



Contents

401 WHO external quality assessment project for the detection of subtype influenza A viruses by polymerase chain reaction – summary analysis, 2007 and 2008

412 Influenza

Sommaire

401 Projet OMS d'évaluation externe de la qualité du dépistage du virus grippal de type A par amplification génique – analyse récapitulative, 2007 et 2008

412 Grippe

WHO external quality assessment project for the detection of subtype influenza A viruses by polymerase chain reaction – summary analysis, 2007 and 2008

Introduction

For more than 50 years, National Influenza Centres (NICs)¹ have been the backbone of WHO's Global Influenza Surveillance Network and WHO's Global Influenza Programme. The centres collect specimens, conduct preliminary analyses and send representative virus isolates in a timely manner to WHO collaborating centres to support the annual recommendation of influenza vaccine composition for the next season. The tests used are mainly virus isolation and haemagglutination inhibition.

Since early 2004 the ongoing presence of the A(H5N1) strain of avian influenza has increased the need to include polymerase chain reaction (PCR) as part of the laboratory process in order to improve the accuracy and efficiency of diagnosis. PCR has become the principal laboratory test for detecting H5 infections, and it has facilitated patient management, outbreak response and pandemic preparedness.

Although many NICs had started using PCR prior to 2006, until that time no globally coordinated external quality assessment programme existed to monitor the quality and comparability of laboratories' performance. WHO's external quality assessment project for the detection of influenza virus type A by PCR was established to improve the global laboratory capacity for diagnosing both seasonal influenza and avian influenza. It specifically aims to monitor the quality and standards of performance of NICs and other influ-

Projet OMS d'évaluation externe de la qualité du dépistage du virus grippal de type A par amplification génique – analyse récapitulative, 2007 et 2008

Introduction

Depuis plus de 50 ans, les centres nationaux de lutte contre la grippe (NIC)¹ sont les piliers du Réseau mondial OMS de surveillance de la grippe et du Programme mondial OMS de lutte contre la grippe. Ils recueillent les échantillons, effectuent les analyses préliminaires et envoient les isolaments de virus représentatifs en temps voulu aux centres collaborateurs de l'OMS afin d'aider à l'établissement de la composition du vaccin antigrippal recommandée chaque année pour la saison suivante. Les épreuves utilisées sont principalement l'isolement viral et l'inhibition de l'hémagglutination.

Depuis début 2004, la présence continue de la souche A(H5N1) du virus de la grippe aviaire a accru la nécessité d'inclure l'amplification génique (PCR) dans les méthodes de laboratoire afin d'améliorer l'exactitude et l'efficacité du diagnostic. La PCR est devenue la principale épreuve de dépistage des infections à virus H5, et elle a facilité la prise en charge des malades, la riposte aux flambées et la préparation à une pandémie.

Bien que de nombreux NIC aient commencé à utiliser la PCR avant 2006, jusque-là aucun programme coordonné d'évaluation externe de la qualité n'existait pour surveiller la qualité et la comparabilité des résultats obtenus par les différents laboratoires. Le projet OMS d'évaluation externe de la qualité du dépistage du virus grippal de type A par PCR a été créé pour renforcer à l'échelle mondiale les moyens de laboratoire destinés au diagnostic de la grippe saisonnière et de la grippe aviaire. Il vise plus particulièrement à surveiller la qualité et les normes d'exécution du dépistage

WORLD HEALTH
ORGANIZATION
Geneva

ORGANISATION MONDIALE
DE LA SANTÉ
Genève

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

11.2008
ISSN 0049-8114
Printed in Switzerland

¹ A list of NICs can be found at <http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/index.html>.

¹ On trouvera une liste des centres nationaux de lutte contre la grippe à l'adresse suivante: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/index.html>.

enza laboratories in detecting influenza A virus subtypes using PCR as well as to promote good laboratory practice.

Coordinated by WHO's Global Influenza Programme, based at WHO's headquarters, the external quality assessment project is being conducted by the WHO reference laboratory for diagnosis of influenza A/H5 infection, National Influenza Centre, Centre for Health Protection, Hong Kong, Special Administrative Region of China (Hong Kong SAR), with support from WHO's collaborating centres on influenza, other influenza A/H5 reference laboratories and WHO regional offices.

This report summarizes the results of laboratories that participated in the assessment exercise by analysing 4 influenza test panels dispatched over a 2-year period from 2007 to 2008.

Preparation of panels

Panels sent to participating laboratories consisted of vacuum-dried RNA specimens extracted from influenza A(H1N1), A(H3N2) and A(H5N1) viruses. Prior to dispatch, the panels were tested by 7 laboratories in Hong Kong SAR to assess sample quality and homogeneity. To assess the effects of storage and transportation at ambient temperature, samples were tested after 7 days of storage at 37 °C using both conventional and real-time PCR assays² to confirm sample stability. The samples were quantified by real-time PCR assay using known synthetic RNA standards.

Composition of panels

The 4 panels consisted of coded samples containing RNA at different concentrations from 5 strains representing different genetic clades (1 and 2) of influenza A(H5N1) viruses, A(H1N1) viruses and A(H3N2) viruses. Samples that contained no virus were also included. Details of the composition of the panels are shown in *Table 1*. Participants were instructed to reconstitute each sample with the provided reconstitution buffer prior to testing. Additionally, a questionnaire was included to obtain information on detection methods used, target genes tested and primer and probe sequences employed.

Distribution of panels and response of participants

NICs and other national influenza laboratories were invited to participate before the panels were dispatched. Panel 1 was dispatched between February 2007 and March 2007; panel 2 was dispatched between August 2007 and October 2007; panel 3 was dispatched between January 2008 and February 2008; and panel 4 was dispatched between June 2008 and July 2008. All panels were dispatched from the Centre for Health Protection in Hong Kong SAR at ambient temperature by courier service to participating laboratories in all 6 WHO regions.

² *Recommendations and laboratory procedures for detection of influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases*. Geneva, World Health Organization, 2007 (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RecAlllabtestsAug07.pdf, accessed 22 October 2008). See recommendations on conventional RT-PCR and real-time RT-PCR.

des sous-types du virus grippal A au moyen de la PCR appliquées par les NIC et autres laboratoires, ainsi qu'à promouvoir de bonnes pratiques de laboratoire.

Coordonné par le Programme mondial OMS de lutte contre la grippe et basé au Siège de l'OMS, ce projet d'évaluation externe de la qualité est mené par le laboratoire OMS de référence pour le diagnostic de l'infection à virus grippal A/H5, Centre national de lutte contre la grippe, Centre de protection de la santé, Hong Kong, région administrative spéciale de la Chine (Hong Kong RAS), avec l'aide des centres collaborateurs OMS pour la grippe, des autres laboratoires de référence pour la grippe A/H5 et des bureaux régionaux de l'OMS.

Le présent rapport récapitule les résultats des laboratoires ayant participé à l'exercice d'évaluation en analysant 4 séries d'échantillons grippaux répartis sur une période de 2 ans s'étendant de 2007 à 2008.

Préparation des séries d'échantillons

Les séries d'échantillons envoyées aux laboratoires participants étaient composées d'échantillons d'ARN extraits par le vide des virus grippaux A(H1N1), A(H3N2) et A(H5N1). Avant de les distribuer, ces séries d'échantillons ont été testées par 7 laboratoires de Hong Kong (région administrative spéciale de Chine) afin d'évaluer la qualité et l'homogénéité des échantillons. Pour apprécier les effets du stockage et du transport à température ambiante, ceux-ci ont été testés au bout de 7 jours de stockage à 37°C au moyen de la PCR classique et de la PCR en temps réel afin de confirmer la stabilité des échantillons. Ces derniers ont été quantifiés par la PCR en temps réel² à l'aide d'étalons d'ARN de synthèse connus.

Composition des séries d'échantillons

Les 4 séries étaient composées d'échantillons codés contenant différentes concentrations d'ARN provenant de 5 souches représentant différents clades génétiques (1 et 2) des virus grippaux A(H5N1), A(H1N1) et A(H3N2). Des échantillons ne contenant aucun virus y ont également été inclus. Le détail de la composition des séries figure dans le *Tableau 1*. Les laboratoires participants ont reçu pour instruction de reconstituer chaque échantillon avec le tampon de reconstitution fourni avant de les tester. De plus, un questionnaire a été joint afin d'obtenir des renseignements sur les méthodes de dépistage utilisées, les gènes cibles recherchés et les séquences des amorces et des sondes employées.

Distribution des séries d'échantillons et réponse des participants

Les NIC et les autres laboratoires nationaux de la grippe ont été invités à participer avant que les séries d'échantillons n'aient été expédiées. La 1^{re} série a été envoyée entre février 2007 et mars 2007; la 2^e entre août 2007 et octobre 2007; la 3^e entre janvier 2008 et février 2008; et la 4^e entre juin 2008 et juillet 2008. Toutes ces séries d'échantillons ont été envoyées à température ambiante aux laboratoires participants situés dans les 6 Régions de l'OMS par le Centre de protection de la santé de Hong Kong RAS qui a fait appel pour cela à une société d'acheminement rapide.

² *Recommendations and laboratory procedures for detection of influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2007 (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RecAlllabtestsAug07.pdf, consulté le 22 octobre 2008). Voir les recommandations relatives à la RT-PCR classique et à la RT-PCR en temps réel.

Table 1 **Overall results of analysis of influenza panels for external quality assessment, 2007 and 2008**
 Tableau 1 **Résultats globaux de l'analyse des séries d'échantillons grippaux pour l'évaluation externe de la qualité, 2007 et 2008**

Influenza A subtype – Sous-type de la grippe A	Clade ^a –	Panel 1 – Série 1			Panel 2 – Série 2			Panel 3 – Série 3			Panel 4 – Série 4		
		Sample number – Numéro d'échantillon	Copies/ μL^b – Exemples/ μL^b	No. (%) of laboratories that correctly identified sample – Nombre (%) de laboratoires ayant identifié correctement l'échantillon	Sample no. – Numéro d'échantillon	Copies/ μL^b – Exemples/ μL^b	No. (%) of laboratories that correctly identified sample – Nombre (%) de laboratoires ayant identifié correctement l'échantillon	Sample no. – Numéro d'échantillon	Copies/ μL^b – Exemples/ μL^b	No. (%) of laboratories that correctly identified sample – Nombre (%) de laboratoires ayant identifié correctement l'échantillon	Sample no. – Numéro d'échantillon	Copies/ μL^b – Exemples/ μL^b	No. (%) of laboratories that correctly identified sample – Nombre (%) de laboratoires ayant identifié correctement l'échantillon
H5N1	1	–	–	–	2007-11	1.629 x 10 ⁵	79 (95)	2008-05	1.103 x 10 ³	85 (89)	2008-11	1.044 x 10 ³	104 (95)
H5N1	1	–	–	–	2007-19	2.552 x 10 ³	76 (92)	–	–	–	–	–	–
H5N1	2.1	2007-03	3.283 x 10 ⁴	57 (89)	2007-16	2.866 x 10 ⁵	79 (95)	2008-01	2.783 x 10 ⁴	88 (93)	2008-13	1.160 x 10 ⁴	105 (96)
H5N1	2.1	2007-09	3.559 x 10 ³	53 (83)	2007-20	2.552 x 10 ³	75 (90)	–	–	–	–	–	–
H5N1	2.2	2007-06	7.274 x 10 ⁴	58 (91)	2007-23	3.210 x 10 ⁴	80 (96)	2008-02	8.343 x 10 ⁴	90 (95)	2008-15	4.957 x 10 ⁴	104 (95)
H5N1	2.2	2007-02	3.744 x 10 ³	55 (86)	2007-14	1.642 x 10 ³	77 (93)	–	–	–	–	–	–
H5N1	2.3.2	–	–	–	–	–	–	2008-07	3.727 x 10 ⁴	89 (94)	2008-12	1.077 x 10 ⁴	103 (94)
H5N1	2.3.2	–	–	–	–	–	–	2008-09	4.313 x 10 ⁴	89 (94)	2008-16	2.590 x 10 ⁴	104 (95)
H5N1	2.3.4	2007-01	1.596 x 10 ⁴	56 (88)	2007-22	1.458 x 10 ⁴	77 (93)	2008-03	6.520 x 10 ⁴	89 (94)	2008-17	4.210 x 10 ⁴	105 (96)
H5N1	2.3.4	2007-07	1.888 x 10 ³	53 (83)	2007-12	1.360 x 10 ³	76 (92)	–	–	–	–	–	–
H1N1	NA – SO	2007-04	1.587 x 10 ⁵	57 (89)	2007-17	4.067 x 10 ⁴	74 (89)	2008-06	3.407 x 10 ⁴	83 (87)	2008-14	5.113 x 10 ³	93 (85)
H3N2	NA – SO	2007-08	3.063 x 10 ⁴	57 (89)	2007-13	7.960 x 10 ³	73 (88)	2008-10	2.173 x 10 ⁴	84 (88)	2008-18	1.163 x 10 ⁴	96 (88)
Negative – Négatif	NA – SO	2007-05	NA – SO	59 (92)	2007-15	NA – SO	81 (98)	2008-04	NA – SO	94 (99)	2008-19	NA – SO	104 (95)
Negative – Négatif	NA – SO	2007-10	NA – SO	60 (94)	2007-18	NA – SO	80 (96)	2008-08	NA – SO	93 (98)	2008-20	NA – SO	107 (98)
Negative – Négatif	NA – SO	–	–	–	2007-21	NA – SO	80 (96)	–	–	–	–	–	–
Negative – Négatif	NA – SO	–	–	–	2007-24	NA – SO	82 (99)	–	–	–	–	–	–

NA, not applicable. (–), not included in the panel. – SO, sans objet. (–), ne figurant pas dans la série.

^a The nomenclature for phylogenetic relationships was based on the HA genes of H5N1 viruses (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html). – La nomenclature des rapports phylogénétiques a été basée sur les gènes HA des virus H5N1 (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html).

^b Measured by real-time polymerase chain reaction after 5 days of storage of viral RNA at 25 °C. – Mesurés par amplification génique en temps réel après stockage de l'ARN viral à 25°C pendant 5 jours.

Participating laboratories were requested to notify the Centre for Health Protection immediately on receipt of the panel, either by fax or e-mail, and to return their results within 1 month. Each laboratory was assigned a participant identity code known only to the Centre for Health Protection and the Global Influenza Programme. Laboratories that did not respond within the specified time frame were reminded by e-mail. A preliminary report, including correct results, was sent to participants shortly after the closing date for each panel.

Results for panel 1 were reported by 64 laboratories from 54 countries, areas or territories; results for panel 2 were reported by 83 laboratories from 66 countries, areas or territories; results for panel 3 were reported by 95 laboratories from 77 countries, areas or territories.

Il a été demandé aux laboratoires participants d'avertir, par télécopie ou par courrier électronique, le Centre de protection de la santé dès réception des échantillons et de renvoyer leurs résultats dans le mois qui suivait. Chaque laboratoire s'est vu attribuer un code d'identité, connu seulement du Centre de protection de la santé et du Programme mondial de lutte contre la grippe. Les laboratoires qui n'ont pas renvoyé leurs résultats dans les délais ont reçu un courrier électronique de rappel. Un rapport préliminaire, renfermant les bons résultats, a été envoyé aux participants peu après la date de clôture fixée pour chaque série d'échantillons.

Pour la 1^{re} série, des résultats ont été notifiés par 64 laboratoires de 54 pays, zones ou territoires; pour la 2^e, ils ont été notifiés par 83 laboratoires de 66 pays, zones ou territoires; pour la 3^e, par 95 laboratoires de 77 pays, zones ou territoires; et pour la 4^e, par 109 laboratoires de 83 pays, zones ou territoires.

ries; and results for panel 4 were reported by 109 laboratories from 83 countries, areas or territories. Details are shown in *Table 2* and *Table 3*. Most participants received the panels within 1 week (panel 1, 81% received within 1 week; panel 2, 87%; panel 3, 86%; panel 4, 85%). Across all 4 panels, nearly half (47%) of participating laboratories were situated in WHO's European Region; 9% were in the African Region; 15% were in the Region of the Americas; 5% were in the Eastern Mediterranean Region; 5% in the South-East Asia Region; and 19% in the Western Pacific Region.

Results

All results returned before the closing date for each panel were included in the analysis, and a full report on laboratories' performance on the panel was sent to all participating laboratories within 1 month after release of the preliminary report.

This assessment required qualitative results (that is, positive or negative) of the target genes tested; quantitative results (that is, copies/ μ L and threshold cycle value) were used only for reference. The performance of individual laboratories was assessed by adding up

Le *Tableau 2* et le *Tableau 3* en montrent le détail. La plupart des laboratoires ont reçu les séries d'échantillons dans la semaine suivant leur envoi (série 1, 81% d'entre eux l'ont reçue dans la semaine; série 2, 87%; série 3, 86%; série 4, 85%). Pour l'ensemble des 4 séries, près de la moitié des laboratoires participants (47%) étaient situés dans la Région européenne de l'OMS; 9% dans la Région africaine; 15% dans la Région des Amériques; 5% dans la Région de la Méditerranée orientale; 5% dans la Région de l'Asie du Sud Est; et 19% dans la Région du Pacifique occidental.

Résultats

Tous les résultats renvoyés avant la date de clôture fixée pour chaque série ont été inclus dans l'analyse et un rapport complet des résultats des laboratoires pour ces séries a été adressé à tous les laboratoires participants dans le mois suivant la diffusion du rapport préliminaire.

Cette évaluation demandait des résultats qualitatifs (c'est-à-dire, positifs ou négatifs) pour les gènes cibles testés; des résultats quantitatifs (c'est-à-dire, le nombre d'exemplaires/ μ l et la valeur seuil pour le cycle) n'ont été utilisés que pour référence. Les résultats de chaque laboratoire ont été évalués en faisant la

Table 2 **Laboratories' responses to invitation to participate in external quality assessment for detection of influenza virus, 2007 and 2008**
Tableau 2 **Réponses des laboratoires à l'invitation à participer à l'évaluation externe de la qualité du dépistage du virus grippal, 2007 et 2008**

WHO region – Région OMS	No. of laboratories – Nombre de laboratoires											
	Invited – Invités				Received samples – Ayant reçu des échantillons				Reported results – Ayant rapporté des résultats			
	Panel 1 – Série 1	Panel 2 – Série 2	Panel 3 – Série 3	Panel 4 – Série 4	Panel 1 – Série 1	Panel 2 – Série 2	Panel 3 – Série 3	Panel 4 – Série 4	Panel 1 – Série 1	Panel 2 – Série 2	Panel 3 – Série 3	Panel 4 – Série 4
African – Africaine	10	11	12	19	6	8	9	16	6	6	8	13
Americas – Amériques	26	28	28	27	6	16	19	22	5	14	16	21
Eastern Mediterranean – Méditerranée orientale	8	9	9	10	2	5	6	7	2	4	6	6
European – Européenne	50	51	53	52	35	40	43	45	34	39	43	45
South-East Asia – Asie du Sud-Est	9	9	10	8	3	4	5	6	3	4	5	5
Western Pacific – Pacifique occidental	19	21	20	21	15	17	17	19	14	16	17	19
Total	122	129	132	137	67	90	99	115	64	83	95	109

Table 3 **Performance of laboratories analysing panels of influenza virus for external quality assessment, 2007 and 2008**
Tableau 3 **Résultats des laboratoires ayant analysé des séries d'échantillons de virus grippaux pour l'évaluation externe de la qualité, 2007 et 2008**

Performance – Résultats	No. (%) of laboratories – Nombre (%) de laboratoires			
	Panel 1 (n=64) – Série 1 (n=64)	Panel 2 (n=83) – Série 2 (n=83)	Panel 3 (n=95) – Série 3 (n=95)	Panel 4 (n=109) – Série 4 (n=109)
All samples correct – Bons pour tous les échantillons	43 (67)	54 (65)	70 (74)	84 (77)
All but 1 sample correct – Bons pour tous les échantillons sauf 1	6 (9)	14 (17)	10 (11)	11 (10)
50–89% of samples correct – Bons pour 50–89% des échantillons	9 (14)	12 (14)	11 (12)	10 (9)
<50% of samples correct – Bons pour <50% des échantillons	6 (9)	3 (4)	4 (4)	4 (4)

the number of correct results. The following standards were used when assessing laboratories' results:

- (i) failing to detect H5 samples and/or reporting the results as non-H5 subtype were recorded as an incorrect response;
- (ii) failing to detect H1 samples and/or reporting the results as non-H1 subtype were recorded as an incorrect response;
- (iii) failing to detect H3 samples and/or reporting the results as non-H3 subtype were recorded as an incorrect response;
- (iv) failing to report correct influenza A test results for H1/H3 samples if H1/H3 subtyping was not performed was recorded as an incorrect response;
- (v) reporting positive results for a sample that did not contain any viral RNA was recorded as an incorrect response.

Performance of the laboratories

Panel 1

A total of 43 participants returned correct results for all 10 samples in panel 1 (*Table 3*). An additional 6 participants returned correct results for 9 samples and 9 participants for 5–8 samples; 6 participants returned correct results for less than half of the samples.

For the 2 negative samples (denoted as 2007-5 and 2007-10), 9 participants reported positive results. The corresponding false-positive rates were 8% and 6%, respectively (*Table 1*).

The 3 strongly positive H5 samples that contained higher concentrations of viral RNA (denoted 2007-1, 2007-6, 2007-3) were correctly reported by 56 (88%) participants, 58 (91%) and 57 (89%), respectively. The 3 less strongly positive H5 samples (denoted 2007-7, 2007-2, 2007-9) were correctly reported by 53 (83%), 55 (86%) and 53 (83%) participants, respectively.

The 1 sample of H1 and 1 sample of H3 were correctly reported by 57 (89%) participants.

Panel 2

A total of 54 participants returned correct results for all 14 samples (*Table 3*). An additional 14 participants returned correct results for 13 samples and 12 participants for 8–12 samples; 3 participants returned correct results for less than half of the samples.

For the 4 negative samples (2007-15, 2007-18, 2007-21, 2007-24), 5 participants reported positive results. The corresponding false-positive rates were 2% for 2007-15, 4% for 2007-18, 4% for 2007-21 and 1% for 2007-24 (*Table 1*).

The 4 samples of H5 with higher concentrations (2007-11, 2007-22, 2007-23, 2007-16) were correctly reported by 79 (95%), 77 (93%), 80 (96%) and 79 (95%) participants, respectively. The 4 samples of H5 with lower concentrations (2007-19, 2007-12, 2007-14, 2007-20) were correctly reported by 76 (92%), 76 (92%), 77 (93%) and 75 (90%) participants, respectively.

somme des bons résultats obtenus. Les règles qui suivent ont été appliquées lors de l'évaluation des résultats des laboratoires:

- i) la non-détection des échantillons H5 et/ou la notification des résultats comme n'appartenant pas au sous-type H5 ont été considérées comme une réponse fautive;
- ii) la non-détection des échantillons H1 et/ou la notification des résultats comme n'appartenant pas au sous-type H1 ont été considérées comme une réponse fautive;
- iii) la non-détection des échantillons H3 et/ou la notification des résultats comme n'appartenant pas au sous-type H3 ont été considérées comme une réponse fautive;
- iv) l'impossibilité de faire état des bons résultats pour les échantillons H1/H3 de la grippe A si le sous typage H1/H3 n'avait pas été effectué a été considérée comme une réponse fautive;
- v) la notification de résultats positifs pour un échantillon qui ne contenait aucun ARN viral a été considérée comme une réponse fautive.

Résultats des laboratoires

Série 1

Quarante-trois laboratoires participants au total ont renvoyé de bons résultats pour les 10 échantillons de la série 1 (*Tableau 3*). Six autres ont renvoyé de bons résultats pour 9 échantillons et 9 laboratoires pour 5 à 8 échantillons; 6 laboratoires ont renvoyé de bons résultats pour moins de la moitié des échantillons.

Pour les 2 échantillons négatifs (2007-5 et 2007-10), 9 laboratoires participants ont rapporté des résultats positifs. Les taux de faux-positifs correspondants ont été de 8% et 6%, respectivement (*Tableau 1*).

Les 3 échantillons H5 fortement positifs qui contenaient des concentrations plus élevées d'ARN viral (2007-1, 2007-6, 2007-3) ont été correctement analysés par 56 (88%), 58 (91%) et 57 (89%) laboratoires participants, respectivement. Les 3 échantillons H5 moins fortement positifs (2007-7, 2007-2, 2007-9) ont été correctement analysés par 53 (83%), 55 (86%) et 53 (83%) laboratoires participants, respectivement.

Les échantillons uniques des souches H1 et H3 ont été correctement analysés par 57 (89%) laboratoires participants.

Série 2

Cinquante-quatre laboratoires participants au total ont renvoyé de bons résultats pour les 14 échantillons (*Tableau 3*). Quatorze autres ont renvoyé de bons résultats pour 13 échantillons et 12 laboratoires pour 8 à 12 échantillons; 3 laboratoires ont renvoyé de bons résultats pour moins de la moitié des échantillons.

Pour les 4 échantillons négatifs (2007-15, 2007-18, 2007-21, 2007-24), 5 laboratoires participants ont fait état de résultats positifs. Les taux de faux-positifs correspondants ont été de 2% pour le 2007-15, de 4% pour le 2007-18, de 4% pour le 2007-21 et de 1% pour le 2007-24 (*Tableau 1*).

Les 4 échantillons d'ARN de la souche H5 ayant des concentrations plus élevées (2007-11, 2007-22, 2007-23, 2007-16) ont été correctement analysés par 79 (95%), 77 (93%), 80 (96%) et 79 (95%) laboratoires participants, respectivement. Les 4 échantillons de H5 renfermant des concentrations plus faibles (2007-19, 2007-12, 2007-14, 2007-20) ont été correctement analysés par 76 (92%), 76 (92%), 77 (93%) et 75 (90%) laboratoires participants, respectivement.

The 1 sample of H1 and the 1 sample of H3 were correctly reported by 74 (89%) and 73 (88%) participants, respectively.

Panel 3

A total of 70 participants returned correct results for all 10 samples (*Table 3*). An additional 10 participants returned correct results for 9 samples and 11 participants for 6–8 samples; 4 participants returned correct results for less than half of the samples.

For the 2 negative samples (2008-04, 2008-08), 2 participants reported positive results. The corresponding false-positive rates were 1% and 2%, respectively (*Table 1*).

The 4 samples of H5 (2008-05, 2008-01, 2008-02, 2008-03) were correctly reported by 85 (89%), 88 (93%), 90 (95%) and 89 (94%) participants, respectively. For the 2 duplicate H5 samples (2008-07, 2008-09), the performance of the participants was consistent: both were correctly reported by 89 (94%) participants.

The 1 sample of H1 and the 1 sample of H3 were correctly reported by 83 (87%) and 84 (88%) participants, respectively.

Panel 4

A total of 84 participants returned correct results for all 10 samples (*Table 3*). An additional 11 participants returned correct results for 9 samples and 10 participants for 6–8 samples; 4 participants returned correct results for less than half of the samples.

For the 2 negative samples (2008-19, 2008-20), 6 participants reported positive results. The corresponding false-positive rates were 5% and 2%, respectively (*Table 1*).

The 4 samples of H5 with a single concentration (2008-11, 2008-13, 2008-15, 2008-17) were correctly reported by 104 (95%), 105 (96%), 104 (95%) and 105 (96%) participants, respectively. For the clade 2.3.2 strain with higher and lower concentrations (2008-16 and 2008-12, respectively), correct results were reported by 104 (95%) and 103 (94%) participants, respectively.

The 1 sample of H1 and the 1 sample of H3 were correctly reported by 93 (85%) and 96 (88%) participants, respectively.

Methods of detection

To allow further comparison of performance and its relationship to the PCR method used, information on assay designs that may affect test results was obtained from participants for comprehensive review and analysis.

There were considerable variations in the PCR protocols applied by participants. For primers and probes for the H5 gene alone, the responding laboratories cited as many as 35 different references for their detection methods. The details on target genes, detection methods and sources of the primers and probes were included

Les échantillons uniques des souches H1 et H3 ont été correctement analysés par 74 (89%) et 73 (88%) laboratoires participants, respectivement.

Série 3

Soixante-dix participants au total ont renvoyé de bons résultats pour les 10 échantillons (*Tableau 3*). Dix autres ont renvoyé de bons résultats pour 9 échantillons et 11 laboratoires pour 6 à 8 échantillons; 4 laboratoires participants ont envoyé de bons résultats pour moins de la moitié des échantillons.

Pour les 2 échantillons négatifs (2008-04, 2008-08), 2 laboratoires ont rapporté des résultats positifs. Les taux de faux-positifs correspondants ont été respectivement de 1% et 2% (*Tableau 1*).

Les 4 échantillons de H5 (2008-05, 2008-01, 2008-02, 2008-03) ont été correctement analysés par 85 (89%), 88 (93%), 90 (95%) et 89 (94%) laboratoires participants, respectivement. Pour les 2 échantillons identiques de H5 (2008-07, 2008-09), les résultats des laboratoires ont été homogènes: 89 (94%) d'entre eux les ont correctement analysés.

Les échantillons uniques des souches de H1 et H3 ont été correctement analysés par 83 (87%) et 84 (88%) des laboratoires participants, respectivement.

Série 4

Quatre-vingt-quatre laboratoires au total ont renvoyé de bons résultats pour les 10 échantillons (*Tableau 3*). Onze autres ont renvoyé de bons résultats pour 9 échantillons et 10 laboratoires pour 6 à 8 échantillons; 4 laboratoires participants ont renvoyé de bons résultats pour moins de la moitié des échantillons.

Pour les 2 échantillons négatifs (2008-19, 2008-20), 6 laboratoires ont fait état de résultats positifs. Les taux de faux-positifs correspondants ont été respectivement de 5% et 2% (*Tableau 1*).

Les 4 échantillons de H5 ayant une même concentration (2008-11, 2008-13, 2008-15, 2008-17) ont été correctement analysés par 104 (95%), 105 (96%), 104 (95%) et 105 (96%) laboratoires, respectivement. Pour les souches du clade 2.3.2 renfermant des concentrations plus élevées ou plus faibles (2008-16 et 2008-12, respectivement), de bons résultats ont été rapportés par 104 (95%) et 103 (94%) laboratoires, respectivement.

Les échantillons uniques des souches H1 et H3 ont été correctement analysés par 93 (85%) et 96 (88%) des laboratoires, respectivement.

Méthodes de dépistage

Pour permettre une comparaison plus poussée des résultats obtenus et du rapport de ces derniers avec la méthode PCR utilisée, on a obtenu des renseignements sur les protocoles d'épreuve pouvant modifier les résultats des tests auprès des laboratoires participants afin de procéder à un examen et à une analyse exhaustifs.

On a constaté des variations considérables dans les protocoles de PCR appliqués par les laboratoires. Pour les seules amorces et sondes du gène H5, les laboratoires ayant répondu ont cité jusqu'à 35 références différentes pour leurs méthodes de détection. Les informations relatives aux gènes cibles, aux méthodes de détection et aux sources d'amorces et de sondes figuraient

in the summary report distributed to all participants together with the results of the analysis.

The target most often used to detect influenza type A viruses was the M gene. Other targets, such as the NS and NP genes, were also used. A minority of participants also performed PCR to detect influenza type B viruses.

For panel 2, panel 3 and panel 4, almost all participants performed H5 subtyping, and >80% of participants reported using H1 and H3 gene targets to subtype influenza type A viruses. Subtyping of the H7 gene was performed by 2–13% participants, of the H9 gene by 1–6% participants, of the N1 gene by 24–37% of participants and of the N2 gene by 14–28% of participants.

The nucleic acid amplification tests used mainly had been developed in-house, and primers and probes were most commonly adapted from other researchers. Commercial kits were used by 11–21% of participants to detect A/M, H5 and N1 genes; commercial kits were rarely used to detect H1, H3 and H7 genes.

Detection methods were based on either conventional PCR or real-time PCR. For panel 2 and panel 3, real-time detection was most often used for A/M and H5 genes; conventional PCR was most often used for H1 and H3 genes. For panel 4, real-time detection was most often used for A/M, H5, H1 and H3 genes.

Comparison of laboratories' performance on all panels

During a 2-year period from 2007 to 2008, the proportion of participants with entirely correct results increased from 65% to 77%, whereas the proportion of participants with incorrect H5 subtyping fell from 23% to 12% and false-positive results fell from 14% to 6% (Table 4). False-positive results for negative samples remained at <10% from panel 2 onward. Of the 868 tests performed on negative samples (panel 1, 128 tests; panel 2, 332 tests; panel 3, 190 tests; panel 4, 218 tests), 32 (3.7%) tests were false-positives; the most frequent false-positive results reported were for influenza A virus subtype H5 (Table 5).

To evaluate the overall performance of participants across the panels, results were categorized as "good"

dans le rapport récapitulatif distribué à tous les laboratoires participants, avec les résultats de l'analyse.

La cible la plus souvent employée pour dépister les virus grippaux de type A est le gène M. D'autres cibles telles que les gènes NS et NP, ont également été utilisées. Une minorité de laboratoires participants a également effectué une PCR afin de détecter des virus grippaux de type B.

Pour les 2^e, 3^e et 4^e séries, presque tous les laboratoires participants ont effectué un sous-typage H5 et >80% d'entre eux ont rapporté avoir utilisé des cibles géniques H1 et H3 pour le sous-typage des virus grippaux de type A. Le sous-typage du gène H7 a été effectué par 2 à 13% des laboratoires, celui du gène H9 par 1 à 6% des laboratoires, celui du gène N1 par 24 à 37% des laboratoires et celui du gène N2 par 14 à 28% des laboratoires.

Les tests d'amplification de l'acide nucléique employés avaient principalement été élaborés sur place, et les amorces et les sondes très communément adaptées à partir de celles d'autres chercheurs. Des nécessaires d'épreuves trouvés dans le commerce ont été utilisés par 11 à 21% des laboratoires participants pour détecter les gènes A/M, H5 et N1, mais rarement pour détecter les gènes H1, H3 et H7.

Les méthodes de dépistage ont basées soit sur la PCR classique, soit sur la PCR en temps réel. Pour la 2^e et la 3^e séries, la PCR en temps réel a été très souvent employée pour les gènes A/M et H5; en revanche, c'est la PCR classique qui a été le plus souvent utilisée pour les gènes H1 et H3. Concernant la 4^e série, c'est la PCR en temps réel qui a été le plus souvent employée pour les gènes A/M, H5, H1 et H3.

Comparaison des résultats des laboratoires pour l'ensemble des séries

Au cours des 2 ans écoulés de 2007 à 2008, la proportion des laboratoires participants ayant des résultats entièrement bons est passée de 65% à 77%, tandis que celle des laboratoires ayant réalisé un mauvais sous-typage H5 a chuté, passant de 23% à 12%, et que les faux-positifs sont passés de 14% à 6% (Tableau 4). Pour les échantillons négatifs, les faux-positifs sont restés <10% à partir de la 2^e série et jusqu'à la dernière. Sur les 868 tests effectués sur des échantillons négatifs (série 1, 128 tests; série 2, 332 tests; série 3, 190 tests; série 4, 218 tests), 32 (3,7%) étaient des faux-positifs; les faux-positifs les plus fréquemment rapportés l'ont été pour le sous-type H5 du virus grippal A (Tableau 5).

Afin d'évaluer les résultats globaux des laboratoires participants pour l'ensemble des séries, on a rangé les résultats comme étant

Table 4 **Testing errors committed by laboratories participating in analysis of influenza samples for external quality assessment, 2007 and 2008**

Tableau 4 **Erreurs commises lors des tests par les laboratoires participants à l'analyse des échantillons grippaux pour l'évaluation externe de la qualité, 2007 et 2008**

Comparison factors – Facteurs de comparaison	No. (%) panel 1 (n=64) – Nombre (%) série 1 (n=64)	No. (%) panel 2 (n=83) – Nombre (%) série 2 (n=83)	No. (%) panel 3 (n=95) – Nombre (%) série 3 (n=95)	No. (%) panel 4 (n=109) – Nombre (%) série 4 (n=109)
All correct – Tous bons	43 (67)	54 (65)	70 (74)	84 (77)
Incorrect H5 results – Résultats faux pour H5	15 (23)	17 (20)	17 (18)	13 (12)
Incorrect H1, H3 subtyping results or incorrect influenza A typing results – Résultats du sous-typage H1, H3 faux ou résultats du typage de la grippe A faux	14 (22)	19 (23)	19 (20)	21 (19)
False-positive results – Faux-positifs	9 (14)	5 (6)	2 (2)	6 (6)

Table 5 **False-positive results obtained by laboratories participating in analysis of influenza samples for external quality assessment, 2007 and 2008**

Tableau 5 **Faux-positifs obtenus par les laboratoires participant à l'analyse des échantillons grippaux pour l'évaluation externe de la qualité, 2007 et 2008**

False-positive results – Faux-positifs	No. (%) of tests (n=32) – Nombre (%) de tests (n=32)
Influenza A virus subtype H5 – Sous-type H5 du virus grippal A	12 (38)
Influenza A virus positive – Positif pour le virus grippal A	7 (22)
Influenza A virus subtype H3 – Sous-type H3 du virus grippal A	5 (16)
Influenza A virus subtype H1 – Sous-type H1 du virus grippal A	5 (16)
Influenza B virus positive – Positif pour le virus grippal B	2 (6)
Influenza A virus subtype H3 and H5 – Sous-types H3 et H5 du virus grippal A	1 (3)

when $\geq 90\%$ were correct and “less good” where $< 90\%$ were correct. When all panels were compared, the proportion of participants returning less good results fell from 23% to 13% (Table 3). The improvement in results could be attributed to participation in earlier panels. Of 15 laboratories returning less good results for panel 1, 12 participated in all panels; the number classified as having less good results decreased from 12 to 4 for panel 2 and from 4 to 2 for panel 3; it remained 2 for panel 4.

A total of 44 laboratories returned less good results for ≥ 1 of the panels; 8 laboratories participated in only 1 panel; the remaining 36 laboratories participated in > 1 panel. These 36 participants were categorized as belonging to 1 of 3 groups according to their performance record: as an “improved performer” (participant returned less good results in earlier panel or panels but good results in a later panel or panels), a “fluctuating performer” (participant returned good results in an earlier panel or panels but less good results in a later panel or panels) or a “persistently poor performer” (participant returned less good results in all panels). In total, 22 laboratories were classified as improved performers, 12 as fluctuating and 2 as persistently poor.

The improvement in H5 subtyping was evident when results for samples with the same concentration were compared. For H1 and H3 subtyping, it appears there is still room for improvement (Table 1).

For all 4 panels, the percentage of laboratories returning all correct results in the European Region was $> 70\%$, but in the African Region and the Eastern Mediterranean Region the percentages remained $< 70\%$ (Fig. 1). The sharp decline ($> 15\%$) in performance in the Region of the Americas and the South-East Asia Region on panel 2 was probably due to the large number of first-time participants; a similar situation occurred in the African Region for panel 3 and panel 4 (Table 6). For panel 4, the performance of the South-East Asia and Western Pacific regions was comparable to that of the European Region.

Factors affecting performance

There was considerable variation in the PCR protocols applied by participants. Because of the multitude of test procedures used by a small number of participants, a meaningful statistical analysis to determine whether 1 individual protocol is significantly better than others

«bons» lorsque $\geq 90\%$ d'entre eux étaient corrects et comme «moins bons» lorsque $< 90\%$ d'entre eux étaient corrects. Lorsque l'on a comparé toutes les séries, la proportion de laboratoires ayant envoyé des résultats moins bons a chuté, passant de 23% à 13% (Tableau 3). L'amélioration des résultats a pu être attribuée à la participation aux séries antérieures. Sur 15 laboratoires ayant envoyé des résultats moins bons pour la 1^{re} série, 12 ont analysé toutes les séries; le nombre de laboratoires classés comme ayant de moins bons résultats a diminué, passant de 12 à 4 pour la 2^e série et de 4 à 2 pour la 3^e; il est resté à 2 pour la 4^e série.

Au total, 44 laboratoires ont renvoyé des résultats moins bons pour au moins une des séries; 8 laboratoires n'ont participé à l'analyse que d'une série; les 36 laboratoires restants ont analysé plusieurs séries. Ces 36 laboratoires ont été rangés dans l'une des 3 catégories qui suivent en fonction de leurs résultats: «laboratoire en progrès» (ayant renvoyé des résultats moins bons dans la ou les premières séries, mais de bons résultats dans la ou les séries suivantes), «laboratoire aux résultats fluctuants» (ayant renvoyé de bons résultats pour la ou les premières séries, mais de moins bons résultats pour les séries suivantes), ou «laboratoire aux résultats régulièrement médiocres» (ayant renvoyé de moins bons résultats pour toutes les séries). Au total, 22 laboratoires ont été rangés dans la première catégorie, 12 dans la deuxième et 2 dans la troisième.

On a observé une amélioration manifeste du sous-typage H5 lorsque les résultats des échantillons ayant la même concentration ont été comparés. Pour les sous-typages H1 et H3, il semble qu'il y ait encore des possibilités d'amélioration (Tableau 1).

Pour les 4 séries d'échantillons, le pourcentage de laboratoires ayant renvoyé des résultats tous bons dans la Région européenne a été $> 70\%$, mais dans la Région africaine et dans la Région de la Méditerranée orientale, ces pourcentages sont restés $< 70\%$ (Figure 1). La chute brutale ($> 15\%$) enregistrée dans les résultats de la Région des Amériques et de la Région de l'Asie du Sud-Est pour la 2^e série a probablement été due au grand nombre de laboratoires participant à l'analyse pour la 1^{re} fois; une situation analogue s'est produite dans la Région africaine pour les 3^e et 4^e séries (Tableau 6). Concernant la 4^e série, des résultats de l'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental ont été comparables à ceux de la Région européenne.

Facteurs influant sur les résultats

On a observé une variation considérable dans les protocoles de PCR appliqués par les laboratoires participants. Du fait de la multitude des méthodes d'épreuve employées par un petit nombre de participants, il n'a pas été possible d'effectuer une analyse statistique significative afin de déterminer si un proto-

Fig. 1 Percentage of laboratories that had all correct results in analysis of influenza samples for external quality assessment, 2007 and 2008

Fig. 1 Pourcentage de laboratoires dont les résultats étaient tous bons lors de l'analyse des échantillons grippaux destinés à l'évaluation externe de la qualité, 2007 et 2008

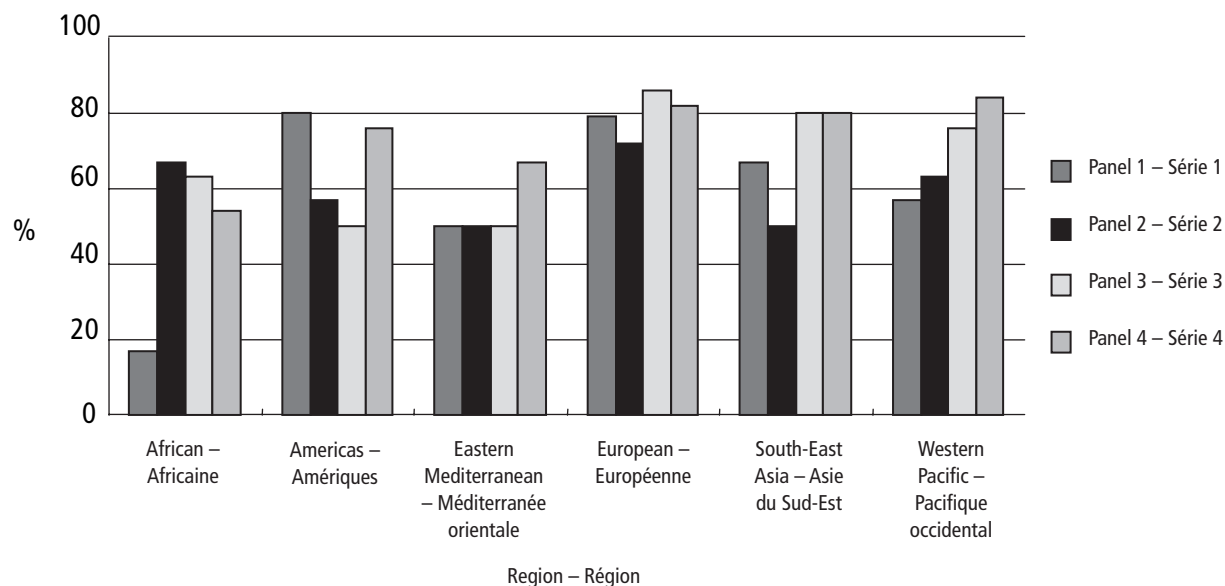


Table 6 Number of first-time participants analysing influenza samples for panel 2, panel 3 and panel 4 for external quality assessment by WHO region, 2007 and 2008

Tableau 6 Nombre de laboratoires participant pour la première fois à l'analyse des échantillons grippaux de la deuxième série, de la troisième série et de la quatrième série pour l'évaluation externe de la qualité, par Région OMS, 2007 et 2008

WHO region – Région OMS	No. of first-time participants/Total no. of participants (%) – Nombre de laboratoires participant pour la première fois/ nombre total de laboratoires (%)		
	Panel 2 – Série 2	Panel 3 – Série 3	Panel 4 – Série 4
African – Afrique	1/6 (17)	1/8 (13)	5/13 (38)
Americas – Amériques	11/14 (79)	2/16 (13)	4/21 (19)
Eastern Mediterranean – Méditerranée orientale	2/4 (50)	2/6 (33)	1/6 (17)
European – Europe	7/39 (18)	4/43 (9)	1/45 (2)
South-East Asia – Asie du Sud-Est	1/4 (25)	1/5 (20)	0/5 (0)
Western Pacific – Pacifique occidental	2/16 (13)	2/17 (12)	2/19 (11)

was not possible. However, we have compared and analysed the use of in-house methods versus commercial kits, and the use of conventional PCR versus real-time PCR.

Analysis showed that in 2 of 3 panels, laboratories using real-time PCR for ≥ 1 test to detect the H5 gene demonstrated significantly better overall performance than laboratories using only conventional PCR (panel 2, $P=0.002$; panel 3, $P=0.006$) (Table 7). The use of commercial kits, however, did not have a significant effect on participants' overall performance (panel 2, $P=0.678$; panel 3, $P=0.637$; panel 4, $P=0.188$).

Discussion

The number of laboratories participating in external quality assessment increased steadily during the 2 years from 2007 to 2008. Efforts were made to overcome communication and logistic challenges by communicating

cole donné était nettement meilleur que les autres. Cependant, nous avons comparé et analysé le recours à des méthodes «maison» par rapport aux nécessaires d'épreuves trouvés dans le commerce, et l'utilisation de la PCR classique à celle de la PCR en temps réel.

L'analyse a montré que pour 2 des 3 séries d'échantillons les laboratoires utilisant la PCR en temps réel pour ≥ 1 épreuve de recherche du gène H5 montraient des résultats globaux nettement meilleurs que les laboratoires n'utilisant que la PCR classique (série 2, $p=0,002$; série 3, $p=0,006$) (Tableau 7). Toutefois, le recours aux nécessaires d'épreuves trouvés dans le commerce n'a pas eu un effet significatif sur les résultats globaux des laboratoires participants (série 2, $p=0,678$; série 3, $p=0,637$; série 4, $p=0,188$).

Discussion

Le nombre de laboratoires participant à l'évaluation externe de la qualité a augmenté régulièrement au cours de ces 2 années (2007-2008). Des efforts ont été consentis pour surmonter les problèmes de communication et difficultés logistiques rencon-

Table 7 Factors influencing the performance of laboratories in detecting H5 gene in external quality assessment analysis, 2007 and 2008
Tableau 7 Facteurs ayant une influence sur les résultats des laboratoires pour la recherche du gène H5 dans le cadre de l'analyse destinée à l'évaluation externe de la qualité, 2007 et 2008

Technical factor – Facteur technique	Group ^a – Groupe ^a									P-value ^b – Valeur de p ^b
	All – Tous			A			B			
	N	n	%	N	n	%	N	n	%	
August–October 2007 (panel 2) – Août–octobre 2007 (2 ^e série)										
Real-time PCR assay – PCR en temps réel	79	56	70	64	51	80	15	5	33	0.002
Commercial kit – Nécessaire d'épreuve trouvé dans le commerce	81	17	21	66	15	23	15	2	13	0.678
January–February 2008 (panel 3) – Janvier février 2008 (3 ^e série)										
Real-time PCR assay – PCR en temps réel	94	66	70	78	60	77	16	6	38	0.006
Commercial kit – Nécessaire d'épreuve trouvé dans le commerce	94	17	18	78	13	17	16	4	25	0.637
June–July 2008 (panel 4) – Juin–juillet 2008 (4 ^e série)										
Real-time PCR assay – PCR en temps réel	108	75	69	96	68	71	12	7	58	0.565
Commercial kit – Nécessaire d'épreuve trouvé dans le commerce	108	17	16	96	13	14	12	4	33	0.188

PCR, polymerase chain reaction. – PCR, amplification génique.

^a N=the number of laboratories responding to each specific question related to the listed technical factor; n=the number of laboratories with a positive answer to the specific question; A= participants with correct H5 results; B=participants with incorrect H5 results. – N = nombre de laboratoires répondant à chacune des questions ayant trait au facteur technique indiqué; n = nombre de laboratoires ayant répondu positivement à la question posée; A = participants ayant obtenu de bons résultats pour H5; B = participants ayant obtenu de mauvais résultats pour H5.

^b The P value for positive influence on all correct results calculated by Yates-corrected χ^2 test. – La valeur de p correspondant à une influence positive sur tous les bons résultats calculée au moyen du test de χ^2 auquel on a appliqué la correction de Yates.

with the appropriate responsible officer in the laboratories, obtaining import permits and resolving shipping problems (Table 8). This increase in the number of participants also reflects improvement in the diagnostic capacity of global influenza laboratories: an increasing number of laboratories are equipped with PCR technology to detect influenza A.

The accurate detection of different subtypes of influenza A virus can help to target resources for disease prevention and control. The panels were designed to focus on different aspects of the testing process. Theoretically, a larger number of samples with different subtypes and concentrations would be more likely to detect errors but would probably create an undue burden on many participants. Except for panel 2, which consisted of 14 samples, each panel consisted of 10 samples; this is considered an acceptable size panel by participants.

trés en communiquant avec le responsable approprié dans chaque laboratoire, en obtenant des permis d'importation et en résolvant les problèmes d'expédition (Tableau 8). Cette progression du nombre de laboratoires participants est également le reflet d'améliorations enregistrées dans la capacité diagnostique des laboratoires de la grippe dans le monde: un nombre croissant de laboratoires sont équipés de la PCR pour dépister la grippe A.

Le dépistage précis des différents sous-types de virus grippal A peut aider à cibler les ressources destinées à la lutte contre cette maladie. Les séries d'échantillons étaient destinées à attirer l'attention sur les différents aspects du processus de dépistage. Théoriquement, un grand nombre d'échantillons contenant différents sous-types à différentes concentrations devrait permettre de mieux déceler les erreurs, mais fera probablement peser une charge de travail inutile sur de nombreux laboratoires. Sauf pour la 2^e série, qui était constituée de 14 échantillons, chaque série en comportait 10; les participants ont considéré qu'il s'agissait là d'une taille acceptable.

Table 8 Reasons for laboratories not receiving panels for external quality assessment of influenza testing, 2007 and 2008
Tableau 8 Raisons pour lesquelles les laboratoires n'ont pas reçu les séries d'échantillons destinées à l'évaluation externe de la qualité du dépistage de la grippe, 2007 et 2008

Problem – Problème	No. (%) of laboratories – Nombre (%) de laboratoires			
	Panel 1 (n=122) – Série 1 (n=122)	Panel 2 (n=129) – Série 2 (n=129)	Panel 3 (n=132) – Série 3 (n=132)	Panel 4 (n=137) – Série 4 (n=137)
Incorrect contact address (no response) – Coordonnées inexactes (pas de réponse)	38 (31)	26 (20)	20 (15)	11 (8)
Unwilling to participate in external quality assessment – Non désireux de participer à l'évaluation externe de la qualité	5 (4)	7 (5)	7 (5)	10 (7)
Import permit and logistic problems – Problèmes liés aux permis d'importation et difficultés logistiques	12 (10)	6 (5)	6 (5)	1 (1)

The aim of the panel 1 was to assess laboratories' performance in detecting different concentrations and strains of H5 viruses: 3 different H5 viruses with high and low concentrations were included. For panel 2, an additional clade of H5 virus with high and low concentrations was included. Because we learnt from panel 1 that false-positive amplification was a problem for 9 laboratories, 4 negative samples were included to assess potential contamination problems in the participating laboratories.

Based on feedback from participants and the decrease in the contamination rate from 14% to 6%, it was decided to reduce the number of negative samples in panel 3. In order to evaluate inter-panel reproducibility, panel 3 and panel 4 were similar in composition and concentration: each contained 5 strains of clade 1 and clade 2 H5 viruses, making it possible to evaluate the effect of testing parameters on the detection of different H5 clades.

The primary purpose of this project was to determine whether participants were capable of obtaining correct results. It was not intended to assess the accuracy of particular methods. However, the results of the analyses of the 4 panels yielded useful information on the performance of the particular methods used. PCR primers and probes from multiple sources were used by participants. Although it is statistically impossible to determine whether 1 set of PCR primers and probes produced significantly better results than others, overall analysis shows that no difference in performance was observed between the use of in-house methods and commercial kits.

Detecting influenza A virus in a clinical sample is a complex, multistep procedure. Each laboratory should have its own testing strategy using optimized protocols for different target genes. The design of the primers and probes alone may not explain why participants failed to detect H5 samples, since base mismatch in some primer and probe sets would still be able to detect all H5 samples (data not shown). Optimization of the PCR reaction seems to be a more important factor: this could explain why performance among laboratories varied even though they were using the same sources of PCR primers and probes.

The scope of this project is limited to the amplification part of the testing process. Steps such as specimen collection and RNA extraction may contribute to the overall accuracy and reliability of test results. It must also be understood that samples for the external quality assessment project were handled differently from real clinical samples. However, the results of this project did show there were improvements in performance, indicating that some problems in laboratory testing had been overcome. The use of real-time PCR appeared to lead to better performance in panel 2 and panel 3 but not in panel 4. This difference is most likely due to the improvement in performing H5 subtyping by the conventional method. The performance of the laboratories in the South-East Asia Region and the Western Pacific

Le but de la 1^{re} série d'échantillons était d'évaluer les résultats des laboratoires pour ce qui est de dépister différentes concentrations et différentes souches de virus H5: 3 virus H5 différents, à des concentrations élevées et faibles en faisaient partie. Pour la 2^e série, un clade supplémentaire de virus H5 a été ajouté, à des concentrations élevées et faibles. Parce que la 1^{re} série nous a enseigné que l'amplification des faux-positifs constituait un problème pour 9 laboratoires, 4 échantillons négatifs y ont été incorporés pour évaluer les problèmes éventuels de contamination dans les laboratoires participants.

Du fait du retour d'information des laboratoires participants et de la diminution du taux de contamination, qui est passé de 14% à 6%, il a été décidé de réduire le nombre d'échantillons négatifs dans la 3^e série. Pour pouvoir évaluer la reproductibilité d'une série à l'autre, les 3^e et 4^e séries étaient analogues dans leur composition comme dans leur concentration: chacune contenait 5 souches de virus H5 du clade 1 et du clade 2, rendant possible l'évaluation de l'effet des paramètres d'épreuve sur la détection des différents clades H5.

Le but principal de ce projet était de déterminer si les laboratoires participants étaient capables d'obtenir de bons résultats. Il ne visait pas à évaluer la précision de méthodes particulières. Toutefois, les résultats des analyses des 4 séries ont fourni des informations utiles sur l'efficacité des méthodes employées. Pour la PCR, des amorces et des sondes d'origines multiples ont été utilisées par les laboratoires. Bien qu'il soit statistiquement impossible de déterminer si une série d'amorces et de sondes utilisée pour la PCR a donné des résultats significativement meilleurs que d'autres, l'analyse globale montre que l'on n'a observé aucune différence d'efficacité entre les méthodes «maison» et les nécessaires d'épreuve trouvés dans le commerce.

Détecter un virus grippal A dans un échantillon clinique est une opération complexe qui se fait en plusieurs étapes. Chaque laboratoire doit avoir sa propre stratégie de recherche faisant appel à des protocoles optimisés pour les différents gènes cibles. La nature des amorces et des sondes n'explique pas à elle seule pourquoi les participants n'ont pas réussi à détecter les échantillons H5, puisqu'un déséquilibre de base dans certaines séries d'amorces et de sondes a quand même permis de détecter tous les échantillons H5 (données non présentées). L'optimisation de la PCR semble être un facteur plus important: elle pourrait expliquer pourquoi les laboratoires ont eu des résultats variables, même lorsqu'ils utilisaient les mêmes sources d'amorces et de sondes pour la PCR.

La portée de ce projet se limite à la partie amplification du processus de recherche. Des étapes comme la collecte des échantillons et l'extraction de l'ARN jouent peut-être un rôle dans l'exactitude et la fiabilité globales des résultats d'épreuve. Il faut également comprendre que les échantillons recueillis pour le projet d'évaluation externe de la qualité ont été manipulés différemment des échantillons cliniques réels. Cependant, les résultats de ce projet ont effectivement montré des améliorations des résultats, indiquant par là que certains des problèmes rencontrés dans les épreuves de laboratoire avaient été surmontés. Le recours à la PCR en temps réel a semblé conduire à de meilleurs résultats dans les 2^e et 3^e séries, mais pas dans la 4^e. Cette différence est très probablement due à l'amélioration de l'exécution du sous-typage H5 par la méthode classique. Les résultats des laboratoires des Régions de l'Asie du Sud-Est et

Region in panel 4 are comparable to that of the European Region: results were 100% correct in $\geq 80\%$ of laboratories. The significant improvement in performance in the South-East Asia and Western Pacific regions is closely linked to the knowledge and skills acquired through various channels. These channels include WHO's training workshop for the detection of influenza A viruses by PCR, conducted for laboratories with incorrect H5 results in these 2 regions at the Centre for Health Protection, Hong Kong SAR, in February 2008 just before panel 3 was sent. Of the 9 laboratories that participated in the workshop, 8 achieved 100% correct results for panel 4, while 1 had 100% correct results for H5 samples but not for H1 and H3 samples.

NICs and national influenza laboratories in countries without NICs are encouraged to participate in the external quality assessment project to benefit from continual monitoring of laboratory performance. It is expected that through this project high-quality influenza diagnostic capacity can be achieved, maintained and improved globally.

Editorial note. The full report for each panel contains more information than that presented in this summary. All data from the project will be used as a foundation to assess needs and plans for action by the Global Influenza Surveillance Network.

WHO would like to thank all NICs and other influenza laboratories for participating in the project, for the time they spent completing the questionnaires and for their willingness to share information for this analysis.

For more information, please contact the WHO Global Influenza Programme, Geneva, Switzerland (e-mail: GISN@who.int). ■

Influenza

This summary provides an updated report of seasonal influenza activity for weeks 41–42. It does not include reports of avian influenza in humans, which are available at: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html

During weeks 41–42, overall influenza activity continued to decline in the southern hemisphere. Activity remained low in the rest of the world.

Hong Kong, Special Administrative Region of China. A decline in the activity of influenza A(H3) and A(H1) viruses was observed, with influenza A(H3) predominating. Also, a B/Victoria lineage virus was detected.

Other reports. Between weeks 41 to 42, sporadic influenza activity was detected in Chile (B), the Russian Federation (H1,H3,B), the United Kingdom (H1, H3) and the United States (A,B).

Belgium, Brazil, Bulgaria, Denmark, France, Germany, Honduras, the Islamic Republic of Iran, Latvia, Mongolia, Norway, Poland, Portugal, Slovenia, South Africa, Spain, Sweden and Switzerland reported no influenza activity. ■

du Pacifique occidental pour la 4^e série sont comparables à ceux de la Région européenne: ils ont été bons à 100% dans $\geq 80\%$ des laboratoires. La nette amélioration enregistrée dans ces deux dernières Régions est étroitement liée aux connaissances et au savoir-faire acquis par divers moyens, dont l'atelier de formation de l'OMS pour le dépistage des virus grippaux A au moyen de la PCR, organisé pour les laboratoires ayant eu de mauvais résultats pour le H5 dans ces 2 Régions, atelier qui s'est tenu au Centre de protection de la santé, Hong Kong (région administrative spéciale de Chine) en février 2008, juste avant l'envoi de la 3^e série. Sur les 9 laboratoires ayant participé à cet atelier, 8 ont obtenu 100% de bons résultats pour la 4^e série, tandis qu'un a obtenu 100% de bons résultats pour les échantillons H5 mais pas pour les H1 et H3.

Les NIC et les laboratoires nationaux de lutte contre la grippe présents dans les pays dépourvus de NIC sont encouragés à participer au projet d'évaluation externe de la qualité afin de bénéficier de la surveillance continue des résultats de laboratoire. On espère grâce à ce projet parvenir à obtenir pour la grippe des moyens diagnostiques de qualité, durables et meilleurs partout dans le monde.

Note de la rédaction. Le rapport complet de chaque série renferme davantage d'informations que celles présentées dans ce résumé. Toutes les données du projet serviront de base à l'évaluation des besoins et à la détermination des mesures que le Réseau mondial de surveillance de la grippe devra prendre.

L'OMS souhaiterait remercier tous les centres nationaux de lutte contre la grippe et autres laboratoires de la grippe pour leur participation à ce projet, pour le temps qu'ils ont passé à remplir les questionnaires et pour la bonne volonté dont ils ont fait preuve pour échanger des informations concernant cette analyse.

Pour de plus amples informations, veuillez contacter le Programme mondial de lutte contre la grippe de l'OMS, Genève, Suisse (courriel: GISN@who.int). ■

Grippe

Ce résumé propose un rapport mis à jour de l'activité grippale saisonnière pour les semaines 41-42. Il n'inclut pas les rapports sur les cas humains de grippe aviaire dont les informations les plus récentes sont disponibles sur http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/fr/index.html

D'une manière générale, le niveau d'activité grippale au cours des semaines 41-42 a continué à baisser dans l'hémisphère sud et il est resté stable dans le reste du monde.

Hong Kong, Région administrative spéciale de la Chine. Une baisse de l'activité grippale des virus de type A (H3) et A (H1) a été observée, avec une prédominance des virus A (H3). Un virus de la lignée B/Victoria a également été dépisté.

Autres rapports. Entre les semaines 41 et 42, une activité grippale sporadique a été signalée au Chili (B), aux Etats-Unis (A,B), en Fédération de Russie (H1,H3,B) et au Royaume-Uni (H1, H3).

L'Afrique du Sud, l'Allemagne, la Belgique, le Brésil, la Bulgarie, le Danemark, l'Espagne, la France, le Honduras, la Lettonie, la Mongolie, la Norvège, la Pologne, le Portugal, la République islamique d'Iran, la Slovénie, la Suède et la Suisse n'ont signalé aucune activité grippale. ■