

Evaluation du contrôle de qualité des tests pour la grippe et le VRS en Europe, saison 2000-01

M. Valette, M. Aymard

Centre national de Référence Grippe, Laboratoire de Virologie HCL, Lyon, France

L'évaluation du contrôle de qualité (ECQ) a été initiée pour estimer la qualité des analyses pour la détection et l'identification des virus grippaux et du virus respiratoire syncytial (VRS) dans les centres de référence nationaux appartenant au Réseau européen de surveillance de la grippe (EISS). Des prélèvements ont été codés et envoyés à 16 laboratoires en deux panels de 12 prélèvements dans un intervalle de deux semaines pendant la saison d'hiver 2000-01. Les titres d'anticorps au test IHA ont été notifiés par 60 % des laboratoires (n=16), et les résultats étaient corrects pour 56 % d'entre eux. Un laboratoire a rapporté une fausse détection d'anticorps à la grippe B et pour les autres, la sensibilité était très variable. Pour la souche A(H3N2), la sensibilité des tests pour l'identification du virus grippal variait de 10 à 100 000 TCID₅₀/ml. Le sous-typage de la grippe A a été réalisé par 87 % des laboratoires, avec 31 % de résultats corrects. Six laboratoires ont effectué la caractérisation des variants, parfaitement réussie pour la moitié d'entre eux. La technique de RT-PCR a été utilisée par 56 % des laboratoires pour les diagnostics ; les résultats étaient spécifiques et la sensibilité équivalente à celle de la culture cellulaire.

Introduction

Le Réseau EISS (European Influenza Surveillance Scheme) est un réseau européen de 18 pays qui recueille des données épidémiologiques et virologiques sur une base hebdomadaire (1). Ce réseau communique l'information sur les virus grippaux détectés, puis lance l'alerte épidémique si besoin, et suit l'impact et la dissémination de l'épidémie dans les pays participants. Les Centres nationaux de référence (CNR) de chaque pays sont chargés de l'isolement et de la caractérisation du type, du sous-type et idéalement, du variant des virus grippaux en circulation. Les virus sont comparés aux souches prototypes du vaccin afin de vérifier leur adéquation et de sélectionner de nouveaux variants pour la prochaine composition vaccinale.

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est également responsable d'épidémies hivernales. Cette infection est souvent sévère et les manifestations cliniques peuvent être similaires à celles de la grippe. Le diagnostic viral étiologique est donc également important pour contrôler l'efficacité du vaccin anti-grippal.

Une harmonisation des méthodes utilisées pour recueillir des données cliniques, épidémiologiques et virologiques concernant la grippe en Europe est nécessaire, et une évaluation du contrôle de qualité (ECQ) virologique a été initiée pendant la saison d'hiver 2000-01. L'objectif de l'ECQ était d'analyser la sensibilité et la spécificité des tests de laboratoire utilisés pour la détection des virus grippaux et des VRS. Tous les laboratoires ont participé sur la base du volontariat. Le laboratoire de virologie de Lyon était responsable de l'évaluation et tous les résultats lui ont été adressés pour analyses ultérieures.

Méthodes

Prélèvements post-vaccination

Quatre échantillons de sérums post vaccination prélevés chez des adultes ont été envoyés pour l'ECQ. Le statut immunitaire des personnes vaccinées doit être évalué par le titrage d'anticorps anti-hémagglutinine (anti-HA). Les données sur l'inhibition de l'hémagglutination (IHA) correspondent aux titres observés (inverses des dilutions de sérum). Les résultats ont été analysés en comparant les résultats d'IHA avec le titre attendu. Les résultats étaient considérés corrects si le titre rapporté restait inférieur au double du titre attendu.

Prélèvements des voies aériennes

Les prélèvements simulés des voies respiratoires comportaient un mélange de cellules infectées et non-infectées, et des cellules MDCK et HEP2 non-infectées étaient également comprises dans les panels, comme contrôles négatifs. ➤

Quality control assessment of influenza and RSV testing in Europe: 2000-01 season

M. Valette, M. Aymard

Centre national de Référence Grippe, Laboratoire de Virologie HCL, Lyons, France

The Quality Control Assessment (QCA) was initiated to evaluate the quality of the influenza and respiratory syncytial virus (RSV) testing in the national reference centres belonging to the European Influenza Surveillance Scheme (EISS) network. Samples were coded and sent in two panels of 12 samples within a two week interval to 16 laboratories during the 2000-01 winter season. The antibodies titration by HI test was reported by 60% of the laboratories (n=16), and the results were correct for 56% of them. One false detection of influenza B antibodies was reported by one laboratory, and for the others the sensitivity varied widely. The sensitivity of the tests for the detection of influenza virus varied for A(H3N2) from 10 to 100 000 TCID₅₀/ml. The influenza A subtyping was performed by 87% of the laboratories, and 31% gave correct results. The characterisation of the variants was undertaken by six laboratories and half of them fully achieved it. Fifty six percent of the laboratories used RT-PCR for the diagnosis; the results were specific and the sensitivity equivalent to the cell culture.

Introduction

The European Influenza Surveillance Scheme (EISS) is a European network of 18 countries collecting epidemiological and virological data on a weekly basis (1). This surveillance scheme provides information about the influenza viruses detected, then issues an alert whenever there is a risk for an epidemic, and monitors the impact and the spread of the epidemic in participating countries. National reference centres (NRCs) in each country are in charge of the isolation and the characterisation of the type, subtype, and ideally, the variant of circulating influenza viruses. The viruses are compared to the vaccine prototype strains in order to verify the adequacy of the strains and select new variants for the next vaccine composition.

The respiratory syncytial virus (RSV) is also responsible for winter epidemics. This infection is often severe and the clinical manifestations can be similar to influenza. The aetiological viral diagnostic is therefore also of major importance for the control of influenza vaccine efficacy.

The harmonisation of methods used to collect clinical, epidemiological and virological data concerning influenza in Europe is necessary, and a virological quality control assessment (QCA) was initiated during the 2000-01 winter season. The QCA was designed to test the sensitivity and specificity of the diagnostic tests used for influenza and RSV viruses. All of the participating laboratories were volunteers. The Laboratory of virology in Lyons carried out the QCA, and all results were sent back to this laboratory for further analysis.

Methods

Post vaccination samples

A selection of four post vaccination sera taken from adults were sent for the QCA. The immune status of vaccinees must be estimated by the titration of anti-haemagglutinin antibodies. The haemagglutination inhibition (HI) data consisted of observed titres (reciprocal of serum dilution). The results were analysed by comparing the HI data with the expected titre. The results were considered correct if the reported titre differed by no more than twofold.

Respiratory samples

The simulated respiratory samples were a mixture of infected and non-infected cells, and uninfected MDCK and HEP2 cells were also included in the panels as negative controls. ➤

► Les virus grippaux étaient des prototypes du type sauvage, correspondant aux souches recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour le vaccin de la saison hivernale 2000-01 : A/Panama/2007/99 (H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), et B/Yamanashi/166/98. Pour le VRS, il s'agissait d'une souche de type A. Les souches grippales prototypes ont été obtenues sur cellules MDCK. Le titrage de l'infectivité virale a été effectué sur les stocks viraux d'origine (50% de doses infectieuses sur cultures de tissus par millilitre [DICT₅₀]).

Sensibilité et spécificité

La sensibilité des tests de diagnostic virologiques a été calculée en préparant des prélèvements contenant différentes concentrations de virus grippaux de types A et B, et la spécificité en élaborant des échantillons codés avec ou sans virus. La sensibilité des tests de laboratoire a été mesurée par la concentration la plus basse de virus grippal détectée.

Questionnaire

Avant le début de l'évaluation, un questionnaire a été envoyé à tous les laboratoires participants pour déterminer les techniques, les réactifs et les lignées cellulaires utilisées dans chaque laboratoire.

Analyse directe

L'analyse virale directe reposait sur la détection de l'antigène viral par immunofluorescence (IF), par test enzymatique ELISA, et/ou par détection du génome viral après amplification, par RT-PCR (amplification génique après transcription inverse). Les virus pouvaient être isolés sur les cultures de cellules. Des échantillons de 2mL ont été codés. La préparation et le codage ont été effectués par les membres de l'équipe de l'ECQ, complètement distincte des techniciens chargés du diagnostic travaillant au CNR de Lyon.

A chaque envoi d'un panel était ajouté un formulaire standard pour noter les résultats. Le premier panel a été envoyé le 20 novembre et le deuxième le 4 décembre. Les échantillons qu'ils contiennent sont présentés dans les tableaux 1a et 1b. Il a été demandé à chaque CNR d'analyser les prélèvements en suivant ses techniques diagnostiques et sérologiques habituelles.

Laboratoires participants

Seize CNR de la grippe, comprenant le laboratoire de référence de Lyon, ont participé à l'ECQ. La liste des participants figure dans le tableau 2 (pays par ordre alphabétique). Quinze laboratoires ont reçu le premier panel, et 16 le second.

Résultats

Pour anonymiser les laboratoires participant à l'évaluation, des codes allant de L1 à L16, distribués au hasard, leur ont été attribués.

Le titrage d'anticorps antigrippaux

Neuf laboratoires (60%) ont réalisé le titrage par le test de IHA, deux ont utilisé le test de fixation du complément et quatre n'ont pas testé les sérums.

Tableau 1a / Table 1a				
Composition des panels : prélèvements simulés / Panels components: simulated samples				
		Premier / First panel 20/11/2000	Second panel 4/12/2000	
Virus grippal / Influenza virus A H1N1 A/NEW CALEDONIA/20/99				
[TCID ₅₀ /mL]	200 000	1 ^a	/	
	200	4	8	
	1	8	/	
Virus grippal / Influenza virus A H3N2 A/PANAMA/2007/99				
[TCID ₅₀ /mL]	100 000	2	2	
	10 000	/	3 ^b	
	1 000	/	7	
	100	/	9	
	10	6	12	
Virus grippal / Influenza virus B B/YAMANASHI/166/98				
[TCID ₅₀ /mL]	100 000	3	4	
	10 000	/	5	
	1 000	7	10	
VRS / RSV				
[TCID ₅₀ /mL]	10 000	/	3 ^b	
	10 000	/	11	
Négatifs / Negatives				
CELL	MDCK	5	6	
	HEp2	/	1	

^a Numéro du prélèvement / Sample number

^b VRS + virus grippal A H3N2 / RSV + Influenza virus A H3N2.

► The influenza viruses were the wild type prototypes, corresponding to the World Health Organization (WHO) recommended strains for the 2000-01 winter season vaccine: A/Panama/2007/99 (H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), and B/Yamanashi/166/98. RSV was the type A Long strain. Influenza prototype strains were adapted on MDCK cells. The titration of viral infectivity was performed on the original virus stocks (50% tissue culture infective doses [TCID₅₀] per milliliter).

Sensitivity and specificity

The sensitivity of the virological diagnostic tests was calculated by introducing various concentrations of influenza viruses types A and B in the samples, and the specificity by the preparation of coded samples containing or not containing viruses. The laboratory test sensitivity was measured as the lowest influenza virus concentration detected.

Questionnaire

Before the QCA began, a questionnaire was sent to all of the participating laboratories in order to determine the techniques, reagents and cell lines used in each laboratory.

Direct analysis

The viral direct test was based on the viral antigen detection by immunofluorescence (IF) or enzymatic assay (ELISA) and/or the viral genome detection after amplification by polymerase chain reaction (RT-PCR). The viruses could be isolated on cell culture. Samples of 2ml were coded. Samples were prepared and coded by the members of the QCA team, which was completely independent from the diagnostic technicians working in the Lyons NRC.

Tableau 1b / Table 1b				
Composition des panels : sérums de personnes vaccinées / Panels components : sera from vaccinees				
Premier / First panel 20/11/2000				
		TITRAGE IHA / HI TITRATION		
Serum No.	Résultats / Results	H3N2	H1N1	B
1	NEGATIVE	< 10	< 10	< 10
2	H3N2 Abs ^a	160	< 10	< 10
3	B Abs ^a	< 10	< 10	320
4	H3N2-H1N1-B Abs ^a	640	640	1280

^a Anticorps / Antibodies

A standard form to report the results was sent with each panel. The first panel was sent on 20 November and the second on 4 December. The two panel samples are listed in tables 1a and 1b. Each NRC were requested to test the samples using their usual serological and diagnostic techniques.

Participating laboratories

Sixteen influenza NRCs, including the reference laboratory in Lyons, participated in the QCA. The list of participants is given in table 2 (countries listed in alphabetical order). Fifteen laboratories received the first panel and sixteen the second one.

Results

The laboratories participating in the QCA were anonymised by randomly allocating codes L1 to L16.

Influenza antibody titration

Nine laboratories (60%) performed the titration by HI test; two used the complement fixation test and four did not test the sera.

Cinq laboratoires sur les neuf ont rapporté des titres attendus. Un laboratoire a détecté un titre d'anti-HA pour la grippe B dans le prélèvement négatif. Un laboratoire a rapporté des titres d'anti-HA faibles pour le sous-type H3 (sérum 2) et le type B (sérum 3). Un autre a rapporté des titres d'anti-HA peu élevés pour B (sérum 3 et 4). Enfin un laboratoire a rapporté des titres d'anti-HA pour la grippe B dans une série de cinq dilutions, selon les antigènes utilisés dans le test dérivés de la même souche prototype.

Détection des virus grippaux et des VRS

Quatre laboratoires participants n'ont pas suivi le protocole de l'ECQ : l'un a cherché des virus grippaux dans le premier panel et des VRS dans le second, deux laboratoires n'ont pas procédé correctement aux analyses de VRS et un CNR n'a reçu que le deuxième panel. Pour prendre en compte ces particularités, nous avons calculé le score global de chaque laboratoire à partir du nombre total d'échantillons testés. En tout, 20 prélèvements ont été envoyés, mais nous en avons enregistré 21, puisqu'un prélèvement mixte était compris dans le second panel (virus grippal A + VRS : deux items) et que nous attendions deux résultats distincts pour le même prélèvement. Le nombre d'items à analyser était de 12 pour un laboratoire, 19 pour deux laboratoires et 21 pour 12 laboratoires. Les résultats litigieux ont été considérés comme négatifs.

Five out of nine laboratories reported expected titres. One laboratory detected HI titre for B in the negative sample. One laboratory reported low HI titres for H3 (serum 2) and B (serum 3). Another laboratory reported low B HI titres (sera 3 and 4). One laboratory reported B HI titres in a range of five fold dilutions, depending on the antigens used in the test that derived from the same prototype strain.

Détection de l'influenza et des VRS

Four participating laboratories failed to follow the QCA protocol: one looked for influenza viruses in the first panel and for RSV in the second panel, two laboratories did not normally perform RSV testing and one NRC only received the second panel. Taking into account these features, each laboratory's global score has been calculated on the number of samples fully tested. A total of 20 samples were sent but we recorded 21 items because we introduced a mixed sample (influenza virus A + RSV: 2 items) in the second panel and we expected two results for the same sample. The number of tested items was 12 for one laboratory, 19 for two laboratories, and 21 for twelve laboratories. Doubtful results were considered to be negative.

Tableau 2 / Table 2

Contrôle de qualité européen – virus grippaux et VRS
European quality control – influenza viruses and RSV

Liste des participants / List of participants			
Dr F. YANE	Scientific Institute of Public Health Louis Pasteur	BRUSSELS	BELGIUM
Dr M. HAVLICKOVA & Dr M. OTAVOVA	National Institute of Public Health	PRAGUE	CZECH REPUBLIC
Prof M. AYMARD & Dr M. VALETTE	CNR Grippe	LYON	FRANCE
Prof S. VAN DER WERF & Dr J.C. MANUGUERRA & M. TARDY-PANIT	Institut Pasteur	PARIS	FRANCE
Dr B. SCHWEIGER	Robert Koch-Institut	BERLIN	GERMANY
Dr F. PREGLIASCO & Dr C. MENSI	Istituto di Virologia	MILAN	ITALY
Dr I. ORSTAVIK & Dr H. SAMDAL	National Institute of Public Health	OSLO	NORWAY
Dr H. MYRMEL & S. MAEHLE	Bergen High Technology Centre	BERGEN	NORWAY
Dr H. REBELO DE ANDRADE	Instituto Nacional de Saude	LISBON	PORTUGAL
Dr V. ALEXANDRESCU & Dr E. LUPULESCU	National Influenza Centre	BUCHAREST	ROMANIA
Dr P. PEREZ BRENA	Servicio de Virologia	MADRID	SPAIN
Prof A. LINDE & C. KOLMSKOG	Department of Virology Hôpital Cantonal	STOCKHOLM	SWEDEN
Dr W. WUNDERLI & Dr Y. THOMAS	Universitaire de Genève	GENEVA	SWITZERLAND
Dr M.L. HEIJNEN & Dr B. WILBRINK	R.I.V.M.	BILTHOVEN	THE NETHERLANDS
Prof A. OSTERHAUS & Dr J. VELZING	Department of Virology-Medical Faculty	ROTTERDAM	THE NETHERLANDS
Dr M. ZAMBON & P. LAIDLER	Central Public Health Laboratory	LONDON	UNITED KINGDOM

Score des laboratoires

Tous tests confondus, quatre laboratoires ont obtenu des résultats globaux de 100%, sept de 90–95 %, un de 85 % et quatre de moins de 80% (tableau 3).

Douze laboratoires (75 %) ont trouvé un mauvais résultat pour au moins un des prélèvements, dix laboratoires (62,5 %) ont trouvé un résultat faux pour la grippe et six laboratoires (43 %) un résultat faux pour le VRS. Cinq laboratoires ont rapporté un résultat faux, quatre participants ont fait deux erreurs et trois laboratoires ont trouvé plus de deux résultats faux.

Sensibilité

Les résultats faux négatifs concernaient surtout la souche A(H1N1), six laboratoires (40 %) n'ayant pas détecté ce virus à une dose de 1 DICT₅₀ ; deux laboratoires n'ont pas détecté la souche grippale A(H3N2) à 100 DICT₅₀, et deux laboratoires n'ont pas détecté la grippe B à 1000 DICT₅₀.

Le VRS a été détecté par 86 % des participants, et par 71 % d'entre eux lorsque virus de la grippe et VRS étaient tous deux présents dans l'échantillon.

Global laboratory score

Whatever the test used, the global laboratory scores were 100% for four laboratories, 95-90% for seven laboratories, 85% for one laboratory and less than 80% for four laboratories (Table 3).

Twelve laboratories (75%) gave a false test result for at least one of the samples, ten laboratories (62.5%) gave a false result for influenza, and six laboratories (43%) gave a false result for RSV. Five laboratory reported one false result, four participants reported two errors, and three laboratories gave more than two false results.

Sensitivity

The false negative results mainly concerned the A(H1N1) strain which was not detected by six laboratories at the 1 TCID₅₀ dose ; for influenza A(H3N2), two laboratories failed to detect 100 TCID₅₀, and for influenza B, two laboratories did not detect 1000 TCID₅₀.

RSV was detected by 86% of the participants, and by 71% of the participants when the sample contained both influenza and RSV viruses.

Identification du virus

Sur 16 laboratoires, 14 (87%) ont entrepris le sous-typage de la grippe A et cinq l'ont totalement accompli (31%). La caractérisation des variants a été réalisée par cinq laboratoires et trois ont identifié correctement tous les prélèvements. Cinq laboratoires (36%) ont déterminé l'échantillon de VRS comme étant de type A.

Détection du génome

La RT-PCR et des réactifs "maison" ont été utilisés par neuf laboratoires pour le diagnostic du virus de la grippe et par six laboratoires pour le virus respiratoire syncytial. Un laboratoire a rapporté un faux diagnostic de virus grippal B dans un prélèvement contenant des cellules MDCK non-infectées. La sensibilité pour la grippe A variait selon les laboratoires entre 1 et 10 000 TCID₅₀ et pour la grippe B entre 1000 et 10 000 DICT₅₀. Deux laboratoires de référence ont détecté le virus de grippe A à une dose de 1 DICT₅₀ par culture cellulaire, alors que le test de RT-PCR était négatif. Les six laboratoires qui utilisaient la RT-PCR pour des diagnostics de VRS ont tous identifié le virus dans les deux prélèvements.

Discussion

Le CNR de Lyon a organisé l'évaluation du contrôle de qualité pour 16 laboratoires en Europe. Chaque CNR participant a reçu individuellement le découpage des échantillons après l'arrivée de tous les résultats à Lyon. Les CNR ont réalisé les analyses de laboratoire avec leurs propres techniques et réactifs.

La sensibilité des résultats d'analyses variait énormément entre les laboratoires participants : des résultats faux négatifs ont été notifiés au moins une fois pour A(H3N2), A(H1N1) et les échantillons de grippe B contenant 100 à 1000 DICT₅₀. Pour l'échantillon comportant la souche A(H1N1) à 1 DICT₅₀, la concentration virale était trop faible pour être détectée en culture, mais aurait dû être identifiée par RT-PCR.

Il est admis que les techniques de détection antigénique ont une faible sensibilité, et doivent être associées à d'autres techniques comme la multiplication du virus sur des cultures de cellules. Tous les participants ont isolé les virus sur culture de cellules MDCK, suivant les recommandations de certaines études (2-4). La performance de cette technique variait beaucoup d'un laboratoire à l'autre. Pour améliorer la croissance virale, il est nécessaire de vérifier la sensibilité de la lignée cellulaire, la qualité du milieu, ainsi que les procédés d'inoculation de l'échantillon et de détection du virus.

Les panels de l'évaluation ont été préparés avec des virus grippaux adaptés aux cellules, qui pouvaient être isolés régulièrement en quatre jours d'incubation à 33°C. La culture cellulaire positive pouvait être testée soit pour l'antigène de la nucléoprotéine NP par le test ELISA, soit pour l'hémagglutinine HA en utilisant des globules rouges humains, de poulet, ou de cochon d'Inde. Les CNR ont pour tâche d'isoler les virus pour la caractérisation antigénique ultérieure, qui pourra être effectuée par le test IHA, en utilisant des antisérums de furet post-infection. Cette identification permet la comparaison des virus en circulation

Virus identification

Out of 16 laboratories, 14 (87%) performed influenza A virus subtyping, and five fully achieved it (31%). The variant characterisation was carried out by five laboratories and three correctly identified all samples. Five (36%) of the laboratories subtyped the RSV sample as type A.

Genome detection

RT-PCR and in-house reagents were used by nine laboratories for influenza virus diagnosis, and by six laboratories for RSV. One laboratory reported a false influenza B diagnosis on a sample containing uninfected MDCK cells. The inter-laboratory influenza A sensitivity varied from 1 to 10 000 TCID₅₀, and from 1 000 to 10 000 TCID₅₀ for influenza B. Two reference laboratories detected 1 TCID₅₀ influenza A virus on cell culture while RT-PCR was negative. All six laboratories using RT-PCR for RSV diagnosis detected the virus in the two samples.

Discussion

The NRC in Lyons organized the QCA for 16 laboratories in Europe. Each participating NRC individually received the decoding of the samples after all the QCA results arrived in Lyons. The NRCs performed the laboratory tests using their own techniques and reagents.

The sensitivity of the test results varied widely among the participating laboratories: false negative results were reported at least once for the A(H3N2), A(H1N1) and B samples containing 100 to 1 000 TCID₅₀. For the A(H1N1) sample containing 1 TCID₅₀, the concentration was too low to be regularly detected on cell culture, but should be detected by RT-PCR.

The antigenic detection techniques are known to be of low sensitivity, and they have to be associated with other techniques such as the growth of the virus in cell cultures. As recommended by a number of studies (2-4), all the participants isolated viruses on MDCK cell culture. The performance of this technique greatly varied from one laboratory to another. To improve virus growth, it is necessary to check the sensitivity of the cell line, the quality of the medium, the techniques for sample inoculation, and virus detection.

The panels in the QCA were prepared with cell adapted influenza viruses, which could be regularly isolated within four days of incubation at 33°C. The positive cell culture could be tested either for NP nucleoprotein antigen in ELISA or for HA hemagglutinin using chicken, human or guinea pig red blood cells. It is the duty of NRC to isolate the viruses for further antigenic characterisation which might be performed by HI test using post infection ferret antiserum. This identification allows a comparison of the circulating viruses with the current vaccine strains. Six laboratories also subtyped the genome by RT-PCR: both antigenic and genetic subtyping were in agree-

No de laboratoire Laboratory No	Nb d'items No. of Items		Score %	Type d'erreur / Type of error	
	Analysés Tested	Corrects Correct		Faux négatif / False negative	Faux positif / False positive
L 1	21	21	100		
L 2	21	20	95	A H1N1 [1 TCID ₅₀]	
L 3	21	21	100		
L 4	21	16	76	A H1N1 [1 TCID ₅₀] - RSV	B - A+B
L 5	12	9	75	A H1N1 [1 TCID ₅₀]	RSV
L 6	21	20	95	A H1N1 [1 TCID ₅₀]	
L 7	21	10	48	A H1N1 A H3N2 B RSV (a)	RSV
L 8	21	20	95		B
L 9	19	18	95	A H1N1 [1 TCID ₅₀]	
L 10	21	11	52	A H1N1 A H3N2 B (a)	
L 11	19	18	95	A H1N1 [1 TCID ₅₀]	
L 12	21	19	90	Pas de typage du virus grippal - VRS Influenza virus not typed - RSV	
L 13	21	21	100		
L 14	21	21	100		
L 15	21	19	90		A - RSV
L 16	13	11	85	RSV	

(a): Détection de 1000 TCID₅₀ ou plus pour la grippe A (H1N1 ou H3N2) et 10 000 TCID₅₀ ou plus pour la grippe B
Detection of 1000 TCID₅₀ or more for influenza A (H1N1 or H3N2) and 10 000 TCID₅₀ or more for influenza B

avec les souches vaccinales en cours. Six laboratoires ont également procédé au sous-typage du génome par RT-PCR : les sous-typages antigénique et génétique concordent. Tous les CNR ont envoyé des isolats caractérisés au centre de référence international qui confirmera l'identification et sélectionnera certains variants comme candidats possibles pour le vaccin de l'hiver suivant.

Les techniques de RT-PCR et les réactifs "maison" ont fourni des résultats spécifiques : un résultat faux positif sur 189 tests. L'introduction de concentrations virales élevées dans le contrôle de qualité a montré que les laboratoires ont correctement contrôlé le risque de contamination. Selon les laboratoires, la sensibilité de la RT-PCR était très variable (40 à 100 % pour la grippe, 71 à 86 % pour les VRS), mais à l'intérieur d'un même laboratoire, elle était identique à la sensibilité de la culture cellulaire, comme cela a été décrit précédemment dans la littérature (5,6).

A notre surprise, seuls 60% des CNR ont utilisé le test d'inhibition de l'hémagglutination pour l'évaluation du statut immunitaire des personnes vaccinées. Les titres d'anti-HA étaient aussi très variables d'un laboratoire à l'autre, surtout pour les titres d'anti-HA de la grippe B. Il est très probable qu'un laboratoire au moins ait utilisé un antigène de la grippe B traité au détergent, mais ne l'a pas rapporté. Pour améliorer le test sérologique, il serait nécessaire d'organiser une ECQ spécifique avec un large panel de différents prélèvements codés et d'étudier les procédures suivies dans chaque laboratoire.

Pour déterminer quel score l'enquête estimerait acceptable pour un CNR, nous avons considéré que le prélèvement contenant la souche A(H1N1) à 1 TCID₅₀ était faiblement positif, et pouvait être exclu du score. Comme il restait 20 items, une erreur réduisait le score de 5 %. Globalement, un score final de 90 % ou plus a été considéré comme acceptable. Sur 16 laboratoires de CNR, 11 (69 %) ont obtenu un score de 90 % ou plus. Les résultats de notre étude n'ont pas remis en question la détection ou la description d'une épidémie de grippe, ni la caractérisation du virus.

Suite à cette première ECQ, il est apparu nécessaire de réaliser d'autres contrôles de qualité, pas seulement pour les CNR qui devaient améliorer leur pratique, mais également pour augmenter la sensibilité et la rapidité de détection de nouveaux variants. Dans le cadre du programme global de préparation aux pandémies, l'étude sur la grippe exige une alerte rapide, tâche dévolue aux CNR.

Le CNR de Lyon organisera la prochaine ECQ sur la détection et l'identification des virus grippaux et des VRS pendant l'hiver 2002-03. Cette évaluation sera proposée aux mêmes laboratoires nationaux de référence et aux nouveaux membres d'EISS (en tout, 26 laboratoires de 20 pays doivent participer à l'évaluation).

Remerciements / Acknowledgements :

L'évaluation du contrôle de qualité d'EISS a été financée en partie par la Commission européenne. Nous aimerions remercier John Paget pour sa relecture de l'article, ainsi que tous les centres nationaux de référence ayant participé à l'évaluation / The EISS QCA was partly funded by the European Commission. We would like to thank John Paget for reviewing the article, and all of the national reference centres who participated in the QCA.

References

1. Manuguerra JC, Mosnier A, Paget W on behalf of EISS (European Influenza Surveillance Scheme). Monitoring of influenza in the EISS European network member countries from October 2000 to April 2001. *Eurosurveillance* 2001; **6**: 127-135. (<http://www.eurosurveillance.org/em/v06n09/0609-221.asp>).
2. Chomel JJ, Remilleux MF, Marchand P, Aymard M. Rapid diagnosis of influenza A. Comparison with ELISA immunocapture and Culture. *J Virol Methods* 1992; **37**: 337-43.
3. Boon ACM, French AM, Fleming DM, Zambon MC. Detection of influenza A subtypes in community-based surveillance. *J Med Virol* 2001; **65**: 163-70.
4. Schultze D, Thomas Y, Wunderli W. Evaluation of an optical immunoassay for the rapid detection of influenza A and B viral antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; **20**: 280-3.
5. Magnard C, Valette M, Aymard M, Lina B. Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to Influenza A and B viruses. *J. Med Virol* 1999; **59**: 215-20. (<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/63003556/START>).
6. Herrmann B, Larsson C, Zwegberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol.* 2001; **39**: 134-8.

ment. All NRC sent characterised isolates to the international reference centre which will confirm the identification and select variants as possible candidates for the vaccine of the following winter season.

RT-PCR techniques and in-house reagents gave specific results: one false positive out of 189 tests. The introduction of high virus concentrations in the quality control showed that laboratories correctly controlled the risk of contamination. The sensitivity of the RT-PCR varied widely (40 to 100% for influenza, 71 to 86% for RSV) depending on the laboratory, but within the same laboratory it was identical to the sensitivity of cell culture as previously reported in the literature (5, 6).

We were surprised that only 60% of the NRC performed the HI test for evaluating the immune status of vaccinees. The HI titres also varied greatly from one laboratory to another, mainly on the B HI titres. It is most probable that at least one laboratory used detergent treated influenza B antigen, but did not report this. To improve the serological test it would be necessary to organise a specific QCA with a large panel of various coded samples and to investigate the procedures in each laboratory.

To establish the score that the assessment considered to be acceptable for a NRC, we considered that the sample with A(H1N1) at 1 TCID₅₀ was weakly positive, and could be excluded from the score. Since there are 20 items left, one error would reduce the score by 5%. Altogether a score of 90% or more was considered to be good. Eleven out of 16 NRC laboratories (69%) obtained a score of 90% or more. The results of this study did not undermine the detection or description of an influenza epidemic, or the characterisation of the virus.

Following this first QCA, it appeared necessary to perform other quality controls, not only for NRCs which had to improve their practices, but also to improve the sensitivity and the rapidity in the detection of new variants. Within the framework of the global pandemic preparedness programme, the flu survey requires an early warning (alert), which is the duty of the NRCs.

The Lyons NRC will organise the next QCA on influenza and RS virus detections and identifications during the winter of 2002-03. This assessment will be proposed to the same national reference laboratories and to the new members of EISS (26 laboratories in 20 countries are expected to participate in this assessment).