0.015
<b><u>IgG indirect ELISA urine</u></b>				
Mean OD	0.015	0.194	0.511	1.826
SD	0.001	0.004	0.009	0.035
<b><u>IgG indirect ELISA saliva</u></b>				
Mean OD	0.014	0.141	0.222	0.481
SD	0.002	0.004	0.009	0.022

SD: Standard Deviation

**S6 Table. Inter-assay precision of the different ELISAs used in the study.** Inter-assay precision (reproducibility) was assessed by testing one negative sample and three positive samples in 5 times different assays.

	Negative sample	Positive sample 1	Positive sample 2	Positive sample 3
<b><u>NS1 plasma</u></b>				
Mean OD	0.066	0.364	1.211	2.476
SD	0.020	0.027	0.043	0.051
<b><u>NS1 urine</u></b>				
Mean OD	0.090	0.240	1.082	2.486
SD	0.037	0.006	0.042	0.088
<b><u>NS1 saliva</u></b>				
Mean OD	0.034	0.132	0.488	1.255
SD	0.009	0.010	0.017	0.077
<b><u>MAC-ELISA plasma</u></b>				
Mean OD	0.008	0.247	0.780	0.913
SD	0.003	0.044	0.120	0.123
<b><u>MAC-ELISA saliva</u></b>				
Mean OD	0.017	0.103	0.677	1.091
SD	0.004	0.005	0.054	0.113
<b><u>AAC-ELISA plasma</u></b>				
Mean OD	0.002	0.465	0.665	1.151
SD	0.001	0.039	0.056	0.117
<b><u>AAC-ELISA urine</u></b>				
Mean OD	0.003	0.372	0.571	0.818
SD	0.002	0.068	0.067	0.087
<b><u>AAC-ELISA saliva</u></b>				
Mean OD	0.004	0.093	0.905	1.330
SD	0.004	0.011	0.063	0.078
<b><u>IgG indirect ELISA plasma</u></b>				
Mean OD	0.009	0.267	0.472	0.588
SD	0.015	0.042	0.050	0.089
<b><u>IgG indirect ELISA urine</u></b>				
Mean OD	0.016	0.167	0.433	1.517
SD	0.004	0.015	0.044	0.162
<b><u>IgG indirect ELISA saliva</u></b>				
Mean OD	0.012	0.150	0.229	0.497
SD	0.002	0.020	0.020	0.049

SD: Standard Deviation

**S7 Table. Detection rate of viral genome, NS1 protein, anti-DENV antibodies in plasma, urine and saliva by time of sampling after onset of fever.**

	PCR plasma	PCR urine	PCR saliva	NS1 plasma	NS1 urine	NS1 saliva	IgM/IgG/IgA plasma	IgG/IgA urine	IgM/IgG/IgA saliva
<b>Total</b>	85.4% (323/378)	41.6% (184/442)	39.0% (219/562)	63.4% (338/533)	14.5% (124/856)	28.3% (195/688)	36% (244/678); 54.4% (417/766); 37.4% (291/778)	38.5% (575/1493); 26.8% (397/1483)	38.1% (531/1395); 52.9% (594/1123); 28.6% (315/1101)
<b>D≤2</b>	100% (37/37)	13.6% (3/22)	60.5% (23/38)	82.4% (56/68)	3.2% (2/63)	15.4% (8/52)	1.7% (1/59); 14.7% (10/68); 0% (0/70)	3.9% (3/78); 0% (0/78)	1.6% (1/63); 8% (4/50); 0% (0/48)
<b>D3</b>	100% (54/54)	23.8% (10/42)	63.9% (39/61)	88.2% (75/85)	15.1% (14/93)	33.3% (27/81)	7.6% (6/79); 15.9% (13/82); 6.9% (6/87)	7.3% (8/110); 0.9% (1/110)	8% (8/100); 12.7% (9/71); 1.4% (1/72)
<b>D4</b>	96.0% (72/75)	41.1% (30/73)	58.5% (55/94)	75.5% (80/106)	24.3% (33/136)	42.6% (49/115)	22% (20/91); 36.5% (39/107); 18.2% (20/110)	20.3% (33/163); 8.6% (14/163)	20.4% (29/142); 20.9% (24/115); 7.6% (8/106)
<b>D5</b>	91.2% (52/57)	48.2% (40/83)	44.2% (46/104)	62.3% (48/77)	23.5% (34/145)	31.1% (41/132)	43.8% (28/64); 47.2% (34/72); 42.3% (33/78)	33.2% (61/184); 21.2% (39/184)	42.1% (72/171); 35.4% (46/136); 23.3% (31/133)
<b>D6</b>	75.0% (36/48)	50% (38/76)	30.9% (30/97)	51.7% (30/58)	15.0% (20/133)	27.3% (30/110)	65% (39/60); 59% (46/78); 56.3% (45/80)	48.9% (87/178); 35.4% (63/178)	54.6% (83/152); 50% (63/126); 51.2% (65/127)
<b>D7</b>	72.9% (35/48)	43.9% (25/57)	23.9% (17/71)	49.1% (30/61)	12.8% (14/109)	26.1% (23/88)	85.7% (54/63); 65.2% (45/69); 72.7% (51/70)	58.7% (78/133); 46.2% (61/132)	73.3% (96/131); 65.4% (68/104); 53.3% (57/107)
<b>W2</b>	62.7% (37/59)	49.3% (37/75)	10% (9/90)	24.4% (19/78)	4.1% (7/172)	15.4% (17/110)	82.2% (83/101); 82.3% (93/113); 88.7% (102/115)	70.2% (153/218); 64.2% (140/218)	72% (144/200); 78.9% (131/166); 65.1% (110/169)
<b>W3</b>	NA	7.1% (1/14)	0% (0/3)	NA	0% (0/5)	NA	NA	56.2% (50/89); 51.7% (46/89)	55.1% (48/87); 79.1% (53/67); 30.9% (21/68)
<b>W4</b>	NA	NA	0% (0/4)	NA	NA	NA	NA	46.5% (47/101); 23% (23/100)	28.4% (25/88); 86.6% (58/67); 14% (10/71)
<b>W5</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	37.9% (22/58); 10.5% (6/57)	25.8% (17/66); 78.7% (37/47); 18%

									(9/50)
<b>W6</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16% (12/75); 81.3% (65/82); 32.1% (25/78)	25.9% (22/85); 3.6% (3/84)	6.3% (6/95); 67.1% (57/85); 3.7% (3/82)
<b>M3</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.2% (1/86); 74.2% (72/97); 10% (9/90)	11.5% (11/96); 1.1% (1/90)	2% (2/100); 46.3% (44/95); 0% (0/68)

D: day after the onset of the fever; W: week after the onset of the fever; M: month after the onset of the fever

NA: No sample Available



**S8 Table. Results of the Boosted Regression Trees analysis for factors associated with NS1 concentration and viral RNA load.**

	Mean Relative Importance (Standard deviation)			Mean correlation coefficient (Standard deviation)
	daof	classif	IgG	
NS1 model (logns1)	8.51 (1.03)	6.30 (0.54)	85.19 (1.49)	0.505 (0.014)
Viral RNA model (logvir)	20.87 (0.31)	1.81 (0.19)	77.32 (0.37)	0.618 (0.002)

daof: number of days between the onset of the fever and the time of sampling

classif: classification of the severity of the disease according to 1997 WHO guidelines

IgG: anti-DENV IgG quantity in plasma estimated by optical density in indirect ELISA

**Article 3: Evaluation of six commercial kits designed for NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens.**

Anne-Claire Andries, Veasna Duong, Sivuth Ong, Sopheaktra Ros, Paul Horwood, Philippe Dussart, Philippe Buchy

Soumis à BMC Infectious Diseases en novembre 2015.

## BMC Infectious Diseases

### Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens.
<b>Article Type:</b>	Research article
<b>Section/Category:</b>	Viral diseases
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background</b> Rapid diagnostic tests (RDTs) have been commercialized in order to help physicians in dengue diagnosis. Until recently, only blood samples were used for those tests but it has been shown in several studies that urine and saliva can also be employed for dengue diagnosis. RDTs for the detection of NS1 antigen and anti-dengue IgG, IgM and IgA in urine and saliva specimens have thus been developed by Standard Diagnostics. The aim of this study was to evaluate the performances these new commercial assays.</p> <p><b>Methods</b> Two panels of clinical specimens were used: one for the evaluation of the NS1-detection devices and the second for the evaluation of the antibody-detection kits. Each panel consisted of urine and saliva specimens collected sequentially from 86 patients with a confirmed dengue infection. A total of 291 saliva and 440 urine samples were included in the NS1-evaluation panel and 530 saliva and 528 urine specimens constituted the antibody-evaluation panel. All samples were tested in parallel by in-house ELISAs and by the commercial RDTs.</p> <p><b>Results</b> Compared to the in-house NS1 ELISA, the results obtained with the NS1 RDT demonstrated a good correlation with urine samples (kappa coefficient: 0.88) but not with saliva samples (kappa coefficient: 0.28). RDTs designed for antibody detection in saliva and urine were extremely specific (100%), but less sensitive than the in-house ELISAs (e.g. reduction of overall sensitivity by 12.2% for the RDT designed for IgG detection in urine and by 23.7% for the RDT detecting anti-DENV IgM in saliva). IgM were not detected in urine, either by RDT or ELISA.</p> <p><b>Conclusions</b> Although the RDTs evaluated here offer an attractive approach for dengue diagnosis, this study suggests that these new commercial kits would benefit from further improvement.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	Philippe Buchy, M.D., Ph.D. Institut Pasteur Cambodia Phnom Penh, CAMBODIA
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Institut Pasteur Cambodia
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Anne-Claire Andries, M.Sc
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Anne-Claire Andries, M.Sc Veasna Duong, M.D., Ph.D.

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	Sivuth Ong, M.D.
	Sopheaktra Ros
	Paul Horwood
	Philippe Dussart
	Philippe Buchy, M.D., Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Opposed Reviewers:</b>	

[Click here to view linked References](#)

- 1
- 2
- 3
- 4 **1 Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue**
- 5
- 6 **2 IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens.**
- 7
- 8
- 9 **3**
- 10
- 11 **4 Anne-Claire Andries<sup>1</sup>, Veasna Duong<sup>1</sup>, Sivuth Ong<sup>1</sup>, Sopheaktra Ros<sup>1</sup>, Paul Horwood<sup>1</sup>, Philippe Dussart<sup>1</sup>,**
- 12 **5 Philippe Buchy<sup>1,2\*</sup>**
- 13
- 14
- 15 **6 <sup>1</sup> Institut Pasteur in Cambodia, International Network of Pasteur Institutes, Virology Unit, Phnom Penh,**
- 16 **7 Cambodia.**
- 17
- 18
- 19 **8 <sup>2</sup> GlaxoSmithKline, Vaccines R&D, Singapore.**
- 20
- 21
- 22 **9**
- 23
- 24 **10 \* Corresponding author. E-mail: buchyphilippe@hotmail.com**
- 25
- 26
- 27 **11**
- 28
- 29
- 30 **12**
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

13 **Abstract**

14 **Background**

15 Rapid diagnostic tests (RDTs) have been commercialized in order to help physicians in dengue diagnosis.  
16 Until recently, only blood samples were used for those tests but it has been shown in several studies that  
17 urine and saliva can also be employed for dengue diagnosis. RDTs for the detection of NS1 antigen and  
18 anti-dengue IgG, IgM and IgA in urine and saliva specimens have thus been developed by Standard  
19 Diagnostics. The aim of this study was to evaluate the performances these new commercial assays.

20 **Methods**

21 Two panels of clinical specimens were used: one for the evaluation of the NS1-detection devices and the  
22 second for the evaluation of the antibody-detection kits. Each panel consisted of urine and saliva  
23 specimens collected sequentially from 86 patients with a confirmed dengue infection. A total of 291  
24 saliva and 440 urine samples were included in the NS1-evaluation panel and 530 saliva and 528 urine  
25 specimens constituted the antibody-evaluation panel. All samples were tested in parallel by in-house  
26 ELISAs and by the commercial RDTs.

27 **Results**

28 Compared to the in-house NS1 ELISA, the results obtained with the NS1 RDT demonstrated a good  
29 correlation with urine samples (kappa coefficient: 0.88) but not with saliva samples (kappa coefficient:  
30 0.28). RDTs designed for antibody detection in saliva and urine were extremely specific (100%), but less  
31 sensitive than the in-house ELISAs (e.g. reduction of overall sensitivity by 12.2% for the RDT designed  
32 for IgG detection in urine and by 23.7% for the RDT detecting anti-DENV IgM in saliva). IgM were not  
33 detected in urine, either by RDT or ELISA.

34 **Conclusions**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

35 Although the RDTs evaluated here offer an attractive approach for dengue diagnosis, this study suggests  
36 that these new commercial kits would benefit from further improvement.

37

### 38 **Key words**

39 Dengue, Diagnostic, Rapid Diagnostic Test, Saliva, Urine, NS1, Antibodies

40

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 41 **Background**

42 Dengue is the most common arboviral disease worldwide, with almost 130 countries of tropical or  
43 subtropical regions for which there is good evidence of dengue occurrence [1]. Dengue illness begins with  
44 undifferentiated symptoms, common to several other infectious diseases such as malaria, influenza or  
45 other arboviral diseases. After a few days, most patients begin to recover but some progress to severe  
46 hemorrhagic disease forms that can result in death without proper medical care. Early clinical  
47 management based on accurate rehydration can prevent life-threatening complications [2]. Hence, the  
48 need for an early diagnosis of dengue infection.

49 Direct diagnosis of dengue is based on dengue virus (DENV) isolation, or detection of the viral genome  
50 or NS1 antigen. Indirect diagnosis using serological methods to detect anti-DENV IgM and IgG is  
51 commonly employed. Anti-DENV IgA are also detectable during a DENV infection but tests to detect  
52 this immunoglobulin isotype are not often used in routine diagnosis [3–5]. Rapid diagnostic tests (RDTs)  
53 for NS1 and anti-DENV antibody detection in blood have been developed in order to help physicians  
54 make rapid and informed decisions about adapted clinical management. Until recently, only blood  
55 samples were used for dengue diagnosis but it has been shown in several studies that urine and saliva can  
56 also be employed [6–11].

57 Standard Diagnostics (SD; Kyonggi-do, South Korea) has developed RDTs able to detect markers of  
58 dengue infection in urine and saliva specimens. They designed a NS1 RDT, a combined anti-DENV  
59 IgM/IgG RDT and an anti-DENV IgA RDT adapted for testing both urine and saliva clinical specimens.  
60 The aim of this study was to evaluate the performances of these diagnostic tools. The results obtained  
61 with the RDTs were compared with those of in-house ELISAs.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 63 **Methods**

### 64 **Clinical samples**

65 Two panels of clinical specimens were used: the first one for the evaluation of the NS1 test and the  
66 second for the antibody detection assays. Each panel consisted of urine, saliva and plasma specimens  
67 collected sequentially from 86 patients with a confirmed dengue infection. A confirmed dengue case was  
68 defined by the detection of viral RNA by RT-PCR and/or the detection of the NS1 protein and/or an IgM  
69 seroconversion and/or a fourfold antibody titer increase measured by hemagglutination inhibition assay  
70 (HIA) in paired plasma of patients presenting with symptoms suggestive of a dengue infection. Patients  
71 were classified in two categories according to disease severity that was assessed for each patient  
72 following the 1997 WHO criteria [12]. Fifty patients presenting with mild symptoms defined WHO as  
73 classical dengue fever (DF) were classified as “non-severe” cases and 36 patients with severe symptoms  
74 compatible with the diagnostic of dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS)  
75 were placed in the “severe” disease group. The immune status of 73 patients was determined by HIA: 24  
76 patients experienced a primary infection whereas 49 had a secondary infection. The NS1 panel consisted  
77 of samples collected during hospitalization (i.e. from day 1 to 12 after onset of fever), whereas samples  
78 collected during a weekly follow-up until three months after discharge were also included in the second  
79 panel designed for the evaluation of the antibody-detection RDTs. Four to ten urine and saliva specimens  
80 and two to five plasma samples obtained from each patient were included in these panels. A total of 241  
81 plasma, 291 saliva and 440 urine samples were included in the NS1-evaluation panel and 292 plasma, 530  
82 saliva and 528 urine specimens constituted the antibody-evaluation panel. The samples of the antibody  
83 panel were classified into three categories based on whether the corresponding plasma sample collected at  
84 the same time point was weakly, medium or highly positive in antibody based on the optical density (OD)  
85 measured by ELISA. Similarly, the samples included in the NS1 panel were classified into weakly,  
86 medium or highly positive based on the concentration of NS1 measured by ELISA in the corresponding



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

87 plasma specimen. The NS1 quantification was only performed for samples obtained from patients  
88 infected by a virus from serotype 1 (DENV-1) as only quantified recombinant NS1 protein from DENV-1  
89 was available in our laboratory. The three categories were defined arbitrarily by calculating the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup>  
90 quartile of 300 OD/concentration values of antibodies and NS1 protein obtained with 300 positive plasma  
91 samples. Weakly, medium and highly positive plasma samples corresponded to samples with a result  
92 lower than the 1<sup>st</sup> quartile, between the 1<sup>st</sup> and the 3<sup>rd</sup> quartile and greater than the 3<sup>rd</sup> quartile,  
93 respectively. Twenty-five specimens obtained from healthy controls recruited during a community-based  
94 study were also added to the panels in order to assess the specificity. These negative controls were  
95 obtained from household members of some of the patients identified during the hospital-based study and  
96 who did not experience any symptoms and had no biological evidence of DENV infection (DENV RT-  
97 PCR negative, NS1 RDT negative and absence of HI antibody).

98 The study was approved by the National Cambodian Ethics Committee. A patient's enrollment was  
99 subject to obtaining written consent signed by the participant or by a legal representative for participants  
100 under 16 years of age.

101 **In-house ELISAs**

102 In-house ELISAs served as reference tests for the purpose of these evaluations and we will refer to them  
103 as "Institut Pasteur Cambodia (IPC) ELISAs" throughout the manuscript. A capture ELISA was used to  
104 detect NS1 in plasma, urine and saliva. Anti-DENV IgG were detected in plasma, urine and saliva by an  
105 indirect ELISA whereas anti-DENV IgM and IgA were detected by capture ELISAs (MAC-ELISA and  
106 AAC-ELISA, respectively). These ELISAs were previously described in details by Andries *et al.* [11].



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

110 **Rapid diagnostic tests**

111 In this study, prototype immunochromatographic kits developed by Standard Diagnostics for NS1 and  
112 anti-DENV IgG, IgM and IgA detection were evaluated. Anti-DENV IgG and IgM were detected by the  
113 same device, whereas NS1 and anti-DENV IgA were detected by two other distinct devices. Each kit was  
114 either designed for saliva or urine specimen analysis. The characteristics of the six different devices are  
115 summarized in the Additional File 1. All tests were strictly performed according to the manufacturer’s  
116 instructions provided with the kits.

117  
118 **Statistical analysis**

119 Statistical analysis was performed using STATA version 11.0 (StataCorp, USA). Significance was  
120 assigned at  $P < 0.05$  for all parameters and were two-sided. Uncertainty was expressed by 95% confidence  
121 intervals (CI95). Statistical differences between various categorical groups were detected using Chi-  
122 squared test or McNemar’s test. Agreement between IPC ELISAs and RDTs was measured by agreement  
123 percentage and kappa coefficient.

124  
125  
126 **Results**

127 **DENV NS1 RDTs**

128 A specificity of 100% (25/25) was obtained for the NS1 RDT in urine, whereas the specificity of the  
129 saliva-based RDT was 84% (21/25).

130 The RDT and the IPC ELISA detected NS1 in 15.5% (68/440, CI95=[12.2-19.2]) and 14.3% (63/440,  
131 CI95=[11.2-17.9]) of the urine samples, respectively. The agreement between the two urine-based tests

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

132 was 97.1% with a kappa coefficient of 0.88. The NS1 RDT and ELISA tested positive in 20.4% (59/289,  
133 CI95=[16.2-25.9]) and 24.7% (72/291, CI95=[19.9-30.1]) of the saliva specimens, respectively. An  
134 agreement of 74.4% was obtained between both tests with a kappa coefficient of 0.28. Two saliva  
135 samples were excluded because an invalid result (no control line) was obtained with the RDT. In total,  
136 66% (159/241, CI95=[59.6-71.9]) of the plasma samples collected at the same time points from the same  
137 dengue-confirmed patients as the urine and saliva specimens tested positive by NS1 IPC ELISA.  
138 The NS1 detection rate by ELISAs and RDTs was systematically higher in urine and saliva samples  
139 obtained from patients with high NS1 concentration in the plasma specimens obtained at the same time  
140 points (Table 1).  
141 The sensitivity of urine- and saliva-based NS1 tests was highest in samples collected 4-7 days after the  
142 onset of fever (DAOF) from patients experiencing a primary infection (Table 2). IPC ELISA and RDT  
143 demonstrated both a maximal sensitivity for NS1 detection of 21.5% (17/79, CI95=[13.1-32.2]) in the  
144 urine samples collected during the 4 to 7 first days of the disease in patients experiencing a primary  
145 infection. A sensitivity of 46.7% (28/60, CI95=[33.7-60]) was observed with the saliva-based IPC ELISA  
146 whereas the RDT's sensitivity only reached a maximum of 33.9% (20/59). In comparison, 93.9% (31/33,  
147 CI95=[79.8-99.3]) of the plasma collected at DAOF 4-7 from the same patients experiencing a primary  
148 infection tested positive for NS1.

## Anti-DENV antibody RDTs

All 25 urine and 25 saliva samples obtained from the healthy controls tested negative for IgG, IgM and IgA by RDTs.

Anti-DENV IgG were detected in 27.9% (145/520, CI95=[24.1-32]) and 40.4% (210/520, CI95=[36.1-44.7]) of the urine samples by RDT and IPC ELISA, respectively. An agreement of 86.7% was obtained between the two assays and the kappa coefficient was 0.71.

A total of 10.7% (56/522, CI95=[8.2-13.7]) and 27.2% (142/522, CI95=[23.4-31.2]) of the urine samples tested positive by RDT and IPC ELISA for anti-DENV IgA detection. Results were concordant for 81.2% of the urine specimens with a kappa coefficient of 0.42. The sensitivity of IgG and IgA antibody detection in urine by the ELISAs was significantly higher than the sensitivity of the RDTs (p-value  $\leq 0.001$  for IgG and IgA).

Anti-DENV IgM were not detected in urine specimens, either by RDT or by IPC ELISA.

The overall detection rates of anti-DENV IgG, IgM and IgA in saliva samples were respectively 34.8% (181/520, CI95=[30.7-39.1]), 11% (57/520, CI95=[8.4-14]) and 6.2% (32/520, CI95=[4.2-8.6]) with the RDTs, and 51.5% (268/520, CI95=[47.1-55.9]), 34.8% (181/520, CI95=[30.7-39.1]) and 22.7% (118/520, CI95=[19.2-26.5]) with IPC ELISAs. Percentages of agreement between RDTs and IPC ELISAs for IgG, IgM and IgA detection in saliva were 81%, 75.8% and 82.3%, respectively. The corresponding kappa coefficients were 0.62, 0.36 and 0.32. Saliva-based ELISAs were significantly more sensitive than saliva-based RDTs (p-value  $\leq 0.001$  for all antibodies).

In comparison, IPC ELISAs for IgG, IgM and IgA detection in the plasma specimens obtained at the same time point from the same patients demonstrated sensitivities of 53.3% (152/285, CI95=[47.4-59.2]), 34.6% (97/280, CI95=[29.1-40.5]) and 40.1% (116/289, CI95=[34.4-46]), respectively. The antibody detection rates obtained in plasma samples by IPC ELISAs were significantly higher than those obtained in saliva and urine specimens by RDTs and IPC ELISAs (p-value  $\leq 0.001$  for all parameters).

1  
2  
3  
4173 For each of the three different antibody isotypes, there was a direct relationship between the level of  
5  
6174 antibodies in the plasma samples and the percentage of positive urine and saliva samples tested by IPC  
7  
8  
9175 ELISAs and RDTs (Table 3).

10  
11176 The IgG saliva-based tests performed better with samples collected between DAOF 8-43. The RDT reached  
12  
13177 a maximum sensitivity of approximately 60% (61.5% at DAOF 8-14; 59.6% at DAOF 15-28; 57.1% at  
14  
15178 DAOF 29-43) and the IPC ELISA a sensitivity of 78% (79.5% at DAOF 8-14; 78.9% at DAOF 15-28;  
16  
17179 75.7% at DAOF 29-43) (Table 4). A total of 85% of the plasma samples collected between DAOF 8-43  
18  
19  
20180 tested positive. Three months after the onset of fever, the sensitivity dropped to 56.7% with the saliva-based  
21  
22181 ELISA and 10.8% with the saliva-based RDT, whereas IgG were detected in 66.7% of the corresponding  
23  
24182 plasma specimens (Table 4). The sensitivity of the IPC and RDT IgG urine-based tests peaked at DAOF 8-14  
25  
26183 (ELISA: 72.2%, RDT: 63.3%). Then, the sensitivity of the ELISA and the rapid test decreased gradually. At  
27  
28  
29184 DAOF 90-103, only 12.1% and 2.9% of the urine samples still tested positive by ELISA and RDT,  
30  
31185 respectively (Table 4).

32  
33186 The second week after the beginning of the disease was the optimal time to detect IgM in both saliva and  
34  
35187 plasma samples. The IgM detection rates in saliva samples by ELISA and RDT reached a maximum of  
36  
37188 69.2% and 24.4%, respectively, whereas 80.5% of the corresponding plasma samples tested positive by  
38  
39  
40189 MAC-ELISA (Table 4).

41  
42  
43190 All IgA tests demonstrated a maximal sensitivity at DAOF 8-14 (saliva: 64.4% with ELISA and 17.1% with  
44  
45191 RDT; urine: 67.1% with ELISA and 31.6% with RDT; plasma ELISA: 90.7%). No positive results were  
46  
47192 obtained with RDTs at DAOF 29-43 whereas 5.4% of the saliva, 5.7% of the urine and 41.7% of the plasma  
48  
49  
50193 samples tested positive by IPC ELISA. Three months after the onset of fever, anti-DENV IgA were not  
51  
52194 detected by saliva- and urine-based tests but 12.1% of the plasma samples still tested positive (Table 4).

53  
54  
55195 Regardless of the diagnostic test, ELISA or RDT, and the biological fluid tested, the detection rates of anti-  
56  
57196 DENV IgG and IgA isotypes were higher in samples collected from patients experiencing a secondary  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4197 infection (Table 5). With IPC and RDT tests designed for IgM detection in saliva and in plasma, no  
5  
6198 significant differences were observed between primary and secondary infections (Table 5).  
7  
8  
9  
10199 The antibody RDT was designed to concomitantly detect anti-DENV IgM and IgG. The combination of IgM  
11  
12200 and IgG results allowed an increase of the overall diagnostic sensitivity in saliva from 34.8% with the IgG  
13  
14201 results alone to 39.4% when both IgG and IgM were tested. This improvement in sensitivity was best for  
15  
16202 samples collected at DAOF 8-14 (9% increase) and DAOF 4-7 (7.1% increase). In comparison, 63.8% of the  
17  
18203 plasma samples tested positive for dengue when IPC MAC-ELISA and IPC IgG indirect ELISA results were  
19  
20  
21204 combined (Table 4).  
22  
23  
24205

## 27 Discussion 28206

29  
30  
31  
32207 The epidemiology of dengue is very dynamic both in terms of geographical spread and intensity.  
33  
34208 Transmission is emerging or reemerging in areas where the disease was absent and it is also intensifying in  
35  
36209 some regions where dengue was already endemic, with both an increase in the number of cases and an  
37  
38  
39210 increase in severity of the disease [13]. This dramatic increase in the global burden of dengue has lead to the  
40  
41211 willingness to develop easy tools for the disease diagnosis, to help in the early detection of new epidemics  
42  
43212 and assist physicians to provide accurate treatment and management of patients as early as possible. The  
44  
45213 ability to rapidly confirm acute dengue infection for patients presenting to a clinical setting could also avoid  
46  
47  
48214 the unnecessary use of antibiotics and other drugs.  
49  
50215 Saliva and urine specimens provide interesting advances for dengue diagnosis as their collection is non-  
51  
52216 invasive and thus well accepted by patients. In addition, it does not require medically-trained staff and the  
53  
54217 samples are easy to process as it does not require on-site laboratory for centrifugation. In a previous study,  
55  
56  
57218 we demonstrated that urine and saliva samples were interesting alternatives to venous blood specimens for  
58  
59219 dengue diagnosis in all situations when blood collection was difficult [11]. In this recent study, in-house  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4220 ELISAs for NS1 antigen and anti-DENV antibodies detection were developed and used as reference tests to  
5  
6221 assess the value of urine and saliva specimens for dengue diagnosis. Good salivary- and urinary-based RDTs  
7  
8  
9222 could be valuable tools for dengue diagnosis as they combine easy sampling methods with rapid, equipment-  
10  
11223 free testing. Such kits could be used by nurses, at the patient's bedside, in hospital settings but also by  
12  
13224 general practitioners in private clinics or by epidemiologists during outbreak investigations and field studies.  
14  
15  
16225 Some oral fluid RDTs have already been marketed for viral infection diagnosis. One  
17  
18226 immunochromatographic assay designed for anti-hepatitis C virus (HCV) antibody detection in saliva and at  
19  
20  
21227 least two anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibody detection kits have been commercialized. The  
22  
23228 anti-HCV antibodies device showed very good performances [14,15] and seemed to be an interesting tool for  
24  
25229 field work with people at risk of HCV infection [16,17]. The anti-HIV antibody oral fluid devices also  
26  
27230 demonstrated good performances but slightly lower than RDTs used for antibody detection in blood [18–20].  
28  
29  
30231 There is currently no rapid test designed for the diagnosis of viral infection in urine but good RDTs have  
31  
32232 been developed for bacterial antigen detection in urine, e.g. for *Legionella pneumophila* serogroup 1 and  
33  
34233 *Streptococcus pneumoniae* [21–23]. A rapid immunochromatographic test for *Plasmodium falciparum* HRP2  
35  
36234 antigen detection in urine is currently in clinical development and a preliminary evaluation reported a  
37  
38  
39235 sensitivity of 83.8% compared to blood smear microscopy, with a lower sensitivity in urine from patients  
40  
41236 with a low parasitemia [24].  
42  
43  
44237 This study was the first evaluation of rapid diagnostic tests designed by the Standard Diagnostics company to  
45  
46238 detect NS1 antigen and anti-DENV IgG, IgM and IgA in urine and saliva specimens. The present study  
47  
48  
49239 demonstrates differing performances of these kits in comparison to the in-house ELISAs that we previously  
50  
51240 developed. The RDT designed for the detection of NS1 in saliva lacked sensitivity and specificity compared  
52  
53241 to the in-house ELISA, resulting in a very low kappa coefficient (0.28). The results obtained by the NS1  
54  
55242 RDT with urine specimens were close to those observed with our reference ELISA with sensitivities of  
56  
57243 15.5% and 14.3%, respectively, and a kappa coefficient of 0.88. The slightly better performance observed  
58  
59  
60244 with the RDT in comparison to the ELISA can be explained by a reduced sensitivity of the IPC in-house  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4245 ELISA for the detection of NS1 protein from serotype 2 dengue viruses. Indeed all of the nine urine samples  
5  
6246 that tested positive with the RDT but negative with IPC ELISA were obtained from patients infected by  
7  
8247 DENV-2. The reduced specificity observed with the RDT in saliva specimens could be a consequence of a  
9  
10  
11248 non-specific adhesion of the conjugate to the nitrocellulose membrane. This phenomenon has been described  
12  
13249 with saliva but not with other body fluids. Indeed, mucin and other proteinaceous and viscous substances  
14  
15250 present in high concentration in saliva are believed to adhere to the membrane and aggregate with the  
16  
17251 conjugates causing non-specific reaction [25]. The IgG RDT demonstrated a good agreement with the in-  
18  
19  
20252 house reference IgG indirect ELISAs, in both saliva (kappa coefficient: 0.62) and urine (kappa coefficient:  
21  
22253 0.71) specimens. IgM and IgA RDTs performed less well in saliva and urine with sensitivities lower than  
23  
24254 50% even in patients with high levels of the corresponding antibody isotype in the plasma specimens  
25  
26255 collected at the same time-points. As previously described by Vasquez *et al.*, anti-DENV IgM were not  
27  
28  
29256 found in urine, either by in-house ELISA or by RDT [7]. The combination of IgG and IgM detection in the  
30  
31257 same device was thus not useful to test urine samples. In saliva specimens, the combination of IgM and IgG  
32  
33258 tests in the same device provided a slight improvement of the overall diagnostic sensitivity compared to the  
34  
35259 sensitivities of IgG and IgM tests taken separately (39.8% for the combination, 35.2% for IgG alone and  
36  
37  
38260 10.8% for IgM tested separately). Urine and saliva are biological fluids that contain very low levels of  
39  
40261 antibodies compared to blood [26,27]. It was estimated that the IgA, IgG and IgM levels in saliva specimens  
41  
42262 were approximately 1/10, 1/800 and 1/400 of those measured in serum [26]. RDTs designed by SD company  
43  
44263 only required 5 µl of saliva and 10 µl of urine. These volumes ensure correct performances of the kits for the  
45  
46  
47264 detection of anti-DENV antibodies in blood [28,29] but could be sub-optimal for the detection of antibodies  
48  
49265 present in lower concentrations in other body fluids. Indeed, Zhang et al. developed a rapid test for the  
50  
51266 detection of anti-DENV IgG in saliva but this assay required a volume of 100 µl [25].  
52  
53  
54267 The high viscosity of some saliva specimens was a interfering with the migration of the sample on the strip  
55  
56268 test. Invalid results with RDTs were obtained because of the non-appearance of the control line. The use of a  
57  
58  
59269 dilution buffer enabling to reduce the saliva viscosity could eventually prevent these migration issues as even  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4270 a freeze–thaw cycle that in theory should break down the mucopolysaccharides responsible of the viscosity  
5  
6271 did not provide any improvement.  
7  
8  
9  
10272 This study has several limitations. Saliva and urine samples were frozen for several months at -80°C before  
11  
12273 the evaluation and it is not known if this process could have altered the stability of the NS1 antigen or the  
13  
14274 antibodies. Additionally, the performances of these diagnostic kits were not evaluated for all four dengue  
15  
16275 virus serotypes as this study was conducted using well-characterized and sequential clinical samples  
17  
18276 prospectively collected during a DENV-1 epidemic, when the DENV-2 and DENV-4 were circulating at  
19  
20  
21277 lower level and no DENV-3 was detected. Specificity results should also be interpreted with caution as they  
22  
23278 were generated from a limited number of available negative controls.  
24  
25  
26  
27279  
28  
29

## 30 **Conclusions**

31280  
32  
33  
34  
35281 Although urine and oral fluid-based rapid diagnostic tests offer an attractive alternative option to blood for  
36  
37282 dengue diagnosis, this evaluation suggests that this first series of diagnostic tools developed by a commercial  
38  
39283 company would benefit from some further improvement especially in a context where the body fluids  
40  
41  
42284 explored are already known to perform less well compared to blood specimens for the diagnosis of dengue  
43  
44285 infection. As for any other diagnostic test evaluation, additional independent study would be beneficial in  
45  
46286 order to provide a better overview of the performances of these kits in different settings and epidemic  
47  
48  
49287 situations.  
50

51  
52288  
53  
54  
55289  
56  
57  
58290  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## List of abbreviations

- 292 DAOF: Day after onset of fever
- 293 DENV: Dengue virus
- 294 DENV-1,-2,-3,-4: Dengue virus serotype 1-4
- 295 ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
- 296 IPC: Institut Pasteur in Cambodia
- 297 RDT: Rapid diagnostic test
- 298 SD: Standard Diagnostics

## Competing interests

301 Philippe Buchy is currently a GSK employee.

## Authors' contributions

304 ACA designed the study, analyzed the data and drafted the manuscript. VD and SO contributed to samples  
305 collection. ACA and SR performed the laboratory analyses. PH and PD drafted the manuscript. PB designed  
306 the project, supervised the analysis, interpreted the data and drafted the paper. All authors read and approved  
307 the final manuscript.



1  
2  
3  
4  
5309  
6  
7  
8  
9310  
10  
11311  
12  
13  
14312  
15  
16  
17313  
18  
19  
20  
21314  
22  
23  
24  
25315  
26316  
27317  
28  
29318  
30319  
31320  
32  
33  
34321  
35322  
36  
37323  
38324  
39325  
40  
41326  
42327  
43328  
44  
45  
46329  
47330  
48331  
49  
50332  
51333  
52334  
53  
54  
55335  
56336  
57337  
58338  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Acknowledgements

The study was supported by Standard Diagnostics, Inc. The funders had no role in study design; in the collection; analysis and interpretation of data; in writing of the manuscript; or in the decision to submit the article for publication.

## References

1. 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: e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760
2. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, World Health Organization. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control.* New ed. Geneva: TDR : World Health Organization; 2009.
3. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 1189–1192.
4. Balmaseda A, Guzmán MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Téllez Y, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10: 317–322.
5. Nawa M, Takasaki T, Ito M, Inoue S, Morita K, Kurane I. Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12: 1235–1237. doi:10.1128/CDLI.12.10.1235-1237.2005
6. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, Mercado JC, Pérez L, Hammond SN, et al. Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *J Clin Virol.* 2008;43: 287–291. doi:10.1016/j.jcv.2008.07.016
7. Vázquez S, Cabezas S, Pérez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int J Infect Dis.* 2007;11: 256–262. doi:10.1016/j.ijid.2006.05.005
8. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnararatchakit K, Yoksan S, Flamand M, Sakuntabhai A. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71: 467–469. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.020



1  
2  
3  
4339 9. Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala A-MK, Kantele A, Vapalahti O. Approach to non-invasive  
5340 sampling in dengue diagnostics: Exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of  
6341 travelers with dengue. *J Clin Virol.* 2014; doi:10.1016/j.jcv.2014.08.021  
7  
8  
9342 10. Yap G, Sil BK, Ng L-C. Use of Saliva for Early Dengue Diagnosis. Lopes da Fonseca BA, editor.  
10343 *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e1046. doi:10.1371/journal.pntd.0001046  
11  
12344 11. Andries A-C, Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, Lorn Try P, et al. Value of Routine Dengue  
13345 Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: e0004100.  
14346 doi:10.1371/journal.pntd.0004100  
15  
16347 12. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control.  
17348 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997.  
18  
19349 13. Wilson ME, Chen LH. Dengue: Update on Epidemiology. *Curr Infect Dis Rep.* 2015;17: 457.  
20350 doi:10.1007/s11908-014-0457-2  
21  
22351 14. Lee SR, Yearwood GD, Guillon GB, Kurtz LA, Fischl M, Friel T, et al. Evaluation of a rapid, point-of-  
24352 care test device for the diagnosis of hepatitis C infection. *J Clin Virol.* 2010;48: 15–17.  
25353 doi:10.1016/j.jcv.2010.02.018  
26  
27354 15. Cha YJ, Park Q, Kang E-S, Yoo BC, Park KU, Kim J-W, et al. Performance evaluation of the  
28355 OraQuick hepatitis C virus rapid antibody test. *Ann Lab Med.* 2013;33: 184–189.  
29356 doi:10.3343/alm.2013.33.3.184  
30  
31357 16. Lee SR, Kardos KW, Schiff E, Berne CA, Mounzer K, Banks AT, et al. Evaluation of a new, rapid test  
33358 for detecting HCV infection, suitable for use with blood or oral fluid. *J Virol Methods.* 2011;172: 27–  
34359 31. doi:10.1016/j.jviromet.2010.12.009  
35  
36360 17. Parisi MR, Soldini L, Vidoni G, Mabellini C, Belloni T, Brignolo L, et al. Point-of-care testing for  
37361 HCV infection: recent advances and implications for alternative screening. *New Microbiol.* 2014;37:  
38362 449–457.  
39  
40363 18. Cappello JM, Gunasekera A, Gunasekera D, Esfandiari J, Ippolito T. A multicenter performance  
41364 evaluation of the DPP(®) HIV-1/2 assay for the detection of HIV antibodies in various HIV testing  
43365 algorithms. *J Clin Virol.* 2013;58 Suppl 1: e59–64. doi:10.1016/j.jcv.2013.08.032  
44  
45366 19. Stekler JD, O’Neal JD, Lane A, Swanson F, Maenza J, Stevens CE, et al. Relative accuracy of serum,  
46367 whole blood, and oral fluid HIV tests among Seattle men who have sex with men. *J Clin Virol.* 2013;58  
47368 Suppl 1: e119–122. doi:10.1016/j.jcv.2013.09.018  
48  
49369 20. Jaspard M, Le Moal G, Saberan-Roncato M, Plainchamp D, Langlois A, Camps P, et al. Finger-stick  
50370 whole blood HIV-1/-2 home-use tests are more sensitive than oral fluid-based in-home HIV tests. *PloS*  
51371 *One.* 2014;9: e101148. doi:10.1371/journal.pone.0101148  
52  
53372 21. Helbig JH, Uldum SA, Lück PC, Harrison TG. Detection of Legionella pneumophila antigen in urine  
54373 samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax  
56374 Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA. *J Med*  
57375 *Microbiol.* 2001;50: 509–516.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

22. Weatherall C, Paoloni R, Gottlieb T. Point-of-care urinary pneumococcal antigen test in the emergency department for community acquired pneumonia. *Emerg Med J.* 2008;25: 144–148. doi:10.1136/emj.2007.050179

23. Bruin JP, Peeters MF, Ijzerman EPF, Diederens BMW. Evaluation of Legionella V-TesT for the detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29: 899–900. doi:10.1007/s10096-010-0932-0

24. Oguonu T, Shu E, Ezeonwu BU, Lige B, Derrick A, Umeh RE, et al. The performance evaluation of a urine malaria test (UMT) kit for the diagnosis of malaria in individuals with fever in south-east Nigeria: cross-sectional analytical study. *Malar J.* 2014;13: 403. doi:10.1186/1475-2875-13-403

25. Zhang Y, Bai J, Ying JY. A stacking flow immunoassay for the detection of dengue-specific immunoglobulins in salivary fluid. *Lab Chip.* 2015;15: 1465–1471. doi:10.1039/c4lc01127a

26. Parry JV, Perry KR, Mortimer PP. Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum. *Lancet.* 1987;2: 72–75.

27. D’Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int.* 2003;63: 809–825. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00840.x

28. Wang SM, Sekaran SD. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83: 690–695. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0117

29. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8: e3171. doi:10.1371/journal.pntd.0003171

1  
2  
3  
4  
5400  
6  
7401  
8  
9  
10402  
11  
12403  
13  
14404  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27405  
28406  
29407  
30  
31408  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Tables

**Table 1: Detection rate of NS1 in urine and saliva samples**

The detection rates of NS1 in urine and saliva samples are presented according to the NS1 level in the corresponding plasma samples

	Urine		Saliva	
	IPC NS1 capture ELISA	NS1 RDT	IPC NS1 capture ELISA	NS1 RDT
Weakly positive plasma	10.3% (3/29)	10.3% (3/29)	13.3% (2/15)	20% (3/15)
Averagely positive plasma	16.7% (9/54)	16.7% (9/54)	48.5% (16/33)	18.2% (6/33)
Highly positive plasma	50% (17/34)	50% (17/34)	64.7% (11/17)	47.1% (8/17)
p-value <sup>a</sup>	<0.001	<0.001	0.011	0.094

<sup>a</sup> Comparison of NS1 positive rate in urine or saliva from patients whose corresponding plasma tested weakly, averagely or highly positive by NS1 ELISA

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 2: Sensitivity of the different diagnostic tools for NS1 detection in plasma, urine and saliva**

The sensitivity of the different diagnostic tools for NS1 detection in plasma, urine and saliva of DENV-infected patients is presented according to the time of sampling after the onset of the fever and the immune status of the patients.

			Total	Primary infection	Secondary infection
Plasma	ELISA	All samples	66% (159/241)	95.7% (66/69)	51.1% (69/135)
		DAOF ≤ 3	94.4% (67/71)	100% (29/29)	88.6% (31/35)
		DAOF 4-7	66.7% (82/123)	93.9% (31/33)	51.4% (36/70)
		DAOF 8-12	21.3% (10/47)	85.7% (6/7)	6.7% (2/30)
Urine	ELISA	All samples	14.3% (63/440)	18.3% (23/126)	8.1% (20/246)
		DAOF ≤ 3	9.9% (8/81)	15.6% (5/32)	2.4% (1/41)
		DAOF 4-7	19.2% (52/271)	21.5% (17/79)	12.3% (19/154)
		DAOF 8-12	3.4% (3/88)	6.7% (1/15)	0% (0/51)
Urine	RDT	All samples	15.5% (68/440)	18.3% (23/126)	10.6% (26/246)
		DAOF ≤ 3	11.1% (9/81)	15.6% (5/32)	4.9% (2/41)
		DAOF 4-7	21% (57/271)	21.5% (17/79)	15.6% (24/154)
		DAOF 8-12	2.3% (2/88)	6.7% (1/15)	0% (0/51)
Saliva	ELISA	All samples	24.7% (72/291)	43.5% (37/85)	15.5% (27/174)
		DAOF ≤ 3	25.5% (12/47)	41.2% (7/17)	19.2% (5/26)
		DAOF 4-7	29.9% (55/184)	46.7% (28/60)	19.4% (21/108)
		DAOF 8-12	8.3% (5/60)	25% (2/8)	2.5% (1/40)
Saliva	RDT	All samples	20.8% (60/289) **	31% (26/84) *	16.2% (28/173) *
		DAOF ≤ 3	14.9% (7/47)	23.5% (4/17)	11.5% (3/26)
		DAOF 4-7	25.7% (47/183) *	33.9% (20/59) *	19.4% (21/108) *
		DAOF 8-12	10.2% (6/59) *	25% (2/8)	10.3% (4/39) *

DAOF: Day After Onset of Fever

\* One invalid result

\*\* Two invalid results



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 3: Detection rate of antibodies in urine and saliva samples**

The detection rates of antibodies in urine and saliva samples are presented according to the level of the immunoglobulin in the corresponding plasma samples.

		Urine		Saliva	
		IPC ELISA	RDT	IPC ELISA	RDT
IgG	Weakly positive plasma	48.1% (13/27)	29.6% (8/27)	48.1% (13/27)	29.6% (8/27)
	Averagely positive plasma	50% (41/82)	36.6% (30/82)	74.4% (61/82)	48.8% (40/82)
	Highly positive plasma	72.1% (31/43)	62.8% (27/43)	93% (40/43)	67.4% (29/43)
	p-value <sup>a</sup>	0.041	0.006	<0.001	0.008
IgM	Weakly positive plasma	0% (0/25)	0% (0/25)	40% (10/25)	8% (2/25)
	Averagely positive plasma	0% (0/54)	0% (0/54)	83.3% (45/54)	22.2% (12/54)
	Highly positive plasma	0% (0/18)	0% (0/18)	100% (18/18)	44.4% (8/18)
	p-value <sup>a</sup>	1	1	<0.001	0.019
IgA	Weakly positive plasma	18.2% (6/33)	0% (0/33)	12.1% (4/33)	0% (0/33)
	Averagely positive plasma	50% (31/62)	27.4% (17/62)	62.3% (38/61) *	13.1% (8/61) *
	Highly positive plasma	100% (21/21)	71.4% (15/21)	81% (17/21)	23.8% (5/21)
	p-value <sup>a</sup>	<0.001	<0.001	<0.001	0.021

<sup>a</sup> Comparison of antibodies positive rate in urine or saliva from patients whose corresponding plasma tested weakly, averagely or highly positive for the same biomarker

\* One invalid result



1  
2  
3  
4437  
5  
6438  
7  
8  
9439  
10440  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48441  
49442  
50  
51443  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 4: Sensitivity of the different diagnostic tools for IgG, IgM and IgA detection**

The sensitivity of the different diagnostic tools for IgG, IgM and IgA detection in plasma, urine and saliva is presented according to the time of sampling after the onset of fever.

		DAOF (Day after onset of fever)						
		1-3	4-7	8-14	15-28	29-43	90-103	Total
Plasma ELISA	IgG	3.8% (2/53)	48.2% (54/112)	85.7% (36/42)	NA	84.4% (38/45)	66.7% (22/33)	53.3% (152/285)
	IgM	3.9% (2/51)	49.1% (55/112)	81% (34/42)	NA	13.6% (6/44)	0% (0/31)	34.6% (97/280)
	IgG or IgM	8.2% (4/49)	64% (71/111)	100% (42/42)	NA	82.9% (34/41)	78.6% (22/28)	63.8% (173/271)
	IgA	3.8% (2/53)	47% (54/115)	90.5% (38/42)	NA	40.4% (19/47)	9.4% (3/32)	40.1% (116/289)
Saliva ELISA	IgG	5.4% (3/56)	38.2% (86/225)	79.5% (62/78)	78.9% (45/57)	75.7% (53/70)	55.9% (19/34)	51.5% (268/520)
	IgM	3.6% (2/56)	44.4% (100/225)	69.2% (54/78)	35.1% (20/57)	7.1% (5/70)	0% (0/34)	34.8% (181/520)
	IgG or IgM	8.9% (5/56)	56.9% (128/225)	92.3% (72/78)	94.7% (54/57)	77.1% (54/70)	55.9% (19/34)	63.8% (332/520)
	IgA	0% (0/57)	24.8% (55/222)	64.4% (49/76)	18.2% (10/55)	5.4% (4/74)	0% (0/36)	22.7% (118/520)
Saliva RDT	IgG	0% (0/56)	24.9% (56/225)	61.5% (48/78)	59.6% (34/57)	57.1% (40/70)	8.8% (3/34)	34.8% (181/520)
	IgM	0% (0/56)	15.6% (35/225)	24.4% (19/78)	3.5% (2/57)	1.4% (1/70)	0% (0/34)	11% (57/520)
	IgG or IgM	0% (0/56)	32% (72/225)	70.5% (55/78)	61.4% (35/57)	57.1% (40/70)	8.8% (3/34)	39.4% (205/520)
	IgA	1.8% (1/57)	8.1% (18/222)	17.1% (13/76)	0% (0/55)	0% (0/74)	0% (0/36)	6.2% (32/520)
Urine ELISA	IgG	3.3% (2/61)	41.3% (93/225)	71.8% (56/78)	58.5% (31/53)	34.3% (24/70)	12.1% (4/33)	40.4% (210/520)
	IgA	0% (0/61)	25.7% (58/226)	67.1% (53/79)	50.9% (27/53)	5.7% (4/70)	0% (0/33)	27.2% (142/522)
Urine RDT	IgG	0% (0/61)	25.8% (58/225)	62.8% (49/78)	45.3% (24/53)	18.6% (13/70)	3% (1/33)	27.9% (145/520)
	IgA	0% (0/61)	11.5% (26/226)	31.6% (25/79)	9.4% (5/53)	0% (0/70)	0% (0/33)	10.7% (56/522)

DAOF: Day After the Onset of Fever

NA: no sample available

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

444 **Table 5: Sensitivity of the different tools for IgG, IgM and IgA detection**

445 The sensitivity of the different tools for IgG, IgM and IgA detection in plasma, urine and saliva is presented according  
446 to the patients' immune status

		Plasma	Saliva		Urine	
		IPC ELISA	IPC ELISA	RDT	IPC ELISA	RDT
IgG	Primary	16.1% (13/81)	13.2% (19/144)	8.3% (12/144)	5.6% (8/143)	1.4% (2/143)
	Secondary	72.9% (124/170)	68% (208/306)	48% (147/306)	56.8% (171/301)	39.2% (118/301)
	p-value <sup>a</sup>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
IgM	Primary	31.2% (24/77)	33.3% (48/144)	11.1% (16/144)	0% (0/143)	0% (0/143)
	Secondary	37.1% (62/167)	34% (104/306)	7.5% (23/306)	0% (0/301)	0% (0/301)
	p-value <sup>a</sup>	0.365	0.891	0.206	1	1
IgA	Primary	12.7% (10/79)	2.9% (4/140)	2.1% (3/140)	4.2% (6/143)	4.2% (6/143)
	Secondary	53.2% (91/171)	30.5% (92/302)	6.6% (20/302)	38.5% (116/301)	14.3% (43/301)
	p-value <sup>a</sup>	<0.001	<0.001	0.049	<0.001	0.002

447 <sup>a</sup> Comparison of sensitivity between primary and secondary infection

448

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## **Additional files**

**Additional file 1. Characteristics of the rapid diagnostic tests for NS1, anti-DENV IgG/IgM and anti-DENV IgA detection in saliva and urine according to the manufacturer's instructions.**

**Format: PDF**

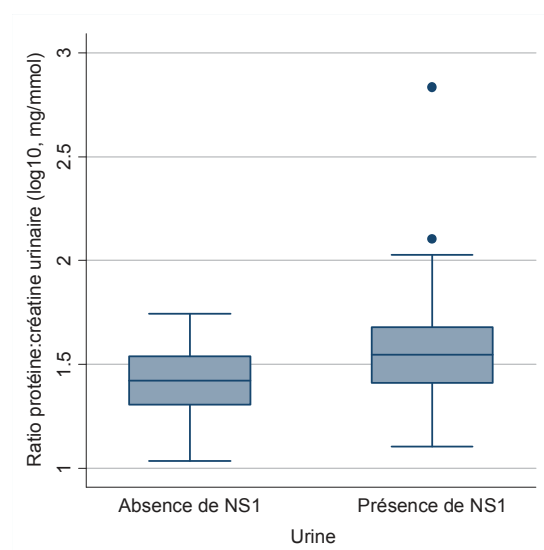
**Additional file 1. Characteristics of the rapid diagnostic tests for NS1, anti-DENV IgG/IgM and anti-DENV IgA detection in saliva and urine according to the manufacturer.**

	<b>Test 1</b>	<b>Test 2</b>	<b>Test 3</b>	<b>Test 4</b>	<b>Test 5</b>	<b>Test 6</b>
<b>Marker</b>	NS1	IgM and IgG	IgA	NS1	IgM and IgG	IgA
<b>Biologic fluid</b>	Saliva	Saliva	Saliva	Urine	Urine	Urine
<b>Volume of sample</b>	100 µl	5 µl	5 µl	100 µl	10 µl	10 µl
<b>Volume of diluent</b>	no diluent	~ 120 µl	~ 120 µl	no diluent	~ 120 µl	~ 120 µl
<b>Reading time</b>	20 minutes	20 minutes	20 minutes	15 to 20 minutes	15 to 20 minutes	15 to 20 minutes

## 4. Résultats complémentaires

Le travail sur la détection de la NS1 dans l'urine a été approfondi. L'étude des paires plasma/urine (échantillons de plasma et d'urine prélevés chez le même patient, le même jour) montre que lorsque le plasma est positif, la NS1 est détectée dans 23% (49/213) des urines provenant de patients avec une dengue non sévère alors qu'elle est détectée dans 31,7% (32/101) des urines prélevées chez des patients avec une dengue sévère. La différence n'est néanmoins pas statistiquement significative ( $p$ -value=0.101). Chuansumrit *et al.* avaient déjà mis en évidence une telle différence et suggéré que la détection de la NS1 dans l'urine puisse servir à identifier les patients à risque de développer une forme grave de la maladie [191].

Une étude menée par Korhonen *et al.* a montré que l'excrétion de NS1 dans l'urine était positivement corrélée à la concentration des protéines totales des urines [189]. L'analyse du ratio protéine/créatinine urinaire mesuré dans 68 urines provenant de patients ayant de la NS1 détectable dans leur plasma indique un UPCR significativement plus élevé dans les échantillons d'urine contenant de la NS1 (médiane=35,2 mg/mmol, valeurs interquartiles=[25,6-47,6]) que dans ceux qui n'en comportent pas (médiane=26,4 mg/mmol, valeurs interquartiles=[20,2-34,6]) (figure 17), confirmant les résultats de Korhonen *et al.* Il aurait été intéressant de mesurer l'UPCR dans tous les échantillons inclus dans notre étude et d'inclure ce paramètre dans le modèle statistique. Cela nous aurait probablement permis d'augmenter la performance du modèle.



**Figure 17 : Comparaison du ratio protéine/créatinine urinaire dans les urines contenant ou ne contenant pas de NS1**



## 5. Conclusion et perspectives

Bien que les performances des différentes méthodes de diagnostic ne soient pas aussi bonnes avec l'urine et la salive qu'avec le plasma, les résultats obtenus pour la détection du génome viral et des anticorps anti-DENV démontrent l'intérêt que peut avoir l'utilisation de ces deux fluides biologiques pour le diagnostic de la dengue dans des situations au cours desquelles il est compliqué d'obtenir du sang. Cela est particulièrement vrai pour les études épidémiologiques. En effet, le désavantage causé par la diminution de sensibilité est en partie compensé par la facilité d'obtention de l'urine et de la salive, par une meilleure acceptabilité de la part des populations ainsi que par une logistique simplifiée. Un premier exemple d'utilisation de la salive au cours d'une étude sur l'impact de la mobilisation communautaire sur le contrôle vectoriel et la prévention de la dengue a récemment été publié [204]. Au cours de ce travail, une enquête séro-épidémiologique (détection des IgG anti-DENV) a été menée chez les enfants âgés de trois à neuf ans avec uniquement des échantillons de salive. Seul 0,4% (37/9536) des enfants ont refusé de donner un échantillon et les résultats de l'étude se sont révélés concluants. Cet exemple d'étude qui ne requière pas forcément un test avec une sensibilité maximale illustre tout à fait l'intérêt de l'utilisation de la salive. L'utilisation de la salive en remplacement du sang pour la détection des anticorps, et plus particulièrement des IgG comme l'ont montré Balmaseda *et al.* [197], pourrait permettre d'aider à la mise en place d'étude épidémiologique pour mesurer l'incidence réelle de la dengue et d'évaluer l'importance des infections asymptomatiques. L'étude récente de Bhatt *et al.* a en effet révélé une très large sous-estimation de l'incidence de la dengue [4]. Alors qu'en 2009 l'OMS estimait que plus de 50 millions d'individus étaient touchés annuellement par la maladie, l'estimation de Bhatt *et al.* fait état de 390 millions d'infection par an parmi lesquels 96 millions s'accompagnent de manifestations cliniques. Concernant les infections asymptomatiques, les différentes études réalisées afin de chiffrer ce phénomène donnent des pourcentages très différents, allant de 42% à 93% [48]. Des études épidémiologiques de grande ampleur sont nécessaires pour parvenir à estimer au plus juste l'incidence réelle de la dengue et le pourcentage des infections asymptomatiques. Néanmoins à cause des coûts logistiques importants pour réaliser les collectes de sang, de nombreux pays ne sont pas en mesure de mettre en place de telles études. L'utilisation de salive permettrait de réduire sensiblement ces coûts.

Dans notre étude, nous ne sommes pas parvenus à isoler le virus, probablement en raison d'une charge virale trop faible. Il serait donc intéressant de tester à nouveau la présence de virus infectieux en inoculant des moustiques avec des échantillons d'urine positifs en PCR. Ce système d'isolement est plus sensible que l'isolement sur cellules C6/36 ou Vero E6 [205]. D'autres techniques de concentration du virus pourraient aussi être envisagées. Il est en effet possible de concentrer le DENV à l'aide de billes magnétiques recouvertes de polymères anioniques [206] ou de nanoparticules d'or recouvertes de polysaccharides sulfates [207]. Le DENV possédant des propriétés agglutinantes, une concentration avec des globules rouges pourrait également être tentée. Cette approche a déjà été utilisée pour concentrer les virus de la grippe à partir d'importants volumes d'eau [208].

L'évaluation des différents tests rapides développés par l'entreprise Standard Diagnostics a montré que l'urine et la salive ne peuvent pas être utilisées de la même façon que le sang avec leurs tests rapides. En effet, les kits développés ont des caractéristiques semblables à celles des tests utilisés pour le sang, aussi bien en termes de volume d'échantillon requis que de temps d'incubation, mais des problèmes de sensibilité et de spécificité ont été observés. Néanmoins l'idée de mettre au point des TDR à utiliser avec des échantillons d'urine ou de salive est très prometteuse car de tels tests combinerait facilité d'obtention de l'échantillon et facilité technique du test.

## **QUATRIEME PARTIE**

### **La protéinurie : un potentiel marqueur de sévérité?**

---

## 1. Contexte et objectifs de l'étude

A l'heure actuelle, lorsqu'un patient se présente dans un centre de soin avec une fièvre qui dure depuis quelques jours et que le médecin suspecte ou diagnostique une infection par le DENV, il est impossible de prédire cliniquement ou biologiquement si le patient va évoluer vers une forme sévère de la maladie au moment de la défervescence thermique ou s'il va guérir spontanément sans complication. Il est donc difficile pour les cliniciens de déterminer quels patients doivent être hospitalisés. Un marqueur aisé à tester, permettant de distinguer les deux populations de patients serait d'une grande utilité clinique et permettrait notamment lors des épidémies de grande ampleur d'aider à trier les patients et d'éviter au maximum de surcharger les hôpitaux. Un article publié récemment, décrivant la situation à Delhi en Inde, expose très bien le problème de surcharge qui survient lors de flambées épidémiques. L'article fait état de deux enfants décédés d'une dengue suite à l'impossibilité des hôpitaux publics, surchargés par l'affluence massive de cas de dengue, à les prendre en charge. Issus de familles trop pauvres pour payer une hospitalisation dans une clinique privée, les patients sont restés sans soins et sont décédés [209].

Les formes sévères de la dengue sont caractérisées par une fuite plasmatique, avec ou sans hémorragies. Le(s) mécanisme(s) responsable(s) de cette fuite ne sont, à l'heure actuelle, pas clairement identifié(s). Une altération du glycocalyx endothélial pourrait être une explication à l'augmentation de la perméabilité vasculaire [54,55,201]. Cette matrice anionique, située à la surface apicale de toutes les cellules endothéliales, permet de retenir et de concentrer les protéines plasmatiques dans le compartiment vasculaire, créant ainsi une pression oncotique responsable de la réabsorption des liquides interstitiels. L'altération du glycocalyx entraîne une fuite protéique, une modification de la pression oncotique dans les vaisseaux et une accumulation liquidienne dans le troisième compartiment, sous forme par exemple d'épanchement pleural ou d'ascite. Au niveau des glomérules rénaux, l'endothélium est spécialisé et comporte des fenestrations afin d'assurer la filtration du sang et l'élimination des déchets. La présence du glycocalyx permet d'empêcher la fuite des macromolécules et des protéines chargées négativement, comme l'albumine. Une altération du glycocalyx liée à l'infection par le DENV pourrait donc se traduire par une plus forte excrétion de protéines dans l'urine. Une étude menée par Wills *et al.* a montré l'augmentation de la clairance de

plusieurs protéines (albumine, transferrine, antithrombine et IgG) dans l'urine de patients atteints d'une dengue sévère, en état de choc [201]. La protéinurie pourrait donc constituer un marqueur de sévérité de la dengue.

Dans cette étude, l'utilité de bandelettes urinaires pour la détection des protéines dans l'urine afin d'assurer un meilleur triage des patients avant leur admission à l'hôpital a été étudiée. Afin de caractériser au mieux la protéinurie qui a lieu lors de l'infection par le DENV, une analyse quantitative par mesure du ratio protéine/créatinine (UPCR) avec des échantillons prélevés à différents moments lors de l'hospitalisation a été réalisée. Quelques électrophorèses des protéines urinaires ont aussi été faites.

### 3.1. Principaux résultats

Au cours de cette étude rétrospective, nous avons montré que 49,2% (39/91) des patients avec une dengue confirmée ont une protéinurie détectable par bandelette urinaire lorsqu'ils se présentent à l'hôpital. La protéinurie est plus fréquemment observée chez les patients présentant les formes les plus sévères de la maladie (dengue sévère selon la classification OMS de 2009 ou DSS selon la classification OMS de 1997). Les probabilités de détecter une protéinurie par bandelette chez un patient sans signes d'alertes (38,1%) et avec signes d'alertes (32%) ainsi que chez un patient DF (36,4%) et chez un patient DHF (29,6%) ne sont pas significativement différentes. Le ratio protéine/créatinine a été mesuré dans 43 des échantillons testés par bandelette. En définissant une protéinurie significative par un UPCR  $\geq 45$  mg/mmol [210], une concordance de seulement 67,4% a été obtenue entre les résultats des deux techniques. Les discordances sont majoritairement observées parmi les échantillons positifs par bandelette urinaire. En effet, seuls 10 des 23 (43,5%) échantillons positifs par bandelette ont une valeur d'UPCR dépassant 45 mg/mmol.

En prenant en compte toute la durée de l'hospitalisation, 30,4% (21/69) des patients avec une infection par le DENV présentent une protéinurie significative, estimée par mesure de l'UPCR, durant leur hospitalisation. Parmi ces patients, 33,3% ne présentent pas de signes d'alerte, 23,3% ont des signes d'alerte et 47,1% ont été admis à l'hôpital pour une dengue sévère. En n'incluant que les échantillons prélevés au moment de la première consultation médicale à l'hôpital, aucun patient sans signes



d'alerte ne présente de protéinurie significative alors qu'un UPCr  $\geq 45$  mg/mmol existe chez 16,1% et 50% des patients avec signes d'alerte et avec une dengue sévère, respectivement. Cela démontre une bonne spécificité de l'UPCR à détecter les patients nécessitant une hospitalisation mais la sensibilité est par contre faible.

Nous nous sommes intéressés au lien entre protéinurie et hypoprotéinémie – signe de fuite plasmatique – mais nous ne sommes pas parvenus à montrer une corrélation entre UPCr et concentration sérique en protéines totales. Une protéinurie a néanmoins été plus fréquemment observée chez les patients présentant une hypoprotéinémie que chez les patients avec une concentration sérique en protéines totales normale (38,1% versus 10%).

L'étude multivariée a montré que l'UPCR augmente au cours de la maladie pour atteindre un pic sept jours après le début de la fièvre. Le ratio diminue ensuite et un mois après la phase aiguë de la maladie les patients ont des valeurs d'UPCR normales. Quelle que soit la forme de la maladie, les valeurs médianes d'UPCR mesurées durant la phase aiguë ou de convalescence précoce (jusqu'au onzième jour après le début de la fièvre) chez les patients avec une dengue sont plus élevées que celles obtenues chez des contrôles sains.

L'analyse par électrophorèse des protéines de 27 urines prélevées au moment de l'admission des patients à l'hôpital a permis de mettre en évidence un profil normal pour 11,1% des échantillons, une protéinurie de type tubulaire pour 51,9% des échantillons, de type glomérulaire dans 22,2% des cas, et une protéinurie mixte pour 14.8% des échantillons.

### 3.2. Article

#### **Article 4: Proteinuria in paediatric dengue fever cases**

Andries AC, Duong V, Cappelle J, Ong S, Kerleguer A, Ly S, Tarantola A, Horwood P, Dussart P, Buchy P.

Soumis à BMC Infectious Diseases en décembre 2015.

**BMC Infectious Diseases**  
**Proteinuria in paediatric dengue fever cases**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	INFD-D-15-00918R1	
<b>Full Title:</b>	Proteinuria in paediatric dengue fever cases	
<b>Article Type:</b>	Research article	
<b>Section/Category:</b>	Viral diseases	
<b>Funding Information:</b>	282378 (FP7/2007/2011)	Not applicable
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background</b>          One of the major challenges for dengue diagnostic and clinical management is to predict which patients are likely to develop complications and a severe form of the disease. Simple, effective and cheap tests are needed to identify patients at risk. A rise in urinary protein excretion due to dengue-related increase in vascular permeability has been described. Simple tests for the detection of protein excretion in urine may therefore be useful to identify patients at risk for severe dengue.</p> <p><b>Methods</b>          In this retrospective study, 91 urine samples collected at the time of admission to hospital in patients presenting with a dengue infection and 15 samples from healthy controls were screened for proteinuria using a dipstick test. Proteinuria was also quantified by urine protein:creatinine ratio (UPCR) in 169 urine samples collected during the course of hospitalization from 69 patients with confirmed dengue infection. Additionally, urine protein electrophoresis was performed in 27 samples obtained from dengue patients.</p> <p><b>Results</b>          The dipstick tested positive in 32.0% and 38.1% of the patients presenting at hospital with laboratory-confirmed dengue with or without warning signs, respectively. A total of 20.0% of the healthy control individuals also tested positive by dipstick. Among dengue patients, UPCR increased during the critical phase of the disease; peaking approximately one week after the onset of fever then decreasing as the patients recovered. Patients with a dengue infection with warning signs and patients with severe dengue were more likely to present with significant proteinuria defined by a UPCR <math>\geq 45</math> mg/mmol at the time of hospital admission compared to patients without warning signs. The sensitivity of this biological marker, however, was limited as only 16.1% of the patients with warning signs had a UPCR <math>\geq 45</math> mg/mmol. Urine protein electrophoresis showed that both tubular and glomerular proteinuria could occur during dengue infection.</p> <p><b>Conclusions</b>          Simple point-of-care urine dipstick and UPCR tests do not seem to be very valuable for the triage of the patients at the time of the initial medical consultation but the observation of a decrease of the UPCR during the course of the illness appears to indicate a favorable evolution towards recovery.</p>	
<b>Corresponding Author:</b>	Philippe Buchy, M.D., Ph.D. Institut Pasteur Cambodia Phnom Penh, CAMBODIA	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Institut Pasteur Cambodia	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Anne-Claire Andries, MSc	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Anne-Claire Andries, MSc	

*Powered by Editorial Manager® and Prodxion Manager® from Aries Systems Corporation*

	Veasna Duong, MD, PhD
	Julien Cappelle, DVM, PhD
	Sivuth Ong, MD
	Alexandra Kerleguer, MD
	Sowath Ly, MD, PhD
	Arnaud Tarantola, MD, MSc
	Paul Horwood, PhD
	Philippe Dussart, PharmD, PhD
	Philippe Buchy, M.D., Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Response to Reviewers:</b>	<p>This is a well-written paper describing a potentially clinically useful application of this simple test in resource-limited, dengue hyperendemic countries - and I note the various teams working (and competing) in this field.</p> <p>A few points for the authors:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Please change the title to show this is a study in children, e.g. "Proteinuria in paediatric dengue fever cases" - this will help to distinguish this from the other competing studies.</li> </ul> <p>We agree with the Reviewer's suggestion and have modified the title accordingly.</p> <p>Also children have slightly different patterns of clinical outcomes than adults from dengue infection, which leads me to my second point:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Were any dengue IgG/IgM tests performed? If yes, they should be included in Table 1 together with the daof indicated - this is useful to see if the current dengue acute infection is on the background of any pre-existing immunity/past-infection to dengue, which may affect the clinical progress and outcomes - and have a potential impact on the proteinuria analysis</li> </ul> <p>We would like to thank the Reviewer for this excellent suggestion. In this work, we actually did not use IgG/IgM ratios but Hemagglutination Inhibition Assay to classify the patients into primary or secondary infections (please see the Material and Method section and Table 1). We conducted the analysis suggested and the result and discussion sections have now been updated. Basically, we observed that the occurrence of proteinuria episodes and their magnitude, estimated by UPCR, were not associated with the immune status of the patients.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- The authors need to exclude any other potential causes of proteinuria that may confound their findings - including any other possible primary viral infections, like CMV, EBV, enterovirus and adenovirus infections (not uncommon in this age group), which may also impact on their findings/interpretations. If these other tests were not or could not be done, the authors should note this as a possible limitation to their study.</li> </ul> <p>We fully agree with the Reviewer. We initially planned to conduct some additional virological tests but unfortunately, because of the limited volume of blood that could be obtained in young children with the consent of the parents and in the frame of the authorization delivered by the National Ethics Committee, we had only small volumes of plasma left, and only for few children. We have acknowledged this limitation in the revised version of the manuscript: "Another limitation of the study is that we were not able to explore potential confounding factors as number of other etiology of proteinuria do exist, including primary viral infections that are not uncommon in children (e.g., adenovirus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, enterovirus, etc.)."</p>

Click here to view linked References

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Proteinuria in paediatric dengue fever cases.

Anne-Claire Andries<sup>1</sup>, Veasna Duong<sup>1</sup>, Julien Cappelle<sup>2,3</sup>, Sivuth Ong<sup>1</sup>, Alexandra Kerleguer<sup>4</sup>, Sowath Ly<sup>2</sup>, Arnaud Tarantola<sup>2</sup>, Paul F. Horwood<sup>1</sup>, Philippe Dussart<sup>1</sup>, Philippe Buchy<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Institut Pasteur in Cambodia, International Network of Pasteur Institutes, Virology Unit, Phnom Penh, Cambodia.

<sup>2</sup> Institut Pasteur in Cambodia, International Network of Pasteur Institutes, Epidemiology and Public Health Unit, Phnom Penh, Cambodia.

<sup>3</sup> Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), Département ES, Unité AGIRs, Montpellier, France

<sup>4</sup> Institut Pasteur in Cambodia, International Network of Pasteur Institutes, Medical laboratory, Phnom Penh, Cambodia.

<sup>5</sup> GlaxoSmithKline, Vaccines R&D, Scientific Affairs and Public Health, Singapore.

\* Corresponding author. E-mail: [buchyphilippe@hotmail.com](mailto:buchyphilippe@hotmail.com)

Email :

Anne-Claire Andries [acandries@pasteur-kh.org](mailto:acandries@pasteur-kh.org)

Veasna Duong [dveasna@pasteur-kh.org](mailto:dveasna@pasteur-kh.org)

Julien Cappelle [julien.cappelle@cirad.fr](mailto:julien.cappelle@cirad.fr)

Sivuth Ong [sivuth@pasteur-kh.org](mailto:sivuth@pasteur-kh.org)

Alexandra Kerleguer [akerleguer@pasteur-kh.org](mailto:akerleguer@pasteur-kh.org)

Sowath Ly, [lsowath@pasteur-kh.org](mailto:lsowath@pasteur-kh.org)

Arnaud Tarantola, [atarantola@pasteur-kh.org](mailto:atarantola@pasteur-kh.org)

Paul Horwood [phorwood@pasteur-kh.org](mailto:phorwood@pasteur-kh.org)

Philippe Dussart [pdussart@pasteur-kh.org](mailto:pdussart@pasteur-kh.org)

Philippe Buchy [buchyphilippe@hotmail.com](mailto:buchyphilippe@hotmail.com)



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## **Abstract**

### **Background**

One of the major challenges for dengue diagnostic and clinical management is to predict which patients are likely to develop complications and a severe form of the disease. Simple, effective and cheap tests are needed to identify patients at risk. A rise in urinary protein excretion due to dengue-related increase in vascular permeability has been described. Simple tests for the detection of protein excretion in urine may therefore be useful to identify patients at risk for severe dengue.

### **Methods**

In this retrospective study, 91 urine samples collected at the time of admission to hospital in patients presenting with a dengue infection and 15 samples from healthy controls were screened for proteinuria using a dipstick test. Proteinuria was also quantified by urine protein:creatinine ratio (UPCR) in 169 urine samples collected during the course of hospitalization from 69 patients with confirmed dengue infection. Additionally, urine protein electrophoresis was performed in 27 samples obtained from dengue patients.

### **Results**

The dipstick tested positive in 32.0% and 38.1% of the patients presenting at hospital with laboratory-confirmed dengue with or without warning signs, respectively. A total of 20.0% of the healthy control individuals also tested positive by dipstick. Among dengue patients, UPCR increased during the critical phase of the disease; peaking approximately one week after the onset of fever then decreasing as the patients recovered. Patients with a dengue infection with warnings signs and patients with severe dengue were more likely to present with significant proteinuria defined by a UPCR  $\geq 45$  mg/mmol at the time of hospital admission compared to patients without warning signs. The sensitivity of this biological marker, however, was limited as only 16.1% of the patients with warning signs had a UPCR  $\geq 45$  mg/mmol. Urine protein electrophoresis showed that both tubular and glomerular proteinuria could occur during dengue infection.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Conclusions

Simple point-of-care urine dipstick and UPCR tests do not seem to be very valuable for the triage of the patients at the time of the initial medical consultation but the observation of a decrease of the UPCR during the course of the illness appears to indicate a favorable evolution towards recovery.

## Keywords

Dengue, proteinuria, urine, dipstick UPCR, biomarker

## Background

Dengue is the most prevalent mosquito-borne viral disease worldwide, occurring in almost 130 tropical or subtropical countries [1]. A majority of the infections caused by one of the four dengue viruses (DENV) are asymptomatic or result in a mild febrile illness, but the virus is also capable of producing a life-threatening disease. The main form of severe dengue is characterized by plasma leakage with or without bleeding, which may lead to circulatory collapse, called dengue shock syndrome. Non-specific complications of systemic diseases – such as encephalitis, hepatitis or myocarditis – can also occur. The course of dengue illness can be divided into three main phases: the febrile phase, the critical phase and the recovery phase. Severe clinical disease manifestations such as fluid leakage, bleeding and shock occur during the critical phase which begins around day 4–7 after the onset of fever, when the body temperature returns below 38°C, and lasts usually between 48–72 hours. During the critical phase, the condition of patients can improve or worsen rapidly, requiring careful monitoring by care givers. Early clinical management based on fluid replacement therapy reduces the morbidity and mortality associated with severe dengue [2].

The major obstacle for an effective clinical management of dengue is the inability to accurately predict, at an early stage of infection, which patients are likely to develop a severe form of the disease. There is a

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

need for simple, effective and cheap tests to identify patients at risk and guide triage. Wills *et al.* observed an increase of urinary protein clearance due to the increase in systemic vascular permeability that occurs in severe dengue. Subsequently, it has been proposed that a simple urine protein excretion screening test could be indicative of the severe form of dengue and therefore guide the triage and monitoring of the patients with suspected dengue infection [3].

The first objective of this study was to assess whether a simple urinalysis strip for protein detection could benefit the triage of patients with suspected dengue at the point of initial medical consultation. The second objective was to characterize proteinuria occurring during dengue disease by analyzing the urine protein:creatinine ratio (UPCR) and conducting a urinary protein electrophoresis on sequential samples from a limited number of hospitalized patients.

**Methods**

*Clinical samples*

A total of 241 spot urine samples obtained from 108 patients with laboratory confirmed dengue virus infection (DVI) were randomly selected from a biobank created in 2013 during the DENgue research Framework for Resisting Epidemics in Europe (DENFREE) study. A confirmed dengue case was defined by the detection of viral RNA by RT-PCR and/or the detection of the NS1 protein and/or an IgM seroconversion and/or a four-fold antibody titer increase measured by hemagglutination inhibition assay (HIA) in paired plasma of patients presenting with symptoms suggestive of DVI. Most urine samples (93.4%; n=225/241) were collected during hospitalization 1–11 days after the onset of fever. An additional 16 samples were collected one or three months after discharge from hospital. Patients were categorized as experiencing dengue “with” or “without” warning signs or severe dengue based on the 2009 case definitions established by the World Health Organization (WHO) [2]. The immune status of patients (primary or secondary infection) was determined by HIA according to WHO criteria [4].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

A further 15 samples collected from healthy children recruited during a community-based study were also added to the panel. These controls were household members of some of the patients identified during the DENFREE hospital-based study that did not experience any symptoms and had no biological evidence of DVI (DENV RT-PCR negative, NS1 negative, no anti-DENV IgM or increasing IgG titer).

*Ethical statement*

The DENFREE project was approved by the Cambodian National Ethics Committee for Health Research (authorization no. 063NECHR). The children’s legal representatives signed a written consent before the enrolment of the patient.

*Urine analysis*

The presence of protein in urine collected at the time of patient admission at hospital was checked using semi-quantitative Mission urine dipsticks (Acon, San Diego, USA). The test was performed according to the manufacturer’s instructions. Results were graded as: no protein; 150 mg/L (trace); 300 mg/L; 1000 mg/L; 3000 mg/L; and 20,000 mg/L. Presence of protein at any concentration was considered as a positive result. Total protein and creatinine concentrations were measured in samples collected during the course of hospitalization using a Cobas integra 400 plus analyzer (Roche Diagnostics, Germany). UPCr was obtained by dividing the total protein concentration expressed in mg/L by the creatinine concentration measured in mmol/L. Proteinuria was defined as a UPCr  $\geq 45$  mg/mmol and a high proteinuria as a UPCr  $\geq 100$  mg/mmol [5].

Urine protein electrophoresis (UPEP) was performed with a MINICAP capillary electrophoresis platform (Sebia, France). Following the manufacturer’s instructions, only samples with a total protein concentration  $>100$  mg/L were tested. Urine samples were processed before electrophoresis following manufacturer’s instructions. Sample processing consisted of a concentration step using a size exclusion column (10K Macrosep ultrafiltration device, Pall, USA) followed by dialysis in Sebia buffer (Dialysis buffer Capillarys/Minicap Urine, Sebia, France). Four electrophoresis patterns were defined for results



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

analysis: pattern 1 for normal profile; pattern 2 for dominant alpha-1 and/or alpha-2 fractions; pattern 3 for a dominant albumin fraction; pattern 4 for a serum-like profile (Additional file 1).

*Statistical analysis*

Statistical tests were performed using STATA version 11.0 (StataCorp, USA). The statistical differences between categorical groups were detected using the Fisher’s exact test. The Kruskal-Wallis rank test and the Mann Whitney U test were used for continuous independent variables and the Wilcoxon test was used for continuous dependant variables. The correlation between two continuous variables was assessed by Spearman’s rank correlation test.

A Generalized Additive Mixed Model (GAMM) was used to evaluate factors independently associated with the UPCR values and with the occurrence of proteinuria. A Poisson GAMM was used to model UPCR values, whereas the occurrence of proteinuria was modeled with a binomial GAMM. Five explanatory variables were included in the model: age, gender, sampling day after onset of fever (DAOF), immune status (primary or secondary infection) and 2009 WHO disease classification (dengue without warning signs, dengue with warning signs, severe dengue). A GAMM was used instead of a Generalized Linear Mixed Model because a non-linear relationship between the response variables (UPCR or proteinuria occurrence) and both “daof” and “age” explanatory variables were expected. A mixed model was used with patient ID as a random effect explanatory variable to take into account the non-independence of samples collected from the same patients and potential random individual variations between patients. The analysis was performed using the “gamm4” package (version 0.2-3) under the R statistical environment (R Foundation, Vienna, Austria).

Significance was assigned at  $p < 0.050$ .

**Results**

A total of 108 patients were included in this study. A summary of the patients’ characteristics, clinical and virologic data is presented in Table 1. In brief, 24 (22.2%) patients presented with dengue without

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

warning signs, 62 (57.4%) with dengue with warning signs and 22 (20.4%) with severe dengue. Patients were aged between 4 and 15 years (median age = 8, interquartile range (IQR) = [7–12]). Males were slightly overrepresented (62%). The median age in the control population was 6 years (interquartile range = [5–8]), and 10 out of 15 (66.7%) were males. A secondary infection was diagnosed in 64 (59.2%) patients.

**Protein detection by dipstick in urine specimens collected at admission**

Proteinuria was assessed by dipstick in 21 patients without warning signs, 50 patients with warning signs and 20 patients with a severe dengue (Table 2). Urine samples were collected from each patient at the time of admission to the hospital (median day after onset of fever = 4, IQR = [3–4]). A total of 39 patients (42.9%) tested positive for proteinuria. Most of the positive samples (71.8%, 28/39) only contained traces of protein (150 mg/L). Nine patients (23.1%) had an approximate protein concentration of 300 mg/L and two (5.1%) an approximate concentration of 1000 mg/L. A positive dipstick result was observed for 32% (16/50) and 38.1% (8/21) of the patients admitted at hospital for a dengue with and without warning signs, respectively. The difference between the two groups was not statistically significant (Fisher’s exact  $p$ -value = 0.784). Proteins were detected in the urine sample of 75% (15/20) of the patients presenting with a severe dengue. Three samples of the control group (20%, 3/15) tested positive for proteinuria, with an approximate concentration of 150 mg/L. The prevalence of proteinuria in dengue patients with and without warning signs was not significantly different from the one obtained for the control group (Fisher’s exact  $P$  = 0.295 and 0.522, respectively). When considering the immune status of the patients, 53.2% (25/47) of those with a secondary infection and 26.9% (7/26) of the patients with a primary infection tested positive for proteins in the urine (Fisher’s exact  $P$  = 0.048).

**Proteinuria determined by the UPCR during the course of hospitalization**

The UPCR was tested at admission in 52 patients (median daof = 4, IQR = [3–4]) and was significant in 23.1% (n=12) of the cases. No dengue patients without warning signs had a significant proteinuria



1  
2  
3  
4 detected at admission compared with 16.1% (5/31) of cases with warning signs and 50% (7/14) of  
5  
6 patients with severe dengue (Table 3). The prevalence of proteinuria cases detected at admission was not  
7  
8 significantly different between primary and secondary dengue infections (13.6% vs 28.6%, Fisher's exact  
9  
10  $P = 0.281$ ) (Table 3).  
11  
12

13  
14 The UPCr was also measured during the course of hospitalization in 178 urine samples collected from  
15  
16 nine dengue patients without warning signs, 43 patients with warning signs and 17 patients with a severe  
17  
18 dengue. Nine samples were excluded from the analysis due to very low creatinine concentration (<1  
19  
20 mmol/L) that led to an overestimation of the UPCr. Proteinuria was observed in 33.3%, 23.3% and  
21  
22 47.1% of the patients without warning signs, with warning signs and severe dengue, respectively (Table  
23  
24 3). Differences between the three groups of patients were not statistically significant. A total of 13% of  
25  
26 the patients presented a high proteinuria (UPCr  $\geq 100$  mg/mmol) during the course of hospitalization  
27  
28 (Table 3). This includes mostly patients with severe dengue (23.5%) but also dengue patients with and  
29  
30 without warning signs (9.3% and 11.1%, respectively). When analyzing by immune status, 26.1% of the  
31  
32 primary dengue cases and 33.3% of the secondary cases experienced at least one episode of proteinuria  
33  
34 with a UPCr  $\geq 45$  mg/mmol during the period of hospitalization (Fisher's exact  $P = 0.768$ ). None of the  
35  
36 controls had a UPCr  $\geq 45$  mg/mmol. The proteinuria mainly detected between DAOF5–7 (Table 3), when  
37  
38 UPCr values were the highest (Figure 1).  
39  
40  
41  
42

43  
44 Sixteen patients included in the study were tested for UPCr one (n=4) or three (n=12) months after  
45  
46 discharge from hospital. None had a UPCr  $\geq 45$  mg/mmol.  
47  
48

49  
50 UPCrs according to the day of sampling after the onset of fever are shown in Figure 1. No significant  
51  
52 difference was observed in UPCr values between the different groups of patients. UPCr values were  
53  
54 significantly higher in each category of dengue patients at each time-point compared to controls. UPCr  
55  
56 values measured one or three months after the disease (median=12.8 mg/mmol, IQR = [10.0–15.0]) were  
57  
58  
59  
60  
61

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

significantly lower than the minimal (median=20.43 mg/mmol, IQR = [17.2–31.4]) values measured in the same patients during the disease (Wilcoxon  $P < 0.001$ ).

**Modeling factors independently associated with UPCR values in dengue cases**

A GAMM was used to assess factors independently associated with the UPCR values measured in dengue patients. The day of sampling after the onset of the fever (“daof” variable) and the age of the patient had a significant effect on UPCR values ( $P < 0.001$ ) (Table 4). The GAMM-estimated relationships between UPCR and both “age” and “daof” variables are shown in Figure 2. The model predicted higher UPCR in urine samples collected from older children ( $\geq 13$  years) and between DAOF 6–8. The immune status of the patient had no effect on UPCR values. A GAMM was also used to assess factors independently associated with the occurrence of significant proteinuria (UPCR of  $\geq 45$  mg/mmol) in dengue patients, using the same variables. No significant association was found (Additional file 2).

**Comparison of dipstick results and UPCR values**

UPCR was measured in 20 and 23 urine samples that tested negative and positive by dipstick, respectively.. The median UPCR was 36.1 mg/mmol (IQR = [19.7-85.1]) for patients with a positive result by dipstick and 25.1 mg/mmol (IQR = [17.7-29.3]) for patients with a negative dipstick test. Ten (43.5%) patients whose urine sample tested positive by dipstick had a UPCR  $\geq 45$  mg/mmol. Only one patient with a negative dipstick result tested positive for proteinuria after calculating the UPCR.

**Association between serum total protein and UPCR**

Serum total protein levels and UPCRs were assessed in parallel in 51 dengue patients. UPCRs tended to be higher in patients with hypoproteinemia (median = 31.6 mg/mmol, IQR = [22.1–48.9]) compared to patients with a normal serum protein concentration (median = 25.9 mg/mmol, IQR = [18.3–32.1]) but the difference was not statistically significant (Mann Whitney  $P = 0.096$ ). A total of 38.1% (8/21) of the patients with hypoproteinemia had a UPCR  $\geq 45$  mg/mmol, whereas 10% (3/30) of the patients with a normal total protein concentration presented such a significant proteinuria (Fisher’s exact  $P = 0.035$ ).

1  
2  
3  
4 Finally, there was no correlation between the total protein concentration in serum and the UPCRs in the  
5  
6 urine samples collected for the same patients at the same time points (Spearman  $P = 0.267$ ).  
7  
8

#### 9 10 11 **Association between the occurrence of proteinuria and the length of stay at hospital**

12 The median length of stay at hospital was five days for the patients with and without significant  
13  
14 proteinuria during the course of the disease but interquartile ranges differed. Two-thirds of patients with a  
15  
16 UPCR  $\geq 45$  mg/mmol in at least one sample were hospitalized 5–7 days whereas 75% of the patients with  
17  
18 a UPCR  $< 45$  mg/mmol stayed 4–5 days at hospital. Univariate statistical analysis demonstrated a  
19  
20 significant difference in the length of stay between the two groups of patients (Mann Whitney  $P = 0.010$ ).  
21  
22 When the analysis was conducted with a cut-off value for UPCR  $\geq 20$  mg/mmol (as defined by the US  
23  
24 National Kidney Foundation), the patients with a proteinuria at the time of hospital admission tended to  
25  
26 have a subsequent longer period of hospitalization than the patients with a UPCR  $< 20$  mg/mmol.  
27  
28 However, this difference was not statistically significant (Mann Whitney  $P = 0.089$ ) possibly due to the  
29  
30 relatively small sampling size.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

#### 38 **Urine protein electrophoresis**

39 UPEP was performed on 27 admission samples in which the total protein concentration was  $\geq 100$  mg/L.  
40  
41 Results are presented in Table 5. A normal profile was obtained with three samples: two were collected  
42  
43 from dengue patients with warning signs and one from a patient presenting with a severe dengue disease.  
44  
45 All three samples had a UPCR  $< 45$  mg/mmol. Slightly more than half of the samples (14/27)  
46  
47 demonstrated a pattern with dominant alpha 1 and/or alpha 2 fractions (alpha 1/2 pattern). Those samples  
48  
49 were obtained from two patients without warning signs, seven patients with warning signs and five  
50  
51 patients with severe dengue. Five samples (one patient with warning signs and four patients with severe  
52  
53 dengue) showed a pattern characterized by a dominant albumin fraction (albumin pattern) and a ‘serum-  
54  
55 like’ pattern was observed in five samples collected from three patients with warning signs and two  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

patients with severe dengue. Out of the 14 samples with an alpha 1/2 pattern, five had a UPCr  $\geq 45$  mg/mmol. Three of the five samples with an albumin pattern had a UPCr  $\geq 100$  mg/mmol and two a UPCr  $< 45$  mg/mmol. UPCr was greater than 45 mg/mmol in all five samples with a 'serum-like' pattern including four with a UCPR  $\geq 100$  mg/mmol.

**Discussion**

The symptoms of dengue disease are typically non-specific unless complications develop, usually at the time of fever defervescence, approximately five or six days after the onset of fever. One of the major issues in dengue diagnosis is the lack of good biomarkers predictive of an evolution towards severe disease, which would improve the triage of dengue cases and help to prioritize the hospitalization of those patients at highest risk of complications.

Increased urinary excretion of protein in patients infected by DENV is thought to be a hallmark of vascular endothelial cells defect and plasma leakage associated with complicated forms of dengue and is considered a possible prognostic marker [3]. Proteinuria has been reported in up to 74% of patients with dengue hemorrhagic fever (DHF) [6] and cases of self-limiting nephrotic-range proteinuria in patients with DHF presenting no manifestations of renal damage have been described elsewhere [7, 8]. The mechanism underlying the hypothesis of increased protein excretion in urine is that during DVI the glycocalyx of the endothelial cells is disrupted either by direct action of the virus or by the NS1 antigen [3, 9, 10], causing plasma leakage. At the kidney level, alteration of the glycocalyx layer that coats the glomerular endothelial cells enables the passage of macromolecules in the primary urine. In normal conditions, this passage is restricted in order to maintain the intravascular albumin concentration. As macromolecules cannot be reabsorbed by tubules, a glomerular proteinuria, mainly characterized by the presence of albumin in the final urine, occurs. Increased clearance of proteins in urine due to disruption of the glycocalyx has been described during diabetes mellitus [11], childhood nephrotic syndrome [12] and meningococcal septicemia [13].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

We first investigated the presence of proteinuria by using a dipstick, one of the easiest, most widely accessible and cheapest methods for the detection of proteins in urine. We observed that urinary dipstick used on samples collected at the time of initial medical consultation before admission to the hospital was not a reliable tool for the triage of dengue patients. The proportions of positive tests in controls (20%) and among patients diagnosed with dengue without (38.1%) and with (32%) warning signs were not statistically different. Similar results were obtained when the patients were classified according to the 1997 WHO guidelines (data not shown). Vasanwala *et al.* as well as Lumpaopong *et al.* also assessed the prognostic value of urine dipstick and demonstrated that this rapid test was not able to discriminate between dengue fever (DF) and DHF [14, 15]. In the present study, the comparison of the dipstick results with the UPCR results indicated that only 43.5% of the patients who tested positive for proteinuria by dipstick had a proteinuria considered as significant as defined by a UPCR  $\geq 45$  mg/mmol. A proteinuria detected by dipstick that was associated with a UPCR  $< 45$  mg/mmol was probably moderate and/or the result of a urine concentration associated with a mild dehydration caused by fever or vomiting. Indeed, Marks *et al.* reported a high incidence of false positive proteinuria detected by dipstick in children with various febrile illnesses [16]. The UPCR is actually a better tool to assess the proteinuria than simple dipstick as it intends to adjust for fluctuations in fluid intake and hydration status.

The gold standard to determine the proteinuria is provided by the measurement of total protein or albumin in urine over a 24-hour period (timed urine). However, this method is time-consuming and cumbersome, especially in young children who represent a large proportion of the patients in dengue hyper-endemic countries like Cambodia. As timed urine would not be collected in real field situations during dengue epidemics when pediatric wards are at full capacity, we instead decided to investigate the value of direct spot urine specimens, which could be more easily collected. Measurement of urine albumin:creatinine or protein:creatinine ratios in random spot urine samples has been demonstrated to be an acceptable alternative to timed urine samples [17, 18]. Since Hanh Tien *et al.* already determined that urine albumin:creatinine ratios in dengue patients were not useful tools to predict the evolution towards severe dengue and the need for hospitalization [19], we instead evaluated the potential value of the UPCR.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

UPCR in dengue adult patients was previously investigated by Vasanwala and colleagues [14]. Our study differed from that of this author because we only included children and used a different definition for a 'significant proteinuria' based on UPCR measurement for which there is no real consensus. Vasanwala *et al.* used the value of 20 mg/mmol as the cut-off following the US National Kidney Foundation recommendations [20], whereas we used a more conservative definition of 45 mg/mmol as recommended by the Royal College of Physicians of London [5]. Indeed, this value appeared more appropriate as 80% (135/169) of the urine samples obtained from pediatric dengue patients had a UPCR  $\geq 20$  mg/mmol in our study. Using the 2009 WHO case definition to classify patients, we demonstrated that patients with warnings signs and severe dengue were more likely to have a UPCR  $\geq 45$  mg/mmol at the time of hospital admission compared to patients without warning signs. Nevertheless, the sensitivity of this marker was limited as only 16.1% of the patients with warning signs had such significant proteinuria.

The UPCR values were systematically higher in dengue patients compared to healthy controls. This was confirmed at all the time-points at which urine specimens were collected during the course of the disease. The increase in UPCR was transient and associated with the acute and early convalescent phase of the disease.

Our multivariate analysis of UPCR during the course of the disease indicated that this ratio was significantly higher six to eight days after the onset of fever. This observation is in agreement with the findings of Vasanwala *et al.* who described that UPCR peaked approximately on the 7<sup>th</sup> day of illness [14, 21]. Hanh Tien *et al.* also reported a UPCR peak at a median time of five days after the onset of symptoms [19]. Rather than being a marker that could be used for patient triage at the time of first medical consultation, UPCR measurement seems to be more useful for monitoring patients during the course of the disease. Indeed, the peak UPCR usually occurred at the end of the critical phase of the disease and the decrease in the ratio seemed to correspond with the beginning of the recovery phase.

Two studies conducted by Vasanwala *et al.* demonstrated that adults patients with DHF or dengue shock syndrome (DSS) had significantly higher median peaks of urine protein:creatinine ratios at days 6-7 after onset of disease than patients experiencing DF [14, 21]. We did not observe this difference in the present

1  
2  
3  
4 study that exclusively included children. UPCRs measured in children with DF were not significantly  
5  
6 different from the ratios obtained in children with DHF or DSS at any point of time during the course of  
7  
8 the disease (data not shown). We were also not able to demonstrate differences in UPCR levels between  
9  
10 patients without warnings, patients with warning signs and patients with severe disease. In this work, we  
11  
12 also showed that the occurrence of proteinuria episodes and their magnitude, estimated by UPCR, were  
13  
14 not associated with the immune status of the patients.  
15  
16

17 Khalil *et al.* previously reported that the occurrence of acute kidney injury during dengue was  
18  
19 independently associated with an increased length of stay in hospital [22]. In this study, children who  
20  
21 experienced a significant proteinuria during the course of the disease and patients with a UPCR  $\geq 20$   
22  
23 mg/mmol at the time of the first medical consultation were more likely to be hospitalized for a longer  
24  
25 period of time.  
26  
27

28 Hypoproteinemia in dengue cases usually indicates a plasma leakage [4]. Here we observed that  
29  
30 significant proteinuria was more frequent in patients with hypoproteinemia but a UPCR  $\geq 45$  mg/mmol  
31  
32 was observed in only 38.1% of the patients with hypoproteinemia. These results may suggest that the  
33  
34 plasma leakage does not necessarily always cause very significant proteinuria. It is possible that in a  
35  
36 number of cases the leakage is too limited or quickly compensated that evidence of proteinuria is not  
37  
38 detected or that the protein leakage mainly occurs through vessels from tissues other than the kidneys.  
39  
40 Three main categories of proteinuria can be distinguished: the overflow proteinuria, the tubular  
41  
42 proteinuria and the glomerular proteinuria [23]. UPEP is a useful tool to determine the type of proteinuria.  
43  
44 Overflow proteinuria is a pre-renal proteinuria. The increased concentration of small proteins in the  
45  
46 plasma, which can be filtered in the glomerulus, leads to an increased protein concentration in the primary  
47  
48 urine and a failure of the complete reabsorption by the tubular cells. It is characterized by an abnormal  
49  
50 peak of one of the five protein fractions. UPEP in tubular proteinuria demonstrates alpha and/or beta  
51  
52 globulin peaks, with or without a minor fraction of albumin. UPEP analysis of glomerular proteinuria  
53  
54 shows either a dominant albumin fraction in selective glomerular proteinuria or a pattern similar to serum  
55  
56 proteins in non-selective glomerular proteinuria. We did not observe any case of overflow proteinuria in  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

the limited number of cases included in our study. Patterns compatible with a tubular proteinuria, a selective glomerular proteinuria and a non-selective glomerular proteinuria, were observed in 51.9%, 22.2% and 14.8% of the samples tested by UPEP, respectively. The glomerular proteinuria was associated with a high value of UPCR and we showed in this study that a  $UPCR \geq 75$  mg/mmol was 100% specific of a glomerular proteinuria. If we set a value of 75 mg/mmol for the UPCR as a hallmark of a glomerular proteinuria, 12 patients beyond the 21 that experienced a significant proteinuria could have been classified in that group. Among those 12 patients, one was classified as dengue without warning signs, six as dengue with warning signs and five as severe dengue. By using the 1997 WHO dengue classification, three, four and five patients were classified as DF, DHF and DSS, respectively. The initial hypothesis that the proteinuria in dengue disease was solely the result of disruption of the glycocalyx is likely to be only partially true as we detected both tubular and glomerular proteinuria cases in almost the same proportions. Renal impairments associated to both glomerular and tubular syndromes have already been described. Lizarraga *et al.* reviewed various types of glomerulonephritis including those associated with the formation of immune complexes in the glomeruli [6]. Kidney biopsies from patients with dengue of varying degrees of severity revealed acute tubular necrosis resulting in tubular impairments [24–28]. Ischemic processes, which are common in patients with severe hypovolemic shock, have been suggested as an explanation to tubular necrosis in DSS patients [25]. Interstitial edema and mononuclear infiltration can also contribute to tubular necrosis in patients without shock syndrome [24, 27]. A limitation of our study was the small number of patients without warning signs as clinical specimens were only collected from hospitalized children and not from ambulatory cases. This resulted in an underrepresentation of the mildest form of dengue disease and may explain why we did not observe differences in proteinuria between patients with or without warning signs. Another limitation was the absence of daily UPCR measurement for each patient: the median number of samples tested for each patient was only two for a median length of hospitalization of five days. It is therefore possible that the occurrence of more significant proteinuria episodes were not captured in some patients. Another limitation of the study is that we were not able to explore potential confounding factors as number of



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

other etiology of proteinuria do exist, including primary viral infections that are not uncommon in children (e.g., adenovirus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, enterovirus, etc.).

The kidney is one of the major organs affected during dengue but the mechanism and the prevalence of renal involvement in children with dengue fever remains unclear. Renal function is not routinely assessed in patients hospitalized for suspected or confirmed dengue and thus the impact of dengue infection on the kidneys could well be under-recognized. This is a third limitation of our study as the proteinuria was measured retrospectively and the renal function was not assessed by the clinicians. There is a clear need, for a future study, to assess simultaneously the various parameters associated with a renal dysfunction as the hematuria, the proteinuria, an electrolyte disturbance, the glomerular filtration rate, and eventually to conduct renal biopsies.

**Conclusions**

This study indicates that protein excretion in urine, estimated by UPCR, increases during the course of dengue disease to reach a maximum level approximately one week after the onset of fever. We found that neither urine dipstick nor UPCR measurement were useful for patient triage at the time of first visit to hospital. Monitoring the urinary protein excretion during the course of the disease, however, might be a factor indicating the evolution towards disease recovery.

**List of abbreviations**

- DAOF: day after onset of fever
- DENV: dengue virus
- DF: dengue fever
- DHF: dengue hemorrhagic fever
- DSS: dengue shock syndrome
- DVI: dengue virus infection
- IQR: interquartile range

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

UPCR: urine protein:creatinine ratio  
UPEP: urine protein electrophoresis  
WHO: World health organization

**Competing interests**

Philippe Buchy is currently a GSK employee.

**Authors' contributions**

ACA designed the study, analyzed the data and drafted the manuscript. VD, LS, AT and SO contributed to samples collection and data analyses. AK performed the laboratory analysis. JC performed the GAMM model. PH and PD drafted the manuscript. PB designed the project, supervised the analysis and drafted the paper. All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgements**

We would like to thank the patients, nurses and doctors who participated in this study. The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007/2011) under Grant Agreement n°282 378.

**Figures**

**Figure 1: UPCR according to time of sampling and disease severity.**  
Horizontal solid lines represent the median value measured in control patients. Horizontal dash lines represent the quartiles. UPCR: Urine protein:creatinine ratio, DAOF: Day After Onset of Fever, WS-: dengue without Warning signs, WS+: dengue with Warning signs, SD: Severe dengue



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Figure 2: Relationship between UPCR and day of sampling after fever onset (A) or patient age (B).**

A GAMM-model was used to estimate the relationship. The figure in the y-axis is the effective degrees of freedom of the smooth function terms. daof: day after onset of fever

## **Additional files**

**Additional file 1. Examples of urine protein electrophoresis profiles obtained by capillary electrophoresis.**

(1) Normal Profile. (2) Profile with dominant alpha-1 peak. (3) Profile with a dominant albumin peak. (4) “Serum-like” profile.

Format: PDF

**Additional file 2. Model estimates of the effects of various parameters on the occurrence of proteinuria.**

Format: PDF

## **References**

1. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, Moyes CL, Farlow AW, Scott TW, Hay SI: Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, 6:e1760.

2. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, World Health Organization: *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention, and Control*. New ed. Geneva: TDR : World Health Organization; 2009.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

3. Wills BA, Oragui EE, Dung NM, Loan HT, Chau NV, Farrar JJ, Levin M: Size and charge characteristics of the protein leak in dengue shock syndrome. *J Infect Dis* 2004, 190:810–818.

4. World Health Organization: *Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention, and Control*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997.

5. Burden R, Tomson C, Guideline Development Committee, Joint Specialty Committee on Renal Disease of the Royal College of Physicians of London and the Renal Association: Identification, management and referral of adults with chronic kidney disease: concise guidelines. *Clin Med Lond Engl* 2005, 5:635–642.

6. Lizarraga KJ, Nayer A: Dengue-associated kidney disease. *J Nephropathol* 2014, 3:57–62.

7. Vasanwala FF, Puvanendran R, Ng JM, Suhail SM: Two cases of self-limiting nephropathies secondary to dengue haemorrhagic fever. *Singapore Med J* 2009, 50:e253–255.

8. Hutspardol S, Prommalikit O, Upiya N, Chataropwijit J, Khemakanok K, Assadamongkol K: Heavy proteinuria following dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011, 42:579–582.

9. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerk W, Malasit P, Atkinson JP, Diamond MS: Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog* 2007, 3:e183.

10. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen van VC, Wills B: Dengue. *N Engl J Med* 2012, 366:1423–1432.

11. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JAE, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JBL, Kastelein JJP, Stroes ESG, Vink H: Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006, 55:1127–1132.

12. Cengiz N, Bayazit AK, Noyan A, Anarat R, Anarat A: Glycosaminoglycan excretion in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger* 2005, 20:486–490.

13. Oragui EE, Nadel S, Kyd P, Levin M: Increased excretion of urinary glycosaminoglycans in meningococcal septicemia and their relationship to proteinuria. *Crit Care Med* 2000, 28:3002–3008.

14. Vasanwala FF, Thein T-L, Leo Y-S, Gan VC, Hao Y, Lee LK, Lye DC: Predictive value of proteinuria in adult dengue severity. *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8:e2712.

15. Lumpaopong A, Kaewplang P, Watanaveeradej V, Thirakhupt P, Chamnanvanakij S, Srisuwan K, Pongwilairat N, Chulamokha Y: Electrolyte disturbances and abnormal urine analysis in children with dengue infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2010, 41:72–76.

16. Marks MI, McLaine PN, Drummond KN: Proteinuria in children with febrile illnesses. *Arch Dis Child* 1970, 45:250–253.

17. Morgenstern BZ, Butani L, Wollan P, Wilson DM, Larson TS: Validity of protein-osmolality versus protein-creatinine ratios in the estimation of quantitative proteinuria from random samples of urine in children. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2003, 41:760–766.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

18. Jafar TH, Chaturvedi N, Hatcher J, Levey AS: Use of albumin creatinine ratio and urine albumin concentration as a screening test for albuminuria in an Indo-Asian population. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2007, 22:2194–2200.

19. Hanh Tien NT, Lam PK, Duyen HTL, Ngoc TV, Ha PTT, Kieu NTT, Simmons C, Wolbers M, Wills B: Assessment of microalbuminuria for early diagnosis and risk prediction in dengue infections. *PLoS One* 2013, 8:e54538.

20. Keane WF, Eknoyan G: Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE): a position paper of the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 1999, 33:1004–1010.

21. Vasanwala FF, Puvanendran R, Fook-Chong S, Ng J-M, Suhail SM, Lee K-H: Could peak proteinuria determine whether patient with dengue fever develop dengue hemorrhagic/dengue shock syndrome?--a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2011, 11:212.

22. Khalil MAM, Tan J, Khalil MAU, Awan S, Rangasami M: Predictors of hospital stay and mortality in dengue virus infection-experience from Aga Khan University Hospital Pakistan. *BMC Res Notes* 2014, 7:473.

23. Abuelo JG: Proteinuria: diagnostic principles and procedures. *Ann Intern Med* 1983, 98:186–191.

24. Aye KS, Charngkaew K, Win N, Wai KZ, Moe K, Punyadee N, Thiemmecca S, Suttitheptumrong A, Sukpanichnant S, Prida M, Halstead SB: Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. *Hum Pathol* 2014, 45:1221–1233.

25. Póvoa TF, Alves AMB, Oliveira CAB, Nuovo GJ, Chagas VLA, Paes MV: The Pathology of Severe Dengue in Multiple Organs of Human Fatal Cases: Histopathology, Ultrastructure and Virus Replication. *PLoS ONE* 2014, 9:e83386.

26. Laoprasopwattana K, Pruekprasert P, Dissaneewate P, Geater A, Vachvanichsanong P: Outcome of dengue hemorrhagic fever-caused acute kidney injury in Thai children. *J Pediatr* 2010, 157:303–309.

27. Mehra N, Patel A, Abraham G, Reddy YNV, Reddy YNV: Acute kidney injury in dengue fever using Acute Kidney Injury Network criteria: incidence and risk factors. *Trop Doct* 2012, 42:160–162.

28. Mohsin N, Mohamed E, Gaber M, Obaidani I, Budruddin M, Al Busaidy S: Acute tubular necrosis associated with non-hemorrhagic Dengue fever: a case report. *Ren Fail* 2009, 31:736–739.



**Table 1. Summary of demographic, clinical and virologic information of the patients.**

	Dengue without warning signs	Dengue with warning signs	Severe dengue
Number of patients (number of samples)	24 (45)	62 (143)	22 (53)
Median age in years [iqr]	7 [6–12]	8.5 [7–12]	9 [7–11]
Sex (Male)	15 (62.5%)	37 (59.7%)	15 (68.2%)
Median day of fever at hospital admission [iqr]	2 [2–3]	4 [3–4]	4 [4–5]
Median length of stay at hospital [iqr]	5 [5–5.5]	5 [4–6]	5 [4–5]
<b>Dengue diagnostic</b>			
RT-PCR and NS1 positive	19 (79.2%)	46 (74.2%)	9 (40.9%)
RT-PCR positive and NS1 negative	5 (20.8%)	11 (17.7%)	8 (36.4%)
RT-PCR negative and NS1 positive	0 (0%)	3 (4.8%)	1 (4.5%)
Other *	0 (0%)	2 (3.2%)	4 (18.2%)
<b>Immune status</b>			
Primary infection	10 (41.7%)	20 (32.2%)	0 (0%)
Secondary infection	11 (45.8%)	32 (51.6%)	21 (95.5%)
Undetermined **	3 (12.5%)	10 (16.1%)	1 (4.5%)
<b>Clinical manifestations at admission</b>			
Dry bleeding ***	4 (16.7%)	15 (24.2%)	6 (27.3%)
Wet bleeding ****	1 (4.2%)	10 (16.1%)	7 (31.8%)
Abdominal pain	0 (0%)	52 (83.9%)	22 (100%)
Persistent vomiting	0 (0%)	39 (62.9%)	22 (100%)
Lethargy/restlessness	1 (4.2%)	19 (30.6%)	15 (68.2%)
Hepatomegaly	0 (0%)	29 (46.8%)	15 (68.2%)
Ascites	0 (0%)	15 (24.2%)	8 (36.4%)
Pleural effusion	0 (0%)	12 (19.4%)	6 (27.3%)
Facial edema	0 (0%)	2 (3.2%)	3 (13.6%)
Cold extremities	0 (0%)	1 (1.6%)	19 (86.4%)
Cyanosis	0 (0%)	0 (0%)	11 (50%)
Hypotension, weak or undetectable pulse	0 (0%)	0 (0%)	12 (50.5%)
Narrow pulse pressure	0 (0%)	0 (0%)	16 (72.7%)
Delayed capillary refill time	0 (0%)	0 (0%)	14 (63.6%)

iqr: interquartile range

\* IgM seroconversion in paired plasma and/or fourfold increase of the antibody titer measured by hemagglutination inhibition assay (HIA) in paired plasma

\*\* Immune status is undetermined when the interval between admission and hospital discharge is < 7 days and the HI titer at the time of hospital discharge is  $\leq 2560$

\*\*\* Petechiae, purpura and/or ecchymosis

\*\*\*\* Nose, gums bleeding, hematemesis, melena and/or conjunctival hemorrhage

**Table 2. Results of urinary protein dipstick test performed at the time of admission to hospital.**

	Positive dipstick, total	Positive dipstick, 150 mg/L (trace)	Positive dipstick, 300 mg/L	Positive dipstick, 1000 mg/L
Control (n=15)	3 (20.0%)	3 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Total dengue (n=91)	39 (42.9%)	28 (30.8%)	9 (9.9%)	2 (2.2%)
<b>2009 WHO dengue classification</b>				
Dengue without warning signs (n=21)	8 (38.1%)	6 (28.6%)	2 (9.5%)	0 (0.0%)
Dengue with warning signs (n=50)	16 (32.0%)	12 (24.0%)	4 (8.0%)	0 (0.0%)
Severe dengue (n=20)	15 (75.0%)	10 (50.0%)	3 (15.0%)	2 (10.0%)
<b>Immune status</b>				
Primary infection (n=26)	7 (26.9%)	7 (26.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Secondary infection (n=47)	25 (53.2%)	16 (34.0%)	7 (14.9%)	2 (4.3%)
Undetermined* (n=18)	7 (38.9%)	5 (27.8%)	2 (11.1%)	0 (0.0%)

\* Immune status is undetermined when the interval between admission and hospital discharge is < 7 days and the HI titer at the time of hospital discharge is  $\leq 2560$



**Table 3. UPCRs in samples collected at the time of admission and during the course of hospitalization.**

	Total dengue	2009 WHO disease classification			Immune status		
		Dengue without warning signs	Dengue with warning signs	Severe dengue	Primary infection	Secondary infection	Undetermined*
<b>Hospital admission</b>							
Number of patients tested	52	7	31	14	22	21	9
Number of patients with an UPCR $\geq$ 45 mg/mmol	12 (23.1%)	0 (0.0%)	5 (16.1%)	7 (50.0%)	3 (13.6%)	6 (28.6%)	3 (33.3%)
<b>All samples (admission and during hospitalization)</b>							
Number of patients included	69	9	43	17	23	33	13
Number of patients with an UPCR $\geq$ 45 mg/mmol in at least one sample	21 (30.4%)	3 (33.3%)	10 (23.3%)	8 (47.1%)	6 (26.1%)	11 (33.3%)	4 (30.8%)
Number of patients with a UPCR $\geq$ 100 mg/mmol in at least one sample	9 (13.0%)	1 (11.1%)	4 (9.3%)	4 (23.5%)	2 (8.7%)	6 (18.2%)	1 (7.7%)
Median UPCR (mg/mmol) [irq]	30.0 [22.1-42.2]	30.8 [20.5-43.0]	28.5 [21.6-38.5]	34.3 [25.7-48.8]	29.6 [22.1-43.3]	29.3 [21.6-48.8]	33.1 [23.6-40.9]
Median day of illness when UPCR $\geq$ 45 mg/mmol [irq]	6 [5-7]	6 [5-6.5]	6 [4-7]	6 [5-7]	5.5 [4-6.5]	6 [4-8]	6 [5-7]

UPCR: Urine protein:creatinine ratio  
irq: interquartile range

\* Immune status is undetermined when the interval between admission and hospital discharge is  $<$  7 days and the HI titer at the time of hospital discharge is  $\leq$  2560

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 4. Effects of age, gender, disease classification, immune status and day of disease on UPCR.**

<b>Linear terms</b>	<b>Estimate</b>	<b>p-value</b>
Male	reference	
Female	0.141	0.454
dengue WS-	reference	
dengue WS+	0.146	0.604
severe dengue	0.269	0.417
primary dengue	reference	
secondary dengue	-0.029	0.899
<b>Non linear terms</b>	<b>edf</b>	<b>p-value</b>
s(daof)	4.921	<0.001
s(age)	3.414	<0.001

edf: effective degrees of freedom of the smooth function terms (edf >1 indicate nonlinear relationships)  
 F value is an approximate F-test  
 daof: day after onset of fever

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 5. Urine protein electrophoresis profiles in dengue patients.**

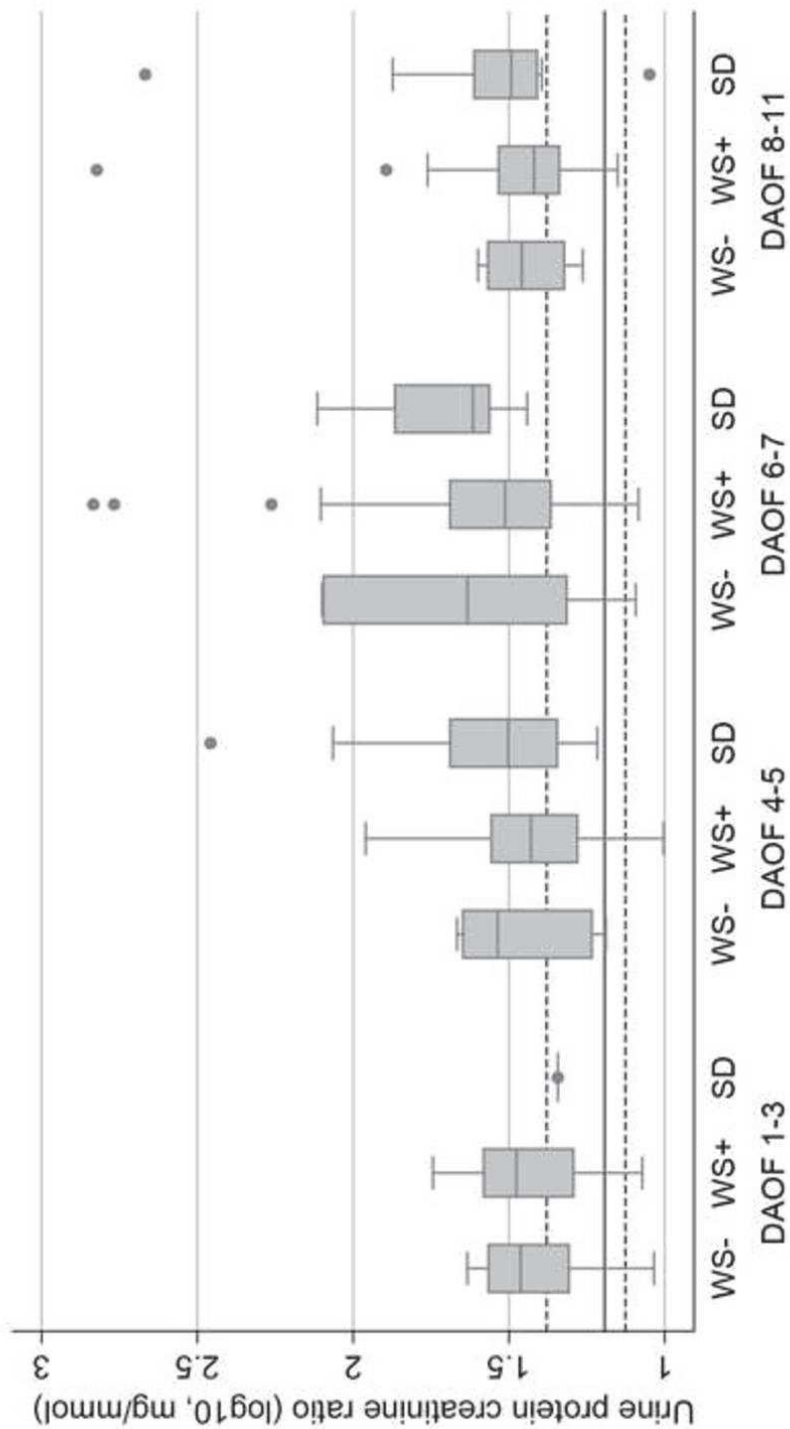
Pattern	Number of observation				Mean UPCR
	Total (n=27)	WS- (n=2)	WS+ (n=13)	SD (n=12)	
Pattern 1 : Normal	3 (11.1%)	0 (0.0%)	2 (15.3%)	1 (8.3%)	27.3 (min=17. ; max=33.10)
Pattern 2 : Alpha-1/Alpha-2	14 (51.9%)	2 (100%)	7 (53.8%)	5 (41.7%)	38.8 (min=18.5 ; max=73.5)
Pattern 3 : Albumin	6 (22.2%)	0 (0.0%)	2 (15.3%)	4 (33.3%)	85.2 (min=27.7 ; max=130.2)
Pattern 4 : “Serum-like”	4 (14.8%)	0 (0.0%)	2 (15.3%)	2 (16.7%)	298.12 (min=114.5 ; max=664.4)

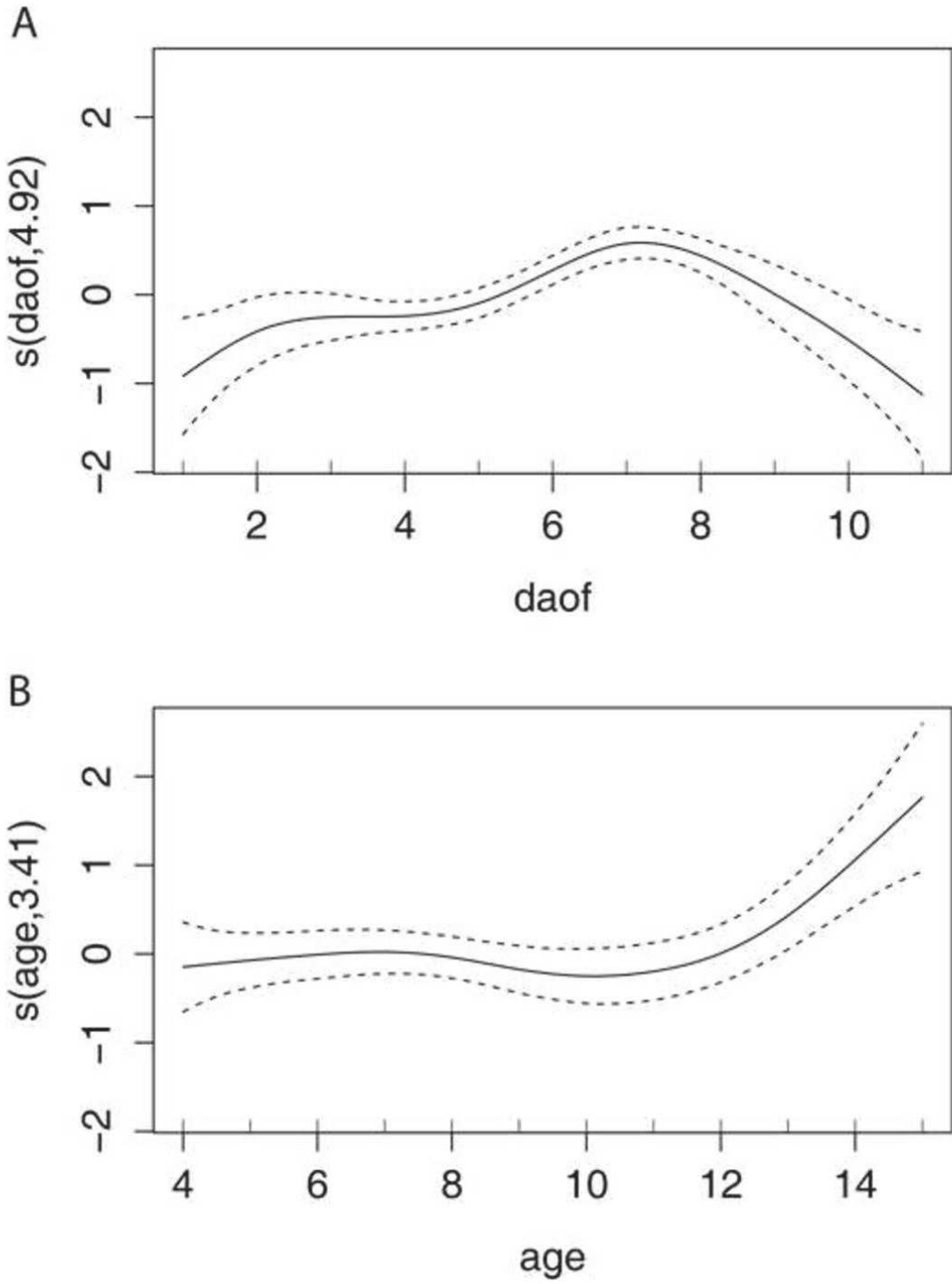
UPCR: Urine protein:creatinine ratio

WS-: Without warning signs; WS+: With warning signs; SD: Severe Dengue

Figure

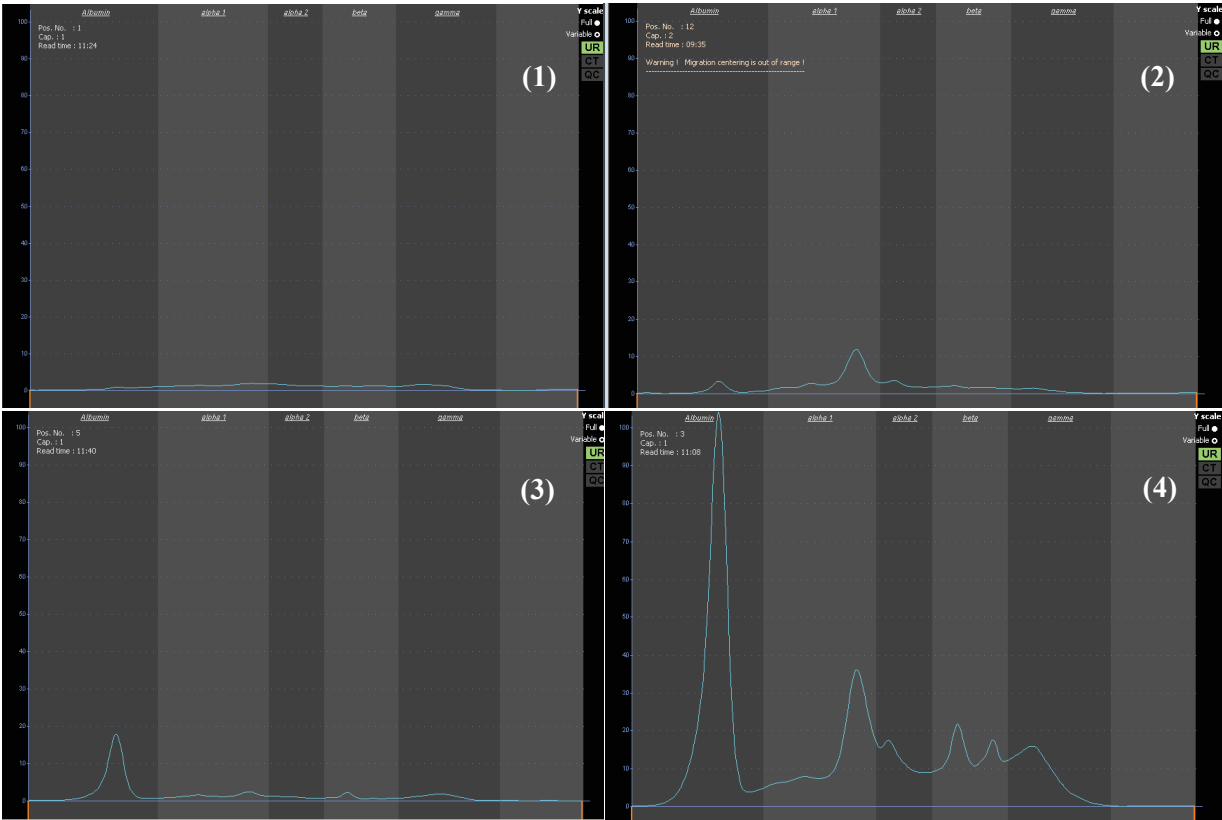
[Click here to download Figure Figure1.tif](#)







**Additional file 1. Examples of urine protein electrophoresis profiles obtained by capillary electrophoresis. (1) Normal Profile. (2) Profile with dominant alpha-1 peak. (3) Profile with a dominant albumin peak. (4) “Serum-like” profile.**



**Additional file 2. Model estimates of the effects of various parameters on the occurrence of proteinuria.**

<b>Linear terms</b>	<b>Estimate</b>	<b>p-value</b>
Male	reference	
Female	-0.155	0.824
dengue WS-	reference	
dengue WS+	0.295	0.778
severe dengue	1.181	0.334
primary dengue	reference	
secondary dengue	-0.233	0.780
<b>Non linear terms</b>	<b>edf</b>	<b>p-value</b>
s(daof)	1.812	<0.277
s(age)	1	0.176

edf: effective degrees of freedom of the smooth function terms (edf >1 indicate nonlinear relationships)

F value is an approximate F-test

daof: day after onset of fever

### 3.3. Conclusion et perspectives

Cette étude n'a pas démontré l'utilité de la détection de la protéinurie, soit par bandelette, soit par UPCR, comme aide au triage des patients atteints de dengue avant leur admission à l'hôpital. Une protéinurie a été observée aussi bien dans les cas les moins sévères de dengue, sans signe d'alerte, que chez les patients un peu plus sévères présentant des signes d'alertes ou classifiés DHF. Néanmoins, la mesure de l'UPCR semble être intéressante comme outil de suivi de l'évolution des patients au cours de la maladie. En effet, nos résultats et ceux de Vasanwala *et al.* [211,212] indiquent que l'excrétion de protéines dans l'urine augmente lors de la phase critique de la maladie, phase qui commence entre quatre et cinq jours après le début de la fièvre et dure deux à trois jours (figure 18), atteint un pic une semaine après l'apparition des symptômes puis diminue alors que le patient entre dans la phase de convalescence de la maladie. La fin de la phase critique et l'entrée dans la phase de convalescence marquent la fin des fuites plasmatiques. Une réabsorption progressive des liquides présents dans le milieu extracellulaire se produit alors. A ce stade de la maladie, il est nécessaire d'arrêter les apports liquidiens par voie intraveineuse afin d'éviter une hypervolémie et la survenue d'œdèmes pulmonaires (figure 18). A l'heure actuelle, le paramètre biologique recommandé pour le suivi de l'évolution du patient au cours de la maladie est la mesure de l'hématocrite qui augmente au cours de la phase critique et doit se stabiliser ou voire même diminuer du fait de la réabsorption des fluides au moment de la phase de convalescence. Pouvoir suivre l'évolution du patient avec un échantillon d'urine à la place d'un échantillon sanguin représenterait une amélioration pour le confort des patients, particulièrement pour les enfants auxquels il peut être plus difficile de faire accepter une prise de sang. Il serait très intéressant de comparer, quotidiennement, en parallèle, et à partir d'une large cohorte de patients, la contribution de l'hématocrite et du ratio protéine/créatinine urinaire de patients hospitalisés pour une infection par le DENV afin de confirmer l'intérêt du suivi de l'UPCR au cours de la maladie.

Ce travail a confirmé que les reins sont fréquemment affectés lors d'une infection par le DENV. En effet, près d'un tiers des patients inclus dans notre étude ont présenté une protéinurie significative au cours de leur hospitalisation. L'affection des reins semble multifactorielle puisque nous avons montré que les protéinuries pouvaient être tubulaires, glomérulaires ou mixte. Ce travail nécessite d'être approfondi afin mieux comprendre la pathogénèse de la dengue au niveau des reins et évaluer

l'incidence réelle des lésions rénales aiguës au cours des infections par le DENV. Une étude permettant d'évaluer de façon complète la fonction rénale avec réalisation de biopsie chez un nombre significatif de patients serait nécessaire.

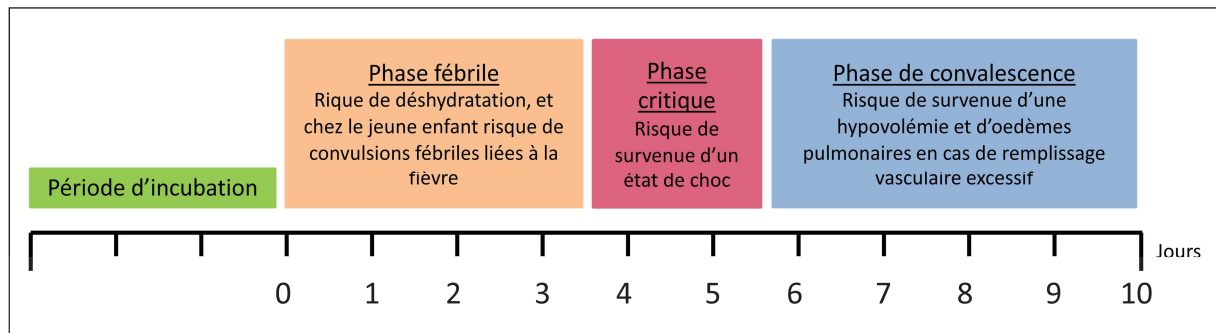


Figure 18 : Différentes phases et complications possibles au cours de la dengue

# Conclusion générale et perspectives

---

Au cours de la dernière décennie, la dengue n'a cessé de prendre de l'ampleur. Elle représente aujourd'hui une menace de santé pour plus de 50% de la population mondiale et constitue un fardeau pour les services de santé et les économies des pays les plus touchés. Depuis 1970, le nombre de pays affectés ainsi que le nombre de cas déclarés se sont considérablement accrus. On estime que le nombre de cas a doublé à chaque décennie jusqu'en 2000 puis entre 2000 et 2010 un quasi doublement tous les 5 ans a été enregistré. Depuis quelques années, les épidémies de dengue se sont intensifiées dans les zones urbaines des régions endémiques et tendent à gagner les régions rurales. De plus en plus de régions, jusque là indemnes de la maladie, déclarent leurs premières épidémies (Tokyo, 2014 ; Madère, 2012 ; etc.) ou leur premiers cas autochtones (France, Croatie). Face au peu d'efforts cohérents et coordonnés entrepris pour contenir la progression de la maladie et inverser les tendances observées, l'OMS a élaboré une stratégie de lutte contre la dengue pour la période 2012-2020. Cette stratégie a pour but de réduire le fardeau de la dengue à l'échelle mondiale, avec pour objectifs spécifiques de faire baisser la mortalité d'au moins 50% et la morbidité d'au moins 25% d'ici 2020. Elle repose sur cinq éléments techniques, à savoir : (i) le diagnostic et la prise en charge des cas ; (ii) la surveillance intégrée et la préparation aux flambées épidémiques ; (iii) la lutte anti-vectorielle durable ; (iv) l'introduction des futurs vaccins ; (v) la recherche fondamentale opérationnelle et pratique, notamment dans les domaines du diagnostic et de la lutte anti-vectorielle. Ce travail de thèse, qui a porté sur le diagnostic de la dengue, est donc tout à fait en adéquation avec la stratégie 2012-2020 de l'OMS.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la fois à l'aspect clinique et à l'aspect santé publique du diagnostic de la dengue. D'un point de vue clinique, l'enjeu du diagnostic biologique est double. D'une part des tests performants pour identifier les cas de dengue sont nécessaires et d'autre part des tests permettant de détecter les patients susceptibles d'évoluer vers une forme grave de la maladie seraient d'une grande aide pour les cliniciens. En pratique, le diagnostic biologique de la dengue n'est peu ou pas réalisé dans les structures de soins des pays en voie de développement, pays les plus



touchés par la maladie, qui ne disposent souvent que de laboratoires de biologie rudimentaires et aucun marqueur biologique permettant d'identifier les patients à risque de développer une forme sévère de la maladie n'est disponible pour aider les cliniciens dans le triage des patients. Dans le cadre des actions de santé publique, le diagnostic biologique de la dengue est nécessaire pour assurer une surveillance correcte de la maladie, la mise en place d'un contrôle vectoriel dans les zones où des cas de dengue sont détectés, les études séro-épidémiologiques ou encore les investigations d'épidémie. Le prélèvement de sang lors d'études épidémiologiques de terrain est logistiquement lourd puisqu'il nécessite la présence de personnel expérimenté en nombre important. De plus, le caractère invasif et parfois douloureux du prélèvement limite le nombre de volontaires lors des études de masse. Ce travail de thèse a été mené afin d'étudier plusieurs solutions envisageables pour faciliter et rendre le diagnostic de la dengue plus accessible.

Dans une première partie du travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux tests de diagnostic rapides, outils récemment développés pour faciliter le diagnostic de la dengue. Ces tests ont l'avantage de donner un résultat en moins d'une demi-heure et d'être simple d'utilisation. Ils peuvent être réalisés dans tous les types de structures médicales, des plus rudimentaires au mieux équipées. L'OMS recommande aujourd'hui leur utilisation comme outil de diagnostic de première intention afin d'identifier le plus précocement possible les cas de dengue. Notre travail sur l'évaluation d'un des tests rapides commercialisés a néanmoins montré que les performances du test variaient en fonction du type de structure dans laquelle ils étaient réalisés. En effet, avec les mêmes échantillons, de moins bonnes performances ont été obtenues dans les laboratoires de biologie rudimentaires rattachés à deux hôpitaux provinciaux du Cambodge par rapport à ceux obtenus dans un laboratoire de référence dans la capitale du Cambodge. La simplicité d'utilisation du test est donc à relativiser. Notre travail a aussi montré les limites du test à fournir un diagnostic de certitude dans les régions où la dengue est endémique. Le diagnostic de certitude se fait par la détection de l'antigène NS1 et malheureusement à l'heure actuelle les TDR disponibles présentent un manque de sensibilité important pour les cas de dengue secondaire, majoritaires en régions endémiques. La détection des anticorps dirigés contre le DENV (IgM et IgG) permet néanmoins d'orienter le diagnostic vers une dengue. Globalement, en période d'épidémie de la dengue, le test rapide évalué, qui associe détection de l'antigène NS1, des

IgM et des IgG anti-DENV, permet de prédire 85,7% des cas de dengue lorsqu'il est réalisé au chevet du malade, et est donc un test tout à fait acceptable.

Une seconde partie de ce travail a été consacrée à l'utilisation des urines et de la salive en remplacement du sang pour les différentes techniques les plus fréquemment utilisées pour le diagnostic de la dengue. Bien que les performances des différentes méthodes de diagnostic ne soient pas aussi bonnes avec de l'urine et de la salive qu'avec du plasma, les résultats obtenus par PCR en temps réel et avec les ELISAs pour la détection des anticorps anti-DENV ont démontré l'intérêt potentiel de ces deux fluides biologiques pour détecter les infections par le DENV, particulièrement pour des études épidémiologiques afin de mesurer par exemple l'incidence de la maladie ou des formes asymptomatiques.

Une dernière partie du travail a été consacrée à l'étude de la protéinurie comme marqueur pronostic potentiel de sévérité de la dengue. En effet, il avait déjà été démontré que la fuite capillaire qui se produit dans les formes sévères de la dengue se traduit par une excrétion accrue des protéines plasmatiques dans l'urine [201]. Ce marqueur biologique ne s'est pas révélé être utile pour diagnostiquer précocement les formes sévères de la maladie mais semble plutôt être un outil intéressant afin de suivre l'évolution du patient au cours de la maladie. Notre travail a aussi permis de confirmer qu'au cours de la dengue, les reins sont affectés puisque nous avons détecté une protéinurie significative chez un près d'un tiers des patients inclus dans notre étude. Nous espérons que ce travail sur la protéinurie contribuera à attirer l'attention des médecins et des chercheurs sur l'importance de surveiller la fonction rénale au cours des infections par le DENV et sur la nécessité d'investiguer plus en profondeur la survenue des atteintes rénales chez les patients atteints de dengue et leur conséquence sur l'évolution du patient.

Au cours de cette thèse, plusieurs approches pour améliorer le diagnostic de la dengue ont été envisagées mais le travail réalisé n'est évidemment pas exhaustif tant la problématique du diagnostic de la dengue est vaste.

Nous nous sommes intéressés à l'urine et la salive comme échantillons alternatifs au sang veineux pour les techniques de diagnostic les plus couramment employées mais nous n'avons pas inclus le sang capillaire. Ce dernier peut facilement être prélevé en piquant avec une micro-aiguille l'extrémité du doigt ou le talon du patient. La goutte de sang obtenue est ensuite absorbée et séchée sur du papier

buvard. Plusieurs études ont déjà été réalisées afin d'évaluer l'intérêt de ce type de prélèvement et de bons résultats ont été obtenus [213–220]. Il pourrait être intéressant de comparer les performances des différentes techniques de diagnostic réalisées avec des urines, de la salive et du sang capillaire afin de déterminer tout au long de la maladie quels échantillons alternatifs et quelles techniques de diagnostic permettent d'obtenir les meilleurs résultats comparés au sang veineux.

Concernant la recherche de marqueurs de sévérité, nous nous sommes penchés dans ce travail que sur un marqueur potentiel, la protéinurie. De nombreux autres marqueurs, et particulièrement des cytokines, ont été proposés mais aucun ne semble à l'heure actuelle satisfaisant. Il est possible que la recherche d'un marqueur unique ne soit pas la bonne piste mais qu'il faille plutôt s'orienter vers une combinaison de plusieurs marqueurs afin d'établir un score de sévérité. Une telle approche a, par exemple, permis dans le cas des hépatites virales de mettre au point des tests permettant d'évaluer, en combinant les résultats de six paramètres sanguins, la sévérité de la fibrose (Fibrotest) et le niveau d'activité inflammatoire (Actitest). Dans le cas de la dengue, on pourrait envisager une combinaison des différents marqueurs qui ont été associés avec la sévérité, comme la NS1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-10, l'ASAT, la ferritine ou encore la LDL. Le dosage des différents marqueurs pourraient être réalisé en une seule étape grâce à la technologie Luminex. Des études protéomiques pourraient aider à l'identification d'autres protéines dont l'expression est différente entre des patients présentant différents niveaux de sévérité de la maladie. Une telle étude a été menée par Kumar *et al.* et 25 protéines ont été identifiées comme marqueurs potentiels de DHF à partir d'un mélange de plusieurs échantillons [221]. Il serait maintenant intéressant de doser chaque marqueur individuellement chez un nombre de patients conséquent afin de confirmer ou non leur rôle prédictif.

Un problème important que nous n'avons pas abordé dans ce travail est le manque de spécificité des tests sérologiques pour le diagnostic de la dengue dans les régions où co-circulent plusieurs flavivirus du fait de l'existence de réactions croisées. Dans ces régions, un résultat positif en sérologie ne peut être utilisé pour poser un diagnostic de certitude d'infection par le DENV. La recherche d'antigènes spécifiques à chaque flavivirus constitue un axe de recherche nécessaire pour l'amélioration du diagnostic de la dengue.

# Bibliographie

---

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11: 480–496.
2. Normile D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. *Science.* 2013;342: 415–415. doi:10.1126/science.342.6157.415
3. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, World Health Organization. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control.* New ed. Geneva: TDR : World Health Organization; 2009.
4. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496: 504–507. doi:10.1038/nature12060
5. Charlier N, Leyssen P, Pleij CWA, Lemey P, Billoir F, Van Laethem K, et al. Complete genome sequence of Montana Myotis leukoencephalitis virus, phylogenetic analysis and comparative study of the 3' untranslated region of flaviviruses with no known vector. *J Gen Virol.* 2002;83: 1875–1885.
6. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44: 649–688. doi:10.1146/annurev.mi.44.100190.003245
7. Gebhard LG, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome. *Viruses.* 2011;3: 1739–1756. doi:10.3390/v3091739
8. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8: S7–16. doi:10.1038/nrmicro2460
9. Netsawang J, Noisakran S, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Wongwiwat W, Malasit P, et al. Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res.* 2010;147: 275–283. doi:10.1016/j.virusres.2009.11.012
10. Colpitts TM, Barthel S, Wang P, Fikrig E. Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. *PloS One.* 2011;6: e24365. doi:10.1371/journal.pone.0024365
11. Yu I-M, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 2008;319: 1834–1837. doi:10.1126/science.1153264
12. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.* 2003;10: 907–912. doi:10.1038/nsb990
13. Catteau A, Kalinina O, Wagner M-C, Deubel V, Courageot M-P, Desprès P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol.* 2003;84: 2781–2793. doi:10.1099/vir.0.19163-0
14. Catteau A, Roué G, Yuste VJ, Susin SA, Desprès P. Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation. *Biochimie.* 2003;85: 789–793.

15. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2012;2: 168–175. doi:10.1016/j.coviro.2012.02.011
16. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 2013;98: 192–208. doi:10.1016/j.antiviral.2013.03.008
17. Fan J, Liu Y, Yuan Z. Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. *Virologica Sinica.* 2014;29: 162–169. doi:10.1007/s12250-014-3459-1
18. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108: 8003–8008. doi:10.1073/pnas.1017338108
19. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38: 1053–1057.
20. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40: 376–381.
21. De la Cruz-Hernández SI, Flores-Aguilar H, González-Mateos S, López-Martínez I, Alpuche-Aranda C, Ludert JE, et al. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88: 446–454. doi:10.4269/ajtmh.12-0023
22. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186: 1165–1168. doi:10.1086/343813
23. Amorim JH, Alves RP dos S, Boscardin SB, Ferreira LC de S. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res.* 2014;181: 53–60. doi:10.1016/j.virusres.2014.01.001
24. Chen J, Ng MM-L, Chu JJH. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2015;11: e1005053. doi:10.1371/journal.ppat.1005053
25. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med.* 2015;7: 304ra142. doi:10.1126/scitranslmed.aaa3863
26. Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med.* 2015;7: 304ra141. doi:10.1126/scitranslmed.aaa3787
27. Kümmerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol.* 2002;76: 4773–4784.
28. Li Y, Li Q, Wong YL, Liew LSY, Kang C. Membrane topology of NS2B of dengue virus revealed by NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2015; doi:10.1016/j.bbamem.2015.06.010



29. Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 2013;3. doi:10.3402/iee.v3i0.19839
30. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol.* 1999;73: 4611–4621.
31. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* 2007;282: 8873–8882. doi:10.1074/jbc.M609919200
32. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol.* 2006;87: 2605–2614. doi:10.1099/vir.0.81844-0
33. Morrison J, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. Innate immunity evasion by Dengue virus. *Viruses.* 2012;4: 397–413. doi:10.3390/v4030397
34. De La Guardia C, Leonart R. Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. *BioMed Res Int.* 2014;2014: 825039. doi:10.1155/2014/825039
35. Asnet Mary J, Paramasivan R, Shenbagarathai R. Identification of sequence motifs involved in Dengue virus - Host interactions. *J Biomol Struct Dyn.* 2015; 1–33. doi:10.1080/07391102.2015.1042914
36. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988;239: 476–481.
37. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11: 369–377. doi:10.1016/j.mib.2008.06.004
38. Villordo SM, Gamarnik AV. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res.* 2009;139: 230–239. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.016
39. Shi P-Y. Structural biology. Unraveling a flavivirus enigma. *Science.* 2014;343: 849–850. doi:10.1126/science.1251249
40. Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau G, Vourc'h G, et al. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N.* 2010;10: 249–258. doi:10.1089/vbz.2009.0026
41. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. Halstead SB, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e646. doi:10.1371/journal.pntd.0000646
42. Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* Wallingford, Oxon, UK ; New York: CAB International; 1997.
43. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife.* 2015;4. doi:10.7554/eLife.08347
44. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2009;9: 523–540. doi:10.1016/j.meegid.2009.02.003

45. Tjaden NB, Thomas SM, Fischer D, Beierkuhnlein C. Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7: e2207. doi:10.1371/journal.pntd.0002207
46. Angel B, Joshi V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *J Vector Borne Dis*. 2008;45: 56–59.
47. Cecílio SG, Júnior WFS, Tótola AH, de Brito Magalhães CL, Ferreira JMS, de Magalhães JC. Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae from southeastern Brazil. *J Vector Ecol J Soc Vector Ecol*. 2015;40: 71–74. doi:10.1111/jvec.12134
48. Grange L, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A, Gresh L, Paul R, Harris E. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. *Front Immunol*. 2014;5: 280. doi:10.3389/fimmu.2014.00280
49. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004;189: 1411–1418. doi:10.1086/383043
50. Aye KS, Charngkaew K, Win N, Wai KZ, Moe K, Punyadee N, et al. Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. *Hum Pathol*. 2014;45: 1221–1233. doi:10.1016/j.humpath.2014.01.022
51. Lee Y-R, Liu M-T, Lei H-Y, Liu C-C, Wu J-M, Tung Y-C, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol*. 2006;87: 3623–3630. doi:10.1099/vir.0.82093-0
52. Kanlaya R, Pattanakitsakul S, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V. Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. *J Proteome Res*. 2009;8: 2551–2562. doi:10.1021/pr900060g
53. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol*. 2004;85: 1801–1813. doi:10.1099/vir.0.19652-0
54. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog*. 2007;3: e183. doi:10.1371/journal.ppat.0030183
55. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen van VC, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012;366: 1423–1432. doi:10.1056/NEJMra1110265
56. Lizarraga KJ, Nayer A. Dengue-associated kidney disease. *J Nephropathol*. 2014;3: 57–62. doi:10.12860/jnp.2014.13
57. Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol*. 2013;12: 906–919. doi:10.1016/S1474-4422(13)70150-9
58. Khairallah M, Kahloun R. Ocular manifestations of emerging infectious diseases. *Curr Opin Ophthalmol*. 2013;24: 574–580. doi:10.1097/ICU.0b013e3283654e09

59. Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol*. 2011;29: 587–619. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101315
60. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*. 2003;9: 921–927. doi:10.1038/nm887
61. De la C Sierra B, Kourí G, Guzmán MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol*. 2007;152: 533–542. doi:10.1007/s00705-006-0869-x
62. Stephens H a. F. HLA and other gene associations with dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338: 99–114. doi:10.1007/978-3-642-02215-9\_8
63. Harapan H, Fajar JK, Wahyuniati N, Anand JR, Nambaru L, Jamil KF. Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection. *Egypt J Med Hum Genet*. 2013;14: 1–11. doi:10.1016/j.ejmhg.2012.08.003
64. Vasquez Velasquez C, Roman AD, Lan NTP, Huy NT, Mercado ES, Espino FE, et al. Alpha tryptase allele of Tryptase 1 (TPSAB1) gene associated with Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS) in Vietnam and Philippines. *Hum Immunol*. 2015;76: 318–323. doi:10.1016/j.humimm.2015.03.009
65. Simon-Loriere E, Lin R-J, Kalayanarooj SM, Chuansumrit A, Casademont I, Lin S-Y, et al. High Anti-Dengue Virus Activity of the OAS Gene Family Is Associated With Increased Severity of Dengue. *J Infect Dis*. 2015; doi:10.1093/infdis/jiv321
66. Kalayanarooj S, Gibbons RV, Vaughn D, Green S, Nisalak A, Jarman RG, et al. Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *J Infect Dis*. 2007;195: 1014–1017. doi:10.1086/512244
67. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174: 479–493.
68. Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, et al. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66: 765–773.
69. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*. 1994;75 ( Pt 1): 65–75.
70. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon null, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999;73: 4738–4747.
71. Tuiskunen A, Monteil V, Plumet S, Boubis L, Wahlström M, Duong V, et al. Phenotypic and genotypic characterization of dengue virus isolates differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. *Arch Virol*. 2011;156: 2023–2032. doi:10.1007/s00705-011-1100-2
72. Tuiskunen A, Wahlström M, Bergström J, Buchy P, Leparç-Goffart I, Lundkvist A. Phenotypic characterization of patient dengue virus isolates in BALB/c mice differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. *Virology*. 2011;8: 398. doi:10.1186/1743-422X-8-398

73. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997.
74. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res.* 2008;72: 1–76. doi:10.1016/S0065-3527(08)00401-6
75. Ashburn PM, Craig CF, US Army Board for the Study of Tropical Diseases. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. 1907. *J Infect Dis.* 2004;189: 1747–1783; discussion 1744–1746. doi:10.1086/383418
76. Hotta S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J Infect Dis.* 1952;90: 1–9.
77. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952;1: 30–50.
78. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015;385: 453–465. doi:10.1016/S0140-6736(14)60572-9
79. Amarasinghe A. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerg Infect Dis.* 2011; doi:10.3201/eid1708.101515
80. Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health.* 2011;39: 3–11. doi:10.2149/tmh.2011-S05
81. Issack MI, Pursem VN, Barkham TMS, Ng L-C, Inoue M, Manraj SS. Reemergence of Dengue in Mauritius. *Emerg Infect Dis.* 2010;16: 716–718. doi:10.3201/eid1604.091582
82. Xu G, Dong H, Shi N, Liu S, Zhou A, Cheng Z, et al. An outbreak of dengue virus serotype 1 infection in Cixi, Ningbo, People’s Republic of China, 2004, associated with a traveler from Thailand and high density of *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76: 1182–1188.
83. Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes J-M, Zeller H, et al. Outbreak of Dengue and Chikungunya Fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008;14: 1135–1137. doi:10.3201/eid1407.071521
84. Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkoghe C, Becquart P, Grard G, et al. Concurrent Chikungunya and Dengue Virus Infections during Simultaneous Outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2009;15: 591–593. doi:10.3201/eid1504.080664
85. Seki N, Iwashita Y, Moto R, Kamiya N, Kurita M, Tahara N, et al. An autochthonous outbreak of dengue type 1 in Tokyo, Japan 2014. *Nihon Kōshū Eisei Zasshi Jpn J Public Health.* 2015;62: 238–250. doi:10.11236/jph.62.5\_238
86. Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2011;16.
87. La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2010;15: 19676.
88. Marchand E, Prat C, Jeannin C, Lafont E, Bergmann T, Flusin O, et al. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2013;18: 20661.

89. Schaffner F, Fontenille D, Mathis A. Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirogenesis in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2014;14: 1044. doi:10.1016/S1473-3099(14)70925-9
90. Huy R, Buchy P, Conan A, Ngan C, Ong S, Ali R, et al. National dengue surveillance in Cambodia 1980-2008: epidemiological and virological trends and the impact of vector control. *Bull World Health Organ.* 2010;88: 650–657. doi:10.2471/BLT.09.073908
91. Vong S, Goyet S, Ly S, Ngan C, Huy R, Duong V, et al. Under-recognition and reporting of dengue in Cambodia: a capture-recapture analysis of the National Dengue Surveillance System. *Epidemiol Infect.* 2012;140: 491–499. doi:10.1017/S0950268811001191
92. Kasper MR, Blair PJ, Touch S, Sokhal B, Yasuda CY, Williams M, et al. Infectious etiologies of acute febrile illness among patients seeking health care in south-central Cambodia. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86: 246–253. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0409
93. Mueller TC, Siv S, Khim N, Kim S, Fleischmann E, Arie F, et al. Acute undifferentiated febrile illness in rural Cambodia: a 3-year prospective observational study. *PloS One.* 2014;9: e95868. doi:10.1371/journal.pone.0095868
94. Vong S, Khieu V, Glass O, Ly S, Duong V, Huy R, et al. Dengue incidence in urban and rural Cambodia: results from population-based active fever surveillance, 2006-2008. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e903. doi:10.1371/journal.pntd.0000903
95. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8: S30–38.
96. Guzmán MG, Kourí G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3: 621–627.
97. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30: 545–551.
98. Leparac-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, Tuiskunen A, Moureau G, Charrel R, et al. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2009;45: 61–66. doi:10.1016/j.jcv.2009.02.010
99. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. Single-reaction, multiplex, real-time rt-PCR for the detection, quantitation, and serotyping of dengue viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7: e2116. doi:10.1371/journal.pntd.0002116
100. Hue KDT, Tuan TV, Thi HTN, Bich CTN, Anh HHL, Wills BA, et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Methods.* 2011;177: 168–173. doi:10.1016/j.jviromet.2011.08.002
101. Najjioullah F, Viron F, Césaire R. Evaluation of four commercial real-time RT-PCR kits for the detection of dengue viruses in clinical samples. *Virol J.* 2014;11: 164. doi:10.1186/1743-422X-11-164
102. Saengsawang J, Nathalang O, Kamonsil M, Watanaveeradej V. Comparison of two commercial real-time PCR assays for detection of dengue virus in patient serum samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52: 3781–3783. doi:10.1128/JCM.01870-14



103. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7: e2311. doi:10.1371/journal.pntd.0002311
104. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virol J*. 2010;7: 361. doi:10.1186/1743-422X-7-361
105. Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5: e1309. doi:10.1371/journal.pntd.0001309
106. Thai KTD, Phuong HL, Thanh Nga TT, Giao PT, Hung LQ, Van Nam N, et al. Clinical, epidemiological and virological features of Dengue virus infections in Vietnamese patients presenting to primary care facilities with acute undifferentiated fever. *J Infect*. 2010;60: 229–237. doi:10.1016/j.jinf.2010.01.003
107. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol*. 1998;36: 1189–1192.
108. De Paula SO, Fonseca BAL da. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. 2004;8: 390–398. doi:S1413-86702004000600002
109. Libraty DH, Endy TP, Hough H-SH, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis*. 2002;185: 1213–1221. doi:10.1086/340365
110. Wang W-K, Chen H-L, Yang C-F, Hsieh S-C, Juan C-C, Chang S-M, et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2006;43: 1023–1030. doi:10.1086/507635
111. Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeung N, et al. Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5: e1244. doi:10.1371/journal.pntd.0001244
112. Thomas L, Najjioullah F, Verlaeten O, Martial J, Brichler S, Kaidomar S, et al. Relationship between nonstructural protein 1 detection and plasma virus load in Dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83: 696–699. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0138
113. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis*. 2006;193: 1078–1088. doi:10.1086/500949
114. Chau TNB, Anders KL, Lien LB, Hung NT, Hieu LTM, Tuan NM, et al. Clinical and virological features of Dengue in Vietnamese infants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4: e657. doi:10.1371/journal.pntd.0000657
115. Allonso D, Meneses MDF, Fernandes CA, Ferreira DF, Mohana-Borges R. Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PloS One*. 2014;9: e113634. doi:10.1371/journal.pone.0113634
116. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis*. 1997;176: 313–321.

117. Villar-Centeno LA, Díaz-Quijano FA, Martínez-Vega RA. Biochemical alterations as markers of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78: 370–374.
118. Souza LJ de, Alves JG, Nogueira RMR, Gicovate Neto C, Bastos DA, Siqueira EW da S, et al. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* 2004;8: 156–163. doi:/S1413-86702004000200006
119. Lee LK, Gan VC, Lee VJ, Tan AS, Leo YS, Lye DC. Clinical relevance and discriminatory value of elevated liver aminotransferase levels for dengue severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6: e1676. doi:10.1371/journal.pntd.0001676
120. Suvarna JC, Rane PP. Serum lipid profile: a predictor of clinical outcome in dengue infection. *Trop Med Int Health TM IH.* 2009;14: 576–585. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02261.x
121. Van Gorp ECM, Suharti C, Mairuhu ATA, Dolmans WMV, van Der Ven J, Demacker PNM, et al. Changes in the plasma lipid profile as a potential predictor of clinical outcome in dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2002;34: 1150–1153. doi:10.1086/339539
122. Durán A, Carrero R, Parra B, González A, Delgado L, Mosquera J, et al. Association of lipid profile alterations with severe forms of dengue in humans. *Arch Virol.* 2015; doi:10.1007/s00705-015-2433-z
123. Biswas HH, Gordon A, Nuñez A, Perez MA, Balmaseda A, Harris E. Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Are Associated with Severe Dengue Outcome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: e0003904. doi:10.1371/journal.pntd.0003904
124. Fragnoud R, Yugueros-Marcos J, Pachot A, Bedin F. Isotope Coded Protein Labeling analysis of plasma specimens from acute severe dengue fever patients. *Proteome Sci.* 2012;10: 60. doi:10.1186/1477-5956-10-60
125. Soundravally R, Agieshkumar B, Daisy M, Sherin J, Cleetus CC. Ferritin levels predict severe dengue. *Infection.* 2015;43: 13–19. doi:10.1007/s15010-014-0683-4
126. Van de Weg CAM, Huits RMHG, Pannuti CS, Brouns RM, van den Berg RWA, van den Ham H-J, et al. Hyperferritinaemia in dengue virus infected patients is associated with immune activation and coagulation disturbances. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8: e3214. doi:10.1371/journal.pntd.0003214
127. Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Atamasirikul K, Tangnararatchakit K. Serum ferritin levels in children with dengue infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2008;39: 832–836.
128. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 532–543. doi:10.1038/nri3014
129. Malavige GN, Gomes L, Alles L, Chang T, Salimi M, Fernando S, et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC Infect Dis.* 2013;13: 341. doi:10.1186/1471-2334-13-341
130. Ferreira RAX, Oliveira SA de, Gandini M, Ferreira L da C, Correa G, Abiraude FM, et al. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. *Acta Trop.* 2015; doi:10.1016/j.actatropica.2015.04.023
131. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol.* 1999;59: 329–334.

132. Mangione JNA, Huy NT, Lan NTP, Mbanefo EC, Ha TTN, Bao LQ, et al. The association of cytokines with severe dengue in children. *Trop Med Health*. 2014;42: 137–144. doi:10.2149/tmh.2014-09
133. Murgue B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. *J Med Virol*. 2001;65: 97–104.
134. Koraka P, Murgue B, Deparis X, Van Gorp ECM, Setiati TE, Osterhaus ADME, et al. Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity. *J Med Virol*. 2004;72: 445–450. doi:10.1002/jmv.20007
135. Furuta T, Murao LA, Lan NTP, Huy NT, Huong VTQ, Thuy TT, et al. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6: e1505. doi:10.1371/journal.pntd.0001505
136. Tseng C-S, Lo H-W, Teng H-C, Lo W-C, Ker C-G. Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;43: 99–102. doi:10.1016/j.femsim.2004.10.004
137. Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanarooj S, Libraty DH, Green S, et al. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever. *J Virol*. 2007;81: 1592–1600. doi:10.1128/JVI.01642-06
138. Seet RCS, Chow AWL, Quek AML, Chan Y-H, Lim ECH. Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in adults with dengue virus infection: a case-control study. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2009;13: e248–253. doi:10.1016/j.ijid.2008.11.028
139. Kalita J, Chauhan PS, Mani VE, Bhoi SK, Misra UK. VEGF and its receptors in dengue virus infection. *J Med Virol*. 2015; doi:10.1002/jmv.24205
140. Van de Weg CAM, Pannuti CS, van den Ham H-J, de Araújo ESA, Boas LSV, Felix AC, et al. Serum angiopoietin-2 and soluble VEGF receptor 2 are surrogate markers for plasma leakage in patients with acute dengue virus infection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2014;60: 328–335. doi:10.1016/j.jcv.2014.05.001
141. Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, De La Barrera R, Dessy F, Fernandez S, et al. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88: 73–88. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0361
142. Simasathien S, Thomas SJ, Watanaveeradej V, Nisalak A, Barberousse C, Innis BL, et al. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus naive children. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78: 426–433.
143. Watanaveeradej V, Gibbons RV, Simasathien S, Nisalak A, Jarman RG, Kerdpanich A, et al. Safety and immunogenicity of a rederived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults living in Thailand: a randomized trial. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91: 119–128. doi:10.4269/ajtmh.13-0452
144. Watanaveeradej V, Simasathien S, Nisalak A, Endy TP, Jarman RG, Innis BL, et al. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naive infants. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85: 341–351. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0501

145. Thomas SJ, Endy TP. Vaccines for the prevention of dengue: development update. *Hum Vaccin*. 2011;7: 674–684.
146. Durbin AP, Whitehead SS, McArthur J, Perreault JR, Blaney JE, Thumar B, et al. rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. *J Infect Dis*. 2005;191: 710–718. doi:10.1086/427780
147. Durbin AP, Karron RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perreault JR, et al. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65: 405–413.
148. Durbin AP, McArthur J, Marron JA, Blaney JE, Thumar B, Wanionek K, et al. The live attenuated dengue serotype 1 vaccine rDEN1Delta30 is safe and highly immunogenic in healthy adult volunteers. *Hum Vaccin*. 2006;2: 167–173.
149. Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Schmidt AC, Whitehead SS. Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. *Vaccine*. 2011;29: 7242–7250. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.023
150. Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, et al. Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults. *J Infect Dis*. 2015; doi:10.1093/infdis/jiv082
151. Cunningham M, Tang J. Purification and properties of cathepsin D from porcine spleen. *J Biol Chem*. 1976;251: 4528–4536.
152. Hss A-S, Koh M-T, Tan KK, Chan LG, Zhou L, Bouckennooghe A, et al. Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2-11 years in Malaysia: a randomized, placebo-controlled, Phase III study. *Vaccine*. 2013;31: 5814–5821. doi:10.1016/j.vaccine.2013.10.013
153. Lanata CF, Andrade T, Gil AI, Terrones C, Valladolid O, Zambrano B, et al. Immunogenicity and safety of tetravalent dengue vaccine in 2-11 year-olds previously vaccinated against yellow fever: randomized, controlled, phase II study in Piura, Peru. *Vaccine*. 2012;30: 5935–5941. doi:10.1016/j.vaccine.2012.07.043
154. Leo YS, Wilder-Smith A, Archuleta S, Shek LP, Chong C-Y, Leong HN, et al. Immunogenicity and safety of recombinant tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in individuals aged 2-45 y: Phase II randomized controlled trial in Singapore. *Hum Vaccines Immunother*. 2012;8: 1259–1271. doi:10.4161/hv.21224
155. Poo J, Galan F, Forrat R, Zambrano B, Lang J, Dayan GH. Live-attenuated Tetravalent Dengue Vaccine in Dengue-naïve Children, Adolescents, and Adults in Mexico City: Randomized Controlled Phase 1 Trial of Safety and Immunogenicity. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; doi:10.1097/INF.0b013e3181fe05af
156. Tran NH, Luong CQ, Vu TQH, Forrat R, Lang J, Vu QD, et al. Safety and Immunogenicity of Recombinant, Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine (CYD- TDV) in Healthy Vietnamese Adults and Children. *J Vaccines Vaccin*. 2012;03. doi:10.4172/2157-7560.1000162
157. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHJM, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a

- phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014;384: 1358–1365.  
doi:10.1016/S0140-6736(14)61060-6
158. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2012;380: 1559–1567.  
doi:10.1016/S0140-6736(12)61428-7
159. Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *N Engl J Med*. 2014;  
doi:10.1056/NEJMoa1411037
160. Osorio JE, Huang CY-H, Kinney RM, Stinchcomb DT. Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine*. 2011;29: 7251–7260. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.020
161. George SL, Wong MA, Dube TJT, Boroughs KL, Stovall JL, Luy BE, et al. Safety and Immunogenicity of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Flavivirus-Naïve Adults: A Randomized, Double-Blinded Phase 1 Clinical Trial. *J Infect Dis*. 2015;  
doi:10.1093/infdis/jiv179
162. Osorio JE, Velez ID, Thomson C, Lopez L, Jimenez A, Haller AA, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naïve healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14: 830–838. doi:10.1016/S1473-3099(14)70811-4
163. Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, Danko JR, Tamminga C, Simmons M, et al. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine*. 2011;29: 960–968.  
doi:10.1016/j.vaccine.2010.11.050
164. Porter KR, Ewing D, Chen L, Wu S-J, Hayes CG, Ferrari M, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a vaxfectin-adjuvanted tetravalent dengue DNA vaccine. *Vaccine*. 2012;30: 336–341. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.085
165. Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, Sidney J, Greenbaum JA, Fernando AN, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: E2046–2053. doi:10.1073/pnas.1305227110
166. Guy B, Saville M, Lang J. Développement d'un vaccin tétravalent contre la dengue. *Virologie*. 2010;14: 311–321. doi:10.1684/vir.2010.0317
167. Chu H, George SL, Stinchcomb DT, Osorio JE, Partidos CD. CD8+ T cell Responses in Flavivirus-Naïve Individuals Following Immunization with a Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate. *J Infect Dis*. 2015; doi:10.1093/infdis/jiv258
168. Plotkin SA. Increasing Complexity of Vaccine Development. *J Infect Dis*. 2015;212 Suppl 1: S12–16. doi:10.1093/infdis/jiu568
169. Yan W. Challenge accepted: Human challenge trials for dengue. *Nat Med*. 2015;21: 828–830.  
doi:10.1038/nm0815-828
170. Tricou V, Vu HTT, Quynh NVN, Nguyen CVV, Tran HT, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis*. 2010;10: 142. doi:10.1186/1471-2334-10-142



171. Blacksell SD, Jarman RG, Bailey MS, Tanganuchitcharnchai A, Jenjaroen K, Gibbons RV, et al. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2011;18: 2095–2101. doi:10.1128/CVI.05285-11
172. Wang SM, Sekaran SD. Evaluation of a commercial SD dengue virus NS1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for early diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol*. 2010;48: 2793–2797. doi:10.1128/JCM.02142-09
173. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8: e3171. doi:10.1371/journal.pntd.0003171
174. Shen W-F, Galula JU, Chang G-JJ, Wu H-C, King C-C, Chao D-Y. Improving dengue viral antigens detection in dengue patient serum specimens using a low pH glycine buffer treatment. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. 2015; doi:10.1016/j.jmii.2015.05.008
175. Lima M da RQ, Nogueira RMR, Filippis AMB de, Nunes PCG, Sousa CS de, Silva MH da, et al. A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. *J Virol Methods*. 2014;204: 105–108. doi:10.1016/j.jviromet.2014.02.031
176. Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyakarnsakul W, Chakorn T, et al. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60: 387–391. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.11.010
177. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2003;41: 4154–4159.
178. World Health Organization, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Handbook for clinical management of dengue. World Health Organization; 2012.
179. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis*. 2009;15: 436–440. doi:10.3201/eid1503.080923
180. Perry KR, Parry JV, Vandervelde EM, Mortimer PP. The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to hepatitis A and hepatitis B core antigens. *J Med Virol*. 1992;38: 265–270.
181. Terada K, Niizuma T, Kataoka N, Niitani Y. Testing for rubella-specific IgG antibody in urine. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19: 104–108.
182. Frerichs RR, Silarug N, Eskes N, Pagcharoenpol P, Rodklai A, Thangsupachai S, et al. Saliva-based HIV-antibody testing in Thailand. *AIDS Lond Engl*. 1994;8: 885–894.
183. Elsana S, Sikuler E, Yaari A, Shemer-Avni Y, Abu-Shakra M, Buskila D, et al. HCV antibodies in saliva and urine. *J Med Virol*. 1998;55: 24–27.
184. Joshi MS, Chitambar SD, Arankalle VA, Chadha MS. Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis a. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9: 840–845.

185. Numata N, Ohori H, Hayakawa Y, Saitoh Y, Tsunoda A, Kanno A. Demonstration of hepatitis C virus genome in saliva and urine of patients with type C hepatitis: usefulness of the single round polymerase chain reaction method for detection of the HCV genome. *J Med Virol.* 1993;41: 120–128.
186. Luo W, Masciotra S, Delaney KP, Charurat M, Croxton T, Constantine N, et al. Comparison of HIV oral fluid and plasma antibody results during early infection in a longitudinal Nigerian cohort. *J Clin Virol.* 2013;58 Suppl 1: e113–118. doi:10.1016/j.jcv.2013.08.017
187. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis.* 2013;208: 1086–1092. doi:10.1093/infdis/jit290
188. Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis.* 2015;21: 84–86. doi:10.3201/eid2101.140894
189. Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala A-MK, Kantele A, Vapalahti O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: Exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. *J Clin Virol.* 2014; doi:10.1016/j.jcv.2014.08.021
190. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101: 738–739. doi:10.1016/j.trstmh.2007.02.007
191. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnararatchakit K, Yoksan S, Flamand M, Sakuntabhai A. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71: 467–469. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.020
192. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol.* 2012;50: 2047–2052. doi:10.1128/JCM.06557-11
193. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virol J.* 2010;7: 22. doi:10.1186/1743-422X-7-22
194. Ma X, Zhen W, Yang P, Sun X, Nie W, Zhang L, et al. First confirmation of imported dengue virus serotype 2 complete genome in urine from a Chinese traveler returning from India. *Virol J.* 2014;11: 56. doi:10.1186/1743-422X-11-56
195. Vázquez S, Cabezas S, Pérez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int J Infect Dis.* 2007;11: 256–262. doi:10.1016/j.ijid.2006.05.005
196. Anders KL, Nguyet NM, Quyen NTH, Ngoc TV, Tram TV, Gan TT, et al. An Evaluation of Dried Blood Spots and Oral Swabs as Alternative Specimens for the Diagnosis of Dengue and Screening for Past Dengue Virus Exposure. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87: 165–170. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0713
197. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, Mercado JC, Pérez L, Hammond SN, et al. Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *J Clin Virol.* 2008;43: 287–291. doi:10.1016/j.jcv.2008.07.016

198. Chakravarti A, Matlani M, Jain M. Immunodiagnosis of dengue virus infection using saliva. *Curr Microbiol.* 2007;55: 461–464. doi:10.1007/s00284-007-9040-5
199. Yap G, Sil BK, Ng L-C. Use of Saliva for Early Dengue Diagnosis. Lopes da Fonseca BA, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e1046. doi:10.1371/journal.pntd.0001046
200. Saito Y, Moi ML, Kotaki A, Ikeda M, Tajima S, Shiba H, et al. Detection of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) in Urine Samples using ELISA as a Laboratory Diagnostic Method for Dengue Virus Infection. *Jpn J Infect Dis.* 2015; doi:10.7883/yoken.JJID.2014.441
201. Wills BA, Oragui EE, Dung NM, Loan HT, Chau NV, Farrar JJ, et al. Size and charge characteristics of the protein leak in dengue shock syndrome. *J Infect Dis.* 2004;190: 810–818. doi:10.1086/422754
202. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Sinigaglia A, Ulbert S, et al. Isolation of West Nile virus from urine of patients with acute infection. *J Clin Microbiol.* 2014; doi:10.1128/JCM.01328-14
203. Fonseca K, Meatherall B, Zarra D, Drebot M, MacDonald J, Pabbaraju K, et al. First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91: 1035–1038. doi:10.4269/ajtmh.14-0151
204. Andersson N, Nava-Aguilera E, Arosteguí J, Morales-Perez A, Suazo-Laguna H, Legorreta-Soberanis J, et al. Evidence based community mobilization for dengue prevention in Nicaragua and Mexico (Camino Verde, the Green Way): cluster randomized controlled trial. *BMJ.* 2015;351: h3267.
205. Guzmán MG, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis.* 2004;8: 69–80.
206. Patramool S, Bernard E, Hamel R, Natthanej L, Chazal N, Surasombatpattana P, et al. Isolation of infectious chikungunya virus and dengue virus using anionic polymer-coated magnetic beads. *J Virol Methods.* 2013;193: 55–61. doi:10.1016/j.jviromet.2013.04.016
207. Saksono B, Dewi BE, Nainggolan L, Suda Y. A Highly Sensitive Diagnostic System for Detecting Dengue Viruses Using the Interaction between a Sulfated Sugar Chain and a Virion. *PloS One.* 2015;10: e0123981. doi:10.1371/journal.pone.0123981
208. Khalenkov A, Laver WG, Webster RG. Detection and isolation of H5N1 influenza virus from large volumes of natural water. *J Virol Methods.* 2008;149: 180–183. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.001
209. Krishnan V. Delhi hospitals are told not to turn away patients with suspected dengue fever. *BMJ.* 2015;351: h4994.
210. Burden R, Tomson C, Guideline Development Committee, Joint Specialty Committee on Renal Disease of the Royal College of Physicians of London and the Renal Association. Identification, management and referral of adults with chronic kidney disease: concise guidelines. *Clin Med Lond Engl.* 2005;5: 635–642.
211. Vasanwala FF, Puvanendran R, Fook-Chong S, Ng J-M, Suhail SM, Lee K-H. Could peak proteinuria determine whether patient with dengue fever develop dengue hemorrhagic/dengue shock syndrome?--a prospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2011;11: 212. doi:10.1186/1471-2334-11-212

212. Vasanwala FF, Thein T-L, Leo Y-S, Gan VC, Hao Y, Lee LK, et al. Predictive value of proteinuria in adult dengue severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8: e2712. doi:10.1371/journal.pntd.0002712
213. Aubry M, Roche C, Dupont-Rouzeyrol M, Aaskov J, Viallon J, Marfel M, et al. Use of serum and blood samples on filter paper to improve the surveillance of Dengue in Pacific Island Countries. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2012;55: 23–29. doi:10.1016/j.jcv.2012.05.010
214. Chakravarti A, Siddiqui O, Malik S, Uppal B. Use of dried blood blotted on filter paper to detect dengue IgM antibody and dengue NS1 antigen. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2013;44: 226–231.
215. De la C Herrera R, Cabrera MV, García S, Gilart M. IgM antibodies to dengue virus in dried blood on filter paper. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2006;367: 204–206. doi:10.1016/j.cca.2005.12.042
216. Matheus S, Chappert J-L, Cassadou S, Berger F, Labeau B, Bremand L, et al. Virological surveillance of dengue in Saint Martin and Saint Barthelemy, French West Indies, using blood samples on filter paper. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86: 159–165. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0475
217. Matheus S, Meynard J-B, Lacoste V, Morvan J, Deparis X. Use of capillary blood samples as a new approach for diagnosis of Dengue virus infection. *J Clin Microbiol*. 2007;45: 887–890. doi:10.1128/JCM.02063-06
218. Matheus S, Meynard J-B, Lavergne A, Girod R, Moua D, Labeau B, et al. Dengue-3 outbreak in Paraguay: investigations using capillary blood samples on filter paper. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79: 685–687.
219. Matheus S, Pham TB, Labeau B, Huong VTQ, Lacoste V, Deparis X, et al. Kinetics of dengue non-structural protein 1 antigen and IgM and IgA antibodies in capillary blood samples from confirmed dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90: 438–443. doi:10.4269/ajtmh.13-0458
220. Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodríguez R, Vázquez S, et al. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *J Virol Methods*. 2005;125: 75–81. doi:10.1016/j.jviromet.2005.01.001
221. Kumar Y, Liang C, Bo Z, Rajapakse JC, Ooi EE, Tannenbaum SR. Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6: e1887. doi:10.1371/journal.pntd.0001887

# Annexes

---



# Annexe 1 : Brochure commerciale du test SD Bioline Dengue Duo



**Alere™**

## SD BIOLINE Dengue RDT Series

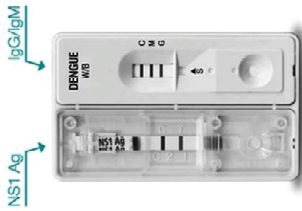
The most perfect diagnostic tool for dengue infection

### Dengue RDT Series

- SD BIOLINE Dengue Duo (NS1 Ag + Ab Combo)
- SD BIOLINE Dengue NS1 Ag
- SD BIOLINE Dengue IgG/IgM

**SD**  
STANDARD DIAGNOSTICS, INC.

**SD**  
STANDARD DIAGNOSTICS, INC.



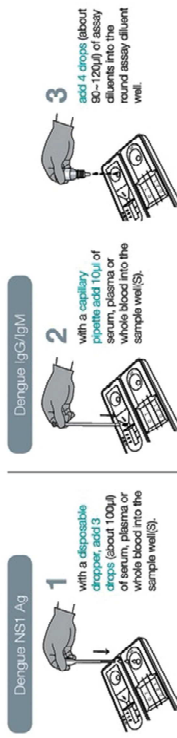
### SD BIOLINE Dengue Duo (NS1 Ag and IgG/IgM)

One step, immunochromatographic assay designed to detect both dengue virus NS1 antigen and antibodies IgG/IgM against dengue virus in human whole blood, serum or plasma.

- The first in the world
- The most perfect diagnostic tool to cover all clinical stage for acute phase to convalescence phase.
- Fast test result : 15-20 minutes
- Convenient storage condition : 1-30 °C

	Dengue NS1 Ag (VS. RIFAC-9)	Dengue IgG/IgM (VS. ELISA)
Sensitivity	92.4%	94.2%
Specificity	98.4%	98.4%

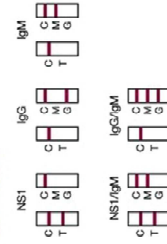
### Simple Testing Process



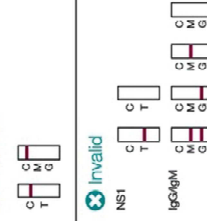
### Reading Results



### Positive



### Negative



# Annexe 2 : Procédure détaillée du test SD Bioline Dengue Duo

**Quick Reference Guide**

**SD BIOLINE**

## Dengue Duo

Dengue NS1 Ag ↔ Ab Combo

**Preparation**

**1**

Check the expiry date. If expiry date has passed, use another kit.

**2**

Put on the gloves.

**3**

Open the test pouch and write the patient's name on the test device.

**4**

Prepare the serum, plasma or whole blood samples.

**5**

Use the disposable dropper to collect sample.

**6**

3X  
Add 3 drops of sample into the sample well.

**6**

6  
Add sample into the square sample well(s).

**7**

4X  
Add 4 drops of assay diluent to round well.

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line

**6**

**7**

**5**

Fill Line