



Contents

- 477 Widespread transmission of circulating vaccine-derived poliovirus identified by environmental surveillance and immunization response, Horn of Africa, 2017–2018
- 480 Isolation and identification of human influenza viruses in cell culture: summary analysis of the WHO external quality assessment programme for National Influenza Centres in the WHO regions of the Americas, Africa and Eastern Mediterranean, 2017

Sommaire

- 477 Vaste transmission de poliovirus circulants dérivés d'une souche vaccinale identifiée par la surveillance environnementale et riposte par la vaccination dans la Corne de l'Afrique, 2017-2018
- 480 Isolement et identification de virus grippaux humains en culture cellulaire: analyse sommaire du programme d'évaluation externe de la qualité de l'OMS pour les Centres nationaux de la grippe dans les régions OMS des Amériques, de l'Afrique et de la Méditerranée orientale, 2017

WORLD HEALTH
ORGANIZATION
Geneva

ORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉ
Genève

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

09.2018
ISSN 0049-8114
Printed in Switzerland

Widespread transmission of circulating vaccine-derived poliovirus identified by environmental surveillance and immunization response, Horn of Africa, 2017–2018

Victor A. Eboh,^a Jeevan K. Makam,^a Rohit A. Chitale,^a Chukwuma Mbaeyi,^a Jaume Jorba,^b Derek Ehrhardt,^a Elias Durry,^a Tracie Gardner,^c Kamil Mohamed,^d Christopher Kamugisha,^e Peter Borus^f and Eltayeb Ahmed Elsayed^g

After declaration of the eradication of wild poliovirus type 2 in 2015, all countries that were using oral poliovirus vaccine (OPV) switched from trivalent OPV (tOPV) (containing types 1, 2 and 3) to bivalent OPV (bOPV) (containing types 1 and 3) in April 2016.¹ Vaccine-derived polioviruses (VDPVs) – strains that have diverged from the live vaccine virus during prolonged circulation – can sometimes emerge in areas with inadequate OPV coverage and can cause outbreaks of paralysis. Before the global switch from tOPV to bOPV, many outbreaks associated with circulating VDPV (cVDPV) identified globally were caused by type 2 cVDPV (cVDPV2). After the switch, 2 large cVDPV2 outbreaks occurred in 2017, one in the Democratic Republic of the Congo (which continues in 2018) and one in the Syrian Arab Republic.^{2,3}

Ethiopia, Kenya and Somalia comprise much of the Horn of Africa. Performance indicators for acute flaccid paralysis (AFP) surveillance, an indicator of the sensitivity of surveillance for detecting a case of polio, indicate some subnational gaps in these countries, including areas of Somalia that are inaccessible for polio vaccination

Vaste transmission de poliovirus circulants dérivés d'une souche vaccinale identifiée par la surveillance environnementale et riposte par la vaccination dans la Corne de l'Afrique, 2017-2018

Victor A. Eboh,^a Jeevan K. Makam,^a Rohit A. Chitale,^a Chukwuma Mbaeyi,^a Jaume Jorba,^b Derek Ehrhardt,^a Elias Durry,^a Tracie Gardner,^c Kamil Mohamed,^d Christopher Kamugisha,^e Peter Borus^f et Eltayeb Ahmed Elsayed^g

Après que le poliovirus sauvage de type 2 a été déclaré éradiqué en 2015, tous les pays qui utilisaient le vaccin antipoliomyélitique oral (VPO) sont passés du VPO trivalent (VPOt, contenant les virus vaccinaux de types 1, 2 et 3) au VPO bivalent (VPOb, contenant les types 1 et 3) en avril 2016.¹ Les poliovirus dérivés d'une souche vaccinale (PVDV) – qui se sont écartés du virus vaccinal vivant au cours d'une circulation prolongée – peuvent parfois émerger dans des zones où la couverture vaccinale par le VPO est insuffisante, et provoquer des flambées de paralysie. Avant le passage au niveau mondial du VPOt au VPOb, de nombreuses flambées associées aux PVDV circulants (PVDVc) recensées dans le monde étaient causées par des PVDVc de sérotype 2 (PVDVc2). Après le remplacement du VPOt par le VPOb, 2 importantes flambées de PVDVc2 ont eu lieu en 2017, l'une en République démocratique du Congo (qui se poursuit en 2018), l'autre en République arabe syrienne.^{2,3}

L'Éthiopie, le Kenya et la Somalie composent la majeure partie de la Corne de l'Afrique. Les indicateurs de performance pour la surveillance de la paralysie flasque aiguë (PFA), qui témoignent de la sensibilité de la surveillance pour la détection des cas de poliomyélite, montrent des lacunes au niveau infranational dans ces pays, notamment dans les zones de

¹ See No. 31, 2016, pp. 365–380.

² See No. 15, 2018, pp. 185–194.

³ See No. 19, 2018, pp. 241–248.

¹ Voir N° 31, 2016, pp. 365-380.

² Voir N° 15, 2018, pp. 185-194.

³ Voir N° 19, 2018, pp. 241-248.

activities.^{4,5} To supplement AFP surveillance, 16 environmental poliovirus surveillance (sewage sampling) sites have been established (*Map 1*).

Decades of civil unrest and protracted conflict in Somalia have weakened the country's governance and health care infrastructure, and routine vaccination coverage is low (<50%). Several areas of Somalia are controlled by anti-Government elements that ban vaccination services, leaving approximately 500 000 children aged <5 years unvaccinated.^{4,5} Furthermore, over 2 million Somalis are internally displaced or live as refugees in neighbouring countries.

In October 2017, a VDPV2 isolate was detected from a sewage sample collected from 1 of 4 environmental surveillance sites in Banadir, Somalia. The isolate differed by 38 nucleotides in the VP1 coding region from the parental Sabin 2 strain, indicating undetected circulation for >3 years. Genetically related VDPV2 isolates were detected in November 2017 in a sewage sample from the same site. Subsequent detection of genetically related VDPV2 isolates from sewage samples collected in January 2018 from a second site in Banadir confirmed cVDPV2 transmission.

Two vaccination response campaigns with monovalent OPV type 2 (mOPV2) were conducted, in December 2017 and January 2018, targeting children aged <5 years in Banadir and the neighbouring provinces of Middle Shabelle and Lower Shabelle (*Map 1*); no vaccination was possible in inaccessible areas in these provinces. After detection of a genetically related VDPV2 isolate from a sewage sample collected in February 2018 from a third site in Banadir, a third mOPV2 vaccination campaign was conducted in the same provinces in early May 2018. VDPV2 was not been detected at the fourth sampling site in Banadir.

In March 2018, a VDPV2 isolate that differed by 47 nucleotides from the parental Sabin 2 strain was detected in a sewage sample collected in Kamukunji, Nairobi County, in neighbouring Kenya. The isolate was genetically linked to the cVDPV2 isolates detected in Banadir (18–25 nucleotide differences), indicating independent circulation of the Banadir and Nairobi VDPV2 lineages for >1 year. VDPV2 has not been detected in samples collected from the other 3 environmental surveillance sites in Nairobi or from sites in other cities in Kenya, although sample collection was irregular. VDPV2 has not been detected in samples from any of the 3 environmental surveillance sites in Ethiopia. A limited mOPV2 response vaccination campaign was conducted in Nairobi in May 2018, and 2 synchronized mOPV2 rounds are scheduled for July and August 2018 in southern and central Somalia, eastern Kenya (including Nairobi) and eastern Ethiopia.

In April 2018, cVDPV type 3 (cVDPV3) isolates (15–17 nucleotide differences from parental Sabin 3 strain) were detected in environmental samples from 2 sites in Banadir province. In May 2018, cVDPV3 related

Somalie où l'accès en vue des activités de vaccination antipoliomyélitique est impossible.^{4,5} Pour compléter la surveillance de la PFA, 16 sites de surveillance environnementale (échantillonnage des eaux usées) ont été établis (*Map 1*).

Des décennies de troubles civils et de conflits prolongés en Somalie ont affaibli la gouvernance nationale et l'infrastructure de soins, et la couverture de la vaccination systématique est faible (<50%). Plusieurs zones de Somalie sont sous le contrôle d'éléments hostiles au gouvernement qui interdisent la vaccination, près de 500 000 enfants âgés <5 ans se trouvant ainsi privés de vaccination.^{4,5} En outre, plus de 2 millions de Somaliens sont déplacés à l'intérieur de leur propre pays ou sont réfugiés dans les pays voisins.

En octobre 2017, un PVDVc2 a été isolé dans un échantillon d'eaux usées prélevé sur l'un des 4 sites de surveillance environnementale de Banadir, en Somalie. Cet isolat se distinguait de la souche Sabin parentale de sérotype 2 par 38 nucléotides de la région codant pour la protéine VP1, indiquant une circulation non détectée depuis >3 ans. Des PVDV2 génétiquement apparentés ont été isolés en novembre 2017 dans un échantillon d'eaux usées provenant du même site. La détection ultérieure de PVDV2 génétiquement apparentés, isolés à partir d'échantillons d'eaux usées prélevés en janvier 2018 sur un deuxième site à Banadir ont apporté la confirmation de la transmission de PVDVc2.

Deux campagnes de vaccination de riposte ont été menées au moyen du VPO monovalent de type 2 (VPOm2), en décembre 2017 et en janvier 2018, ciblant les enfants <5 ans à Banadir et dans les provinces voisines du Moyen et du Bas Shabelle (*Carte 1*); aucune vaccination n'a été possible dans les zones inaccessibles de ces provinces. Après l'isolement d'un PVDV2 génétiquement apparenté à partir d'un échantillon d'eaux usées recueilli en février 2018 sur un troisième site à Banadir, une troisième campagne de vaccination par le VPOm2 a été menée dans les mêmes provinces au début de mai 2018. Aucun PVDV2 n'a été détecté sur le quatrième site d'échantillonnage de Banadir.

En mars 2018, un PVDVc2 qui se distinguait de la souche Sabin parentale de sérotype 2 par 47 nucléotides, a été détecté dans un échantillon d'eaux usées recueilli à Kamukunji, dans le Comté de Nairobi, au Kenya voisin. L'isolat était génétiquement apparenté aux isolats de PVDVc2 détectés à Banadir (18 à 25 différences de la séquence nucléotidique), témoignant d'une circulation indépendante de celle des lignées de PVDV2 détectées à Banadir et Nairobi, pendant >1 an. Aucun PVDV2 n'a été détecté dans les échantillons recueillis à partir des 3 autres sites de surveillance environnementale à Nairobi ou de sites situés dans d'autres villes du Kenya, la collecte d'échantillons n'étant toutefois pas systématique. Le PVDV2 n'a pas non plus été détecté dans les échantillons provenant de sites de surveillance environnementale en Éthiopie. Une campagne de vaccination de riposte par le VPOm2, d'envergure limitée, a été menée à Nairobi en mai 2018, et 2 tournées de vaccination synchronisées par le VPOm2 sont prévues en juillet et en août 2018 dans le sud et le centre de la Somalie, dans l'est du Kenya (y compris Nairobi) et dans l'est de l'Éthiopie.

En avril 2018, des PVDVc de type 3 (15 à 17 différences de la séquence nucléotidique par rapport à la souche Sabin de sérotype 3) ont été isolés dans des échantillons environnementaux provenant de 2 sites de la province de Banadir. En mai 2018, un

⁴ Mbaeyi C, Kamadjeu R, Mahamud A et al. Progress toward polio eradication – Somalia, 1998–2013. *J Infect Dis.* 2014;210:S173–80.

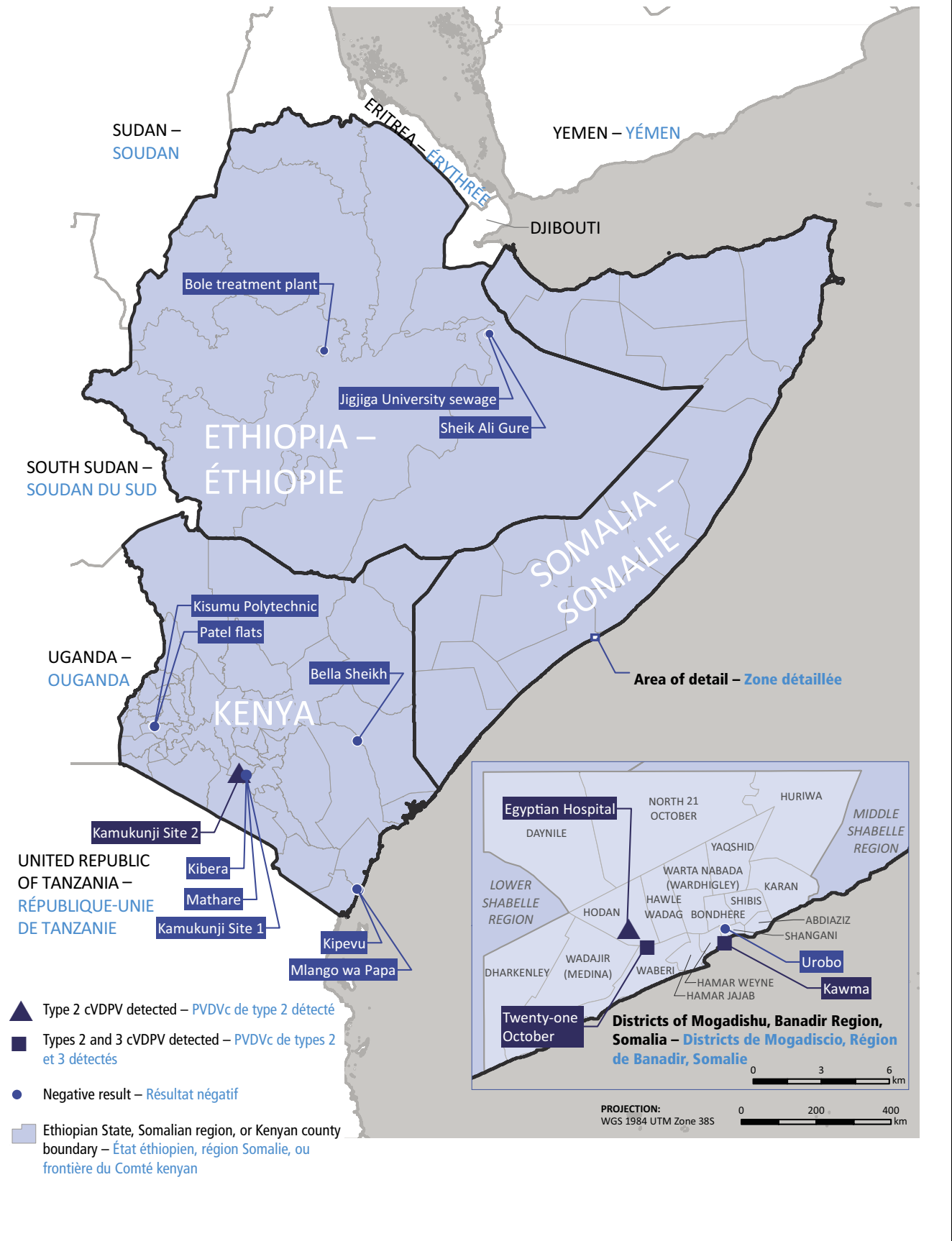
⁵ Kamadjeu R, Mahamud A, Webeck J et al. Polio outbreak investigation and response in Somalia, 2013. *J Infect Dis.* 2014;210:S181–6.

⁴ Mbaeyi C, Kamadjeu R, Mahamud A et al. Progress toward polio eradication – Somalia, 1998–2013. *J Infect Dis.* 2014;210:S173–80.

⁵ Kamadjeu R, Mahamud A, Webeck J et al. Polio outbreak investigation and response in Somalia, 2013. *J Infect Dis.* 2014;210:S181–6.

Map 1 **Environmental surveillance sites for detection of polioviruses by outcomes of tests for vaccine-derived poliovirus – Horn of Africa Region, 2017–2018 (as of 7 June 2018)**

Carte 1 **Sites de surveillance environnementale pour la détection des poliovirus et résultats des tests pour les poliovirus dérivés de souches vaccinales – Région de la Corne de l’Afrique, 2017–2018 (au 7 juin 2018)**



to the April sewage isolate was identified in stool samples from 2 AFP cases in Middle Shabelle province and 1 AFP case in Hiran province (which consisted of coinfection with cVDPV2). A bOPV response vaccination campaign is planned for the southern and central provinces of Somalia. AFP surveillance has been intensified in all 3 countries through active case finding at health facilities and other reporting sites. Further field investigations are ongoing.

Affiliations

^a Global Immunization Division, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (GA), USA; ^b Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (GA), USA; ^c Polio Eradication Department, World Health Organization, Geneva, Switzerland; ^d World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean, Amman, Jordan; ^e World Health Organization, Horn of Africa Coordination Office, Nairobi, Kenya; ^f World Health Organization, Kenya Country Office, Nairobi, Kenya; ^g World Health Organization Liaison Office for Somalia, Nairobi, Kenya (Corresponding author: Victor Eboh, nqy1@cdc.gov). ■

PVDVc3 apparenté à l'isolat prélevé dans les eaux usées en avril a été identifié dans des échantillons de selles provenant de 2 cas de PFA dans la province du Moyen Shabelle et d'un cas de PFA dans la province d'Hiran (un cas de coinfection par le PVDVc2). Une campagne de vaccination de riposte par le VPOb est prévue dans les provinces du sud et du centre de la Somalie. Des efforts d'intensification de la surveillance de la PFA ont été faits dans les 3 pays moyennant une recherche active des cas dans les centres de santé et autres sites de notification. Des recherches plus approfondies se poursuivent sur le terrain.

Affiliations des auteurs

^a Global Immunization Division, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (GA), États-Unis d'Amérique; ^b Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (GA), États-Unis d'Amérique; ^c Département Éradication de la poliomyélite, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse; ^d Bureau régional de la Méditerranée orientale de l'Organisation mondiale de la Santé, Amman, Jordanie; ^e Bureau de coordination pour la Corne de l'Afrique de l'Organisation mondiale de la Santé, Nairobi, Kenya; ^f Bureau de pays de l'OMS au Kenya, Nairobi, Kenya; ^g Bureau de liaison de l'Organisation mondiale de la Santé pour la Somalie, Nairobi, Kenya (auteur correspondant: Victor Eboh, nqy1@cdc.gov). ■

Isolation and identification of human influenza viruses in cell culture: summary analysis of the WHO external quality assessment programme for National Influenza Centres in the WHO regions of the Americas, Africa and Eastern Mediterranean, 2017

M. Ximena Tolosa,^{a, b} Vivian K. Leung,^a Iwona Buettner,^a Angela Todd,^a Yi-Mo Deng,^a Robert Shaw,^a Kanta Subbarao,^a Ian G. Barr,^a Belinda Herring,^c Amal Barakat,^d Rakhee Palekar,^e Wenqing Zhang,^f Christian Fuster,^f Magdi D. Samaan^f and Patrick C. Reading^g

Introduction

Global influenza virus surveillance has been conducted through the WHO Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) for more than 65 years.¹ The laboratory network associated with GISRS comprises more than 140 National Influenza Centres (NICs) in >110 WHO Member States, 6 WHO collaborating centres (CCs), 4 WHO essential regulatory laboratories and 13 WHO H5 reference laboratories. NICs perform preliminary analyses on virus specimens collected in the country before shipping representative clinical specimens and influenza virus isolates to WHO CCs for advanced antigenic and genetic analyses. The results of these analyses form the basis for WHO recommendations on the composition of influenza vaccines twice a year. The ability to isolate and propagate influenza virus from clinical specimens is essential for ongoing surveillance of circulating virus strains and sharing of viruses. Virus isolates generated from clinical specimens provide the necessary antigenic and genetic information to

Isolement et identification de virus grippaux humains en culture cellulaire: analyse sommaire du programme d'évaluation externe de la qualité de l'OMS pour les centres nationaux de la grippe dans les régions OMS des Amériques, de l'Afrique et de la Méditerranée orientale, 2017

M. Ximena Tolosa,^{a, b} Vivian K. Leung,^a Iwona Buettner,^a Angela Todd,^a Yi-Mo Deng,^a Robert Shaw,^a Kanta Subbarao,^a Ian G. Barr,^a Belinda Herring,^c Amal Barakat,^d Rakhee Palekar,^e Wenqing Zhang,^f Christian Fuster,^f Magdi D. Samaan^f et Patrick C. Reading^g

Introduction

Depuis plus de 65 ans, le Système mondial OMS de surveillance de la grippe et de riposte (GISRS) assure la surveillance des virus grippaux au niveau mondial.¹ Le réseau de laboratoires associé au GISRS comprend plus de 140 centres nationaux de la grippe (CNG) dans plus de 110 États Membres de l'OMS, 6 Centres collaborateurs de l'OMS, 4 laboratoires essentiels de réglementation et 13 laboratoires H5 de référence de l'OMS. Les CNG pratiquent des analyses préliminaires sur des échantillons de virus recueillis dans le pays avant l'expédition d'échantillons cliniques représentatifs et d'isolements de virus grippaux aux centres collaborateurs (CC) de l'OMS pour des analyses antigéniques et génétiques poussées. Les résultats de ces analyses servent de base à la formulation des recommandations de l'OMS concernant la composition des vaccins antigrippaux deux fois par an. La capacité à isoler et à propager le virus grippal à partir d'échantillons cliniques est déterminante pour la surveillance continue des souches virales circulantes et l'échange de virus. Les isolements de virus obtenus à partir des échantillons cliniques fournissent les informations antigéniques et

¹ Global influenza surveillance and response system (GISRS). Geneva: World Health Organization; 2011 (http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/).

¹ Système mondial OMS de surveillance de la grippe et de riposte (GISRS). Genève, Organisation mondiale de la santé, 2011 (http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/).

inform selection of vaccine strains and are used for other assays, such as phenotypic assays for assessing susceptibility to antiviral drugs.

NICs and diagnostic laboratories perform proficiency tests to confirm the quality and reliability of their testing procedures. In 2007, after a number of outbreaks of A(H5N1) in Asia, WHO initiated a global external quality assessment (EQA) programme for influenza A virus subtype detection by polymerase chain reaction (PCR). The EQA programme has been extended to include seasonal influenza A, influenza B and other non-seasonal influenza A viruses reported in human infections such as influenza A(H5N1) and A(H7N9) as well as analysis of the susceptibility of influenza viruses to current antiviral drugs.² Over the years, a growing number of NICs worldwide have participated in this programme. Of the 151 laboratories that reported results for the 2016 panel (panel 15), 87.4% returned correct results for all EQA samples.²

Influenza virus isolation in cell culture is a key function of NICs and is in their WHO terms of reference. In 2016, an initiative was begun to assess the performance of NICs in the WHO Western Pacific and South-East Asian regions in isolating and identifying a panel of influenza viruses in cell culture (panel 1).³ In 2017, this programme was extended to assess isolation and identification of influenza viruses with cell culture techniques by NICs in the WHO regions of the Americas (AMR), Africa (AFR) and the Eastern Mediterranean (EMR) in a second panel of viruses (panel 2). This programme, under the coordination of WHO's Global Influenza Programme, was implemented by the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza Melbourne, Australia (Melbourne WHO CC), with support from the associated WHO regional offices. This report summarizes the results for panel 2, which was dispatched to participating laboratories starting in 2017.

Study design

Preparation and composition of panel

EQA panel 2 comprised 16 samples containing isolates of influenza A or B viruses and negative control samples labelled VIP-2017-01–VIP-2017-16. All were originally isolated in MDCK or MDCK-SIAT-1 cells at the WHO CC between 2015 and 2016 and stored at –80 °C. The virus isolates used to generate the EQA panel were A/H1N1pdm09 (A/H3N2 subtype), A/Sydney/31/2016 (H1N1pdm09 subtype), B/Victoria/726/2015 (B/Victoria lineage (B/Vic)) and B/New Caledonia/47/2015 (B/Yamagata lineage (B/Yam)). Isolates were diluted as appropriate in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco), separated into 0.5-mL aliquots and frozen at –80 °C. The composition of the panel is shown in *Table 1*.

EQA sample VIP-2017-01 (containing a B/Yam virus isolate) was included in the panel to test the ability of laboratories to perform haemagglutination (HA) assays with their choice of red blood cells. Participating laboratories were instructed not to perform virus isolation on this sample. VIP-2017-01 was tested in 3 independent

génétiques nécessaires pour étayer la sélection des souches vaccinales et sont utilisés dans d'autres épreuves, telles que les tests phénotypiques visant à évaluer la sensibilité aux antiviraux.

Les CNG et les laboratoires de diagnostic prennent part à des tests d'aptitude pour confirmer la qualité et la fiabilité de leurs procédures d'analyse. En 2007, suite à la survenue d'un certain nombre de flambées de grippe A(H5N1) en Asie, l'OMS a lancé un programme mondial d'évaluation externe de la qualité (EQA) portant sur la détection des virus grippaux appartenant au sous-type A par amplification génique (PCR). Ce programme d'EQA a été étendu pour couvrir également la grippe A saisonnière, la grippe B et d'autres virus grippaux non saisonniers signalés comme responsables d'infections humaines, tels que les virus A(H5N1) et A(H7N9), ainsi que l'analyse de la sensibilité des virus grippaux aux médicaments antiviraux actuels.² Avec les années, de plus en plus de CNG dans le monde ont pris part au programme. Sur les 151 laboratoires ayant rapporté des résultats pour la série d'échantillons de 2016 (série 15), 87,4% ont soumis des résultats corrects pour l'ensemble des échantillons d'EQA.²

L'isolement des virus de la grippe en culture cellulaire est une fonction essentielle des CNG et figure dans leur mandat selon l'OMS. En 2016, une initiative a été lancée pour évaluer la capacité de ces centres, dans les Régions OMS du Pacifique occidental et de l'Asie du Sud-Est, à isoler et à identifier les virus grippaux en culture cellulaire dans une série d'échantillons (série 1).³ En 2017, ce programme a été élargi pour intégrer l'évaluation de l'isolement et de l'identification des virus grippaux par des techniques de culture cellulaire par les CNG dans les Régions OMS des Amériques (AMR), de l'Afrique (AFR) et de la Méditerranée orientale (EMR) sur une deuxième série de virus (série 2). Ce programme, sous la coordination du Programme mondial de l'OMS de lutte contre la grippe, a été mis en œuvre par le centre collaborateur de référence et de recherche pour la grippe (CC) de Melbourne (Australie), avec l'appui des bureaux régionaux de l'OMS associés. Le présent rapport résume les résultats pour la série 2, qui a été distribuée aux laboratoires participants à partir de 2017.

Conception de l'étude

Préparation et composition de la série

La série 2 de l'EQA comprenait 16 échantillons, dont des échantillons de virus grippaux A ou B et des échantillons témoins négatifs, étiquetés VIP-2017-01–VIP-2017-16. Tous avaient initialement été isolés dans des cellules MDCK ou MDCK-SIAT-1 dans le CC de l'OMS à Melbourne entre 2015 et 2016, puis conservés à 80°C. Les isolations de virus utilisés pour générer la série d'EQA appartenaient aux lignées A/H1N1pdm09 (sous-type A/H3N2), A/Sydney/31/2016 (sous-type H1N1pdm09), B/Victoria/726/2015 (lignée B/Victoria (B/Vic)) et B/New Caledonia/47/2015 (lignée B/Yamagata (B/Yam)). Les isolations ont été dilués dans un milieu d'Eagle modifié par Dulbecco exempt de sérum (Gibco), la solution obtenue étant ensuite fractionnée en aliquotes de 0,5 ml et congelée à -80 °C. La composition de la série est présentée dans le *Tableau 1*.

L'échantillon d'EQA VIP-2017-01 (contenant un isolement de virus B/Yam) a été inclus dans la série pour tester la capacité des laboratoires à pratiquer les épreuves d'hémagglutination (HA) avec des érythrocytes de leur choix. Les laboratoires participants ont reçu l'instruction de ne pas réaliser d'isolement viral sur cet échantillon. Le VIP 2017-01 a été soumis à 3 épreuves d'HA indé-

² See No. 4, 2017, pp. 37–44.

³ Reading PC, Leung VK, Buettner I et al. The first external quality assessment of isolation and identification of influenza viruses in cell culture in the Asia Pacific region, 2016. *J Clin Virol.* 2017;97:54–8.

² Voir N° 4, pp 37-44.

³ Reading PC, Leung VK, Buettner I et al. The first external quality assessment of isolation and identification of influenza viruses in cell culture in the Asia Pacific region, 2016. *J Clin Virol.* 2017;97:546–8.

Table 1 **EQA panel 2 samples provided to National Influenza Centres for influenza virus isolation and identification and corresponding results**
 Tableau 1 **Échantillons de la série 2 d'EQA fournis aux Centres nationaux de la grippe à des fins d'isolement et d'identification des virus grippaux, et résultats correspondants**

Sample identity – Identité de l'échantillon	Identity ^a – Identité ^a	Virus load ^b – Charge virale ^b	Correct isolation result ^c – Résultat d'isolement correct ^c		Correct identification result – Résultat d'identification correct	
			n	%	n	%
VIP-2017-02	A/H1pdm	++	14	56	17	68
VIP-2017-03	B/Vic	++	15	60	18	72
VIP-2017-04	A/H3	++	16	64	19	76
VIP-2017-05	B/Vic	++	14	56	17	68
VIP-2017-06	Negative – Négatif	–	22	88	25	100
VIP-2017-07	B/Yam	++++	21	84	22	88
VIP-2017-08	A/H1pdm	++	17	68	20	80
VIP-2017-09	B/Vic	++++	20	80	21	84
VIP-2017-10	Negative – Négatif	–	23	92	24	96
VIP-2017-11	Negative – Négatif	–	22	88	24	96
VIP-2017-12	A/H1pdm	++++	20	80	21	84
VIP-2017-13	A/H3	++++	18	72	20	80
VIP-2017-14	A/H3	++	16	64	16	64
VIP-2017-15	B/Yam	++	13	52	14	56
VIP-2017-16	A/H3	++++	21	84	22	88

CPE: cytopathic effect; EQA: external quality assessment; HA: haemagglutination. – ECP: effet cytopathologique; EQA: évaluation externe de la qualité; HA: hémagglutination

^a The identity of each sample was confirmed by real-time RT-PCR with CDC primers and probes. – L'identité de chaque échantillon a été confirmée par RT-PCR en temps réel au moyen d'amorces et de sondes des CDC.

^b The amount of virus in each EQA sample provided to laboratories is shown. +++++, ++, – = real-time RT-PCR values of 20–25, 25–30 and > 35, respectively, for type A/B assays. Negative = no A/B virus added to EQA sample. – Indication de la quantité de virus contenue dans chaque échantillon d'EQA fourni aux laboratoires. +++++, ++, – = valeurs de Ct de 20-25, 25-30 et >35, respectivement, lors de la RT-PCR en temps réel pour les types A/B. Négatif = aucun virus A/B ajouté à l'échantillon d'EQA.

^c Isolation was assessed on the basis of HA results from the 21/25 laboratories that performed this test and on the basis of CPE results from 3/25 laboratories. The 1 laboratory that performed neither CPE nor HA was assigned a value of 0 correct. – L'isolement des virus a été évalué à partir des résultats des épreuves d'HA effectuées par 21/25 laboratoires et des résultats des tests d'ECP pour 3/25 laboratoires. Le seul laboratoire qui n'avait ni évalué l'ECP, ni réalisé d'épreuve d'HA, s'est vu attribuer une valeur de 0 résultat correct.

HA assays at the Melbourne WHO CC with turkey, guinea-pig or human type O erythrocytes (all HA titre = mean of 32 haemagglutinating units (HAU/25 µL)). HA assays were performed with erythrocyte suspensions prepared at 1% vol/vol in phosphate-buffered saline by standard procedures.

EQA samples VIP-2017-02–VIP-2017-16 were included in the panel to test the ability of the laboratories to isolate and identify viruses. The samples were thawed and tested at the Melbourne WHO CC with the real-time RT-PCR influenza A/B typing and subtyping kits FR-198, FR-929 and FR-1209 from Influenza Reagent Resource, Influenza Division, WHO Collaborating Centre for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. Each sample contained only one virus type/subtype or type/lineage, and no evidence was found of mixed samples (data not shown). Samples from the EQA panel were inoculated onto MDCK cells, and virus was isolated and identified at the Melbourne WHO CC on independent 2 occasions, with consistent results.

Participants were instructed how to store and test the panel of viruses. A questionnaire on the laboratory methods used for cell culture and influenza virus isolation and identification was included for completion by each participant.

Distribution of panel and response of participants

NICs were invited to participate before the panels were dispatched. The panel was dispatched between November 2017 and June 2018 to 25 NICs, namely 12 NICs in

pendantes au CC de l'OMS à Melbourne avec des érythrocytes de dinde, de cochon d'Inde ou humains de groupe O (pour tous les titres d'HA = moyenne de 32 unités hémagglutinantes (HAU/25 µL)). Les épreuves d'HA ont été pratiquées avec des suspensions d'érythrocytes à 1% en volume dans une solution saline tamponnée au phosphate, selon des procédures standard.

Les échantillons d'EQA VIP-2017-02–VIP-2017-16 ont été inclus dans la série pour tester la capacité des laboratoires à isoler et identifier les virus. Les échantillons ont été décongelés et analysés au CC de l'OMS à Melbourne avec des kits FR-198, FR-929 et FR-1209 de typage et de sous-typage des virus grippaux A/B par RT-PCR en temps réel, fournis par l'Influenza Reagent Resource, Influenza Division, Centre collaborateur de l'OMS pour la surveillance, l'épidémiologie et la lutte contre la grippe, intégré aux Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (États-Unis d'Amérique). Chaque échantillon contenait un seul type/sous-type de virus ou un type/une lignée unique et il n'a pas été mis en évidence d'échantillon mixte (données non représentées). Les échantillons de la série d'EQA ont été inoculés dans des cellules MDCK et le virus a été isolé et identifié au CC de l'OMS à Melbourne en 2 occasions indépendantes, avec des résultats cohérents.

Les participants ont reçu des instructions pour conserver et tester la série de virus. Un questionnaire sur les méthodes de laboratoire appliquées pour la culture cellulaire, l'isolement et l'identification des virus grippaux était joint aux envois d'échantillons pour être rempli par chacun des participants.

Distribution de la série et réponse des participants

Les CNG ont été invités à participer avant que les séries ne soient envoyées. Cette série a été distribuée entre novembre 2017 et juin 2018 à 25 CNG, dont 12 dans la Région africaine,

AFR, 4 NICs in AMR and 9 NICs in EMR. The panels were shipped on dry ice, and temperature monitors were included in each shipment to ensure that the panels remained frozen throughout transport. Three receiving laboratories reported that the panel did not arrive frozen on dry ice but that they had nonetheless tested the panel. Participating laboratories were asked to report results within 6 weeks of the date of sample reception. Of the 25 participating laboratories, 12 (48%) reported results within 6 weeks, 6 reported results within 6–8 weeks, and 7 reported results after 8 weeks. The average turnaround time from the reception of EQA panel to submission of result was 52 days, the shortest and longest times being 19 days and 131 days, respectively. All the results received were analysed, irrespective of time taken for submission.

Methods for assessing virus growth and for determining type, subtype and/or lineage after isolation

Participating laboratories isolated viruses on either MDCK (20/25), MDCK-SIAT-1 (3/25), Vero (1/25) or RhMK (1/25) cells. Cells were prepared in tissue culture flasks (14/25), multi-well plates (3/25) or vials/tubes (8/25). All the laboratories reported that the cells were $\geq 70\%$ confluent at the time of inoculation. Negative and positive controls for virus isolation were used by 20/25 and 13/25 NICs, respectively. Cells were inoculated with 0.5 mL of EQA sample, as stated in the instructions, by 17/25 laboratories, while 8/25 laboratories used smaller volumes. The protocols used for virus isolation were the WHO Global Influenza Surveillance Network *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza* (12/25), in-house standard operating procedures (2/25) and protocols obtained from the WHO CCRI (8/25) or other sources (3/25). Exogenous trypsin was added to virus isolation media at a final concentration of $<1 \mu\text{g/mL}$ (5/25), $1\text{--}5 \mu\text{g/mL}$ (17/25) or $>5 \mu\text{g/mL}$ (3/25).

The first tests used to determine virus growth after inoculation of EQA samples were assessment of cytopathic effect (CPE) and/or HA assays. Overall, 22/25 participating laboratories assessed CPE and 21/25 performed HA assays after inoculation of cells with VIP-2017-02–VIP-2017-16, and 19/25 used both CPE and HA. Only one laboratory assessed neither CPE nor HA but used RT-PCR for the first assessment of virus growth. The methods used to identify the type, subtype and/or lineage of influenza virus present in virus isolates included immunofluorescence assay (IF), haemagglutination inhibition (HI) assay and/or RT-PCR. Overall, 18/25 laboratories performed RT-PCR, 14/25 performed HI, and 2/25 performed IF assays; 12/25 laboratories used more than one assay to confirm virus identity, with combinations of HI and PCR (9/25), HI and IF (1/25), PCR and IF (1/25) and HI, PCR and IF (1/25). The ability of laboratories to identify virus isolates differed, most (23/25) being able to determine influenza type (A or B), 23/25 reporting the influenza A subtype (A/H3 or A/H1pdm) and 20/25 reporting the influenza B lineage (B/Yam or B/Vic). The 2 laboratories that did not report type or subtype used HI assays to identify isolates but reported that they had not obtained sufficient HA titres for subsequent assays.

4 dans la Région des Amériques et 9 dans la Région de la Méditerranée orientale. Les échantillons ont été expédiés sur de la glace sèche et des moniteurs de température ont été inclus dans chaque envoi pour s'assurer que les séries restent à l'état congelé tout au long du transport. Trois laboratoires destinataires ont signalé que la série n'était pas arrivée congelée sur de la glace sèche, mais ils l'ont néanmoins analysée. Il a été demandé aux laboratoires participants de fournir les résultats dans les 6 semaines suivant la réception des échantillons. Sur les 25 laboratoires participants, 12 (48%) ont rapporté les résultats dans le délai de 6 semaines, 6 l'ont fait entre 6 et 8 semaines après la réception et 7 après 8 semaines. Le temps de traitement moyen des échantillons depuis la réception de la série d'EQA jusqu'à la soumission des résultats était de 52 jours, avec un minimum de 19 jours et un maximum de 131 jours. Tous les résultats reçus ont été analysés, indépendamment du temps écoulé avant la soumission.

Méthodes pour évaluer la croissance virale et pour déterminer le type, le sous-type et/ou la lignée après l'isolement du virus

Les laboratoires participants ont isolé des virus sur des cellules MDCK (20/25), MDCK-SIAT-1 (3/25), Vero (1/25) ou RhMK (1/25). Les cellules ont été préparées dans des flasques à culture cellulaire (14/25), sur des plaques multipuits (3/25) ou dans des flacons/tubes (8/25). Tous les laboratoires ont indiqué que les cellules étaient confluentes à $\geq 70\%$ au moment de l'inoculation. Des témoins négatifs et positifs pour l'isolement viral ont été utilisés par 20/25 et 13/25 des CNG respectivement. Sur les 25 laboratoires, 17 ont inoculé les cellules avec 0,5 ml d'échantillon d'EQA, conformément aux instructions, tandis que 8 ont utilisé de plus petits volumes. Les protocoles appliqués pour l'isolement des virus étaient tirés de *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza* du Réseau mondial de surveillance de la grippe (12/25), des modes opératoires normalisés internes (2/25) ou des protocoles fournis par le centre CCRI de l'OMS (8/25) ou émanant d'autres sources (3/25). De la trypsine exogène a été ajoutée au milieu d'isolement viral à une concentration finale $<1 \mu\text{g/ml}$ (5/25), comprise entre 1 et 5 $\mu\text{g/ml}$ (17/25) ou $>5 \mu\text{g/ml}$ (3/25).

Les premiers tests appliqués pour déterminer la croissance virale après l'inoculation des échantillons d'EQA étaient l'évaluation de l'effet cytopathologique (ECP) et/ou des épreuves d'HA. Globalement, 22 laboratoires participants sur 25 ont évalué l'ECP et 21/25 ont effectué des épreuves d'HA après inoculation des cellules avec l'échantillon VIP-2017-02–VIP-2017-16; 19 laboratoires sur 25 ont mis en œuvre les deux types de test. Un seul laboratoire n'a ni évalué l'ECP ni pratiqué d'épreuve d'HA, mais a utilisé la RT-PCR pour sa première évaluation de la croissance virale. Les méthodes appliquées pour identifier le type, le sous-type et/ou la lignée du virus grippal présent dans les isolements viraux comprenaient la détermination par immunofluorescence (IF), l'inhibition de l'hémagglutination (IH) et/ou la RT-PCR. Globalement, 18 laboratoires sur 25 ont mis en œuvre la RT-PCR, 14 sur 25 ont pratiqué l'IH et 2 sur 25 ont réalisé des déterminations IF; 12 des 25 laboratoires ont fait appel à plus d'un test pour confirmer l'identité du virus, en combinant les épreuves IH et PCR (9/25), IH et IF (1/25), PCR et IF (1/25) et IH, PCR et IF (1/25). La capacité des laboratoires à identifier les isolements viraux était variable, la plupart (23/25) étant en mesure de déterminer le type de grippe (A ou B), 23/25 d'indiquer le sous-type A (A/H3 ou A/H1pdm) et 20/25 d'indiquer la lignée grippale B (B/Yam ou B/Vic). Les 2 laboratoires qui n'avaient pas indiqué le type ou le sous-type avaient fait appel à des épreuves d'IH pour identifier les isolements, mais ont signalé qu'ils n'avaient pas obtenu des titres d'HA suffisants pour les épreuves ultérieures.

Performance of laboratories

Analysis of VIP-2017-01 with the HA assay

HA titres of sample VIP-2017-01 were provided by 22/25 participating laboratories, and 15/22 reported titres that were within 4-fold of the minimum/maximum HA titres (compared with 32 HAU/25 µL, as determined at the WHO CCRRI). Overall, 7/25 laboratories reported HA titres of ≤4. Participating laboratories used guinea-pig (9/22), turkey (8/22), human O (4/22) and/or chicken (3/22) erythrocytes; 2 laboratories reported results with both guinea-pig and chicken erythrocytes. All laboratories used 0.5–1.0% suspensions of erythrocytes for HA assays.

Isolation and identification of influenza viruses from samples in the EQA panel

The ability of participating laboratories to obtain the correct result for virus growth, indicative of virus isolation and virus identification, in each sample in the panel are presented in *Figure 1A* and *B*, respectively. Virus isolation was assessed from HA results from the 21/25 laboratories that performed this test and for 3/25 from CPE results. The laboratory that did not perform either CPE or HA was assigned a value of 0 correct analyses. Laboratories were successful (72–84% of the 25 participating laboratories) in isolating virus from the 5 EQA samples that contained large amounts of virus, indicated by a lower cycle threshold (Ct) of 20–25 by real-time RT-PCR (*Table 1, Figure 1A*). Fewer laboratories (52–68%) were able to isolate virus from the 7 EQA samples that contained smaller amounts of virus (Ct 5–30 for influenza A or influenza B virus) (*Table 1*). The smallest proportions of laboratories reported influenza virus isolation from EQA samples VIP-2017-15 (52% correct), VIP-2017-02 (56% correct) and VIP-2017-05 (56% correct). Generally, participating laboratories did not report virus isolation from the 3 samples in the EQA panel that did not contain virus (88–92% correct), although 2/25 laboratories reported a positive HA result for VIP-2017-06 and VIP-2017-11, and 1/25 reported a positive HA result for VIP-2017-10 (*Table 1, Figure 1A*).

The results for virus identification showed similar trends to those for virus isolation (*Figure 1B*). Two laboratories were unable to isolate virus from any samples and therefore correctly identified only negative samples. Of the remaining laboratories, 3/25 performed typing and subtyping assays but did not assess type B lineage; therefore, the results of A/H3, A/H1pdm or type B type were considered correct. For the majority (20/25) of laboratories that assessed isolates for type, subtype and lineage, the results of A/H3, A/H1pdm, B/Yam and B/Vic were considered correct. High percentages (80–88%) of participating laboratories correctly identified the 5 EQA samples containing large amounts of virus (Ct = 20–25 for type A/B, *Table 1*) but fewer (56–80%) for EQA samples that contained less virus (Ct = 25–30 for type A/B, *Table 1*). With regard to the negative EQA samples, which did not contain virus, no laboratories identified virus in VIP-2017-06, while 1/25 laboratories identified influenza virus in both VIP-2017-10 (B type) and VIP-2017-11 (B type).

Performances des laboratoires

Analyse du VIP-2017-01 par une épreuve d'HA

Sur les 25 laboratoires participants, 22 ont communiqué des titres d'HA pour l'échantillon VIP-2017-01, et 15 de ces 22 laboratoires ont donné des titres moins de 4 fois supérieurs aux titres d'HA minimum/maximum (par rapport à la valeur de 32 HAU/25 µL établie par le CCRRI de l'OMS). En tout, 7 laboratoires sur 25 ont fourni des titres d'HA ≤4. Les laboratoires participants ont utilisé des érythrocytes de cochon d'Inde (9/22), de dinde (8/22), humains de groupe O (4/22) et/ou de poulet (3/22); 2 laboratoires ont soumis des résultats obtenus à la fois avec des érythrocytes de cochon d'Inde et de poulet. Tous les laboratoires ont utilisé des suspensions d'érythrocytes à 0,5-1,0% pour les épreuves d'HA.

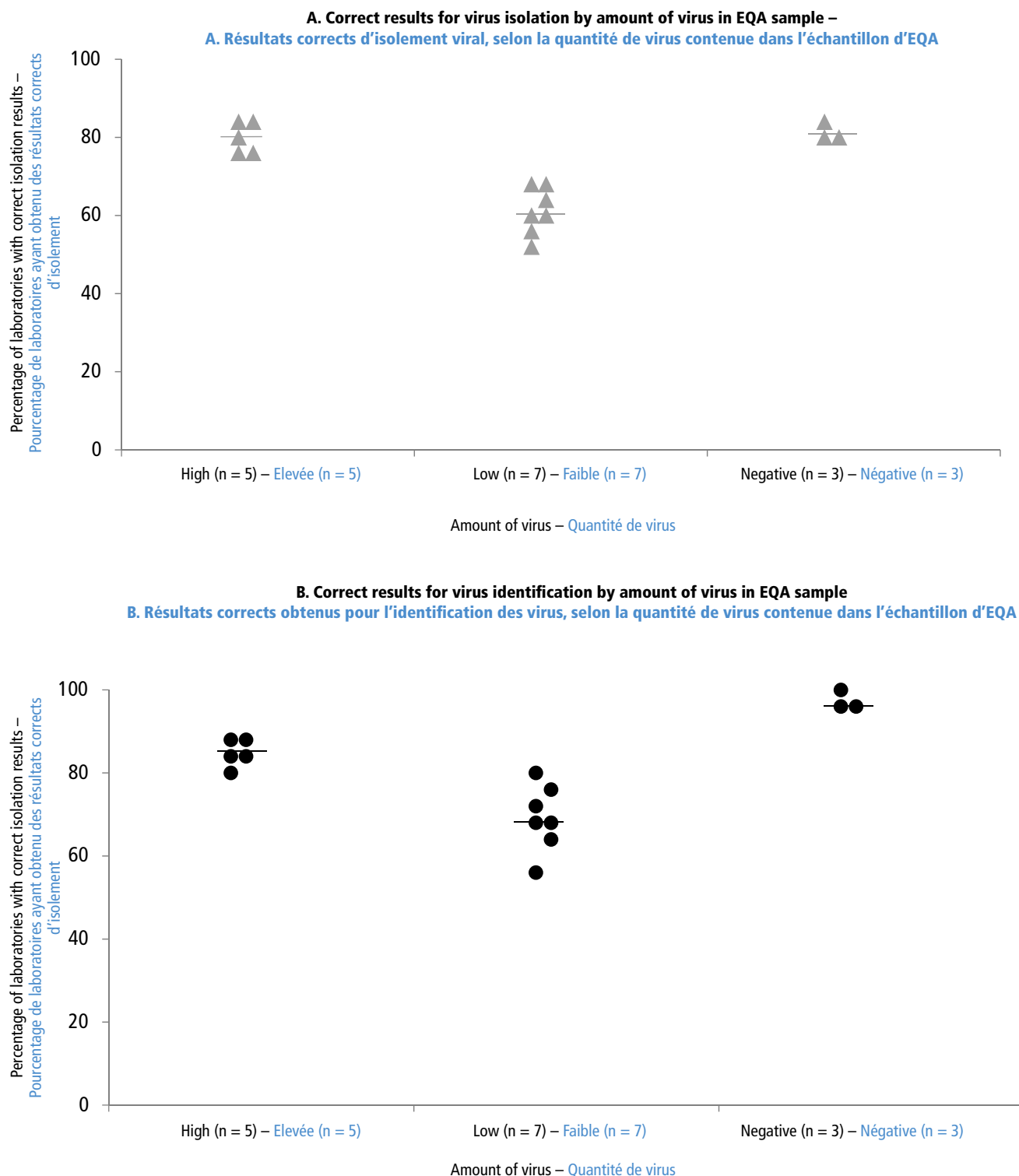
Isolement et identification des virus grippaux dans les échantillons de la série d'EQA

La capacité des laboratoires participants à obtenir des résultats corrects pour la croissance virale, qui est un indicateur de l'isolement et de l'identification des virus, dans chaque échantillon de la série est présentée dans les *Figures 1A* et *B*, respectivement. L'isolement des virus a été évalué à partir des résultats des épreuves d'HA effectuées par 21/25 laboratoires et des résultats des tests d'ECP pour 3/25 laboratoires. Le laboratoire qui n'avait ni évalué l'ECP, ni réalisé d'épreuve d'HA s'est vu attribuer une valeur de 0 analyse correcte. La grande majorité des 25 laboratoires participants (72–84%) a réussi à isoler le virus dans les 5 échantillons d'EQA qui contenaient une grande quantité de virus, dénotée par une faible valeur de cycle seuil (Ct), de 20-25, lors de la RT-PCR en temps réel (*Tableau 1, Figure 1A*). Un nombre moins important de laboratoires (52-68%) est parvenu à isoler le virus des 7 échantillons d'EQA qui contenaient une quantité plus faible de virus (valeur de Ct de 25-30 pour les virus grippaux A ou B) (*Tableau 1*). La proportion de laboratoires ayant isolé le virus grippal était particulièrement faible pour les échantillons d'EQA VIP-2017-15 (52% de résultats corrects), VIP-2017-02 (56% de résultats corrects) et VIP-2017-05 (56% de résultats corrects). De manière générale, les laboratoires participants n'ont pas signalé d'isolement viral dans les 3 échantillons de la série d'EQA qui ne contenaient pas de virus (88-92% de résultats corrects), mais 2/25 laboratoires ont donné un résultat positif à l'épreuve d'HA pour VIP-2017-06 et VIP-2017-11, et 1/25 un résultat positif d'HA pour VIP-2017-10 (*Tableau 1, Figure 1A*).

Pour l'identification des virus, les résultats suivaient une tendance comparable à celle de l'isolement des virus (*Figure 1B*). Deux laboratoires n'ont pas été en mesure d'isoler le virus dans un quelconque échantillon et ont donc correctement identifié uniquement des échantillons négatifs. Parmi les autres laboratoires, 3/25 ont effectué des tests de typage et de sous-typage, mais n'ont pas évalué la lignée de type B; leurs résultats pour A/H3, A/H1pdm et les virus de type B ont donc été considérés comme corrects. Pour la majorité (20/25) des laboratoires ayant analysé les isolements de virus en vue d'en établir le type, le sous-type et la lignée, les résultats pour A/H3, A/H1pdm, B/Yam et B/Vic ont été considérés comme corrects. La proportion de laboratoires participants ayant correctement identifié les virus était élevée (80-88%) pour les 5 échantillons d'EQA qui contenaient une grande quantité de virus (Ct=20-25 pour les types A/B, *Tableau 1*), mais plus faible (56-80%) pour les échantillons d'EQA qui contenaient moins de virus (Ct=25-30 pour les types A/B, *Tableau 1*). S'agissant des échantillons négatifs d'EQA, qui ne contenaient pas de virus, aucun laboratoire n'a identifié de virus dans l'échantillon VIP-2017-06, tandis que 1/25 laboratoire a identifié un virus grippal aussi bien dans l'échantillon VIP-2017-10 (type B) que dans l'échantillon VIP-2017-11 (type B).

Figure 1 **Summary of correct results for virus isolation and identification in the EQA panel samples containing high and low amounts of virus and in negative samples**

Figure 1 **Synthèse des résultats corrects obtenus pour l'isolement et l'identification des virus dans les échantillons d'EQA contenant une grande quantité de virus, une faible quantité de virus et les échantillons négatifs**



The 15 EQA samples tested for virus isolation were grouped according to the amount of influenza virus into "high" (5 panel samples, Ct = 20–25 for type A or B by real-time RT-PCR), "low" (7 panel samples, Ct = 26–30 for type A or B by real-time RT-PCR) or "negative" (3 panel samples, Ct >35 for type A or B by real-time RT-PCR). The percentages of the 25 participating laboratories that obtained the correct result for (A) virus isolation and (B) virus identification are shown. Note that isolation was assessed on the basis of HA results from the 21/25 laboratories that performed this test and on the basis of CPE results from 3/25 laboratories. The 1 laboratory that performed neither CPE nor HA was assigned a value of 0 correct. – Les 15 échantillons d'EQA soumis à une épreuve d'isolement viral ont été regroupés selon la quantité de virus grippaux qu'ils contenaient: «élevée» (5 échantillons de la série, Ct=20-25 pour les types A ou B par RT-PCR en temps réel), «faible» (7 échantillons, Ct=26-30 pour les types A ou B par RT-PCR en temps réel) ou «échantillon négatif» (3 échantillons, Ct>35 pour les types A ou B par RT-PCR en temps réel). La figure indique la proportion de laboratoires, sur les 25 participants, ayant obtenu des résultats corrects pour (A) l'isolement des virus et (B) l'identification des virus. À noter que l'isolement des virus a été évalué à partir des résultats des épreuves d'HA effectuées par 21/25 laboratoires et des résultats des tests d'ECP pour 3/25 laboratoires. Le seul laboratoire qui n'avait ni évalué l'ECP, ni réalisé d'épreuve d'HA, s'est vu attribuer une valeur de 0 résultat correct.

Capacity of participating laboratories to isolate and identify viruses

We assessed the overall performance of the participating laboratories in correctly isolating and identifying influenza viruses from the EQA panel samples (Figure 2). For virus isolation, 8/25 laboratories (7/12 in AFR, 0/5 in AMR and 1/8 in EMR) obtained correct results for all 15 EQA samples, and 18 laboratories obtained correct results for $\geq 10/15$ samples (9/12 in AFR, 4/5 in AMR and 5/8 in EMR); 7/25 laboratories reported correct isolation results for $< 10/15$ EQA samples (3/12 in AFR, 1/5 in AMR and 3/8 in EMR).

With regard to virus identification, 12/25 laboratories also obtained correct results for 15/15 EQA samples (6/12 in AFR, 2/5 in AMR and 4/8 in EMR), and 20/25 laboratories obtained correct results for ≥ 10 EQA samples (10/12 in AFR, 4/5 in AMR and 6/8 in EMR). Overall, 5 laboratories reported correct identification results for $< 10/15$ EQA panel samples (2/12 in AFR, 1/5 in AMR and 2/8 in EMR).

Discussion

Panel 2 is the first EQA of influenza virus isolation and identification in cell culture distributed to NIC laboratories in WHO AFR, AMR and EMR. Most of the participating laboratories could detect influenza virus growth and could identify virus amplified from EQA

Capacité des laboratoires participants à isoler et à identifier les virus

Nous avons évalué la capacité globale des laboratoires participants à isoler et à identifier correctement les virus grippaux à partir des échantillons de la série d'EQA (Figure 2). Concernant l'isolement des virus, 8/25 laboratoires (7/12 dans la Région AFR, 0/5 dans la Région AMR et 1/8 dans la Région EMR) ont obtenu des résultats corrects pour l'ensemble des 15 échantillons d'EQA; 18 laboratoires ont donné des résultats corrects pour $\geq 10/15$ échantillons (9/12 dans la Région AFR, 4/5 dans la Région AMR et 5/8 dans la Région EMR); et 7/25 ont communiqué des résultats d'isolement corrects pour $< 10/15$ échantillons d'EQA (3/12 dans la Région AFR, 1/5 dans la Région AMR et 3/8 dans la Région EMR).

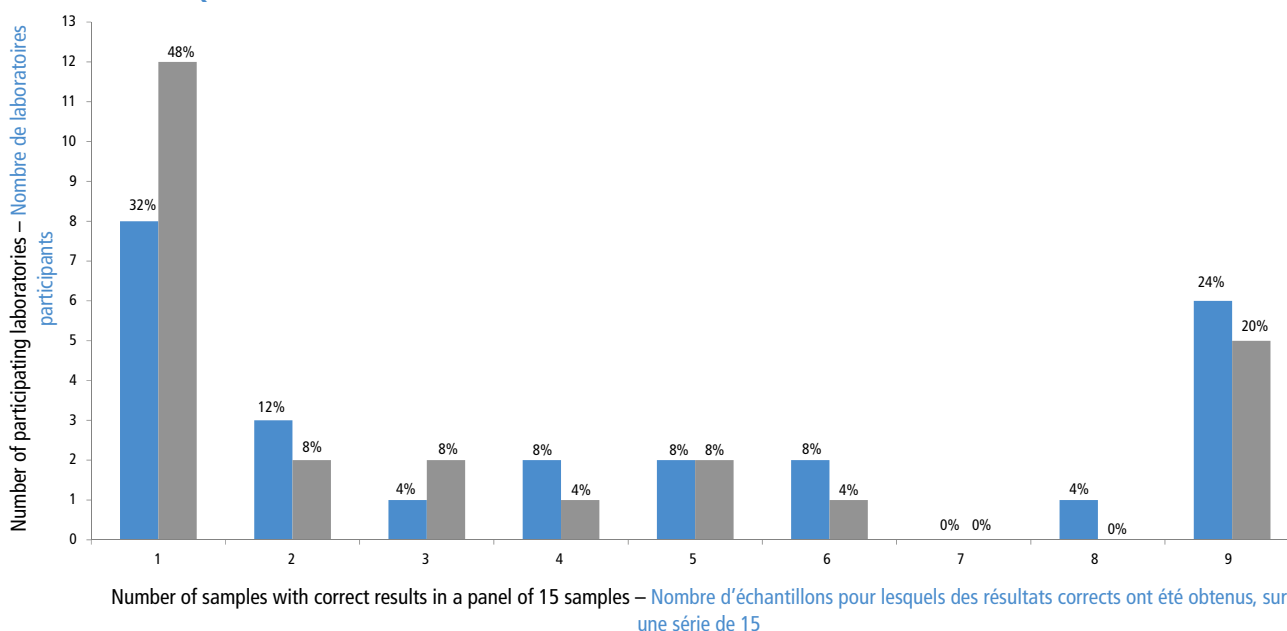
Pour ce qui est de l'identification des virus, 12/25 laboratoires ont également obtenu des résultats corrects pour 15/15 échantillons d'EQA (6/12 dans la Région AFR, 2/5 dans la Région AMR et 4/8 dans la Région EMR), et 20/25 laboratoires ont donné des résultats corrects pour ≥ 10 échantillons (10/12 dans la Région AFR, 4/5 dans la Région AMR et 6/8 dans la Région EMR). En tout, 5 laboratoires ont communiqué des résultats d'identification corrects pour $< 10/15$ échantillons de la série d'EQA (2/12 dans la Région AFR, 1/5 dans la Région AMR et 2/8 dans la Région EMR).

Discussion

La série 2 est la première série d'échantillons d'EQA à avoir été distribuée aux laboratoires des CNG dans les Régions AFR, AMR et EMR pour évaluer l'isolement et l'identification des virus grippaux en culture cellulaire. La plupart des laboratoires participants ont été en mesure de détecter la croissance virale et

Figure 2 **Summary of performance of participating laboratories in obtaining correct results for samples in the EQA panel**

Figure 2 **Synthèse de la performance des laboratoires participants, en termes d'obtention de résultats corrects pour les échantillons de la série d'EQA**



Shown are the numbers of participating laboratories that obtained correct results for the 15 EQA samples in (i) detecting virus growth, indicative of virus isolation (blue columns) and (ii) identifying influenza virus type, subtype and/or lineage in isolates derived from EQA samples to the best of the testing capabilities in their laboratory (grey columns). The percentage of laboratories that obtained correct results is shown above the columns. Note that isolation was assessed on the basis of HA results from the 21/25 laboratories that performed this test and on the basis of CPE results from 3/25 laboratories. The 1 laboratory that performed neither CPE nor HA was assigned a value of 0 correct. – Cette figure indique le nombre de laboratoires participants ayant obtenu des résultats corrects pour les 15 échantillons d'EQA en ce qui concerne i) la détection de la croissance virale, indicateur de l'isolement du virus (colonnes bleues) et ii) l'identification du type, du sous-type et/ou de la lignée des virus isolés à partir des échantillons d'EQA, dans la mesure des capacités d'analyse du laboratoire (colonnes grises). Le pourcentage de laboratoires ayant obtenu des résultats corrects est indiqué au-dessus des colonnes. À noter que l'isolement des virus a été évalué à partir des résultats des épreuves d'HA effectuées par 21/25 laboratoires et des résultats des tests d'ECP pour 3/25 laboratoires. Le seul laboratoire qui n'avait ni évalué l'ECP, ni réalisé d'épreuve d'HA, s'est vu attribuer une valeur de 0 résultat correct.

samples; however, a number of laboratories obtained <7/15 correct results for isolation and identification. In addition, many laboratories had difficulty in isolating and identifying viruses from EQA samples that contained low titres, indicating differences in the range of sensitivity of influenza virus isolation among laboratories.

The majority of the participating laboratories (19/25) used both CPE and HA to confirm virus growth. RT-PCR (18/25) and HI (14/25) assays were the most commonly used tests for identifying viruses; 9/25 laboratories performed both assays. IF was used in combination with RT-PCR or HI in 3/25 laboratories. While many laboratories were less successful in correctly isolating and identifying viruses in EQA samples that contained smaller amounts (Figure 1), the EQA identified certain issues for particular laboratories. For example, a number of laboratories identified EQA samples correctly by RT-PCR, but recorded high Ct values, in the range of 30–40 instead of <25, as would be expected for virus isolates, indicating suboptimal virus isolation and/or lack of sensitivity of RT-PCR detection. Another laboratory obtained low HA titres (indicative of low levels of virus) but low Ct values (indicative of high levels of virus) for EQA samples after isolation, suggesting issues in HA test performance. Although one laboratory obtained accurate HA test results for VIP-2017-01, they did not succeed in detecting any virus isolates with the HA test, indicating a major problem in their virus isolation technique. Individual follow-up will be required to correct these issues and to improve the accuracy of virus isolation and identification in these laboratories.

The EQA samples provided to participating laboratories in panel 2 were not original clinical specimens, which is the material most NICs would receive for routine virus isolation. Instead, the panel consisted of virus isolates propagated in MDCK cells at the WHO CCRI that were diluted to contain amounts of virus similar to those present in clinical specimens (as determined by Ct values obtained with RT-PCR assays for influenza A or B viruses). Re-isolation of previously isolated influenza viruses is likely to be more successful than isolation from true respiratory clinical samples. It should be noted that, in recent years, H3N2 viruses have proven particularly difficult to isolate from clinical material, both in eggs and in MDCK cell cultures.⁴ Changes in the agglutination of different erythrocytes and reduced growth capacity have created challenges to laboratories for isolating and characterizing H3N2 viruses (in particular, clade 3C.2a viruses) antigenically in the HI assay.^{5, 6, 7} Use of MDCK cells engineered to express a high density of human-type sialic acid recep-

d'identifier les virus amplifiés dans les échantillons d'EQA; cependant plusieurs laboratoires ont obtenu <7/15 résultats corrects pour l'isolement et l'identification. En outre, de nombreux laboratoires ont eu des difficultés à isoler et à identifier les virus dans les échantillons d'EQA qui contenaient un faible titre de virus, ce qui indique que la sensibilité de la procédure d'isolement des virus grippaux varie entre les laboratoires.

La majorité des laboratoires participants (19/25) se sont appuyés à la fois sur l'évaluation de l'ECP et des tests d'HA pour confirmer la croissance virale. Les épreuves de RT-PCR (18/25) et d'IH (14/25) étaient les plus fréquemment employées pour identifier les virus; 9/25 laboratoires ont effectué les deux types de test. L'immunofluorescence a été utilisée en combinaison avec la RT-PCR ou l'IH dans 3/25 laboratoires. Les laboratoires ont été nombreux à avoir des difficultés à isoler et à identifier correctement les virus des échantillons d'EQA contenant une quantité plus faible de virus (Figure 1), mais l'EQA a identifié des problèmes spécifiques à certains laboratoires. Par exemple, plusieurs laboratoires ont correctement identifié les virus des échantillons d'EQA par RT-PCR, mais ont enregistré des valeurs de Ct élevées, de l'ordre de 30-40, au lieu de la valeur <25 normalement escomptée pour les isolements, ce qui témoigne d'un isolement viral sous-optimal et/ou d'une sensibilité insuffisante de la détection par RT-PCR. Un autre laboratoire a obtenu des titres faibles d'HA (signe d'une quantité faible de virus), mais aussi des valeurs faibles de Ct (signe d'une quantité élevée de virus) pour les échantillons d'EQA après l'isolement, ce qui est révélateur de problèmes dans la réalisation des tests d'HA. Dans un laboratoire, les résultats obtenus au test d'HA étaient exacts pour l'échantillon VIP-2017-01, mais aucun isolement de virus n'a pu être détecté au moyen du test d'HA, signe d'un problème majeur dans la méthode d'isolement utilisée. Un suivi individuel sera nécessaire pour remédier à ces problèmes et améliorer l'isolement et l'identification des virus dans ces laboratoires.

Dans cette série 2, les échantillons d'EQA fournis aux laboratoires participants n'étaient pas des échantillons cliniques originaux, comme ceux que la plupart des CNG reçoivent ordinairement à des fins d'isolement viral, mais plutôt des isolements de virus qui avaient été propagés sur cellules MDCK au CCRI de l'OMS, puis dilués de sorte à contenir une quantité de virus analogue à celle des échantillons cliniques (déterminée à partir des valeurs de Ct obtenues par RT-PCR pour les virus grippaux A ou B). Le réisolement de virus grippaux préalablement isolés est plus aisément réalisable que l'isolement des virus à partir d'échantillons cliniques respiratoires réels. Il convient de noter que ces dernières années, les virus H3N2 se sont avérés particulièrement difficiles à isoler à partir d'échantillons cliniques, que ce soit sur œufs ou sur cellules MDCK.⁴ En raison des changements observés dans l'agglutination de différents érythrocytes et de la capacité de croissance réduite de ces virus, il est devenu difficile pour les laboratoires d'identifier et de caractériser antigéniquement les virus H3N2 (en particulier ceux appartenant au clade 3C.2a) par des épreuves d'IH.^{5, 6, 7} Des cellules MDCK qui ont été modifiées pour exprimer une forte densité de récepteurs sialiques de

⁴ Asaoka N, Tanaka Y, Sakai T et al. Low growth ability of recent influenza clinical isolates in MDCK cells is due to their low receptor binding affinities. *Microbes Infect.* 2006;8:511–9.

⁵ Chambers BS, Li Y, Hodinka RL et al. Recent H3N2 influenza virus clinical isolates rapidly acquire hemagglutinin or neuraminidase mutations when propagated for antigenic analyses. *J Virol.* 2014;88:10986–9.

⁶ Lin YP, Gregory V, Collins P et al. Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J Virol.* 2010;84:6769–81.

⁷ Skowronski DM, Sabaiduc S, Chambers C et al. Mutations acquired during cell culture isolation may affect antigenic characterisation of influenza A(H3N2) clade 3C.2a viruses. *Euro Surveill.* 2016;21:30112.

⁴ Asaoka N, Tanaka Y, Sakai T et al. Low growth ability of recent influenza clinical isolates in MDCK cells is due to their low receptor binding affinities. *Microbes Infect.* 2006;8:511–9.

⁵ Chambers BS, Li Y, Hodinka RL et al. Recent H3N2 influenza virus clinical isolates rapidly acquire hemagglutinin or neuraminidase mutations when propagated for antigenic analyses. *J Virol.* 2014;88:10986–9.

⁶ Lin YP, Gregory V, Collins P et al. Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J Virol.* 2010;84:6769–81.

⁷ Skowronski DM, Sabaiduc S, Chambers C, et al. Mutations acquired during cell culture isolation may affect antigenic characterisation of influenza A(H3N2) clade 3C.2a viruses. *Euro Surveill.* 2016;21:30112.

tors (MDCK-SIAT1) has been adopted in many laboratories to improve isolation of H3N2 (and other influenza viruses),⁸ including 3/25 laboratories participating in this EQA. Future EQA panels should include samples that accurately reflect the challenges associated with isolation and characterization of the most recent H3N2 viruses.

Participation in EQA programmes is relevant to core NIC functions and is important to establish the reliability of laboratory diagnostic procedures for accurate, reliable, timely test results. EQA permits laboratories to identify problems in their practices and to find corrective actions, and it is required for quality management systems and laboratory accreditation. Given the diverse protocols and procedures used for influenza virus isolation and identification in the laboratories that participated in this EQA, individual feedback will be given to those laboratories that reported difficulty in isolating and/or identifying influenza viruses in this EQA. For example, considerable differences were seen in (i) the source of the standard operating procedure used to perform virus isolation, (ii) the tissue culture vessels used to perform virus isolation (e.g. flasks, tubes and multi-well plates were all used) and (iii) the laboratory tests used to detect virus growth and to identify the virus present in isolates derived from EQA samples. In addition to individual recommendations, standardization of reagents and protocols is a simple approach for improving evaluation (and perhaps the performance) of NICs in future EQA panels for assessing influenza virus isolation and identification in cell culture.

Author affiliations

^a WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory at the Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, Melbourne, Victoria, Australia; ^b National Centre for Epidemiology and Population Health, The Australian National University, Canberra, Australia; ^c Infectious Hazard Management, WHO Health Emergencies, WHO Regional Office for Africa, Brazzaville, Congo; ^d Infectious Hazard Management Unit, WHO Health Emergency Department, WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean, Cairo, Egypt; ^e WHO Regional Office for the Americas, Washington DC, USA; ^f Global Influenza Programme, Influenza Preparedness and Response, Infectious Hazard Management, WHO Health Emergencies Cluster, World Health Organization, Geneva, Switzerland (Corresponding author: Patrick C. Reading, Patrick.Reading@influenzacentre.org).

Acknowledgements

We thank Jayde Simpson and Katie Milne at the Melbourne WHO CC for excellent administrative assistance in this project. The Melbourne WHO CC is supported by the Australian Government Department of Health. ■

type humain (MDCK-SIAT1) sont désormais utilisées dans de nombreux laboratoires, dont 3 des 25 laboratoires ayant participé à cette évaluation EQA, pour faciliter l'isolement du virus H3N2 (et d'autres virus grippaux).⁸ Les séries d'EQA futures devront comporter des échantillons reflétant mieux les difficultés associées à l'isolement et à la caractérisation des virus H3N2 les plus récents.

La participation aux programmes d'EQA s'inscrit de manière pertinente dans les fonctions essentielles des CNG et est importante pour établir la fiabilité des procédures de diagnostic et la capacité des laboratoires à fournir des résultats exacts, fiables et rapides. Elle permet aux laboratoires d'identifier les problèmes éventuels dans leurs pratiques et de prendre des mesures correctives; elle est en outre requise dans le cadre des systèmes de gestion de la qualité et de l'accréditation des laboratoires. Compte tenu de la diversité des protocoles et procédures d'isolement et d'identification des virus grippaux mis en œuvre par les laboratoires ayant participé à ce programme d'EQA, des commentaires individuels seront transmis aux laboratoires ayant fait état de difficultés dans l'isolement et/ou l'identification des virus grippaux lors de cette évaluation. Par exemple, des différences considérables ont été observées en ce qui concerne i) l'origine des modes opératoires normalisés appliqués pour l'isolement des virus, ii) les récipients de culture tissulaire employés pour l'isolement des virus (notons par exemple l'utilisation à la fois de flasques, de tubes et de plaques multipuits), et iii) les tests effectués pour détecter la croissance virale et identifier les virus présents dans les isolats dérivés des échantillons d'EQA. Outre les recommandations individuelles, la standardisation des réactifs et des protocoles est un moyen simple d'améliorer l'évaluation (et peut-être la performance) des CNG lors des futures séries d'EQA portant sur l'isolement et l'identification des virus en culture cellulaire.

Affiliations des auteurs

^a Centre collaborateur OMS de référence et de recherche pour la grippe, Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory at the Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, Melbourne, Victoria, Australie; ^b National Centre for Epidemiology and Population Health, The Australian National University, Canberra, Australie; ^c Gestion des risques infectieux, Programme OMS de gestion des situations d'urgence sanitaire, Bureau régional OMS de l'Afrique, Brazzaville, Congo; ^d Unité Gestion des risques infectieux, Département OMS de gestion des situations d'urgence sanitaire, Bureau régional OMS de la Méditerranée orientale, Le Caire, Égypte; ^e Bureau régional OMS des Amériques, Washington DC, États-Unis d'Amérique; ^f Programme mondial de lutte contre la grippe, Préparation et riposte à la grippe, Gestion des risques infectieux, Groupe OMS de gestion des situations d'urgence sanitaire, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse (auteur correspondant: Patrick C. Reading, Patrick.Reading@influenzacentre.org).

Remerciements

Nous tenons à remercier Jayde Simpson et Katie Milne, du CC de l'OMS à Melbourne, pour l'excellent soutien administratif apporté à ce projet. Le CC de l'OMS à Melbourne est soutenu par le Département de la Santé du Gouvernement australien. ■

⁸ Oh DY, Barr IG, Mosse JA et al. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2189–94.

⁸ Oh DY, Barr IG, Mosse JA et al. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2189–94.