

► consultations ne coïncide avec celui des consultations des 0–4 ans que pour Manchester, et la contribution des 45–64 ans y semble être plus importante que dans les autres comtés. Il faudrait plusieurs années de surveillance encore pour pouvoir expliquer ces résultats, et notamment les différences entre zones rurales et urbaines.

Le réseau du Nord-Ouest permet de connaître la dissémination locale de la grippe, mais également de renforcer la surveillance nationale en validant les tendances nationales. Une évaluation poussée du bénéfice que peut apporter ce réseau sentinelle de médecins généralistes est prévue pendant les saisons à venir, afin d'estimer sa contribution dans la planification des urgences et dans la préparation aux catastrophes des services sociaux et sanitaires de la région Nord-Ouest de l'Angleterre. ■

## Remerciements / Acknowledgements

Nous remercions tous les médecins généralistes qui ont contribué à ce programme de surveillance, ainsi que le personnel du département pour la protection de la santé à Manchester pour le recueil et la saisie des données. Merci également à tous les centres de contrôle des maladies transmissibles et aux directeurs de santé publique du nord-ouest pour leur soutien. Nous remercions également le Dr Carol Joseph à l'Unité des maladies respiratoires au CDSC, Colindale et les relecteurs anonymes d'Eurosurveillance pour leurs commentaires sur cet article. *We are very grateful to all the GP practices contributing to this surveillance scheme and the staff at Manchester Health Protection Unit for the collection and entry of data. Thanks also go to all CsCDC and Directors of Public Health in the North West for their support. We also thank Dr Carol Joseph at the Respiratory Division of CDSC, Colindale and the anonymous Eurosurveillance referees for their helpful comments on this manuscript.*

## References

1. Department of Health. Compendium of Clinical and Health Indicators 2001 - Clinical and Health Outcomes Knowledge Base. Dataset published online (limited access) <http://nww.nchod.nhs.uk>. Accessed August 2002
2. Regan CM, Johnstone F, Joseph CA, Urwin M. Local surveillance of influenza in the United Kingdom: from sentinel practices to sentinel cities. *Commun Dis Public Health* 2002; **5**(1): 17-22.
3. Fleming DM, Ross AM. Weekly Returns service annual report for 1990, Birmingham Research Unit, Royal College of General Practitioners, 1991.
4. Dedman DJ, Watson JM. The use of thresholds to describe levels of influenza activity. *PHLS Microbiology Digest* 1997; **14**: 206-8.
5. Fleming DM, Cohen JM. Experience of European collaboration in influenza surveillance in the winter of 1993-94. *J Pub Health Med* 1996; **18**(2):133-42.
6. Warden J. Health secretary reports on winter crisis. *BMJ* **318**(7177):145, 1999

► may clarify these results, and particularly the differences between rural and urban areas.

In addition to clarifying the local transmission of influenza, the north west network is able to strengthen national influenza surveillance by validating national trends. Further evaluation of the benefit of the GP sentinel practice network is planned for subsequent seasons to assess its contribution to contingency planning and disaster preparedness of health and social care services in the north west of England. ■

## RAPPORT DE SURVEILLANCE

### Accroître la valeur prédictive des prélèvements pharyngés dans la surveillance virologique de la grippe

K. Leitmeyer, U. Buchholz, M. Kramer, B. Schweiger  
Institut Robert Koch, Berlin, Allemagne

**Selon une étude nationale allemande, la surveillance virologique de la grippe peut être améliorée lorsque les médecins sentinelle n'effectuent des prélèvements pharyngés que sur les malades qui consultent tôt après le début de la maladie (dans les 48 heures), et lorsqu'ils suivent la stricte définition de cas du syndrome grippal. La PCR est recommandée pour détecter les virus grippaux.**

Les pays de la région Europe ont entrepris la surveillance de la grippe en raison de son impact important sur la morbidité et la mortalité et de ses conséquences économiques chaque hiver. Le réseau de surveillance européenne de la grippe (European Influenza Surveillance Scheme, EISS) favorise l'échange d'informations sur l'activité grippale collectées par les systèmes nationaux de surveillance. D'autres pays sont sur le point de mettre en place des systèmes de surveillance de la grippe. Dans la plupart, la surveillance de la grippe comporte un volet clinique et un volet virologique. Ce dernier inclut l'identification

## SURVEILLANCE REPORT

### Enhancing the predictive value of throat swabs in virological influenza surveillance

K. Leitmeyer, U. Buchholz, M. Kramer, B. Schweiger  
Robert Koch-Institut, Berlin, Germany

**According to a national survey in Germany, the influenza virological surveillance can be improved when sentinel practitioners take throat swabs specimens only from patients who consult early after the disease onset (ie, within 48 hours), and when they use the strict clinical case definition of influenza-like illness. PCR should be used for primary detection of influenza viruses.**

Countries within the European region conduct surveillance for influenza because of its marked impact on morbidity, mortality, and the economy each winter season. The European Influenza Surveillance Scheme (EISS) facilitates the exchange of information on influenza activity collected by the national surveillance systems, and other countries are in the process of setting up influenza surveillance. Most countries' surveillance for influenza consists of a clinical and a virological component. The latter may include the identification of viruses, their type, their subtype, and the cha-

des virus, de leur type et sous-type et leur caractérisation par des méthodes sérologiques (inhibition de l'hémagglutination) ou moléculaires (séquençage). Les laboratoires nationaux de référence procèdent généralement à l'identification des virus grippaux par isolement des virus, par la méthode ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), par immunofluorescence (IF) ou par amplification génique après transcription inverse (RT-PCR). L'isolement du virus est toujours considéré comme le meilleur choix à l'échelle internationale.

La valeur prédictive positive (VPP) pour la grippe des échantillons prélevés chez les patients atteints d'infections des voies respiratoires est fondamentale pour pouvoir identifier la phase initiale d'une épidémie de grippe. La VPP d'une définition de cas plus une analyse de laboratoire dépend de la sensibilité de la définition de cas, de sa spécificité, et de la méthode d'analyse employée par le laboratoire, ainsi que de la prévalence de la maladie dans la population.

En vue de développer des recommandations pour la surveillance nationale de la grippe en Allemagne, nous avons comparé la PCR et l'isolement du virus au regard de leur capacité à identifier la grippe, et nous avons étudié d'autres facteurs que nous pensions pertinents pour augmenter l'obtention de tests positifs, comme l'intervalle entre l'apparition des premiers symptômes et le prélèvement des échantillons, ou le délai écoulé entre le prélèvement d'un échantillon et la réception de celui-ci au laboratoire.

## Méthodes

Nous avons utilisé des données de la saison grippale 2000–01. Le Centre national de référence de la grippe (National Influenza Reference Centre, NIC) à Berlin, en Allemagne, membre actif de EISS pendant plusieurs années, a fourni les tubes pour les écouvillons et préparé le mailing destiné aux 105 médecins sentinelle. Le NIC leur a demandé de pratiquer trois à cinq prélèvements pharyngés par semaine chez des patients présentant une infection respiratoire aiguë (IRA), caractérisée par une fièvre élevée, une toux sèche, des maux de tête, une myalgie ou un malaise. Les médecins sentinelle ont renvoyé les prélèvements cliniques au NIC, qui les a tous analysés par isolement du virus et par PCR (1). Tous les tests de PCR comprenaient des contrôles positifs et négatifs.

Le laps de temps entre l'apparition des premiers symptômes et le prélèvement a été défini comme « intervalle 1 », et le délai entre le prélèvement et la réception de l'échantillon au laboratoire comme « intervalle 2 », et nous avons procédé aux calculs suivants :

- Comparaison de la proportion globale d'échantillons positifs pour la grippe par les méthodes d'isolement et de PCR ➤

racterisation of viruses by serological (haemagglutination inhibition) as well as molecular methods (sequencing). National reference laboratories usually identify influenza viruses either through virus isolation, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF) or reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Internationally, virus isolation is still considered the gold standard.

The positive predictive value (PPV) for influenza of specimens taken from patients with respiratory tract infections is crucial for the ability to recognise the initial phase of an influenza epidemic. The PPV of a case definition plus a laboratory test depends on the sensitivity of the case definition, the specificity of the case definition, and the laboratory test method, as well as the prevalence of the disease in the population.

To develop recommendations for national influenza surveillance in Germany, we compared PCR and virus isolation regarding their sensitivity to identify influenza, and assessed other factors thought

to be relevant to increase the yield of positive tests, such as the interval between disease onset and sample collection, as well as the time between sample collection and receipt of the sample by the laboratory.

## Methods

We used data from the influenza season 2000–01. The National Influenza Reference Centre (NIC) in Berlin, Germany, which has been an active EISS member for several years, provided swab containers and pre-addressed and stamped envelopes to 105 sentinel physicians. The NIC advised them to take throat swabs from 3 to 5 patients per week if they presented

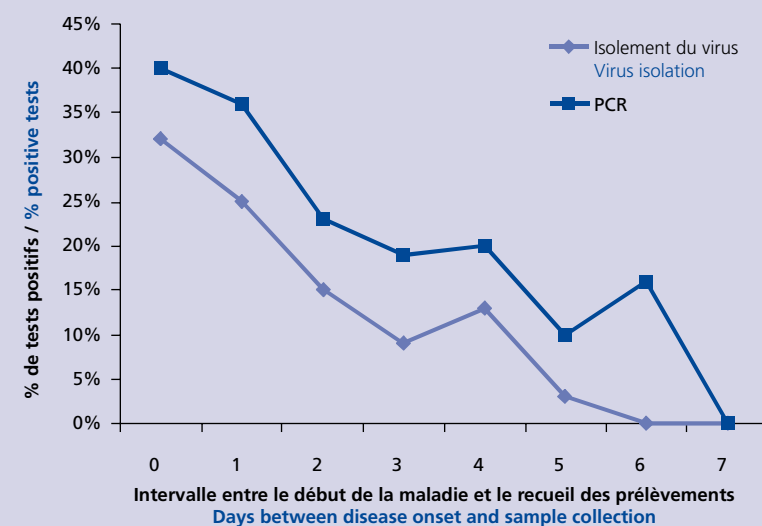
with influenza-like illness (ILI), defined as acute onset of fever, dry cough, headache, myalgia or malaise. Sentinel physicians sent clinical samples to the NIC by mail. The NIC tested all samples by virus isolation and by PCR (1). All routine PCR tests included positive and negative control strains (quality controls).

We defined the time interval between disease onset and sample collection as “interval 1”, the time interval between sample collection and receipt of the sample by the laboratory as “interval 2”, and we performed the following calculations:

- Comparison of the overall proportion of influenza-positive samples by test method, i.e. virus isolation and PCR ➤

**Figure 1**

Relation entre la proportion d'écouvillons positifs pour la grippe et le délai entre l'apparition de la maladie et le prélèvement (n=1882), saison grippale 2000–01  
Relation between the proportion of throat swabs positive for influenza, and time interval between disease onset and specimen collection (n=1882), influenza season 2000–01



PCR = polymerase chain reaction

Source : Laboratoire National allemand de référence de la grippe, Berlin  
German national reference laboratory for influenza, Berlin.

- Relation entre la proportion d'échantillons positifs pour la grippe et l'intervalle 1, en comparant la PCR à la culture (données disponibles pour 1882 spécimens)
- Relation entre la proportion de prélèvements positifs en PCR et l'intervalle 2, stratifiée en fonction de l'intervalle 1 (données disponibles pour 1879 spécimens)

- Relation between the proportion of influenza-positive samples and interval 1, comparing PCR with virus culture (information available for 1882 specimens)
- Relation between the proportion of specimens testing PCR-positive and interval 2, stratified by interval 1 (information available for 1879 specimens)

## Résultats

Pendant la saison grippale 2000–01, le NIC a reçu 2592 prélèvements utilisables, parmi lesquels 642 (25%) ont donné des PCR positives, et 439 (17%) des cultures positives. Aucun isolement du virus n'a pu être obtenu pour 204 des 642 (32%) échantillons positifs en PCR, alors que sur les 439 échantillons positifs en culture, la PCR n'a pu détecter une séquence virale que dans un seul cas (0,02%).

Sur les 1945 prélèvements pour lesquels la date d'apparition de la maladie et la date du prélèvement étaient disponibles, 1430 (74%) ont été prélevés dans les 48 heures suivant le début de la maladie. Nous avons constaté que plus cet intervalle 1 augmentait, plus la proportion de prélèvements positifs pour la PCR et celle d'échantillons positifs en culture virale diminuaient de façon nette ( $\chi^2$  pour une relation linéaire = 42 et 39,  $p < 0,001$  dans les deux cas). Lorsque l'échantillon était collecté dans les 48 heures suivant l'apparition de la maladie, la proportion de prélèvements positifs en PCR se situait entre 23 et 40% (figure 1). Il est intéressant de noter que pour un délai de 0 à 6 jours entre l'apparition des symptômes et la réalisation du prélèvement, l'utilisation de la PCR a permis d'avoir davantage de résultats positifs (plus 8 à 16%) que l'isolement par culture virale.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation linéaire entre la proportion de prélèvements positifs en PCR et l'intervalle 2, en stratifiant en fonction de l'intervalle 1 ( $\chi^2$  pour une relation linéaire compris entre 0 et 4,  $p \geq 0,04$ ; figure 2). Les résultats des cultures virales ont donné des résultats similaires.

## Discussion

Nous avons concentré cette étude sur le rôle des paramètres modifiables susceptibles d'influencer la VPP des prélèvements provenant de patients atteints de syndromes grippaux. L'obtention de prélèvements positifs peut être tout d'abord améliorée lorsqu'ils sont effectués tôt (entre 24 et 48 heures) après l'apparition de la maladie, quelle que soit la méthode d'analyse utilisée. Ceci correspond au mode de dissémination du virus grippal. La réplication virale atteint un pic environ 48 heures après l'infection, puis décline lentement après six à huit jours (2, 3). Le nombre de tests positifs est significativement plus élevé lorsque la détection des virus grippaux est faite par PCR. Ceci a été démontré lors de la saison 2000–01 avec 25% de prélèvements positifs en PCR, contre 17% seulement en culture. Des résultats similaires ont été obtenus lors des saisons précédentes (1,4). De plus, les résultats des analyses

## Results

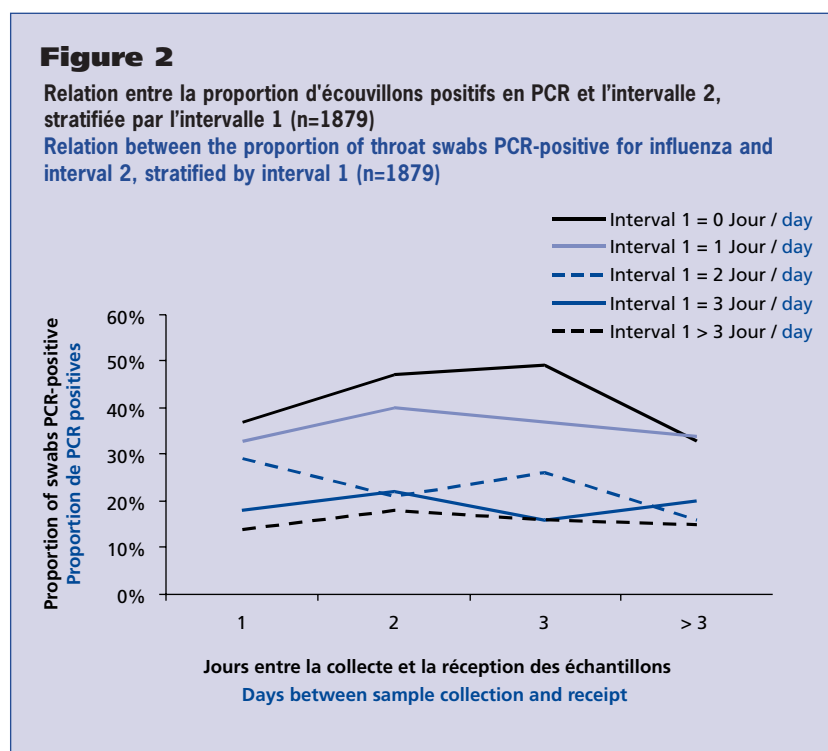
During the influenza season 2000–01, the NIC received 2592 processable specimens: 642 (25%) of the specimens tested positive by PCR, and 439 (17%) of them were culture-positive. No virus could be isolated in 204 (32%) of 642 specimens positive for PCR, but among 439 specimens from which an influenza virus could be cultured, PCR failed only once (0.02%) to detect influenza virus.

Of 1945 specimens where information on the date of onset and the date of specimen collection was available, 1430 (74%) were taken within 48 hours of disease onset. We observed a clear downward trend of the proportion of influenza-positive specimens both for PCR and virus isolation as interval 1 increased ( $\chi^2$  for linear trend=42 and 39, both  $p$ -values<0.001). If the specimen was collected within 48 hours of disease onset, the proportion of specimens positive by PCR was between 23% and 40% (figure 1). Notably, for all time points of interval 1 between day 0 and day 6, use of PCR resulted in 8-16% more positive results than virus isolation.

A clear linear trend between the proportion of specimens positive by PCR and interval 2 could not be found for any of the strata of interval 1 ( $\chi^2$  for linear trend between 0 and 4,  $p$ -values $\geq 0.04$ ; Figure 2). Results from virus culture give a similar picture.

## Discussion

Our focus in this study was the role of modifiable factors that could influence the PPV of specimens taken from patients with ILI. First, the yield of positive samples can be enhanced when the swabs are taken early (between 24 and 48 hours) after disease onset, independent of the method used. This reflects the pattern of virus shedding. Influenza virus replication peaks at about 48 hours after infection and declines slowly thereafter, with little shedding after days 6 to 8 (2,3). The number of positive



test results is significantly higher when PCR is used for detection of influenza viruses. This was demonstrated during the season 2000/2001 when 25% of the specimens were positive by PCR, compared with only 17% that could be cultured. Similar results were obtained during previous seasons (1,4). In addition, PCR results are

par PCR sont généralement disponibles le jour même, alors que l'isolement du virus nécessite en moyenne une semaine environ (4).

D'autre part, la spécificité pour les syndromes grippaux est supérieure à celle pour les infections respiratoires aiguës (IRA), et de ce fait, elle est utilisée dans la plupart des pays pour obtenir des échantillons pour les tests de grippe (5,6). La spécificité des amorces/sondes utilisées pour notre PCR TaqMan® pour l'amplification et la détection des génomes de virus grippaux est très élevée (100%), comme l'a montré l'étude sur un certain nombre de souches grippales de référence et sur les échantillons cliniques (1). De même, on considère que la spécificité des techniques de culture virale était bien supérieure à 95%.

Les valeurs prédictives positives sont influencées par de légères augmentations de la prévalence ou de l'incidence d'une maladie, d'un niveau très bas à un niveau bas ou modéré. C'est le cas au début d'une épidémie de grippe, comme cela a été observé pendant la saison grippale 2000–01 (7). De ce fait, la proportion des patients présentant un syndrome grippal et dont le prélèvement pharyngé est positif pour la grippe, peut être considérée comme un indicateur sensible permettant de détecter le début d'une activité grippale importante en début de saison.

Nous avons pu montrer que la proportion de prélèvements positifs en PCR variait très peu en fonction du délai d'envoi de ces échantillons par les médecins sentinelle au laboratoire. Ceci est en faveur des procédures pratiquées par la plupart des systèmes de surveillance, qui ont recours au courrier normal pour l'envoi de prélèvements non réfrigérés.

La méthode d'isolement du virus, bien qu'elle prenne du temps, est encore considérée mondialement comme la référence absolue pour détecter des virus grippaux, car les tests plus rapides, tels que l'ELISA ou l'immunofluorescence ont une sensibilité et une spécificité réduites. La PCR est très spécifique, il s'agit de la technique la plus sensible pour le typage et le sous-typage des virus grippaux qui ait été décrite. Notre rapport confirme que la PCR est notablement plus sensible que l'isolement du virus, ce qui coïncide avec les études antérieures comparant la culture virale à la PCR sur plusieurs années (1,4,8). Cette différence peut s'expliquer par le fait que pour une PCR, une concentration très faible de virus est suffisante, et qu'il n'est pas nécessaire qu'ils puissent se reproduire. L'utilité de cette technique pour la surveillance virologique en routine est démontrée à présent. L'isolement des virus continuera d'être indispensable pour une caractérisation exhaustive des virus grippaux en circulation.

En conclusion, pour optimiser la détection rapide d'un début d'épidémie de grippe par la surveillance virologique, nous recommandons aux médecins sentinelle de ne pratiquer de prélèvement que chez les patients qui consultent peu de temps après l'apparition de la maladie (c'est-à-dire dans les 48 heures), de suivre la définition de cas clinique d'un syndrome grippal au sens strict, et d'utiliser la PCR pour la première détection des virus de grippe. ■

usually available on the same day while virus isolation takes on average about a week (4).

Second, the specificity of ILI is substantially higher compared to, for example, acute respiratory infection (ARI), and is therefore used by most countries for obtaining specimens for influenza testing (5,6). The specificity of the primer/probe sets used in our TaqMan® PCR for amplification and detection of influenza virus genomes is very high (100%) as has been shown by investigating a number of influenza reference strains and clinical samples (1). Virus culture is also estimated to be well above 95%.

Third, PPVs are influenced by small increases in the prevalence or incidence of a disease from very low to low or moderate levels. This is the case at the beginning of an influenza epidemic, as observed during the influenza season 2000/01 (7). Therefore, the proportion of patients with ILI whose throat swabs are positive for influenza can be considered a sensitive monitor to assist in detecting the beginning of substantial influenza activities at the start of the season.

We were able to show that the proportion of PCR-positive specimens is affected very little by the time taken to transport specimens between sentinel physicians and the laboratory. This supports the practice of most surveillance systems, which use standard mailing of non-refrigerated specimens for transport.

Internationally, virus isolation, although time consuming, is still considered to be the gold standard for detection of influenza viruses, because more rapid tests, such as ELISA or IF, are of limited sensitivity and specificity. PCR is very specific, and the most sensitive technique which has been described for typing and subtyping of influenza viruses. This report confirms previous findings comparing virus isolation and PCR over several years (1,4,8), which are that PCR is substantially more sensitive than virus isolation. This difference may be explained by the fact that PCR requires viruses in only very low concentrations, and which do not need to be capable of replication. Its use in routine virological surveillance has now been demonstrated. Virus isolation will continue to be indispensable for the comprehensive characterisation of circulating influenza viruses.

In conclusion, to optimise early recognition of the beginning of an influenza epidemic through virological surveillance, we recommend that sentinel physicians be advised to take specimens only from patients who present early after disease onset (for example, within 48 hours of disease onset), that they use the strict clinical case definition of ILI, and that PCR be used for primary detection of influenza viruses. ■

## References

1. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1552-8. (<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/38/4/1552.pdf>)
2. Murphy BR, Chalhub EG, Nusinoff SR, Kasel J, Channock RM. Temperature-sensitive mutants of influenza viruses. 3. Further characterization of the ts-1(E) influenza A recombinant (H3N2) virus in man. *J Infect Dis* 1973; **128**: 479-87.
3. Frank AL, Taber LH, Wells CR, Wells JM, Glezen WP, Paredes A. Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children. *J Infect Dis* 1981; **144**: 433-41.
4. Schweiger B, Timm H. Die TaqMan-PCR: Schnelle Typisierung und Subtypisierung von Influenzaviren direkt aus Patientenmaterial. [A TaqMan-PCR for rapid typing and subtyping influenza viruses in clinical specimens.] *Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* 2000; **43**: 788-95. [in German, English abstract available from <http://yellow-fever.rki.de/FORSCH/PUBLIST/2000/00S17.HTM>]
5. Webpage of the European Influenza Surveillance Scheme (EISS). Available at: <http://eiss.org/html/introduction.html>, accessed on November 14, 2001.
6. Aguilera JF, Paget WJ, van der Velden J, Watson JM. Heterogeneous case definitions used for the surveillance of influenza in Europe. Poster presentation, 6th EPIET Scientific Seminar; October 2001; Veyrier du Lac, France.
7. Uphoff H, Heckler R, Schweiger B. Ergebnisse der Influenzasurveillance im Winter 2000/01. [Results of the Influenza Surveillance Program for the 2000-2001 Influenza Season.] *Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 2001; **44**: 1169-73. [in German, English abstract available from <http://www.rki.de/FORSCH/PUBLIST/2001/01U1.HTM>]
8. Ellis JS, Fleming DM, Zambon MC. Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 2076-82.