



## Contents

- 229 Measles and rubella laboratory network: 2007 meeting on use of alternative sampling techniques for surveillance

## Sommaire

- 229 Réseaux des laboratoires de la rougeole et de la rubéole: réunion de 2007 sur le recours à d'autres techniques d'échantillonnage pour la surveillance

### Measles and rubella laboratory network: 2007 meeting on use of alternative sampling techniques for surveillance

#### WHO's measles and rubella laboratory network

WHO's measles and rubella laboratory network (LabNet) was established to provide a standardized testing and reporting structure with a comprehensive external quality assurance programme.<sup>1</sup> The LabNet comprises 679 laboratories serving 166 countries. The primary focus of these laboratories is to confirm measles and rubella cases by identifying the presence of measles virus-specific or rubella virus-specific immunoglobulin M (IgM) antibodies. More than 180 000 serum samples were tested for measles IgM in 2007, approximately 85% of which were also tested for rubella IgM. However, surveillance is incomplete in some areas because serum samples are difficult to collect and transport. From 2003 to 2007, 2 alternative sampling approaches to collecting serum samples were evaluated in WHO's measles and rubella LabNet; these have the potential to be useful tools for measles and rubella control programmes. These alternative approaches use dried blood spots or oral fluid. This report summarizes the main features of the 3 approaches to surveillance to enable programme managers to make decisions about their use.

#### Development of alternative sampling techniques

##### Background

Laboratory confirmation of measles and rubella is an important component at all stages of control programmes. Because clinical diagnosis is unreliable, case-based

<sup>1</sup> See No. 44, 2005, 384–388.

### Réseaux des laboratoires de la rougeole et de la rubéole: réunion de 2007 sur le recours à d'autres techniques d'échantillonnage pour la surveillance

#### Réseaux OMS des laboratoires de la rougeole et de la rubéole

Le réseau OMS des laboratoires de la rougeole et de la rubéole (LabNet) a été créé pour fournir une structure normalisée d'analyse et de notification ainsi qu'un programme complet d'assurance externe de la qualité.<sup>1</sup> Le LabNet compte 679 laboratoires desservant 166 pays. Ces laboratoires mettent principalement l'accent sur la confirmation des cas de rougeole et de rubéole par la recherche de la présence d'immunoglobulines M (IgM) spécifiques du virus rougeoleux ou du virus rubéoleux. Plus de 180 000 échantillons sériques ont été analysés à la recherche d'IgM antirougeoleuses en 2007 et près de 85% d'entre eux l'ont également été à la recherche d'IgM antirubéoleuses. Toutefois, la surveillance est incomplète dans certaines régions parce que les échantillons de sérum sont difficiles à recueillir et à transporter. Récemment, 2 techniques d'échantillonnage autres que le prélèvement d'échantillons de sérum ont été évaluées par le LabNet; elles semblent pouvoir être des instruments utiles pour les programmes de lutte antirougeoleuse et antirubéoleuse. Ces autres techniques font appel à des gouttes de sang séchées ou à des échantillons de liquide buccal. Le présent rapport récapitule les principales caractéristiques de ces 3 techniques de surveillance pour permettre aux administrateurs de programme de décider desquelles ils vont se servir.

#### Mise au point d'autres techniques d'échantillonnage

##### Généralités

La confirmation au laboratoire de la rougeole et de la rubéole est une composante importante à toutes les étapes des programmes de lutte. Du fait que le diagnostic clinique soit

<sup>1</sup> Voir N° 44, 2005, 384–388.

WORLD HEALTH  
ORGANIZATION  
Geneva

ORGANISATION MONDIALE  
DE LA SANTÉ  
Genève

Annual subscription / Abonnement annuel  
Sw. fr. / Fr. s. 334.–

6.2008  
ISSN 0049-8114  
Printed in Switzerland

laboratory confirmation of disease is critical in the elimination stage of programmes. Currently, laboratory confirmation of suspected cases is based on the detection of measles virus-specific or rubella virus-specific IgM in a single serum sample collected soon after the onset of symptoms, but detection of viral RNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and subsequent genotyping of strains is also valuable. Collection of a throat swab or urine sample is recommended for virus detection by isolation or RT-PCR.<sup>2</sup>

Accurate laboratory confirmation depends on proper collection, processing, shipment and storage of clinical samples, as well as the use of accurate tests by a proficient laboratory. Collection of blood samples, particularly from children, can be challenging, and sustaining a cold-chain for all samples is not always achievable. Two alternatives to standard serum collection have the potential to be useful tools for measles and rubella control programmes: dried blood spots collected on filter paper and oral fluid samples. Dried blood spots have been used for a range of epidemiological studies as an alternative to serum for the detection of virus-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM.<sup>3, 4, 5, 6</sup> Antibody and viral RNA are sufficiently stable at up to 37°C when dried on filter-paper to allow these methods to be used for case confirmation in areas where a reverse cold-chain is not feasible logistically. Oral fluid samples have been used for a wide range of epidemiological studies and for the national measles-mumps-rubella (MMR) surveillance programme in the United Kingdom for >10 years.<sup>7, 8</sup> Oral fluid is easy to collect and because it is less invasive, it is more acceptable to the population, thereby enabling health workers to obtain more complete sampling of suspected cases. Both virus-specific IgM and viral RNA can be detected in oral fluid.<sup>9</sup> Therefore, both alternative approaches create additional opportunities to serologically confirm cases and to detect viral RNA in the same sample.

peu fiable, la confirmation au laboratoire des cas de la maladie est essentielle dans la phase d'élimination des programmes. A l'heure actuelle, la confirmation au laboratoire des cas présumés est basée sur la mise en évidence d'IgM spécifiques du virus rougeoleux ou du virus rubéoleux dans un échantillon unique de sérum prélevé peu après l'apparition des symptômes, mais la recherche de l'ARN viral par transcription inverse (RT-PCR) suivie d'une amplification génique et le génotypage ultérieur des souches sont également très utiles. Le recueil d'un prélèvement de gorge ou d'un échantillon d'urine est recommandé pour la détection du virus par les techniques d'isolement ou la RT-PCR.<sup>2</sup>

La confirmation fiable au laboratoire passe par des conditions appropriées de recueil, de traitement, d'expédition et de conservation des échantillons cliniques, ainsi que par l'utilisation de tests fiables par un laboratoire compétent. Le prélèvement des échantillons de sang, en particulier chez les enfants, peut poser des problèmes et il n'est pas toujours possible de respecter la chaîne du froid pour l'ensemble des échantillons. Deux autres méthodes que la collecte normalisée du sérum pourraient s'avérer être des instruments utiles pour les programmes de lutte contre la rougeole et la rubéole: les gouttes de sang séchées recueillies sur papier filtre et les échantillons de liquide buccal. On s'est servi de gouttes de sang séchées au lieu de sérums pour toute une série d'études épidémiologiques afin de rechercher des immunoglobulines G (IgG) et des IgM spécifiques de virus.<sup>3, 4, 5, 6</sup> Les anticorps et l'ARN viral sont suffisamment stables jusqu'à 37°C lorsqu'ils sont séchés sur du papier filtre pour permettre d'utiliser ces méthodes afin de confirmer les cas dans les régions où il est logiquement impossible de maintenir la chaîne du froid jusqu'au laboratoire. Au Royaume Uni, on a utilisé les échantillons de liquide buccal pour un large éventail d'études épidémiologiques ainsi que pour le programme national de surveillance de la rougeole, des oreillons et de la rubéole (ROR) pendant plus de 10 ans.<sup>7, 8</sup> Le liquide buccal est facile à recueillir et parce qu'il s'agit d'une technique moins invasive, elle est plus acceptable pour la population, permettant ainsi aux agents de santé d'obtenir un échantillonnage plus complet des cas présumés. On peut aussi bien rechercher des IgM spécifiques du virus que l'ARN viral dans le liquide buccal.<sup>9</sup> Par conséquent, ces 2 autres stratégies offrent des occasions supplémentaires de confirmer sérologiquement les cas et de détecter l'ARN viral dans un même échantillon.

<sup>2</sup> *Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella infection*, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 2007 (WHO/IVB/07.01).

<sup>3</sup> Ibrahim SA et al. Measles virus-specific antibody levels in Sudanese infants: a prospective study using filter paper blood samples. *Epidemiology and Infection*, 2006, 134:79-85.

<sup>4</sup> Riddell MA, et al. Dried venous blood samples for the detection and quantification of measles IgG using a commercial enzyme immunoassay. *Bulletin of the World Health Organization*, 2003, 81:701-707.

<sup>5</sup> Condorelli F et al. Use of a microquantity enzyme immunoassay in a large-scale study of measles, mumps, and rubella immunity in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 17:49-52.

<sup>6</sup> Helfand RF et al. Comparison of detection of rubella-specific IgM and IgG in dried blood spots and sera collected during a rubella outbreak in Peru. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14:1522-1525.

<sup>7</sup> Vyse AJ et al. Evolution of surveillance of measles, mumps, and rubella in England and Wales: providing the platform for evidence-based vaccination policy. *Epidemiologic Reviews*, 2002, 24:125-136.

<sup>8</sup> Jin L, Vyse A, Brown DWG. The role of RT-PCR assay of oral fluid for diagnosis and surveillance of measles, mumps and rubella [letter to the editor]. *Bulletin of the World Health Organization*, 2002, 80:76-77.

<sup>9</sup> Van Binnendijk RS et al. Evaluation of serological and virological tests in the diagnosis of clinical and subclinical measles virus infections during an outbreak of measles in The Netherlands. *Journal of Infectious Diseases*, 2003, 188:898-903.

<sup>2</sup> *Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella infection*, 2nd ed. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2007 (WHO/IVB/07.01).

<sup>3</sup> Ibrahim SA et al. Measles virus-specific antibody levels in Sudanese infants: a prospective study using filter paper blood samples. *Epidemiology and Infection*, 2006, 134:79-85.

<sup>4</sup> Riddell MA, et al. Dried venous blood samples for the detection and quantification of measles IgG using a commercial enzyme immunoassay. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 2003,81:10. (Résumé en français)

<sup>5</sup> Condorelli F et al. Use of a microquantity enzyme immunoassay in a large-scale study of measles, mumps, and rubella immunity in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 17:49-52.

<sup>6</sup> Helfand RF et al. Comparison of detection of rubella-specific IgM and IgG in dried blood spots and sera collected during a rubella outbreak in Peru. *Clinical and Vaccine Immunology*; 2007, 14:1522-1525.

<sup>7</sup> Vyse AJ et al. Evolution of surveillance of measles, mumps, and rubella in England and Wales: providing the platform for evidence-based vaccination policy. *Epidemiologic Reviews*, 2002, 24:125-136.

<sup>8</sup> Jin L, Vyse A, Brown DWG. The role of RT-PCR assay of oral fluid for diagnosis and surveillance of measles, mumps and rubella. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 2002, 80:76-77.

<sup>9</sup> Van Binnendijk RS et al. Evaluation of serological and virological tests in the diagnosis of clinical and subclinical measles virus infections during an outbreak of measles in The Netherlands. *Journal of Infectious Diseases*, 2003, 188:898-903.

## Comparative evaluation of alternative sampling techniques

Measles and rubella reference laboratories in Australia, Côte d'Ivoire, the Netherlands, Turkey, Uganda, the United Kingdom and the United States have optimized dried blood spots and oral-fluid IgM antibody assays and RNA detection protocols and determined IgM and RNA stability in dried blood spots and oral fluid samples since 2001.<sup>10, 11</sup> The effectiveness of these methods (summarized below) for surveillance of measles and rubella in outbreak settings and routine surveillance has been evaluated. Dried blood spots, oral fluid and corresponding serum samples were collected from suspected cases during measles and rubella outbreaks and were tested for the presence of virus-specific IgM for measles or rubella. Data were also available from the MMR surveillance programme in the United Kingdom where 1000–3000 oral fluid samples have been collected annually during the past decade. In addition, 7 countries in WHO's African Region used dried blood spot sampling methods for routine measles and rubella surveillance during 2005–2007. In these 7 countries, dried blood spots either were the only sample collected (Sierra Leone) or were collected in conjunction with routine serum collection (Burkina Faso, Democratic Republic of the Congo, Ethiopia, Ghana, Senegal and Zambia). This work provided data on the sensitivity and specificity of dried blood spots and oral fluid samples compared with serum, and it identified logistic challenges in implementing alternative sampling techniques in a region where alternative specimens might improve surveillance.

The standard protocols recommended by the measles and rubella LabNet are outlined in the laboratory manual.<sup>2</sup>

## Sample collection procedures

### Serum

Blood samples are collected by venepuncture and allowed to clot. Serum is separated in the health facility and transported to the laboratory, usually under a cold-chain. If no serum-separation facilities are available, whole blood is shipped to the laboratory within 24 hours of collection.

### Dried blood spot samples

Dried blood spots are collected using a sterile, auto-disable lancet to obtain blood from the finger or heel of the suspected case. Blood drops are collected on blood-collection filter-paper and allowed to air dry thoroughly before being shipped to the laboratory at ambient temperature in a resealable plastic bag with desiccant. In the laboratory, the immunoglobulin or RNA is extracted from the blood spot and tested for specific IgM or viral RNA, or both.

## Evaluation comparée des autres techniques d'échantillonnage

Les laboratoires de référence pour la rougeole et la rubéole d'Australie, de Côte d'Ivoire, des Etats-Unis, de l'Ouganda, des Pays Bas, du Royaume-Uni et de Turquie ont optimisé les méthodes permettant d'utiliser des gouttes de sang séchées et du liquide buccal (y compris pour la recherche d'IgM et pour les protocoles de détection de l'ARN) ainsi que la mesure de la stabilité des IgM et de l'ARN dans le sang séché et les échantillons de liquide buccal depuis 2001.<sup>10, 11</sup> L'efficacité de ces méthodes (résumée ci-après) pour la surveillance de la rougeole et de la rubéole en situation de flambée ou dans les conditions habituelles a été évaluée. Du sang séché, du liquide buccal et des échantillons de sérum correspondants ont été prélevés chez des cas présumés au cours de flambées de rougeole et de rubéole et ont été analysés à la recherche d'IgM spécifiques des virus rougeoleux ou rubéoleux. On disposait également des données du programme de surveillance ROR du Royaume-Uni dans le cadre duquel 1000 à 3000 échantillons de liquide buccal ont été recueillis chaque année au cours de la dernière décennie. En outre, 7 pays de la Région africaine de l'OMS ont utilisé les méthodes d'échantillonnage du sang séché pour la surveillance systématique de la rougeole et de la rubéole de 2005 à 2007. Dans ces 7 pays, les gouttes de sang séchées étaient le seul échantillon collecté (Sierra Leone) ou ont été recueillies parallèlement à un prélèvement de sérum classique (Burkina Faso, Ethiopie, Ghana, République démocratique du Congo, Sénégal et Zambie). Ces travaux ont fourni des données sur la sensibilité et la spécificité comparées des échantillons de sang séché ou de liquide buccal par rapport au sérum, et ont permis de recenser les problèmes logistiques que poserait la mise en œuvre d'autres techniques d'échantillonnage dans une région où ces autres échantillons permettraient d'améliorer la surveillance.

Les protocoles normalisés recommandés par le LabNet de la rougeole et de la rubéole sont exposés dans le manuel de laboratoire.<sup>2</sup>

## Méthodes de collecte des échantillons

### Sérum

Les prélèvements de sang sont obtenus par ponction veineuse et on les laisse coaguler. On sépare le sérum au centre de santé et on le transporte jusqu'au laboratoire, en général en respectant la chaîne du froid. S'il n'existe aucune installation pour séparer le sérum, on expédie le sang total au laboratoire dans les 24 heures suivant son prélèvement.

### Echantillons de sang séché

Les gouttes de sang séchées sont recueillies à l'aide d'une lancette stérile auto-bloquante au niveau du doigt ou du talon de la personne présumée infectée. Les gouttes de sang sont recueillies sur du papier filtre et on les laisse sécher complètement à l'air avant de les expédier au laboratoire à température ambiante dans un sac en plastique hermétiquement fermé accompagné d'un deshydratant. Au laboratoire, les immunoglobulines ou l'ARN sont extraits du sang séché et testés à la recherche d'IgM spécifiques ou d'ARN viral, ou des deux.

<sup>10</sup> Riddell MA et al. Detection of measles virus-specific immunoglobulin M in dried venous blood samples by using a commercial enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40:5–9.

<sup>11</sup> De Swart RL et al. Combination of reverse transcriptase PCR analysis and immunoglobulin M detection on filter paper blood samples allows diagnostic and epidemiological studies of measles. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39:270–273.

<sup>10</sup> Riddell MA et al. Detection of measles virus-specific immunoglobulin M in dried venous blood samples by using a commercial enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40:5–9.

<sup>11</sup> De Swart RL et al. Combination of reverse transcriptase PCR analysis and immunoglobulin M detection on filter paper blood samples allows diagnostic and epidemiological studies of measles. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39:270–273.

## Oral fluid samples

Oral fluid samples are collected by gently rubbing a small sponge on a stick along the gum and dentine interface for about 1 minute. The sponge absorbs approximately 0.5 ml of crevicular fluid during this period. It is sealed in a tube and transported to the laboratory at ambient temperature. The laboratory adds buffer to the sponge, extracts the crevicular fluid by centrifugation and tests the supernatant for specific IgM or viral RNA, or both.

## Extraction process

Almost all IgM enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) are designed for serum or plasma samples and usually require a minimum volume of 5–20 µl. Serum samples can be tested without any further treatment, although whole blood requires serum separation. A minimum of 0.5 ml is the blood collection volume recommended by the measles and rubella LabNet, which is normally adequate for retesting and transporting to a reference laboratory for validation purposes.

Extraction procedures for oral fluid samples and dried blood spots account for approximately 10–15 minutes of additional hands-on laboratory time. The final volume of extracted oral fluid is approximately 1 ml; and for dried blood spots about 15 µl of serum can be extracted per circle of each blood spot (approximately 50 µl of whole blood). All 4 circles on the dried blood spot filter-paper card must be filled to ensure adequate volumes for retesting and confirmatory testing. The volume of the extracted oral fluid sample is adequate for all testing procedures.

## Determination of IgM

One commercially available ELISA, commonly used by the measles and rubella LabNet for detecting serum measles and rubella IgM, which is not affected by haemolysis, was standardized for all network evaluations of dried blood spots. For oral fluid, the supernatant was tested for the presence of IgM using a commercially available capture ELISA designed specifically for this type of sample. This ELISA can also be used for serum IgM detection.<sup>2</sup>

The data accumulated using these procedures were reviewed at a meeting held at WHO headquarters in Geneva in June 2007, and they are summarized below and in the figures and table.

## Sensitivity of detecting IgM and RNA

The sensitivity and specificity for detecting measles virus-specific and rubella virus-specific IgM in dried blood spots and oral fluid are almost equivalent to serum (*Fig. 1, Fig. 2, Table 1*), although a moderate reduction in the sensitivity for detecting rubella virus-specific IgM in oral fluid during the first 4–5 days after disease onset was noted (*Fig. 2, Table 1*).

Detection of RNA in serum and dried blood spots is possible with nested or real-time RT-PCR (but not conventional RT-PCR) if samples are collected within 5–7 days after rash onset. This procedure has proven

## Echantillons de liquide buccal

Les échantillons de liquide buccal sont recueillis en frottant doucement une petite éponge fixée sur un bâtonnet le long de la jonction entre la gencive et la dentine pendant environ 1 minute. Cette éponge absorbe à peu près 0,5 ml de liquide crévulaire au cours de cette période. Elle est ensuite enfermée dans un tube et transportée au laboratoire à température ambiante. Le laboratoire ajoute du tampon à l'éponge, extrait le liquide crévulaire par centrifugation et teste le surnageant à la recherche d'IgM spécifiques ou d'ARN viral, ou des deux.

## Méthodes d'extraction

Presque tous les titrages avec un immunoabsorbant liés à une enzyme (ELISA) sont conçus pour des échantillons de sérum ou de plasma et exigent en général un volume minimal de 5 à 20 µl. Les prélèvements de sérum peuvent être analysés sans autre traitement, tandis que le sang total exige que l'on sépare le sérum. Le volume de sang prélevé et recommandé par le LabNet pour la rougeole et la rubéole est au minimum de 0,5 ml, ce qui suffit normalement pour refaire le test et expédier l'échantillon à un laboratoire de référence à des fins de validation.

Les méthodes d'extraction pour les échantillons de liquide oral et de sang séché représentent à peu près 10 à 15 minutes de manipulations supplémentaires au laboratoire. Le volume final de liquide buccal extrait est d'environ 1 ml; et pour les gouttes de sang séchées, on peut extraire environ 15 µl de sérum par goutte (près de 50 µl de sang total). Il faut remplir de sang séché les 4 cercles indiqués sur le papier filtre pour être sûr de disposer des volumes suffisants pour tester à nouveau l'échantillon et procéder aux tests de confirmation. Le volume de l'échantillon de liquide buccal extrait est suffisant pour toutes les analyses.

## Détermination des IgM

Un test ELISA disponible dans le commerce, communément employé par le LabNet de la rougeole et de la rubéole afin de rechercher les IgM sériques antirougeoleuses et antirubéoleuses, et qui n'est pas modifié par l'hémolyse a été normalisé pour toutes les évaluations du réseau effectuées sur du sang séché. Concernant le liquide buccal, une recherche d'IgM dans le surnageant a été effectuée au moyen d'un test ELISA avec capture d'IgM spécifiquement conçu pour ce type d'échantillon et disponible dans le commerce. On peut également utiliser cet ELISA pour rechercher des IgM sériques.<sup>2</sup>

Les données accumulées à l'aide de ces méthodes ont été analysées lors d'une réunion qui s'est tenue au siège de l'OMS à Genève en juin 2007 et elles sont résumées ci-après, ainsi que dans les figures et tableaux.

## Sensibilité de la détection des IgM et de l'ARN

La sensibilité et la spécificité de la recherche des IgM spécifiques du virus rougeoleux et du virus rubéoleux dans des gouttes de sang séchées et du liquide buccal sont presque les mêmes que pour le sérum (*Fig. 1, Fig. 2, Tableau 1*), bien qu'on ait noté une légère diminution de la sensibilité pour la détection des IgM spécifiques du virus rubéoleux dans le liquide buccal au cours des 4 à 5 premiers jours suivant l'apparition de la maladie (*Fig. 2, Tableau 1*).

La recherche d'ARN dans le sérum et dans les gouttes de sang séchées est possible au moyen de la RT-PCR nichée ou en temps réel (mais pas au moyen de la RT-PCR classique) si les échantillons sont recueillis dans les 5 à 7 jours suivant l'apparition de

Fig. 1 **Schematic of wild measles-virus infection and sensitivity of alternative sampling methods**  
 Fig. 1 **Schéma de l'infection par un virus rougeoleux sauvage et sensibilité d'autres méthodes d'échantillonnage**

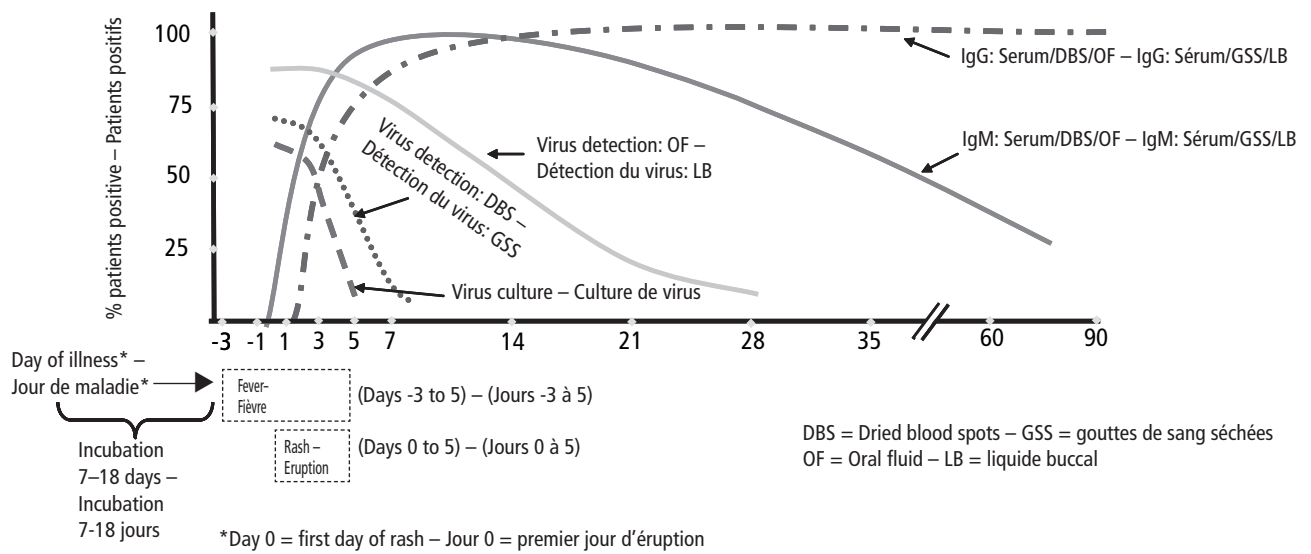
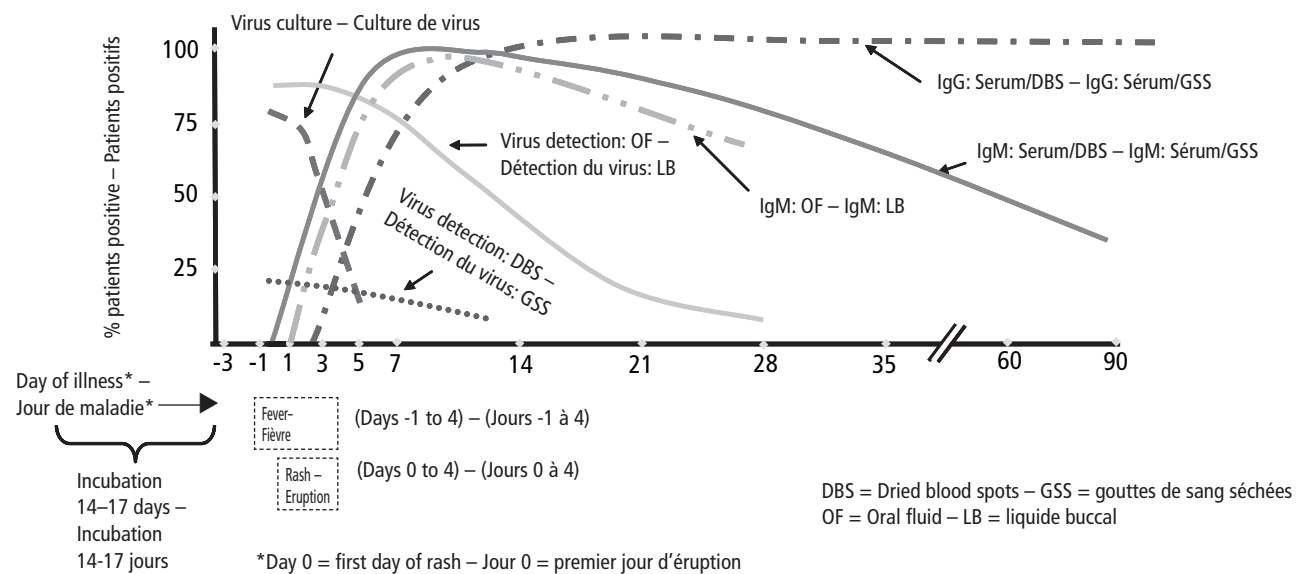


Fig. 2 **Schematic of wild rubella-virus infection and sensitivity of alternative sampling methods**  
 Fig. 2 **Schéma d'une infection par le virus rubéoleux sauvage et sensibilité d'autres méthodes d'échantillonnage**



invaluable for collecting viral sequence information where urine or throat swabs have not been collected. The United Kingdom has gained the most experience in detecting viral RNA from oral fluid samples and found that the sensitivity of nested RT-PCR ranged from 80% to 90% when collected during the first week after rash onset, and sensitivity was  $\leq 50\%$  at 3-4 weeks after rash onset. Conventional RT-PCR was less sensitive but still useful. Testing for both IgM and RNA in oral fluid samples greatly increased the sensitivity for confirming rubella cases during the first 4-5 days after rash onset at a time when many rubella cases are not yet IgM-positive.

l'éruption cutanée. Cette méthode s'est avérée extrêmement utile pour recueillir des données sur les séquences virales en l'absence d'échantillons d'urine ou de prélèvements de gorge. Le Royaume-Uni a la plus grande expérience de la détection de l'ARN viral à partir d'échantillons de liquide buccal et ses chercheurs se sont aperçus que la sensibilité de la RT-PCR nichée était comprise entre 80% et 90% lorsque lesdits échantillons étaient recueillis au cours de la première semaine suivant l'apparition de l'éruption cutanée, la sensibilité étant  $\leq 50\%$  au bout de 3 à 4 semaines. La RT-PCR classique a été moins sensible mais tout de même utile. La recherche des IgM et de l'ARN dans les échantillons de liquide buccal a permis d'augmenter considérablement la sensibilité pour confirmer les cas de rubéole au cours des 4 à 5 premiers jours suivant l'apparition de l'éruption, moment auquel de nombreux cas de rubéole ne sont pas encore IgM-positifs.

Table 1 **Summary of sensitivity of each sampling procedure. Time of collection is based on number of days after rash onset**  
 Tableau 1 **Tableau récapitulatif de la sensibilité de chacune des méthodes d'échantillonnage. Le moment du recueil est basé sur le nombre de jours suivant l'apparition de l'éruption cutanée**

Time of collection – Moment du recueil		Serum (%) – Sérum (%)	Dried blood sample (%) – Echantillon de sang séché (%)	Oral fluid (%) – Liquide buccal (%)	
<b>Measles – Rougeole</b>	IgM	Early (day 0–3) – Précoce (jour 0-3)	60–70	60–70	60–70
		Intermediate (day 4–14) – Intermédiaire (jour 4-14)	90–100	90–100	90–100
		Late (day 15–28) – Tardif (jour 15-28)	100	100	100
	Virus detection (RT-PCR) – Détection virale (RT-PCR)	Early (day 0–3) – Précoce (jour 0-3)	<10	<25	>80
		Intermediate (day 4–14) – Intermédiaire (jour 4-14)	<1	<1	50
		Late (day 15–28) – Tardif (jour 15-28)	0	0	≤20
<b>Rubella – Rubéole</b>	IgM	Early (day 0–3) – Précoce (jour 0-3)	~50	~50	~40
		Intermediate (day 4–14) – Intermédiaire (jour 4-14)	60–90	60–90	50–90
		Late (day 15–28) – Tardif (jour 15-28)	100	100	100
	Virus detection (RT-PCR)	Early (day 0–3) – Précoce (jour 0-3)	Limited data – Données limitées	~20	60–70
		Intermediate (day 4–14) – Intermédiaire (jour 4-14)	Limited data – Données limitées	Low – Faible	50
		Late (day 15–28) – Tardif (jour 15-28)	Limited data – Données limitées	0	Limited data – Données limitées

IgM, immunoglobulin M; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction. – IgM, Immunoglobuline M; RT-PCR, transcription inverse suivie d'une amplification génique.

### Transporting samples to the laboratory

It is recommended that serum samples are transported under a cold chain. Transport boxes are usually available, but funds for transportation may be limited. IgM and RNA in dried blood spots are stable when fully dried and can be transported at ambient temperature. IgM and RNA in oral fluid are sufficiently stable to permit transport at ambient temperatures of up to 42°C if the sample reaches the laboratory within 3 days, as recommended by the measles and rubella LabNet.

### Access to sample collection devices

Almost all health facilities have equipment and experience in collecting blood for serum samples. Devices for collecting dried blood spots and oral fluid are unlikely to be available in most health facilities unless specifically provided by a surveillance programme. Though simple to use, training in devices for collecting dried blood spots and oral fluid samples will be required before implementation to ensure adequate volumes are collected, especially for dried blood spots. Samples for dried blood spots are usually limited to 3–4 blood drops per finger-prick or heel-prick before clotting occurs.

Oral fluid sampling is simple, non-invasive and requires minimal training for successful collection. The oral fluid sampling device used for the evaluations is commercially available, inexpensive and comes complete with transport tube and easy-to-follow instructions.

### Transport des échantillons jusqu'au laboratoire

Il est recommandé de transporter les échantillons de sérum en respectant la chaîne du froid. On dispose en général de boîtes pour le transport mais les fonds destinés à ce transport peuvent être limités. Les IgM et l'ARN dans les gouttes de sang séchées sont stables lorsque ces dernières sont bien séchées et peuvent être transportées à température ambiante. Dans le liquide buccal, les IgM et l'ARN sont suffisamment stables pour permettre leur transport à température ambiante jusqu'à 42°C si l'échantillon parvient au laboratoire dans les 3 jours, comme le recommande le LabNet de la rougeole et de la rubéole.

### Accès aux dispositifs de prélèvement des échantillons

Presque tous les centres de santé disposent du matériel et ont l'expérience nécessaire pour le prélèvement d'échantillons de sérum. Les dispositifs permettant de recueillir des gouttes de sang séchées et du liquide buccal ont peu de chance d'être disponibles dans la plupart des centres de santé, sauf s'il sont spécifiquement fournis par un programme de surveillance. Bien que simples à utiliser, ces dispositifs permettant de recueillir des gouttes de sang séchées et des échantillons de liquide buccal exigeront la formation des agents avant d'être utilisés, afin de veiller à ce que des volumes suffisants soient recueillis, surtout en ce qui concerne les gouttes de sang séchées. Pour ces dernières, l'échantillon sera en général limité à 3-4 gouttes de sang recueillies par ponction digitale ou ponction au niveau du talon avant que la coagulation ne se fasse.

L'échantillonnage du liquide buccal est simple, non invasif et nécessite une formation minimale pour être bien fait. Le dispositif d'échantillonnage de liquide buccal utilisé pour les évaluations est disponible dans le commerce, peu coûteux et se présente de manière complète, avec les tubes de transport et des instructions faciles à suivre.

## Cost

The total cost of collection, extraction and testing is almost equivalent for serum, dried blood and oral fluid samples. However, the potential for savings may be considerable if dried blood spots and oral fluid samples are transported outside the cold chain.

## Quality assurance

An extensive quality assurance programme has been established for serum-based measles and rubella testing in the measles and rubella LabNet. Introducing alternative sampling for routine testing would require development of quality assurance programmes specific to each of the alternative collection procedures.

## Conclusions

Both dried blood spots and oral fluid samples have been shown to have a potential role in improving measles and rubella surveillance. Compared with serum sampling these sampling procedures:

- provide almost equivalent sensitivity and specificity for specific IgM detection, though moderately lower sensitivity for rubella IgM in oral fluid samples;
- are easy to implement, although training is required;
- have good patient acceptance since the use of dried blood spots avoids venepuncture and oral fluid sampling is non-invasive;
- have a minimal risk of transmitting blood-borne disease (oral fluid);
- have stability outside the cold chain for periods of  $\leq 7$  days (oral fluid) or longer (dried blood spot);
- have an equivalent combined cost for collection, extraction and testing;
- have the potential to greatly reduce transportation costs;
- are able to detect both specific IgM and RNA in the same sample. The use of oral fluid sampling can extend the opportunity for RNA detection after rash onset;
- are equivalent to serum for detecting IgG and in versatility for use in sero-epidemiology studies.

The oral fluid and dried blood spot procedures have some minor disadvantages compared to serum, in particular:

- collection devices are not commonly available and would need to be provided to health centres;
- the volume of dried blood spots may be limited unless staff are fully trained in sample collection;
- laboratory processing time may increase;
- external quality assurance programmes have yet to be established.

**Editorial note.** The measles and rubella LabNet has completed a comprehensive assessment of the use of dried blood spot and oral fluid sampling techniques for case-confirmation of measles and rubella using the presence of IgM as an indicator of recent infection and detection of viral RNA for molecular epidemiological purposes. Extensive optimization of the collection, extraction and testing procedures has been performed by

## Coût

Le coût total de la collecte, de l'extraction et de l'analyse est presque équivalent, qu'il s'agisse d'échantillons de sérum, de sang séché ou de liquide buccal. Toutefois, les possibilités d'économies peuvent être considérables si les gouttes de sang séché et le liquide buccal sont transportés en dehors de la chaîne du froid.

## Assurance de la qualité

Un programme étendu d'assurance de la qualité a été mis en place pour les analyses effectuées sur des sérums dans le LabNet de la rougeole et de la rubéole. Le fait d'introduire d'autres techniques d'échantillonnage pour les tests systématiques nécessiterait l'élaboration de programmes d'assurance de la qualité spécifiques pour chacune des autres méthodes de collecte.

## Conclusions

On a montré que les échantillons de sang séché et de liquide buccal pouvaient jouer un rôle dans l'amélioration de la surveillance de la rougeole et de la rubéole. Par comparaison avec l'échantillonnage de sérum, ces 2 méthodes:

- ont une sensibilité et une spécificité presque équivalentes pour la détection des IgM spécifiques, bien que leur sensibilité soit modérément inférieure pour les IgM antirubéoleuses dans les échantillons de liquide buccal;
- sont faciles à appliquer même s'il faut pour cela une formation;
- sont bien acceptées par les malades puisque l'utilisation de sang séché évite la ponction veineuse et que le prélèvement de liquide buccal est non invasif;
- présentent un risque minimal de propagation de maladies à transmission hématogène (liquide buccal);
- sont stables en dehors de la chaîne du froid pendant une durée  $\leq 7$  jours (liquide buccal, gouttes de sang séchées);
- ont un coût associé équivalent pour le recueil, l'extraction et l'analyse;
- peuvent potentiellement grandement réduire les coûts de transport;
- permettent de rechercher des IgM spécifiques et de l'ARN dans le même échantillon. L'utilisation d'échantillons de liquide buccal permet d'étendre les possibilités de détection de l'ARN après l'apparition de l'éruption cutanée;
- sont équivalentes au sérum pour la recherche des IgG et l'adaptabilité à l'utilisation dans les études séro-épidémiologiques.

Le liquide buccal et le sang séché présentent des inconvénients mineurs par comparaison avec le sérum, à savoir:

- Les dispositifs de collecte ne sont pas communément disponibles et devraient être fournis au centre de santé;
- Le volume de sang séché peut être limité sauf si le personnel est bien formé à la collecte d'échantillons;
- Le temps de traitement au laboratoire peut être plus long;
- Les programmes d'assurance externe de la qualité restent à définir.

**Note de la rédaction.** Le LabNet de la rougeole et de la rubéole a achevé une évaluation complète du recours aux techniques d'échantillonnage du sang séché et du liquide buccal pour la confirmation des cas de rougeole et de rubéole en recherchant la présence d'IgM comme indicateur d'une infection récente et en détectant l'ARN viral à des fins d'épidémiologie moléculaire. Une optimisation étendue des techniques de collecte, d'extraction et de l'analyse a été effectuée par des laboratoires spécia-

specialized and reference laboratories in the laboratory network, and the medium-term temperature stability of both IgM and RNA has been ascertained.

No single sampling technique has been shown to be optimal under every circumstance, and serum should still be considered the gold standard for IgM detection. The measles and rubella LabNet performs >300 000 tests per year on serum for measles virus-specific and rubella virus-specific IgM, and health programmes in many countries routinely collect blood for testing for other medical purposes. However, there is considerable evidence that dried blood spots or oral fluid techniques may be a viable option for measles and rubella surveillance, especially where challenges exist with transportation or maintenance of a cold chain, or both, and where patients may resist venepuncture.

The introduction of alternative samples for surveillance raises many programmatic issues, including those of cost, robustness and accuracy. The 2007 Geneva Alternative Sampling Method Evaluation Meeting considered the detailed evidence, summarized above, and made the following recommendations.

Though serum is still the gold standard, evidence has been provided that alternative sampling techniques would not adversely affect routine measles and rubella surveillance (provided adequate training and resources are provided) and may enhance surveillance by offering:

- a more acceptable non-invasive method (oral fluid);
- more cost-effective transportation (dried blood spots);
- enhanced molecular surveillance (both oral fluid and dried blood spots);
- enhanced sensitivity during the first 4–5 days after rash onset (oral fluid);
- a confirmatory option for doubtful IgM results (RNA detection in oral fluid).

Regions that have an elimination goal and already have established a serum-based rash-illness surveillance system would not benefit from changing to dried blood spots or oral fluid sampling methods except on a case-by-case basis, especially where:

- the timeliness of transporting specimens from remote or difficult-to-access areas to the laboratory conducting the serological analysis could be improved;
- the collection of oral fluid in addition to serum could improve the efficiency of case identification and virological surveillance.

In summary, dried blood spots and oral fluid sampling have been thoroughly evaluated as alternatives to serum samples in the laboratory and in field studies. Their advantages and disadvantages have been documented, and it remains for technical advisory groups and programme managers to promote their use in appropriate settings. ■

lisés et de référence du réseau et la thermo-stabilité à moyen terme des IgM et de l'ARN a été vérifiée.

Aucune technique d'échantillonnage ne s'est avérée optimale dans toutes les situations et le sérum doit toujours être considéré comme «l'étalon or» pour la détection des IgM. Le LabNet de la rougeole et de la rubéole effectue plus de 300 000 analyses par an sur des échantillons de sérum à la recherche d'IgM spécifiques des virus rougeoleux et rubéoleux et les programmes de santé de nombreux pays prélèvent systématiquement du sang pour d'autres analyses médicales. Toutefois, tout porte à croire que les gouttes de sang séchées ou le liquide buccal sont peut-être une solution viable pour la surveillance de la rougeole et de la rubéole, surtout lorsqu'il existe des problèmes de transport ou de maintien de la chaîne du froid, ou les deux, et lorsque les malades s'opposent à la ponction veineuse.

L'introduction d'autres techniques d'échantillonnage pour la surveillance pose de nombreux problèmes programmatiques, notamment en ce qui concerne le coût, la fiabilité et l'exactitude. Les participants à la réunion d'évaluation des autres méthodes d'échantillonnage, tenue à Genève en 2007, se sont penchés sur les données détaillées récapitulées ci-dessus et ont formulé les recommandations qui suivent.

Bien que le sérum reste «l'étalon or», il apparaît que d'autres techniques d'échantillonnage n'auraient pas d'effets indésirables sur la surveillance systématique de la rougeole et la rubéole (pour autant qu'une formation et des ressources suffisantes aient été fournies) et pourraient même la renforcer en offrant:

- Une méthode non invasive plus acceptable (liquide buccal);
- Un mode de transport plus rentable (sang séché);
- Une surveillance moléculaire renforcée (liquide buccal et sang séché);
- Une meilleure sensibilité au cours des 4 à 5 premiers jours suivant l'apparition de l'éruption cutanée (liquide buccal);
- Une possibilité de confirmation des résultats douteux pour les IgM (détection de l'ARN dans le liquide buccal).

Les régions qui ont pour but l'élimination de ces maladies et qui ont déjà mis en place un système de surveillance des éruptions cutanées basé sur l'analyse du sérum ne tireraient aucun avantage du fait de passer aux méthodes d'échantillonnage du sang séché ou du liquide buccal, sauf au cas par cas, surtout lorsque:

- Le respect des délais de transport des spécimens depuis des régions reculées ou difficiles d'accès jusqu'au laboratoire effectuant l'analyse sérologique pourrait être amélioré;
- la collecte de liquide buccal en plus du prélèvement de sérum permettrait d'améliorer l'efficacité du recensement des cas et de la surveillance virologique.

En résumé, les gouttes de sang séchées et les prélèvements de liquide buccal ont été soigneusement évalués comme alternative aux échantillons de sérum pour les études au laboratoire et sur le terrain. Leurs avantages et inconvénients ont été documentés et il appartient désormais aux groupes consultatifs techniques et aux administrateurs de programmes d'en promouvoir l'utilisation dans les situations appropriées. ■