



Contents

- 37 Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2016

Sommaire

- 37 Détection des virus grippaux de type A par amplification génique: analyse sommaire du programme d'évaluation externe de la qualité de l'OMS, 2016

Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2016

Introduction

Global influenza virus surveillance has been conducted through the WHO Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) for over half a century.¹ Currently there are 143 institutions in 113 WHO Member States recognized by WHO as National Influenza Centres (NICs). The laboratory network also comprises 6 WHO Collaborating Centres (CCs), 4 Essential Regulatory Laboratories and ad hoc groups set up to address specific emerging issues.

Due to the continuous evolution of influenza viruses, together with the pandemic potential of non-seasonal influenza viruses, robust laboratory diagnostics and timely surveillance are essential. The WHO external quality assessment programme (EQAP) for influenza virus subtype A detection by polymerase chain reaction (PCR) was initiated in 2007, after the influenza A(H5N1) outbreaks in Asia, to assess the ability of NICs to detect influenza A(H5) viruses, which pose a pandemic threat. The EQAP has evolved over the years, with its scope being extended to seasonal influenza A, influenza B and other non-seasonal influenza A viruses reported in human infections, to monitor the quality and comparability of the performance of participating laboratories. Summaries of the performance of participating laboratories from panels 1 to 14

Détection des virus grippaux de type A par amplification génique: analyse sommaire du programme d'évaluation externe de la qualité de l'OMS, 2016

Introduction

Depuis plus d'un demi-siècle, le Système mondial OMS de surveillance de la grippe et de riposte (GISRS) assure la surveillance des virus grippaux au niveau mondial.¹ Il existe actuellement 143 établissements reconnus par l'OMS comme centres nationaux de lutte contre la grippe, répartis dans 113 États Membres. Le réseau de laboratoires comprend également 6 centres collaborateurs de l'OMS, 4 laboratoires essentiels de réglementation et des groupes spéciaux établis au besoin pour traiter de questions spécifiques qui se font jour.

Compte tenu de la constante évolution des virus grippaux et du potentiel pandémique des virus non saisonniers, une surveillance en temps utile et des capacités solides de diagnostic en laboratoire sont indispensables. Le programme d'évaluation externe de la qualité (EQAP) de l'OMS, portant sur la détection des virus grippaux de type A par amplification génique (PCR), a été lancé en 2007, suite aux flambées de grippe A(H5N1) survenues en Asie, afin d'évaluer la capacité des centres nationaux de lutte contre la grippe à détecter les virus grippaux A(H5), susceptibles de donner lieu à une pandémie. L'EQAP a par la suite évolué et son champ d'action a été élargi pour inclure la grippe A saisonnière, la grippe B et d'autres virus grippaux A non saisonniers signalés dans des cas d'infection humaine, afin de contrôler la qualité et la comparabilité des résultats obtenus par les laboratoires participants. Pour les séries 1 à 14 (2007 à 2015), une

WORLD HEALTH
ORGANIZATION
Geneva

ORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉ
Genève

Annual subscription / Abonnement annuel
Sw. fr. / Fr. s. 346.–

01.2017
ISSN 0049-8114
Printed in Switzerland

¹ See http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/

¹ Voir http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/

(2007 to 2015) have been reported in the *Weekly Epidemiological Record*.²⁻⁹

In 2016, the project continued under the coordination of WHO's Global Influenza Programme, implemented by the H5 Reference Laboratory and National Influenza Centre at the Centre for Health Protection, Department of Health, Hong Kong Special Administrative Region, China, with support from WHO regional offices.

The programme currently dispatches samples for testing once per year. This report summarizes the results of panel 15, which was dispatched to participating laboratories in 2016. Phenotypic/genotypic neuraminidase inhibitor (NAI) susceptibility testing for influenza A(H1N1)pdm09 viruses was also included on an optional basis.

Preparation of panel 15

Vacuum-dried inactivated influenza viruses were dispatched to participating laboratories. Viruses were grown in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells and inactivated by triton X-100. Pre-distribution homogeneity and stability testing was performed on 10 random samples respectively, as in previous panels.

Composition of panel 15

Panel 15 consisted of 10 coded samples, represented by different concentrations of influenza viruses, including: influenza A(H5N1) of genetic clade 2.3.2.1; influenza A(H5N6) of genetic clade 2.3.4.4; influenza A(H1N1)pdm09; influenza A(H3N2); influenza A(H9N2); influenza B (Yamagata lineage); and a sample that contained no virus. Two influenza A(H1N1)pdm09 samples designated for phenotypic/genotypic testing of NAI susceptibility were included upon request. Details of the composition of the panel are shown in *Table 1a* and *1b*. Participants were instructed to reconstitute each sample with PCR-grade water prior to testing. A questionnaire on the laboratory methods and gene targets used for the EQAP specimens was also included.

Distribution of panel and response of participants

NICs and other national influenza laboratories were invited to participate before the panels were dispatched. Panel 15 was dispatched between April 2016 and June 2016 to 174 participating laboratories in 138 countries

synthèse des résultats des laboratoires participants a été publiée dans les numéros correspondants du *Relevé épidémiologique hebdomadaire*.²⁻⁹

En 2016, le projet s'est poursuivi sous la coordination du Programme mondial de lutte contre la grippe de l'OMS, sa mise en œuvre étant assurée par le Laboratoire de référence H5 et le Centre national de lutte contre la grippe relevant du Centre de protection sanitaire, Département de la Santé, de Hong Kong (Région administrative spéciale de la Chine), avec l'appui des bureaux régionaux de l'OMS.

Dans le cadre du programme, des échantillons sont actuellement envoyés une fois par an aux laboratoires participants à des fins d'analyse. Le présent rapport récapitule les résultats de la série 15, dont les échantillons ont été envoyés aux laboratoires en 2016. Une analyse phénotypique/génotypique de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase pour les virus grippaux A(H1N1)pdm09 était également incluse à titre facultatif.

Préparation de la série 15

Des virus grippaux ont été envoyés aux laboratoires participants après inactivation et dessiccation sous vide. Ces virus ont été cultivés sur des cellules rénales canines Madin-Darby (MDCK) et inactivés par le triton X-100. Comme pour les séries précédentes, des tests d'homogénéité et de stabilité ont été effectués avant la distribution, chaque test portant sur 10 échantillons aléatoires.

Composition de la série 15

La série 15 comportait 10 échantillons codés, contenant différentes concentrations de virus grippaux, dont des virus A(H5N1) appartenant au clade génétique 2.3.2.1, des virus A(H5N6) du clade génétique 2.3.4.4, des virus A(H1N1)pdm09, A(H3N2) et A(H9N2), des virus grippaux B (lignée Yamagata) et un échantillon ne contenant aucun virus. Deux échantillons de virus grippaux A(H1N1)pdm09 destinés à un test phénotypique/génotypique de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase ont été inclus sur demande dans cette série. La composition de la série est présentée en détail dans les *Tableaux 1a* et *1b*. Les laboratoires participants ont reçu l'instruction de reconstituer chaque échantillon avec de l'eau ayant la qualité requise pour la PCR avant de procéder à l'analyse. Un questionnaire portant sur les méthodes de laboratoire et les cibles géniques utilisées pour les échantillons de l'EQAP a été joint.

Distribution de la série d'échantillons et réponse des participants

Les centres nationaux de lutte contre la grippe, ainsi que d'autres laboratoires nationaux de la grippe, ont été invités à participer au programme avant l'envoi des échantillons. Entre avril et juin 2016, les échantillons de la série 15 ont été envoyés

² See No. 45, 2008, pp. 401–412.

³ See No. 48, 2009, pp. 493–504.

⁴ See No. 3, 2011, pp. 17–24.

⁵ See No. 3, 2012, pp. 29–36.

⁶ See No. 4, 2013, pp. 37–48.

⁷ See No. 4/5, 2014, pp. 37–44.

⁸ See No. 3, 2015, pp. 9–16.

⁹ See No. 1, 2016, pp. 1–12.

² Voir N° 45, 2008, pp.401-412.

³ Voir N° 48, 2009, pp.493-504.

⁴ Voir N° 3, 2011, pp.17-24.

⁵ Voir N° 3, 2012, pp.29-36.

⁶ Voir N° 4, 2013, pp.37-48.

⁷ Voir N° 4/5, 2014, pp.37-44.

⁸ Voir N° 3, 2015, pp.9-16.

⁹ Voir N° 1, 2016, pp.1-12.

Table 1a **Panel composition and results of panel 15 (2016) of the external quality assessment programme**
 Tableau 1a **Composition et résultats de la série 15 (2016) du programme d'évaluation externe de la qualité de l'OMS**

Influenza viruses – Virus grippaux	Virus (clade) ^a – Virus (clade) ^a	Sample number – Numéro de l'échantillon	Copies/ μ l ^b – Copies/ μ l ^b	No. (%) of laboratories correctly identifying sample (n=151) – Nombre (%) de laboratoires ayant correctement identifié l'échantillon (n=151)
A(H5N1)	A/Hong Kong/5923/2012 (2.3.2.1)	V01-2016	7.21	145 (96.0)
A(H5N1)	Same virus as V01-2016 – <i>Même virus que V01-2016</i>	V08-2016	1.26 x 10 ²	150 (99.3)
A(H5N6)	A/Peregrine Falcon/Hong Kong/15-04955/2015 (2.3.4.4)	V06-2016	9.40	147 (97.4)
A(H5N6)	Same virus as V06-2016 – <i>Même virus que V06-2016</i>	V10-2016	7.49 x 10 ¹	148 (98.0)
A(H1N1)pdm09	A/California/7/2009-like virus – <i>Analogue à A/California/7/2009</i>	V04-2016	1.27 x 10 ²	147 (97.4)
A(H1N1)pdm09	A/California/7/2009-like virus – <i>Analogue à A/California/7/2009</i>	V07-2016	6.93 x 10 ²	151 (100.0)
A(H3N2)	A/Hong Kong/4801/2014-like virus – <i>Analogue à A/Hong Kong/4801/2014</i>	V03-2016	6.57	146 (96.7)
A(H9N2)	A/Hong Kong/308/2014	V09-2016	2.55 x 10 ¹	140 (92.7)
B	B/Phuket/3073/2013-like virus (Yamagata lineage) – <i>Analogue à B/Phuket/3073/2013 (lignée Yamagata)</i>	V02-2016	1.92 x 10 ²	148 (98.0)
Negative – <i>Négatif</i>	NA – <i>SO</i>	V05-2016	NA – <i>SO</i>	150 (99.3)

^a The nomenclature of influenza A(H5) was based on the HA gene. For additional information, see http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/h5n1_nomenclature/en/; http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/h5_nomenclature_clade2344/en/. – La nomenclature des virus A(H5) est basée sur le gène HA. Pour en savoir plus, consulter http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/h5n1_nomenclature/en/; http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/h5_nomenclature_clade2344/en/.

^b Measured by real-time RT-PCR after 5 days of storage of inactivated virus at 25°C. – Mesuré par PCR en temps réel après 5 jours de conservation du virus inactivé à 25°C.
 NA: not applicable. – *SO*: sans objet.

Table 1b **Details of influenza A(H1N1)pdm09 samples for optional neuraminidase inhibitor susceptibility testing**
 Tableau 1b **Échantillons de virus grippaux A(H1N1)pdm09 inclus pour l'analyse facultative de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase**

Sample No. – N° de l'échantillon	Amino acid substitution ^a (Nucleotide change detected) – Substitution d'acides aminés ^a (modification nucléotidique détectée)	Oseltamivir	Zanamivir	No. of participants with correct results – Nbre de laboratoires obtenant des résultats corrects	
				Genotypic (n=43) – <i>Génotypique (n=43)</i>	Phenotypic (n=28) – <i>Phénotypique (n=28)</i>
NAI01-2016	H275Y (C823T)	(Highly) reduced inhibition – <i>Inhibition (fortement) réduite</i>	Normal inhibition – <i>Inhibition normale</i>	42	28
NAI02-2016	Wild type – <i>Type sauvage</i>	Normal inhibition – <i>Inhibition normale</i>	Normal inhibition – <i>Inhibition normale</i>	41	28

^a Residue position in N1 neuraminidase numbering. – Position du résidu dans la numérotation N1 de la neuraminidase.

at ambient temperature by courier service, as in previous panels. Participating laboratories were requested to report results within 4 weeks after the date of sample reception. Of the 174 participating laboratories which received the panel, 151 (86.8%) reported results before the closing date. The number of laboratories reporting results from the WHO regions on time for analysis in panel 15 was as follows: African Region (AFR), n=23;

à 174 laboratoires participants dans 138 pays, à température ambiante et par un service d'acheminement rapide, comme pour les séries précédentes. Il a été demandé aux laboratoires de transmettre leurs résultats dans un délai de 4 semaines à compter de la date de réception des échantillons. Sur les 174 laboratoires participants ayant reçu les échantillons, 151 (86,8%) ont communiqué leurs résultats avant la date de clôture. Pour chacune des Régions de l'OMS, le nombre de labo-

Region of the Americas (AMR), $n=27$; Eastern Mediterranean Region (EMR), $n=12$; European Region (EUR), $n=60$; South-East Asia Region (SEAR), $n=5$ and Western Pacific Region (WPR), $n=24$.

Methods of detection

Various PCR protocols and testing strategies were used by participating laboratories for the detection of influenza type A and B viruses and subtyping of influenza A viruses as described for previous panels. More than half of the participants used protocols from the United States Centers for Disease Control and Prevention. Use of different PCR protocols did not yield apparent differences in performance. Details on target genes, detection methods and source of primers/probes and enzymes used were included in the summary report of performance that was distributed to all participants.

Performance of laboratories

Only results returned within the designated closing date from the 151 laboratories were included in the analysis. Based on the same assessment criteria for panels 1–14,^{2–9} 132 of the 151 (87.4%) participating laboratories returned correct results for all 10 samples, and 141 (93.4%) correctly identified all 4 influenza A(H5) samples.

Two different influenza A(H5) viruses were included. The first was a human influenza A(H5N1) virus of clade 2.3.2.1 (V01-2016 and V08-2016, in different concentrations). The rates of correct detection were 145/151 (96.0%) and 150/151 (99.3%) respectively. The second was an avian influenza A(H5N6) virus of clade 2.3.4.4 (V06-2016 and V10-2016, in different concentrations). The rates of correct detection were 147/151 (97.4%) and 148/151 (98.0%) respectively.

For the influenza A(H1N1)pdm09 samples, the rates of correct detection for V04-2016 and V07-2016 were 147/151 (97.4%) and 151/151 (100.0%) respectively. For the influenza A(H3N2) sample (V03-2016) and influenza B Yamagata lineage sample (V02-2016), 146/151 (96.7%) and 148/151 (98.0%) laboratories reported correct results respectively.

The rate of correct detection for the influenza A(H9N2) sample (V09-2016) was 140/151 (92.7%). The sample was correctly reported as influenza A(H9) ($n=42$), influenza A(H9N2) ($n=4$), and influenza A untypeable ($n=93$) for participants who did not perform H9 testing. An additional participant reporting a negative result for this sample was also scored correct, as this participant only performed influenza A subtype-specific tests for influenza A detection, which did not include H9-specific testing. One participating laboratory reported a positive result for the negative sample (V05-2016). The false-positive rate was 0.7% (Table 1a).

In this panel, 19/151 (12.6%) participants reported incorrect results. Altogether 12/151 (7.9%) participants returned one incorrect result and 7/151 (4.6%) returned more than one incorrect result (Table 2). The details are presented in Table 3.

ratoires ayant transmis les résultats de la série 15 à temps pour l'analyse était le suivant: Région africaine, $n=23$; Région des Amériques, $n=27$; Région de la Méditerranée orientale, $n=12$; Région européenne, $n=60$; Région de l'Asie du Sud-Est, $n=5$; et Région du Pacifique occidental, $n=24$.

Méthodes de détection

Comme pour les séries précédentes, les laboratoires participants ont employé divers protocoles de PCR et différentes stratégies d'analyse pour détecter les virus grippaux de types A et B et sous-typier les virus A. Plus de la moitié des laboratoires ont utilisé les protocoles des Centers for Disease Control and Prevention des États-Unis. L'utilisation de différents protocoles de PCR ne s'est pas traduite par une variation manifeste de la performance. Les détails sur les gènes cibles, les méthodes de détection et l'origine des amorces/sondes et enzymes utilisées figuraient dans le compte rendu analytique des résultats qui a été distribué à tous les laboratoires participants.

Résultats des laboratoires

Seuls les résultats transmis par 151 laboratoires dans les délais fixés ont été inclus dans l'analyse. Selon les mêmes critères d'évaluation que pour les séries 1 à 14,^{2–9} 132 des 151 laboratoires participants (87,4%) ont fourni des résultats corrects pour l'ensemble des 10 échantillons et 141 (93,4%) ont correctement identifié les 4 échantillons de virus grippaux A(H5).

Deux virus grippaux A(H5) différents ont été inclus dans la série. Le premier était un virus humain A(H5N1) du clade 2.3.2.1 (V01-2016 et V08-2016, à différentes concentrations). Le taux de détection correcte de ces échantillons était de 145/151 (96,0%) et 150/151 (99,3%) respectivement. Le second était un virus aviaire A(H5N6) du clade 2.3.4.4 (V06-2016 et V10-2016, à différentes concentrations). Le taux de détection correcte de ces échantillons était de 147/151 (97,4%) et 148/151 (98,0%) respectivement.

Pour le virus grippal A(H1)pdm09, le taux de détection correcte des échantillons V04-2016 et V07-2016 était de 147/151 (97,4%) et 151/151 (100,0%) respectivement. Pour les échantillons de virus grippal A(H3N2) (V03-2016) et de virus grippal B de la lignée Yamagata (V02-2016), 146/151 laboratoires (96,7%) et 148/151 laboratoires (98,0%), respectivement, ont transmis des résultats corrects.

Pour l'échantillon de virus grippal A(H9N2) (V09-2016), le taux de détection correcte était de 140/151 (92,7%). L'échantillon a été correctement identifié comme étant un virus A(H9) ($n=42$), un virus A(H9N2) ($n=4$) ou un virus de type A ne pouvant être typé ($n=93$, pour les laboratoires n'ayant pas réalisé d'analyse H9). En outre, un laboratoire ayant signalé un résultat négatif pour cet échantillon a également été classé parmi les réponses correctes car il s'agit d'un laboratoire ne réalisant que des tests spécifiques par sous-type pour la détection de la grippe A, le sous-type H9 n'étant pas inclus dans les analyses effectuées. Un laboratoire participant a notifié un résultat positif pour l'échantillon négatif (V05-2016), soit un taux de faux positifs de 0,7% (Tableau 1a).

Dans cette série, 19 des 151 laboratoires participants (12,6%) ont transmis des résultats incorrects. En tout, 12 laboratoires sur 151 (7,9%) ont obtenu 1 résultat incorrect et 7 sur 151 (4,6%) en ont obtenu plusieurs (Tableau 2). Ces résultats sont présentés en détail dans le Tableau 3.

Table 2 Performance of participating laboratories in the external quality assessment programme, panel 15 (2016)

Tableau 2 Résultats des laboratoires participant au programme d'évaluation externe de la qualité, série 15 (2016)

Number of correct samples – Nombre d'échantillons corrects	No. (%) of laboratories (n=151) – Nombre (%) de laboratoires (n=151)
10	132 (87.4)
9	12 (7.9)
6–8	6 (4.0)
<6	1 (0.7)

Table 3 Details of incorrect results reported by participating laboratories in the external quality assessment programme, panel 15 (2016)

Tableau 3 Détails des résultats incorrects rendus par les laboratoires participant au programme d'évaluation externe de la qualité, série 15 (2016)

Samples – Échantillons		Number of participants reporting – Nombre de laboratoires ayant notifié des résultats					Total
Influenza A(H5) – Virus grippaux A(H5)	Other influenza A subtype – Autres sous-types grippaux A	Influenza A untypeable – Virus A ne pouvant être typés	Influenza B – Virus B	Negative – Négatif			
V01-2016 /clade 2.3.2.1	1	4	0	1		6	
V06-2016 /clade 2.3.4.4	1	1	0	2		4	
V08-2016 /clade 2.3.2.1	1	0	0	0		1	
V10-2016 /clade 2.3.4.4	0	2	1	0		3	
Non-influenza A (H5) – Virus grippaux non A(H5)	A(H1)pdm09	A(H3)	A(H5)	A untypeable ^a – A ne pouvant être typé ^a	B	Negative – Négatif	Total
V02-2016/ B Yamagata	0	0	0	0	1 Victoria	2	3
V03-2016/ A(H3)	1	NA – SO	1	3	0	0	5
V04-2016/ A(H1)pdm09	NA – SO	1	0	1	0	2	4
V05-2016/ Negative	1	0	0	0	0	0	1
V07-2016/ A(H1)pdm09	NA – SO	0	0	0	0	0	0
V09-2016/ A(H9)	0	1	1	6	0	3	11

^a Only includes laboratories that have indicated performance of the specific subtyping assay. – Inclut uniquement les laboratoires ayant indiqué que l'essai spécifique de sous-typage a été réalisé.

NA: not applicable. – SO: sans objet.

Phenotypic/genotypic neuraminidase inhibitor susceptibility testing

Two influenza A(H1N1)pdm09 samples: NAI01-2016 (with highly reduced neuraminidase inhibition by oseltamivir) and NAI02-2016 (wild type), were included for the NAI susceptibility testing. Altogether 47/151 (31.1%) participants reported NAI results, in which 43 returned results for genotypic testing and 28 for phenotypic testing; 24 participants performed both tests.

For genotypic testing, 43 participants reported results for NAI01-2016 and 42 for NAI02-2016. For NAI01-2016, 42/43 reported (highly) reduced inhibition by oseltamivir with nucleotide change (C823T) in the NA gene corresponding with H275Y amino acid substitution. Six participants also reported (highly) reduced inhibition by peramivir. For NAI02-2016, 41/42 (97.6%) reported

Test phénotypique/génotypique de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase

Deux échantillons de virus A(H1N1)pdm09 ont été inclus dans la série à des fins d'analyse de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase: NAI01-2016 (présentant une forte réduction de l'inhibition de la neuraminidase par l'oseltamivir) et NAI02-2016 (de type sauvage). En tout, 47 des 151 laboratoires participants (31,1%) ont transmis des résultats sur la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase, 43 d'entre eux ayant effectué un test génotypique, 28 un test phénotypique et 24 ayant procédé aux 2 types de test.

Pour le test génotypique, 43 laboratoires ont communiqué des résultats pour l'échantillon NAI01-2016, et 42 pour l'échantillon NAI02-2016. Pour NAI01-2016, 42 des 43 laboratoires ont signalé une (forte) réduction de l'inhibition par l'oseltamivir, avec une modification nucléotidique (C823T) sur le gène NA correspondant à une substitution d'acide aminé H275Y. Six laboratoires participants ont également indiqué une (forte) réduction de

wild-type influenza A(H1N1)pdm09. One participant reported reversed results for the 2 samples. Among the 43 participants, various methods were used. These included allelic discrimination by real-time RT-PCR (used by 25 participants [58.1%]), Sanger sequencing (used by 15 [34.9%]), pyrosequencing (used by 5 [11.6%]) and massive parallel sequencing (used by 1 [3.0%]). Three participants used both allelic discrimination by real-time RT-PCR and Sanger sequencing.

For phenotypic testing, all 28 participants reported correct results. For NAI01-2016, 27 participants reported highly reduced inhibition by oseltamivir and 1 reported reduced inhibition. For NAI02-2016, all 28 participants correctly reported normal inhibition by oseltamivir. Both samples had normal inhibition by zanamivir. Of the 28 participants, 22 also reported results for zanamivir and all were correct. Two major methodologies were used for phenotypic testing: chemiluminescence-based NA-Star/NA-XTD assay ($n=6$) and fluorescence-based MUNANA assay ($n=22$). IC50 values obtained by both methods are summarized in Table 4.

Discussion

The number of laboratories participating in the EQAP has remained fairly stable since panel 8 in 2010 (Figure 1). Among these panels the average correct rates for all samples and influenza A(H5) samples were 80.6% and 89.0% respectively, compared with 88.9% and 93.4% in panel 15.

The subtyping performance for samples of both influenza A(H5N1) genetic clade 2.3.2.1 and influenza A(H5N6) genetic clade 2.3.4.4 was good, with the same combined correct rate ($295/302=97.7\%$) in this panel. The correct rate for influenza A(H5) samples correlated inversely with virus concentrations. The influenza A(H5N1) sample (V08-2016), at the highest concentration, had only one incorrect subtyping result, which was

l'inhibition par le peramivir. Pour NAI02-2016, 41 des 42 laboratoires (97,6%) ont notifié un virus grippal A(H1N1)pdm09 de type sauvage. Un laboratoire participant a obtenu des résultats inversés pour les 2 échantillons. Ces 43 laboratoires participants ont eu recours à diverses méthodes: 25 d'entre eux (58,1%) ont utilisé la discrimination allélique par RT-PCR en temps réel, 15 (34,9%) le séquençage Sanger, 5 (11,6%) le pyroséquençage et 1 (3,0%) le séquençage massivement parallèle. Trois d'entre eux ont employé à la fois la discrimination allélique par RT-PCR en temps réel et le séquençage Sanger.

Pour le test phénotypique, les 28 laboratoires participants ont tous transmis des résultats corrects. Pour l'échantillon NAI01-2016, 27 laboratoires ont fait état d'une forte réduction de l'inhibition par l'oseltamivir et 1 laboratoire a indiqué une réduction de cette inhibition. Pour l'échantillon NAI02-2016, les 28 participants ont tous correctement signalé une inhibition normale par l'oseltamivir. Les 2 échantillons présentaient une inhibition normale par le zanamivir. Sur les 28 laboratoires participants, 22 ont communiqué des résultats, tous corrects, sur le zanamivir. Deux méthodes principales ont été utilisées pour l'analyse phénotypique: l'épreuve par chimiluminescence avec substrat NA-Star/NA-XTD ($n=6$) et le test fluorimétrique avec substrat MUNANA ($n=22$). Le Tableau 4 fournit un récapitulatif des valeurs de CI50 obtenues par les 2 méthodes.

Discussion

Le nombre de laboratoires participant à l'EQAP est resté relativement stable depuis la série 8 en 2010 (Figure 1). Sur l'ensemble des séries, le taux moyen de résultats corrects s'élève à 80,6% tous échantillons confondus et à 89% pour les échantillons A(H5). Pour la série 15, ces taux sont de 88,9% et 93,4% respectivement.

De bons résultats ont été obtenus dans cette série pour le sous-typage des virus grippaux A(H5N1) du clade génétique 2.3.2.1 et des virus A(H5N6) du clade 2.3.4.4, avec le même taux combiné de détection correcte ($295/302=97,7\%$). Le taux de résultats corrects pour les échantillons A(H5) était inversement corrélé à la concentration en virus. Seul un résultat incorrect de sous-typage a été obtenu pour l'échantillon A(H5N1) de plus forte concentration (V08-2016), résultant probablement d'une

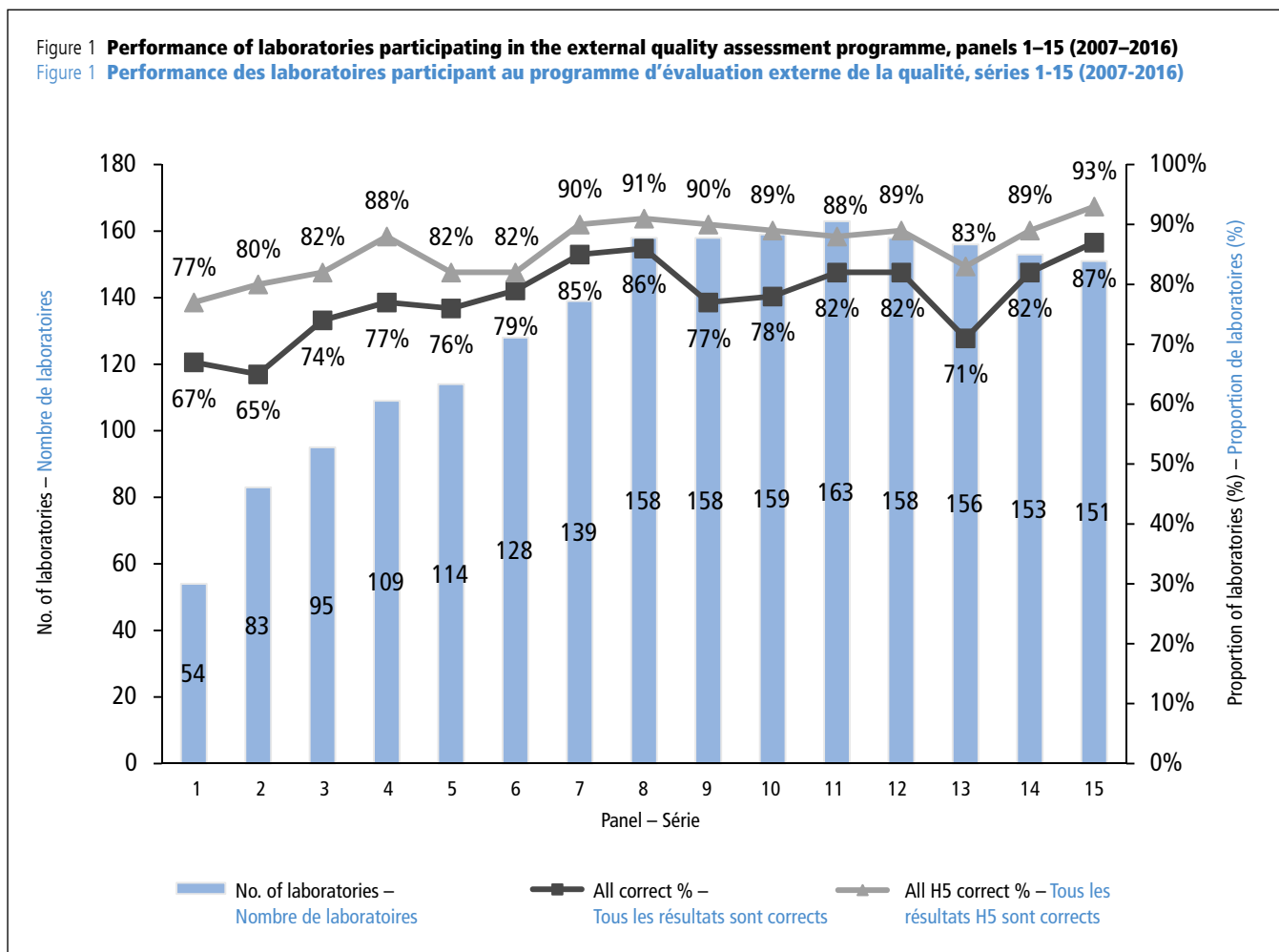
Table 4 IC50 values obtained by phenotypic neuraminidase inhibitor susceptibility testing

Tableau 4 Valeurs CI50 obtenues pour le test phénotypique de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase

Drug – Médicament	Assay – Épreuve	Substrate – Substrat	Number of datasets – Nombre de séries de données	NAI01-2016		NAI02-2016		Observed fold difference* – Facteur de différence observé*
				IC50 values (nM) – Valeurs de CI50 (nM)				
				Median – Médiane	Range – Intervalle	Median – Médiane	Range – Intervalle	
Oseltamivir	Chemiluminescence-based – Par chimiluminescence	NA-Star/ NA-XTD	6	99.71	56.93–215.20	0.36	0.20–0.50	178–533
	Fluorescence-based – Fluorimétrique	MUNANA	22	230.16	126.97–>1000	0.40	0.15– 1.50	182–1450
Zanamivir	Chemiluminescence-based – Par chimiluminescence	NA-Star/ NA-XTD	6	0.6	0.33–1.75	0.45	0.31–1.83	<10
	Fluorescence-based – Fluorimétrique	MUNANA	22	0.38	0–0.90	0.36	0–0.65	<10

* Between NAI01-2016 and NAI02-2016 as reported by each participant. – Entre NAI01-2016 et NAI02-2016, signalé par chaque laboratoire participant.

Figure 1 Performance of laboratories participating in the external quality assessment programme, panels 1–15 (2007–2016)
 Figure 1 Performance des laboratoires participant au programme d'évaluation externe de la qualité, séries 1-15 (2007-2016)



likely attributable to contamination by the adjacent influenza A(H1)pdm09 sample at relatively high concentration. Among the 14 incorrect results for influenza A(H5) samples, 6 were reported for the sample with the lowest virus concentration, V01-2016, for which there were 5 reports of influenza untypeable or negative results. This may be correlated with assay sensitivity, based on 2 participants performing conventional PCR, 1 using an assay with mismatches in primer/probe sequences and 2 reporting generally high Ct values (>30) for all panel samples. Another identified source of error was sample swapping within the panel. For some other cases, no obvious reasons could be identified for the incorrect results.

For the influenza A(H9N2) sample, the correct rate of detection was 140/151 (92.7%) which was similar to that of another non-seasonal influenza virus, influenza A(H7), 141/153 (92.2%) in panel 14. Among 11 incorrect results, 6 participants indicated performing specific H9 testing, including 1 using a conventional PCR assay with primer mismatches, 1 performing a commercial microarray assay, and 4 for which no apparent reason could be identified. For the remaining 5 participants who did not perform H9 subtyping tests, 2 reported V09-2016 as other influenza A subtypes, and 3 reported the sample as negative. One participant who only performed non-H9 subtyping tests, without influenza A detection tests, reported V09-2016 as negative and was considered

contamination par l'échantillon voisin de virus grippal A(H1) pdm09 à concentration relativement élevée. Parmi les 14 résultats incorrects obtenus pour les échantillons A(H5), 6 concernaient l'échantillon de plus faible concentration virale, V01-2016, pour lequel 5 résultats négatifs ou de virus grippal impossible à typer ont été signalés. Cela peut être lié à la sensibilité des épreuves, 2 laboratoires ayant effectué une analyse par PCR classique, 1 ayant réalisé un test avec un mauvais appariement des séquences de l'amorce/de la sonde et 2 ayant signalé des valeurs de Ct généralement élevées (>30) pour tous les échantillons de la série. Un échange d'échantillons à l'intérieur de la série était une autre source d'erreur identifiée. Pour certains autres cas, aucune cause d'erreur évidente n'a pu être déterminée.

Le taux de détection correcte de l'échantillon de virus grippal A(H9N2) était de 140/151 (92,7%), soit un niveau comparable à celui obtenu dans la série 14 pour un autre virus grippal non saisonnier, le virus A(H7) (141/153, 92,2%). Parmi les 11 laboratoires ayant obtenu des résultats incorrects, 6 ont indiqué qu'ils avaient effectué un test H9 spécifique, dont 1 par PCR classique avec un mauvais appariement de l'amorce, 1 au moyen d'un test commercial sur puce à ADN, et 4 pour lesquels aucune cause d'erreur apparente n'a pu être identifiée. Parmi les 5 laboratoires restants, qui n'ont pas réalisé de test de sous-typage H9, 2 ont classé l'échantillon V09-2016 dans d'autres sous-types A et 3 ont donné un résultat négatif. L'un des laboratoires, qui avait procédé à des essais de sous-typage uniquement pour les virus autres que H9, sans test de détection de la grippe A, a donné un résultat

correct. However, routine inclusion of influenza A detection assay in the testing algorithm is recommended to maintain laboratory capacity to detect emerging or less commonly circulating influenza A virus subtypes. On the other hand, the number of participants performing H9 subtyping test (52/151, 34.4%), was much lower than that for influenza A(H7) (136/153, 88.9%) in panel 14. With the continuous circulation of influenza A(H9) viruses and the pandemic potential, participants are encouraged to consider regularly adopting and reviewing their subtyping assays.

The false positive rate dropped to 0.7% (1/151) in panel 15, compared with 2.0% (3/153) in panel 14. However, suspected sample swapping ($n=3$) and transcription error ($n=1$) were noted, highlighting the importance of good laboratory practice.

In panel 15, phenotypic and genotypic NAI susceptibility testing continued to be included on an optional basis. Overall, the on-time return rate for analysis increased from 38/153 (24.8%) in panel 14 to 47/151 (31.1%) in panel 15 with few participants indicating problems with reagent availability during the testing period. An influenza A(H1N1)pdm09 sample with NA H275Y substitution associated with highly reduced inhibition by oseltamivir (NAI01-2016) and a wild-type virus (NAI02-2016) were included. Performance in genotypic testing was generally good, with all 43 participants, except 1 (with possible sample swapping) reporting correct results. One participant who reported using massive parallel sequencing did not provide genotyping results for NAI02-2016, possibly due to insufficient assay sensitivity.

All 28 participants reported correct phenotypic interpretations. The observed fold difference values of neuraminidase inhibition between the 2 samples were more than 100 for all participants. This is consistent with the WHO criteria where NAI01-2016 is associated with highly reduced inhibition by oseltamivir. One participant who returned NAI susceptibility testing results for the first time, reported NAI01-2016 to have “reduced inhibition” by oseltamivir, but did not provide the interpretation criterion. All 22 participants who performed testing on zanamivir correctly reported normal inhibition for both samples.

Among all the 47 participants in NAI susceptibility testing, the majority were from EUR ($n=27$), followed by WPR ($n=8$), AMR ($n=5$), AFR ($n=3$), EMR ($n=3$) and SEAR ($n=1$). The participation pattern reflected development in global testing capacity and continuous EQAP support would be beneficial, especially to laboratories recently initiating NAI susceptibility testing. ■

négatif pour V09-2016, résultat qui a été considéré comme correct. Toutefois, l'inclusion systématique d'un test de détection de la grippe A dans l'algorithme d'essai est recommandée pour préserver la capacité des laboratoires à détecter les sous-types viraux A émergents ou de circulation moins fréquente. D'autre part, le nombre de laboratoires ayant effectué un test de sous-typage H9 (52/151, 34,4%) était bien inférieur au nombre de laboratoires qui avaient réalisé un sous-typage des virus A(H7) dans la série 14 (136/153, 88,9%). Compte tenu de la circulation persistante des virus grippaux A(H9) et de leur potentiel pandémique, les laboratoires sont encouragés à examiner et adapter régulièrement leurs essais de sous-typage.

Le taux de faux positifs est tombé à 0,7% (1/151) dans la série 15, contre 2,0% (3/153) dans la série 14. Cependant, des échanges présumés d'échantillons ($n=3$) et des erreurs de transcription ($n=1$) ont été constatés, soulignant l'importance des bonnes pratiques de laboratoire.

L'analyse génotypique et phénotypique de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase a de nouveau été incluse à titre facultatif dans la série 15. Dans l'ensemble, la proportion de laboratoires transmettant des résultats d'analyse dans les délais fixés a augmenté, passant de 38/153 (24,8%) dans la série 14 à 47/151 (31,1%) dans la série 15, et peu de laboratoires ont fait état de problèmes de disponibilité des réactifs durant la période d'analyse. Les échantillons soumis étaient un échantillon de virus A(H1N1)pdm09 présentant une substitution H275Y sur le gène NA et associé à une forte réduction de l'inhibition par l'oseltamivir (NAI01-2016) et un échantillon de virus A(H1N1)pdm09 de type sauvage (NAI02-2016). De manière générale, les performances des tests génotypiques ont été bonnes, des résultats corrects ayant été obtenus par l'ensemble des 43 laboratoires participants, à une exception près (potentiellement due à un échange d'échantillons). L'un des laboratoires, qui a indiqué avoir procédé par séquençage massivement parallèle, n'a pas fourni de résultat de génotypage pour l'échantillon NAI02-2016, peut-être en raison d'une sensibilité insuffisante de l'épreuve.

Pour le test phénotypique, les 28 laboratoires participants ont tous transmis des résultats corrects. Tous les laboratoires participants ont observé un écart d'un facteur supérieur à 100 des valeurs d'inhibition de la neuraminidase entre les 2 échantillons. Ce résultat est compatible avec les critères établis par l'OMS pour un échantillon NAI01-2016 associé à une forte réduction de l'inhibition par l'oseltamivir. L'un des laboratoires participants, qui transmettait pour la première fois des résultats d'analyse de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase, a signalé une «inhibition réduite» par l'oseltamivir pour NAI01-2016, mais n'a pas indiqué quel critère d'interprétation avait été adopté. Les 22 laboratoires ayant effectué une analyse sur le zanamivir ont tous transmis des résultats corrects, indiquant une inhibition normale pour les 2 échantillons.

Les 47 laboratoires ayant participé aux essais de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase se trouvaient en majorité dans la Région européenne ($n=27$), suivie de la Région du Pacifique occidental ($n=8$), de la Région des Amériques ($n=5$), de la Région africaine ($n=3$), de la Région de la Méditerranée orientale ($n=3$) et de la Région de l'Asie du Sud-Est ($n=1$). Le profil de participation à ces essais reflète l'évolution des capacités d'analyse dans le monde et il serait souhaitable que l'EQAP continue de soutenir ces efforts, en particulier au profit des laboratoires ayant récemment institué des tests de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase. ■