



## Contents

- 9 Detection of influenza viruses by reverse transcription polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2017

## Sommaire

- 9 Détection des virus grippaux par la méthode de la réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse: analyse sommaire du programme d'évaluation externe de la qualité de l'OMS, 2017

## Detection of influenza viruses by reverse transcription polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2017

### Introduction

Global influenza virus surveillance has been conducted through the WHO Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) for over 60 years.<sup>1</sup> Currently there are 144 institutions in 114 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, H5 Reference Laboratories and other working groups set up to address specific emerging issues.

Due to the continuous evolution of seasonal influenza viruses causing annual epidemics worldwide, together with the pandemic potential of non-seasonal influenza A viruses, assurance of the quality and capacity of laboratory diagnostics is essential. The WHO external quality assessment programme (EQAP) for the detection of influenza viruses by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-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, considered a potential pandemic threat. The EQAP has evolved over the years, extending its scope to seasonal influenza A, influenza B and other non-seasonal influenza A viruses that could infect humans, to monitor the quality and comparability of the performance of participating laboratories. Summaries of the performance of labora-

## Détection des virus grippaux par la méthode de la réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse: analyse sommaire du programme d'évaluation externe de la qualité de l'OMS, 2017

### Introduction

Depuis plus de 60 ans, le Système mondial OMS de surveillance de la grippe et de riposte (GISRS) assure la surveillance des virus grippaux au niveau mondial.<sup>1</sup> Il existe actuellement 144 établissements reconnus par l'OMS comme centres nationaux de lutte contre la grippe, répartis dans 114 États Membres. Le réseau de laboratoires comprend également 6 centres collaborateurs de l'OMS, 4 laboratoires essentiels de réglementation, les laboratoires de référence H5 et d'autres groupes spéciaux établis pour traiter de questions spécifiques qui se font jour.

Compte tenu de la constante évolution des virus grippaux saisonniers, qui entraîne chaque année des épidémies mondiales, et du potentiel pandémique des virus grippaux non saisonniers de type A, l'assurance de la qualité et les capacités de diagnostic en laboratoire sont indispensables. Suite aux flambées épidémiques de grippe A(H5N1) survenues en Asie, le programme d'évaluation externe de la qualité (EQAP) de l'OMS pour la détection des virus grippaux par la méthode de la réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-PCR) a été lancé en 2007; ce programme a pour but d'évaluer la capacité des centres nationaux de lutte contre la grippe à détecter les virus grippaux A(H5), considérés comme une menace potentielle de pandémie. L'EQAP a par la suite évolué et son champ d'action a été élargi pour inclure les virus de la grippe A saisonnière, de la grippe B et d'autres virus de la grippe A non saisonnière susceptibles d'infecter l'homme, afin de

WORLD HEALTH  
ORGANIZATION  
Geneva

ORGANISATION MONDIALE  
DE LA SANTÉ  
Genève

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

01.2018  
ISSN 0049-8114  
Printed in Switzerland

<sup>1</sup> See [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/)

<sup>1</sup> Voir [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/)

tories from panels 1 to 15 (2007 to 2016) have been reported in the *Weekly Epidemiological Record*.<sup>2</sup>

In 2017, 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 16, which was dispatched to participating laboratories in 2017. Phenotypic/genotypic neuraminidase inhibitor (NAI) susceptibility testing for influenza A (H1N1)pdm09 viruses was also included on an optional basis.

### Preparation of panel 16

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 16

Panel 16 consisted of 10 coded samples, represented by different concentrations of influenza viruses, including influenza A (H5N1) virus of genetic clade 2.3.2.1, influenza A (H5N6) virus of genetic clade 2.3.4.4, influenza A (H1N1)pdm09 virus, influenza A (H3N2) virus, influenza A (H7N9) virus, and influenza B viruses (Victoria lineage and Yamagata lineage), together with a sample that contained no virus. Two influenza A (H1N1)pdm09 virus 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 testing the EQAP specimens was also included.

### Distribution of panel and response of participants

Invitations were sent to NICs and other national influenza laboratories before the panels were dispatched. Panel 16 was dispatched between April 2017 and June 2017 to 170 participating laboratories in 136 countries at ambient temperature by courier service as with previous panels. Participating laboratories were requested to report results within 4 weeks after the date of sample reception. Of the 170 participating laboratories which received the panel, 160 (94.1%) reported results before the closing date. The number of laboratories reporting

contrôler la qualité et la comparabilité des résultats obtenus par les laboratoires participants. Pour les séries 1 à 15 (2007 à 2016), une synthèse des résultats des laboratoires a été publiée dans les numéros correspondants du *Relevé épidémiologique hebdomadaire*.<sup>2</sup>

En 2017, 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, à Hong Kong (Région administrative spéciale de la Chine), avec l'appui des bureaux régionaux de l'OMS.

Actuellement, le programme envoie une fois par an des échantillons aux laboratoires participants à des fins d'analyse. Le présent rapport récapitule les résultats de la série 16, dont les échantillons ont été envoyés aux laboratoires en 2017. Une analyse phénotypique/génotypique de la sensibilité des virus grippaux A(H1N1)pdm09 aux inhibiteurs de la neuraminidase était également incluse à titre facultatif.

### Préparation de la série 16

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 16

La série 16 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, des virus A(H3N2), des virus A(H7N9), des virus de la grippe B (lignées Victoria et Yamagata) et un échantillon ne contenant aucun virus. Deux échantillons de virus grippal 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 cette 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 une PCR avant de procéder à l'analyse. Un questionnaire portant sur les méthodes de laboratoire et les cibles géniques utilisées pour l'analyse des échantillons de l'EQAP était également inclus.

### Distribution de la série d'échantillons et réponse des laboratoires 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 2017, les échantillons de la série 16 ont été envoyés à 170 laboratoires participants dans 136 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 170 laboratoires participants ayant reçu les échantillons, 160 (94,1%) ont communiqué

<sup>2</sup> See [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/external\\_quality\\_assessment\\_project/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/external_quality_assessment_project/en/)

<sup>2</sup> Voir [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/external\\_quality\\_assessment\\_project/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/external_quality_assessment_project/en/)

Table 1a **Panel composition and results of panel 16 (2017) of the external quality assessment programme**  
 Tableau 1a **Composition et résultats de la série 16 (2017) du programme d'évaluation externe de la qualité de l'OMS**

Influenza viruses – Virus grippaux	Virus (clade) <sup>a</sup> – Virus (clade) <sup>a</sup>	Sample number – Numéro de l'échantillon	Copies/μl <sup>b</sup> – Copies/μl <sup>b</sup>	No. (%) of laboratories correctly identifying sample (n=160) – Nombre (%) de laboratoires ayant correcte- ment identifié l'échantillon (n=160)
A (H5N1)	A/Hong Kong/6841/2010 (2.3.2.1)	V03-2017	1.00 x 10 <sup>2</sup>	158 (98.8)
A (H5N1)	Same virus as V03-2017 – <i>Même virus que V03-2017</i>	V05-2017	5.83 x 10 <sup>2</sup>	158 (98.8)
A (H5N6)	A/Chicken/Hong Kong/16-02206-5/2016 (2.3.4.4)	V01-2017	3.48 x 10 <sup>2</sup>	155 (96.9)
A (H5N6)	Same virus as V01-2017 – <i>Même virus que V01-2017</i>	V09-2017	4.92 x 10 <sup>1</sup>	151 (94.4)
A (H7N9)	A/Hong Kong/793/2016	V06-2017	1.22 x 10 <sup>2</sup>	155 (96.9)
A (H1N1)pdm09	A/Michigan/45/2015-like virus – <i>Analogue à A/Michigan/45/2015</i>	V02-2017	8.87 x 10 <sup>2</sup>	159 (99.4)
A (H3N2)	A/Hong Kong/4801/2014-like virus – <i>Analogue à A/Hong Kong/4801/2014</i>	V07-2017	5.25 x 10 <sup>2</sup>	158 (98.8)
B	B/Brisbane/60/2008-like virus (Victoria lineage) – <i>Analogue à B/Brisbane/60/2008 (lignée Victoria)</i>	V04-2017	5.30 x 10 <sup>1</sup>	158 (98.8)
B	B/Phuket/3073/2013-like virus (Yamagata lineage) – <i>Analogue à B/Phuket/3073/2013 (lignée Yamagata)</i>	V08-2017	1.55 x 10 <sup>1</sup>	155 (96.9)
Negative – <i>Négatif</i>	NA – <i>SO</i>	V10-2017	NA – <i>SO</i>	157 (98.1)

<sup>a</sup> 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/h5n1_nomenclature/en/); [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/h5\\_nomenclature\\_clade2344/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/h5n1_nomenclature/en/); [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/h5\\_nomenclature\\_clade2344/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/h5_nomenclature_clade2344/en/).

<sup>b</sup> 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. – Numéro de l'échantillon	Amino acid substitution <sup>a</sup> (Nucleotide change detected) – <i>Substitution d'acides aminés<sup>a</sup> (modification nucléotidique détectée)</i>	Oseltamivir	Zanamivir	No. of participants with correct results – <i>Nbre de laboratoires obtenant des résultats corrects</i>	
				Genotypic – Génotypique	Phenotypic – Phénotypique
NAI01-2017	H275Y (C823T)	(Highly) reduced inhibition – <i>Inhibition (fortement) réduite</i>	Normal inhibition – <i>Inhibition normale</i>	50/53	34/34
NAI02-2017	H275Y (C823T)	(Highly) reduced inhibition – <i>Inhibition (fortement) réduite</i>	Normal inhibition – <i>Inhibition normale</i>	51/52	33/34

<sup>a</sup> Residue position in N1 neuraminidase numbering. – *Position du résidu dans la numérotation N1 de la neuraminidase.*

results from the 6 WHO regions on time for analysis in panel 16 was as follows: African Region (AFR), n=24; Region of the Americas (AMR), n=26; Eastern Mediterranean Region (EMR), n=16; European Region (EUR), n=61; South-East Asia Region (SEAR), n=8 and Western Pacific Region (WPR), n=25.

### Methods of detection

Various polymerase chain reaction (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

leurs résultats avant la date butoir. Pour chacune des 6 Régions de l'OMS, le nombre de laboratoires ayant transmis les résultats de la série 16 à temps pour l'analyse était le suivant: Région africaine, n=24; Région des Amériques, n=26; Région de la Méditerranée orientale, n=16; Région européenne, n=61; Région de l'Asie du Sud-Est, n=8; et Région du Pacifique occidentale, n=25.

### Méthodes de détection

Comme pour les séries précédentes, les laboratoires participants ont employé divers protocoles de réaction en chaîne par polymérase (PCR) et différentes stratégies d'analyse pour détecter les virus grippaux de types A et B et sous-typé les virus A. Plus de la moitié des laboratoires ont utilisé les protocoles des *Centers for Disease*

protocols from the United States Centers for Disease Control and Prevention. Use of different PCR protocols did not apparently affect 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 160 laboratories were included in the analysis. Based on the same assessment criteria for panels 1–15,<sup>2</sup> 139 of the 160 (86.9%) participating laboratories returned correct results for all 10 samples, and 149 (93.1%) 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 (V03-2017 and V05-2017, in different concentrations). The rates of correct detection of both samples were identical, 158/160 (98.8%). The second was an avian influenza A (H5N6) virus of clade 2.3.4.4 (V01-2017 and V09-2017, in different concentrations). The rates of correct detection were 155/160 (96.9%) and 151/160 (94.4%) respectively.

The rate of correct detection for the influenza A (H7N9) sample (V06-2017) was 155/160 (96.9%). The sample was correctly reported as influenza A (H7) (n=128), influenza A (H7N9) (n=15), and influenza A untypeable (n=11) for participants who did not perform H7 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, which did not include H7-specific testing.

For the influenza A (H1N1)pdm09 sample, the rate of correct detection for V02-2017 was 159/160 (99.4%), while that for the influenza A (H3N2) sample (V07-2017) was 158/160 (98.8%). As for the influenza B virus samples, correct results for the Victoria (V04-2017) and Yamagata (V08-2017) lineage samples were 158/160 (98.8%) and 155/160 (96.9%) respectively.

Three participating laboratories reported a positive result for the negative sample (V10-2017), with a false-positive rate of 1.9% (Table 1a).

In this panel, 21/160 (13.1%) participants reported incorrect results. Altogether, 12/160 (7.5%) participants returned one incorrect result and 9/160 (5.6%) returned more than one incorrect result (Table 2). Performance of participating NICs in different WHO regions are presented in Table 3. Details are presented in Table 4.

### Phenotypic/genotypic neuraminidase inhibitor susceptibility testing

Two influenza A (H1N1)pdm09 virus samples with highly reduced neuraminidase inhibition by oseltamivir, namely NAI01-2017 and NAI02-2017, were included for NAI susceptibility testing. Altogether 58/160 (36.3%) participants reported NAI results and the methods reported for NAI susceptibility testing are summarized in Table 5.

*Control and Prevention* des États-Unis. L'utilisation de différents protocoles de PCR ne s'est pas traduite par une variation manifeste des résultats. Les données détaillées sur les gènes cibles, les méthodes de détection et l'origine des amorces/sondes et enzymes utilisées figuraient dans le rapport récapitulatif de résultats qui a été distribué à tous les laboratoires participants.

### Résultats des laboratoires

Seuls les résultats transmis par 160 laboratoires dans les délais fixés ont été inclus dans cette analyse. Selon les mêmes critères d'évaluation que pour les séries 1 à 15,<sup>2</sup> 139 des 160 laboratoires participants (86,9%) ont fourni des résultats corrects pour l'ensemble des 10 échantillons et 149 (93,1%) 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 (échantillons V03-2017 et V05-2017, à différentes concentrations). Les taux de détection correcte de ces 2 échantillons étaient identiques et s'élevaient à 158/160 (98,8%). Le second était un virus aviaire A(H5N6) du clade 2.3.4.4 (échantillons V01-2017 et V09-2017, à différentes concentrations). Les taux de détection correcte de ces échantillons étaient de 155/160 (96,9%) et 151/160 (94,4%) respectivement.

Pour l'échantillon V06-2017 contenant le virus grippal A(H7N9), le taux de détection correcte était de 155/160 (96,9%). L'échantillon a été correctement identifié comme étant un virus A(H7) (n=128), un virus A(H7N9) (n=15) ou un virus de type A ne pouvant être typé (n=11, pour les laboratoires n'ayant pas réalisé d'analyse H7). 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 sous-typages spécifiques du virus de la grippe A, n'incluant pas le sous-type H7.

Pour les virus grippaux A(H1N1)pdm09 et A(H3N2), les taux de détection correcte des échantillons V02-2017 et V07-2017, respectivement, étaient de 159/160 (99,4%) et de 158/160 (98,8%), respectivement. Pour le virus grippal B, les résultats corrects obtenus pour les échantillons contenant la lignée Victoria (V04-2017) et Yamagata (V08-2017) étaient de 158/160 (98,8%) et de 155/160 (96,9%), respectivement.

Trois laboratoires participants ont notifié un résultat positif pour l'échantillon négatif (V10-2017), soit un taux de faux positifs de 1,9% (Tableau 1a).

Dans cette série, 21 des 160 laboratoires participants (13,1%) ont fourni des résultats incorrects. Globalement, 12 des 160 laboratoires participants (7,5%) ont obtenu un seul résultat incorrect et 9 (5,6%) en ont obtenu plusieurs (Tableau 2). Les résultats des centres nationaux de lutte contre la grippe participants dans les différentes Régions de l'OMS sont présentés dans le Tableau 3. Ces résultats sont détaillés dans le Tableau 4.

### Test phénotypique/génotypique de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase

Deux échantillons de virus A(H1N1)pdm09 associés à une forte réduction de l'inhibition de la neuraminidase par l'oseltamivir, NAI01-2017 et NAI02-2017, ont été inclus dans la série aux fins des tests de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase. En tout, 58 des 160 laboratoires participants (36,3%) ont transmis des résultats sur la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase dont les méthodes de test sont résumées dans le Tableau 5.

Table 2 **Performance of participating laboratories in the external quality assessment programme, panel 16 (2017)**Tableau 2 **Résultats des laboratoires participant au programme d'évaluation externe de la qualité, série 16 (2017)**

Number of correct samples – Nombre d'échantillons corrects	No. (%) of laboratories (n=160) – Nombre (%) de laboratoires (n=160)
10	139 (86.9)
9	12 (7.5)
6–8	8 (5.0)
<6	1 (0.6)

Table 3 **Performance of participating National Influenza Centres (NICs) in the WHO Regions, panel 16 (2017)**Tableau 3 **Résultats des centres nationaux de lutte contre la grippe dans les Régions de l'OMS, série 16 (2017)**

WHO Region – Région OMS	No. of NICs with reported results – Nombre de centres nationaux ayant soumis des résultats	No. (%) of NICs with all correct results – Nombre de centres nationaux obtenant des résultats
African – Afrique	13	11 (84.6)
Americas – Amériques	19	16 (84.2)
Eastern Mediterranean – Méditerranée orientale	14	14 (100.0)
European – Europe	46	41 (89.1)
South-East Asia – Asie du Sud-Est	7	7 (100.0)
Western Pacific – Pacifique occidental	19	16 (84.2)

Table 4 **Details of incorrect results reported by participating laboratories in the external quality assessment programme, panel 16 (2017)**Tableau 4 **Détails des résultats incorrects rendus par les laboratoires participant au programme d'évaluation externe de la qualité, série 16 (2017)**

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		
V01-2017 /clade 2.3.4.4	1		3	0	1	5	
V03-2017 /clade 2.3.2.1	1		1	0	0	2	
V05-2017 /clade 2.3.2.1	1		1	0	0	2	
V09-2017 /clade 2.3.4.4	1		6	1	1	9	
Non-influenza A (H5) – Virus grippaux non A(H5)	A(H1)pdm09	A(H3)	A(H5)	A untypeable <sup>a</sup> – A ne pouvant être typé <sup>a</sup>	B	Negative – Négatif	Total
V02-2017/ A (H1)pdm09	NA – SO	0	0	1	0	0	1
V04-2017/ B Victoria	0	0	0	0	1 Yamagata	1	2
V06-2017/ A (H7)	1	1	1	1	0	1	5
V07-2017/ A (H3)	1	NA – SO	0	0	0	1	2
V08-2017/ B Yamagata	0	0	0	0	NA – SO	5	5
V10-2017/ Negative	0	0	0	2	1	0	3

<sup>a</sup> 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.

Table 5 **Methods reported for neuraminidase inhibitor susceptibility testing**  
 Tableau 5 **Méthodes utilisées pour le test de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase**

Test – Test	Number of laboratories participating in the external quality assessment programme – Nombre de laboratoires participant au programme d'évaluation externe de la qualité		
	One method – Une méthode	Both methods – Les deux méthodes	Total
Genotypic – Génotypique	24	29	53
Phenotypic – Phénotypique	5	29	34

For genotypic testing, 50/53 (94.3%) and 51/52 (98.1%) participants correctly reported NAI01-2017 and NAI02-2017 respectively as influenza A(H1)pdm09 with the H275Y amino acid substitution (C823T nucleotide change), with the interpretation of (highly) reduced inhibition by oseltamivir (*Table 1b*). One participant only returned results for the first but not the second sample, and indicated insufficient reagents for testing. Seven participants also reported (highly) reduced inhibition by peramivir. One participant incorrectly reported normal inhibition by oseltamivir with no mutation detected for both samples. For NAI01-2017, one participant incorrectly reported the sample to have an additional S247N amino acid substitution by Sanger sequencing and interpreted the sample as having reduced inhibition to both oseltamivir and zanamivir. Another participant reporting reduced inhibition by oseltamivir and indicating a mixture of wild type and mutant virus based on Sanger sequencing was considered to be incorrect.

Among the 53 participants, various methods were used, including allelic discrimination by real-time RT-PCR (26, 49.1%), Sanger sequencing (25, 47.2%), pyrosequencing (8, 15.1%) and massive parallel sequencing (1, 1.9%). Seven participants used Sanger sequencing together with either pyrosequencing or allelic discrimination by real-time RT-PCR.

For phenotypic testing, all the 34 participants reported correct results for NAI01-2017 as showing highly reduced inhibition (n=32) or reduced inhibition (n=2) by oseltamivir. For NAI02-2017, 33 participants reported correct results as highly reduced inhibition (n=32) or reduced inhibition (n=1) by oseltamivir. One participant incorrectly reported normal inhibition for the sample. Of the 34 participants, 30 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=5) and fluorescence-based MUNANA assay (n=29). IC50 values obtained by both methods are summarized in *Table 6*.

## 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 81.3% and 89.4% respectively, compared to 86.9% and 93.1% in panel 16.

Pour le test génotypique, 50/53 (94,3%) et 51/52 (98,1%) laboratoires participants ont correctement identifié le virus grippal A(H1)pdm09 avec la substitution d'acide aminé H275Y (modification nucléotidique C823T) dans les échantillons NAI01-2017 et NAI02-2017, respectivement, et conclu à une (forte) réduction de l'inhibition par l'oseltamivir (*Tableau 1b*). Un laboratoire participant a envoyé des résultats uniquement pour le premier échantillon et indiqué qu'il manquait de réactifs pour réaliser les tests. Sept laboratoires participants ont également indiqué une (forte) réduction de l'inhibition par le peramivir. Un laboratoire participant a obtenu des résultats incorrects montrant une inhibition normale par l'oseltamivir et aucune mutation détectée dans les deux échantillons. Pour NAI01-2017, un laboratoire participant a transmis des résultats incorrects indiquant une substitution d'acide aminé supplémentaire S247N par séquençage Sanger et une réduction de l'inhibition à la fois par l'oseltamivir et le zanamivir. Un autre laboratoire participant signalant une réduction de l'inhibition par l'oseltamivir et un mélange de virus de type sauvage et mutant, par séquençage Sanger, a été considéré comme ayant obtenu des résultats incorrects.

Ces 53 laboratoires participants ont eu recours à diverses méthodes: 26 d'entre eux (49,1%) ont utilisé la discrimination allélique par RT-PCR en temps réel, 25 (47,2%) le séquençage Sanger, 8 (15,1%) le pyroséquençage et 1 (1,9%) le séquençage massivement parallèle. Sept d'entre eux ont employé le séquençage Sanger couplé au pyroséquençage ou à la discrimination allélique par RT-PCR en temps réel.

Pour le test phénotypique, les 34 laboratoires participants ont tous transmis des résultats corrects pour NAI01-2017 montrant une forte réduction de l'inhibition (n=32) ou une réduction de l'inhibition (n=2) par l'oseltamivir. Pour NAI02-2017, 33 laboratoires participants ont transmis des résultats corrects indiquant une forte réduction de l'inhibition (n=32) ou une réduction de l'inhibition (n=1) par l'oseltamivir. Un laboratoire participant a obtenu des résultats incorrects montrant une inhibition normale pour cet échantillon. Sur les 34 laboratoires participants, 30 ont également communiqué des résultats avec le zanamivir, tous corrects. Deux méthodes principales ont été utilisées pour l'analyse phénotypique: l'épreuve par chimiluminescence avec substrat NA-Star / NA-XTD (n=5) et le test fluorimétrique avec substrat MUNANA (n=29). Le *Tableau 6* fournit un récapitulatif des valeurs de CI50 obtenues par ces 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 pour tous les échantillons et pour les échantillons de virus grippaux A(H5) s'élevait précédemment à 81,3% et 89,4%, respectivement, contre 86,9% et 93,1% pour cette série 16.

Table 6 **IC50 values obtained by phenotypic neuraminidase inhibitor susceptibility testing**  
 Tableau 6 **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	NAI01-2017		NAI02-2017	
				IC50 values (nM) – Valeurs de CI50 (nM)			
				Median – Médiane	Range – Intervalle	Median – Médiane	Range – Intervalle
Oseltamivir	Chemiluminescence-based – Par chimiluminescence	NA-Star/NA-XTD	5	63.79	28.40–127.30	96.90	45.60–120.07
	Fluorescence-based – Fluorimétrie	MUNANA	29	204.20	98.78–560.00	199.63	105.29*–700.00
Zanamivir	Chemiluminescence-based – Par chimiluminescence	NA-Star/NA-XTD	3	0.70	0.60–0.81	0.70	0.40–1.15
	Fluorescence-based – Fluorimétrie	MUNANA	27	0.37	0–1.42	0.36	0–1.40

\* The IC50 result with incorrect result as normal inhibition (2.55 nM) was excluded. – La CI50 avec un résultat incorrect, inhibition normale (2,55 nM), a été exclue.

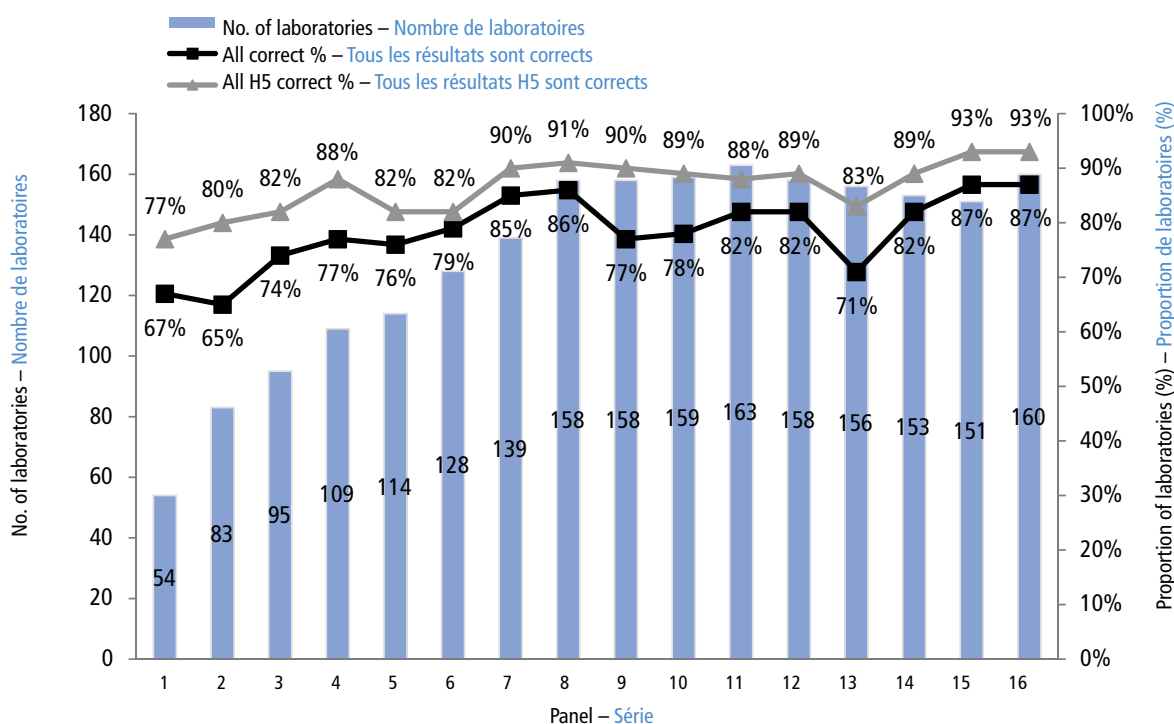
The subtyping performance for samples of both influenza A (H5N1) and influenza A (H5N6) was good. The combined correct rate for genetic clade 2.3.2.1 (316/320 = 98.8%) was slightly higher than that for genetic clade 2.3.4.4 (306/320 = 95.6%) in this panel. Of note, 5 participants using the same protocol could not provide the subtype of either or both samples of genetic clade 2.3.4.4. On the other hand, one participant did not report performance of H5 subtyping test, against the eligibility criterion for participation in this EQAP.

An influenza A (H7N9) sample was also included to challenge participants' ability in detecting other non-seasonal

De bons résultats ont été obtenus dans cette série pour le sous-typage des virus grippaux A(H5N1) et A(H5N6); le taux combiné de détection correcte pour le clade génétique 2.3.2.1 (316/320 = 98,8%) était légèrement supérieur à celui obtenu pour le clade génétique 2.3.4.4 (306/320 = 95,6%). Il est à noter que 5 laboratoires participants utilisant le même protocole n'ont pas pu sous-typé un des échantillons du clade génétique 2.3.4.4 ou les deux. Par ailleurs, un laboratoire participant n'a pas transmis de résultats pour le test de sous-typage des virus H5, bien que les critères à remplir pour participer à cet EQAP le prévoyaient.

Un échantillon de virus grippaux A(H7N9) a également été inclus pour évaluer la capacité des laboratoires participants à détecter

Figure 1 **Performance of laboratories participating in the external quality assessment programme, panels 1–16 (2007–2017)**  
 Figure 1 **Performance des laboratoires participant au programme d'évaluation externe de la qualité, séries 1-16 (2007-2017)**



influenza A viruses. The correct rate of detection increased from 92.2% (141/153) in panel 14 to 96.9% (155/160) in this panel. The number of participants performing H7 subtyping test has also increased from 136/153 (88.9%) to 146/160 (91.3%) in this panel. This reflects enhanced capacity for detection of influenza A(H7), which has continued to be associated with human infections.

For seasonal influenza A(H1)pdm09, A(H3) and influenza B, the performance was good, with over 96.9% participants reporting correct results for each of these samples. For influenza B, participants reporting lineage information has increased from 60.3% in panel 15 to 67.5% in this panel. The false positive rate remained low at 1.9% (3/160) in this panel compared to 0.7% (1/151) in panel 15. All these results signified improvement in the overall diagnostic capacity in participating laboratories.

In panel 16, phenotypic and genotypic NAI susceptibility testing continued to be included on an optional basis. The number of laboratories requesting samples for NAI susceptibility testing slightly increased from 74 in panel 15 to 76 in panel 16. A few laboratories, citing different reasons including insufficient reagents and problems with testing capacity, did not return results. Overall, the on-time return rate for analysis increased to 58/160 (36.3%) in this panel from 47/151 (31.1%) in panel 15. The majority of the participants were from EUR (n=31), followed by WPR (n=11), AMR (n=8), EMR (n=4), AFR (n=2) and SEAR (n=2).

Performance in both genotypic and phenotypic testing was generally good. It is noted that 2 participants performing phenotypic testing reported IC50 values between 166.17 nM and 663.23 nM for oseltamivir, but provided the interpretation as “reduced inhibition”, against the terminology of “highly reduced inhibition”. Laboratories are suggested to refer to reporting criteria established by the Influenza Antiviral Working Group.<sup>3</sup>

### Prospect for future panels

For influenza A detection and subtyping, laboratories are expected to perform influenza A detection test for all EQAP samples, and to rule out non-seasonal influenza A viruses by performing subtyping tests for H1pdm09 and H3. Identification of any non-seasonal influenza A virus from clinical specimens should prompt timely further investigation of possible zoonotic influenza A infection.

As regards NAI susceptibility testing, this component will be enhanced and formalized in the coming panel with considerations on the following: 1) increase in number of samples in each panel; 2) inclusion of additional influenza types, e.g. influenza A(H3) and B with corresponding mutations; 3) implementation of scoring and 4) provision of certificate of completion. ■

d'autres virus grippaux A non saisonniers. Le taux de détection correcte a augmenté, passant de 92,2% (141/153) dans la série 14 à 96,9% (155/160) dans cette série. Le nombre de laboratoires participants effectuant un sous-typage des virus H7 a également progressé, passant de 136/153 (88,9%) à 146/160 (91,3%) dans cette série. Cela reflète une meilleure capacité à détecter les virus grippaux A(H7) qui continuent d'être associés aux infections humaines.

Les résultats étaient satisfaisants pour les virus grippaux saisonniers A(H1)pdm09, A(H3) et B, avec plus de 96,9% de laboratoires participants présentant des résultats corrects pour chacun de ces échantillons. Pour les virus grippaux B, le nombre de laboratoires participants ayant transmis des informations sur les lignées a progressé, passant de 60,3% dans la série 15 à 67,5% dans cette série. Le taux de faux positifs reste faible à 1,9% (3/160) dans cette série contre 0,7% (1/151) dans la série 15. Tous ces résultats montrent une amélioration de la capacité de diagnostic globale des laboratoires participants.

L'analyse génotypique et phénotypique de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase a de nouveau été incluse à titre facultatif dans la série 16. Le nombre de laboratoires demandant des échantillons pour tester la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase a légèrement augmenté, passant de 74 dans la série 15 à 76 dans la série 16. Quelques laboratoires n'ont pas transmis de résultats pour différentes raisons, notamment le manque de réactifs ou des problèmes de capacités d'analyse. Globalement, la proportion de laboratoires transmettant des résultats d'analyse dans les délais fixés a progressé, passant de 47/151 (31,1%) dans la série 15 à 58/160 (36,3%) dans cette série. La majorité des laboratoires participants provenaient de la Région européenne (n=31), suivie de la Région du Pacifique occidental (n=11), de la Région des Amériques (n=8), de la Région de la Méditerranée orientale (n=4), de la Région africaine (n=2) et de la Région de l'Asie du Sud-Est (n=2).

De manière générale, les résultats des épreuves génotypiques et phénotypiques étaient bons. On note que 2 laboratoires participants ayant effectué des tests phénotypiques ont notifié des valeurs de CI50 comprises entre 166,17 nM et 663,23 nM pour l'oseltamivir, mais interprété ces données comme une «inhibition réduite» au lieu d'utiliser le terme «inhibition fortement réduite». Ainsi, il est suggéré aux laboratoires de se référer aux critères de notification établis par le groupe de travail sur les antiviraux contre la grippe.<sup>3</sup>

### Perspectives pour les séries futures

Pour la détection et le sous-typage des virus grippaux A, on attend des laboratoires qu'ils effectuent un test de détection de la grippe A sur tous les échantillons de l'EQAP et qu'ils écartent les virus de la grippe A non saisonnière en effectuant un sous-typage des virus H1pdm09 et H3. L'identification de virus grippaux A non saisonniers dans des échantillons cliniques doit amener à rechercher sans délai une éventuelle infection par la grippe A zoonotique.

Concernant les tests de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase, cette composante sera développée et formalisée dans la série à venir, notamment par: 1) l'augmentation du nombre d'échantillons dans chaque série; 2) l'inclusion d'autres types de virus grippaux, par exemple A(H3) et B avec les mutations correspondantes; 3) l'attribution d'un score, et 4) la remise d'un certificat de participation. ■

<sup>3</sup> See No. 39, 2012, pp. 369–374.

<sup>3</sup> Voir N° 39, 2012, pp. 369-374.