

N° d'ordre : 3465

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Centre de Génomique des Pathologies Humaines

Structure de Recherche : Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines

Discipline : Biologie

Spécialité : Virologie

Présentée et soutenue le 29/05/2021 par :

Fatima ELFALAKI

**Etude phénotypique et génotypique des profils de sensibilité/résistance
aux inhibiteurs de la neuraminidase des virus influenza circulant aux
Maroc**

JURY

Abdelaziz BENJOUAD	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Président
Nadia DAKKA	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Examineur /Rapporteur
Mariette DUCATEZ	PES, Université de Toulouse , Ecole nationale vétérinaire-Toulouse	Examineur /Rapporteur
My Mustapha NAJJI	PES , Faculté de Science et de Technologie- Mohammedia PH,	Examineur /Rapporteur
Siham FELLAHI	PH , Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat	Examineur /Rapporteur
Hicham OUMZIL	PA, Université Mohammed V , Faculté de medecine et de pharmacie-Rabat	Co-directeur de thèse
Youssef BAKRI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat	Directeur de Thèse

Année Universitaire : 2020/2021



DEDICACES

À la mémoire de mon père

À ma mère

En témoignage de mon affection et de ma reconnaissance

À ma petite famille

Hamid, Nassim et Lamiae

À mes chères Sœurs

Samira, Nabila et Houda

À mon cher frère

Rachid

À tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

La poursuite de mes études doctorales m'a offert l'opportunité d'évoluer auprès d'éminents chercheurs et de collaborer avec de nombreux laboratoires de virologie et donc d'être à la pointe des dernières techniques de recherche virologiques. À toutes ces personnes rencontrées sur mon chemin, je souhaite adresser mes sincères remerciements.

*À mon Directeur de thèse, Monsieur **Youssef BAKRI** Professeur d'enseignement supérieur à la faculté des sciences de Rabat et directeur du centre d'étude doctorale, qui m'a fait l'honneur de diriger et de corriger mon travail. Je le remercie pour ses remarques pertinentes, tant sur le fond que sur la forme.*

*J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur **Hicham OUMZIL** Professeur d'enseignement supérieur à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat et chef du département de virologie à l'Institut National d'Hygiène, pour son aide inestimable et l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail. Son dynamisme et ses encouragements m'ont permis de ne pas baisser les bras, Ses compétences autant que sa disponibilité m'ont permis de mener à bien ce travail. Qu'il trouve ici toute ma gratitude.*

Je tiens également à remercier tous les membres de jury qui ont accepté d'évaluer mon projet de thèse.

*Je présente mes remerciements les plus sincères à Monsieur **Abdelaziz BENJOUAD** professeur d'enseignement supérieur à l'Université Internationale de Rabat qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse. Je lui exprime ma profonde gratitude.*

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame **Nadia DAKKA** Professeur d'enseignement supérieur à la faculté des sciences de Rabat et responsable du Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines, pour l'honneur qu'elle me fait en prenant la charge de rapporteur et en siégeant à ce jury.

Je tiens à remercier également Madame **Mariette DUCATEZ** professeur d'enseignement supérieur à l'école nationale vétérinaire de Toulouse, d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et pour la rapidité avec laquelle elle a lu mon manuscrit. Ses remarques pertinentes ont considérablement amélioré la qualité de ce manuscrit.

Je remercie également Monsieur **My Mustapha ENNAJI** professeur d'enseignement supérieur à la faculté des sciences et technologies de Mohammedia d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse, ainsi que pour ces remarques scientifiques enrichissantes qui m'ont été d'une grande aide pour mener à bien ce travail.

Je suis extrêmement reconnaissante à Madame **Siham FELLAHI** Professeur habilité à l'Institut Agronomique et Vétérinaire et chef d'unité des pathologies aviaires, d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

Un remerciement tout particulier à mes collègues du Centre National de référence de la grippe et des virus respiratoires à l'Institut National d'Hygiène, sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce travail.

*Je tiens également à exprimé mes remerciements les plus s'insères à Dr **Touria BENAMAR**, Epidémiologiste au Centre National d'Opération d'Urgence en Santé Publique pour les efforts déployés autant que point focale gestion du projet CDC.*

*Les mots me manquent pour exprimer ma reconnaissance **aux membres de l'équipe du centre collaborateur de l'OMS** à Londres pour leur accueil chaleureux et pour le temps qu'ils m'ont consacré lors de ma formation.*

*Mes remerciements s'adressent également **au personnel du département de virologie de l'Institut National d'Hygiène**, qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par leurs encouragements, leurs conseils et leurs critiques.*

Avant-propos

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines de la Faculté des Sciences de Rabat sous la direction du professeur Youssef BAKRI et le laboratoire de Virologie de l'Institut National d'Hygiène sous la direction du professeur Hicham OUMZIL, avec le soutien financier du Ministère de la Santé, de l'Organisation Mondiale de la Santé et du Centre de Contrôle des Maladies Infectieuses (CDC), Atlanta, USA (Grant numéro : 5U51CI000469).

Ce travail de thèse a permis de valoriser les résultats scientifiques obtenus lors d'une décennie de surveillance sentinelle des Infections Respiratoires Aigües à l'échelle nationale, ce qui lui a valu d'être publié dans des journaux à comité de lecture et présenté dans des congrès internationaux.



PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture :

- **Elfalaki, F.**, Ihazmad, H., Bimouhen, A., Regragui, Z., Benkarroum, S., Bakri, Y., Barakat, A., 2016. Detection of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitor in Morocco during 2014/15 season. Eastern Mediterranean Health Journal 22, 452–458. <https://doi.org/10.26719/2016.22.7.452>

- **El falakiFatima**, Bimouhen Abderrahman, Ihazmad Hassan, Regragui Zakia , Benkerroum samira , Bakri youssef , and Oumzil Hicham.Genomic Variability and Neuraminidase Inhibitor Drug Susceptibility Patterns of Influenza A/H1N1pdm09 Strains Circulating in Morocco during the 2015-2016 Season. (Soumis)

- Bimouhen, A., **El falaki, F.**, Ihazmad, H., Regragui, Z., Benkerroum, S., Barakat, A., 2016. Circulation of Respiratory Syncytial Virus in Morocco during 2014-2016: Findings from a sentinel-based virological surveillance system for influenza. Eastern Mediterranean Health Journal 22, 482–489. <https://doi.org/10.26719/2016.22.7.482>

- Global Influenza B Study group, Caini, S., Spreeuwenberg, P., Kuznierz, G.F., Rudi, J.M., Owen, R., Pennington, K., Wangchuk, S., Gyeltshen, S., Ferreira de Almeida, W.A., Pessanha Henriques, C.M., Njouom, R., Vernet, M.-A., Fasce, R.A., Andrade, W., Yu, H., Feng, L., Yang, J., Peng, Z., Lara, J., Bruno, A., de Mora, D., de Lozano, C., Zambon, M., Pebody, R., Castillo, L., Clara, A.W., Matute, M.L., Kosasih, H., Nurhayati, Puzelli, S., Rizzo, C., Kadjo, H.A., Daouda, C., Kiyankbekova, L., Ospanova, A., Mott, J.A., Emukule, G.O., Heraud, J.-M., Razanajatovo, N.H., Barakat, A., **El Falaki, F.**, Huang, S.Q., Lopez, L., Balmaseda, A., Moreno, B., Rodrigues, A.P., Guiomar, R., Ang, L.W., Lee, V.J.M., Venter, M., Cohen, C., Badur, S., Ciblak, M.A., Mironenko, A., Holubka, O., Bresee, J., Brammer, L., Hoang, P.V.M., Le, M.T.Q., Fleming, D., Séblain, C.E.-G., Schellevis, F., Paget, J., 2018. Distribution of influenza virus types by age using case-based global surveillance data from twenty-nine countries, 1999-2014. BMC Infectious Diseases 18. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3181-y>

- Caini, S., Kuznierz, G., Garate, V.V., Wangchuk, S., Thapa, B., de Paula Júnior, F.J., Ferreira de Almeida, W.A., Njouom, R., Fasce, R.A., Bustos, P., Feng, L., Peng, Z., Araya, J.L., Bruno, A., de Mora, D., Barahona de Gámez, M.J., Pebody, R., Zambon, M., Higueros, R., Rivera, R., Kosasih, H., Castrucci, M.R., Bella, A., Kadjo, H.A., Daouda, C., Makusheva, A., Bessonova, O., Chaves, S.S., Emukule, G.O., Heraud, J.-M., Razanajatovo, N.H., Barakat, A., **El Falaki, F.**, Meijer, A., Donker, G.A., Huang, Q.S., Wood, T., Balmaseda, A., Palekar, R., Arévalo, B.M., Rodrigues, A.P., Guiomar, R., Lee, V.J.M., Ang, L.W., Cohen, C., Treurnicht, F., Mironenko, A., Holubka, O., Bresee, J., Brammer, L., Le, M.T.Q., Hoang, P.V.M., El Guerche-Séblain, C., Paget, J., the Global Influenza B Study team, 2019. The

epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century. PLOS ONE 14, e0222381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222381>

- Hind Ezzine, Imad Cherkaoui, Ahmed Rguig, Hicham Oumzil, Mouad Mrabet, Abderrahman Bimouhen, **Fatima El Falaki**, Zakia Regragui, Zineb Tarhda, Mohammed Youbi, Mariam Naciri Influenza epidemiology and risk factors for severe acute respiratory infection in Morocco during the 2016/2017 and 2017/2018 Seasons Pan African Medical Journal. 2020;36(159). 10.11604/pamj.2020.36.159.21239

<https://www.panafrican-medjournal.com//content/article/36/159/full>.

- Rguig, A., Cherkaoui, I., McCarron, M., Oumzil, H., Triki, S., Elmbarki, H., Bimouhen, A., **El Falaki, F.**, Regragui, Z., Iahzmad, H., Nejari, C., Youbi, M., 2020. Establishing seasonal and alert influenza thresholds in Morocco. BMC Public Health 20. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09145-y>

Publications scientifiques dans des revus nationales à comité de lecture:

- Rguig Ahmed; Cherkaoui Imad; Oumzil Hisham;Elmbarki Houria; Bimouhen Abderrahman,**El Falaki Fatima**; Triki Soumia; Tarhda Zainab; Nejari Chakib et Maaroufi Abderrahmane Etude comparative de méthode statistiques pour determination des seuilsd'activité grippale au Maroc ; 2004-2017. (Bulletin d'Epidémiologie et de Santé Publique / Volume 50 /N° 75/ ISSN08518238/ Février 2018)

Communications Orales :

- **Fatima EL FALAKI**, Zakia REGRAGUI, Abderrahman BIMOUHEN, Hassan IHAZMAD, Youssef BAKRI, Hicham OUMZIL. Molecular Evolution of Neuraminidase Gene (NA) of Seasonal Influenza A and B Virus in Morocco during 2009-2018.Congrès international: «The First International Congress of the Moroccan Society of Genomic and Human Genetics and the third edition of the School of Immunogenetics».du 19-21 Décembre, 2019, Agadir, Maroc.

- Hicham OUMZIL, Zakia REGRAGUI, Abderrahman BIMOUHEN, Hassan IHAZMAD, Samira BENKERROUM, Abdelkarim FILALI-MALTOUF, Soumia TRIKI, Imad CHERKAOUI, **Fatima El FALAKI**, Detection and characterization of influenza virus from influenza-like illness cases in the private and public sentinel networks during the 2016-2019 influenza seasons in Morocco.Congrès international: «2nd Scientific Conference on Acute Respiratory Infection in the Eastern Mediterranean Region and the 5th Meeting of the Eastern Mediterranean Acute Respiratory Infection Surveillance (EMARIS) Network» du 12-15 novembre 2019,Casablanca,Maroc.

- Hassan IHAZMAD, Zakia REGRAGUI, Abderrahman BIMOUHEN, Samira BENKERROUM Abdelkarim FILALI-MALTOUF, **Fatima El FALAKI**, Hicham OUMZIL. Assessment of the compliance of the national influenza center (MOROCCO) to the biorisk management standards of the CWA 15793:2011 Congrès international: «2nd Scientific Conference on Acute Respiratory Infection in the Eastern Mediterranean Region and the 5th Meeting of the Eastern Mediterranean Acute Respiratory Infection Surveillance (EMARIS) Network» du 12-15 novembre 2019, Casablanca, Maroc.

Communications affichées:

- **El falaki Fatima** ; Ihazmad Hassan, Bimouhen Abderrahman, Regragui Zakia, Benkerroum Samira, Bakri Youssef, Barakat Amal and Oumzil Hicham .Phenotypic and genotypic susceptibility profile to NAIs of type B influenza viruses circulating in Morocco during the 2014 /2015 influenza seasons. Congrès international «Fourth meeting of the Eastern Mediterranean Acute Respiratory Infection Surveillance (EMARIS) Network and her poster on» du 11-14 decembre 2017, Jordanie.

- **El Falaki Fatima**, Ihazmad Hassan, Bimouhen Abderrahman, Regragui Zakia, Benkerroum Samira, Bakri Youssef, Barakat Amal and Oumzil Hicham .Genomic Variability and Neuraminidase Inhibitor Drug Susceptibility Profile of Influenza A/H1N1pdm09 Strains Circulating in Morocco during 2015-2016 Season. Congrès international. «International Conference on Epidemiology and Infectious Diseases (ICEID)» du 26 -29 Aout 2018, Atlanta.

- Bimouhen. A, **F. El Falaki**, H. Ihazmad, Z. Regragui, S. Benkerroum and A. Barakat Respiratory viruses associated with severe acute respiratory infection (SARI) among children under five years old in Morocco, during two seasons 2014-16. Congrès international. «International Conference on Epidemiology and Infectious Diseases (ICEID)» du 26 -29 Aout 2018, Atlanta.

- Zakia REGRAGUI, Abderrahman BIMOUHEN, Hassan IHAZMAD, Samira BENKERROUM, Abdelkarim FILALI-MALTOUF, Soumia TRIKI, Imad CHERKAOUI, **Fatima El FALAKI**, Hicham OUMZIL. Influenza-associated severe acute respiratory infections among children under five years old in Morocco from September 2017 to March 2019. Congrès international: «2nd Scientific Conference on Acute Respiratory Infection in the Eastern Mediterranean Region and the 5th Meeting of the Eastern Mediterranean Acute Respiratory Infection Surveillance (EMARIS) Network » du 12-15 novembre 2019, Casablanca, Maroc.

Résumé

Les épidémies de grippe sont responsables d'une mortalité et d'une morbidité importante. Bien que la vaccination reste le principal moyen de prévention, les antiviraux constituent un élément clé en termes de prophylaxie et de traitement. Les inhibiteurs de la neuraminidase sont actuellement la seule classe d'antiviraux disponible. Compte tenu de ces options limitées de thérapie antivirale, la résistance aux médicaments antigrippaux constitue une préoccupation constante. Au Maroc, les données relatives aux profils de sensibilité des virus grippaux aux INAs sont rares. Cette étude constitue une première évaluation nationale du degré de sensibilité des virus grippaux à ces deux antiviraux. Au cours de la période d'étude (quatre saisons grippales). L'évaluation phénotypique, complétée par l'analyse génotypique du gène NA, révèle une sensibilité normale pour les deux médicaments. Aucune mutation de résistance n'a été identifiée. Cependant, une diminution de l'affinité du virus A (H1N1) pdm09 pour l'oseltamivir a été détectée. Probablement liée aux mutations situées au voisinage du site actif de la neuraminidase. D'autre part, la dynamique d'évolution du gène NA des virus grippaux isolés pendant les saisons grippales 2009/2010 à 2017/2018, déterminée selon la méthode (MCMC) complétée par un suivi de la dynamique de migration des sites de N-glycosylation, révèle une dérive génétique associée à un taux de substitution plus accentué pour les virus grippaux type A que type B, particulièrement chez le A (H1N1) pdm09. A cette dérive s'ajoute une dynamique de migration des sites de glycosylation en faveur d'une diminution de l'affinité pour l'Oseltamivir et d'un échappement au système immunitaire. Les résultats obtenus grâce à cette première étude documentée démontrent clairement l'importance de la surveillance des profils de sensibilité des virus grippaux aux antiviraux et du suivi de la dynamique d'évolution du gène de la NA.

Mots clés : Influenza, neuraminidase, INAs, profil de sensibilité, Dynamique d'évolution

Abstract

Influenza epidemics are responsible for significant mortality and morbidity. Although vaccination remains the primary means for the prevention of influenza, antiviral drugs are a key component in the prophylaxis and treatment. Neuraminidase inhibitors are currently the only class of antiviral available. Given these limited antiviral therapy options, resistance to anti-influenza drugs is constant concern. In Morocco, data relating to the sensitivity profiles of influenza viruses to the two INAs are scarce. This study constitutes a first national assessment of the degree of sensitivity of influenza viruses to two antiviral drugs. During the study period (four influenza seasons), using the phenotypic NA inhibition assay as well as sequencing of the NA gene. We found that all the influenza viruses exhibited normal sensitivity for both drugs. The mutations in the NA polypeptide associated with drug resistance in Influenza virus were not detected in any of the Moroccan isolates analyzed in this study. However, a decrease in the affinity of influenza A (H1N1) pdm09 to Oseltamivir was detected. Probably related to mutations detected in the vicinity of the active site of the NA polypeptide. The evolution dynamics of the NA gene of influenza viruses isolated during the influenza seasons 2009/2010 to 2017/2018, determined using the Bayesian method (MCMC). Completed by a follow-up of the migration dynamics of the N-glycosylation sites. The results obtained reveal a genetic drift associated with a substitution rate at the nucleotide scale that is relatively more accentuated in the case of influenza viruses type A than type B. In addition to this drift, there is a migration dynamic of the glycosylation sites in favor of a decrease in affinity to Oseltamivir and escape to the immune system. The results obtained through this first documented study clearly demonstrate the importance of monitoring the susceptibility profiles of influenza viruses to antiviral.

Keywords: Influenza, neuraminidase, INAs, sensitivity profile, Evolutionary dynamic

ملخص

في كل سنة يكون لأوبئة الأنفلونزا تأثير كبير على السكان فهم مسئولون عن الوفيات والأمراض بشكل كبير على الرغم من أن التطعيم ليزال الوسيلة الرئيسية للوقاية من الأنفلونزا فإن مضادات الفيروسات تشكل عنصر أساسي من حيث الوقاية والعلاج لاسيما بالنسبة للفئات التي تعاني من ضعف في جهازها المناعي أو من أمراض مزمنة.

تعتبر متبذات النورامينيداز على الخصوص الأوسيلتا ميفير الفئة الوحيدة المتوفرة حاليا من مضادات الأنفلونزا أمام هذه الخيارات العلاجية المحدودة فإن ظهور عينات مقاومة لهذه الفئة من الأدوية تشكل مصدر قلق دائم.

على صعيد المغرب هناك شح في البيانات المتعلقة بتقييم خصائص الحساسية لفيروسات الأنفلونزا لهذه المضادات.

تشكل هذه الدراسة أول رصد على الصعيد الوطني لخصائص الحساسية المتعلقة بالنمط الظاهر والنمطي الجيني لفيروسات الأنفلونزا بالمغرب خلال فترة الدراسة أربع مواسم للأنفلونزا تم جمع 4888 عينة لمسحات حلقية أو أنفية من خلال الشبكة الوطنية لتتبع الحالة الوبائية للأنفلونزا والتي يتم إرسالها إلى المركز الوطني المرجعي للأنفلونزا بالمعهد الوطني للصحة. أخذت العينات عند مرضى يعانون من أعراض الأنفلونزا أو مصابين بأمراض تنفسية حادة وخيمة من بين 1126 حالة ايجابية والتي تم تأكيدها من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل 319 فقط كانت تتوفر على شروط الأزمة (36.7/°) 17 B 1 وهي تتوزع كالتالي فئة الأنفلونزا MDCK للخضوع لبقية التقييم وذلك بعد حقنها لخلايا pdm09 (H1N1) A (102/°) (32/°) الأنفلونزا A(H3N2) 100 (31.3/°) الأنفلونزا أظهر فحص الحساسية لمتبذات النورامينيداز المرتبطة بالنمط الظاهري والنمط الجيني أن كل العينات تظهر حساسية طبيعية بالإضافة أنه لم يتم الكشف عن أية طفرات ثم الإعلان عنها سابقا على أنها تمنح مقاومة للعقارين أضف إلى ذلك أن الأحماض الأمينية المشكلة أو المحيطة بالمركز المحفز للبروتين جد مخفوفة لكن بالمقابل ثم الكشف عن ارتفاع على مقاومة الأوزيلتاميفير هذه المقاومة ربما مرتبطة بالطفرات التي تم الكشف عنها A(H1N1) pdm 09 قدرة بالقرب من المركز المحفز الشيء الذي دفعنا إلى تعميق البحث من خلال رصد دينا ميكية التطور الجيني للنورامينيداز للسنوات الممتدة مابين 2010/2009 و 2018/2017 أكثر من غيره مدعم دينا ميكية PDM A(H1 N1) أظهر البحث سرعة تطور الجين بالنسبة لفيروس الأنفلونزا 09 لتحريك المواقع الكليكوزيلية بهدف الانفلات من الجهاز المناعي للجسم كل هذه النتائج المحصل عليها تؤكد أن الترصد المتمس لحساسية متبذات النورا مينيداز أمر ضروري .

الكلمات المفتاح: الأنفلونزا – النورا مينيداز – الخصائص الحساسية – الديناميكية التطورية

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	4
I. Agent étiologique et sa variabilité.....	5
1. Classification et nomenclature.....	5
2. Structure de la particule virale.....	6
2.1. Présentation générale.....	6
2.2. Génome.....	8
3. Protéines du virus de la grippe	9
3.1. L'Hémagglutinine (HA).....	9
3.2. La neuraminidase (NA)	10
3.3. Les protéines de matrice M1 et M2	11
3.4. La nucléoprotéine (NP)	12
3.5. Le complexe de la polymérase	12
3.6. Les protéines NS1 et NEP (anciennement appelée NS2).....	12
4. Cycle d'infection du virus de la grippe	13
5. La variabilité antigénique	15
5.1. Glissement antigénique.....	15
5.2. Cassures antigéniques (réassortiment).....	15
II. Aspect épidémiologique.....	17
III. Les formes cliniques de la grippe	19
1. Syndrome grippal	19
2. Les formes compliquées	20
IV. Méthodes de diagnostic	22
1. Tests rapides	23
2. Immunofluorescence(IF)	23
3. Culture cellulaire	24
4. Biologie moléculaire.....	24
V. Traitements préventifs et curatifs	26
1. Vaccination.....	Erreur ! Signet non défini.
1.1. Les vaccins inactivés	26

1.2. Les vaccins atténués	27
1.3. Indication de la vaccination	28
1.4. Evaluation de l'efficacité du vaccin	29
2. Les antiviraux	29
2.1. Adamantanes	30
2.2. Inhibiteurs de la neuraminidase	31
2.2.1. L'Oseltamivir/Tamiflu©.....	34
2.2.2. Le Zanamivir / Relenza©	36
2.2.3. Les Inhibiteurs de la neuraminidase de la nouvelle génération.....	37
VI. La résistance aux antiviraux	39
1. Mécanisme de résistance	39
2. Les mutations de résistance aux INAs.....	44
3. Méthodes de détection de la résistance aux INAs	47
3.1. Les tests phénotypiques	47
3.2. Les tests génotypiques	48
3.2.1. Méthode de détection des polymorphismes mononucléotidiques(SNP)	48
3.2.2. Méthode de séquençage du génome du virus de la grippe	49
VII. Programme de surveillance de la grippe	51
1. A l'échelle mondiale.....	51
2. Au Maroc	53
Chapitre II : MATERIELS ET METHODES	55
I. Population de l'étude.....	56
1. Définition de cas	56
2. Recueil des échantillons	56
3. Approche générale	57
II. Procédures de laboratoire.....	58
1. Extraction de l'ARN virale.....	58
2. Détection et identification des virus de la grippe par RT- PCR en temps réel.....	58
2.1. Préparation du mélange réactionnel ou (Master Mix)	60
2.2. Interprétation des résultats.....	61
3. Isolement des virus grippaux.....	62
4. Analyse phénotypique des profils de sensibilité aux antiviraux par la technique de la fluorescence :	64

4.1. Principe.....	64
4.2. Reconstitution des médicaments et la préparation du panel des souches de référence	66
4.3. Détermination de l'activité de la neuraminidase	67
4.4. Détermination de l'IC50.....	68
4.5. L'analyse des données	69
4.6. Critère d'interprétation des résultats.....	70
5. Séquençage du segment 6 du génome viral (NA) par méthode de Sanger.....	71
5.1. Rétrotranscription et amplification	72
5.2. Révélation des produits de PCR sur gel	73
5.3. Purification des produits de PCR : EXOSAP-IT	74
5.4. Réaction de séquence.....	74
5.5. Purification des produits de séquences	75
5.6. Détection automatisée des séquences	75
III. Analyse phylogénétique des séquences	76
IV. Estimation du taux d'évolution du gène de la NA	76
V. Détermination des sites de glycosylation	76
Chapitre III : Résultats et discussion.....	77
I. Bilan virologique.....	78
II. Isolement virale.....	80
III. Evaluation de la sensibilité des virus grippaux aux INAs (Oseltamivir et Zanamivir).	81
1. Pour les virus type B.....	81
1.1. Evaluation phénotypique par test fluorométrique.....	81
1.2. L'évaluation génotypique par séquençage du gène de la NA	84
2. Pour les virus sous-type A(H1N1) pdm09	88
2.1. Evaluation phénotypique par test fluorométrique.....	88
2.2. L'évaluation génotypique par séquençage du gène de la NA	90
3. Pour les virus sous-type A(H3N2).....	93
3.1. Evaluation phénotypique par test fluorométrique.....	93
3.2. L'évaluation génotypique par séquençage du gène de la NA	95
IV. Dynamique d'évolution du gène de la neuraminidase des virus de la grippe au cours des dix dernières années au Maroc	99
1. Analyse phylogénétique et taux de substitution à l'échelle nucléotidique	99

1.1. Cas du virus de type B	99
1.2. Cas du virus pandémique A/H1N1pdm09	105
1.3. Cas du virus A(H3N2)	108
2. Dynamique du potentiel de la glycosylation	110
2.1. Cas du virus de type B	110
2.2. Cas du virus A (H1N1) pdm09	111
2.3. Cas du virus A (H3N2).....	111
V. Discussion générale	115
VI. Conclusion et recommandations	118
Productionsn scientifiques	119
Références Bibliographiques	119
Annexes.....	119

ABRÉVIATIONS

A(H1N1)pdm09	: Virus pandémique A (H1N1) apparu en 2009
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADNc	: Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AVWG	: Anti-Viral Working Group
ARN	: Acide ribonucléique
ARNc	: ARN complémentaire
ARNm	: ARN messenger
ARNv	: ARN viral
AS	: Acide sialique
B/Victoria	: B/Victoria/2/87
B/Yamagata	: B/Yamagata/16/88
CNRG	: Centre national de référence de la grippe
DELM	: Direction d'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies
EMRO	: Eastern Mediterranean Regional office
HA	: Hémagglutinine
HA0	: Précurseur de la protéine H
HA1	: Sous unité de la protéine HA
HA2	: Sous unité de la protéine HA
IC50	: La concentration inhibitrice médiane
IF	: Immunofluorescence
INAs	: Inhibiteurs de la neuraminidase
INH	: Institut National d'Hygiène
IRAS	: Infection Respiratoire Aiguë Sévère
M1	: Protéine de matrice
M2	: Protéine du canal ionique
MDCK	: Madin-Darby Canine Kidney
MEM	: Minimum Essentiel Medium

NA	: Neuraminidase
NEP	: Protéine d'export nucléaire
NGS	: Next Generation Sequencing
NP	: Nucléoprotéine
NS1	: Protéine non structurale 1
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PA	: Protéine acide
PB1	: Protéine basique 1
PB2	: Protéine basique 2
RBS	: Site de liaison au récepteur
RT-PCR	: Reverse transcriptase- réaction de polymérisation en chaîne

Codes et abréviations des Acides Aminés

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	cys
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Photo en microscope électronique de virus de l'influenza	7
Figure 2 : Illustration schématique du virus de la grippe	7
Figure 3: Structure tridimensionnelle de la protéine HA	9
Figure 4: Structure linéaire et tridimensionnelle de la NA	11
Figure 5 : Illustration schématique du cycle de réplication de virus de la grippe	14
Figure 6 : schéma représentant glissement et cassure antigénique des virus influenza.	16
Figure 7 : Modèle d'induction des réponses immunitaires après la vaccination antigrippale atténuée.....	27
Figure 8: Les groupes à risque pour lesquels la vaccination est fortement recommandée par l'OMS.....	28
Figure 9 : Structure chimique des principaux médicaments utilisés contre la grippe	29
Figure 10 : Sites de liaison de la Rimantadine et de l'Amantadine au canal ionique M2.	30
Figure 11 : Structure moléculaire de la neuraminidase (a)Zanamivir,(b)Laninamivir, (c) Oseltamivire carboxylase et (d) Peramivir.....	32
Figure 12 : Site actif de la neuraminidase du virus de la grippe en complexe avec l'oseltamivir.....	32
Figure 13 : Image en microscopie électronique des cellules MDCK infectées avec le virus de l'influenza A.	33
Figure 14 : Mode d'administration et posologies usuelles de l'Oseltamivir.....	35
Figure 15 : Les mutations de la protéine M2 qui confèrent une résistance aux d'Adamantanes	40
Figure 16 : Epidémiologie d'émergence des formes résistantes aux Adamantanes Dans la région EMRO	41
Figure 17 : Représentation graphique de la dernière évaluation mondiale de la surveillance de la résistance aux INAs.....	43
Figure 18: (A) mécanisme d'action de l'Oseltamivir et du Zanamivir. (B) marqueurs de résistance	45

Figure 19 : Algorithme adopté au cours de cette étude.....	57
Figure 20 : Extracteur automatique TM PureLink ARN total.....	58
Figure 21 : Représentation schématique de l'algorithme de détection et d'identification des virus grippaux par RT-PCR temps réel.....	60
Figure 22 : Répartition des échantillons et des couples d'amorces sur la plaque dans le cas du typage du virus de la grippe	60
Figure 23 : Paramètres d'amplification de la matrice virale par PCR en temps réel	61
Figure 24 : Critères d'interprétation d'un test de typage/sous typage du virus de la grippe par PCR en temps réel.....	62
Figure 25 : Culture de la lignée MDCK dans des plaques de 24 puits	63
Figure 26 : principe de la technique d'étude de la sensibilité des virus grippaux par fluorescence.....	64
Figure 27 : Test fluorimétrique de l'activité de la neuraminidase	65
Figure 28 : Modèle de préparation de la série de dilution de la suspension virale	67
Figure 29: Dilution des médicaments.....	68
Figure 30 : Plaque de 96 cupules avec les différentes concentrations des INAs (de 1000 nM à 0.01 nM).....	69
Figure 31: Stratégie d'amplification du segment 6 du génome viral en 5 fragments individuels	71
Figure 32: Saisonnalité des types et sous-types du virus de la grippe A et B au Maroc de quatre saisons grippales 2014/15, 2015/16, 2016/17 et 2017/2018	78
Figure 33: Répartition des différents sous-types grippaux pour chaque saison grippale.....	79
Figure 34: Taux de positivité grippale relative à chaque saison	79
Figure 35: Rendement en culture cellulaire relatif à chaque sous-type de virus grippale	80
Figure 36: Rendement en culture cellulaire relatif à chaque saison grippale.....	80
Figure 37: Comparaison de la sensibilité du virus de type B aux deux médicaments	83
Figure 38: Variation dans la séquence en acides aminés de la neuraminidase des isolats cliniques appartenant à la lignée Yamagata par rapport à la souche de référence B/Florida/4/2006	86
Figure 39: Variation dans la séquence en acides aminés de la neuraminidase des isolats cliniques appartenant à la lignée Victoria par rapport à la souche de référence B/Malaysia/30552/2004	87

Figure 40: Comparaison de la sensibilité du virus, sous-type A/H1N1pdm09 aux deux médicaments.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 41: Variation dans la séquence en acides aminés de la neuraminidase des isolats cliniques appartenant au sous-type A(H1N1) pdm09 par rapport à la souche de référenceA/California/07/09.....	92
Figure 42: Comparaison de la sensibilité du virus sous-type A/H3N2 aux deux médicaments	95
Figure 43: variation dans la séquence en acides aminés de la neuraminidase des isolats cliniques appartenant au sous-type A(H3N2) par rapport à la souche de référenceA/Brisbane/10/2007.....	97
Figure 44: Arbre phylogénétique Bayesiendu virus B lignée Victoria	102
Figure 45: Représente le taux de substitution à l'échelle nucléotidique du gène de la neuraminidase du virus type B lignée Victoria. Avec un intervalle de confiance de 95% HPD (2.24×10^{-3} - 2.96×10^{-3})	101
Figure 46: Arbre phylogénétique Bayesiendu virus B lignée Yamagata	104
Figure 47: Taux de substitution à l'échelle nucléotidique du gène de la neuraminidase du virus de la grippe de type B lignée Yamagata. Avec un intervalle de confiance de 95% HPD (1.99×10^{-3} - 2.71×10^{-3}).	103
Figure 48: Arbre phylogénétique Bayésien du virus A(H1N1) pdm09	107
Figure 49: Taux de substitution à l'échelle nucléotidique du gène de la neuraminidase du virus sous-type A(H1N1) pdm09 estimé à $4,15 \times 10^{-3}$ avec un intervalle de confiance de 95% HPD (3.52×10^{-3} - 4.78×10^{-3})	106
Figure 50: Arbre phylogénétique bayésien du virus A(H3N2)	109
Figure 51: Taux de substitution a l'échelle nucléotidique du gène de la neuraminidase du virus sous-type A(H3N2) estimé à 3.42×10^{-3} avec un intervalle de confiance de 95% HPD (3.01×10^{-3} - 3.84×10^{-3})	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Protéines codées par les segments d'ARN du virus type A	8
Tableau 2 : Historique des pandémies grippales chez l'homme	17
Tableau 3: Mutations des acides aminés catalytiques et structuraux et spécificité des antiviraux.....	46
Tableau 4 : Amorces et sondes utilisées pour les tests de RT-PCR à la recherche de la mutation H275Y du virus A/H1N1pdm09	49
Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel	59
Tableau 6 : valeurs de l'IC50 des souches de référence des virus grippaux	65
Tableau 7 : Séquences nucléotidiques des 5 couples d'amorces utilisées dans l'amplification du gène de la neuraminidase du virus pandémique A/H1N1pdm09	72
Tableau 8 : Valeurs des IC50 moyenne du type B (Yamagata et Victoria) des deux INAs ...	83
Tableau 9 : Valeurs des IC50 moyenne des souches A/H1N1pdm 09 relatives aux deux INAs	89
Tableau 10 : Valeurs des IC50 moyenne des isolats A(H3N2) relatifs aux deux INAs	94
Tableau 11 : Sites de glycosylation relatifs à chaque type /sous-type du virus de la grippe circulant au Maroc de 2009 à 2018	112

PROBLÉMATIQUE

Bien que la prophylaxie des infections grippales repose essentiellement sur la vaccination (Arr et al., 2010), les antiviraux jouent un rôle important dans la lutte contre les épidémies de grippe et dans la stratégie développée par l'OMS en prévision d'une pandémie grippale. C'est la seule mesure d'intervention susceptible d'atténuer l'incidence d'une pandémie d'influenza avant qu'un vaccin ne soit disponible. Cependant le danger associé à leur utilisation, réside dans leur pouvoir à exercer une pression sélective sur les formes résistantes. Il existe principalement deux classes de médicaments antiviraux, les inhibiteurs de la neuraminidase, l'Oseltamivir (Tamiflu) et le Zanamivir (Relenza) en l'occurrence et les inhibiteurs du canal ionique M2 que sont les Adamantanes (l'Amantadine et la Rimantadine). L'exposition des virus grippaux à ces drogues provoque la sélection de mutants viraux génétiquement résistants qui peuvent ensuite se transmettre sans perdre leur pouvoir pathogène. Actuellement, la plus grande partie des virus grippaux sont résistants aux Adamantanes (Saito *et al.*, 2003). La résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase (INAs) était un phénomène rare jusqu'en 2007. En effet de 1999 à 2002, moins de 1% des virus étaient résistants (Reece PA., 2007). Cependant, durant des dernières années une augmentation régulière du taux de résistance des virus A(H1N1) saisonnier a été constatée, pouvant atteindre 100% de résistance dans certains pays en 2008-2009 (Bazet *al.*, 2010 et Okomo-Adhiambo *et al.*, 2010). Au cours de la pandémie de 2009, quelques cas sporadiques de résistance à l'Oseltamivir pour le virus A(H1N1) pdm09 ont été détectés.

Le potentiel d'émergence et de propagation de variant du virus résistant aux INAs associé aux limites des options pharmaceutiques actuellement disponibles pour lutter contre les infections grippales, souligne la nécessité d'une mise en place d'un système de surveillance de la résistance aux antiviraux grippaux. Les informations obtenues sont essentielles pour la prise de décisions concernant les recommandations relatives à la prescription des médicaments, à la gestion des épidémies ou à une éventuelle pandémie.

Objectif global

Etablir à l'échelle nationale, la première estimation de la prévalence de la résistance aux antiviraux grippaux (INAs), en se basant sur les isolats cliniques recueillis par le réseau national de surveillance des syndromes grippaux et des infections respiratoires aiguës sévères durant les quatre saisons grippales de 2014/2015 à 2017/2018. Les résultats obtenus permettront d'estimer l'ampleur de la problématique liée à la résistance aux antiviraux grippaux et de constater l'éventualité d'une pharmacorésistance dans notre pays. Cette étude a pour ambition de mettre à la disposition des cliniciens et des décideurs, des informations pertinentes dans leur stratégie thérapeutique et ce, dans le but d'une utilisation plus rationnelle des antiviraux.

Objectifs spécifiques

Ce projet de thèse a été réalisé dans le but d'atteindre trois objectifs spécifiques :

- 1 / L'évaluation phénotypique de la sensibilité des virus grippaux circulant à l'échelle nationale vis-à-vis des INAs, l'Oseltamivir et le Zanamivir en l'occurrence.
- 2/ L'analyse génotypique à la recherche d'éventuels marqueurs de résistance.
- 3/ Le suivi de la dynamique d'évolution du gène de la neuraminidase cible des antiviraux grippaux.

Introduction

L'influenza, ou plus communément appelée la grippe est une infection virale aiguë qui se transmet aisément d'une personne à l'autre. Elle représente un problème majeur de santé public à travers le monde. C'est la maladie respiratoire la plus fréquente en termes de morbidité et de mortalité, en plus de son impact économique non négligeable. En effet, les épidémies saisonnières d'influenza affectent 5 à 20% de la population mondiale causant une maladie sévère chez 3 à 5 millions de personnes et le décès de 290 000 à 650 000 personnes à travers le monde chaque année. (OMS., 2017).

Conscient de la problématique de santé publique que pose la grippe, le Maroc a installé un réseau de surveillance virologique et épidémiologique, dont les principales attributions sont la détection, l'isolement, l'identification et la caractérisation antigéniques et génétiques des virus grippaux circulant durant une saison grippale. Les données générées par ce système de surveillance ont constitué l'évidence épidémiologique de base pour la mise en place d'un programme national de prévention et de contrôle de la grippe et des infections respiratoires aiguës sévères. Ce dernier s'articule autour de deux axes, le premier concerne l'introduction progressive de la vaccination antigrippale comme une prestation de service de santé publique à partir de 2006. Alors que le second axe est basé principalement sur l'élaboration d'un protocole thérapeutique utilisant des antiviraux, en l'occurrence, les inhibiteurs des canaux M2, les Adamantanes et les inhibiteurs de la neuraminidase (INAs), l'Oseltamivir et le Zanamivir.

Avec plus de recul, ces derniers (l'Oseltamivir et le Zanamivir), sont devenus les agents de choix pour le traitement des personnes atteintes d'infections grippales sévères et celles présentant des maladies sous-jacentes prédisposant aux complications grippales. A l'opposé, les inhibiteurs des canaux M2 qui présentent des niveaux élevés de résistance pour les virus grippaux type A ont été abandonnés. Comme c'est le cas pour d'autres antiviraux, le développement de la résistance aux médicaments est un problème majeur qui peut potentiellement limiter l'utilisation des INAs pour des fins thérapeutiques ou prophylaxies.

Les facteurs associés à la sélection de la résistance aux INAs au niveau individuel comprennent : l'utilisation d'une prophylaxie post-exposition (avec l'administration d'une dose de médicament plus faible), l'infection d'un hôte immunodéprimé et un traitement antiviral prolongé. Les mutations associées à la résistance aux INAs surviennent sur les huit sites catalytiques ou les 11 résidus de la charpente de la poche de liaison à l'acide sialique (AS) de la Neuraminidase. Ces mutations sont à l'origine d'une baisse du niveau d'interaction de la Neuraminidase et de la poche de liaison de l'acide sialique. (Essaghi *et al.*, 2014 ; Yaqin *et al.*, 2021).

Plusieurs études cliniques ou de génétiques inverses ont démontré que des substitutions d'acides aminés dans des sites catalytiques ou de charpente pouvaient entraîner une résistance aux INAs spécifiques aux sous-types de virus grippaux. Ainsi, des substitutions au niveau de la NA du virus de la grippe A(H3N2) sur les positions, E119V, D151E, I222V, R224K, E276D, N249S, R292K et R371K, seraient capables d'augmenter de 50% de la concentration inhibitrice (IC50) pour les INAs. Des résultats similaires ont été rapportés chez le virus A (H1N1) ayant montré des mutations sur les positions E119V, I222R / V, S247N, H275Y et N294S. (Boivin., *et al* 2014 ; Abed et Boivin., 2006 ; Whitley., *etal* 2001).

Le choix du traitement anti-grippale le plus approprié doit tenir compte du fait que la plupart des cas de résistance à l'Oseltamivir sont dus à la mutation H275Y du sous-type N1 ou aux mutations E119V et R292K du sous-type N2 et que les deux premiers mutants viraux restent sensibles au Zanamivir. En effet, la présence de ces mutations confère une transmission cinq fois plus importante de la souche mutée par rapport à une souche sauvage du même sous type (Takashita *et al.*, 2016), et augmente de ce fait le taux de reproduction de base (R0) dans un contexte épidémiologique. D'autres études ont rapporté également que les souches A (H1N1) résistantes à l'Oseltamivir étaient moins sensibles à l'inhibition par des anticorps spécifiques, ce qui favoriserait leur sélection et leur dissémination. (Boivin., 2013),

Depuis 2007, l'OMS ne cesse de mettre en garde contre la circulation de souches de virus grippaux A(H3N2) et A(H1N1) saisonniers résistants à l'Adamantane ainsi que des virus saisonniers A(H1N1) résistants à l'Oseltamivir.

En 2012-2013, le Groupe de travail d'experts du Système mondial de surveillance et de riposte à la grippe (GISRS) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour la surveillance de la sensibilité aux antiviraux a effectué une surveillance mondiale de la sensibilité des virus grippaux A et B aux INAs. Au cours de cette saison, la fréquence de la résistance aux NAIs des virus A (H1N1) pdm09 et A (H3N2) était de 0,9% et 0,4%, respectivement, et de 0,3% et 1,0% dans les virus B / Yamagata et B / Victoria, respectivement. Cependant, au cours de la saison suivante, 2013-2014, 3,4% des virus A (H1N1) pdm09 et 0,3% des virus A (H3N2) ont montré une résistance aux NAIs, avec une résistance aux NAIs détectée dans 0,3% et 2,0% des virus de la grippe B des lignées Yamagata et Victoria, respectivement. (Meijer *et al.*, 2014, Takashita *et al.*, 2015)

Au Maroc, les INAs ont été utilisés pour la première fois en 2009 comme approche préventive et curative dans la gestion de la grippe porcine et pour la prise en charge des personnes à risques. Depuis, une utilisation plus étendue des INAs plus particulièrement de l'Oseltamivir, a été observée à l'échelle nationale. Cependant, à notre connaissance, aucune étude nationale n'a fait l'objet d'une évaluation de la situation épidémiologique des profils de sensibilité ou de résistance aux antiviraux des virus grippaux circulants au Maroc.



*Chapitre I : Revue
bibliographique*



I. Agent étiologique et sa variabilité

Classification et nomenclature

La grippe est une maladie infectieuse d'origine virale, affectant les voies respiratoires supérieures (nez, larynx, pharynx) rarement les poumons (Thorland *et al.*,2011). L'agent étiologique appartient à la famille des Orthomyxoviridae, au genre Influenza (Martin-benito and Ortin., 2013). Sur la base de l'antigénicité de la nucléoprotéine(NP), ce genre est subdivisé en quatre types sérologiques à savoir A, B, C et D (Asha *et al.*,2019). Bien que les types A et B ont un impact important en santé humaine, le type A reste quant à lui le plus virulent. Il offre également une assez grande diversité antigénique induisant une subdivision de ce type en plusieurs sous-types d'hémagglutinines (HA) et de neuraminidase (NA) (Duwe *et al.*,2017).

Actuellement, 18 HA différents et 11NA différents ont été répertoriés (Hamilton *et al.*2012). Parmi les nombreux sous-types des virus grippaux A, les sous-types A(H1N1) pdm09, A(H3N2), A(H5N1), A(H7N9) circulent actuellement chez l'homme (Raj *et al.* 2014 ; Litelier *etal.*2017). Les virus influenza sont responsables chaque année d'épidémies, parfois même de pandémies (Rambaut *et al.* 2008).

La désignation officielle des souches a été adoptée par l'Organisation Mondiale de la Santé(OMS) en octobre 1971. C'est une formule qui décrit l'identité de la souche, à savoir le type antigénique (A, B, C), l'origine animale (si rien n'est précisé, le virus a été isolé chez l'homme), le lieu d'origine du virus (1^{er} isolement), le numéro d'ordre de l'isolement du virus, les deux derniers chiffres de l'année d'isolement du virus et enfin la formule antigénique entre parenthèse avec H pour l'hémagglutinine et N pour la neuraminidase. Chaque mention est séparée d'une barre oblique.

A titre d'exemple A/Agadir/120/12(H3N2) est un virus A(H3N2) isolé à Agadir sous le numéro 120 en 2012. Pour les virus isolés à partir de prélèvements vétérinaires, l'espèce d'origine précède le lieu. Par exemple A/CK/Cambodia/07/04(H5N1) est un virus A(H5N1) isolée à partir d'un poulet (CK = Chicken) au Cambodge en 2004 (Bouvier et Palese., 2008).

Structure de la particule virale

2.1. Présentation générale

En microscopie électronique, les virus grippaux se présentent sous forme de particules soit sphériques de 100nm de diamètre ou filamenteuses dépassant souvent 300 nm de long (figure1). Il s'agit d'un virus à ARN monocaténaire, négatif et segmenté enveloppé par une bicouche lipidique d'origine membranaire (Bouvier et palese. 2008 ; Harris *et al.* 2006).

Au sein de la membrane sont enchâssées deux glycoprotéines : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) dans un rapport d'environ quatre pour un. Les deux glycoprotéines sont responsables des propriétés antigéniques qui sont à la base de classification des virus de la grippe A.

Actuellement, 18 sous types antigéniques différents d'HA ont été identifiés (H1-H18) et 11 sous types de NA (N1-N11) (hamilton *et al.* 2012).

A ces deux glycoprotéines s'ajoute d'autres, à savoir les protéines M1 et M2. En plus de leurs contributions à la cohérence de la structure de la particule virale, certaines fonctions du cycle répliatif leurs sont attribuées.

La protéine M1, qui adhère intimement à la face interne de la membrane virale (Harris *et al.* 2006), interagit d'une part avec les lipides de la membrane virale et les extrémités cytosoliques de HA et NA, et d'autre part avec les ribonucléoprotéine qui intervient dans l'assemblage et le bourgeonnement des nouveaux virions (Yee *et al.*, 1999). La protéine M2 se comporte quand à elle, comme un canal ionique qui régule le pH interne du virus à travers le transport d'ions H⁺(Rossman *et al.* 2010 ; Greber., 2016).

A l'intérieur de la particule, on trouve sept ou huit nucléocapsides de symétrie hélicoïdale, chacune d'entre elles résultant de l'association d'une molécule d'ARN et de nombreuses molécules de nucléoprotéine. A ce complexe, se fixe trois polymérase appelées PA (protéine acide), PB1 (protéine basique 1) et PB2 (protéine basique 2) constituant ainsi la ribonucléoprotéine (RNP) (Hamilton *et al.*, 2012) (figure2).

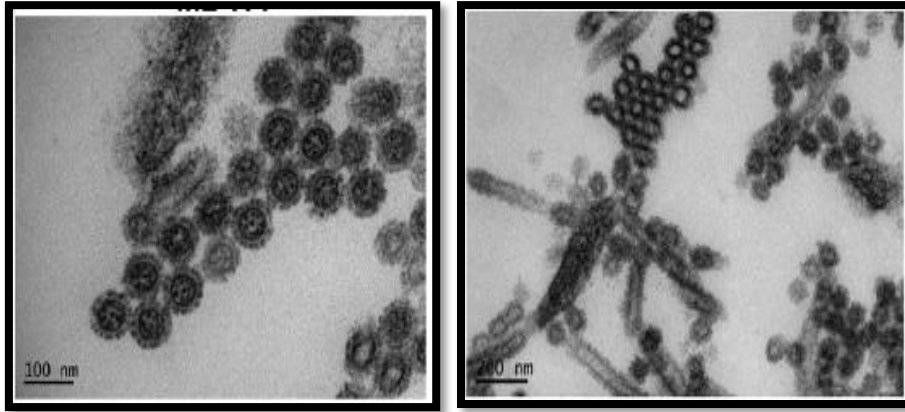


Figure 1: Photo en microscope électronique de virus de l'influenza (Wen-chi et al.,2017)

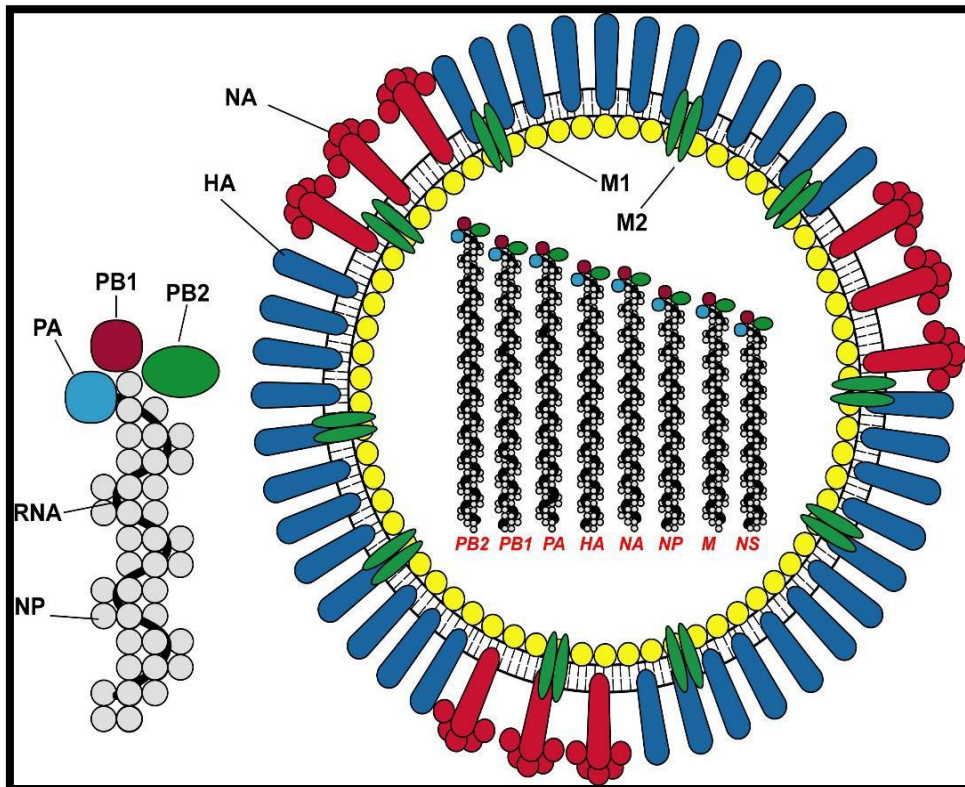


Figure 2 : Illustration schématique du virus de la grippe (Sridhar et al.,2015)

2.2. Génome

Il s'agit d'un ARN monocaténaire de polarité négative (ARN-) divisé en huit segments codant pour onze protéines virales différentes (tableau 1). Les segments 1-3-4-5 et 6 codent chacun pour une protéine, respectivement la sous-unité PB2 de la polymérase, la sous-unité PA de la polymérase, l'hémagglutinine HA, la nucléoprotéine NP et la neuraminidase NA. Tandis que le segment 2 code pour la sous-unité PB1 de la polymérase et pour la protéine virale PB1-F2 (Chen *et al.*, 2001), le segment 7 code pour la protéine matricielle M1 et la protéine canal M2 (Lamb *et al.*, 1981) le segment 8 quant à lui, code pour la protéine non structurale NS1 et NS2 (Dechassez *et al.*, 2013).

Tableau 1 : Protéines codées par les segments d'ARN du virus type A (Bouvier et al., 2008)

Segment D'ARN	Longueur (nt)	Polypeptide	Longueur de la protéine (a. a)	Nombre de molécules par virion	Fonction de la protéine
1	2341	PB2	759	30-60	Sous-unité polymérase
2	2341	PB1	757	30-60	Sous-unité polymérase, activité endonucléase Activité pro-apoptique
		PB1-F2	87	30-60	
3	2233	PA	716	30-60	Sous-unité polymérase, activité protéase
4	1778	HA	550	500	Glycoprotéine de surface, principal antigène, lie le récepteur et permet la fusion
5	1565	NP	498	1000	Protège le matériel génétique, importation des gènes viraux dans le noyau de la cellule hôte
6	1413	NA	454	100	Glycoprotéine de surface, activité sialidase, libération du virion
7	1027	M1	252	3000	Protéine de structure virale, exportation de l'ARN virale hors du noyau, bourgeonnement du virus Canal ionique, assemblage du virus
		M2	97	20-60	
8	890	NS1	230	-	Régulation de l'expression des gènes de la cellule hôte, protéine antagoniste de l'interféron Permet l'exportation d'ARN viral hors du noyau
		NS2	121	130-200	

Protéines du virus de la grippe

Globalement, les protéines du virus de la grippe peuvent être classées en deux groupes ; les protéines dites externes et celles internes. Les premières correspondent aux protéines virales HA (hémagglutinine), NA (neuraminidase) et le canal ionique M2 : ce sont les protéines présentes à la surface de la particule virale (Figure 2). Elles sont synthétisées au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique. Les protéines dites internes sont celles qui sont synthétisées par les ribosomes libres dans le cytoplasme. Ce sont les protéines NP, les trois sous-unités de la polymérase (PB1, PB2, PA), M1 et les deux protéines NS1 et NS2 (Gira *et al.*, 2012).

3.1. L'Hémagglutinine (HA)

L'HA est la plus abondante des glycoprotéines externes. Elle se compose de 550 acides aminés codés par le segment 4 du génome viral, et elle se présente sous forme d'un homotrimère (molécule formée de trois monomères identiques). Chaque monomère est une glycoprotéine HA0 constituée de deux domaines : un premier domaine globulaire HA1 contenant le site d'attachement au récepteur (Receptor Binding Site (RBS)) et les sites antigéniques et un second qui a la forme d'une tige HA2 permettant l'encrage de l'HA au sein de l'enveloppe virale et portant le peptide de fusion (Eckert et Kim., 2001). L'HA1 est impliquée dans l'attachement du virus à la cellule cible alors que l'HA2 est chargée de faire libérer le contenu viral dans la cellule. (Skehel *et al.*, 1982; Wiley., 1987., Skehe., 1982).

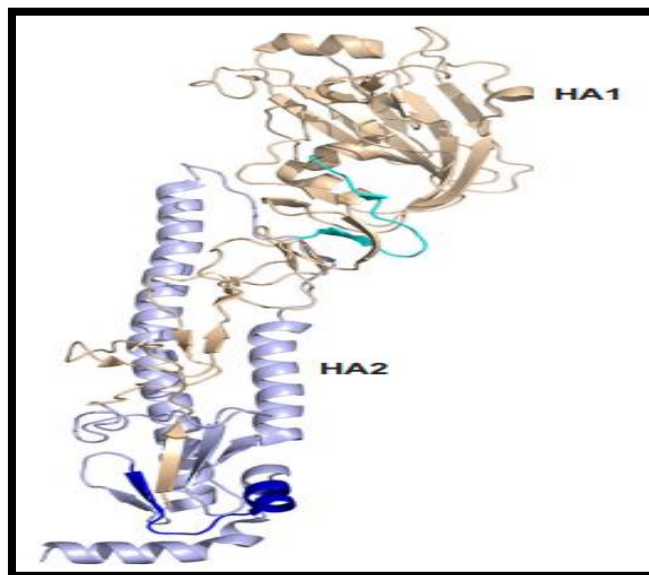


Figure 3: Structure tridimensionnelle de la protéine HA (wang et al., 2018)

3.2. La neuraminidase (NA)

Présente en moins grande quantité que l'HA à la surface virale dans les virus de la grippe A et B, mais elle est absente dans le virus de la grippe C (Tong *et al.*, 2012). C'est une protéine de 470 acides aminés codée par le segment 6 du génome viral. Sa structure cristallographique est connue depuis longtemps, aussi bien libre qu'en complexe avec de l'acide sialique (Burmeister *et al.*, 1992).

Elle est organisée sous la forme d'un homo-tétramère ayant l'aspect d'un champignon avec une courte tige. Chaque monomère est formé d'une courte région intra-cytoplasmique de six acides aminés conservés, une partie transmembranaire hydrophobe de 7 à 29 acides aminés, une tige considérée comme flexible de 50 acides aminés et une tête globulaire qui porte l'activité catalytique assurée par le site actif qui se présente sous forme d'une poche profonde, de 19 acides aminés, localisée au centre de la partie globulaire (figure 4). Les sites de liaison aux anticorps sont situés sur les boucles de surface entourant le site actif de l'enzyme (Colman, 1994 ; Shtyrya *et al.*, 2009).

Son rôle est complémentaire à celui de l'hémagglutinine. Elle est dotée d'une activité enzymatique assurant le clivage des liaisons osidiques formées entre l'HA et les résidus d'acide sialique (Air *et al.*, 1989). Cette fonction est capitale au stade tardif de la réplication, pour permettre la libération des virions nouvellement formés, attachés à la surface de la cellule infectée, et empêcher leur agrégation. Elle facilite également le détachement des virions du mucus présent au niveau de l'épithélium respiratoire, très riche en acide sialique (Ferraris *et al.*, 2010). Cette protéine est donc impliquée dans la propagation de l'infection virale.

La NA est la cible de la deuxième génération d'antiviraux grippaux nommée Inhibiteurs de la neuraminidase (INAs). Les résidus qui constituent le site actif ont un contact direct avec les INAs tels que l'Oseltamivir et le Zanamivir selon la numérotation N2 sont: Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 et Tyr406. La géométrie du site catalytique est stabilisée par résidus Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp / Asn 198, Ile222, Glu227, His274, Glu277, Asn 294 et Glu425 (Xu *et al.*, 2008). Les mutations dans le site catalytique et/ou les résidus de structure peuvent conduire à une pharmacorésistance.

Ces deux protéines (HA, NA) représentent les déterminants antigéniques majeurs du virus (Paleze *et al.*, 1974).

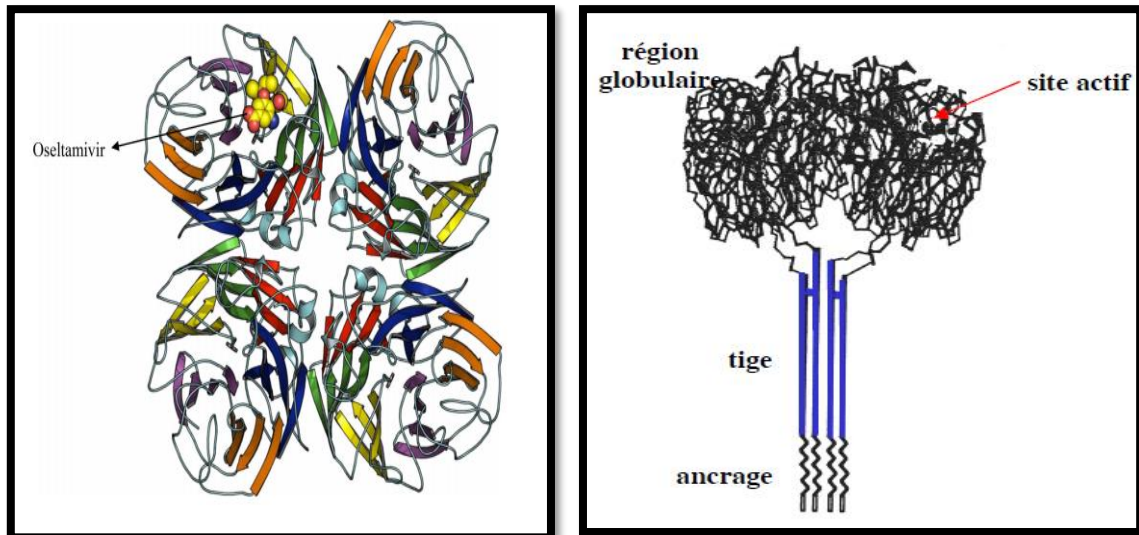


Figure 4: Structure linéaire et tridimensionnelle de la NA (Jagadesh et al.,2016)

3.3. Les protéines de matrice M1et M2

Les protéines de matrice M1 et M2 constituent également la capsid, elles sont codées par le segment 7 du génome viral (Lamb *et al.*, 1981).

M1 étant majoritaire, elle tapisse toute la face interne de l'enveloppe virale (d'où son nom de protéine matricielle) et vient assurer sa rigidité, interagissant ainsi d'une part avec la bicouche phospholipidique (Gregoriades *et al.*, 1980 ; Ruigrok *et al.*, 2000 ; Baudin *et al.*, 2001) et d'autre part avec les segments génomiques viraux (Ye *et al.*, 1987 ; Agusta et Digard.,2002).

M2 est également enchâssée dans la bicouche phospholipidique, elles jouent le rôle de canal à proton qui assure la régulation du PH à l'intérieur du virus (Nishimura *et al.*, 2002). Ce dernier est la cible des antiviraux de la classe des Adamantanes (Pielak *et al.*, 2009). Cette structure n'étant présente que chez les virus de type A, l'Amantadine et la Rimantadine sont inefficaces sur les virus de la grippe type B et C. Pour ces deux types, la fonction de la protéine M2 est assurée par la protéine NB dans le type B et CM2 pour le type C (bouvier *et al.*,2008).

3.4. La nucléoprotéine (NP)

C'est la protéine la plus intimement liée à l'ARN viral, constituée de 498 à 565 acides aminés (Elton *et al.*, 1999). En plus de son importance dans l'identification antigénique des types viraux A, B et C (Tong *et al.*,2012), elle assure la stabilité et la protection du génomeviral (Klumpp *et al.*,1997). Sa présence semble être indispensable à la transcription de l'ARN viral (Kimura *et al.*,1992).

3.5. Le complexe de la polymérase

Trois protéines associées de façon non-covalentes forment le complexe de la polymérase qui à son tour s'associe avec l'ARN viral. Il s'agit de la protéine basique 1(PB1), la protéine basique 2(PB2) et la protéine acide(PA). Les sous-unités de la polymérase, avec la nucléoprotéine (NP), sont les quatre protéines virales indispensables pour les étapes de transcription et réplication du matériel génétique virale au sein du noyau (Mena *et al.*,1994).

3.6. Les protéines NS1 et NEP (anciennement appelée NS2)

Ce sont deux protéines codées par le plus petit segment du génome viral (segment 8). (Lamb et Chopin 1979). La protéine NS1 est dite non structurale du fait qu'elle s'exprime dans la cellule hôte mais elle n'est pas présente au niveau de la particule virale. Brièvement, c'est une protéine de 230 acides aminées, impliquée surtout dans l'inhibition de la réponse antivirale cellulaire (Wang *et al.*, 2000) et l'optimisation de la transcription desARNmviraux (Salvatore *et al.*, 2002).

Contrairement à la NS1, la protéine d'export nucléaire (NEP), est présente en plusieurs exemplaires (100-300) dans la particule virale (Neill *et al.*,1998 ; Yasuda*et al.*,1993). Il s'agit d'une protéine de 121 acides aminés (Lamb et Chopin, 1979). Avec la protéine M1, on leur attribue un rôle fondamental dans l'export du génome viral (Akarsu *et al.*,2003).

Cycle d'infection du virus de la grippe

Le virus de la grippe a pour cible les cellules épithéliales du système respiratoire. D'une manière générale le cycle débute par une phase d'attachement au cours de laquelle la particule virale se fixe à des récepteurs (glycoprotéines, glycolipides) localisés au niveau de la membrane cytoplasmique de la cellule cible. Ces derniers sont reconnus de façon spécifique par les glycoprotéines de la surface virale (HA) (Edinger *et al.*, 2014, Chenet *et al.*, 2012).

Une fois fixé sur la membrane de la cellule hôte, le virus pénètre à l'intérieur par endocytose (Rossman *et al.*, 2011 ; Rust *et al.*, 2004). Ensuite, les protons de l'endosome, par l'intermédiaire du canal à protons M2, pénètrent à l'intérieur de la particule virale. Progressivement, le PH du contenu s'abaisse. Lorsqu'il devient suffisamment acide (PH 6 à 5) l'HA subit un changement conformationnel déstabilisant l'enveloppe virale et permettant ainsi la fusion entre la membrane endosomale cellulaire et la bicouche lipidique virale. Enfin, les nucléocapsides se dissocient de la couche de protéines M1. Ces deux événements PH dépendants permettent la libération des 8 segments génomiques du virus dans le cytoplasme (Simonides *et al.*, 2017).

A la différence des autres virus à ARN négatif, les étapes de transcription et de réplication ont lieu dans le noyau de la cellule infectée. Après un transport actif à travers les ports nucléaires (Cheung et Poon., 2007), la transcription des ARN de polarité négatif en ARN de polarité positif se fait grâce au complexe ARN polymérase formé par les polymérases acides et basiques (PA, PB1 et PB2) et grâce à une amorce (fragment d'ARN de 10 à 13 nucléotides) empruntées aux ARNm cellulaires. Les segments complémentaires (ARN positif) seront utilisés d'une part, comme matrice pour la production des génomes viraux au sein du noyau et d'autre part, pour la synthèse des protéines virales par les ribosomes cellulaires (Neuman *et al.*, 1997). Une fois dans le cytoplasme les protéines virales subissent au cours de leurs passages à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi certaines modifications (glycosylation).

Au contact de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte, les protéines virales vont se fixer et ainsi remplacer les protéines normales de la cellule hôte. Puis les nouvelles nucléocapsides se placent sous la membrane et provoquent un bourgeonnement. Les virions se détachent progressivement grâce à l'activité sialidase de la NA qui détruit les acides sialiques présents à la surface de la cellule infectée. Ainsi, les virions néoformés sont disséminés dans l'épithélium respiratoire (Figure 5) (Von Itzstein., 2007).

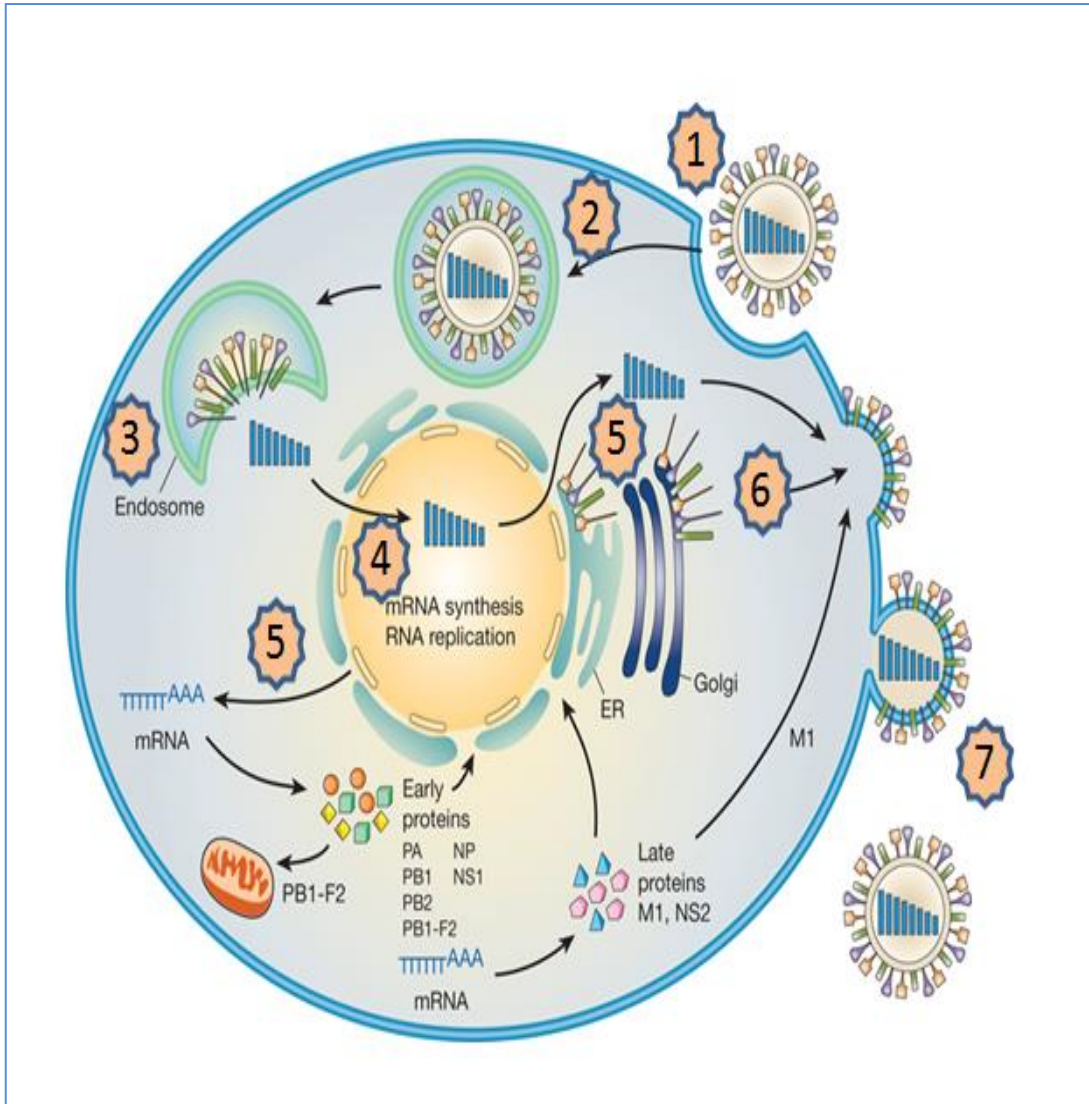


Figure 5 : Illustration schématique du cycle de réplication de virus de la grippe (D'après Neumann *et al.*, 2009)

La variabilité antigénique

La grande variabilité antigénique du virus de la grippe est due essentiellement à deux événements génétiques qui sont : le glissement antigénique (drift) et le réassortiment antigénique (shift).

5.1. Glissement antigénique

Le « drift », qui signifie littéralement glissement antigénique, est dû essentiellement aux mutations ponctuelles produites particulièrement lors de la synthèse des acides nucléiques. En général les taux de mutations produits par les ARN polymérases sont beaucoup plus importants que ceux générés par les ADN polymérases. Dans le cas du virus de l'influenza, le taux d'erreurs associés à l'ARN polymérase est de l'ordre de $1/10^5$ mutations par cycle répliatif viral (Drake.,1993). Cette enzyme est un complexe hétérotrimérique englobant la protéine acide, la protéine basique1 et la protéine basique 2, dépourvue d'une activité réparatrice dite 'proof Reading' pouvant corriger les erreurs de polymérase. Ainsi ces mutations aléatoires ne sont pas corrigées. De ce fait, leur accumulation dans la séquence d'acides aminés peut engendrer l'altération des épitopes ou des déterminants antigéniques à savoir l'HA et la NA (Ferguson 2003). Ce phénomène facilite l'échappement du virus au système immunitaire des populations hôtes et peut provoquer des épidémies (figure 6). Les mutations en question se produisent à une fréquence de moins de 1% par an (Abed *et al.*, 2002) et poussent les autorités sanitaires (l'OMS et son réseau mondial de surveillance de la Grippe) à revoir régulièrement la composition des souches vaccinales (Barr *et al.*, 2010).

5.2. Cassures antigéniques (réassortiment)

Le « shift » ou cassure antigénique, appelé aussi "saut antigénique", est un événement typique aux virus de l'influenza A. Ce changement majeur a lieu lors d'une coinfection d'une cellule par deux sous-types viraux différents, souvent un virus humain et un virus aviaire. Au cours de cette infection, il se produit des échanges de segments entre les deux sous-types de virus conduisant à l'apparition d'un nouveau virus hybride appelé « réassortant » (figure 6), contre lequel l'immunité préexistante et le vaccin demeurent inefficaces, et qui peut être à l'origine de pandémie. Il a été estimé qu'en moyenne il peut y avoir trois pandémies par siècle, soit une pandémie tous les 30ans (Turner *et al.*, 2010).

Dans la nature, il existe des espèces qui servent de réservoir de dormance des virus influenza. Les porcs sont considérés comme réservoirs de réassortiment. En effet, les cellules du tractus respiratoire supérieur du porc sont tapissées de récepteurs "acides sialiques $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ " qui présentent une affinité assez élevée respectivement pour les virus aviaires et les virus influenza humaines (schrader *et al.*, 2003).

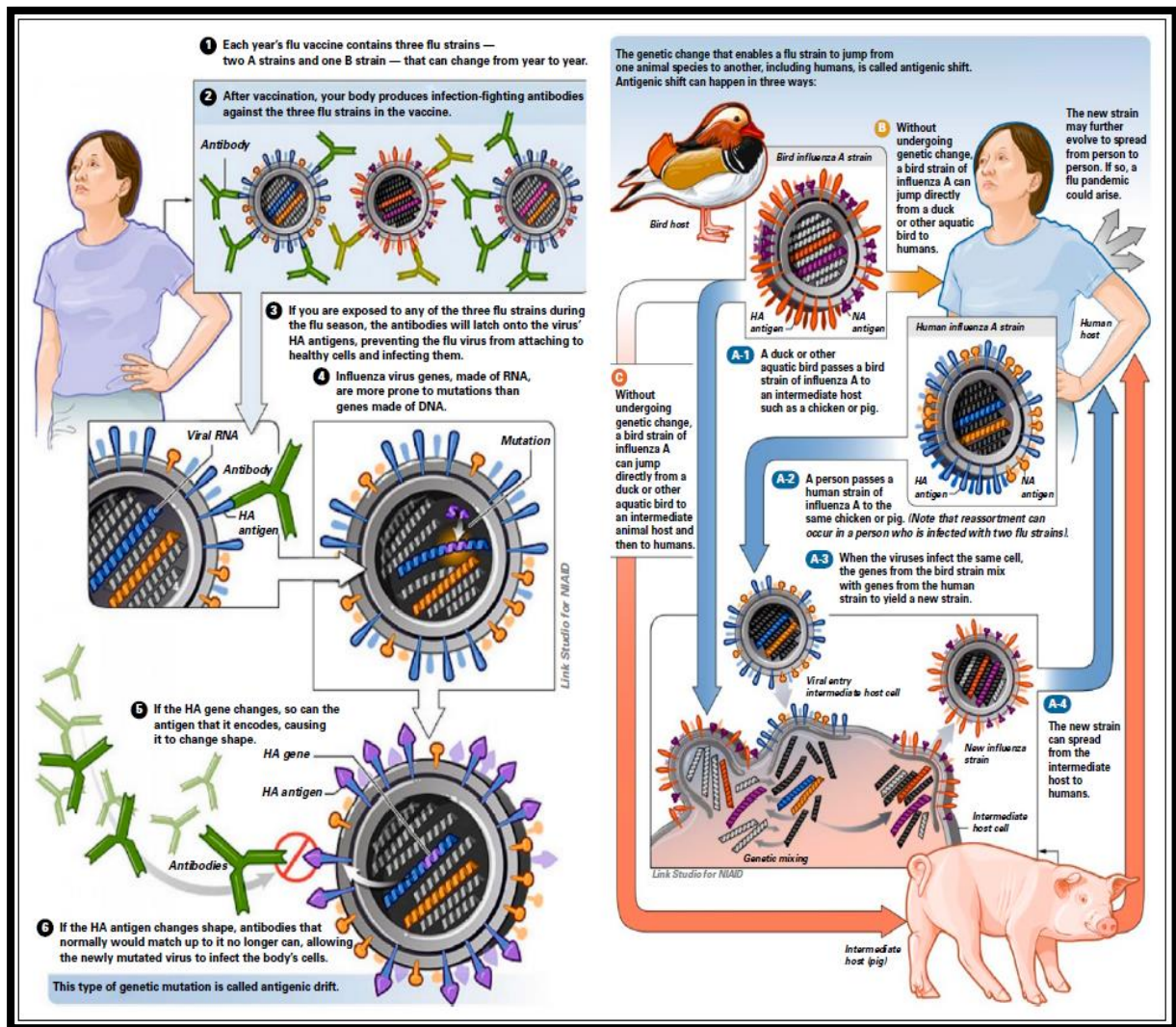


Figure 6 : schéma représentant glissement et cassure antigénique des virus influenza.

(El Ramahi *et al.*, 2019)

II. Aspect épidémiologique

Le virus grippal se propage rapidement à travers le monde lors d'épidémies saisonnières qui se traduisent par une morbidité et une mortalité excessives (Gasparini *et al.*, 2012). Sous les climats tempérés, la grippe saisonnière se manifeste chaque année, à la fin de l'automne ou au cours de l'hiver. Néanmoins, des cas sporadiques peuvent être observés toute l'année. Les épidémies peuvent être dues à une circulation exclusive ou prédominante d'un seul type ou sous-type viral A(H1N1) pdm09 ou A(H3N2), soit à une circulation concomitante de ces deux sous-types. Parfois, on peut observer la circulation de deux types différents tels que le virus de type A et celui de type B (Rambaut *et al.*, 2008 ; Smith *et al.*, 2009).

Certaines années, la circulation virale adopte un caractère biphasique avec une première vague due à des virus de type A suivie d'une deuxième vague due à des virus de type B. La raison de la saisonnalité est inconnue, elle est probablement liée à la variabilité génétique des virus grippaux qui leur permet d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Krammer *et al.*, 2015). Chaque année, les épidémies saisonnières du virus de la grippe A et B affectent 5 à 20% de la population humaine causant une maladie sévère chez 3 à 5 millions de personnes et entre 250 000 à 500 000 décès à travers le monde (Schirmer *et al.*, 2009).

À la différence des gripes saisonnières qui surviennent chaque année, les gripes pandémiques arrivent à des intervalles beaucoup moins fréquents (tous les 30 ans) et sont issues de cassures antigéniques ; elles sont caractérisées par un taux d'attaque et une mortalité élevée (Ian *et al.*, 2018). Après 2 à 3 vagues d'infections massives, la grippe pandémique devient une grippe habituelle à évolution saisonnière. (El ramahi *et al.*, 2019). Quatre pandémies ont eu lieu au cours du siècle dernier en 1918, en 1957, en 1968 et en 2009 (Tableau 2).

Tableau 2 : Historique des pandémies grippales chez l'homme (Ian *et al.*, 2018)

Saison grippale	Pandémie correspondante
1918-1919	Grippe espagnole(H1N1) 30 millions de décès
1957-1958	Grippe asiatique (H2N2) «asian-flu» 1million de décès
1968-1969	Grippe de Hong-Kong A(H3N2) 0,8 million de décès
2009-2010	Grippe mexicaine A(H1N1) pdm09 280 000 morts

En règle générale, la grippe touche toute les tranches d'âge, mais la prévalence est plus grande chez les enfants d'âge scolaire ; la gravité de la maladie est maximale chez les nourrissons, les personnes âgées et les personnes souffrant de maladies chroniques. (Taubenberger *et al.*,2008). Cependant, l'impact sur les différentes tranches d'âge varie d'une saison à une autre (Kwongetal., 2011).

Pendant la phase aigüe de la maladie, les particules virales sont secrétées par les voies respiratoires supérieures et expulsées, lors des épisodes d'éternuements ou de toux des personnes infectées, vers le milieu ambiant sous forme de petites gouttelettes de 10 à 100 μ m de diamètre (Rolfes *et al.*,2018). Elles forment ainsi de véritables aérosols infectieux qui se transmettent d'autant plus rapidement que l'on se trouve dans un espace clos. De ce fait la propagation est généralement plus facile et rapide dans les transports communs et les collectivités (crèches et écoles) (Taubenberger *et al.*,2008).

III. Les formes cliniques de la grippe

Maladie qui apparaît comme courante, la grippe est une infection virale des voies respiratoires qui donne un tableau clinique évolutif. Le syndrome grippal (SG) est généralement bénin mais il peut entraîner des complications surtout chez les groupes à haut risque, ce qui se manifeste le plus souvent par une infection respiratoire aiguë sévère (IRAS) (Mohn *et al.*, 2018)

1. Syndrome grippal

La maladie s'exprime le plus souvent de façon relativement brutale. Chez l'adulte la période d'incubation est courte de 1 à 2 jours (Layanni., 2010), le virus se fixe sur les membranes des cellules épithéliales du tractus respiratoire, s'y multiplie et envahit les voies respiratoires. Le tableau clinique de la maladie est le plus souvent bénin associant des signes divers appelé syndrome grippal (Hayden *et al.*, 1998).

Signes généraux : Une fièvre, pas toujours intense mais qui peut cependant atteindre 40°C. Elle est souvent associée à une myalgie, frissons, anorexie, asthénie, mal de gorge, courbatures et céphalées. Typiquement, la fièvre ne dure que 3 jours, mais parfois elle peut se prolonger jusqu'à 4 à 8 jours. Dans un certain nombre de cas, la courbe de la température corporelle peut adopter un caractère biphasique. Elle peut atteindre plus de 40°C, commencer à céder après 2 à 3 jours mais peut remonter au 4ème ou 5ème jour : c'est le « V » grippal. Elle n'excède jamais 7 jours. Les manifestations respiratoires telles que les éternuements, la congestion nasale, la rhinopharyngite et la toux dominent la phase aiguë. Les symptômes s'estompent progressivement avec une persistance de l'asthénie pour quelques semaines (Treanor *et al.*, 2000).

Chez l'enfant, on observe les mêmes symptômes mais les symptômes gastro-intestinaux et la somnolence peuvent être plus fréquents que chez l'adulte. L'infection peut être accompagnée ou suivie de complications transitoires touchant d'autres systèmes physiologiques principalement des anomalies du rythme cardiaque et des convulsions fébriles. Une otite aiguë est relativement plus fréquente chez les enfants atteints de grippe (Norowitz *et al.*, 2016).

2. Les formes compliquées

Bien que les complications de la grippe soient rares elles sont le plus souvent fatales. Elles sont liées essentiellement à la virulence du virus, à la fragilité du sujet infecté (nourrissons, sujets âgés, comorbidités, femmes enceintes), et à la surinfections bactériennes (El ramahi *et al.*, 2019).

Les lésions trachéobronchiques engendrées par la desquamation de l'épithélium des cellules ciliées et sécrétoires suite à l'envahissement du virus font le lit de la prolifération bactérienne locale, avec le développement du *Streptococcus pneumoniae* le plus souvent, l'*Haemophilus Influenzae*, ou le *Staphylococcus aureus* plus rarement (Trottein and Paget.,2019). Ces complications se manifestent par une bronchite aiguë avec accentuation de la toux qui devient purulente. Ainsi l'apparition d'un foyer de pneumopathie peut être souvent observé quelques jours après le début des symptômes de la maladie (Quinton *et al.*,2018). Les complications liées au virus sont le plus souvent respiratoires.

On distingue généralement :

- La bronchite aiguë dont l'incidence est plus élevée chez les personnes âgées et chez les patients souffrant de maladies chroniques.
- La pneumonie virale est surtout liée aux virus de la grippe de type A et elle peut induire une détresse respiratoire (polypnée, cyanose). Survient alors un œdème aigu massif et irréversible provoquant une insuffisance respiratoire aiguë et mortelle en 3 à 4 jours.
- Les complications de la sphère ORL (otite, sinusite et laryngite) touchent surtout les enfants. Il a été constaté que l'otite aiguë surviendrait chez 35% des enfants hospitalisés pour une grippe de type A (Scotta *et al.*,2019).
- Les myocardites et les péricardites sont exceptionnelles.
- Les femmes enceintes constituent un terrain favorable pour le développement d'infection virale grave en raison des modifications physiologiques qui les caractérisent. Au niveau pulmonaire, on constate une diminution de la compliance thoracique suite à une prise de poids associée à une diminution de la capacité pulmonaire totale liée à la compression par l'utérus gravide. Au niveau cardiaque, on observe une remarquable augmentation de la volémie et de la fréquence cardiaque et par conséquent une augmentation du débit sanguin (katz *et al.*,2017).

Ces modifications cardio-pulmonaires rendent la femme enceinte plus exposée aux risques de complications. D'autre part, au cours de la grossesse le système immunitaire sous l'influence des facteurs hormonaux dévie au profit de l'immunité humorale. Ainsi on constate une diminution du nombre des lymphocytes T, une baisse de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques et d'une atténuation de l'activité des cellules NK (Natural Killer) qui jouent un rôle déterminant dans la défense antivirale (Trushakova *et al.*, 2019).

IV. Méthodes de diagnostic

La clinique et le contexte épidémiologique ne suffisent pas toujours pour confirmer avec certitude le diagnostic d'une grippe. Ce dernier repose exclusivement sur l'investigation virologique. L'identification d'une infection à virus influenza A ou B est particulièrement indispensable chez tous les sujets hospitalisés pour une infection respiratoire aiguë sévère (IRAS). Elle est justifiée si l'on recourt à un traitement antiviral spécifique, et elle s'impose en cas d'échec thérapeutique. Deux types de méthodes permettent de poser un diagnostic de certitude : le diagnostic virologique direct et le diagnostic sérologique indirect. Ce dernier n'est utilisé que dans les études épidémiologiques. Il existe une large gamme de méthodes permettant une recherche directe du virus ou de ces constituants dans les sécrétions respiratoires (petric *et al.*,2006; Vumela *et al.*,2016).

Le succès du diagnostic direct de la grippe est étroitement lié à la qualité du prélèvement qui doit être réalisé au cours de la phase aiguë de la maladie (idéalement 72 heures après le début des symptômes), des conditions de transport jusqu'au laboratoire (+4°C), de la durée et de la température de conservation avant la réalisation du test (maximum trois jours à +4°C)(Johnson *et al.*, 1990).

Classiquement, les prélèvements effectués au niveau des voies respiratoires supérieures correspondent à des écouvillonnages nasaux ou pharyngés, parfois à des aspirations nasopharyngées. Si l'état du patient nécessite d'avoir recours aux voies respiratoires inférieures se sont le plus souvent des aspirations trachéales et des lavages broncho-alvéolaires qui sont réalisées (OMS., 2011, Covalciuc *et al.*,1999).

1. Tests rapides

Avant l'utilisation généralisée de la PCR pour la détection du virus de la grippe, les tests rapides occupaient une place de choix par leur facilité d'utilisation et la rapidité d'obtention du résultat (Waris *et al.*,1990). Ces tests qualitatifs font appel à des anticorps monoclonaux qui ciblent les nucléoprotéines virales. Basées sur le principe de techniques immuno-enzymatique ou immuno-chromatographique, la détection repose sur un signal visuel ou nécessite un lecteur pour interpréter la réflectance ou la fluorescence. La sensibilité et la spécificité de ces tests varient en fonction des types de tests choisis, types et sous-types du virus grippal, du site corporel à partir duquel le spécimen a été effectué (écouvillonnage nasale, pharyngé ou rhinopharyngé) et de l'âge du patient (Harper *et al.*, 2009).

Actuellement, ces tests trouvent toujours leur utilité lors des épidémies, dans l'adaptation d'une thérapie, ou lorsque les tests virologiques de biologie moléculaire ne sont pas accessibles (Hazelton *et al.*,2015).

2. Immunofluorescence(IF)

Les cellules provenant d'un écouvillonnage nasal et /ou pharyngé (ou d'une aspiration nasale ou trachéobronchique) sont, après lavage, déposées sur une lame microscopique. Elles sont ensuite fixées par l'acétone. Les cellules ainsi préparées sont mises en contact avec des anticorps monoclonaux spécifiques anti-virus influenza. La lecture au microscope à fluorescence se fait soit directement dans le cas où les anticorps sont couplés à un fluorochrome, soit indirectement après addition d'un anti-anticorps fluorescent. Ces tests sont principalement destinés à la détection des virus grippaux A et B. Cependant, ils ne sont pas utiles pour le sous-typage. Comparée à l'isolement en culture cellulaire, les tests IF ont montré une sensibilité allant de 60% à 80% (Vumela *et al.*,2016). Au cours de la pandémie de la grippe A(H1N1) pdm09, les tests IF avaient montré une sensibilité, comprise entre 38% et 93%, comparé à la PCR en temps réel. Les tests IF sont actuellement remplacés partout dans le monde par des approches moléculaires plus sensibles et moins laborieuses pour le diagnostic virologique de routine en laboratoire. (Ganzenmueller *et al.*,2010 ; Vumela *et al.*,2016).

3. Culture cellulaire

La culture cellulaire a longtemps été le gold standard pour le diagnostic de la grippe. C'est un système d'amplification virale puissant qui a l'avantage de générer des quantités importantes de virus, ce qui peut permettre par la suite, d'étudier plus finement leur variabilité génétique et antigénique, ou encore leur profil de sensibilité aux principaux antiviraux. Introduite dans les années 1940, l'isolement des virus influenza sur les cellules de mammifères cultivées in vitro ou sur l'œuf de poule embryonné, reste à ce jour la principale méthode de référence permettant l'identification des virus influenza (Vumela *et al.*, 2016). Lorsque ces souches sont obtenues en culture sur œuf, elles peuvent éventuellement être retenues dans la composition du vaccin antigrippal. La méthode cellulaire la plus largement exploitée dans les laboratoires de diagnostic est celle utilisant les cellules rénales de chien MDCK (Madin-Darby canine kidney). C'est une lignée continue de cellules épithéliales polarisées, possédant des récepteurs spécifiques des virus influenza (de type sialique), qui les rendent sensibles à l'infection par la majorité des virus influenza A, B et C (Tobita *et al.*, 1975). Malgré son importance, la culture reste une technique d'utilisation limitée aux laboratoires de virologie hautement spécialisés du fait qu'elle impose des structures de laboratoire, des logistiques et des compétences propres à la culture de cellules (laboratoire BSL2 ou BSL3, hottes à flux laminaire, incubateurs à CO₂...). Mais elle reste néanmoins indispensable au suivi de la variabilité des virus influenza.

4. Biologie moléculaire

Le développement de la technique de PCR (polymérase Chain réaction) par Kary Mullis en 1983 a révolutionné le domaine du diagnostic des maladies infectieuses. Ces techniques dites de biologie moléculaire reposent sur l'amplification par PCR de matériels génétiques (ADN ou ARN) spécifiques au virus. Une grande variété de ces techniques est actuellement disponible pour le diagnostic des infections grippales. La rétro-transcriptase PCR (RT-PCR) est la plus traditionnelle et la plus puissante technique pour l'identification des virus de la grippe, utilisée dans la majorité des laboratoires de diagnostic du monde. Elle repose sur l'amplification d'un brin d'ADN complémentaire obtenu après rétro-transcription d'un fragment du génome viral.

La détection peut se faire, dans le cas d'une PCR conventionnelle, en phase finale après migration sur gel des produits PCR obtenues (Poon *et al.*,2005 ; sharmaet *al.*,2018) ou en temps réel dans le cas de la RT-PCR temps réel, par détection d'un signal fluorescent proportionnel à la quantité du produit PCR généré.

Cette dernière présente l'avantage de réduire le délai d'obtention des résultats (OMS.,2011). Il existe des RT-PCR en temps réel multiplex qui permettent, en plus de la détection du virus de la grippe, celle de plusieurs autres virus respiratoires, et ce, à partir du même prélèvement (lee *et al.*,2018 ; Eigneret *al.*, 2019). Par leur spécificité élevée, ces techniques sont actuellement considérées par OMS comme des méthodes de diagnostic de référence (OMS.,2011).

V. Traitements préventifs et curatifs

1. Vaccination

La vaccination est la méthode de choix pour la prévention de la grippe. En effet, les vaccins permettent d'induire une immunité protectrice qui se traduit par la production d'anticorps neutralisant dirigés contre les protéines de surface, en particulier l'HA et la NA. Du fait de la dérive antigénique rapide des protéines de surface des virus grippaux, la composition vaccinale est revue chaque année selon les recommandations émises par l'OMS en fonction des données de la surveillance mondiale (Sridhar *et al.*, 2015).

Deux vaccins (vaccin inactivé et vaccin atténué) ont montré jusqu'à aujourd'hui une bonne efficacité et une innocuité acceptable et ce, grâce à leur renouvellement périodique afin d'inclure les souches virales susceptibles de circuler dans la population. Ces vaccins sont soit trivalents contenant les deux sous-types des virus A(H1N1) pdm09 et A(H3N2), et un des virus de la lignée B (Victoria ou Yamagata), soit quadrivalent contenant les deux sous-types des virus A et les deux virus de la lignée B.

1.1. Les vaccins inactivés

Les vaccins antigrippaux inactivés sont produits et utilisés depuis les années 1940 et constituent les types de vaccins les plus couramment utilisés. Ils sont commercialisés sous forme de vaccins à sous-unités, vaccins à virus fragmentés et vaccins à virus entiers. Du fait de la plus forte réactogénicité du vaccin à base de virus entier, ce sont surtout les vaccins fragmentés et sous unitaires qui sont désormais commercialisés. Le vaccin saisonnier inactivé contient 15µg de trois antigènes provenant chacun d'un sous-type viral (A(H1N1) pdm09, A(H3N2) et B). Les méta-analyses ont montré que les vaccins inactivés présentaient une efficacité d'environ 60% chez les enfants et d'environ 40% chez les adultes et les personnes âgées (jefferson *et al.*, 2010a ; jefferson *et al.*, 2010b).

La production du vaccin est relativement lente nécessitant 3 à 6 mois. De plus ce vaccin est contre-indiqué pour les personnes présentant une allergie aux œufs. Afin de pallier au temps de production du vaccin et à l'allergie aux œufs, des chercheurs estiment qu'il est plus pertinent de produire le vaccin inactivé sur les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (perdue *et al.*, 2011).

1.2. Les vaccins atténués

La production de vaccin atténué a pour objectif de solliciter une réponse immunitaire humorale et cellulaire, presque identique à une réaction immunitaire naturelle (figure7). Cette production est homologuée aux États-Unis, en Europe, en Russie et en Inde. Le vaccin est constitué d'une souche atténuée qui produit les protéines internes de réplication virale, et d'une souche sauvage circulante qui exprime les antigènes de surface (HA et NA), cibles de la prophylaxie (figure7) (Hoffmann *et al.*,2005). Le vaccin atténué est administré par voie intra-nasale (0,25ml dans chaque narine) sous forme d'aérosol. Le procédé de production est identique à celui du vaccin inactivé. L'efficacité de ce dernier est supérieure à celle du vaccin inactivé chez les enfants et les jeunes adultes allant jusqu'à 80% chez les enfants de moins de 6 ans (Jefferson *et al.*,2008).

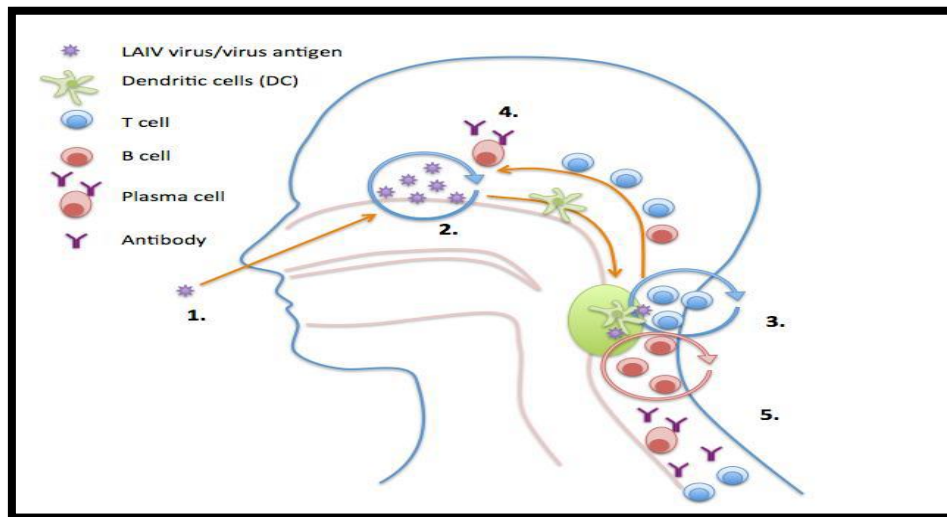


Figure 7 : Modèle d'induction des réponses immunitaires après la vaccination antigrippale atténuée (Sridhar et al.,2015)

- (1) Immunisation intra-nasale,
- (2) L'antigène viral est transporté dans les amygdales / adénoïdes par les cellules dendritiques (CD),
- (3) Activation et prolifération des cellules T et B dans les amygdales / adénoïdes à l'aide des cellules T CD4 + Maturation d'affinité des cellules B et des plasmocytes,
- (4,5) Les lymphocytes activés sont situés au niveau du site d'infection et entrent en circulation. Les cellules plasmiques sécrètent des anticorps dans le sang et sur les surfaces muqueuses.

LAIV : Live Attenuated Influenza Virus

1.3. Indication de la vaccination

L'objectif de la vaccination est de protéger les personnes vulnérables susceptibles de présenter des formes compliquées de la grippe, ainsi que le personnel de soins susceptible de transmettre le virus aux patients. La vaccination antigrippale annuelle est fortement recommandée notamment chez les personnes à risques comme celles souffrant de pathologies aggravantes telles que les infections broncho-alvéolaires chroniques, l'asthme, la mucoviscidose, les pathologies cardiaques, les néphropathies chroniques graves, le diabète insulino-dépendant ainsi que les pathologies qui conduisent à une immunosuppression. L'OMS considère comme population à haut risque : les femmes enceintes, les enfants de moins de 5 ans, les sujets âgés, les porteurs de maladies chroniques et les professionnels de santé (Figure8). Les contres indications de la vaccination antigrippale se limitent aux allergies aux constituants du vaccin comme les protéines de l'œuf notamment l'ovalbumine (Sridhar *et al.*,2015).

Recommended Group	WHO Rationale for the Recommendation
Pregnant women	Increased risk of serious disease in mother Increased risk of death in mother and unborn child Secondary effect of protection of child up to 6 m Globally applicable *
Healthcare workers	Increased exposure to influenza Reduces morbidity and mortality in patients Preserves integrity of health care systems Possible to implement
Children <2 years old	Experience highest levels of serious illness Responsible for spread in community Disadvantage costly to implement vaccination campaign
Children 2–5 years old	Large burden of morbidity Respond better to vaccines than younger children live attenuated influenza virus (LAIV) gives improved protection
Children < 6 months	No available vaccines Indirect protection through vaccination of mother during pregnancy Indirect protection through vaccination of close contacts
Elderly > 65 years old	Highest risk of mortality Vaccine is less effective Disadvantage annual immunization is costly to administer
Patients with chronic conditions	Highest risk for serious disease Disadvantage requires considerable resources to identify individuals
* pregnant women have contact with health care services.	

Figure 8: Les groupes à risque pour les quels la vaccination est fortement recommandée par l'OMS (Sridhar et al.,2015)

1.4. Evaluation de l'efficacité du vaccin

L'efficacité vaccinale dépend du degré de concordance entre la souche vaccinale et la souche circulante, du statut d'immunocompétence et de l'âge du patient. Il existe plusieurs niveaux d'appréciation de l'efficacité vaccinale. On peut évaluer la prévention de l'infection, la prévention des complications graves et la prévention des décès dus à la grippe ou à ses complications. La compilation de plusieurs études a permis d'estimer une réduction de 27 % du risque d'hospitalisation pour une grippe ou une pneumonie chez les sujets âgés de plus de 65 ans, une baisse de 48% du risque de décès dans la même population (Nichol *et al.*,2007), une diminution de 51% des consultations chez les médecins généralistes pour pneumonie et une diminution de 25% du risque d'exacerbation d'asthme chez les enfants et les adolescents de moins de 18 ans (Hak *et al.*,2005).

2. Les antiviraux

Deux classes d'antiviraux ont été développées à ce jour :

- Les Adamantanes qui comportent l'Amantadine commercialisée sous le nom de (Symetrel©) et la Rimantadine en vente sous le nom de (Flumadine©).
- Les inhibiteurs de la neuraminidase (INAs) (Oseltamivir et le Zanamivir commercialisés respectivement sous le nom Tamiflu© et Relenza©).

Récemment, deux autres molécules appartenant à la famille des INAs ont vu le jour : le Peramivir et le Laninamivir, mais leur utilisation reste limitée (Farrukee et Hurt.,2017 ; McLaughling *et al.*,2015). Les deux classes antivirales diffèrent par leur mode d'action, leur toxicité et leur pharmacocinétique (Abed *et al.*, 2006) (Figure9).

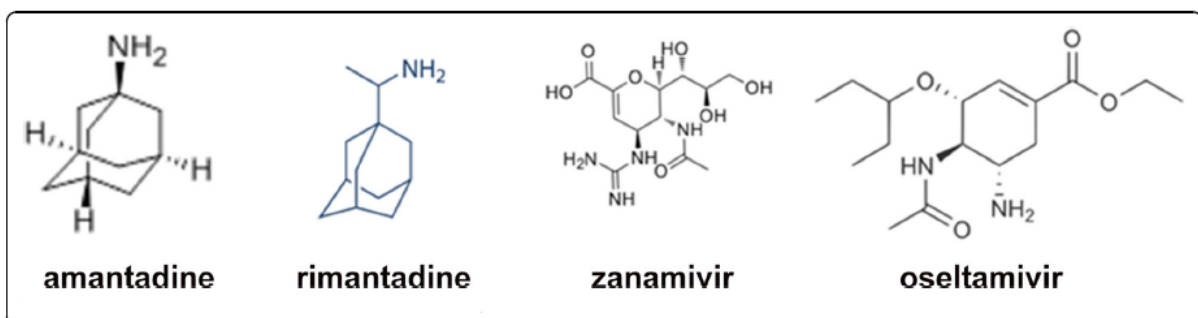


Figure 9 : Structure chimique des principaux médicaments utilisés contre la grippe
(shi *et al.*,2017)

2.1. Adamantanes

Ce sont des molécules élaborées au cours des années 1960 comme médicaments antiparkinsoniens, leur effet inhibiteur sur la réplication des virus grippaux type A a été démontré en 1964 (Davies *et al.*, 1964). Regroupant l'Amantadine et son dérivé la Rimantadine, ces antiviraux représentent la première classe d'antiviraux cliniquement approuvés pour le traitement d'infection grippale de type A. Leur action réside dans l'inhibition de l'action du canal ionique M2 impliqué dans la libération du matériel génétique du virus dans le cytoplasme de la cellule hôte lors de la réplication virale. L'Amantadine exerce son action inhibitrice sur les résidus 22 à 46 de la protéine M2 qui assure le transport de protons, alors que la Rimantadine se lie plutôt aux résidus 18 à 60 (Takeda *et al.*, 2002) (Figure10).

Ce médicament est inefficace sur le virus de la grippe de type B car ce dernier ne possède pas la protéine M2. De nombreuses études ont attribuées une efficacité de 61% à l'Amantadine et 71% à la Rimantadine pour la prévention des infections des virus type A. L'utilisation des Adamantanes est souvent associée à des effets secondaires de types neurologiques tels que l'insomnie, la confusion, les hallucinations et la dépression (Jefferson *et al.*, 2006). L'administration de cette classe d'antiviraux à des patients présentant une grippe confirmée induit une réduction de la durée des symptômes due à une diminution d'excrétions virales. Le problème majeur lié à l'utilisation de cette classe d'antiviraux, c'est qu'elle induit très rapidement l'émergence de variants résistants et transmissibles. Une seule mutation confère une résistance simultanée aux deux molécules (Brosou., 2013).

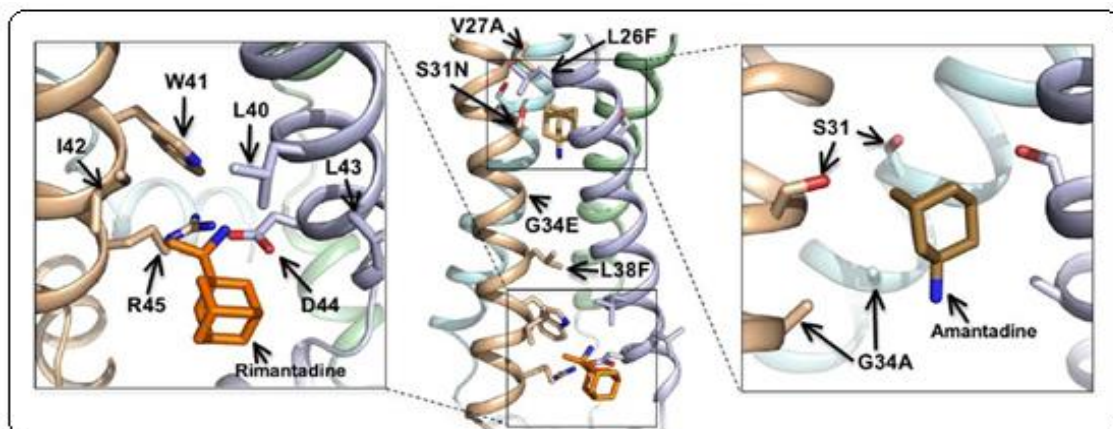


Figure 10 : Sites de liaison de la Rimantadine et de l'Amantadine au canal ionique M2. Tiré de (Pielak *et al.*, 2009)

2.2. Inhibiteurs de la neuraminidase

En raison de son rôle majeur dans la propagation du virus de la grippe et du haut niveau de conservation des résidus d'acides aminés du site catalytique, la neuraminidase a été choisie comme cible antivirale (Ferraris *et al.*, 2010). Les inhibiteurs de la neuraminidase (INAs) ont été décrits dès les années 1970. C'est grâce aux travaux de Itzstein et de ses collaborateurs que la première molécule a vu le jour en 1993 portant le nom de Zanamivir (Itzstein *et al.*, 1993). Elle a été commercialisée en 1999 sous le nom de Rolenza. Cette molécule a servi de base pour la synthèse d'autres molécules comme l'Oseltamivir, objet en 2001 d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) sous le nom de Tamiflu (Kim *et al.*, 1997). Au cours de la dernière décennie deux autres molécules appartenant à la même famille d'antiviraux ont vu le jour, se sont le Peramivir et le Laninamivir.

Les INAs constituent actuellement la classe de choix en termes de traitement et de prophylaxie des infections grippales. A l'opposé de L'Oseltamivir (Tamiflu) et le Zanamivir (Relenza) qui sont utilisés dans le monde entier, le Peramivir n'est autorisé qu'aux États-Unis, au Japon et en Corée du Sud. En ce qui concerne le Laninamivir, il n'est utilisé qu'au Japon (Mc Laughlin *et al.*, 2015).

Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs de la neuraminidase qui se fixent avec une forte affinité au niveau du site catalytique. La conservation de ce site explique le fait que ces drogues restent efficaces sur l'ensemble des sous-types de NA des virus grippaux de type A et de type B. Les INAs possèdent une structure presque identique à celle de l'acide sialique (Figure 11). Cette structure leur confère la capacité de se fixer sur le site actif de la NA et ainsi, de neutraliser son activité en empêchant le détachement des particules virales de la surface de la cellule hôte et l'envahissement d'autres cellules (Figure 12 et 13) (Ha T Nguyen *et al.*, 2012).

Les INAs sont utilisés comme une alternative pour le contrôle de la grippe de façon prophylactique chez les sujets non vaccinés ou en cas d'inadéquation de la composition vaccinale avec les souches circulantes, ou de façon curative pour les formes compliquées de la grippe. En période de pandémie, l'émergence d'un nouveau réassortant contre lequel l'immunité préexistante demeure inefficace, le traitement par les INAs s'avère une arme de substitution. Comme ce fut le cas au cours de la pandémie grippale à A(H1N1) pdm09 (Miller *et al.*, 2013)

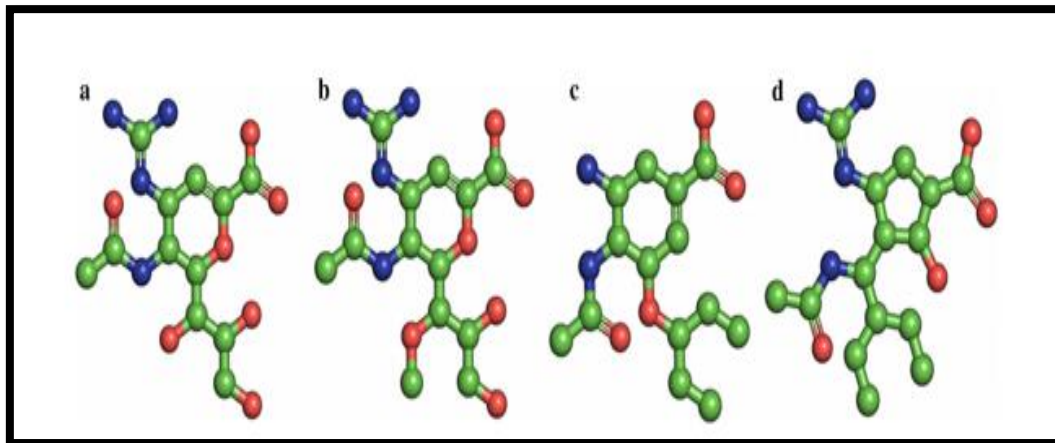


Figure 11 : Structure moléculaire de la neuraminidase(a)Zanamivir, (b)Laninamivir, (c) Oseltamivire carboxylase et (d) Peramivir(Jagadesh *et al.*,2016)

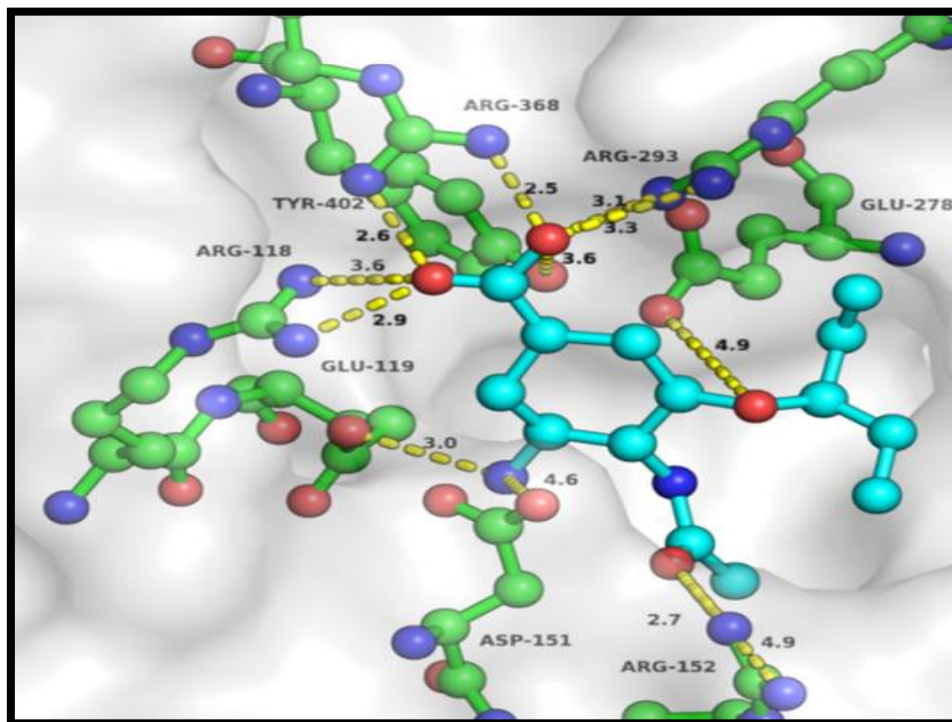


Figure 12 : Site actif de la neuraminidase du virus de la grippe en complexe avec l'oseltamivir.

Les résidus d'acides aminés du site catalytique qui interagissent avec le médicament sont représentés en vert. Oseltamivir est représenté en bleu cyan. Les liaisons Hydrogènes sont représentées par des lignes en pointillés avec les distances correspondantes. (Jagadesh *et al.*,2016)

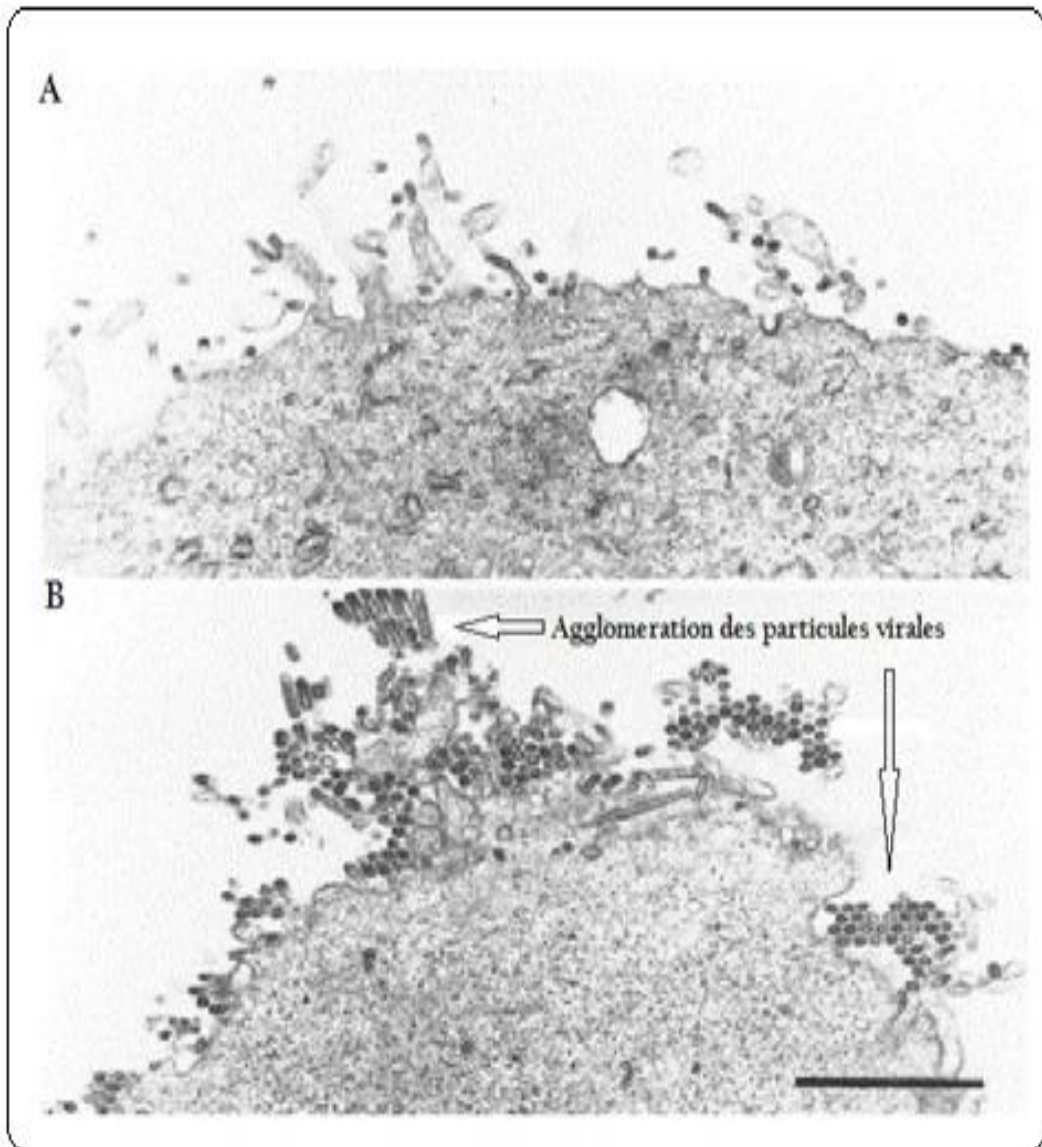


Figure 13 : Image en microscopie électronique des cellules MDCK infectées avec le virus de l'influenza A.

A) Assemblage et bourgeonnement normal du virus en absence des INAs.

B) Agrégation de particules virales à la surface de la cellule hôte en présence des INAs, qui occupent le site active de la protéine NA en inhibant le clivage entre la protéine NA et le récepteur AS sur la cellule hôte. (Gubareva *et al.*, 2000)

2.2.1. L'Oseltamivir/Tamiflu©

Pharmacocinétique

L'Oseltamivir (GS4071ethyl ester, GS4104, RO64-0769) est disponible sous forme d'Oseltamivir phosphate conditionné en capsule ou en poudre pour suspension buvable. Ce dernier, une fois administré, est rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal pour atteindre le foie où il va subir un clivage par des estérases hépatiques pour donner le carboxylated'Oseltamivir. Près de 75% de la dose rejoint la circulation sanguine (biodisponibilité) sous forme de carboxylate d'Oseltamivir avec une demi-vie de 6 à 10 h dans le sang. Son élimination de l'organisme se fait à 80% par le système rénal et à 20% par la matière fécale (He *et al.*, 1999).

Posologies usuelles

L'Oseltamivir est commercialisé sous forme de capsule ou de suspension buvable de 30mg, 45mg et 75mg. En traitement curatif chez l'adulte et l'adolescent de plus de 13 ans, la posologie usuelle est de 75mg deux fois par jour pendant 5 jours. Dans le cas d'un traitement prophylactique post-exposition, l'Oseltamivir est prescrit en une prise journalière pendant dix jours (Jefferson *et al.*, 2009). Pour les enfants de plus d'un an, les doses du traitement varient en fonction du poids de l'enfant (Shun-shin *et al.*, 2009). En revanche, il n'y a actuellement aucune donnée disponible pour les nourrissons âgés de moins d'un an. Au cours de la pandémie 2009, l'OMS a recommandé une posologie de 3mg/Kg/2x par jour pendant 5 jours uniquement pour un traitement curatif, mais sur une base de très faibles données pharmacocinétiques (Figure 14). Chez les insuffisants rénaux, une adaptation posologique est nécessaire en fonction de la clairance de la créatinine et du poids (patel *et al.*, 2015).

Chez l'adulte		Chez l'enfant	
Curatif	Prophylaxie	Curatif	Prophylaxie
<i>Voie orale</i>	<i>Voie orale</i>	<i>Voie orale</i>	<i>Voie orale</i>
75 mg x 2/jour pendant 5 jours	75 mg/jour pendant 10 jours	13 ans et plus 75 mg x 2/jour pendant 5 jours	13 ans et plus 75 mg x 1/jour pendant 10 jours
		1-12 ans : 10 à 15 kg : 30 mg x 2/j > 15 à 23 kg : 45 mg x 2/j > 23 à 40 kg : 60 mg x 2/j > 40 kg : 75 mg x 2/j pendant 5 jours	1-12 ans : 10 à 15 kg : 30 mg x 1/j > 15 à 23 kg : 45 mg x 1/j > 23 à 40 kg : 60 mg x 1/j > 40 kg : 75 mg x 1/j pendant 10 jours
		6 mois-1 an 3 mg/kg x2/j pendant 5 jours	

Figure 14 : Mode d'administration et posologies usuelles de l'Oseltamivir (DELM., 2018)

Efficacité

L'Oseltamivir a un effet antiviral significatif, qui se traduit par une amélioration plus rapide des symptômes chez les patients avec une grippe confirmée. Son administration à un stade précoce induit une réduction de 30% de la durée moyenne des symptômes (Treanor *et al.*, 2000 ; Yu glanz *et al.*, 2018). En effet, l'instauration d'un traitement curatif précoce par l'Oseltamivir (quatre premiers jours après apparitions des symptômes) induit une diminution significative de la charge virale. D'après une étude, le virus n'a été détecté que dans 25% de la population traitée pendant une semaine, contre 58% de celle sous placebo (lee *et al.*, 2009).

Chez les enfants âgés de moins de 12 ans souffrants d'une grippe confirmée biologiquement, le traitement par l'Oseltamivir administré dans les 48 heures après le début des symptômes a entraîné une diminution de la durée moyenne des symptômes de 36 heures ainsi qu'une réduction de la sévérité des symptômes de 29% par rapport à un groupe témoin (Richard *et al.*, 2001).

En terme de prévention des complications, le traitement par l'Oseltamivir permet une réduction de 60% le risque d'hospitalisation et d'environ 50% le risque de pneumonie chez les sujets présentant une grippe confirmée par rapport au groupe placebo (kaiser *et al.*, 2003). De même, une autre étude réalisée en milieu hospitalier chez des patients présentant des formes grave de la grippe, indique que le risque de décès dans les 15 premiers jours d'hospitalisation est significativement réduit suite à un traitement par l'Oseltamivir même si le traitement est administré au-delà des 48 heures (Mcgeeret *al.*,2007 ; Burch *et al.*,2009).

2.2.2. Le Zanamivir / Relenza©

Pharmacocinétique

Le Zanamivir (4-guanidino-Neu5Ac2en, GG167) est disponible sous forme de poudre inhalable. Le Zanamivir est un composé à fort caractère polaire, ce qui induit une diminution considérable de son absorption par l'organisme quand il est administré par voie orale (2%) Dans le cas d'une administration par inhalation, seulement 13% de la dose initiale passe dans les poumons, 78% en moyenne se dépose au niveau de l'oropharynx (Cass *et al.*, 1999). Ce qui semble être en faveur de la lutte contre l'infection. (Peng *et al.*, 2000).

Au sein de notre organisme, la molécule ne subit aucune transformation, son excrétion se fait par voie urinaire d'où la nécessité d'ajuster la dose pour les personnes présentant des complications rénales. La demi-vie plasmatique du métabolite est de 2.5 à 5heures.

La présence du lactose comme adjuvant présente certains inconvénients tels que son caractère hygroscopique qui augmente l'agglomération de la poudre via les forces capillaires inter-particules. De plus, l'augmentation de l'humidité modifie progressivement les forces d'adhérence entre le Zanamivir et le lactose, ce qui peut affecter la cléarence du médicament. D'autre part, le lactose ne peut pas être utilisé pour des patients diabétiques et intolérants en raison des considérations cliniques (Bevard *et al.*, 2002).

Posologies usuelles

Chez les adultes et les enfants âgés de plus de 5ans, la dose recommandée pour le traitement est de 5mg deux fois par jour pendant 5 jours, alors qu'en prophylaxie, il est recommandé d'utiliser quotidiennement 10mg pendant plus de 28 jours (Hayden *et al.*, 2006).

Efficacité

L'utilisation du Zanamivir permet une réduction de 40% de la fréquence des prescriptions d'antibiotiques pour les complications du tractus respiratoire inférieur (Hayden *et al.*, 2005 et Hayden *et al.*, 2006). Son efficacité est plus importante que celle d'Oseltamivir vis-à-vis de l'influenza type B (IC50 de 4.19 nM contre 13 nM) (Sugaya *et al.*, 2007).

L'efficacité de ce médicament s'est avérée plus élevée atteignant 67% à 87% chez la population d'adulte ne présentant pas de pathologie chronique. Ce remarquable avantage est attribué à la modalité d'administration et à la rareté des effets indésirables observés lors de la réalisation des essais cliniques (Keyser *et al.*, 2000).

2.2.3. Les Inhibiteurs de la neuraminidase de la nouvelle génération

Peramivir commercialisé sous le nom de Rapivab™ aux États-Unis, Rapiacta™ au Japon et PeramiFlu™ en Corée du Sud, est un inhibiteur de la neuraminidase des virus de la grippe de type A et de type B. En raison de sa faible biodisponibilité orale, le peramivir a été développé en tant que substance active administré par voie intramusculaire ou par voie intraveineuse. L'effet indésirable le plus fréquent est la diarrhée (Alame *et al.*, 2016). Autorisé aux États-Unis depuis l'année 2014 pour le traitement des gripes non compliquées chez les patients âgés de plus de 18 ans et administré en une dose unique. Au Japon et en Corée du Sud, l'injection du Peramivir est autorisée depuis 2010 pour le traitement de la grippe chez les adultes, les enfants et les nourrissons (Hata *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2020)

Laninamivir (Japon : Inavir®), est un analogue du zanamivir. Il s'agit d'un inhibiteur de la neuraminidase à longue durée d'action avec une efficacité thérapeutique après une seule administration nasale. Après inhalation, Laninamivir est absorbé par les cellules épithéliales du revêtement des voies respiratoires supérieures où il est rapidement hydrolysé en Laninamivir actif. Autorisé uniquement au Japon depuis l'année 2013 pour le traitement des patients de toute tranche d'âge. Laninamivir a été approuvé comme traitement curatif depuis 2010 et comme une approche prévention aussi bien pour les adultes que les enfants en 2013 au Japon. L'efficacité d'une dose unique inhalée du Laninamivir est similaire à un traitement de 10 doses de 40 mg d'Oseltamivir administrées oralement (Hata *et al.*, 2014).

En conclusion, l'utilisation des INAs chez les adultes en bonne santé n'a pas un grand intérêt du fait qu'il ne permet qu'une diminution de la durée de l'épisode grippale de 1 à 2 jours. Ce bénéfice clinique reste modeste et peut se justifier pour le confort du patient ou pour favoriser un retour plus rapide à la vie active. Alors que pour les personnes à risque, un traitement par l'Oseltamivir ou le Zanamivir semble être raisonnable et éthiquement incontournable afin de diminuer les complications pour les personnes à risques et de prendre en charge les cas graves (Jefferson *et al.*, 2009; Burchet *al.*, 2009; Fly *et al.*, 2013)

VI. La résistance aux antiviraux

1. Mécanisme de résistance

L'utilisation des Adamantanes a été limitée par l'émergence rapide de mutants transmissibles. Les virus de l'influenza A résistants aux Adamantanes ont été signalés pour la première fois au cours de l'épidémie de 1980 (Heider *et al.*, 1981). Jusqu'en 2004, une prévalence inférieure à 1% a été observée parmi les virus en circulation (Duwe., 2018). Au cours de la saison grippale 2004-2005, une prévalence élevée et une forte transmission du virus A(H3N2) résistants aux Adamantanes ont été observées en Asie, en Europe, en Australie et aux États-Unis (Bright *et al.*, 2005). Pendant la saison suivante (2005-2006), la prévalence de ces virus a augmenté pour atteindre près de 100% (Hayden *et al.*, 2009). Ces résultats suivis des premiers rapports sur la détection de virus saisonniers résistants A(H1N1) démontrent l'inefficacité de cette classe de médicament.

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de l'apparition de ces formes de résistance: les Mutations spontanées au cours de la réplication virale altérant le site d'interaction de l'antivirale avec la protéine cible, la pression de sélection due à un traitement mal conduit (durée et/ou dose non respectées) ou la prescription d'un traitement à dose prophylactique chez des sujets en phase d'incubation de la grippe. Les mutations de la protéine M2 qui confèrent une résistance aux médicaments à base d'Adamantanes sont classées en trois catégories en fonction de leur localisation dans la protéine. Ils comprennent les mutations faisant face aux pores (V27A, A30T, S31N, G34E), la mutation faisant face à l'hélice N-terminale (L26F) et les mutations faisant face à l'inter-hélice C-terminal (L38F, D44A) (Gu *et al.*, 2011 ; Hay *et al.*, 1985) (figure 15). Il a été estimé que 97% des formes de résistance sont dues aux mutations V27A et/ou S31N (Saito *et al.*, 2003; Wanget *al.*, 2013a). Aujourd'hui tous les virus A(H3N2) sont naturellement résistants à cette classe d'antiviraux (Bright *et al.*, 2005). Il est également à noter que les virus pandémiques A(H1N1) pdm09 sont porteurs de la mutation S31N et donc naturellement résistants aux Adamantanes (Garten *et al.*, 2009).

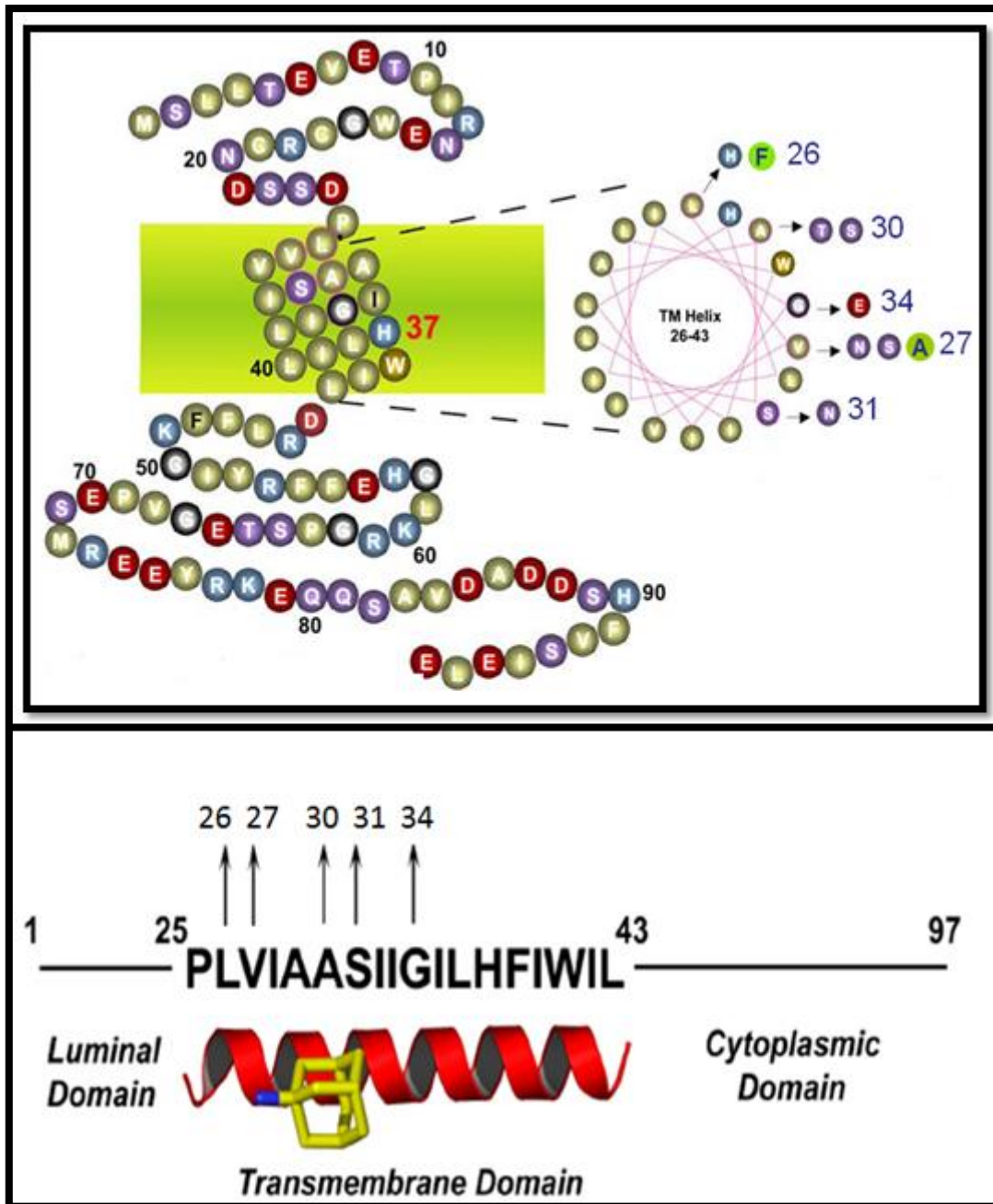


Figure 15 : Les mutations de la protéine M2 qui confèrent une résistance aux d'Adamantanes (Présentation CDC., 2010)

Une évaluation épidémiologique de l'émergence des formes résistantes aux Adamantanes au niveau de la région EMRO, dont le Maroc fait partie intégrante, a révélé une fréquence de 90.6% de formes résistantes pour le virus A(H3N2), à partir de l'année 2006, de 69% pour A(H1N1) et de 28% pour A(H5N2) au cours de la saison grippale 2013 (figure 16).

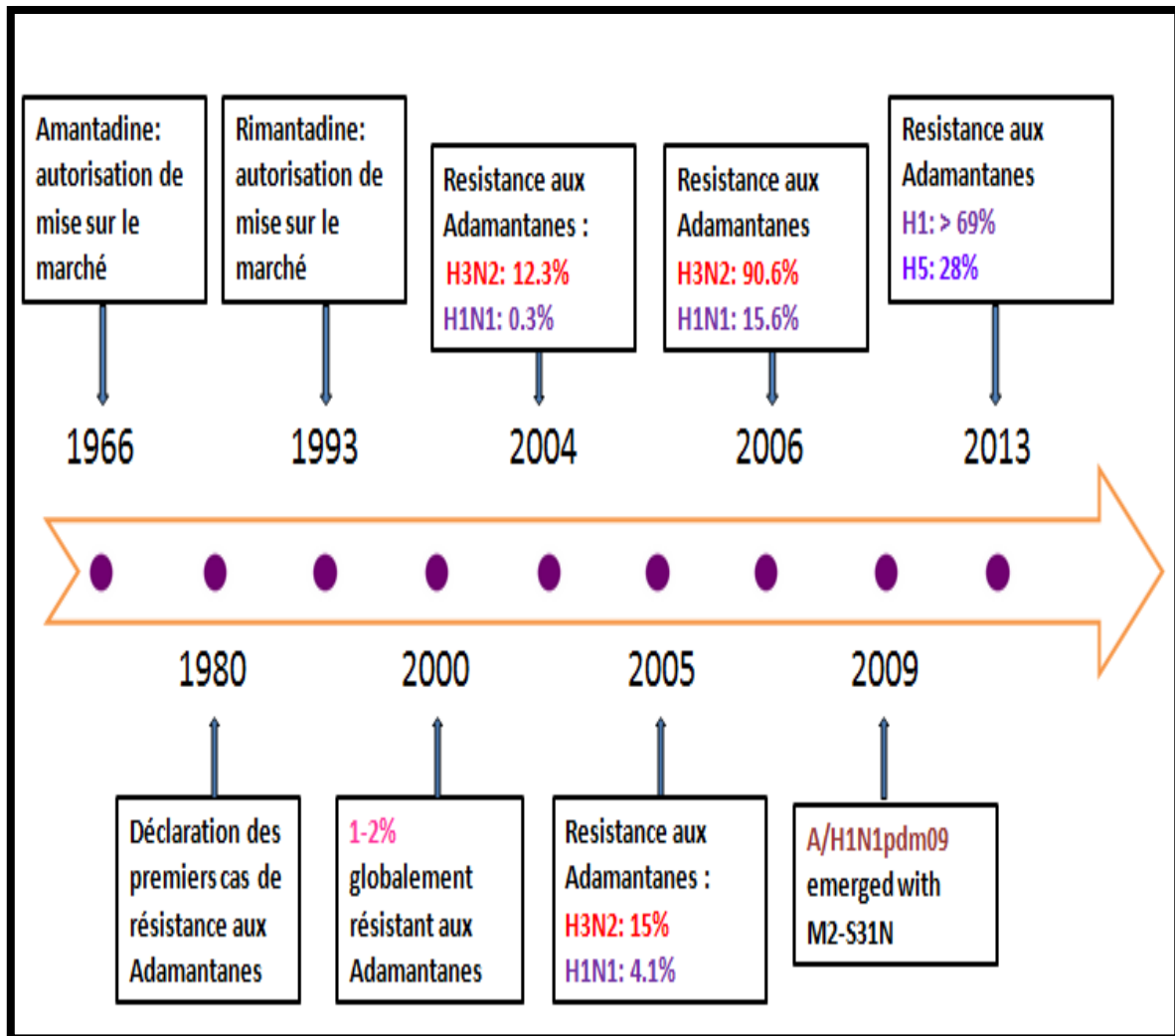


Figure 16 : Epidémiologie d'émergence des formes résistantes aux Adamantanes Dans la région EMRO (Moasser *et al.*, 2016)

Contrairement aux Adamantanes, l'apparition de la résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase était un phénomène rare jusqu'à 2007. Avant cette année, les isolats testés du virus de la grippe montraient une sensibilité naturelle aux INAs (Ferraris *et al.*,2005). Par ailleurs, lors des premières années d'utilisation de l'Oseltamivir, le taux de résistances se situait entre 0.4 et 1.0% chez les adultes (Monto *et al.*,2006). Du fait que les mutations induisant la résistance à cette classe d'antiviraux diminuaient la capacité répliquative de l'agent infectieux et par conséquent, empêchaient son émergence. Ce qui a permis de conclure que les mutations associées à la résistance n'auraient probablement aucune conséquence clinique.

Au cours de la saison 2007-2008, de nombreuses études portant sur la surveillance des isolats du virus de la grippe ont montrés une augmentation de la fréquence des formes résistantes à l'Oseltamivir suite à la présence de la mutation H274Y chez les virus de la grippe A(H1N1) pouvant aller jusqu'à 100% de résistance dans certains pays.(Baz *et al.*,2010 et Okomo-Adhiambo *et al.*, 2010). Il a été démontré que c'est l'appariation successive de deux mutation permissives (V234M et par la suite la R22Q) qui ont pu compenser la diminution de la capacité répliquative et par conséquent ont favorisées l'émergence des formes résistante (Bloom *et al.*,2010). Après la survenue de la pandémie grippale de 2009, l'ancien virus saisonnier A(H1N1) a été complètement remplacé par le nouveau virus A(H1N1) pdm09 qui se caractérise par sa sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase (Hurt *et al.*,2014). Au cours de la pandémie 2009, il a été observé des cas sporadiques de résistance pour le virus A(H1N1) pdm09 (Chen H *et al.*,2009).

La dernière mise à jour relative à la surveillance de la sensibilité aux INAs à l'échelle mondiale a estimé une fréquence des formes résistante à 1.7% pour l'A(H1N1) pdm09, à 0.2% pour l'A(H3N2), à 0.5% pour le B Victoria et à 0.4% pour le B Yamagata (Gubareva *et al.*,2017) (figure 17).

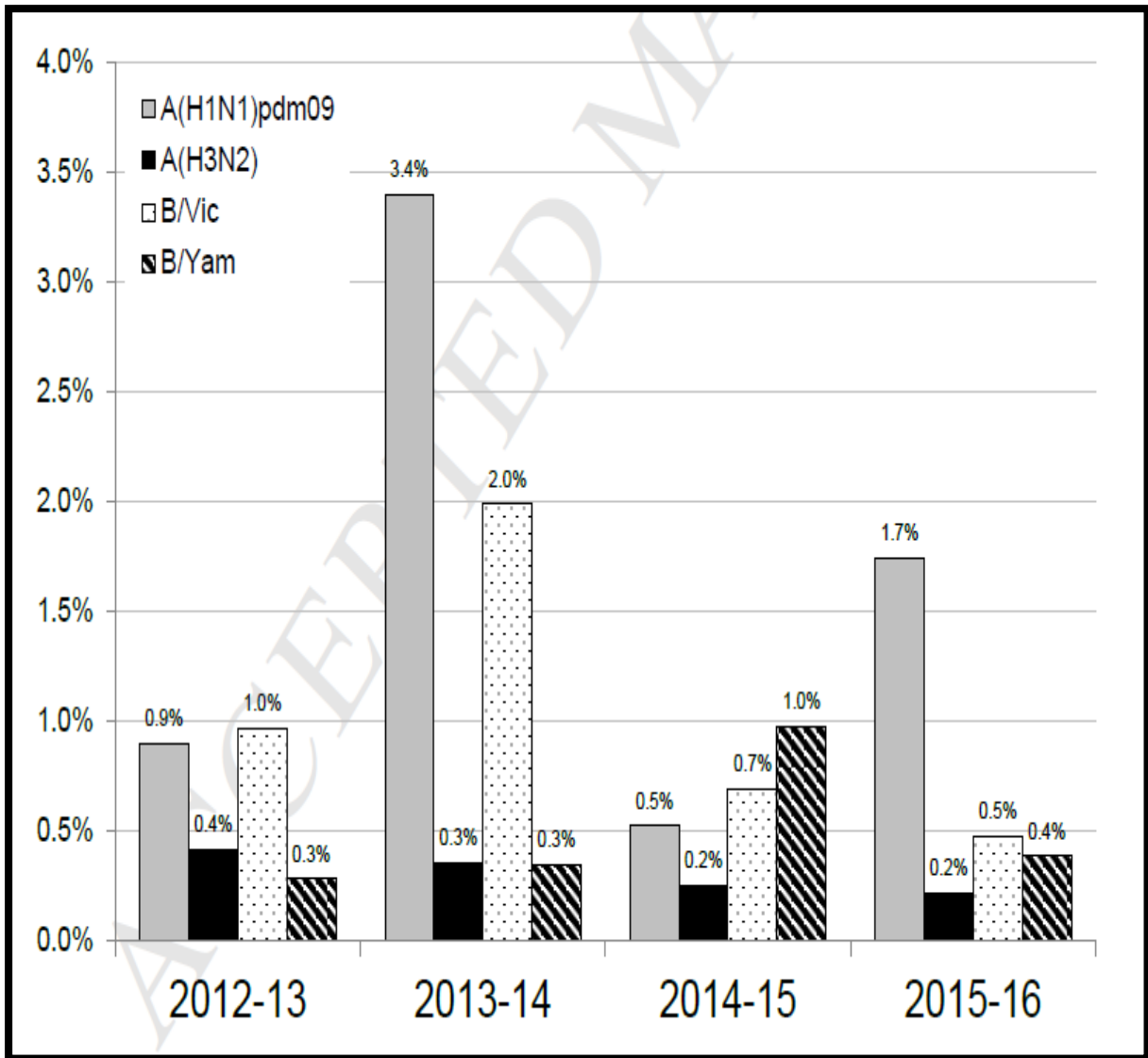


Figure 17 : Représentation graphique de la dernière évaluation mondiale de la surveillance de la résistance aux INAs (Gubareva et al.,2017)

2. Les mutations de résistance aux INAs

Les mutations de résistance portent sur des résidus conservés de la NA, qui sont soit des résidus du site catalytique (R152K, R292K) soit des résidus proches de ce site et qui sont importants pour sa structure (H274Y, E119V, N294S, D198N). Certaines mutations confèrent à la NA une résistance croisée au Zanamivir et à l'Oseltamivir comme les mutations R152K ou D198N. Alors que les autres sont spécifiques de l'Oseltamivir (Marmier *et al.*, 2010). La majorité des mutations décrites confèrent un haut niveau de résistance aux INAs (Tableau3).

D'une manière générale, les mutations R292K et E119V sont associées le plus souvent au virus A(H3N2) résistant à l'Oseltamivir alors que la mutation H274Y (H275Y en nomenclature N1) est fréquemment rencontrée chez les virus A(H1N1) résistants à l'Oseltamivir (Ives *et al.*, 2002). Chez le virus de type B, la substitution D198N a été détectée et décrite comme conférant la résistance à l'Oseltamivir chez un patient immunodéprimé (Gubareva., 2004).

Les résistances associées au Zanamivir sont moins nombreuses que celles associées à l'Oseltamivir pour deux raisons : la première c'est que le Zanamivir présente une structure quasi identique à celle de l'acide sialique, donc toute mutation empêchant la liaison avec le Zanamivir dans le site actif de la NA, empêcherait aussi la liaison avec l'acide sialique et aurait un effet négatif sur la réplication du virus. La deuxième raison est expliquée par le mode d'administration simple d'Oseltamivir lui fournissant une place de choix en termes de traitement ou de prévention augmentant ainsi la pression sélective de ce dernier sur les souches résistantes (Hurt *et al.*, 2016 ; Gubareva *et al.*, 2017).

D'après certaines études, l'augmentation progressive de la résistance à l'Oseltamivir par rapport au Zanamivir est probablement liée à la structure conformationnelle de la molécule favorisant le développement des formes résistantes à l'antiviral particulièrement pour les virus grippaux A(H1N1). En effet, afin d'accueillir la chaîne latérale de la molécule d'Oseltamivir, la neuraminidase doit subir un réarrangement créant ainsi une poche. Ce changement au sein de la protéine (site catalytique) n'est pas nécessaire pour la fixation du Zanamivir (figure18) (Varghese *et al.*, 1998).

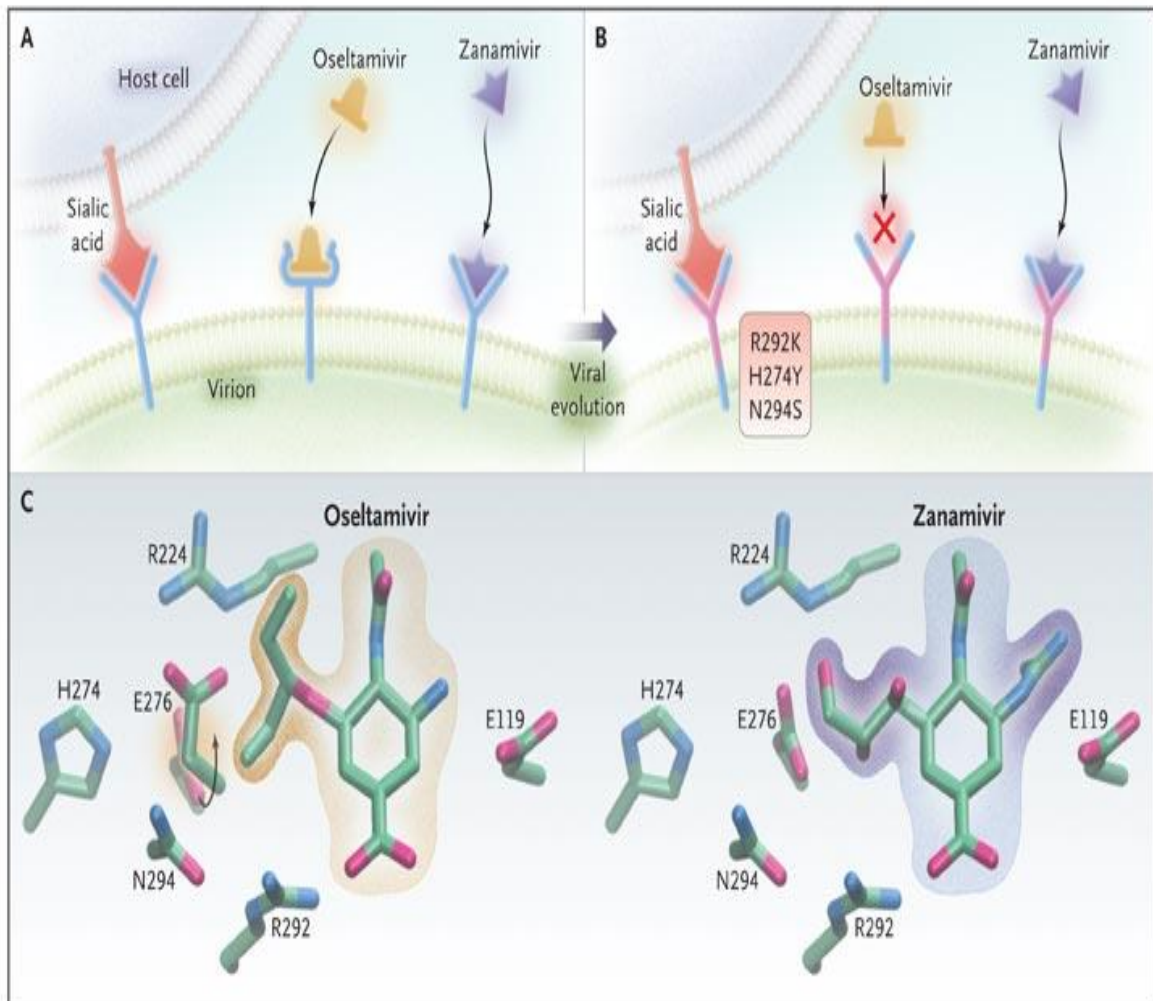


Figure 18: (A) mécanisme d'action de l'Oseltamivir et du Zanamivir.(B) marqueurs de résistance(Moscona., 2005)

Tableau 3: Mutations des acides aminés catalytiques et structuraux et spécificité des antiviraux (Marmier *et al.*, 2010).

Mutation	Type et /ou sous-type	Efficacité	
		Oseltamivir	Zanamivir
AA catalytique			
R292K	A/N2	R	NT
R152K	B	R	R
AA structuraux			
E119V	A/N2	R	S
D198N	B	R	R
H274Y	A/N1	R	S
N294S	A/N2, A/N1	Faible R	NT

NT : nom testé

R : Résistant

S : sensible

3. Méthodes de détection de la résistance aux INAs

La stratégie d'évaluation de la sensibilité des virus grippaux aux antiviraux plus particulièrement les INAs, repose essentiellement sur des tests phénotypiques basés sur la mesure de l'IC50 (concentration minimale d'antiviral inhibant 50% de la réplication virale) ou des tests génotypiques qui reposent sur la mise en évidence de la présence d'éventuel marqueurs de résistance au niveau du segment codant pour cette protéine par comparaison à des séquences de référence. Le choix de l'une ou l'autre de ces méthodes, ou la combinaison des deux dépendra essentiellement des capacités de chaque laboratoire et de l'objectif de l'investigation. C'est-à-dire, soit l'orientation des directives de prise en charge correcte du patient en cas d'échec thérapeutique, ou la surveillance de la dynamique d'évolution des virus grippaux en terme de sensibilité aux antiviraux le long de la saison grippale. (Pozo *et al.*, 2013)

3.1. Les tests phénotypiques

Les premiers tests phénotypiques consistaient en la détection des virus grippaux résistants par une évaluation de la réplication de ces derniers au cours de leur culture cellulaire en présence du médicament. Cependant, en raison de l'effet imprévisible du récepteur antigénique (HA) sur la multiplication virale (Tisdale *et al.*, 2001), ces tests ont été rapidement abandonnés pour être remplacés par d'autres tests également phénotypiques mais qui se basent sur une culture des virus grippaux sur des cellules MDCK et une évaluation par la suite de leur sensibilité aux antiviraux.

La détection de la résistance repose sur la détermination des valeurs de l'IC50. Le substrat analogue de l'acide sialique est incubé en présence du virus grippal avec des concentrations croissantes d'inhibiteurs de la neuraminidase. Après clivage du substrat on observe une augmentation de la fluorescence ou de la chimioluminescence (selon la technique de détection utilisée). Le signal est proportionnel à l'activité enzymatique de la neuraminidase. Plus l'IC50 est faible, plus la souche est sensible à la molécule testée (Okomo-Adhimbo *et al.*, 2010 ; Boivin., 2013).

Les techniques de détection par fluorescence ou chimioluminescence ont une procédure similaire. Cependant ils peuvent générer des valeurs IC50 différentes, en particulier pour les virus résistants. Les valeurs de l'IC50 générées par fluorescence sont souvent plus élevées que celles obtenues par chimioluminescence (Okomo-Adhimbo *et al.*, 2013a) ce qui offre une

meilleure discrimination entre les valeurs de l'IC50 du mutant et celles du virus de type sauvage. La technique de détection par fluorescence nécessite donc des titres viraux plus élevés que la technique de dosage par chimioluminescence.

L'inconvénient majeur des tests phénotypiques est le temps. En effet, les virus grippaux sont mis en culture sur des cellules MDCK étape essentielle pour étudier la sensibilité des isolats aux antiviraux, ce qui nécessite de 3 à 7 jours d'incubation. Cette étape peut aussi induire une modification de la sensibilité des souches virales aux antiviraux (Tamura *et al.*, 2013). D'autre part, l'interprétation des résultats nécessite l'implication de plusieurs paramètres (type de test, conditions d'essai, spécificité du support d'analyse, type ou sous-type de virus testé (Okomo-Adhimbo *et al.*, 2013b)). Les tests phénotypiques ne sont appropriés que lorsque le temps nécessaire pour générer un résultat n'est pas critique, comme pour une analyse rétrospective des échantillons provenant de patients traités ou pour une surveillance.

3.2. Les tests génotypiques

La recherche des mutations génomiques conférant la résistance à un antiviral est possible par séquençage du gène codant pour la protéine ciblée par l'antiviral. Comme c'est le cas pour le segment 6 du génome du virus de la grippe qui code pour la neuraminidase cible de l'Oseltamivir et du Zanamivir. Ces techniques permettent de mettre en évidence de nouvelles mutations de résistance par comparaison avec des séquences de référence provenant d'isolats viraux exprimant un phénotype résistant.

3.2.1. Méthode de détection des polymorphismes mononucléotidiques (SNP)

Lorsque les mutations de résistances sont déjà bien identifiées, par exemple, la mutation Y275H en N1 due à une substitution de la cytosine en thymine à la position 823 du gène de la neuraminidase peut entraîner une substitution d'histidine en tyrosine en position 275 associée à la résistance à l'Oseltamivir. Il est possible de les rechercher par d'autres techniques de biologie moléculaire. La technique la plus utilisée est la PCR en temps réel impliquant des amorces correspondant aux codons sauvages et d'autres aux codons mutés. L'interprétation est en partie basée sur la comparaison des signaux obtenus avec les amorces des codons sauvages et celles des codons mutés. (Lackenby *et al.*, 2008 ; vandervries *et al.*, 2010).

Tableau 4 : Amorces et sondes utilisées pour les tests de RT-PCR à la recherche de la mutation H275Y du virus A/H1N1pdm09 (vandervries et al.,2010)

Primers du A/H1N1pdm09/ H275Y		
panN1-275Y-primer sense	cagtcgaaatgaatgccccctaa	797–818
panN1-H275-primer antisense	tgcacacacatgtgatttcactag	797–818
panN1-275H-probe	ttatcactatgaggaatga 6-FAM/BHQ-1	819–837
panN1-275Y-probe	ttattactatgaggaatgaDragonfly/BHQ-2	819–837

3.2.2. Méthode de séquençage du génome du virus de la grippe

Le séquençage complet du génome de la grippe est de plus en plus utilisé pour la recherche et la surveillance mondiale des virus de la grippe. Traditionnellement, cela a été fait par séquençage de Sanger, développée par Fredrick Sanger et ses collègues à la fin des années 1970, cette approche implique l'utilisation de l'ADN polymérase (Enzyme thermostable), une paire d'amorces d'ADN, des désoxynucléotides triphosphates non marqués (dNTPs) et les didésoxynucléotides à terminaison de chaîne (ddNTP), chaque base étant marquée par un fluorophore unique. Dans ce cas, l'incorporation sélective de ddNTP dans un brin nouvellement synthétisé par l'ADN polymérase inhibe l'addition de dNTP ultérieurs, ce qui empêche l'allongement ultérieur de l'ADN cible, et engendre des fragments d'ADN de différentes tailles contenant du ddNTP marqué par fluorescence. La séquence d'ADN est ensuite déterminée sur la base de la taille des fragments d'ADN issus de la réaction de séquençage. Cette approche de séquençage peut générer des lectures de séquences d'ADN de 1000 pb par réaction.

Cependant, le facteur le plus déterminant pour la réussite de la stratégie de séquençage de Sanger du génome complet est la disponibilité d'amorces capables de cibler de manière fiable uniquement les séquences du virus, mais pas celles d'hôte ou d'autres agents pathogènes. En raison de la grande diversité des virus de la grippe, la plupart des méthodes Sanger développées à ce jour sont spécifiques aux sous-types et nécessitent souvent l'utilisation d'un grand nombre d'amorces. A titre d'exemple, la méthode décrite par Lee et ses collaborateurs (Lee *et al.*,2013) concernant le sous-type A/H3N2 implique l'utilisation de 19 paires d'amorces PCR pour l'amplification du génome complet du virus, suivis de 40 amorces

supplémentaires pour le séquençage des produits de PCR. Les scientifiques utilisent souvent la méthode de Sanger pour effectuer le séquençage partiel du génome des virus de la grippe, tandis que les nouvelles technologies (NGS) conviennent mieux au séquençage du génome entier.

Les systèmes de séquençage de nouvelle génération ont été introduits au cours de la dernière décennie et permettent des réactions de séquençage massivement parallèles. Ces systèmes sont capables d'analyser des millions, voir des milliards de réactions de séquençage en même temps. Une telle approche a amélioré considérablement la procédure de manipulation pour l'identification des souches de virus grippaux. Le NGS révèle les variations génétiques parmi de nombreuses particules de virus grippal différentes dans un seul échantillon. Ce niveau de détail peut être directement bénéfique pour la prise de décision en matière de santé publique. Toutefois, le coût et la disponibilité des équipements NGS, associés à la nécessité d'une bioinformatique d'analyse complexe, constituent des obstacles majeurs pour de nombreux laboratoires lors de l'introduction de cette nouvelle technologie (Zhao *et al.*, 2016).

VII. Programme de surveillance de la grippe

La surveillance de la grippe constitue un enjeu majeur de santé publique. Cette pathologie infectieuse saisonnière, dont l'agent étiologique est le virus Influenza, est responsable de trois à cinq millions de cas de maladies graves (Hsu *et al.*, 2012) et d'environ 250.000 à 500.000 décès par an (Iuliano *et al.*, 2018). Il est donc indispensable, en période épidémique, d'identifier le type de virus circulant et d'estimer la gravité de la pathologie, dans le but de redresser les approches préventives et curatives.

1. A l'échelle mondiale

Les craintes suscitées par les maladies émergentes et réémergentes ont donné lieu à plusieurs initiatives nationales et internationales visant à rétablir et à améliorer les dispositifs de surveillance et de lutte contre les maladies transmissibles. L'un des principaux moyens mis en œuvre par les Etats Membres de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) est la création d'un système mondial de surveillance qui regroupe les réseaux de laboratoires et de centres médicaux existant au niveau local, régional, national et international en un super réseau de surveillance.

Le système mondial de surveillance de la grippe en est un exemple concret. Mis en place en 1949 à la suite de la pandémie de 1947, il est devenu au fil des années un partenariat mondial des plus performants. Ce réseau comprend actuellement 143 centres nationaux de référence grippe (CNRG), 6 centres collaborateurs OMS, 4 laboratoires de réglementation essentiels OMS, 13 laboratoires de référence H5 OMS (Gubareva *et al.*, 2017). Les centres nationaux ont pour mission de surveiller continuellement les virus grippaux isolés localement et de communiquer des informations sur l'émergence et la propagation des différentes souches. Les données collectées à travers ce système permettent d'estimer la gravité de la pathologie dans le but d'adapter en permanence les dispositifs de prévention, d'organisation des soins et de redressement des stratégies thérapeutiques. Ils font également parvenir aux centres collaborateurs mondiaux des échantillons des souches isolées à l'échelle locale. (L'OMS recommande quatre envois par saison et à deux mois d'intervalle). Les souches partagées feront l'objet d'une caractérisation antigénique et génétique plus poussée, les résultats obtenus constituent la base des recommandations de l'OMS pour la composition vaccinale lors des réunions annuelles en février au siège de l'OMS à Genève (OMS., 2013).

Parallèlement, une évaluation continue de la sensibilité de ces virus aux principaux médicaments antigrippaux est réalisée.

Grâce à ce système on a pu mettre en évidence :

- En 2000, la propagation rapide et mondiale des virus A(H3N2) résistants aux Adamantines, entraînant des recommandations de cesser d'utiliser cette catégorie d'antiviraux (Saito *et al.*, 2003 et Bright *et al.*, 2005).
- En 2008 l'émergence des formes 100% résistantes à l'Oseltamivir chez le virus A(H1N1) (Baz *et al.*, 2010).
- En 2012 l'identification en Australie d'un regroupement de virus A(H1N1)pdm09 résistants à l'Oseltamivir chez des patients qui n'ont jamais suivi un traitement à l'Oseltamivir (Hurt *et al.*, 2012).

L'émergence inattendue et la propagation mondiale de la résistance aux antiviraux grippaux ont justifié l'importance de la surveillance de la sensibilité aux médicaments. Ainsi, l'OMS à travers son réseau de surveillance de la grippe a augmenté son niveau de vigilance, et a renforcé son système de surveillance de la sensibilité des virus grippaux aux INAs. Elle a procédé à la création en 2011, d'un groupe de travail formé par des experts en matière de surveillance de l'émergence des souches résistantes aux antiviraux. Ce comité veille à l'élaboration des approches pratiques à l'intention des centres nationaux de référence de la grippe en examinant les méthodes disponibles pour la surveillance de la sensibilité aux antiviraux, et à l'orientation de l'interprétation des données des laboratoires sur la surveillance. Elle assure par ailleurs, une collecte des données à l'échelle mondiale concernant l'émergence des formes résistantes, ce qui permet l'élaboration de rapports qui servent de base pour la mise au point des lignes directrices (OMS., 2012 ; OMS., 2013).

Grâce aux travaux de ce comité, un guide standard « **Practical guidance for national influenza centres establishing or implementing neuraminidase inhibitor susceptibility surveillance** » a été élaboré en 2016 et destiné aux centres nationaux de référence de la grippe afin de standardiser la stratégie de surveillance de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase à l'échelle mondiale (OMS., 2016).

2. Au Maroc

A l'heure actuelle, la surveillance épidémiologique de la grippe se fait à travers deux systèmes complémentaires :

- **La surveillance virologique :** Elle a été mise en place par le laboratoire de virologie de l'Institut National d'Hygiène (INH) depuis la saison 1995/ 1996, constitué d'un réseau de médecins volontaires du secteur libéral (généralistes, pédiatres et pneumo-phthysiologues) répartis géographiquement au niveau de différentes régions du royaume. Ce réseau a été renforcé en 2000 par l'intégration de 8 centres de santé répartis au niveau de 8 préfectures, chef-lieu de régions et en 2007 par l'insertion de huit centres hospitaliers sentinelles du secteur public (Rabat, Fès, Meknès, Agadir, Tanger, Oujda et Béni Mellal). Cette surveillance repose sur l'identification hebdomadaire tout au long de la saison des syndromes grippaux et des Infections Respiratoires Aiguës.
- **La surveillance épidémiologique :** Ce réseau de 379 Centres de Santé et de 8 Centres Hospitalisés (intégrés en 2006) est animé, depuis 2004, par la Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte contre les Maladies. La DELM estime tout au long de l'année le nombre hebdomadaire de patient consultant pour un Syndrome Grippal ou pour une Infection Respiratoire Aigüe Sévère (IRAS) (Rguig *et al.*, 2020).

A cela s'est ajoutée la création d'une base de données intégrée dans le web. Cette base permet non seulement la communication entre les différents intervenants de cette surveillance mais également l'analyse, la rétro-information et la diffusion des données.

Ce système a pour objectif global, la collecte de données épidémiologiques et virologiques nécessaires pour mettre en place les mesures d'intervention appropriées pour assurer un meilleur contrôle de la maladie. Les objectifs spécifiques sont beaucoup plus attachés à l'aspect épidémiologique ou virologique de la surveillance.

Aspect Epidémiologique :

- a. Signaler le début et la fin de la saison de la grippe ;
- b. Identifier et surveiller les groupes à haut risque de complications graves et de décès ;
- c. Estimer la charge de morbidité et de mortalité de la grippe afin d'évaluer l'impact et la gravité de chaque saison et prédire l'impact d'éventuelles pandémies futures ;
- d. Aider à développer une compréhension de la relation entre les souches du virus et la gravité de la maladie.

Aspect Virologique :

- a. Identifier la circulation locale selon le type et sous-type des virus et la comparer au niveau mondial et régional ;
- b. Participer au réseau de surveillance mondial de la grippe de l’OMS en fournissant des virus candidats pour la production de vaccins ;
- c. Décrire le caractère antigénique et génétique des virus en circulation ;
- d. Surveiller la sensibilité des virus aux antiviraux ;
- e. Détecter les événements inhabituels et inattendus, comme les éclosions de cas de grippe en dehors de la saison typique ;
- f. Détecter les échecs vaccinaux qui peuvent annoncer la circulation de nouveaux virus de la grippe ;
- g. Détecter d’autres virus (VRS, Adénovirus, Parainfluenz1,2,3, Coronavirus)

En termes de surveillance de la sensibilité aux antiviraux grippaux et suite à l’utilisation excessive du Tamiflu lors de la pandémie grippale 2009, une stratégie d’évaluation des profils sensibilité/résistance vis-à-vis des inhibiteurs de la neuraminidase des virus grippaux circulants à l’échelle nationale a été mise en place à partir de saison 2014/2015. Une initiative qui a été considérée par l’OMS comme étude pilote au niveau de la région EMRO.

Cette stratégie, selon les recommandations de l’OMS, repose sur une sélection représentative (au moins 40 échantillons positifs) représentant chaque type ou sous-types du virus de la grippe, couvrant toute la saison et les différentes régions du pays (OMS.,2016). Une évaluation phénotypique de leur sensibilité aux deux principaux inhibiteurs de la neuraminidase (Oseltamivir et le Zanamivir) est effectuée, complétée par une analyse génotypique :

- Des cas présentant un profil de sensibilité anormale dans le but de rechercher la présence d’éventuels marqueurs de résistance.
- Une sélection de virus avec profil de sensibilité normale dans le but d’évaluer la dynamique du glissement antigénique au niveau du segment 6 du génome virale (Cible des inhibiteurs de la neuraminidase).



Chapitre II : MATÉRIELS ET MÉTHODES



I. Population de l'étude

Les prélèvements sont collectés dans le cadre de la surveillance virologique de la grippe, chez des patients présentant soit un Syndrome Grippal ou une Infection Respiratoire Aigüe Sévère.

1. Définition de cas

L'aspect syndrome grippal (**SG**) est attribué à toute personne présentant brusquement : une fièvre supérieure à 38° C, une toux ou un mal de gorge, et en l'absence d'autre diagnostic (OMS., 2018 ; Rguig *et al.*,2020). Cinq prélèvements par jour (les cinq premières personnes répondant à la définition de cas de grippe) sont recrutés parmi la population consultante au niveau des centres de santé ou chez des médecins privés.

Alors que, les cas d'infections respiratoire aigües sévère (**IRAS**) sont généralement attribuées à toute personne, quelque soit son âge, présentant un tableau clinique associant une apparition brutale de signes respiratoires (toux associée à une difficulté respiratoire) dans un contexte infectieux (fièvre, asthénie et céphalée). Toute personne répondant à la définition de cas d'IRAS (OMS., 2018; Rguig *et al.*,2020) fait l'objet d'un prélèvement dès son admission au niveau des services hospitaliers de Pédiatrie, de Réanimation et de Pneumologie des hôpitaux sentinelles.

2. Recueil des échantillons

Les prélèvements sont réalisés par un écouvillonnage nasal, pharyngé ou nasopharyngé, dans les trois jours suivant l'apparition des symptômes qui correspond à la phase aigüe de la maladie (Johnson., 1990). Il s'agit d'un geste techniquement simple en médecine ambulatoire, à l'aide d'un écouvillon stérile, on prélève le plus de cellules possible en grattant les parois internes des narines et/ou les zones inflammatoires du fond de la gorge. L'écouvillon est introduit dans un tube renfermant 3ml de milieu de transport additionné d'antibiotique et d'antifongique. Après étiquetage, chaque prélèvement est associé à une fiche d'investigation dûment remplie et envoyée au centre national de référence de la grippe dans une caisse isotherme à une température de +4°C dans un délai maximal de 72 heures (Barakat *et al.*,2012).

3. Approche générale

Les 4888 prélèvements collectés durant les quatre années de l'étude ont été investigués par la technique de RT-PCR en temps réel. Ce test est utilisé en priorité pour détecter et identifier les virus grippaux type B, sous-type A(H3N2) et A(H1N1) pdm09. Seuls les prélèvements positifs sont mis en culture sur les cellules MDCK. Les isolats présentant une charge virale importante (titre en hémagglutination $>1/16$) seront retenus pour une évaluation phénotypique appuyée par une analyse génotypique de leur profil de sensibilité aux antiviraux, l'Oseltamivir et le Zanamivir en l'occurrence (figure 19).

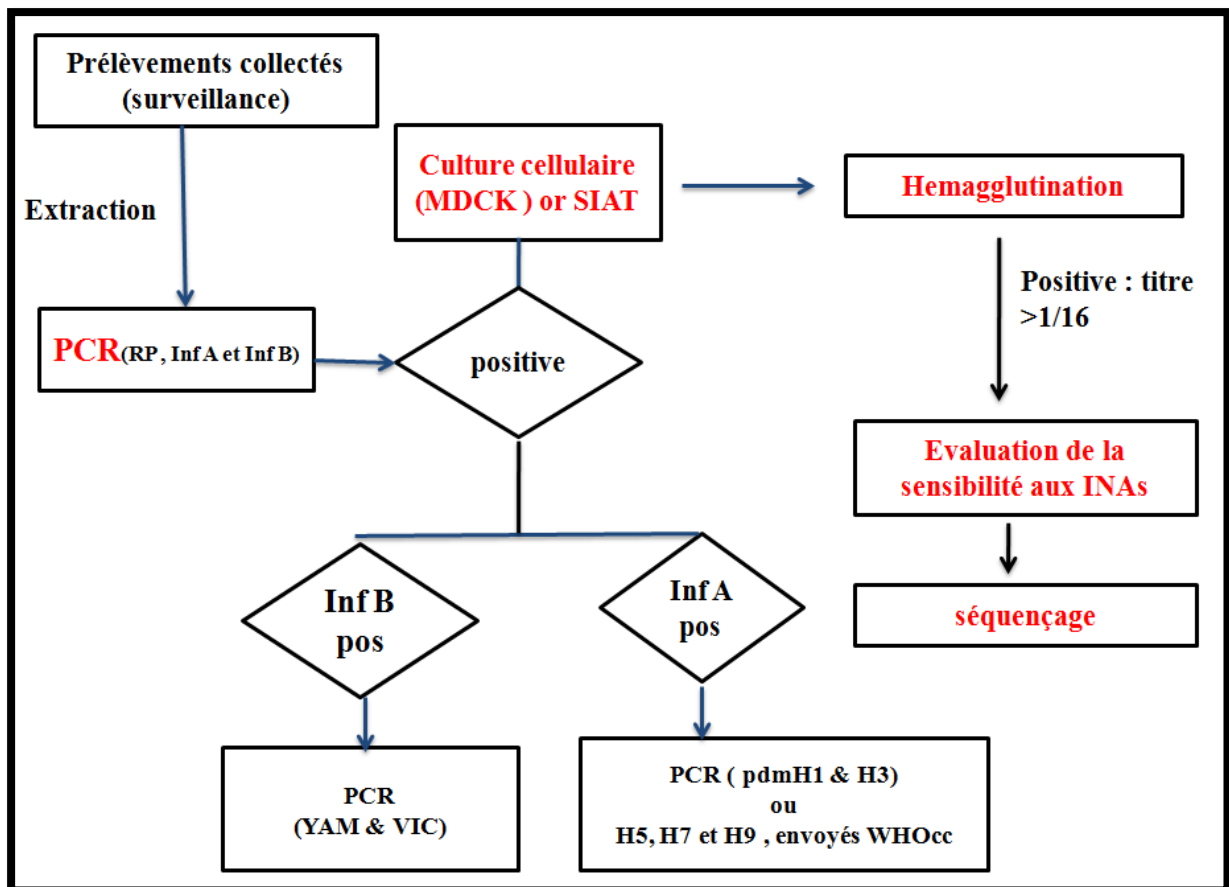


Figure 19 : Algorithme adopté au cours de cette étude

II. Procédures de laboratoire

1. Extraction de l'ARN virale

L'extraction de l'ARN virale est réalisée par méthode automatisée via l'extracteur PureLink ARN total (IPrep™) et Trizol® Plus Kits ARN (IPrep™ Kits ARN). La méthode repose sur une purification (après lyse des échantillons) qui fait appel à des mono-disperses, perles magnétiques avec une surface de silice optimisée d'une haute spécificité : « Dynabeads® MyOne™ silane ». Une fois les acides nucléiques fixés à la surface des billes, un passage dans une série de tampon de lavage permet d'éliminer toute trace de contaminants. L'ARN totale est ensuite récupéré dans un tampon d'élution. A partir d'un volume initial de 400 uL on obtient un éluat de 100uL. Bien qu'elle soit coûteuse, cette méthode reste d'une grande utilité pour les laboratoires de biologie moléculaire à haut débit (Figure 20).



Figure 20 : Extracteur automatique™ PureLink ARN total

2. Détection et identification des virus de la grippe par RT- PCR en temps réel

L'ARN viral est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, suivie d'une amplification par le biais de deux amorces qui se lient aux extrémités 3' de l'ADNc. La détection se fait grâce à une troisième amorce spécifique et couplée à des fluorophores (Probe). La présence de séquences virales spécifiques se traduit par une augmentation de la fluorescence observée à partir de la sonde doublement marquée. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la charge virale dans l'échantillon.

Dans notre étude le protocole expérimental implique l'utilisation de huit couples d'amorces et sondes : RNase P, InfA, InfB, A/H3N2, SW InfA, le SWH1, B/Yamagata et B/Victoria (voir annexe1). Le couple d'amorces et sondes RNase P sert comme contrôle positif interne pour les acides nucléiques humains, tandis que les autres sont plutôt impliqués dans la détection et l'identification des différents types et sous-types de virus grippaux selon l'algorithme représenté au niveau de la figure 21 (OMS.,2009; OMS.,2011).

Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel

Composants	Volume pour une réaction (µl)
H2O RNase Free	5.5
2X RT-PCR buffer	12.5
Amorce Forward (40uM)	0.5
Amorce reverse (40uM)	0.5
Sonde (10uM)	0.5
SuperScript III TM RT / Platinum Taq Mix®	0.5
Volume total	20

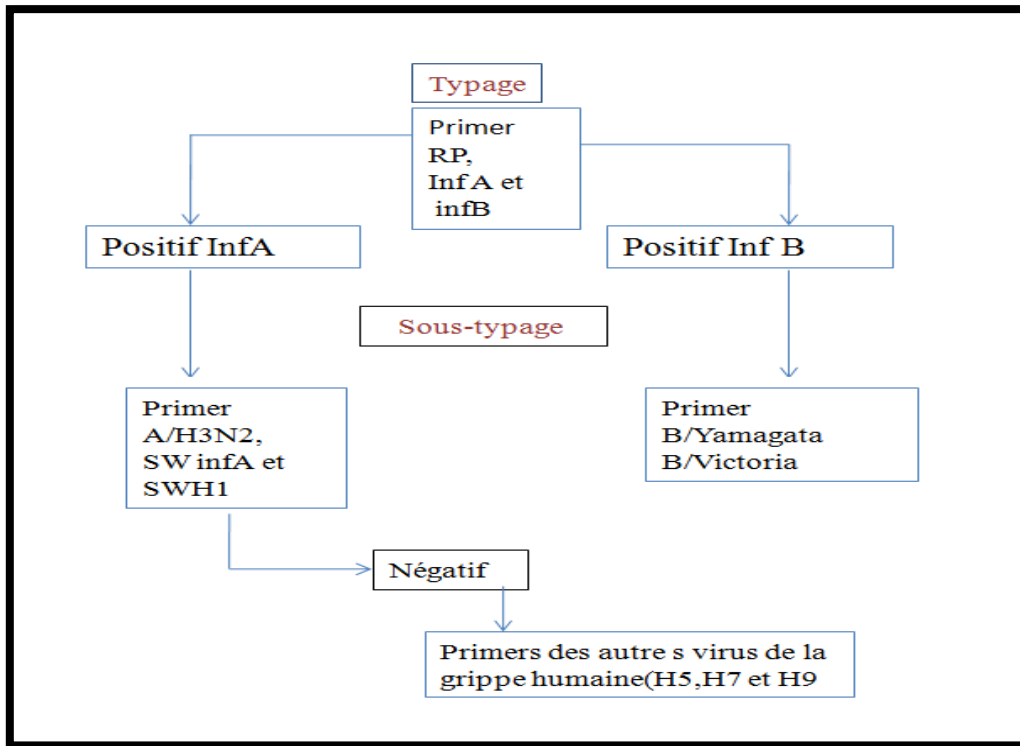


Figure 21 : Représentation schématique de l’algorithme de détection et d’identification des virus grippaux par RT-PCR temps réel(OMS., 2009; OMS., 2011)

2.1. Préparation du mélange réactionnel ou (Master Mix)

Un volume de 20 ul du mélange réactionnel préparé selon le tableau 5 est déposé dans chaque puit d’une plaque de 96. Par la suite 5ul de l’extrait de l’échantillon est ajouté comme indiqué dans la figure 22.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RP	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
RP	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	NTC	HSC
InfA	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
InfA	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	NTC	PTC
InfB	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
InfB	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	NTC	PTC

Figure 22 : Répartition des échantillons et des couples d’amorces sur la plaque dans le cas du typage du virus de la grippe

La plaque scellée est introduite dans un thermocycleur (ABI7500 Fast), programmé selon les paramètres d'amplification indiqués ci-dessous (figure23).

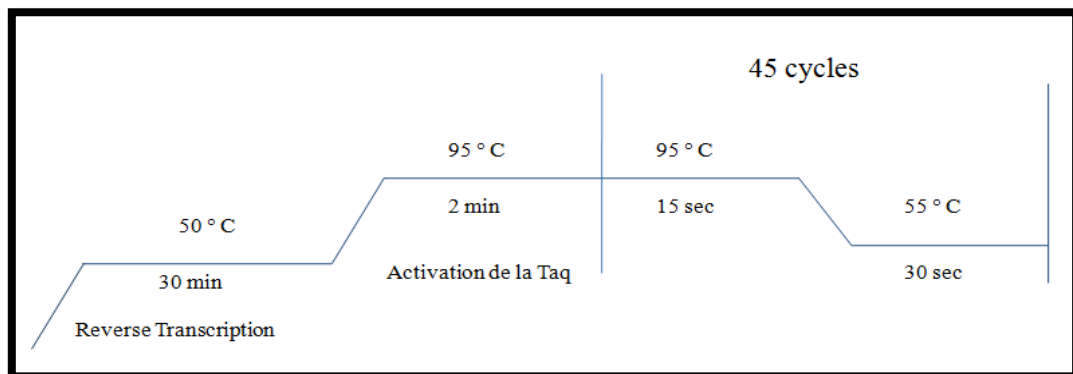


Figure 23 : Paramètres d'amplification de la matrice virale par PCR en temps réel

2.2. Interprétation des résultats

Lorsque tous les contrôles (positif et négatif) répondent aux exigences, un spécimen est considéré comme positif grippe A/H3N2, si la réaction avec INFA et A/H3N2 montre des courbes d'amplification exponentielles avant le cycle 40.

Il est considéré comme positif grippe A/H1N1pdm09, si la réaction avec INFA, SW INFA et SW H1 montre des courbes d'amplification exponentielles avant le cycle 40.

Si la réaction avec INFB montre des courbes d'amplification exponentielle avant le cycle 40, alors il est considéré comme positif grippe B.

Par contre, un spécimen est considéré comme négatif pour les virus de la grippe A et B, si la réaction avec l'INFA et la réaction avec l'INFB, ne montre pas de courbes d'amplification exponentielles avant le cycle 40.

Il faut noter que si un échantillon est positif pour l'INFA et négatif pour les deux sous-types circulant couramment, il doit être sous-typé pour les autres virus de la grippe Humaine (H5, H7 et H9) selon le protocole spécifique à chaque sous-type de virus.

RP	InfA	InfB	SW InfA	SWH1	A/H3N2	Résultat
+/-	+	-	+	+		A/H1N1pdm09
+/-	+	-			+	A/H3N2
+/-	-	+	-	-	-	La grippe B
+	-	-	-	-	-	Négatif grippe A et B
+/-	+	-	-	-	-	A sous-typer pour les autres gripes humaines (H5, H7 et H9)

Figure 24 : Critères d'interprétation d'un test de typage/sous typage du virus de la grippe par PCR entemps réel (OMS.,2009)

3. Isolement des virus grippaux

Les virus grippaux sont isolés sur les cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney cells lines). Lignée cellule provenant du rein de chien. Elles sont de nature épithéliale possédant des récepteurs de type sialique, spécifiques aux virus influenza, ce qui explique leur sensibilité à l'infection par la majorité des virus influenza A, B et C (Tobita *et al.*, 1975).

Ces cellules sont cultivées dans des boîtes de culture stériles en présence d'un milieu nutritif MEM (Minimum essentiel Medium) additionné de 10 % de sérum de veau foetal (SVF). Deux fois par semaine, lorsque les cellules sont confluentes, elles sont transférées après trypsination dans d'autres boîtes (repiquage). La trypsination consiste à décoller les cellules de leur support grâce à l'action d'une enzyme appelée Trypsine qui a la particularité à 37°C, de cliver les liaisons entre les cellules. Ces cellules en suspension sont remises en culture dans de nouvelles boîtes contenant du milieu enrichi de SVF (pour le maintien) ou dans des plaques de 24 puits en vue de cultiver le virus. Pour ce faire, on place 2 ml de suspension cellulaire par puit. Au bout de 24 heures à 48 heures, lorsque le tapis cellulaire atteint 70% de confluence, il est prêt à être inoculé. Après avoir lavé 2 fois les cellules au PBS incomplet (sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺), on inocule 0,1 ml de liquide de prélèvement par puit (figure 25).

Après 30 min d'adsorption à température ambiante, 2 ml de milieu MEM additionné de 2µg/ml de trypsine TPCK sont ajoutés à chaque puit. Les cellules sont ensuite incubées dans des sachets scellés à 35°C. En général, la libération de nouvelles particules virales se produit à partir de la sixième heure et atteint son maximum à 16 voir 24 heures.

Pour juger du résultat de l'isolement, les cellules sont observées sous microscope inversé. L'effet cytopathogène se manifeste par le décollement des cellules et la destruction du tapis cellulaire. L'évaluation de la charge virale dans la suspension du surnageant cellulaire se fait à l'aide d'un test d'hémagglutination.

En effet, le virus de la grippe possède la propriété d'agglutiner les hématies de plusieurs espèces animales (Cochons dinde, Mouton, Coq). Ce phénomène peut être évalué et visualisé de façon macroscopique.



Figure 25 : Culture de la ligné MDCK dans des plaques de 24puits

Dans notre étude, le test d'hémagglutination a été réalisé avec les hématies du cochon d'inde. Un volume de 10 ml d'hématies prélevées sur 20 ml d'Alsever puis lavées 3 fois avec le PBS. Entre chaque lavage, les cellules sont centrifugées 15 min à une vitesse de 3000 rpm. Elles sont ensuite resuspendues dans le PBS à raison de 1 volume pour 9 volumes et conservées à 4°C.

Une série de dilutions de suspension virale de raison 2 au PBS est réalisée dans des microplaques à 96 cupules (50µl/cupule). Le même volume d'une suspension d'hématies de cobaye à 0,5% en PBS est ajouté. Les plaques sont ensuite incubées 1 heure, à température ambiante. La réaction positive se traduit par un dépôt irrégulier à bords déchiquetés et crénelés d'hématies tapissant tout le fond du tube. La réaction négative donne une sédimentation des hématies en un point rouge au fond du tube. Le titre du virus est l'inverse de la dernière dilution qui donne encore une hémagglutination complète (OMS.,2011).

4. Analyse phénotypique des profils de sensibilité aux antiviraux par la technique de la fluorescence

4.1. Principe

L'analyse phénotypique de la résistance aux antiviraux par la technique de la fluorescence se fait en deux étapes :

La première consiste en la détermination de l'activité de la neuraminidase in vitro par le biais d'un substrat fluorogénique, MUNANA (2'-(4-Methylumbelliferyl) - α -D-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate). Ce substrat est clivé par la NA avec production du 4-Methylumbelliférol (4MU), qui émet une fluorescence à 460 nm pour une excitation à 355 nm. La mesure de cette fluorescence permet de quantifier l'activité neuraminidasique (Figure 26). Une telle quantification permettra d'estimer le facteur de dilution spécifique pour chaque souche analysée qui permet l'obtention d'un signal en fluorescence équivalent à celui généré par une concentration de 10 μ M du 4MU (Valeur standardisée par l'OMS pour la réalisation de la suite du test).

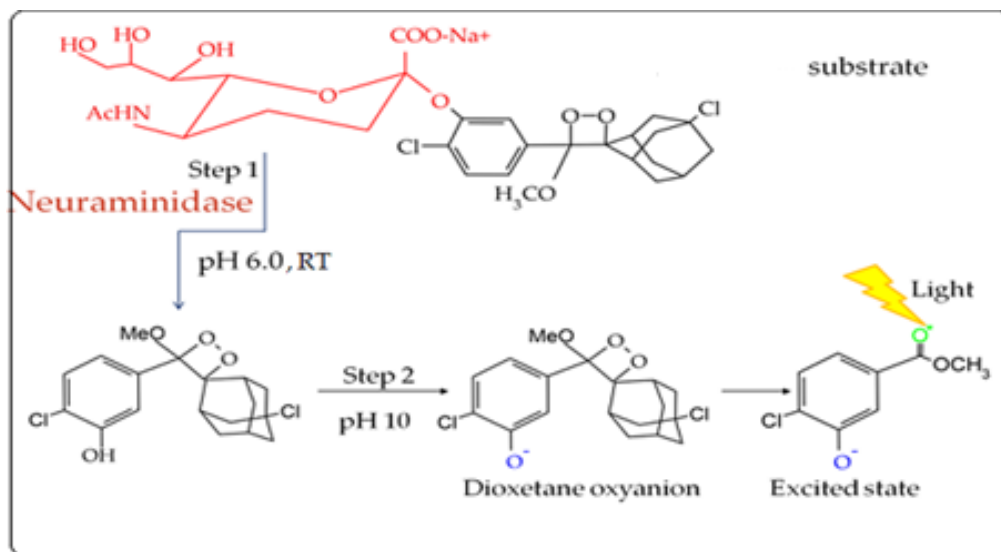


Figure 26 : principe de la technique d'étude de la sensibilité des virus grippaux par fluorescence

- La seconde permet l'évaluation de la sensibilité de ces virus aux INAs (Oseltamivir et le Zanamivir). Dans ce cas, le substrat est incubé en présence des virus qui sont préalablement traités par des concentrations croissantes d'INAs. Après clivage du substrat, on observe une production de la fluorescence. Le signal est proportionnel à l'activité enzymatique de la NA, ainsi plus l'IC₅₀ obtenue (concentration de médicament requise pour inhiber l'activité enzymatique de 50%) est faible plus la souche est sensible à la molécule testée (Figure 27).

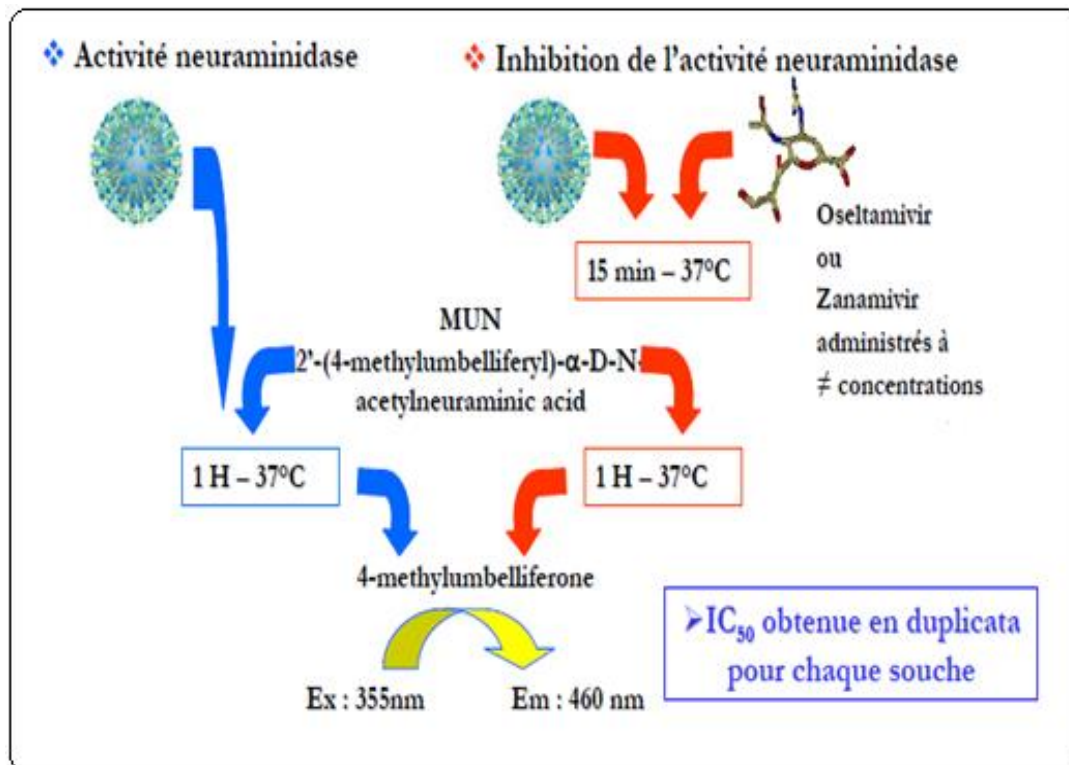


Figure 27 : Test fluorimétrique de l'activité de la neuraminidase

La validation du test nécessite l'introduction de souches de références types sauvages et types mutées pour les quelles l'IC₅₀ Oseltamivir et Zanamivir ont été déterminés avec exactitude par le centre collaborateur OMS (tableau6).

Tableau 6 : valeurs de l'IC₅₀ des souches de référence des virus grippaux

sous-type	Génotype	IC ₅₀ moyenne Oseltamivir	IC ₅₀ moyenne Zanamivir
A(H1N1)	sauvage	0,5	0,4
A(H1N1)	Mutée (H275Y)	458,2	0,4
A(H3N2)	sauvage	0,2	7,1
A(H3N2)	Mutée (E119V)	42,3	7,1
A(H1N1) pdm09	sauvage	0,6	0,2
A(H1N1) pdm09	Mutée (H275Y)	191,3	0,4
B	sauvage	13,1	1,3
B	Mutée (D197E)	182,6	7,1

4.2. Reconstitution des médicaments et la préparation du panel des souches de référence

Reconstitution d'Oseltamivir et du zanamivir

L'Oseltamivir carboxylate a été fourni par la société Hoffman La Roche (Basel, Switzerland), alors que le Zanamivir par la société GlaxoSmithKline (Uxbridge, UK).

A partir du produit lyophilisé, on prépare une solution de 100 µM d'Oseltamivir carboxylate et de Zanamivir avec de l'eau ultra-pure. Les solutions reconstituées sont ensuite filtrées, aliquotées et stockées à -20°C.

Préparation du Panel des souches de référence

Le panel des virus de référence fourni par le laboratoire collaborateur de l'OMS pour la grippe est constitué de virus grippaux humain de référence, présentant des profils de sensibilité connus. Ce panel comprend les virus type A (sous type H1N1, H1N1pdm09 et H3N2) et les virus de type B comme indiqué dans le tableau 6.

Dès leur réception au laboratoire, les souches de références sont rapidement stockées à -70°C. Pour chaque type et sous-type de virus, on prépare deux flask de 75cm² de culture de cellules MDCK à 100% de confluence. Dans une hotte à flux laminaire de classe II, chaque flask de cellules MDCK est lavé trois fois avec du PBS incomplet stérile, inoculé par 5ml de la suspension virale (dilué au 1/100 dans du PBS stérile) et incubé à 35°C pendant 30min. Ensuite on ajoute 20ml de MEM (0 % SVF) avec la trypsine TPCK et on réincube à 35°C pendant 3 jours.

L'effet cytopathogène peut être observé au microscope optique et ensuite confirmé par la technique d'hémagglutination. Les 40ml de la suspension virale ainsi obtenu pour les deux flask sont aliquotés comme suit :

- ✚ 20 X 100µl (quantité suffisante pour un test).
- ✚ 8 X 1000µl (pour un stockage à long terme).
- ✚ 15 X 2000µl (pour un stockage à long terme).

4.3. Détermination de l'activité de la neuraminidase

L'activité de la neuraminidase permet de mettre en évidence le niveau de multiplication virale. Pour ce faire, des microplaques à 96 cupules contenant différentes dilutions des suspensions virales à raison de 2 à l'aide du tampon 1X, sont préparées (Figure 28). On y ajoute du substrat (MUNANA), puis les plaques sont incubées à 37°C pendant une heure. Immédiatement après l'addition de la solution stop, la plaque est introduite dans le fluoromètre. L'intensité de la fluorescence est détectée à une longueur d'émission de 460nm pour une longueur d'excitation de 355nm. Les résultats sont enregistrés au niveau d'un tableau Excel avant d'être transférés sur une feuille de calcul développée en interne par le CDC. Cette dernière permet de déterminer la dilution de la suspension virale standard pour la réalisation de la deuxième étape du test de sensibilité aux INAs.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/2	A	Virus 1	Virus 1	Virus 2	Virus 2	Virus 3	Virus 3	Virus 4	Virus 4	Virus 5	Virus 5	Virus 6	Virus 6
1/4	B												
1/8	C												
1/16	D												
1/32	E												
1/64	F												
1/128	G												
Tampon	H												

Figure 28 : Modèle de préparation de la série de dilution de la suspension virale

4.4. Détermination de l'IC50

➤ Préparation des dilutions l'Oseltamivir et le Zanamivir de 1000 nM à 0.01nM

A partir des solutions-mères Oseltamivir et Zanamivir à 100µM, on prépare une série de dilution des deux médicaments allant de 1000nM à 0.01nM comme illustré dans la figure 29.

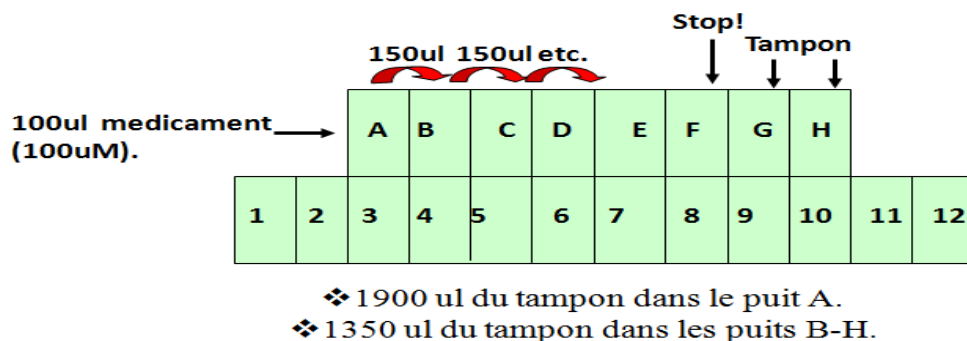


Figure 29: Dilution des médicaments

➤ Dilution des suspensions virales

Dans une hotte de classe II et selon le facteur de dilution obtenu par la fiche de calcul on procède à la dilution des suspensions virales aussi bien celles à tester que celles de référence avec le tampon 1X. Généralement 400µl de chaque suspension virale diluée est suffisante pour tester un médicament.

➤ Détermination de l'IC50

Cette étape permet de tester l'influence directe des inhibiteurs sur l'activité neuraminidasique. La suspension virale diluée est pré-incubée à 37°C pendant 45 min en présence d'une gamme de concentration d'inhibiteurs (1000 nM à 0.01 nM). Le substrat est ensuite ajouté suivi d'une réincubation à 37°C pendant 60min. Ceci permet d'évaluer l'activité neuraminidasique résiduelle par la détection du signal généré à la suite du clivage du substrat (Figure 30).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1000	A	Virus 1	Virus 1	Virus 2	Virus 2	Virus 3	Virus 3	Virus 4	Virus 4	Virus 5	Virus 5	Virus Sauvage	Virus Muté
100	B												
10	C												
1	D												
0.1	E												
0.01	F												
Cn	G												
Tampon	H												

Figure 30 : Plaque de 96 cupules avec les différentes concentrations des INAs (de 1000 nM à 0.01 nM)

4.5. L'analyse des données

Une représentation graphique de l'intensité de la fluorescence émise en fonction de la concentration du médicament permet la détermination de l'IC50, en utilisant le logiciel d'ajustement de courbe JASPR V1.2 (CDC, Atlanta, GA, USA).

La courbe est obtenue selon l'équation $V = V_{max} * (1 - ([I] / (K_i + [I])))$.

V_{max} : la vitesse maximale de génération du métabolite,

I : la concentration de l'inhibiteur,

K_i : constante d'inhibition du complexe enzyme-inhibiteur.

Les valeurs de l'IC50 sont ensuite analysées par comparaison aux souches de référence. L'analyse de la distribution des valeurs de l'IC50 est effectuée pour chaque médicament grâce au logiciel **Statistica 6**, qui détermine la moyenne, paramètre nécessaire pour la comparaison du degré de sensibilité du même sous-type virale pour les deux médicaments.

4.6. Critère d'interprétation des résultats

L'une des principales difficultés de la surveillance de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase est l'interprétation des résultats obtenus. Pour les essais phénotypiques, il s'agit d'interpréter les valeurs des IC50 obtenues.

Actuellement, il n'y a pas de données suffisantes pour décrire les conséquences cliniques des modifications même mineures des valeurs des IC50 et/ou des substitutions d'acides aminés associées. Pour veiller à la cohérence de la notification des données de surveillance de la sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase, l'OMS a fixé un ensemble de critères définissant la sensibilité des virus aux antiviraux sur la base de coefficients de multiplication des valeurs des IC50 par rapport aux valeurs de référence (OMS.,2012)

En ce qui concerne les virus grippaux A, l'OMS recommande d'utiliser les critères suivants :

- ✚ Sensibilité normale :IC50 <10 fois IC50 moyennede la souche de référence sauvage,
- ✚ Sensibilité réduite :IC50 comprise entre 10 et 100 fois IC50 moyennede la souche de référence sauvage,
- ✚ Sensibilité très réduite :IC50 >100 fois IC50 moyennede la souche de référence sauvage.

Pour les virus grippaux type B, voici les recommandations de l'OMS :

- ✚ Sensibilité normale :IC50 <5 fois IC50 moyenne de la souche de référence sauvage,
- ✚ Sensibilité réduite :IC50 comprise entre 5 et 50 fois IC50 moyennede la souche de référence sauvage,
- ✚ Sensibilité très réduite (IC50 >50 fois IC50 moyennede la souche de référence sauvage.

(Okomo-Adhiambo., 2013a; Okomo-Adhiambo.,2013b; OMS., 2012).

Séquençage du segment 6 du génome viral (NA) par méthode de Sanger

Dans le but de garantir l'obtention de séquences de bonne qualité, le gène de la neuraminidase des différents sous-types de virus de la grippe a été séquencé en 5 fragments individuels chevauchant les uns avec les autres (figure 31). Ainsi 5 paires d'amorce permettent un séquençage complet du gène viral. D'autre part ces paires d'amorces sont couplées au niveau de leur extrémité 5' par deux amorces universelles, la M13F et la M13R (Protocole CDC). Une stratégie qui vise à minimiser le nombre de réaction PCR (réaction de séquence) tout en garantissant la qualité du séquençage.

En effet, au niveau de la réaction de séquence, les deux amorces universelles couvraient efficacement l'ensemble des fragments pour tous les produits PCR, réduisant ainsi la nécessité d'un séquençage plus approfondi utilisant des amorces internes supplémentaires (référence Protocole CDC non publié).

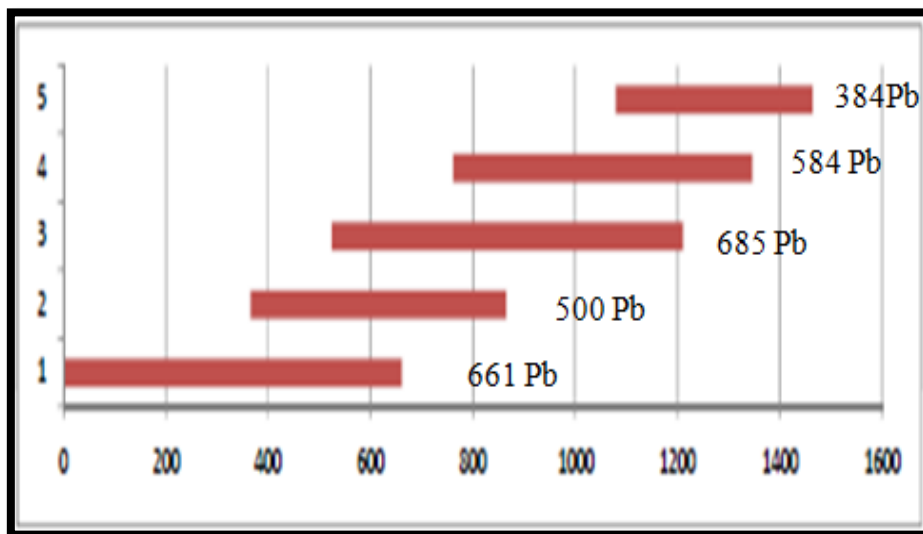


Figure 31: Stratégie d'amplification du segment 6 du génome viral en 5 fragments individuels

5.1. Rétrotranscription et amplification

L'ARN viral a été extrait à partir des isolats obtenus par culture cellulaire. Une rétrotranscription associée à une amplification pour les 5 fragments du gène de l'neuraminidase avec le panel d'amorces du CDC (Tableau7) a été réalisée selon le protocole indiqué par la trousse Bioline.

Tableau 7 : Séquences nucléotidiques des 5 couples d'amorces utilisées dans l'amplification du gène de la neuraminidase du virus pandémique A/H1N1pdm09 (OMS., 2018)

Amorces NA A/H1N1pdm09	Séquence de nucléotides
N1pdmNA_F1	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC AAA AGC AGG AGT
N1pdmNA_R1	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCT GTT ATT ATR CCR TTG TA
N1pdmNA_F2	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGT CAT RAG RGA RCC ATT CA
N1pdmNA_R2	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TAA CAG GAG CAT TCC TCA TA
N1pdmNA_F3	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCA TAC AAC TCA AGA TTT GAG TCA G
N1pdmNA_R3	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CGC TAT ATC CTG ACC ACT CAT T
N1pdmNA_F4	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAT GGR CAR GCC TCR TAC AA
N1pdmNA_R4	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GCT GCT YCC RCT AGT CCA GAT
N1pdmNA_F5	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGC AAT GGT GTT TGG ATA GG
N1pdmNA_R5	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTA TGA CCA GTA GAA ACA AGG AGT TT
M13forward	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Protocole :

Un volume de 5ul d'ARN virale est ajouté à un mélange réactionnel de 45 ul (Tableau 8). L'ensemble est introduit dans un thermocycleur, la matrice est amplifiée selon les conditions suivantes : 45°C pendant 20min pour une rétrotranscription, suivie d'une étape d'activation de la Taq polymérase une minute à 95°C. A la fin de 40 cycles de (dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, hybridation à 60°C pendant 10 secondes et extension à 72°C pendant 30 secondes), le produit PCR peut être détecté.

Tableau 8 : Composition du mélange réactionnel

Composants	Volume pour une réaction (µl)
H2O Ultra pure	14.5
Tampon (2X My Taq one-step Mix)	25
Amorce Forward	2
Amorce reverse	2
Rnase inhibiteur	1
Reverse transcriptase	0.5
Volume total	45

5.2. Révélation des produits de PCR sur gel

Les produits de la première PCR sont déposés dans un gel d'agarose à 1% préparé dans une solution de TBE (Tris – Borate- EDTA) additionnée de bromure d'éthidium (BET). Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques et présente la propriété de donner une fluorescence en rouge orange lorsqu'il est excité par la lumière ultraviolet (UV). C'est ainsi que les produits après migration sont visualisés sur plaque à UV, leurs tailles sont déterminées en comparaison avec un marqueur de poids moléculaire.

5.3. Purification des produits de PCR : EXOSAP-IT

L'Exo SAP permet de purifier les produits de PCR en éliminant les amorces et les dNTPs en excès. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100 paires de base sont ainsi dégradés. Pour 5ul du produit PCR 4ul de l'EXOSAP-IT sont ajoutés. L'ensemble est introduit dans un thermocycleur et incubé selon le protocole suivant : 15min à 37°C, 15min à 80°C et 4°C à ∞. Le produit de purification peut être conservé au congélateur -20°C pour effectuer la réaction de séquence ultérieurement.

5.4. Réaction de séquence

Le séquençage consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un gène ou d'un fragment de gène. La méthode de séquençage actuellement employée est la méthode enzymatique de Sanger ou méthode des interrupteurs de chaînes. Elle consiste à synthétiser l'ADN complémentaire de chaque brin par extension de l'amorce tout en incorporant au hasard des didésoxynucléotides (ddNTPs). Dès qu'un ddNTP est incorporé, la synthèse d'ADN s'arrête puisqu'il ne possède pas de groupement hydroxyle en position 3' nécessaire pour former la liaison phosphodiester reliant les ddNTPs entre eux. Les ddNTPs étant en très faible concentration ne s'incorporent que rarement et au hasard. Statistiquement, des fragments d'ADN de toutes les tailles sont formés, contenant à leur extrémité 3' terminale les ddNTPs d'arrêt. La trousse Big Dye Terminator utilise le principe des terminateurs de chaîne ; il s'agit de ddNTPs marqués avec quatre fluorochromes de couleurs différentes (Beate *et al.*,2020)

Les produits PCR purifiés ont été séquencés avec l'utilisation du kit Big Dye Terminator (version 3.1) et des amorces universelles M13 (protocole CDC **non publié**). Chaque produit de PCR devra être séquencé dans deux réactions (séquençage bidirectionnel).

Un mélange réactionnel de 10 ul contenant : 2ul tampon Big Dye Terminator (version3.1),2 ul de la polymérase, 3µl de l'eau ultra pure,1ul des amorces (M13 Forward ou reverse) en plus de 2 µl de l'ADN purifiée est introduit dans un thermocycleur. L'ADN matrice est amplifiée après activation de la polymérase 5 minutes à 95°C, suivie de 30 cycles de (15 secondes dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 45°C et 30 secondes d'élongation à 68°C) et une extension finale 3 minutes à 60°C. Les réactions de séquençage sont réalisées dans des plaques de 96 puits.

5.5. Purification des produits de séquences

Les derniers produits de PCR ont été purifiés en utilisant kit (Big Dye X Terminator purification version 1.1). Le kit permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les nucléotides non incorporés et les amorces en excès en plus des sels et des autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la migration capillaire. A chaque puit de la réaction séquence un volume de 10 ul d'un mélange (45ul de la solution SAM et 10ul de la solution BDX) est ajouté. On vortex par la suite pendant 30 minutes. Une centrifugation à 1600g pendant 2 minutes permet de faire précipiter les débris de la réaction de séquence. Le produit d'amplification purifié se trouve dans la phase aqueuse. Une vérification de la présence de deux phases culot et surnageant au niveau de la plaque de séquence avant son introduction dans l'analyseur est recommandée.

5.6. Détection automatisée des séquences

Les produits préalablement purifiés sont chargés au niveau de l'analyseur ABI 3130XL. Le séquençage implique la création d'un flux électrique du sens négatif vers le sens positif à travers le polymère capillaire (migration en capillaire avec du polymère POP7). Les fragments d'ADN les plus petits migrent plus vite que les fragments plus longs. Comme chaque fragment est excité par le laser à ions argon, la fluorescence est détectée par une caméra CCD et convertie en séquence par le logiciel d'analyse de séquençage d'ADN (Sequencing Analysis)

III. Analyse phylogénétique des séquences

Les séquences sont assemblées, éditées, et alignées à l'aide du programme Sequencher 4.10 (Gene Codes Corporation, MI, USA). La construction des arbres phylogénétiques est réalisée en utilisant le programme MEGA (version 6.0) avec la méthode du plus proche voisin, dite de « neighbour-joining » (NJ) et en utilisant le test de robustesse de l'arbre (« boot strap ») de 1000 (Tamura *et al.*, 2007). Le test de robustesse de l'arbre (« boot strap ») de 1000 permet de déterminer le degré de fiabilité des branchements dans les arbres. Lorsque ce nombre est supérieur à 70%, le noeud est fortement prédit, lorsqu'il est compris entre 50 et 70%, il est douteux, et lorsqu'il est inférieur à 50%, cela signifie que la branche concernée est très faiblement prédite, donc non significative. Dans chaque cas, les isolats sont comparés à des souches de référence et ceci pour établir le degré de proximité génétique.

IV. Estimation du taux d'évolution du gène de la NA

Les taux globaux de changement évolutif (substitutions / site / an) et la diversité génétique relative des gènes de NA ont été déterminés à l'aide de la méthode Bayésienne Chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) mise en œuvre dans le logiciel BEAST (Bayésien Evolutionary Analysis Sampling Trees) version 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012). Un "bayésien skyline plot" a été généré pour le gène de la NA des différents sous-types grippaux collectés durant les saisons grippales de 2009/2010 à 2017/2018, afin d'analyser l'évolution génétique des séquences au fil du temps.

V. Détermination des sites de glycosylation

A l'aide du logiciel (Glycosylation site calculator) on a pu établir la dynamique de migration des sites de glycosylation au niveau de la protéine de la NA des différents sous-types de virus grippaux circulant au Maroc durant les dix dernières saisons grippales.



*Chapitre III : Résultats et
discussion*



I. Bilan virologique

Pendant les quatre saisons qu'a durées cette étude (saison 2014/2015, 2015/2016, 2016/2017 et 2017/2018), respectivement 440,1189,1593 et 1666 prélèvements ont été collectés dans le cadre de la surveillance virologique de la grippe au Maroc, chez des patients présentant un syndrome grippal ou une infection respiratoire aigüe. Le suivie hebdomadaire des épisodes grippaux durant la période de l'étude, a permis de mettre en évidence une certaine régularité dans la survenue de la saison grippale, mais avec une ampleur variable. Un début entre la 46^{ème} et 49^{ème} semaine et un pic entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine de chaque l'année (figure32).

D'autre part, une prédominance d'un sous-type particulier durant certaines épidémies de grippe, a été observée. C'est le cas pour le type B au cours de la saison 2014/2015, le sous-type A(H1N1) pdm09 au cours de la saison 2016/2017 et le sous-type A(H3N2) au cours de la saison 2016/2017. Alors que la saison 2017/2018 a été caractérisée par une circulation concomitante des trois sous-types viraux. (Figure33)

Parmi les 4888 prélèvements globalement collectés, 1126 ont été confirmés biologiquement positif. Parmi lesquels 201 au cours de la saison 2014/2015, 274 au cours de la saison 2015/2016, 255 au cours de la saison 2016/2017 et 396 au cours de la saison 2017/2018 reflétant un taux de positivité respectif de 46%,23%,16%, et 24% (figure34).

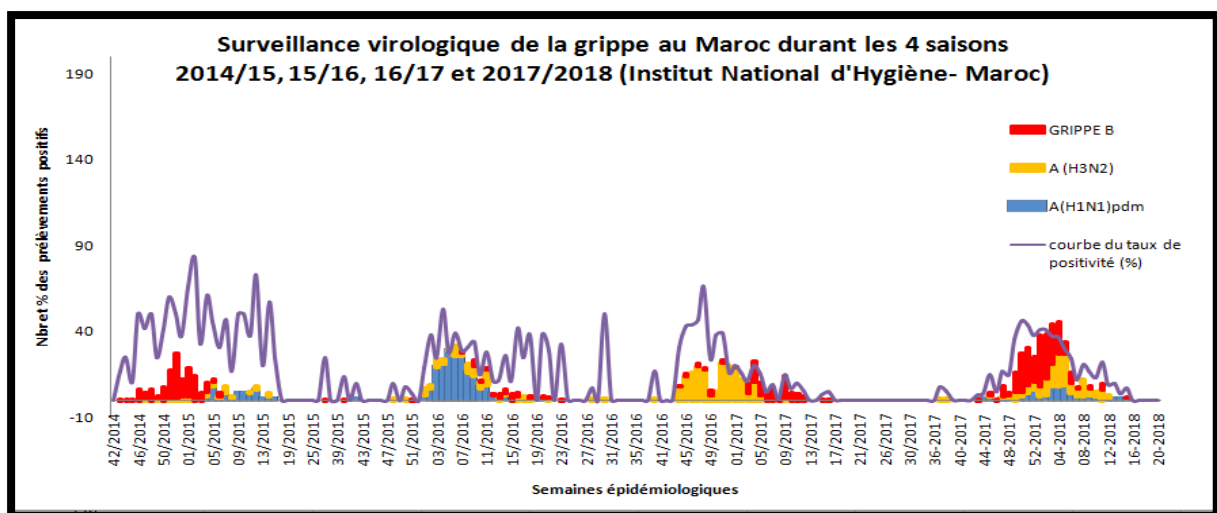


Figure 32: Saisonnalité des types et sous-types du virus de la grippe A et B au Maroc de quatre saisons grippales 2014/15,2015/16,2016/17et 2017/2018

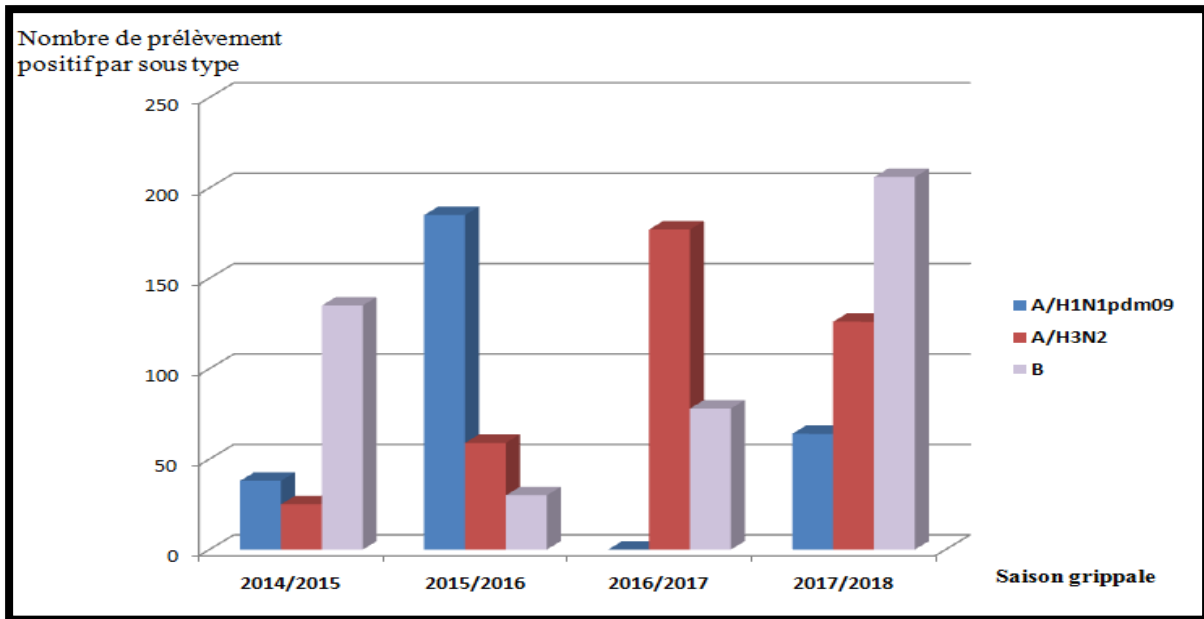


Figure 33: Répartition des différents sous-types grippaux pour chaque saison grippale

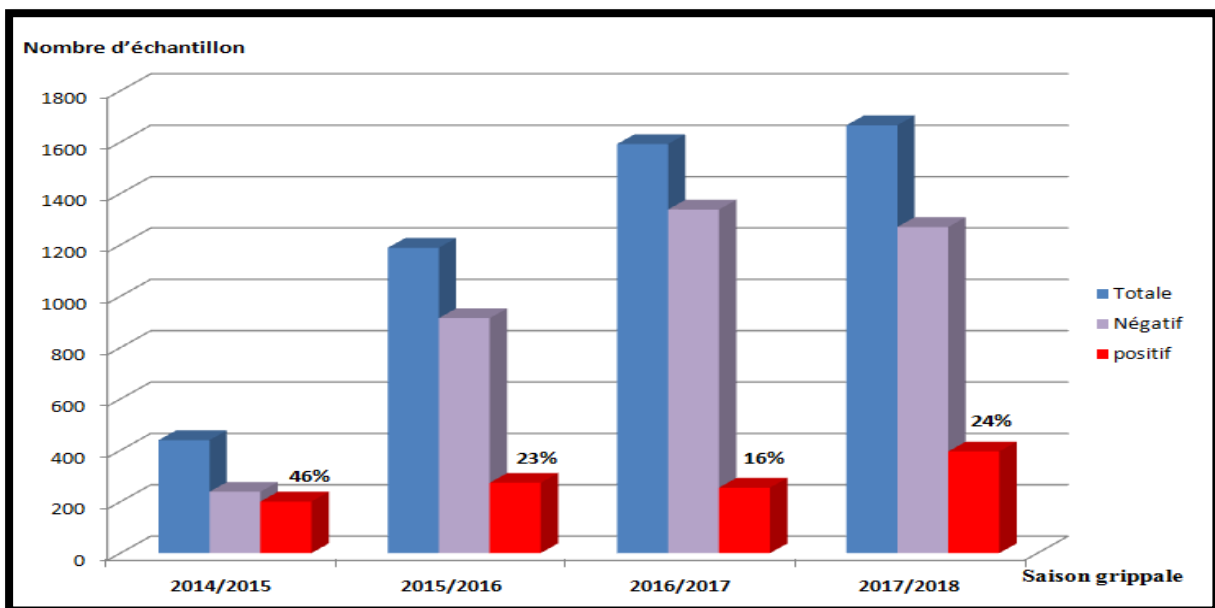


Figure 34: Taux de positivité grippale relative à chaque saison

II. Isolement virale

Tous les prélèvements positifs ont été cultivés sur cellules MDCK dans le but d'augmenter leur titre viral (paramètre primordial pour l'évaluation de leur sensibilité aux deux antiviraux). Après culture, uniquement les isolats ayant un titre viral supérieur ou égal à 1/16 ont été retenus pour la suite de l'étude. Parmi les 1126 échantillons positifs détectés au cours de ces quatre saisons, 319 isolats ont donné un titre satisfaisant. Parmi eux, 117(36.7%) sont de sous-type A/H1N1pdm09, 102(32%) de sous-type A/H3N2 et 100(31.3%) de type B (figure35). Les résultats obtenus reflètent un rendement en culture cellulaire de 32%,38%, 35% et 15% respectivement pour les saisons 2014/2015,2015/2016, 2016/2017 et 2017/2018 (figure36).

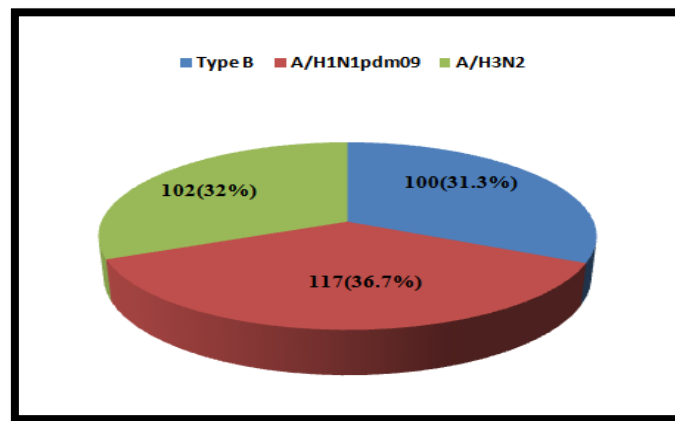


Figure 35: Rendement en culture cellulaire relatif à chaque sous-type de virus grippale

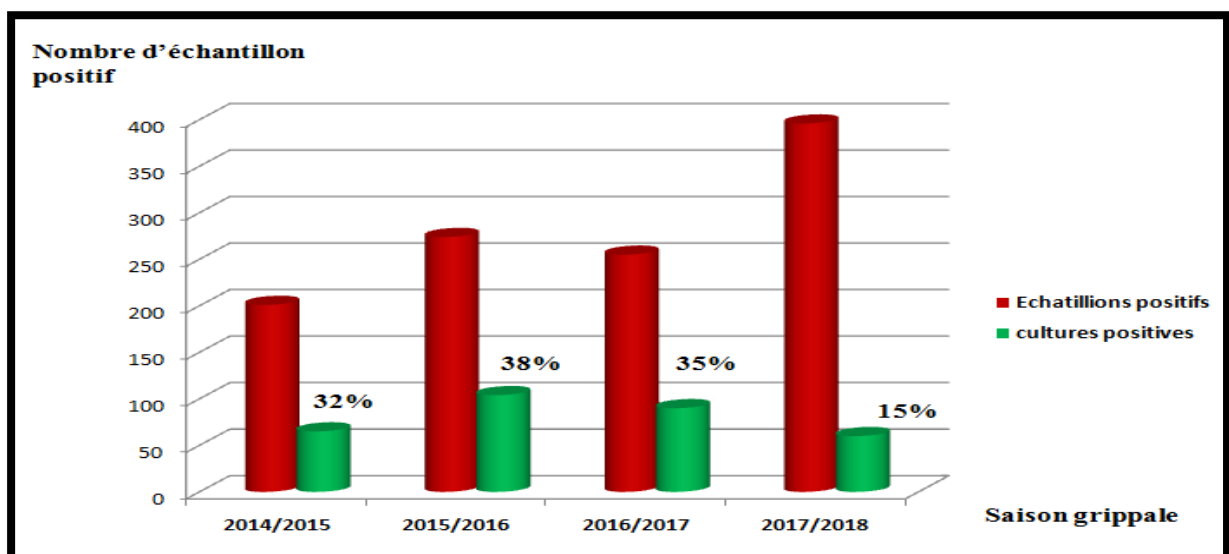


Figure 36: Rendement en culture cellulaire relatif à chaque saison grippale

III. Evaluation de la sensibilité des virus grippaux aux INAs (Oseltamivir et Zanamivir).

1. Pour les virus type B

1.1. Evaluation phénotypique par test fluorométrique

Cent isolats appartenant au sous type B, ont fait l'objet d'une évaluation de leur sensibilité aux deux antiviraux grippaux (Oseltamivir et le Zanamivir) par un test fluorométrique permettant ainsi un calcul de l'IC50 (la concentration d'antivirale capable d'inhiber 50% de l'activité neuraminidase). Comme indiqué précédemment, le profil "sensibilité ou résistance" est déterminé à la base des coefficients de multiplication des valeurs des IC50 moyenne des souches testées par rapport à l'IC50 moyenne spécifique à la souche de référence B/Perth/211/2009. Le résultat de l'analyse phénotypique comme indiqué dans le tableau 8 a révélé que parmi les 100 isolats testés 98 ont présentés une IC50 moyenne par rapport à l'IC50 moyenne B/Perth/211/2009(souche référence type B) inférieur à 5. Donc ils ont une sensibilité normale vis à vis des deux médicaments. Alors que deux souches, **B/Morocco/176H/2014** et **B/Morocco/CP10/2015** ont présentées une IC50 Oseltamivir d'un multiple respectif de **6** et **8** par rapport à l'IC50 moyenne de la souche de référence. Elles sont considérées comme ayant une sensibilité réduite vis-à-vis de l'Oseltamivir, alors que leur sensibilité au Zanamivir est normale. Un profil qui doit être confirmé par une analyse génotypique. D'autre part, Dans le but d'évaluer le degré de sensibilité des isolats grippaux types B à chaque médicament, l'IC50 moyenne globale relative à chaque molécule a été calculée. L'IC50 moyenne du Zanamivir globale est de **2.47µM** alors que celle de l'Oseltamivir est de **35.29µM**, ce qui traduit une sensibilité plus accrue (**14 fois**) pour le Zanamivir par rapport à l'Oseltamivir.

Cette grande différence de comportement pourrait s'expliquer par la structure conformationnelle caractéristique de chaque médicament. En effet, l'Oseltamivir renferme un groupement amine et une chaîne latérale hydrophobe alors que le Zanamivir possède un groupement guanine et une chaîne glycérol. Il a été démontré que la fixation de l'Oseltamivir nécessite des réarrangements au sein de la neuraminidase (la rotation et la liaison du résidu E276 au résidu R224 est nécessaire) qui pourrait conduire à une réduction de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du médicament. Le Zanamivir a une haute homologie à l'acide sialique, substrat naturel de la neuraminidase, par conséquent, cette modification conformationnelle

n'est pas nécessaire d'où l'affinité enzymatique observée pour ce médicament (McKimm-Breschkin *et al.*,2012). L'Oseltamivir a été signalé comme ayant une efficacité clinique moindre dans la prise en charge des enfants infectés par la grippe B par rapport à la grippe A (Sugaya *et al.*,2007 ; Burhman *et al.*,2013)

Lors de cette étude, une grande variabilité des valeurs des IC50 pour l'Oseltamivir a été constatée pour les 98 échantillons. En revanche, pour le Zanamivir, les IC50 présentent des valeurs rapprochées (Tableau 9). La variabilité des IC50 Oseltamivir constatée chez les virus grippaux de type B serait probablement associée aux propriétés antigéniques et génétiques des deux lignées, à savoir la lignée Victoria et la lignée Yamagata (Okomo-Adhiamo *et al.*, 2013a). Cette constatation nous a incité à effectuer des analyses génétiques et antigéniques supplémentaires. Sur les 98 virus grippaux B testés pour l'Oseltamivir, 20(20,41%) appartenaient à la lignée Victoria, tandis que 78(79.59%) étaient de la lignée Yamagata. L'analyse statistique complémentaire des données de l'IC50 pour les 2 sous-types du virus de la grippe B, a révélé que les virus de la lignée Victoria étaient deux fois moins susceptibles à l'Oseltamivir que les virus de la lignée Yamagata (Figure 37).

Tableau 8 : Valeurs des IC50 moyenne du type B (Yamagata et Victoria) des deux INAs

	Années d'isolement	Origine	IC50 (nM) Type B			
			Nombre (100)	Médiane [range]	Moyenne ± SD	phénotype
Oseltamivir	2014/2015	SG	28	33,94 [11,60 - 46,44]	31,98 ± 9,57	S N
		IRAS	30	32,26 [12,04 - 380,20]	31,52 ± 11,17	S N
			2	225,40 [200,60 - 250,20]	225,44±35,07	SR (6-8)
	2016/2017	SG	20	55,30 [43,20–60,04]	50,61 ± 11,86	S N
	2017/2018	SG	20	26,33 [19,51 - 37,03]	27,08 ± 5,41	S N
Zanamivir	2014/2015	SG	28	3,45 [0,67 - 7,51]	3,37 ± 1,79	SN
		IRAS	32	3,60 [0,56 - 8,61]	3,74 ± 2,11	SN
	2016/2017	SG	20	1,35 [0,79 - 2,65]	1,47 ± 0,53	SN
	2017/2018	SG	20	1,20 [0,85 - 2,41]	1,31 ± 0,44	SN

SN : sensibilité normale SR : sensibilité réduite

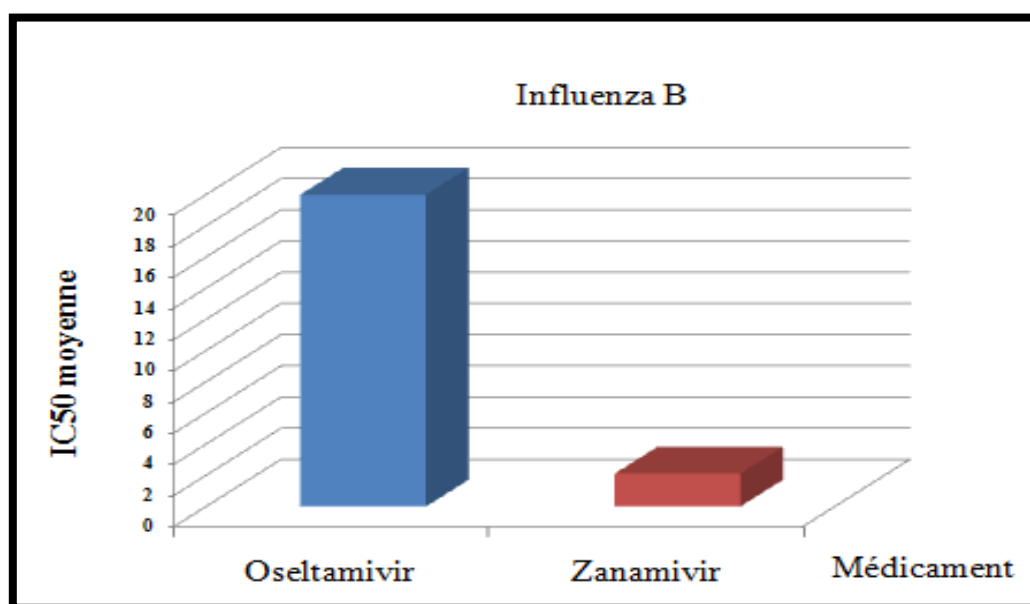


Figure 37: Comparaison de la sensibilité du virus de type B aux deux médicaments

1.2. L'évaluation génotypique par séquençage du gène de la NA

Comme il a été décrit dans le protocole de l'étude, les souches ayant présentées un profil de sensibilité anormale, la **B/Morocco/176H/2014** et la **B/Morocco/CP10/2015** en l'occurrence, ont fait l'objet d'une analyse génotypique dans le but de rechercher d'éventuelles mutations reconnues par l'AVWG comme conférant une résistance aux INAs de la neuraminidase.

Parallèlement, un échantillon représentatif de 30 souches de type B, ayant un profil de sensibilité normale a été également génotypé, dans le but d'évaluer l'effet cumulatif de la dérive génétique du segment 6 du génome viral durant les quatre saisons.

Les 32 isolats marocains analysés B/Yamagata et B/Victoria par comparaison aux souches de référence respectives B/Florida/4/2006 et B/Malaysia/30552/2004, n'ont montré aucun acide aminé de substitution associé à une réduction de la sensibilité aux deux inhibiteurs de la neuraminidase. En ce qui concerne l'isolat **B/Morocco/CP10/2015** une mutation à la position **K371N** a été identifiée mais n'a jamais été décrite auparavant comme étant un marqueur de résistance. Elle est localisée à 3 acides aminés du site actif. Ceci peut être à l'origine de la modification de la sensibilité observée pour l'Oseltamivir au niveau du test phénotypique. Une confirmation par génétique inversée a été recommandée par le comité de surveillance de la sensibilité aux antiviraux grippaux de la région EMRO (Elfalaki *et al.*, 2016). Concernant l'isolat **B/Morocco/176H/2014**, étant donné la faible différence de son IC50 par rapport à la valeur seuil et de l'absence de tous marqueurs de résistance, cet isolat est considéré comme sensible (Okomo Adhiambo *et al.*, 2013a). Par contre, un certain nombre de substitutions a été décelé aussi bien dans le cas de la lignée Yamagata (16 substitutions) que dans celui de la lignée victoria (15 substitutions) (figures 38 et 39). Aucune de ces mutations n'a été décrite auparavant comme affectant les fonctions biologiques du virus, elles sont surtout liées à la diversification génétique spécifique à de chaque lignée (Chen *et al.*, 2016).

Le résultat obtenu traduit une prévalence de 1% des formes résistantes relatives à l'Oseltamivir, ce qui est en phase avec les tendances observées à l'échelle mondiale. En effet, les études de surveillance antivirale menées au cours des différentes saisons et dans différentes zones géographiques à travers le monde ont montré une remarquable activité in vitro des INAs contre les virus de la grippe B et ont indiqué une faible fréquence de circulation des variant pharmaco-résistants (Li *et al.*, 2015 ; Okomo-Adhiambo *et al.*, 2015).

Guebariva et ces collaborateurs, dans leur dernière mise à jour en terme de prévalence des formes résistantes à l'échelle mondiale, ont estimé une prévalence de 0.5% des formes résistantes à l'Oseltamivir parmi les souches qui ont circulées durant la saison 2015-2016 (Guebariva *et al.*, 2017).



Figure 38: Variation dans la séquence en acides aminés de la neuraminidase des isolats cliniques appartenant à la lignée Yamagata par rapport à la souche de référence B/Florida/4/2006

2. Pour les virus sous-type A(H1N1) pdm09

2.1. Evaluation phénotypique par test fluorométrique

Le Protocole d'évaluation de la sensibilité aux INAs du virus de l'influenza A est similaire à celui utilisé pour l'influenza B et comprend l'approche phénotypique complétée par l'analyse génotypique (Potier *et al.*, 1979). Un total de 116 isolats A(H1N1) pdm09 a été sélectionné durant la présente étude et soumis à l'évaluation phénotypique. 71/116 ont été prélevés chez des patients présentant un Syndrome Grippalet 46/117 chez des patients ayant développés une infection respiratoire aigue sévère.

Par comparaison à l'IC50 moyenne d'A/Perth/265/2009 (souche de référence sous-type A/H1N1pdm09), et comme indiqué dans le tableau 10, la totalité des souches testées a présenté un coefficient de multiplication inférieur à 10 aussi bien pour l'Oseltamivir que pour le Zanamivir. Ce qui traduit un profil de sensibilité normale pour les deux médicaments. La figure 40 représente les IC50 moyennes Oseltamivir et Zanamivir globale relative aux souches sensibles isolées durant la période de l'étude. Une comparaison de ces valeurs moyenne relative au sous-type A(H1N1) pdm09, reflète une sensibilité 3 fois plus réduite pour l'Oseltamivir (IC50 1.24 μ M) que pour le Zanamivir (IC50 0.54 μ M). Il a été rapporté, que le virus pandémique présente une sensibilité similaire pour ces deux médicaments (Okomo-Adhiambo *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus à travers cette évaluation phénotypique sont en faveur de la probabilité d'une modification à l'échelle moléculaire du gène de la neuraminidase du virus pandémique. En termes de prévalence des formes résistantes, les résultats obtenus s'alignent avec les derniers rapports publiés par le groupe de surveillance de la sensibilité aux antiviraux grippaux de l'OMS. Le taux d'incidence relativement faible des formes résistantes aux INAs suggère que ces mutations pourraient avoir un impact négatif sur la capacité répliquative du virus entraînant une diminution du taux de transmission directe chez l'Homme (Bloom *et al.*, 2010 ; Baek *et al.*, 2015). Une étude expérimentale travaillant sur des modèles animaux a permis d'établir une corrélation entre la diminution de la capacité répliquative et une transmission réduite, dans le cas des virus A(H1N1)pdm09 porteur de la mutation **H274Y** (Herlocher *et al.*, 2002 ; Ives *et al.*, 2002 ; Eshaghi *et al.*, 2014).

Tableau 9 : Valeurs des IC50 moyenne des souches A/H1N1pdm 09 relatives aux deux INAs

	Années d'isolement	Origine	IC50(nM) Type A(H1N1) pdm09			
			Nombre(117)	Médiane [range]	Moyenne ± SD	phénotype
Oseltamivir	2015/2016	SG	56	1,29 [0,12 - 1,96]	1,31 ± 0,27	SN
		IRAS	40	1,43 [1,10 - 1,70]	1,45 ± 0,16	SN
	2017/2018	SG	15	1,07 [0,82 - 1,37]	1,18 ± 0,54	SN
		IRAS	6	1,03 [0,84 - 1,30]	1.12 ± 0,26	SN
Zanamivir	2015/2016	SG	56	0,51 [0,15 - 1,59]	0,54 ± 0,27	SN
		IRAS	40	0,53 [0,12 - 0,91]	0,50 ± 0,17	SN
	2017/2018	SG	15	0,63 [0,36 - 0,85]	0,63 ± 0,14	SN
		IRAS	6	0,60 [0,38 - 0,76]	0.61 ± 0,14	SN

SN : sensibilité normale

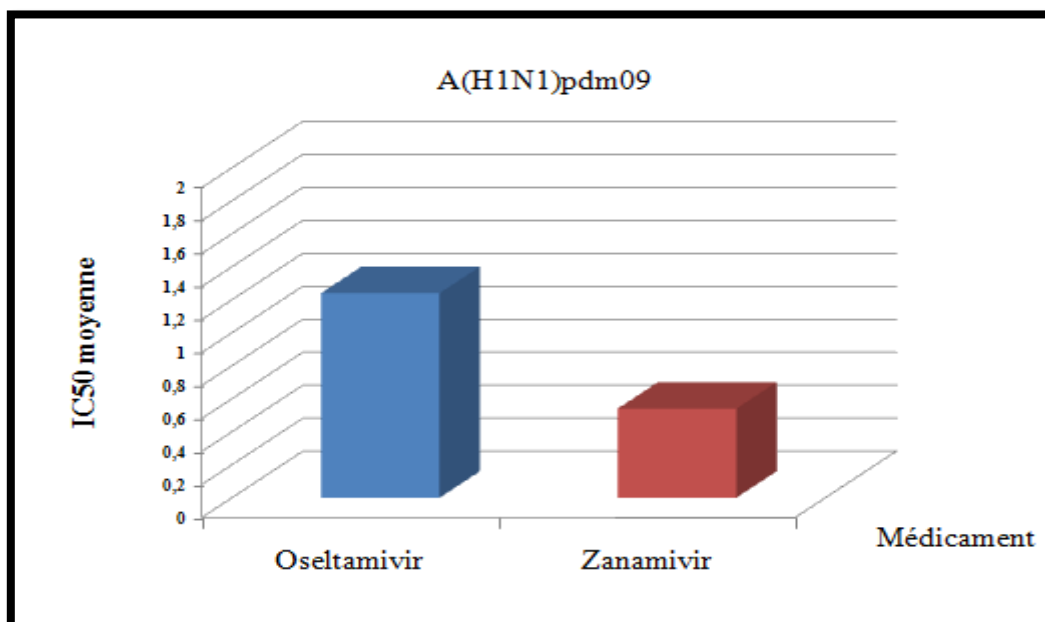


Figure 40: Comparaison de la sensibilité du virus, sous-type A/H1N1pdm09 aux deux médicaments

2.2. L'évaluation géotypique par séquençage du gène de la NA

Bien que l'analyse phénotypique des 117 isolats A(H1N1) pdm09 testés a permis de confirmer un profil de sensibilité normal vis-à-vis des deux INAs, la NA d'une sélection de 23 isolats couvrant les quatre années de l'étude a été séquencée et par la suite analysée, dans le but d'essayer de trouver une explication à la diminution de la sensibilité observée pour l'Oseltamivir. Un alignement des protéines de la NA par rapport à la souche de référence **A/California/07/09**, comme indiqué au niveau de la figure 41, a permis d'affirmer que :

- Les sites catalytiques représentés par les résidus R118, E119, D151, R152, W179, I223, R225, E277, R293, R368 et Y402 ainsi que les résidus structuraux R156, S180, E228, S247, E278 et N295 étaient hautement conservés dans tous les isolats A(H1N1)pdm09 marocains soumis à l'analyse.

- Les 23 isolats marocains traités présentent des substitutions caractéristiques dont :

✚ Quatre sont localisées à proximité du site catalytique, c'est le cas pour la substitution V241I, la N369K, la N386K et la K432E (**23/23**).

✚ Deux sont plutôt proches des acides aminés structuraux, ce sont les substitutions N248D (**23/23**) et N270K (**21/23**).

Les substitutions V241I, la N369K, la N386K et la K432E, favorisent la stabilité de la protéine neuraminidase, ce qui induit probablement une diminution de l'affinité à l'Oseltamivir et par conséquent une forte dissémination virale chez l'hôte (Fry *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2020). La présence des deux mutations la V241I et la N369K dites permissives dans tous les virus A(H1N1) pdm09 suggère qu'ils sont plus favorables à l'acquisition de la **H275Y** et augmentent donc le risque de propagation à l'échelle nationale des souches résistantes à l'Oseltamivir, comme elles leur permettent de rétablir leur capacité répliquative (Abed *et al.*, 2013). Il est important de noter que les mutations N386K et K432E ont été rapportées comme affectant de manière significative l'affinité de liaison de l'Oseltamivir à la neuraminidase. Suite à ces deux mutations, la poche de liaison de NA devenait plus étroite de sorte que les angles de liaison changeaient d'environ 35,1 degrés, ce qui conduisait à une diminution de la liaison de l'oseltamivir à NA. Rendant ainsi la neuraminidase moins susceptible (Butler *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2017).

Bien qu'elles ne sont pas identifiées comme marqueurs de résistance, on leur attribue une augmentation d'environ (2.67fois) la valeur de l'IC50 Oseltamivir (Liu *et al.*, 2017).

De plus, toutes les souches examinées lors de cette étude portaient la substitution N248D. Il a été suggéré qu'une mutation au niveau du résidu 248 modifie la partie centrale d'un site de reconnaissance d'anticorps sur NA et par conséquent favorise l'échappement du virus au système immunitaire (Richard *et al.*, 2008).

L'analyse génotypique nous a permis de mettre en exergue les modifications génétiques qui sont probablement à l'origine de la diminution de l'affinité pour l'Oseltamivir observée lors de l'analyse phénotypique.

A la lumière de ces résultats, on peut estimer que la dynamique active de dérive génétique qui se traduit par l'accumulation de substitutions sporadiques d'acides aminés au niveau du segment 6 du génome viral, confirme l'instabilité génétique des virus A (H1N1) pdm09. le nouveau virus pandémique pourrait ne pas encore être complètement adapté à la population humaine, ce qui signifie que de nouveaux changements conduiront à l'émergence de souches plus virulentes (Mukherjee *et al.*, 2016).

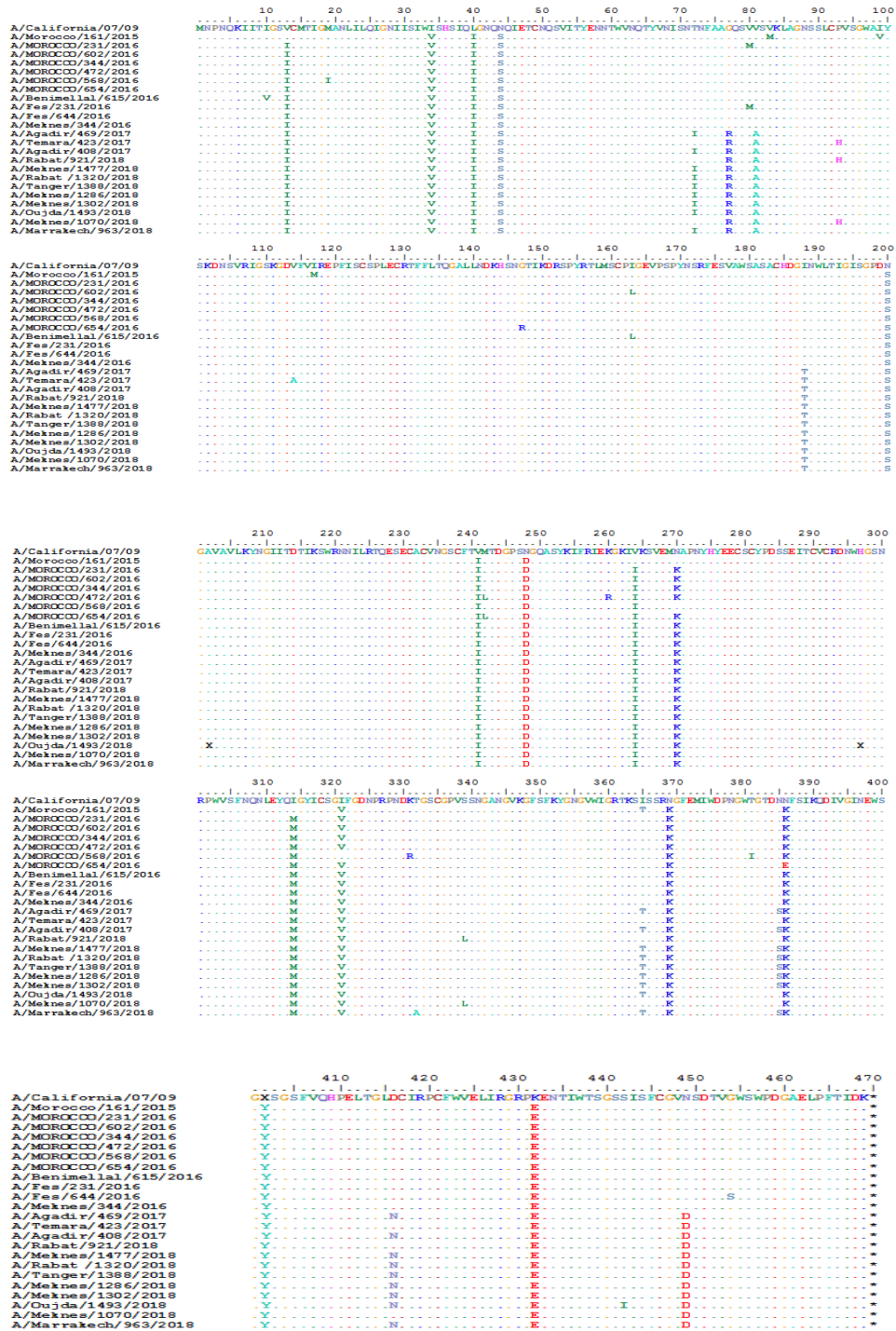


Figure 41: Variation dans la séquence en acides aminés de la neuraminidase des isolats cliniques appartenant au sous-type A(H1N1) pdm09 par rapport à la souche de référence A/California/07/09

3. Pour les virus sous-type A(H3N2)

3.1. Evaluation phénotypique par test fluorométrique

Parmi les prélèvements positifs A(H3N2) collectés durant les quatre saisons et cultivés sur cellules MDCK, 102 ont présentés un titre d'Hémagglutination supérieur à 1/16 et par conséquent ont été soumis à une évaluation phénotypique de leur sensibilité aux deux INAs. Comme indiqué dans le tableau 11, l'IC50 moyenne de la totalité des souches testées présente un coefficient de multiplication (1) par rapport à la IC50 moyenne de A/Ficui/20/2004 (souche de référence sous-type A(H3N2)). Un rapport qui traduit une sensibilité normale de la totalité des isolats testés aussi bien pour l'Oseltamivir que pour le Zanamivir.

La comparaison des IC50 moyennes Oseltamivir et Zanamivir relative aux souches sensibles isolées durant les quatre saisons, a permis de montrer que les virus A(H3N2) présentent une sensibilité similaire aussi bien pour l'Oseltamivir (IC50 moyenne 0.45) que pour le Zanamivir (IC50 moyenne 0.55) (figure42).

Tableau 10 : Valeurs des IC50 moyenne des isolats A(H3N2) relatifs aux deux INAs

	Années d'isolement	Origine	IC50(nM) Type A(H3N2)			
			Nombre(102)	Médiane [range]	Moyenne ± SD	Rapport
Oseltamivir	2014/2015	SG	4	0,41 [0,29 - 0,55]	0,41 ± 0,10	SN
	2015/2016	SG	8	0,33 [0,25 - 0,77]	0,38 ± 0,17	SN
	2016/2017	SG	60	0,47 [0,19 - 1,00]	0,50 ± 0,20	SN
		IRAS	10	0,46 [0,18 - 0,73]	0,49 ± 0,18	SN
	2017/2018	SG	15	0,47 [0,30 - 0,78]	0,49 ± 0,12	SN
		IRAS	5	0,43 [0,24 - 0,70]	0,43 ± 0,10	SN
	Zanamivir	2014/2015	SG	4	0,47 [0,41 - 1,02]	0,59 ± 0,28
2015/2016		SG	8	0,39 [0,30 - 0,65]	0,41 ± 0,10	SN
2016/2017		SG	60	0,62 [0,30 - 1,59]	0,64 ± 0,21	SN
		IRAS	10	0,65 [0,30 - 0,89]	0,65 ± 0,18	SN
2017/2018		SG	15	0,59 [0,45 - 0,89]	0,61 ± 0,12	SN
		IRAS	5	0,43 [0,38 - 0,84]	0,55 ± 0,11	SN

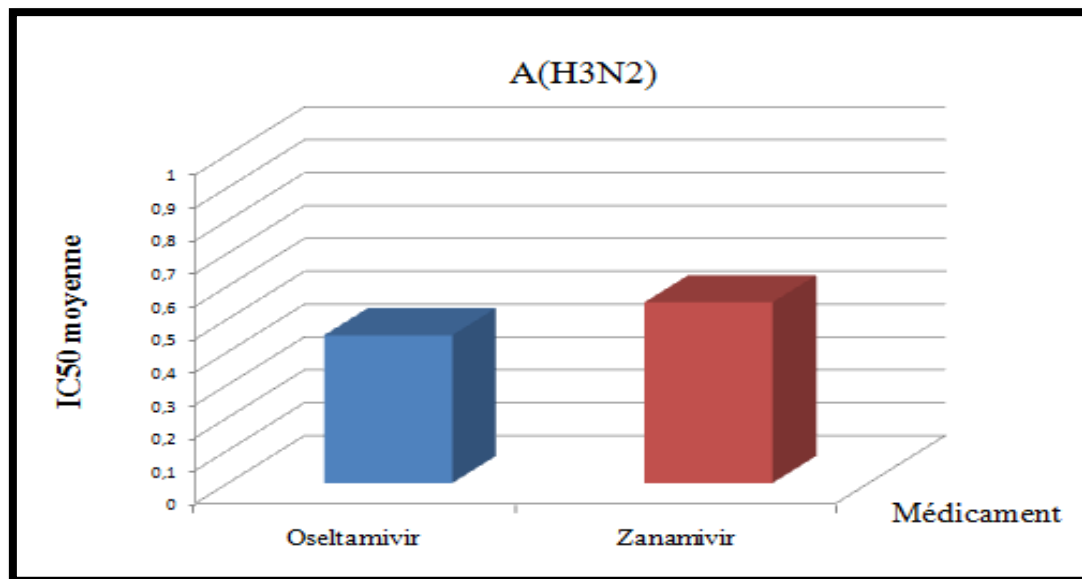


Figure 42: Comparaison de la sensibilité du virus sous-type A/H3N2 aux deux médicaments

3.2. L'évaluation génotypique par séquençage du gène de la NA

Dans le cas des souches A (H3N2), le gène de la NA de 36 isolats a été séquencé et soumis à l'analyse. D'après les résultats obtenus, suite à un alignement par rapport à la souche de référence **A/Brisbane/10/2007**, le gène NA était moins variable que le A (H1N1) pdm09 avec un total de 18 mutations détectées. Les sites catalytiques ainsi que les résidus qui les supportent au niveau de la protéine de la NA sont hautement conservés et sont généralement stables dans le temps. Cependant, sept substitutions ont été identifiées près du site actif, à savoir les mutations I176M, E221D, S245N, S247T, S367N, K369T et N402D. À l'exception I176M, ces substitutions ont été acquises par la majorité des virus A(H3N2) (75%) en 2016. Il est important de noter qu'aucune des souches analysées ne présente un marqueur de résistance à l'Oseltamivir c'est-à-dire le H274Y, E119I ou R292K.

L'effet marquant c'est la double mutation 245/247 qui a été rapportée comme déstabilisant la liaison à l'oseltamivir.

A l'échelle mondiale la prévalence des formes résistantes A(H3N2) est généralement faible. Il a été estimé que 99% des souches A (H3N2) circulantes durant la saison grippale 2016-2017 sont sensibles à l'Oseltamivir (Gubareva.,2017). Selon la dernière mise à jour effectuée par les centres collaborateurs OMS, chargés de la surveillance de la sensibilité des virus grippaux aux INAs les plus couramment utilisés, la fréquence des virus présentant une sensibilité réduite demeure globalement faible 32/13672 (0,2%) par comparaison aux saisons précédentes: 2012/2013(0,6%) ; 2013/2014(1,9%) ; 2014/2015(0,5%) ;2015/2016 (0,8%) (Lackenby., 2018).

Comme tous les virus à ARN négatifs, l'influenza a potentiellement une forte capacité à muter pendant la réplication. A la lumière des résultats obtenus relatifs à l'analyse phénotypique complétée par l'analyse génotypique pour les isolats cliniques obtenus durant la période de la présente étude :

- On peut considérer l'évaluation phénotypique comme preuve irréfutable sur l'efficacité in vitro des INAs plus particulièrement l'Oseltamivir et le Zanamivir dans l'inactivation des virus grippaux circulants au Maroc.
- La décision prise par le ministère de la Santé d'utiliser les INAs, en particulier l'Oseltamivir, comme approche préventive et curative dans la prise en charge des personnes à risque de développer des complications suite à une infection grippale.
- Dans le cas d'une infection à l'influenza B, il est plus judicieux d'orienter les schémas thérapeutiques vers l'utilisation du Zanamivir plutôt que l'Oseltamivir.
- A travers l'analyse génotypique on a pu exclure la présence de toutes mutations associées à la résistance aux deux INAs. Cependant, l'accumulation de substitutions sporadiques d'acides aminés au niveau du segment 6 du génome viral, reflète une dynamique évolutive progressive en faveur d'une adaptation à l'organisme humain, par conséquent une résistance aux traitements antiviraux.

IV. Dynamique d'évolution du gène de la neuraminidase des virus de la grippe au cours des dix dernières années au Maroc

Dans le but d'évaluer la dynamique d'évolution du gène de la NA des virus de la grippe A et B circulants au Maroc, une étude phylodynamique rétrospective a été réalisée, englobant 154 souches qui ont été isolées et séquencées durant les dix dernières années (2009-2018). Parmi ces souches testées, **50** séquences du gène de la NA correspondent au virus de la grippe de type B, **49** au sous-type A(H1N1) pdm09 et **55** au sous-type A(H3N2). Les numéros d'accès de ces séquences au niveau de la base de données GISAID sont mentionnés dans l'annexe 2, 3 et 4. Notre analyse a été consolidée par l'introduction des séquences de la NA des souches de référence ainsi que celles des souches vaccinales relatives à chaque saison grippale.

1. Analyse phylogénétique et taux de substitution à l'échelle nucléotidique

1.1. Cas du virus de type B

Bien que les virus grippaux de type B ne provoquent pas de pandémie, étant dépourvu de réservoir animal, ils causent souvent une proportion importante de grippe saisonnière. De ce fait, la majorité des études qui concernent ce virus se sont surtout focalisées sur son aspect épidémiologique et antigénique mais peu se sont intéressées à sa dynamique d'évolution (Chen *et al.*, 2008 ; Langat *et al.*, 2017). Néanmoins, les connaissances existantes dans ce domaine montrent qu'ils subissent une dérive génétique plus lente que les virus de la grippe A (Bedford *et al.*, 2014 ; Bedford *et al.*, 2015). Isolé pour la première fois en 1940 lors d'une épidémie aux États-Unis (B / Lee / 40), c'est en 1983 que le type du virus de la grippe B a été séparé en deux lignées principales et distinctes sur le plan antigénique, Victoria (type B / Victoria / 2/87) et Yamagata (type B / Yamagata / 16/88).

Cette distinction entre ces 2 lignées s'est faite sur la base d'une dérive antigénique au niveau du gène de l'HA (McCullers *et al.*, 1999), laissant supposé que le gène de la NA est identique (Xu *et al.*, 2004). La différence de sensibilité de ces deux lignées vis-à-vis de l'Oseltamivir, suggère une dynamique d'évolution différente pour le gène de la NA. Comme représenté dans les figures 44 et 45, l'analyse phylogénétique traduit un remarquable glissement génétique au fil du temps, aussi bien pour la lignée Yamagata que pour la lignée Victoria. L'estimation du taux de substitution à l'échelle nucléotidique du gène NA de la

lignée B Victoria, déterminé par le logiciel Tracer, est de l'ordre de 2.58×10^{-3} substitution /site /an. Le taux de substitution de la lignée B Yamagata, est de l'ordre de 2.33×10^{-3} substitution /site /an. Ces résultats intéressants sont en corrélation avec d'autres études internationales (Vijaykrishna *et al.*, 2015 ; Oonget *et al.*, 2015; Tewawonget *et al.*, 2017).

Le gène NA de la lignée B Victoria semble subir une dérive génétique plus rapide que celui de la lignée B Yamagata. (Lei *et al.*, 2019). Cette différence dans la tendance évolutive à l'échelle génomique entre les deux lignées semble être à l'origine de la différence de susceptibilité à l'Oseltamivir.

Langat et ses collaborateurs, ont évalué la dynamique d'évolution du virus de l'influenza B ayant circulé entre 1989 et 2015 à l'échelle mondiale. Un fait intéressant a été relevé lors de l'analyse phylogénétique. En effet, la scission du génome s'est produite progressivement sur une période d'environ 10 ans, en commençant par le segment PB1 vers 1993 (95% de la densité postérieure la plus élevée (HPD) 1992–1994), suivi de la protéine polymérase acide (PA) en 1996 (95% HPD 1995-1997), puis de la nucléoprotéine (NP), PB2, HA, NA, protéine non structurale1(NS1) et protéine matricielle1(M1) en 2002–2003 (HPD 95% 2001-2004) (Langat *et al.*, 2017).

Dans notre étude, l'estimation du temps jusqu'au dernier ancêtre commun (TMRCA) dans le cas du virus type B est de l'ordre de 16.52 ans pour la lignée Victoria et de 18.98 ans pour la lignée Yamagata. Ce qui suppose que la dérive génétique du gène NA s'est probablement produite entre 2001 et 2003. Ce qui est en corrélation avec l'étude précédente.

A la diversification génétique, origine de l'évolution des profils antigénique, le virus de l'influenza B adopte une dynamique évolutive supplémentaire qui repose sur un modèle de dominance alternée entre les deux lignées B/Victoria et B/Yamagata. En effet, l'une de ces deux lignées domine la population virale jusqu'à ce qu'une immunité suffisante soit générée contre elle, pour céder la place à l'autre lignée qui va en profiter pour augmenter en fréquence (Chen *et al.*, 2008).

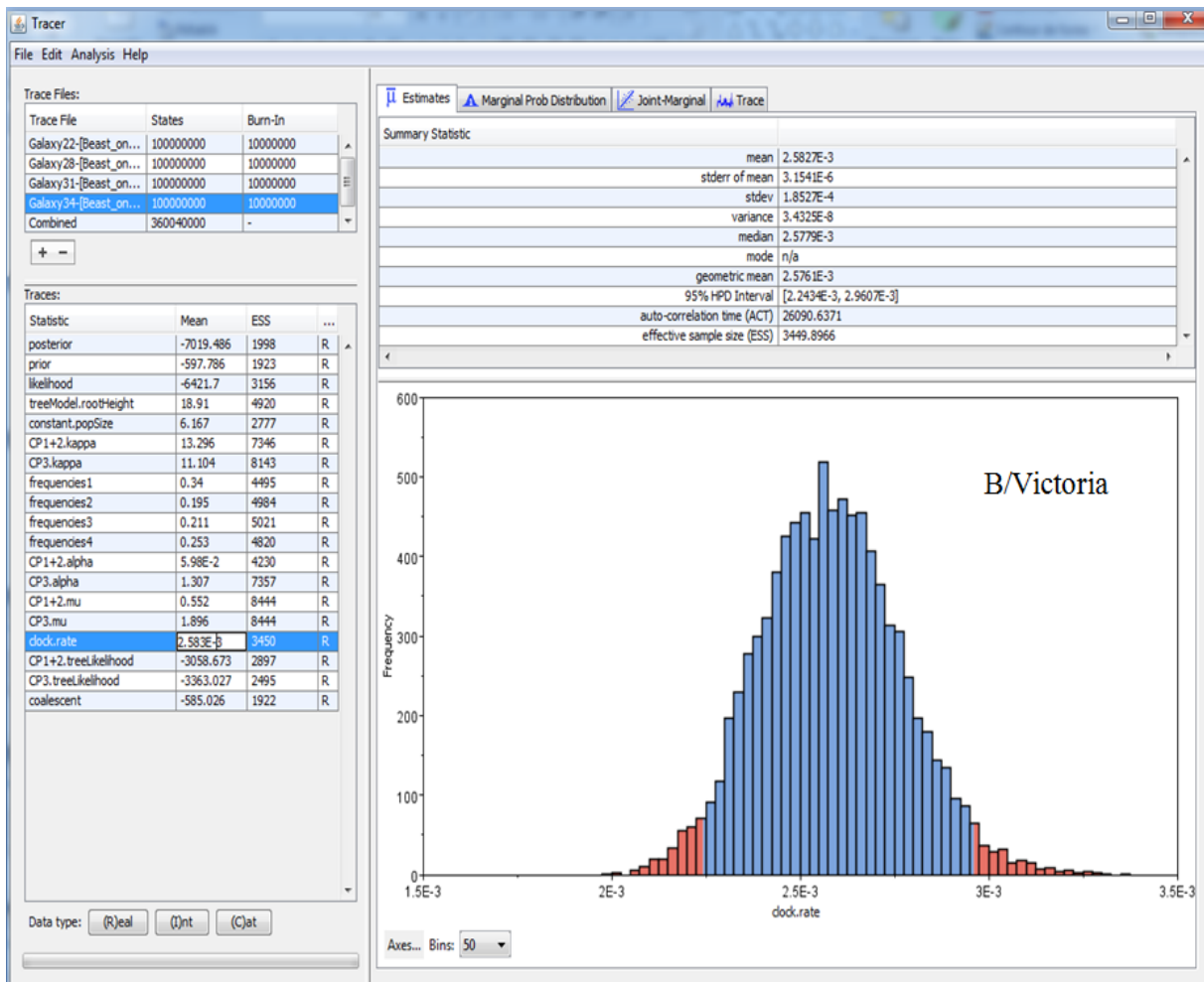


Figure 44: Représente le taux de substitution à l'échelle nucléotidique du gène de la neuraminidase du virus type B lignée Victoria. Avec un intervalle de confiance de 95% HPD (2.24×10^{-3} - 2.96×10^{-3})

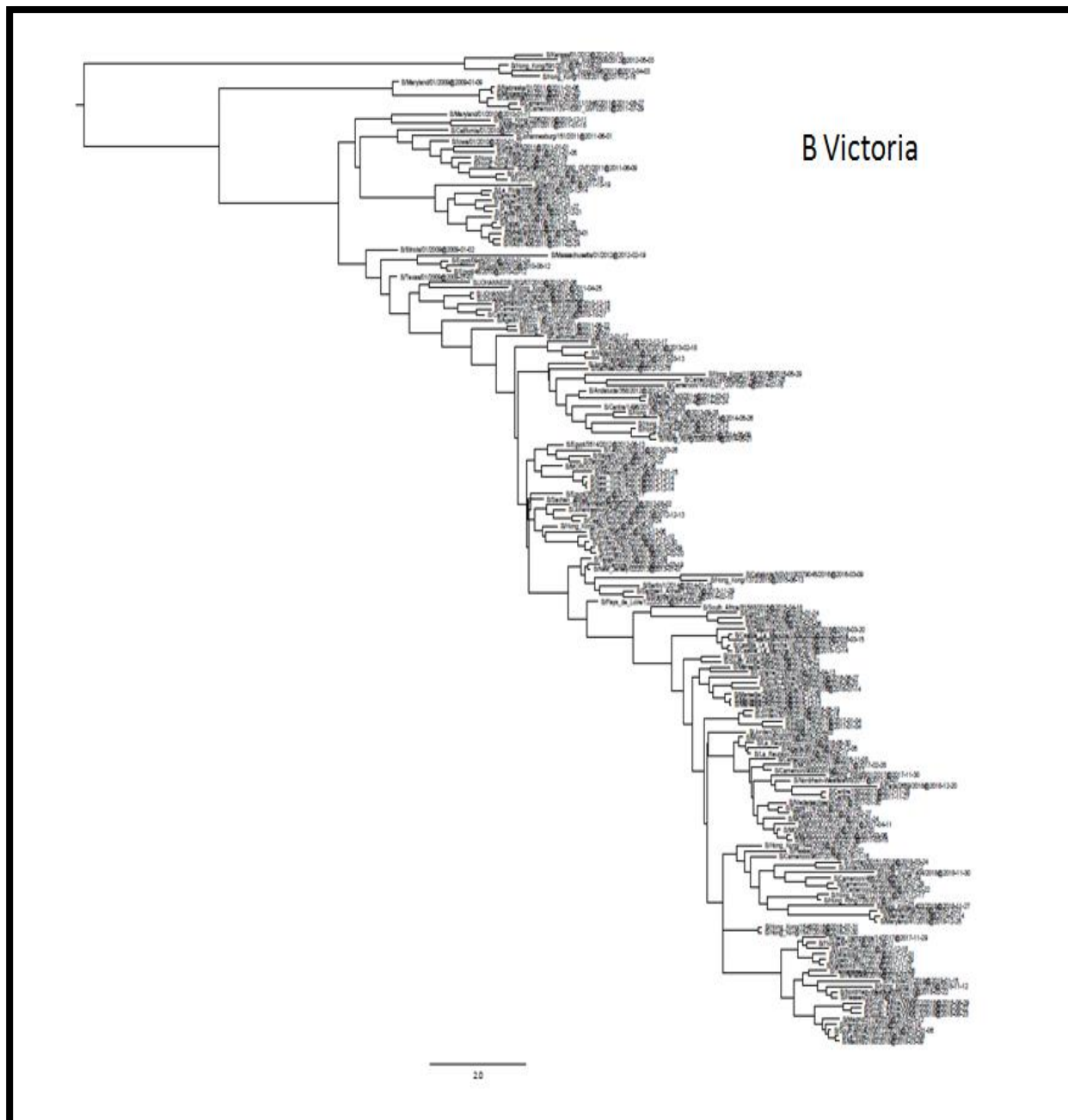


Figure 45: Arbre phylogénétique Bayésien du virus B lignée Victoria

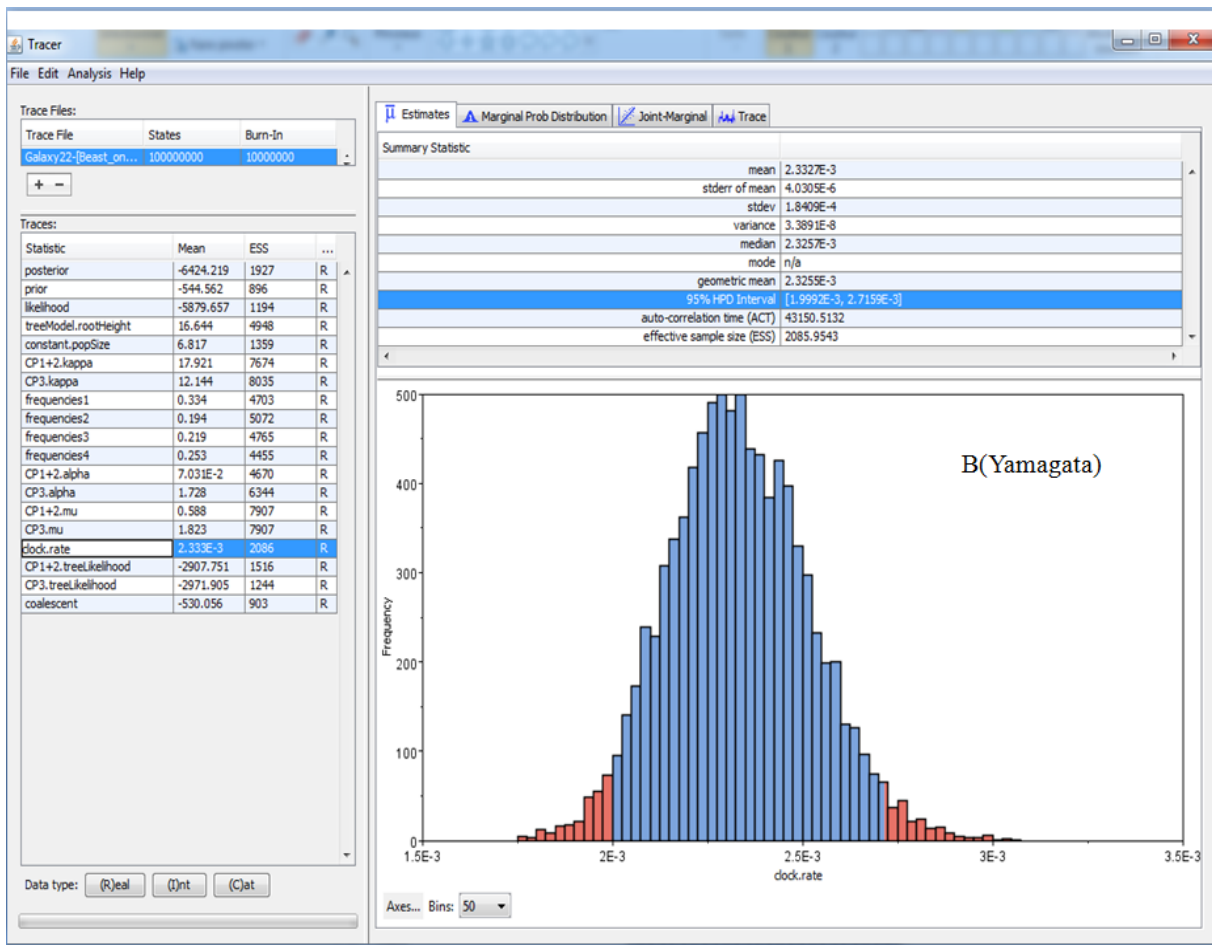


Figure 46: Taux de substitution à l'échelle nucléotidique du gène de la neuraminidase du virus de la grippe de type B lignée Yamagata. Avec un intervalle de confiance de 95% HPD (1.99×10^{-3} - 2.71×10^{-3}).

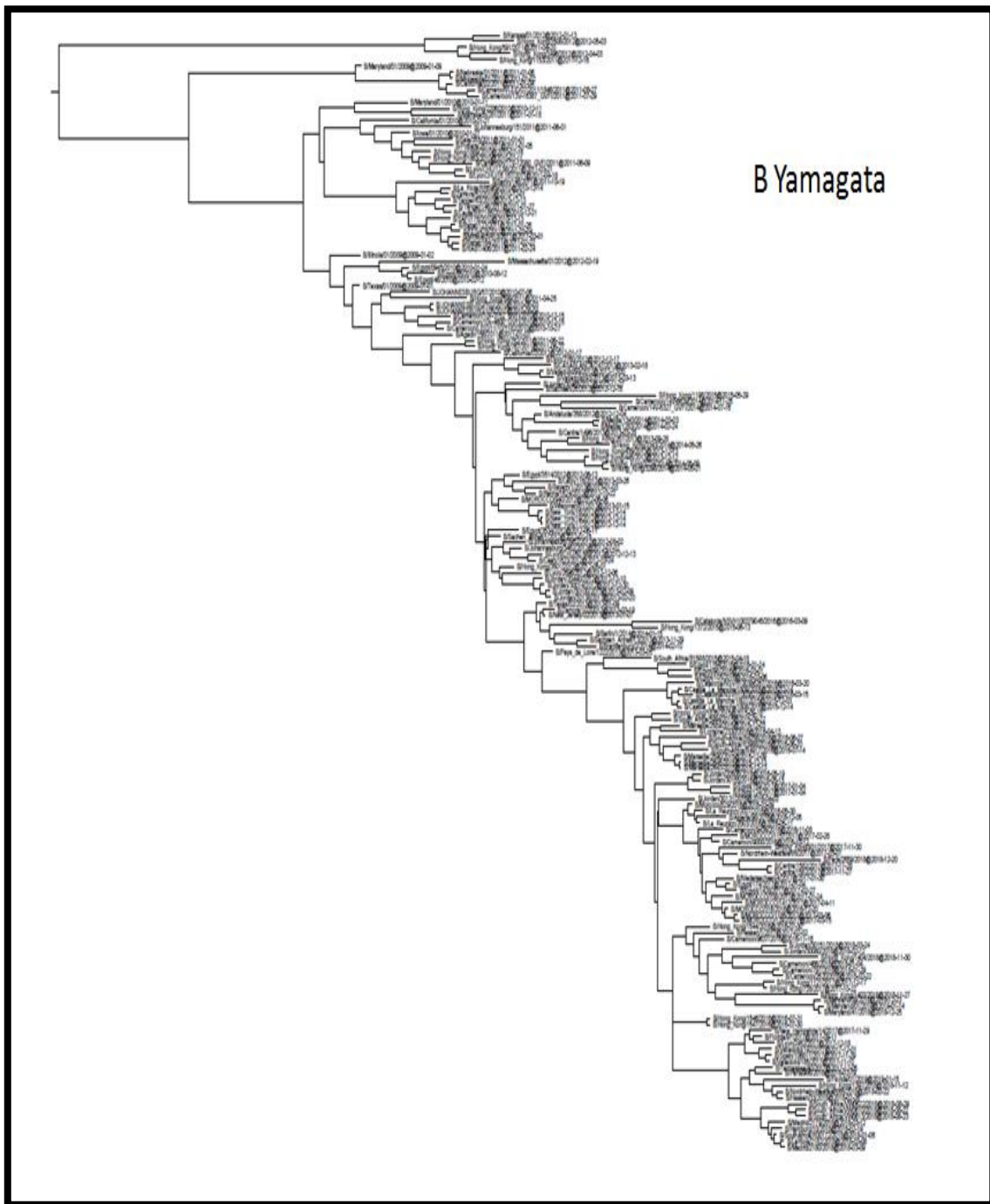


Figure 47: Arbre phylogénétique Bayesien du virus B lignée Yamagata

1.2. Cas du virus pandémique A(H1N1) pdm09

L'évaluation phénotypique et génotypique constitue une première à l'échelle nationale. Les résultats de cette étude rétrospective reflète une dynamique d'évolution inquiétante qui se traduit par une tendance vers un échappement à l'action inhibitrice de la nouvelle classe d'antiviraux.

En effet, l'analyse phylogénétique démontre clairement une dérive génétique assez remarquable du gène NA. L'estimation du taux de substitution à l'échelle nucléotidique est de l'ordre de 4.15×10^{-3} substitution/site/an, ce qui est relativement plus élevé que celui de l'influenza B. Ce taux de substitution nucléotidique du gène de la NA est comparable à celui signalé dans d'autre pays du monde (Stamatakis *et al.*, 2006 ; Rambaut *et al.*, 2016) comme la Thaïlande qui a rapporté un taux de substitution de 3.49×10^{-3} substitution/site/an lors de la période 2010-2015 (Tewawong *et al.*, 2017).

L'accumulation de substitutions sporadiques d'acides aminés associée à un taux de substitution relativement plus élevé que ceux des autres virus grippaux, confirment l'instabilité génétique des virus A (H1N1) pdm09. Il a été suggéré que le nouveau virus pandémique pourrait ne pas encore s'être complètement adapté à la population Humaine, ce qui signifie que de nouveaux changements vont s'installer dans le but d'assurer une meilleure dissémination au sein de l'organisme (Mukherjee *et al.* ; 2016).

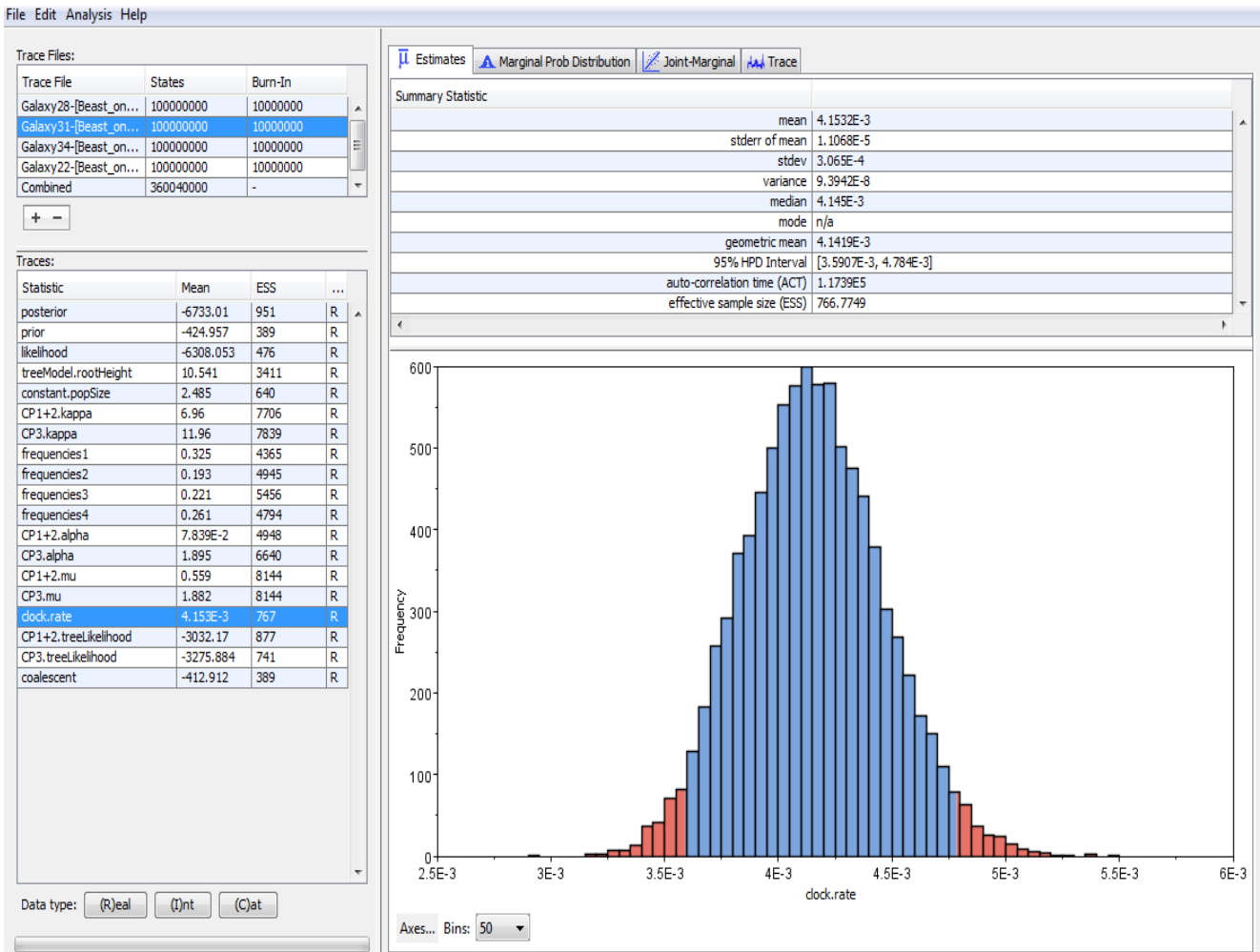


Figure 48: Taux de substitution à l'échelle nucléotidique du gène de la neuraminidase du virus sous-type A(H1N1) pdm09 estimé à $4,15 \times 10^{-3}$ avec un intervalle de confiance de 95% HPD ($3,52 \times 10^{-3}$ - $4,78 \times 10^{-3}$)

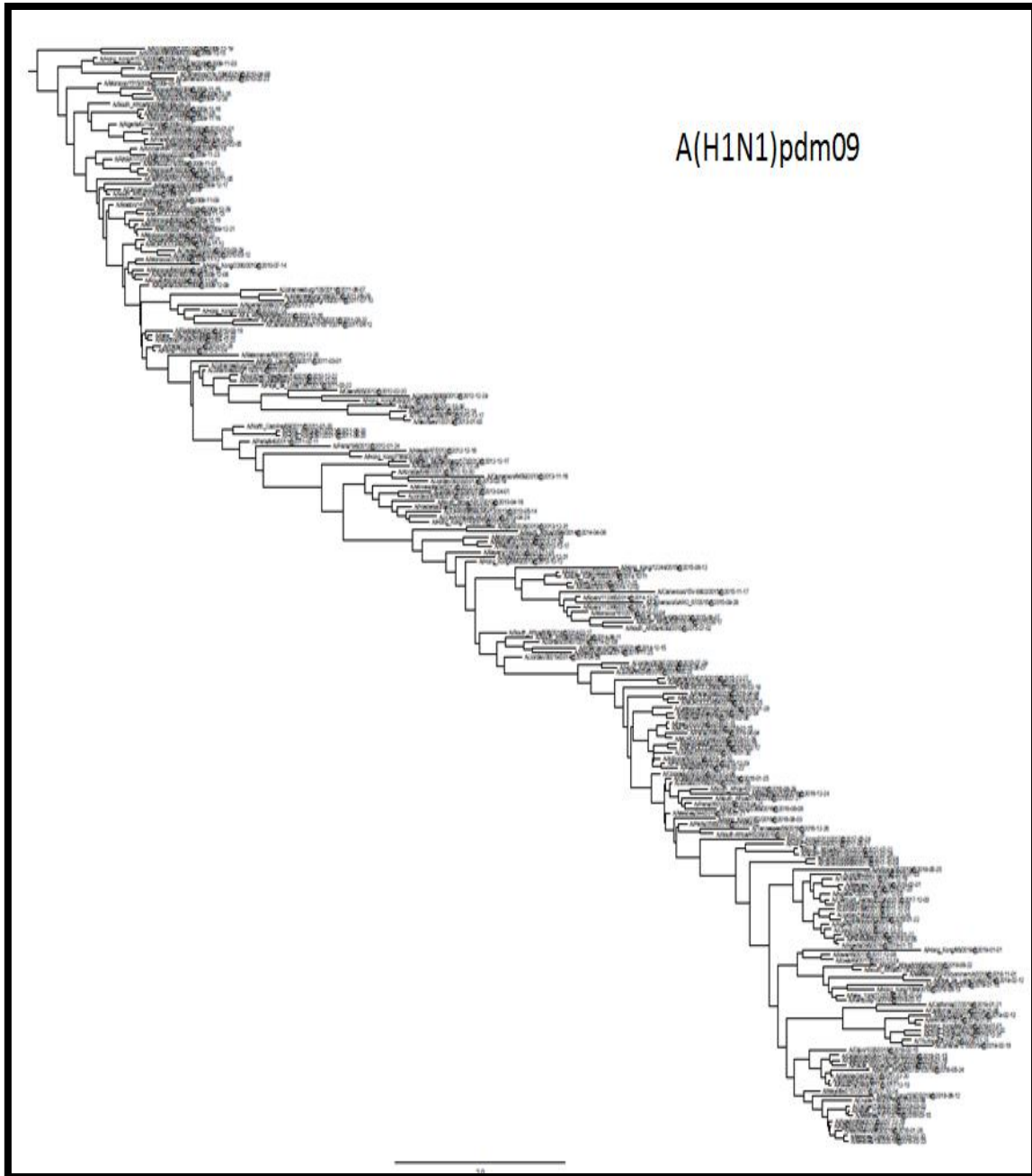


Figure 49: Arbre phylogénétique Bayésien du virus A(H1N1) pdm09

1.3. Cas du virus A(H3N2)

Bien que le taux de substitution à l'échelle nucléotidique soit légèrement plus faible que celui du virus pandémique A(H1N1) pdm09 (3.42×10^{-3} substitution/site/an), le virus A(H3N2) possède une dynamique d'évolution plus régulière. En effet, les souches appartenant à ce sous-type ont acquis au cours des dix dernières années, plusieurs substitutions qui ont été introduites avec succès et de façon irréversible. La majorité de ces substitutions a été à l'origine de la diversité antigénique au sein de la population virale, contrairement aux souches du virus A(H1N1) pdm09 pour les quelles certaines substitutions ne sont que transitoires. Il a été suggéré que cette stabilité est probablement associée au fait que ce virus circule au sein de la population humaine depuis 1968.

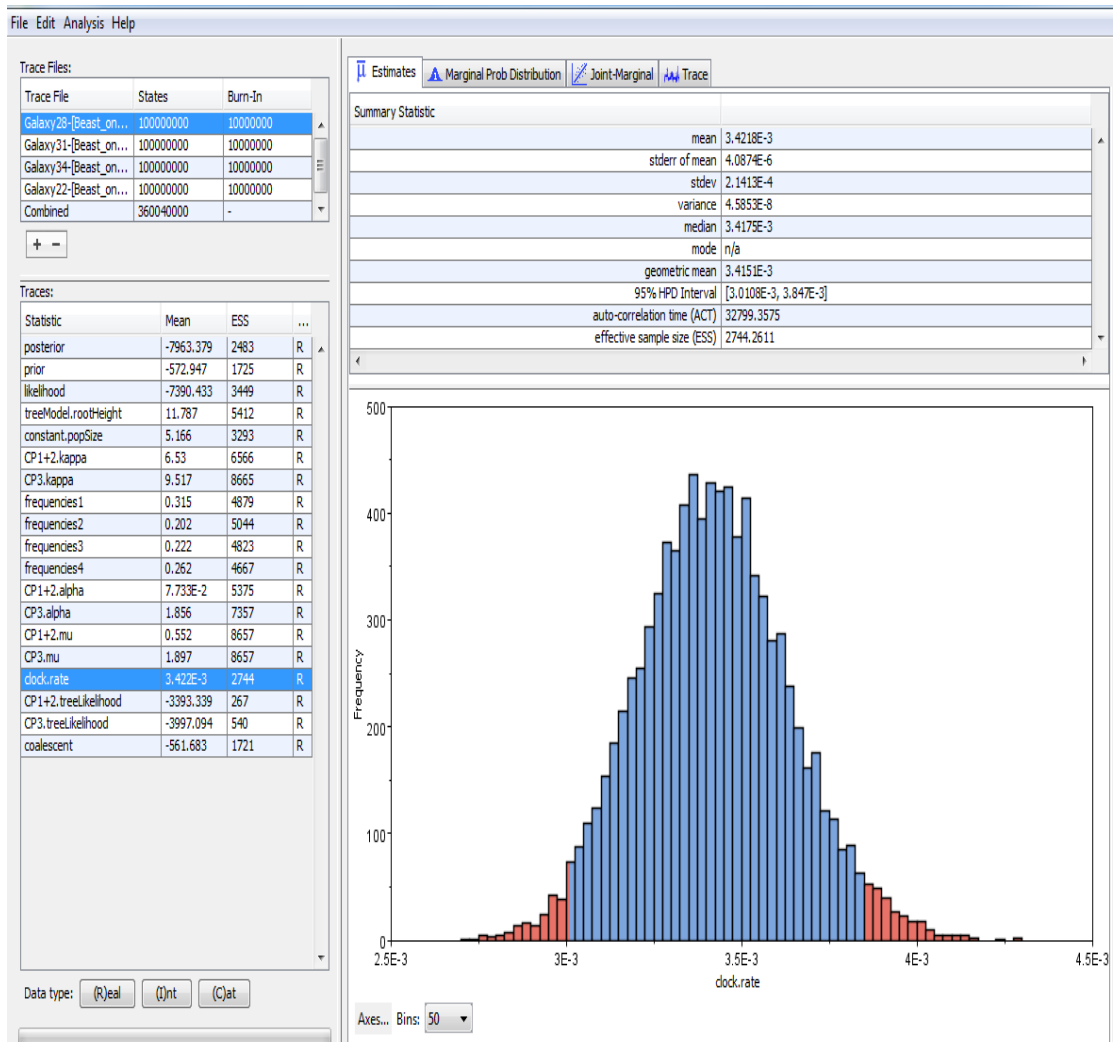


Figure 50: Taux de substitution à l'échelle nucléotidique du gène de la neuraminidase du virus sous-type A(H3N2) estimé à 3.42×10^{-3} avec un intervalle de confiance de 95% HPD (3.01×10^{-3} - 3.84×10^{-3})

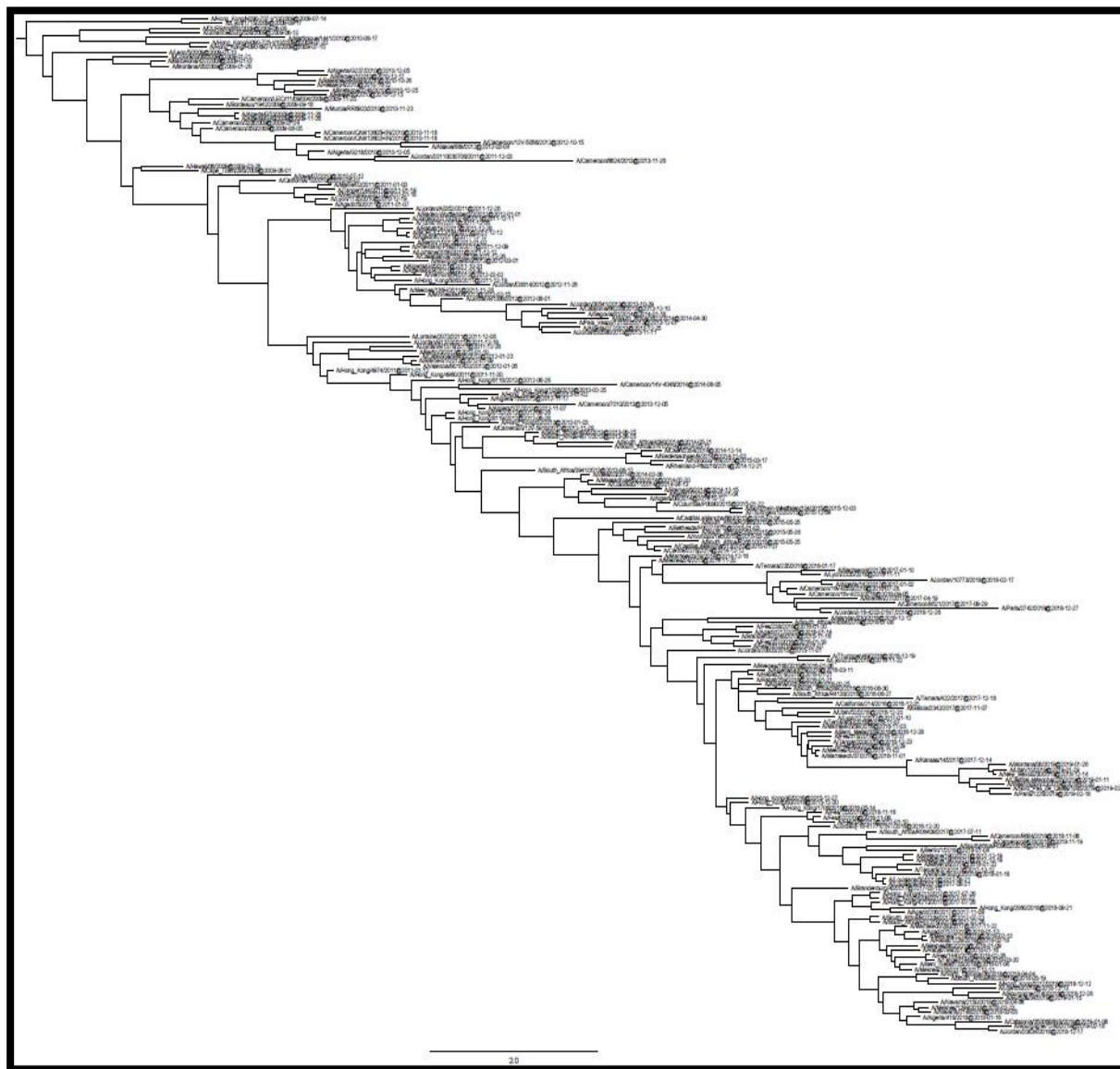


Figure 51: Arbre phylogénétique bayésien du virus A(H3N2)

2. Dynamique du potentiel de la glycosylation

2.1. Cas du virus de type B

En plus des changements d'acides aminés, la dérive génétique implique souvent des modifications des profils de glycosylation des deux glycoprotéines les plus immunogènes à savoir l'HA et la NA. On parle alors, de glissement antigénique (Kim *et al.*, 2018). La glycosylation, dépendante des cellules hôtes, est une modification post-traductionnelle, qui se manifeste par la fixation d'une ramification glucidique à une chaîne latérale d'asparagine de la protéine. Seules les asparagines appartenant aux deux séquences Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr où X peut représenter tout acide aminé sauf la Proline peuvent être glycosylées (Kornfeld *et al.*, 1985).

Ce processus peut être à l'origine d'une altération de la spécificité de liaison ainsi que de la virulence, soit directement, en modifiant les propriétés biologiques de l'HA et de la NA (Schulze., 1997), soit indirectement, en atténuant la liaison au récepteur, masquant les régions antigéniques de la protéine, régulant l'activité catalytique ou empêchant le clivage protéolytique de la tige de NA (Matsuoka *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2017).

Dans le but de localiser et ainsi d'évaluer l'impact de ces changements sur l'activité biologique de la neuraminidase, un suivi des modifications des sites de glycosylation des 154 isolats, objet de l'étude, a été réalisé via le logiciel "Glycosylation site calculator".

Les protéines de la NA des virus de la lignée B/Yamagata présentent cinq sites potentiels de N-glycosylation bien conservés (56, 64, 144, 284, 463) par rapport à la souche de référence (B/Florida/4/2006). Tandis que celles de la lignée B/Victoria n'en ont que quatre par référence à B/Malaysia/30552/2004. Ce qui suggère que cette dernière a subi une délétion d'un site de glycosylation de la partie globulaire au niveau de la position 463 après sa scission de la lignée Yamagata. Ceci peut être à l'origine de la modification de l'affinité à l'Oseltamivir observée au cours du test phénotypique.

2.2. Cas du virus A (H1N1) pdm09

Par comparaison à la souche de référence A/California/07/09 les virus A (H1N1) pdm09 révèlent sept sites de glycosylation qui sont hautement conservés. Quatre au niveau de la tige (50, 58, 63, 68) et trois au niveau de la tête globulaire de la protéine (88, 146, 235). Fait intéressant, c'est qu'une année après leur émergence (2010/2011), ils ont acquis un nouveau site de glycosylation à la position 386, pour le perdre en 2014/2015. Cette perte a été compensée au cours de la même saison par l'insertion d'un autre site de N-glycosylation au niveau de la tige à la position 42.

2.3. Cas du virus A (H3N2)

En se référant à la souche B/Brisbane /10/2007, sept sites de glycosylation ont été caractérisés et ils sont bien conservés: trois au niveau de la tige (61, 70, 86) et quatre au niveau de la tête globulaire (146, 200, 234,367). Cependant au cours de leur évolution durant ces dix dernières années, ces virus ont perdu deux potentiel site de N-glycosylation au niveau de la tête globulaire de la molécule, l'un à la position 402 au cours de la saison 2011/2012 et un autre à la position 329 durant la saison 2016/2017. Cette perte a été contre-balancée par un gain d'un site de glycosylation à la position 245 qui s'est infiltré au sein de la population virale de façon permanente à partir de la saison 2015/2016 (tableau 12).

Tableau 11 : Sites de glycosylation relatifs à chaque type /sous-type du virus de la grippe circulant au Maroc de 2009 à 2018

Type /Sous-type	Saison	Nombre	Sites de N-glycosylation
LignéeB Yamagata	2012/2013	5	56, 64, 144, 284,463
	2014/2015		
	2017/2018		
Lignée B Victoria	2010/2011	4	56, 64, 144, 284,463
	2011/2012		
	2012/2013		
	2015/2016		
	2016/2017		
A(H1N1)pdm09	2008/2009	7	50, 58, 63, 68, 88,146, 235
	2009/2010	8	50, 58, 63, 68, 88,146, 235, 386
	2014/2015	8	42 , 50, 58, 63, 68, 88,146, 235, 386
	2015/2016	8	42 , 50, 58, 63, 68, 88,146, 235, 386
	2017/2018	8	42 , 50, 58, 63, 68, 88,146, 235, 386
A(H3N2)	2010/2011	9	61, 70, 86, 146, 200, 234, 329, 367, 402
	2011/2012	8	61, 70, 86, 146, 200, 234, 329, 367, 402
	2015-2016	9	61, 70, 86, 146, 200, 234, 245 , 329, 367,
	2016/2017	8	61, 70, 86, 146, 200, 234, 245, 329 , 367,
	2017/2018	8	61, 70, 86, 146, 200, 234, 245, 329 , 367,

Bien que les changements dans les sites de glycosylation de NA ont été considérés comme moins dramatiques que pour l'HA (Huang *et al.*,2017), ils revêtent une importance multifactorielle. Il a été rapporté qu'une perte ou un gain d'un potentiel de N- glycosylation pour la NA, peut modifier les profils de spécificité au substrat, corriger le repliement de la molécule et protéger les sites de clivage enzymatique. Alors que dans le cas de l'HA,ce la permet de masquer plus efficacement les sites antigéniques et par conséquent de moduler la reconnaissance des glycoprotéines par le système immunitaire adaptatif (Schulze.,1997 ;Sun *et al.*,2012). Cette modification du potentiel de N- glycosylation pour la NA joue également un rôle important dans l'atténuation de la réponse immunitaire innée, vu que les glycanes sont eux même des dérivés d'hôte et sont donc considérés comme soi (vigerust *et al.*,2007;Tripathi *et al.*,2013;York *et al.*,2018).

Dans notre contexte, la modulation du potentiel de glycosylation au niveau de la tête globulaire semble contribuer à une modification de l'affinité vis-à-vis de l'Oseltamivir dans le cas de la lignée B Victoria et dans le cas du sous-type A(H1N1) pdm09.

La glycosylation de la tige de la NA à la position 42 détectée dans les virus A(H1N1)pdm09 a été identifiée initialement dans des isolats de porcs à la fin des années 1990. Elle a été introduite dans les virus aviaires et humains ces dernières années, reflétant probablement une transmission zoonotique du porc à l'homme (Kim *et al.*,2018). Il a été rapporté qu'une modification des sites de glycosylation au niveau de la tige est plutôt liée à une protection plus accentuée vis-à-vis de l'action protéolytique. Ce qui est le cas pour le sous-type A(H1N1) pdm09 circulant au Maroc (Varghese *et al.*,1983; Colman *et al.*,1983; Russell *et al.*,2006).

Dans le cas du sous-type A(H3N2), aucune de ces modifications n'a été rapportée comme touchant l'activité catalytique. Elles sont probablement associées à un maintien de la stabilité de la région globulaire de la protéine. La dérive antigénique dans le cas de l'HA contribue à faciliter l'échappement du virus de la grippe au système immunitaire aussi bien inné que adaptatif (Schulze.,1997;Sun *et al.*, 2012;vigerust *et al.*,2007;Tripathi *et al.*,2013;York *et al.*,2018).Alors que dans le cas de la NA, elle lui permet de modifierles propriétés de la fonction catalytique de l'enzyme. C'est pour cette raison que les vaccins produits aujourd'hui sont normalisés principalement en fonction de la quantité de l'HA, alors que celle de la NA est souvent variable (Jakadesh *et al.*,2016).

Suite à la pandémie de 2009, la composition vaccinale a été revue. De 2010 à 2016, le composant A(H1N1) pdm09 recommandé pour la production des vaccins saisonniers, aussi bien trivalents que quadrivalents était le "A / California/7/2009", un isolat très précoce du virus de la grippe A (H1N1) pdm09. Le taux d'efficacité était de l'ordre de 60% au cours des saisons grippales 2009-2010 et 2010-2011 (Griffin *et al.*,2011 ;Treanor *et al.*,2012). Elle était beaucoup plus faible surtout pour les vaccins vivants atténués en 2013-2014 et 2015-2016 (Gaglani *et al.*,2016).

Cette diminution progressive dans l'efficacité du vaccin a été attribuée à la dérive antigénique du gène de l'HA, qui a été à l'origine d'une altération de la capacité répliquative du virus atténué (Linderman *et al.*, 2014) ; Pebody *et al.*,2016). C'est pour cette raison qu'en 2016/2017 la composition du vaccin en composant A(H1N1) pdm09 a été revue.

En 2019, Gao et ses collègues ont pu démontrer que la faible efficacité des vaccins atténués au cours des saisons 2013-2014 et 2015-2016 n'était pas liées à la mauvaise répllication du virus A(H1N1) pdm09 comme il a été rapporté dans d'autres études (Linderman *et al.*,2014; Helmekeet *al.*,2015), mais surtout à l'effet de la dérive antigénique du gène NA. (Gao *et al.*,2019). Il existe des preuves que NA est immunogène et que les anticorps anti-NA confèrent une immunité hétérologue à large spectre. Des études ont montré que la variation antigénique se produit à un taux plus lent dans NA que dans HA, et donc, les anticorps anti-NA peuvent induire une immunité à long terme. Des décennies de recherche sur les anticorps anti-NA, en particulier sur leur rôle dans l'immunité et les méthodes de détection, faciliteront la mise au point de nouveaux vaccins pouvant être évalués pour leur teneur et leur activité en HA et en NA. Ces vaccins peuvent devenir des vaccins universels offrant une protection contre les nouveaux virus de la grippe (Jakadesh *et al.*,2016).

V. Discussion générale

La grippe est une infection respiratoire aigüe, l'agent étiologique est un virus à ARN segmenté qui évolue continuellement. Il est à l'origine d'épidémies annuelles qui atteignent leur pic pendant l'hiver dans les régions tempérées. Parfois il peut provoquer des pandémies. Cette infection respiratoire extrêmement contagieuse sévit dans le monde avec un taux d'attaque annuel estimé de 5 à 10% chez les adultes et de 20 à 30% chez les enfants (Duwe *et al.*, 2017). Généralement bénigne, elle peut aussi être fatale. Elle est responsable d'environ 3 à 5 millions d'hospitalisations et de 250 000 à 500 000 décès (Hsu *et al.*, 2012), constituant de ce fait, un problème de santé publique majeur.

En dehors des mesures d'hygiène, la vaccination annuelle reste le moyen le plus efficace pour la prévention de la grippe. Les vaccins antigrippaux permettent d'induire une immunité protectrice qui se traduit par la production d'anticorps neutralisants dirigés contre les protéines de surface plus particulièrement l'HA et facultativement la NA. En raison des modifications constantes des virus grippaux, le vaccin peut différer dans sa composition d'une année à une autre. La raison pour laquelle l'OMS émet chaque année des recommandations sur les souches qui doivent être incluses dans le vaccin. Cependant l'efficacité du vaccin dépend d'une part de l'âge et du statut immunitaire du sujet vacciné et d'autre part du degré de similitude entre les souches vaccinales et les virus en circulation. D'où l'importance d'utiliser des antiviraux dans la prise en charge des cas sévères (Duwe., 2017). Leur rôle est important dans le contrôle des épidémies et dans la stratégie développée par l'OMS en prévision d'une pandémie grippale. C'est la seule mesure d'intervention susceptible d'atténuer l'incidence d'une pandémie d'influenza avant qu'un vaccin ne soit disponible.

Actuellement, il existe principalement deux classes de médicaments antiviraux : les inhibiteurs du canal ionique M2 et les inhibiteurs de la neuraminidase. Depuis la pandémie de 2009, une utilisation de plus en plus accentuée des antiviraux grippaux plus particulièrement les INAs a été constatée. Sauf que le danger associé à leur utilisation, réside dans leur pouvoir à exercer une pression sélective sur les formes résistantes. En effet, l'exposition des virus grippaux à ces drogues provoque la sélection de mutants viraux génétiquement résistants qui peuvent ensuite se transmettre sans perdre leur pouvoir pathogène, comme c'était le cas pour le virus de la grippe A(H3N2). Jusqu'en 2004, la prévalence des formes résistantes du virus A(H3N2) était de moins de 1% pour atteindre une prévalence de 100% au cours de l'hiver suivant 2005–2006.

Au cours de la saison grippale 2004–2005, une forte propagation des virus résistants aux Adamantanes ont été détectés en Asie, en Europe, en Australie et aux États-Unis, rendant ainsi, cette classe de médicaments pratiquement inefficace.

En ce qui concerne les inhibiteurs de la neuraminidase (INAs), jusqu'en 2007 la résistance était un phénomène rare. Pourtant durant la saison 2007-2008, une augmentation des formes résistantes du virus A(H1N1) saisonnier a été observée, et à même atteint 100% de résistance dans certains pays en 2008-2009 (Baz M *et al.*, 2010 et Okomo-Adhiambo M *et al.*, 2010).

Conscient de la problématique de santé publique que pose le phénomène de résistance aux antiviraux, le Maroc a introduit depuis la saison grippale 2014-2015, la surveillance de la sensibilité des virus grippaux aux antiviraux comme objectif spécifique de sa stratégie nationale de surveillance épidémiologique et virologique.

C'est dans ce contexte que la présente étude a été entreprise, dans l'objectif d'isoler et de caractériser phénotypiquement et génotypiquement les profils de sensibilité aux deux principaux INAs utilisés au Maroc pour la prise en charge des infections grippales. Ce qui permettra d'estimer la prévalence des formes résistantes et d'évaluer la dynamique d'évolution du gène de la neuraminidase, cible des ces antiviraux.

Les prélèvements testés ont été collectés à travers le réseau national de surveillance de la grippe, un système installé depuis plus de 20 ans, couvrant la totalité du territoire marocain. Ceci nous a permis d'avoir une couverture spatiale et temporelle importante.

L'analyse phénotypique a pu mettre en évidence moins de 1% de prévalence des formes résistantes à l'échelle nationale. Ceci concorde avec le dernier rapport de l'OMS relatif à la résistance aux INAs au niveau international. Cette étude démontre clairement que les virus grippaux de type B présentent une affinité plus accrue au Zanamivir qu'à l'Oseltamivir, alors que pour les virus A(H1N1) pdm09 et A(H3N2) la sensibilité est presque similaire pour les deux médicaments. L'effet inquiétant observé est lié à la diminution de l'affinité des virus A(H1N1) pdm09 (plus virulent que l'A(H3N2) et le B) pour l'Oseltamivir et ce, pour la totalité des souches isolées durant la période de l'étude.

Les résultats obtenus ont été consolidés par l'analyse génotypique d'un échantillon représentatif d'isolats de virus grippaux. La comparaison par rapport aux souches prototypes de chaque sous-type A(H3N2), A(H1N1) pdm09, Type B Yamagata et le type B Victoria, ont mis l'accent sur un certain nombre de mutations. Bien qu'aucune d'elles n'a été rapporté comme marqueur de résistance, certaines ont été préalablement décrites comme favorisant

une tendance vers la diminution de l'affinité plus particulièrement dans le cas du virus A(H1N1) pdm09. Les modifications observées nous ont incité à nous orienter vers un suivi de l'évolution du gène de la NA pour chaque sous-type.

Effectivement, l'évolution du gène de la NA au cours des neuf dernières années reflète une dérive antigénique importante, accompagnée par un taux de substitution variable d'un sous-type à un autre. L'estimation du taux de substitution à l'échelle nucléotidiques reflète une dynamique d'évolution plus accentuée pour le virus A(H1N1) pdm09 que pour les autres sous-types.

De plus, la dynamique de migration des sites de glycosylation consolide la tendance du virus pandémique à une adaptation à l'organisme Humain, associé à un échappement au système immunitaire et à une émergence des formes résistantes aux médicaments.

Au Maroc, jusqu'en 2009, l'utilisation des antiviraux grippaux surtout les INAs était strictement limité à la prise en charge des cas suspects de grippe aviaire H5N2.

Lorsque la pandémie de 2009 est survenue et afin de la contrôler, le Tamiflu a été utilisé de façon massive, plus en tant qu'approche prophylactique que thérapeutique, ce qui a entraîné l'émergence de quelques cas de résistance à cet antiviral. A la fin de la deuxième vague de la grippe porcine (fin de la saison grippale 2010/2011), comme la majorité des pays du monde, il n'était plus recommandé au Maroc.

Cependant, au cours de la saison grippale 2018/2019 et suite à une augmentation du nombre des IRAS au niveau des services hospitaliers avec une grippe A(H1N1) pdm09 confirmée, un nouveau protocole thérapeutique a été élaboré, validé et diffusé. Ce dernier repose sur l'utilisation du Tamiflu comme recours thérapeutique pour la prise en charge des complications associées à la grippe porcine A(H1N1) pdm09 surtout chez les personnes à risque.

Le risque d'émergence et de propagation de variant du virus résistant aux antiviraux doublé d'options thérapeutiques limitées, souligne l'importance du système de surveillance de la résistance aux antiviraux grippaux à l'échelle nationale.

VI. Conclusion et recommandations

Cette étude a la prétention d'être la première à l'échelle nationale à avoir permis une estimation de la prévalence, des souches résistantes aux antiviraux grippaux, particulièrement les inhibiteurs de la neuraminidase (INAs). Pour la réalisation de ce travail deux démarches complémentaires ont été suivies:

La première consiste en une évaluation phénotypique complétée d'une analyse génotypique des virus grippaux isolés durant quatre saisons grippales, de 2014/2015 à 2017/2018. La seconde s'est penchée sur la dynamique d'évolution du gène de la neuraminidase des souches isolées durant la dernière décennie.

Les résultats de la première partie de ce travail plaident en faveur d'une faible prévalence des formes résistantes aux antiviraux. En effet, à travers l'analyse phénotypique, une sensibilité normale pour la majorité des isolats a été démontrée. Néanmoins, notre étude a mis en exergue une réduction de l'affinité vis-à-vis de l'Oseltamivir pour les isolats du sous-type A(H1N1) pdm09. L'analyse génotypique a permis de consolider les résultats du test phénotypique. Ainsi, la comparaison aux souches de références confirme l'absence de toute mutation reconnue comme conférant la résistance, mais elle a permis la détection de sites de substitution au voisinage du site catalytique, les quels sont probablement à l'origine de la diminution de l'affinité pour l'Oseltamivir dans le cas d'A(H1N1) pdm09.

Les résultats de la seconde partie de ce travail ont montré une remarquable dynamique d'évolution du gène de la neuraminidase, relativement plus accentuée dans le cas du virus A(H1N1) pdm09, à laquelle est associée une dynamique de migration des sites de N-glycosylation.

Les données de la présente étude apportent les éléments de base pour améliorer la stratégie de riposte nationale contre les virus grippaux.

En dépit de la faible prévalence de la résistance aux INAs, et compte tenu de la dynamique d'évolution génomique des virus grippaux, le système de surveillance intégré épidémiologique et virologique doit être maintenu et renforcé conformément aux recommandations suivantes :

- Maintenir et élargir le système de surveillance virologique de la grippe saisonnière.
- Augmenter le taux de couverture vaccinale en particulier chez les personnes à risque.

- Améliorer la dispensation précoce des antiviraux selon les recommandations de l’OMS.
- Mettre en place un système de monitoring de l’évolution de la maladie et d’éventuelles complications sous INAs.
- Intégrer de nouveaux outils de séquençage haut débit, de protéomique et de RT-ddPCR pour améliorer les connaissances sur les populations virales minoritaires, les mutations signatures de résistance et les recombinaisons virales éventuelles.
- Mettre en place un système de surveillance intégrant la surveillance des virus influenza d’origine zoonotique selon le concept *One Health*. Cela doit permettre un meilleur suivi des nombreuses souches de virus grippaux circulantes dans les différentes espèces animales sur le territoire national.
- Sensibiliser vivement le corps médical, quand au risque d’émergence de forme résistante aux antiviraux si le protocole thérapeutique n'est pas ciblé.
- Introduire de nouveaux antiviraux. Le Ministère de la Santé, les décideurs doivent impérativement diversifier le stock national d'antiviraux grippaux et faire appel à la nouvelle et prometteuse génération d'inhibiteurs de la neuraminidase (INAs).



Productionsn scientifiques



Detection of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitor in Morocco during 2014/15 season

F. Elfalki^{1,2}, H. Ihazmad¹, A. Bimouhen¹, Z. Regragui¹, S. Benkaroum¹, Y. Bakri² and A. Barakat¹

اكتشاف فيروسات إنفلونزا B ذات حساسية منخفضة لمثبطات النورامينيداز في المغرب خلال موسم 2014-2015

فاطمة الفلكي، حسن احزام، عبد الرحمان بيموحن، زكية الركراكي، سميرة بنكروم، يوسف بكري، أمال بركات

الخلاصة: تهدف هذه الدراسة إلى رصد خصائص الحساسية المتعلقة بالنمط الظاهري والنمط الجيني لفيروسات الإنفلونزا في المغرب خلال موسم 2014-2015 للدوائين المثبطين للنورامينيداز، اوسيلتاميفير وزاناميفير. مُجمعت العينات (مسحات حلقية أو أنفية) من مرضى خارجيين (بأعراض ما يشبه الإنفلونزا) ومرضى داخليين (بأعراض مرض تنفسي حاد وخيم)، وفُحصت عينات فيروسات الإنفلونزا A و B باستخدام مقاييسات تفاعل البلمرة المتسلسل - الزمن الحقيقي* في الزمن الحقيقي البسيط. ولقّحت العينات الإيجابية على خلايا مادين-داري كائين كيدني، وقيمت خصائص حساسية النمط الظاهري للفيروسات المستفردة لمثبطات النورامينيداز باستخدام مقاييسات تثبيط النورامينيداز المتألق. من أصل 440 عينة كانت 135 (31%) عينة إيجابية لفيروس الإنفلونزا B الشبيه بياماجاتا، وكانت 38 (8%) عينة A(H1N1)pdm09 و 25 (6%) عينة كانت A(H3N2). لقد وجد أن ستين فيروساً من فيروسات الإنفلونزا B التي استُفردت على MDCK وفُحصت حساسيتها لمثبطات النورامينيداز لم تظهر أي مقاومة تذكر لمثبطات النورامينيداز المتوفرة. واثنان من فيروسات الإنفلونزا B /Morocco/176H/2015 و B/Morocco/CP10/2015، وهما سلالتان استثنائيتان اشتملت عليهما فيروسات الإنفلونزا B التي استُفردت في MDCK - أظهرت انخفاضاً في الحساسية للأوسيلتاميفير. إن وجود اثنين من فيروسات الإنفلونزا B الجوالاة أثناء موسم 2014-2015 في المغرب حساسيتها منخفضة للأوسيلتاميفير يُظهر أن التّرصّد المستمر للحساسية لمثبطات النورامينيداز أمر ضروري.

ABSTRACT We monitored phenotypic and genotypic susceptibility of influenza viruses circulating in Morocco during 2014-2015 to oseltamivir and zanamivir. Throat and nasal swab specimens were collected from outpatients (with influenza-like illness) and inpatients (with severe acute respiratory illness) and tested for influenza viruses using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Positive samples were inoculated in MDCK cells and virus phenotypic susceptibility to neuraminidase inhibitors (NAIs) was assessed using fluorescent NA inhibition. Of 440 specimens, 135 were positive for influenza B Yamagata-like virus, 38 were A(H1N1)pdm09 and 25 were A(H3N2). Sixty influenza B viruses isolated from MDCK cells showed no significant resistance to NAIs. However, two of these strains, B/Morocco/176H/2015 and B/Morocco/CP10/2015, showed reduced susceptibility to oseltamivir. The two influenza B viruses with reduced susceptibility to oseltamivir show that ongoing NAI susceptibility surveillance is essential.

Maroc : dépistage de virus de la grippe B présentant une sensibilité réduite à l'inhibiteur de la neuraminidase durant la saison 2014-2015

RÉSUMÉ Nous avons surveillé le profil de sensibilité phénotypique et génotypique des virus de la grippe à l'oseltamivir et au zanamivir durant la saison 2014-2015 au Maroc. Des échantillons ont été prélevés (par frottis de gorge ou écouvillonnage du nez) chez des patients externes (présentant un syndrome de type grippal) et chez des patients hospitalisés (présentant une infection respiratoire aiguë sévère). Ils ont été soumis au test de détection des virus de la grippe A et B via la méthode d'analyse RT-PCR simplex en temps réel. Les échantillons positifs ont été inoculés à des cellules rénales canines Madin-Darby (MDCK) et le profil de sensibilité phénotypique des virus isolés aux INA a été évalué au moyen du test d'inhibition de la neuraminidase (NA) par fluorescence. Sur 440 échantillons, 135 (31 %) étaient positifs au virus de la grippe B de type Yamagata, 38 (8 %) à celui de la grippe A(H1N1)pdm09 et 25 (6 %) à celui de la grippe A(H3N2). Soixante virus de la grippe B isolés sur les cultures de cellules MDCK et soumis au test de sensibilité aux INA n'ont démontré aucune résistance significative aux INA. Toutefois, deux de ces souches, la B/Maroc/176H/2015 et la B/Maroc/CP10/2015, ont démontré une sensibilité réduite à l'oseltamivir. Les deux virus de la grippe B ayant une sensibilité réduite à l'oseltamivir montrent l'importance d'une surveillance permanente de la sensibilité à l'inhibiteur de la neuraminidase.

¹National Influenza Centre, Institut National d'Hygiène, Ministère de la Santé, Rabat, Morocco (correspondence to A. Barakat: barakat@yahoo.fr).

²Department of Biology, Faculté des Sciences, Université Mohammed VI - Agdal, Rabat, Morocco.

Received: 29/05/16; accepted: 29/08/16

Introduction

Human influenza is responsible for an estimated 250 000–500 000 deaths annually worldwide (1). Although vaccination remains the primary means for the prevention of influenza, antiviral drugs are a key component in the prophylaxis and treatment of the population at high risk of influenza-associated complications. Antiviral drugs might be the only medical intervention available during the early phases of a pandemic. Two classes of specific anti-influenza drugs have been developed to date: the M2 ion channel blockers (adamantanes) and the neuraminidase inhibitors (NAIs) (oseltamivir and zanamivir) (2).

Susceptibility of influenza B viruses to NAIs has been less studied than susceptibility of influenza A viruses. Influenza B viruses, classified into 2 genetic lineages Victoria and Yamagata, are circulating globally with unpredictable temporal and spatial distributions (3). Recently, low-level resistance to NAIs has been documented but the known molecular markers, transmissibility and fitness of NAI-resistant variants are not well established (4). A worldwide antiviral surveillance study of influenza B viruses from 2004 to 2008 identified 1 extreme outlier and 3 mild outliers among 1070 viruses tested (0.4%) (5). A later study among 346 influenza B viruses isolated worldwide during 2011 identified 2 (0.6%) with reduced susceptibility to NAIs (6). These resistant viruses can emerge under drug selection pressure or occur naturally without drug interventions (7), and are associated with amino acid substitutions at the conserved NA residues or in surrounding locations (8).

In this study, we evaluated the sensitivity to oseltamivir and zanamivir of influenza B viruses isolated from specimens collected from the National Influenza Surveillance System in Morocco during the 2014–2015 season.

Methods

Sample collection

Throat and nasal swab specimens were collected during the 2014–2015 season from outpatients presenting with influenza-like illness (ILI) and inpatients presenting with severe acute respiratory illness (SARI). ILI was defined as ARI with onset during the past 10 days, temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ and cough (9). SARI was defined as ARI with history of fever or temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ and cough, with onset of symptoms in the past 10 days and requiring hospitalization (10). After collection, the samples were immediately stored at 4°C until delivery to the National Influenza Centre located at the Institut National d'Hygiène in < 48 –72 hours (9,10).

Influenza B virus screening

Viral RNA was extracted directly from the collected specimens by automatic extraction (iPrep Purelink Virus Kit; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA 92008 USA). A 25- μL reaction volume contained 12.5 μL 2 \times polymerase chain reaction (PCR) Master Mix, 5.5 μL RNase-free water, 0.5 μL 40 μM reverse primer, 0.5 μL 40 μM forward primer, 0.5 μL 10 μM (influenza A or B), 0.5 μL enzyme mix (SuperScript III RT/Platinum Taq Mix; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA 92008 USA and 5 μL viral RNA extract. Amplification was carried out in a 7500 Fast 96-Well Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with a single reverse transcription step (50 $^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes), Taq inhibitor activation (95 $^{\circ}\text{C}$ for 2 minutes), PCR amplification over 45 cycles (95 $^{\circ}\text{C}$, 30 seconds/55 $^{\circ}\text{C}$, 30 seconds), according to the US Centers for Disease Control (CDC) protocol (11). Influenza B primers and probes were provided by CDC as part of a material transfer agreement that ensures privacy and non-publication.

Subtyping of influenza B virus lineages

The 25- μL reaction volume contained 12.5 μL 2 \times PCR Master Mix, 5.5 μL RNase-free water, 0.5 μL 25 μM reverse primer, 0.5 μL 25 μM forward primer, 0.5 μL probe 25 μM (Yamagata or Victoria; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA 92008 USA), 0.5 μL enzyme mix (SuperScript III RT/Platinum Taq Mix), and 5 μL viral RNA extract. Amplification was carried out in a 7500 Fast Thermocycler (Applied Biosystems) with a single reverse transcription step at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes, Taq inhibitor activation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes, and PCR amplification over 45 cycles (95 $^{\circ}\text{C}$, 10 seconds/54 $^{\circ}\text{C}$, 30 seconds/72 $^{\circ}\text{C}$, 10 seconds) (11).

Virus isolation

PCR-positive samples (100 μL) were inoculated into 2 wells of a 24-well plate with 70–90% confluent monolayers of MDCK cells. After 30 minutes adsorption at room temperature, 2 mL/well minimal essential medium supplemented with 2 mg/mL tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone trypsin was added. Cells were incubated in sealed bags at 35 $^{\circ}\text{C}$. After 2 days, viral multiplication was detected by haemagglutination assay using guinea pig red blood cells. Virus identification was carried out by haemagglutination inhibition test using WHO Haemagglutination inhibition reagent kits (12).

NAIs

Oseltamivir carboxylate, the active compound of the ethyl ester prodrug oseltamivir phosphate, was kindly provided by Hoffmann–La Roche (Basel, Switzerland), and zanamivir by GlaxoSmithKline (Uxbridge, UK).

Reference viruses

A matching pair (sensitive and resistant to oseltamivir and/or zanamivir) of reference viruses for each subtype to be tested was included in each assay run. The panel containing drug-sensitive/

resistant control virus pairs was delivered by the WHO Collaborating Centre, Melbourne (13).

Fluorescent NA inhibition assay

The phenotypic evaluation of influenza B virus susceptibility to NAIs was performed using the NA-Fluor Influenza Neuraminidase Assay Kit (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in 96-well, opaque black, flat-bottom microplates, according to the CDC protocol (available from the CDC upon request: flu-antiviral@cdc.gov). This assay utilized 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetyl neuraminic acid (MUNANA) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as substrate. Viruses were diluted at concentrations corresponding to the target fluorescence signal generated by 1000 pmol/well of 4-methylumbelliferone standard. Subsequently, 25 μ L of each diluted virus was mixed with 25 μ L of a range of concentrations of each NAI inhibitor (0.0015–4000 nM) and incubated at 37°C for 45 minutes. Then, 50 μ L of 200 mM MUNANA was added to the virus and inhibitor mixture and incubated at 37 °C for 1 hour. The reaction was stopped with 100 μ L NA-Fluor Stop Solution. Fluorescence was detected on the Victor X3 (WLSLH. Series Multilabel Plate Readers PerkinElmer, Inc. Waltham, MA 02451 USA) equipped with filters for excitation ($\lambda = 365$ nm) and emission ($\lambda = 450$ nm) (14).

Data analysis

Raw fluorescence NA inhibition assay data expressed as RFU were plotted against drug concentration (nM) to calculate the median 50% inhibitory concentration (IC₅₀) using JASPER version 1.2 curve-fitting software (CDC, Atlanta, GA, USA) (15).

Interpretation of IC₅₀ values

Fold changes in IC₅₀ were determined by comparing the IC₅₀ of test viruses

with the mean IC₅₀ (outliers excluded) according to drug and influenza type/subtype (16). IC₅₀ was interpreted using the WHO Antiviral Susceptibility Expert Working Group criteria for influenza B viruses: < 5-fold change in IC₅₀ represents normal inhibition; 5–50-fold change represents reduced inhibition; and > 50-fold change is highly reduced inhibition (17).

Sequencing of the NA gene

Real-time PCR was carried out for individual gene fragments with the primers panel from the CDC with PCR conditions as described in the MyTaq One-step RT-PCR Kit (Bioline, London, UK). The PCR products were purified using the GE Healthcare/USB ExoSAP-IT PCR Product Clean-Up (Affymetrix, Cleveland, OH, USA). Purified PCR products were sequenced with the use of the ABI Big Dye Terminator, version 3.1 (Applied Biosystems) and M13 primers (CDC protocol unpublished). The latest PCR products were purified using Big Dye X Terminator purification (Applied Biosystems)

and then analysed on an ABI 3130XL sequencer.

Sequencing analysis

The sequences of nine NA gene were assembled, edited and aligned using the Sequencher programme (version 4.10) (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). The construction of phylogenetic trees was performed using MEGA version 4.0 with the neighbour-joining method and bootstrap analysis of 1000 replicates.

Results

Influenza virus surveillance

From September 2014 to August 2015, 440 specimens were collected from 273 ILI and 167 SARI patients (Table 1). Two hundred and one (46%) specimens tested positive for influenza virus: 135 (31%) were type B, 38 (8%) were A(H1N1)pdm09 and 25 (6%) were A(H3N2). Subtyping of influenza B virus circulating in the 2014/15 season

Table 1 Demographic characteristics and influenza prevalence among patients with ILI and SARI, Morocco, 2014–2015

Characteristic	ILI (n = 273) No. (%)	SARI (n = 167) No. (%)	Total (n = 440) No. (%)
Age			
0–23 months	5 (1.8)	71 (42.5)	76 (17.3)
2–5 years	19 (7.0)	13 (7.8)	32 (7.3)
6–15 years	50 (18.3)	14 (8.4)	64 (14.6)
16–49 years	112 (41.0)	28 (16.8)	140 (31.8)
50–64 years	59 (21.6)	17 (10.2)	76 (17.3)
≥ 65 years	16 (5.9)	15 (9.0)	31 (7.1)
Unknown	12 (4.4)	9 (5.4)	21 (4.8)
Sex			
Female	155 (56.7)	81 (48.5)	236 (53.6)
Influenza subtype			
A (H1N1)pdm09	24 (8.8)	14 (8.4)	38 (8.6)
A (H3N2)	22 (8.1)	3 (1.8)	25 (5.7)
A unsubtypeable	NA	3 (1.8)	3 (0.7)
B	113 (41.4)	22 (13.2)	135 (30.7)
Negative	114 (41.8)	125 (74.9)	239 (54.3)

ILI = influenza-like illness; SARI = severe acute respiratory illness.

Table 2 NAI susceptibility of influenza B/Yamagata isolates by fluorescent NAI assay

NAIs	Origin of specimen	No. analysed	IC50 (nM)		
			Median (range)	Mean ± SD	NAI susceptibility (fold change)
<i>Oseltamivir</i>	ILI	28	33.94 (11.60–46.44)	31.98 ± 9.57	S (1)
	SARI	30	31.84 (12.04–59.01)	31.52 ± 11.17	S (1)
		2	225.40 (200.60–250.20)	225.44 ± 35.07	RS (6–8)
<i>Zanamivir</i>	ILI	28	3.45 (0.67–7.51)	3.37 ± 1.79	S (1)
	SARI	32	3.60 (0.56–8.61)	3.74 ± 2.11	S (1)

Median IC50 values for the drug among susceptible viruses (outliers excluded in calculation).

IC50 values calculated using JASPER curve-fitting software.

Mean and SD of IC50 values for the drug among susceptible viruses (outliers excluded in calculation).

Fold changes in IC50 determined by comparing IC50 of test viruses to the mean IC50 (outliers excluded) by respective drug and influenza type/subtype.

ILI = influenza-like illness; NAI = neuraminidase inhibitor; RS = reduced susceptibility; S = sensitive; SARI = severe acute respiratory illness; SD = standard deviation.

showed that all belonged to B/Yamagata/16/88 lineage.

Phenotypic analysis

Sixty of 135 influenza B viruses had a titre of ≥ 1 in 4 in the haemagglutination test and were subject to the NA inhibition assay. The assay showed that all influenza B viruses were sensitive to NAIs, except B/Morocco/176H/2015 and B/Morocco/CP10/2015, with IC50 values of 200.60 and 250.20 nM, respectively (Table 2). Therefore, these 2 viruses were considered as outliers and demonstrated a 6–8-fold reduced susceptibility to oseltamivir compared to the mean IC50 (31.52 nM) of the same virus types. The mean IC50 for all influenza B viruses tested, not including the outliers, for zanamivir (3.62 nM) was low compared with the mean IC50 for oseltamivir (31.74 nM), reflecting increased sensitivity ($\times 9$) of influenza B virus to zanamivir compared with oseltamivir.

Phylogenetic and molecular analysis

The NA of 9 of 60 influenza B virus strains tested in the fluorescent NA inhibition assay was sequenced: B/Morocco/CP10/2015, B/Meknes/35/2014, B/Sale//70/2014, B/Agadir/68/2014,

B/Morocco/176H/2015, B/Oujda/96/2014, B/Morocco/102/2015, B/Morocco/43H/2014 and B/Meknes/32/2014. The respective GISAID accession numbers were: EPI_ISL_216533, EPI_ISL_175139, EPI_ISL_17514, EPI_ISL_175086, EPI_ISL_215754, EPI_ISL_171966, EPI_ISL_215717, EPI_ISL_215716 and EPI_ISL_171964). The phylogenetic and molecular analysis of the 9 NA sequences (Figure 1) showed that they were related genetically to B/Phuket/3073/2013; the vaccine prototype strain for the 2015–2016 season (18). The NA of the 2 isolates with reduced sensibility to oseltamivir harboured the specific mutations of B/Phuket/3073/2013 (Figure 2). The B/Morocco/CP10/2015 strain collected from a deceased patient confirmed as influenza positive harboured the specific K371N amino-acid substitution mutation, which is not known to confer drug resistance on influenza B viruses.

Discussion

We analysed the antiviral susceptibility of the predominant influenza B virus circulating in Morocco during the 2014/15 season using the phenotypic

NA inhibition assay (NA Fluor Influenza Neuraminidase Assay kit) as well as sequencing of the NA gene. We found that all the influenza B viruses exhibited normal sensitivity for zanamivir. This is in accordance with studies of influenza drug susceptibility worldwide, in which only a few strains with reduced sensitivity to zanamivir have been reported (19,20). This could be explained by the characteristic structure and conformation of this drug. The higher structural homology with the NA natural substrate, sialic acid, and lower use of zanamivir (compared with oseltamivir) are the most probable factors to account for the infrequent isolation of zanamivir-resistant variants worldwide (8).

Sixty influenza B viruses isolated in MDCK cells and tested by fluorescent NA inhibition test were sensitive to oseltamivir (< 5 -fold change in IC50), except for 2 isolates that demonstrated a 6–8-fold reduced susceptibility compared with the mean IC50 (outliers excluded) according to drug and influenza virus type/subtype. Both isolates were collected from SARI patients without historical drug exposure. A few previous studies have revealed influenza B virus with reduced susceptibility to NAIs, particularly oseltamivir (2,21,22).

Acknowledgements

We would like to thank all the physicians and nurses in the public and private sector who contributed to the

collection of samples at the sentinel sites.

Funding: This work was supported through funding by the Centers for Disease Control and Prevention

(CDC) grant no. 5U51CI000469 and the WHO Pandemic Influenza Preparedness Framework.

Competing interests: None declared.

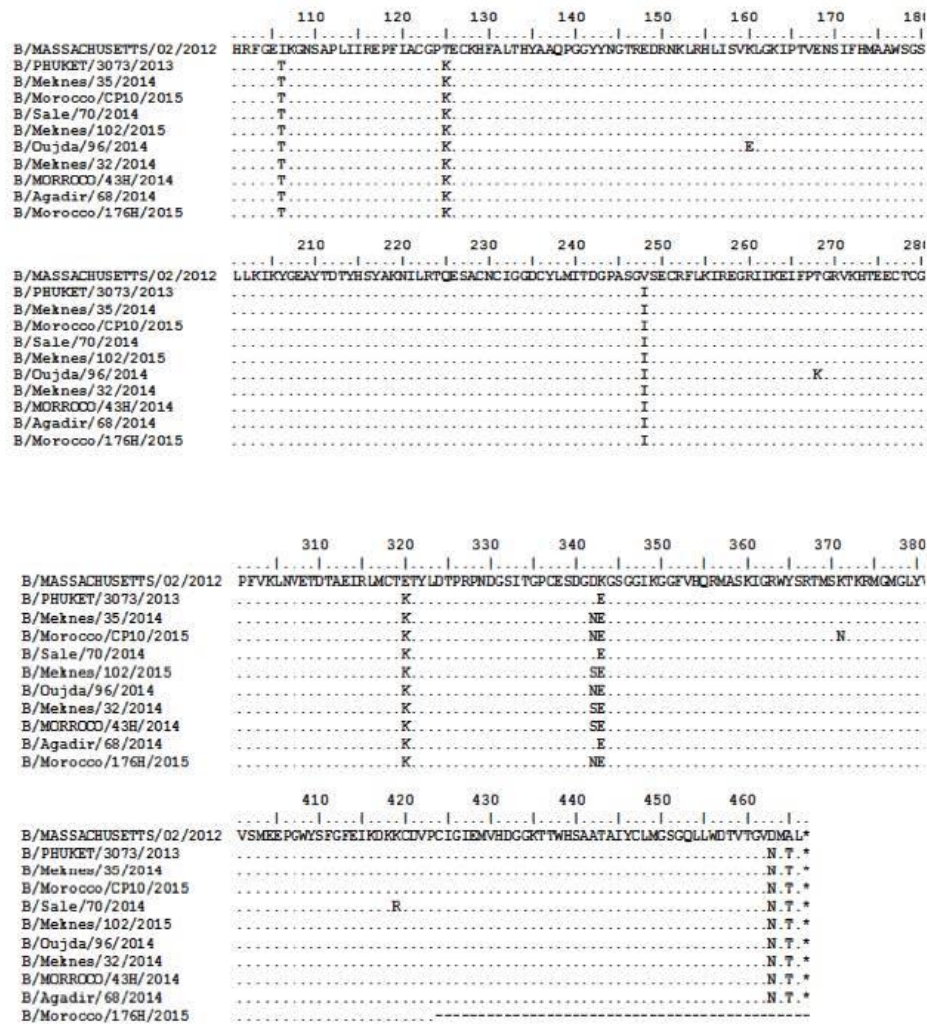


Figure 2 Comparison of amino acid sequences of NA gene of Yamagata lineage Moroccan influenza B virus strains with reference strain B/Massachusetts/02/2012, showing the specific substitutions.

References

- Schirmer P, Holodniy M. Oseltamivir for treatment and prophylaxis of influenza infection. *Expert Opin Drug Saf.* 2009;8(3):357-71.
- Wang D, Sleeman K, Huang W, Nguyen HT, Levine M, Cheng Y, et al. Neuraminidase inhibitor susceptibility testing of influenza type B viruses in China during 2010 and 2011 identifies viruses with reduced susceptibility to oseltamivir and zanamivir. *Antiviral Res.* 2013;97(3):240-4.
- Barr et al. 2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A (H1N1), A (H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 northern hemisphere season. *Vaccine.* 2010 Feb 3;28(5):1156-67.
- Burnham AJ, Baranovich T, Govorkova EA. Neuraminidase inhibitors for influenza B virus infection: efficacy and resistance. *Antiviral Res.* 2013;100(2):520-34.
- Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, Butler EN, Wallis TR, Klimov AI, Gubareva LV. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52:3284-3292.
- Okomo-Adhiambo M, Sleeman K, Lysen C, Nguyen HT, Xu X, Li Y, Klimov AI, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor susceptibility surveillance of influenza viruses circulating worldwide during the 2011 Southern Hemisphere season. *Influenza and other respiratory viruses.* 2013.
- Hatakeyama S, Ozawa M, Kawaoka Y. In vitro selection of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors *Clin Microbiol Infect.* 2011 Sep; 17(9): 1332-1335.
- Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther.* 2012;17:159-73.
- Barakat A, Ihazmad H, Benkaroum S, Cherkaoui I, Benmamoun A, Youbi M, et al. Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996-2009. *PLoS One.* 2011;6(9):e24579.
- Barakat A, Ihazmad H, El Falaki F, Tempia S, Cherkaoui I, El Aouad R. Pandemic influenza A(H1N1)2009 in Morocco, 2009-2010: epidemiology, transmissibility and factors associated with fatal cases. *J Infect Dis.* 2012;206 Suppl. 1:S94-100.
- WHO information for molecular diagnostic of influenza virus humans-update. Geneva: World Health Organization;2011(http://www.who.int/influenza/resources/documents/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201108, accessed 27 April 2016).
- Manual for the laboratory diagnostic and virological surveillance of influenza. Geneva: World Health organization;2011(http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/, accessed 24 May 2016).
- International Society for Influenza and Other Respiratory Virus Diseases. (<https://isriv.org/site/index.php/special-interest-groups/antiviral-group-home>, accessed 27 April 2016).
- Okomo-Adhiambo M, Michin VP, Sleeman K, Sagur E, Guevera H, Reisdorf E. Standardizing the influenza neuraminidase inhibition assay among United States public health laboratories conducting virological surveillance. *Antiviral Res.* 2016;128:28-35.
- Okomo-Adhiambo M, Sleeman K, Ballenger K, Nguyen HT, Mishin VP, Sheu TG, et al. Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: a laboratory surveillance perspective. *Viruses.* 2010;2(10):2269-89.
- Okomo-Adhiambo M, Nguyen HT, Anwar AE, Sleeman K, Fry AM, Gubareva LV. Drug susceptibility surveillance of influenza viruses circulating in the United States in 2011-2012: application of the WHO antiviral working group criteria. *Influenza Other Respi Viruses.* 2014;8(2):258-65.
- Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility Geneva, November 2011 and June 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012;87(39):369-80.
- Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season. Geneva: World Health Organization; 2012 (<http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>, accessed 27 April 2016).
- Monitoring of neuraminidase inhibitor resistance among clinical influenza virus isolates in Japan during the 2003-2006 influenza seasons. *Wkly Epidemiol Rec.* 2007;82(17):149-50.
- Sheu TG, Deyde VM, Garten RJ, Klimov AI, Gubareva LV. Detection of antiviral resistance and genetic lineage markers in influenza B virus neuraminidase using pyrosequencing. *Antiviral Res.* 2010;85:354-60.
- Bastien N, Gubbay JB, Richardson D, Sleeman K, Gubareva L, Li Y. Detection of an influenza B virus strain with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *Clin Microbiol.* 2011;49:4020-1.
- Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, Yamazaki M, Ichikawa M, Kimura K, et al. Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *JAMA.* 2007;297:1435-42.
- Ison MG, Gubareva LV, Atmar RL, Treanor J, Hayden FG. Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. *Infect Dis J.* 2006;193:760-4.
- Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M, Tamura D, Ichikawa M, Kimura K, et al. Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children. *Clin Infect Dis.* 2007;44(2):197-202.</jrn>
- Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, Maeda T, Kanazawa H, Kawashima T, et al. A comparison of the effectiveness of zanamivir and oseltamivir for the treatment of influenza A and B. *J Infect.* 2008;56:51-7.

Genomic Variability and Neuraminidase Inhibitor Drug Susceptibility Patterns of Influenza A/H1N1pdm09 Strains Circulating in Morocco during the 2015-2016 Season.

Fatima El FALAKI ^{1,2}, Abderrahman Bimouhen ^{1,2}, Hassan Ihazmad ¹, Zakia Rezagui ^{1,2}, Samira Benkerroum ¹, Youssef Bakri ², and Hicham Oumzil ¹.

1. National Influenza Center. Virology Department, National Institute of Hygiene. RABAT, Morocco.

2. Biochemistry Laboratory Faculty of sciences RABAT, Morocco.

Abstract

Introduction: Information regarding the genomic variability, molecular characteristic, and susceptibility profile to antiviral drug resistance are scarce for influenza A/H1N1pdm09 strains circulating in Morocco. The aims of this study are to survey genetic changes in the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes and to phenotypically assess the antiviral drug resistance (AVR) to neuraminidase inhibitors (NAIs) drugs-related mutations.

Method: During the 2015-2016 flu season, 1189 nasopharyngeal swabs samples were collected from influenza-like illness (ILI) and severe acute respiratory illness (SARI) patients in eight sentinel sites distributed throughout the country for virological surveillance. Positive A/H1N1pdm09 samples by reverse transcription real time PCR (rRT-PCR) were inoculated in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell line for virus isolation. Sequencing and phylogenetic analysis of HA and NA genes were performed to evaluate the genetic diversity of Moroccan A/H1N1pdm09 strains. AVR screening against two NA inhibitor (NAI's) drugs (oseltamivir and zanamivir) was performed on MDCK-propagated viruses using the functional neuraminidase inhibition assay.

Result: Among those 1189 specimens, 185 were A/H1N1pdm09, 59 A/H3N2, and 30 influenza B. Ninety-six of the 185 A/H1N1pdm09 propagated strains had aHA titer of at least 1:16 and were subjected to NAIs assay. Phylogenetic analysis of HA and NA genes revealed that Moroccan A/H1N1pdm09 isolates clustered with the predominate genetic group 6B.1.

Compared to the A/California/7/2009(H1N1) reference strain, significant amino acid changes such as S203T, S189T, K163Q, and S162N (N1 numbering) located in the antigenic site and S185T in receptor-binding domain were identified, which may have contributed with

enhanced virulence. The NA assay showed no increased resistance (normal inhibition) against both NAI drugs in all tested isolates.

Conclusion: This study confirms that A/H1N1pdm09 circulating strains in Morocco have undergone genetic variability and dynamic evolution. Surveillance of viral genetic evolution is important for implementation of disease management and appropriate public health intervention during influenza outbreaks.

Keywords: A/H1N1pdm09 viruses, genetic characteristic, amino-acid substitution, neuraminidase inhibitors, susceptibility profile.

1. Introduction

Human influenza is an acute respiratory infection transmitted via direct contact and respiratory droplets (Thorlund et al, 2011) causing respiratory illness and is responsible for significant mortality and morbidity during seasonal epidemics (Gunase et al,2012). About 3–5 million cases of severe influenza disease and 250,000–500,000 deaths occur every year (Talla Nzussouo et al , 2017). Between the two types of influenza viruses circulating in humans, type A and type B, influenza A virus is the more diverse virus (Devanchi et al, 2017). Accumulation of minor mutations within the antibody-binding sites on the two main viral surface proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA)(antigenic drift),or major changes due to genetic reassortment (antigenic shift) can result in the emergence of antigenically distinct viruses and be responsible of seasonal epidemics or pandemics, respectively)(Treanor et al,2004; Korsun et al,2017).In April 2009,a novel A/H1N1 virus emerged and spread rapidly; within 3 months ,it resulted in the declaration of pandemic level 6 by World Health Organization (WHO)(Barakat .,2012).The 2009 A/H1N1pdm09virus had a complex combination of gene segments from avian, swine, and human influenza viruses (Garten et al, 2009).Since 2010, the A/H1N1pdm09 strain replaced the seasonal A/H1N1 and became the endemic strain(Broor et al,2012).Molecular markers predictive of adaptation to humans are not currently present in the A/H1N1pdm09viruses, suggesting that previously unrecognized molecular determinants could be responsible for the transmission and establishment of this H1N1.It is imperative to study the antigenic sites which are keystone population immunity and viral fitness. Similarly, monitoring of the susceptibility of

influenza viruses to antiviral drugs particularly neuraminidases inhibitors (NAIs) is necessary to allow rapid detection of resistant viruses and prevention of further transmission (Korsun et al, 2017). Understanding the diversity and epidemiology of the virus is essential to devising strategies, both for the control of viral spread and in overcoming drug-resistance.(Al-Qahtani et al,2016).The WHO recommends that health authorities should monitor respiratory disease activity and circulation of the influenza A/H1N1pdm09 virus during the post-pandemic period to assess important genetic, antigenic, and functional changes associated with antiviral drug resistance. The main purpose of this study is to evaluate those viruses collected during the 2015-2016 season and to understand the A/H1N1pdm09genomic variability, the AVR to NAIs on strains circulating in Morocco, and the viral profiles compared to the rest of the region.

2. Materials and Methods

2.1. Collection and transport of clinical specimens

Oropharyngeal (OP) and Nasopharyngeal (NP) swabs specimens along demographic information were collected at the sentinel surveillance sites from enrolled patients presenting ILI and SARI symptoms. The specimens were placed in collection tubes containing 3ml of viral transport media (VTM). OP and NP swabs collected from the same patient were placed in the same VTM. The samples were immediately stored at 4°C and delivered to the national influenza centerwithin48 to 72 hours (Agrawal et al, 2009)

2.2. RNA extraction

Nucleic acid for influenza PCR was purified from clinical specimens using the automatic extraction method (iPrep™Purelink Virus Kit; Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA 92008 USA). Viral RNA for sequencing analysis was purified from isolates using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

2.3. One step real-time RT-PCR for the detection of influenza A/H1N1pdm 09

As described in the package insert of the CDC Human Influenza Virus Real-time RT-PCR Detection and Characterization Panel, each RNA extract was screened for influenza type A, influenza B, and human RNase P gene. Influenza A positive RNA extracts were further subtyped for influenza subtype H3, and the influenza A/H1N1pdm09 viral genes. (WHO.

2011) Specimens with amplification curve with a Cycle threshold of less than 37 were considered nucleic acid detected for any target assayed.

2.4. Virus isolation

Viral propagation was performed by inoculating 100 µl of samples confirmed positive for A/H1N1pdm09 into two wells of a 24-well plate with 70–90% confluent monolayers Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) cell line. After 30 min of adsorption at room temperature, 2 mL per well of minimum essential medium (MEM) supplemented with 0.18% Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V, 50 units/ml of penicillin, 50 µg/ml of streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 2 mg/ml of TPCK trypsin were added. Cells were then incubated in sealed bags at 35 °C. Viral replication was assessed by the HA assay. Viral isolates showing HA titers ≥ 16 up to two passages were selected for further sequencing and phenotyping analysis (WHO, 2011).

2.5. Sequencing and sequence analysis

Conventional PCR targeting HA and NA genes were performed on the nucleic acid extracts of the cell culture isolates. PCR products were purified and sequenced using the ABI Big Dye Terminator, version 3.1 (Applied Biosystems, Cat No 4337455, Foster City, USA) and M13 primers (CDC protocol unpublished) on an ABI 3130XL sequencer. The sequences of HA and NA genes were assembled, edited, and aligned using Sequencher® (Gene Codes Corporation, MI, USA). The phylogenetic analysis of the HA and NA genes were constructed using Mega 7.0 software by the neighbour-joining method with bootstrap analysis of 1000 replicates.

2.6. Nucleotide sequence deposition

The nucleotide sequence genes of HA and NA from this study have been submitted to the Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID). The accession numbers of the sequences and submitting laboratory are presented in the table 1.

Table 1: GISAID accession numbers for the haemagglutinin sequences (segment 4) and neuraminidase sequences (segment 6) of Moroccan influenza A/H1N1 09pdm strains

A/H1N12009pdm	accession of HA sequences	accession of NA sequences	Submitting laboratory
A/Morocco/ 11/2009	EPI316932	EPI316933	National Institute of Hygiene
A/Morocco/ 51/2009	EPI316935	EPI316936	National Institute of Hygiene
A/Morocco/ 49/2009	EPI316938	EPI316939	National Institute of Hygiene
A/Morocco/ 231/2016	EPI729910	EPI729911	National Institute of Hygiene
A/Morocco/ 602/2016	EPI729912	EPI729913	National Institute of Hygiene
A/Morocco/ 344/2016	EPI748990	EPI749891	National Institute of Hygiene
A/Benimellal/ 614/2016	EPI748820	EPI748821	Crick Worldwide Influenza center
A/Fes/ 644/2016	EPI748906	EPI748907	Crick Worldwide Influenza center
A/Meknes/ 344/2016	EPI730811	EPI737407	Crick Worldwide Influenza center
A/Morocco/ 472/2016	EPI921259	EPI921270	National Institute of Hygiene
A/Morocco/ 568/2016	EPI921376	EPI921377	National Institute of Hygiene
A/Morocco/ 654/2016		EPI921448	National Institute of Hygiene

2.7. Neuraminidase (NA) inhibition assay

The NAI phenotypic assay was performed to assess the susceptibility of the Moroccan A/H1N1pdm09 circulating strains to two NAIs drugs, oseltamivir carboxylate (Hoffmann–La Roche (Basel, Switzerland) and zanamivir (GlaxoSmithKline; Uxbridge, United Kingdom) using a fluorescent enzyme inhibition assay based on a previously published CDC protocol (Okomo-Adhiambo, 2016). Two viral strains controls, A/Perth/265/2009 (sensitive) and A/Perth/261/2009 (resistant) by the NAI's were included to validate each assay.

IC₅₀ analysis

Neuraminidase inhibition activity reciprocal to the fluorescence emitted by each drug concentration was used to calculate the overall median inhibitory concentration (IC₅₀) using

JASPER V1.2 curve-fitting software (Okomo-Adhiambo, 2016). Interpretation of the IC₅₀ was evaluated using the WHO AVWG criteria based on the fold change of IC₅₀ values compared with drug-sensitive reference virus IC₅₀ values. For influenza A viruses, a <10fold increase in IC₅₀ represents normal inhibition, and a 10–100 fold increase represents reduced inhibition, while a >100 fold increase is highly reduced inhibition (WHO, 2012).

3. Results

3.1. Influenza virological surveillance

From September 2015 to August 2016, a total of 1189 specimens were collected from ILI and SARI patients, referred to National Influenza Centre; Division of Molecular Virology, National Institute of Hygiene, Morocco. Using the real time RT-PCR, of 274 influenza positive cases, 185 were found to be A/H1N1pdm09 viruses, 59 A/H3N2 viruses, and 30 influenza B viruses (table 2).

Table 2: Demographic characteristics and influenza prevalence among patients with ILI and SARI, Morocco, 2015–2016

Characteristic	ILI (n = 624) No. (%)	SARI (n = 565) No. (%)	Total (n = 1189) No. (%)
Age			
0–23 months	38 (6.1)	327 (57.9)	365 (30.7)
2–5 years	62 (9.9)	62 (11.0)	124 (10.4)
6–15 years	68 (10.9)	20 (3.5)	88 (7.4)
16–49 years	296 (47.4)	63 (11.2)	359 (30.2)
50–64 years	100 (16.0)	41 (7.3)	141 (11.9)
≥ 65 years	42 (6.7)	28 (5.0)	70 (5.9)
Unknown	18 (2.9)	24 (4.3)	42 (3.5)
Gender			
Female	352 (56.4)	244 (43.2)	596 (50.1)
Influenza subtype			
A (H1N1) pdm09	124 (19.9)	61 (10.8)	185 (15.6)
A (H3N2)	51 (8.2)	8 (1.4)	59 (5.0)
B	24 (3.8)	6 (1.1)	30 (2.5)
Negative	425 (68.1)	490 (86.7)	915 (77.0)
<i>ILI = influenza-like illness; SARI = severe acute respiratory illness.</i>			

3.2. Phylogenetic characterization.

The phylogenetic trees of the HA and NA gene of A/H1N1pdm09 were constructed using sequences from both the Moroccan isolates and public databases (the Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID)). Phylogenetic analysis of the 10 HA and NA genes of the 2009 Pandemic H1N1 viruses circulating during 2015/2016 season demonstrate that the Moroccan isolates clustered with the strains of antigenic group 6B.1, the group that emerged at the end of 2016. High sequence identities were observed for HA and NA in influenza A/H1N1pdm09, displaying 85 and 99 % nucleotide identities, respectively, with the A/H1N1pdm09 Northern Hemisphere WHO vaccine strain A/California/07/2009 in the 2017-2018 season (Figure 1, Figure 2).

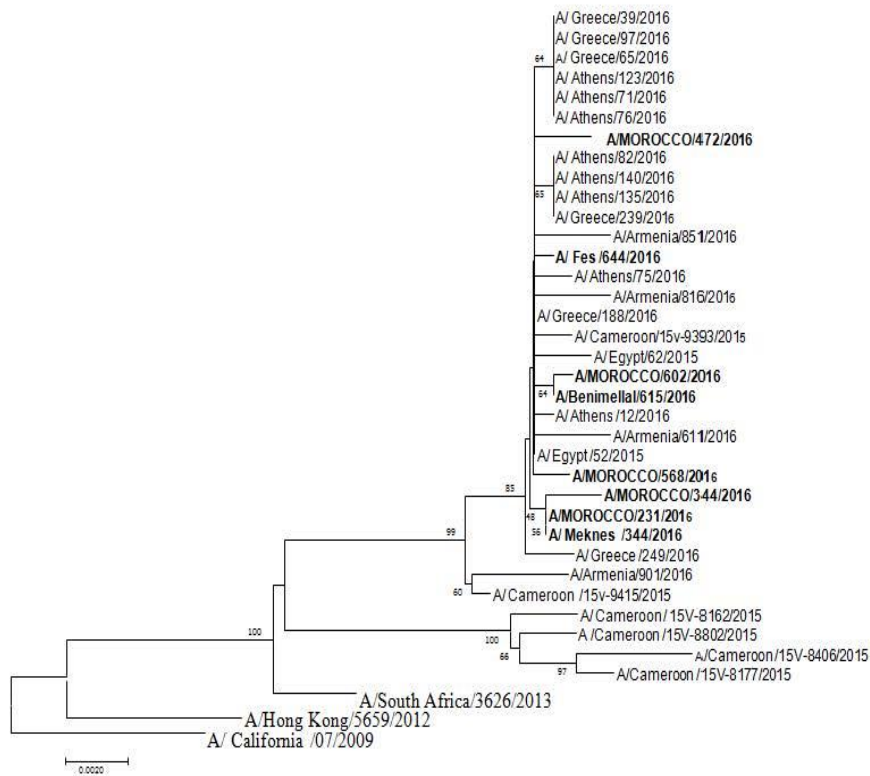


Figure 1. phylogenetic relationships of the HA of A/H1N1pdm09 viruses isolated in Morocco compared to vaccine strain, A/California/7/09. The tree was constructed with the Neighbour-Joining method with bootstrap analysis of 1000 replicates using Mega7 software.

3.3. Amino acid variations of HA gene.

Compare to the California strain of 2009 (A/California/7/2009), a significant amino acid change was identified. Using N1 numbering, P83S, S203T and I321V have been found to be consistent in A/H1N1pdm09 of 2009-2010 strains from the initial outbreak. Substitutions of D97N and S185T are characteristic of genetic group 6. K163Q, A256T, and K283E define group 6B, while S84N, S162N and N216T define subclade 6B1. Among the specific amino acid substitutions, four were located in antigenic sites: **S203T** in Ca and **S185T** in Sb domains, while **K163Q** and **S162N** were found in the Sa domain of HA gene. Analysis of the receptor-binding domain (RBD63-286) revealed amino acid variations of **S185T** in the 190 helix (184–195) regions of predicted antigenic sites of all HA sequences reported during the study season, while, the 130-loop (131–138) and 220-loop (218–228) structure were found to be highly conserved. In contrast, several minor changes were observed at positions **A256T** and **K283E** in HA1 and **E374K**, **S451N**, and **E499K** in the HA2 polypeptide. The notable features in the HA gene sequence of A/Fes/231/2016 were polymorphisms at residues 127 and 222 of HA1 (table 3). The HA D222G substitution is reportedly associated with severe disease (Salin et al.; 2010, Belser et al, 2011). All Moroccan viruses carried nine potential sites of N-glycosylation motifs in HA1 (10, 11, 23, 87, 162, 276, 287 and 154, 213 in HA2). S162N marker which is specific to the subclade 6B1 viruses creates a new potential N-glycosylation motif within the Sa antigenic site.

Table 3: Comparison of amino acid sequences of HA gene of A/H1N1pdm09 Morocco viruses with reference strain A/California/7/09, showing the specific substitutions.

Amino Acids HA	83	84	97	162	163	185	203	216	222	256	283	321	374	451	499
A/california/07/2009	P	S	D	S	K	S	S	I		A	K	I	E	S	E
A/Morocco/ 11/2009	S	T	.		.	.	V	.	.	.
A/Morocco/ 51/2009	S	T	.		.	.	V	.	.	.
A/Morocco/ 49/2009	S	T	.		.	.		K	.	.
A/Morocco/ 231/2016	S	N	N	N	Q	T	T	T		T	E	V	K	N	K
A/Morocco/ 602/2016	S	N	N	N	Q	T	T	T		T	E	V	K	N	K
A/Morocco/ 344/2016	S	N	N	N	Q	T	T	T		T	E	V	K	N	K
A/Beni mellal/ 614/2016	S	N	N	N	Q	T	T	T		T	E	V	K	N	K
A/Fes/ 644/2016	S	N	N	N	Q	T	T	T		T	E	V	K	N	K
A/Meknes/ 344/2016	S	N	N	N	Q	T	T	T		T	E	V	K	N	K
A/Morocco/ 472/2016	S	N	N	N	Q	T	T	T		T	E	V	K	N	K
A/Morocco/ 568/2016	S	N	N	N	Q	T	T	T		T	E	V	K	N	K

3.4. Amino acid variations of NA gene.

Globally, H275Y and N295S mutations in the NA polypeptide have been associated with multiple drug resistance in Influenza A (Nguyel et al, 2012). These two mutations were not detected in any of the nine isolates analyzed in this study. However, several other amino acid substitutions like N44S, N200S, V241I and N369K in genetic group 6 viruses; I34V L40I I321V N386K and K432E in genetic group 6B viruses; and V13I, K264I, N270K, and I314E in genetic group 6B.1 were detected. The 11 framework (E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294, E425) and eight functional (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, Y406) residues comprising the NA catalytic site (Neli Korsun et al, 2017) were conserved among all nine viruses (table 4). The Moroccan A/H1N1pdm09 viruses circulating during 2015-2016 carried eight conserved potential N-glycosylation motifs in the NA (position 42, 50, 58, 63, 68, 88, 146, and 235).

Table 4: Comparison of amino acid sequences of NA gene of A/H1N1pdm09 Morocco viruses with reference strain A/California/7/09, showing the specific substitutions.

Amino Acids NA	13	34	40	44	106	200	241	248	264	270	314	321	351	369	386	432
A/california/07/2009	V	I	L	N	V	N	V	N	V	N	I	I	Y	N	N	K
A/Morocco/ 11/2009	I	.	.	D	F	.	.	.
A/Morocco/ 51/2009	I	.	.	D	F	.	.	.
A/Morocco/ 49/2009	I	.	.	D	F	.	.	.
A/Morocco/ 231/2016	I	V	V	S		S	I	D	I	K	M	V	F	K	K	E
A/Morocco/ 602/2016	I	V	V	S		S	I	D	I	K	M	V	F	K	K	E
A/Morocco/ 344/2016	I	V	V	S		S	I	D	I	K	M	V	F	K	K	E
A/Benimellal/ 614/2016	I	V	V	S		S	I	D	I	K	M	V	F	K	K	E
A/Fes/ 644/2016	I	V	V	S		S	I	D	I	K	M	V	F	K	K	E
A/Meknes/ 344/2016	I	V	V	S		S	I	D	I	K	M	V	F	K	K	E
A/Morocco/ 472/2016	I	V	V	S		S	I	D	I	K	M	V	F	K	K	E
A/Morocco/ 568/2016	I	V	V	S		S	I	D	I		M		F	K	K	E
A/Morocco/ 654/2016	I	V	V	S		S	I	D	I	K	M	V	F	K	K	E

3.5. Phenotypic analysis

A total of 100 A/H1N1pdm09 virus samples had a titre at least > 1:8 in the haemagglutination and were subjected to the NAI assay. Using the standardised definitions for reporting NAI susceptibility data (WHO, 2012), the NAI test showed that all influenza A/H1N1pdm09 viruses tested in this study were sensitive to both drugs oseltamivir and zanamivir (table 5).

Table 5: NAI susceptibility of influenza A/H1N1pdm09 isolates by fluorescent NAI assay

NA inhibitors	origin of specimens	IC50(nM)			NAI Susceptibility (folder change)
		No. Analyzed (n)	Median [range]	Mean ± SD	
Oseltamivir[®]	ILI	56	1,29 [0,12 - 1,96]	1,31 ± 0,27	S(1)
	SARI	40	1,43 [1,10 - 1,70]	1,45 ± 0,16	S(1)
	Total	96	1,35 [0,12 - 1,96]	1,37 ± 0,24	S(1)
Zanamivir[®]	ILI	56	0,51 [0,15 - 1,59]	0,54 ± 0,27	S(1)
	SARI	40	0,53 [0,12 - 0,91]	0,50 ± 0,17	S(1)
	Total	96	0,51 [0,12 - 1,59]	0,53 ± 0,23	S(1)

*IC50 values were calculated using JASPR curve-fitting software.

*Fold changes in IC₅₀ determined by comparing IC₅₀ of test viruses to the mean IC₅₀ (outliers excluded) by respective drug and influenza type/subtype.

ILI= influenza like illness, NAI =neuraminidase inhibitor, S= sensitive, SARI =severe acute respiratory illness, SD =standard deviation.

4. Discussion

In Morocco, the first laboratory-confirmed A/H1N1pdm09 case was identified on 10 June 2009 in a 19-year-old woman travelling from Canada to Morocco (Barakat et al, 2012). In order to limit the communal spread, the Ministry of Health instituted an infection control plan, which included social distancing, early isolation of cases, and antiviral prophylaxis for close contacts of case patients. During the initial phase of the 2009 pandemic, antiviral drugs were prescribed for all patients with confirmed infection and close contacts. Thereafter, the drugs were recommended for persons with suspected influenza virus infections who were at high risk for severe disease. Over the six seasons since the 2009 A/H1N1pdm emergence, very little virological surveillance of the 2009 A/H1N1pdm in Morocco has been published. In order to understand the genetic changes and antiviral drug susceptibility of the 2009 A/H1N1pdm, phylogenetic analysis and amino acid modification of the 2015-2016 influenza viruses were examined.

The phylogenetic analysis of HA and NA genes demonstrated that circulating strains belonged to subclade 6B1. This subclade diverges genetically by the mutations they harbored compared to the prototype A/California/07/2009 strain. Among specific amino acid substitutions in HA genes sequences, four were located in antigenic sites: **S203T** in Ca and **S185T** in Sb domains along with **K163Q** and **S162N** were found in the Sa domain. Substitution **S185T** was located in the RBS/190 helix (Sriwilaijaroen et al, 2012). It has been reported that substitutions near or in the RBS can influence the antigenic properties of A/H1N1pdm09 strains (Koel et al, 2015). Certain amino acid substitutions such as **D222G** are associated with severe disease and poor outcome (Glinsky GV et al, 2010); only one of the Moroccan strains, A/Fes/231/2016, analyzed here displayed this mutation, thus a more accentuated surveillance is recommended. All of the HA genes sequences analyzed in this study present the **I321V** polymorphism. In contrast to the HA D222G mutation, the effect of retaining isoleucine at this position on disease severity has not been clearly demonstrated (Al-Qahtaniet Ahmed A et al, 2017). Substitutions such **E374** and **S451N** were also present in all the analyzed Moroccan strains. In addition to the variation in the antigenic sites of HA sequences; analysis was also done for number of N-glycosylation sequons in HA. Subclade 6B.1 viruses have an additional N-glycosylation motif. S162N substitution, specific to latter subclade generated a new potential N-glycosylation motif at residues 162-164 of HA within the SA antigenic site. Evolutionary studies of A/H1N1 strains indicate that the number of N-glycosylation site in HA is relatively conserved, but it appears to increase as influenza viruses

evolve (Melidou et al, 2010). The acquisition of N-linked glycosylation sites on the HA protein is thought to play a beneficial role for the virus by shielding antigenic sites from interaction with antibodies. (Cherry JL et al, 2009). In addition, the number and location of glycosylation sites on HA may alter neutralization antibody recognition (Job ER et al, 2014). NA active sites at catalytic and framework residues were also examined, and showed all the viruses isolates had conserved catalytic and framework residues. The isolates from Morocco are found to have the characteristic amino acid substitutions V241I and N369K. It has been documented that amino acid modification of V241I and N369K would improve protein stability in neuraminidase gene which would possibly improve oseltamivir-resistance and virus fitness (Fry et al, 2012). Furthermore, all strains examined in this study carried the N248D substitution. It has been suggested that mutation at the residue 248 alters the central part of an antibody recognition site on NA (Richard M et al, 2008). Located near H275, this N248D mutation may be associated with oseltamivir resistance (Giria MT et al, 2012). In Morocco, limited information is available on the drug resistant profiles of circulating A/H1N1pdm09 strains. To evaluate the impact of amino acid substitution to neuraminidase inhibitor susceptibility particularly oseltamivir and zanamivir, phenotypic assay of the representatives isolates (N=100) was performed. All studied viruses showed normal inhibition to both drugs. The decision by the Moroccan Ministry of Health to use NAIs, especially oseltamivir, as the treatment and control for persons with suspected influenza virus infections that were at high risk for severe disease is still recommended and effective.

5. Conclusion

Findings in the present study confirm that influenza A/H1N1pdm09 strains of subclade 6B.1 predominated in Morocco during the 2015/2016 season, as they remained antigenically closely related to the vaccine strain, despite some genetic changes located at the antigenic sites. Oseltamivir-resistance related mutations were not detected during the 2015-2016 study season. Accumulation of sporadic amino acid substitutions and active dynamic of variation in N-glycosylation sites in the genes of external glycoprotein HA and NA confirm the genetic instability of A/H1N1pdm09 viruses. It has been suggested that the new pandemic virus may not yet have completely adapted to the human population, signifying that further adaptive changes will lead to more virulence strains (Garten R et al, 2009). Our observation

emphasizes the importance of continuous genetic surveillance of A/H1N1pdm09 strains to monitor

Acknowledgements

We would like to thank all the physicians and nurses in the public and private network who contributed to the collection of samples at the sentinel sites.

Conflict of interest statement

We declare that none of us has any conflict of interest.

Financial support

This work was supported through funding by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) grant no. 5U51CI000469 and the WHO Pandemic Influenza Preparedness Framework

Reference

- [1] Thorlund K, Awad T, Boivin G, Thabane, L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect Dis* .2011; 11, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-134>.
- [2] Gunasekaran P, Krishnasamy K, Arunagiri K, Sambasivam M, Lakshmiathy M, ArunponFathima SG. Genetic analysis of HA gene of pandemic H1N1 2009 influenza viruses circulating in India. *Indian. J Med Microbiol* .2012 ; 30(3):346–349 <https://doi.org/10.4103/0255-0857.99500>.
- [3] Talla Nzussouo N, Duque J, Adedeji AA, Coulibaly D, Sow S, Tarnagda Z, et al. Epidemiology of influenza in West Africa after the 2009 influenza A(H1N1) pandemic, 2010–2012. *BMC Infectious Diseases*. 2017 ;17, 745. <http://doi.org/10.1186/s12879-017-2839-1>.
- [4] Gohil D, Kothari S, Shinde P, Meharunkar R, Warke, R, Chowdhary A, et al. Genetic Characterization of Influenza A (H1N1) Pandemic 2009 Virus Isolates from Mumbai. *Current Microbiology* . 2017; 74, 899–907. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1262-6>.
- [5] Treanor, J., 2004. Influenza vaccine—outmaneuvering antigenic shift and drift. *New England Journal of Medicine* 350, 218–220. <https://doi.org/10.1056/NEJMp038238>.
- [6] Korsun N, Angelova S, Gregory V, Daniels R, Georgieva I, & McCauley J. Antigenic and genetic characterization of influenza viruses circulating in Bulgaria during the 2015/2016 season. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017;49, 241–250. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.027>.
- [7] Barakat A, Ihazmad H, El Falaki F, Tempia S, Cherkaoui I, El Aouad R. 2009 Pandemic Influenza A Virus Subtype H1N1 in Morocco, 2009–2010: Epidemiology, Transmissibility, and Factors Associated With Fatal Cases. *The Journal of Infectious Diseases*. 2012; 206, S94–S100. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis547>.
- [8] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* .2009; 325(5937), 197-201. <http://doi.org/10.1126/science.1176225>.
- [09] Broor S, Gupta S, Mohapatra S, Kaushik S, Mir MA, Jain P, Dar L, Lal RB. Emergence of 2009A/H1N1 cases in a tertiary care hospital in New Delhi, India: Emergence of pandemic H1N1 in New Delhi, India. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2011; 5, e552–e557 <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00274.x>
- [10] Al-Qahtani AA, Mubin M, Dela Cruz DM, Althawadi SI, UIRehman MSN, Bohol MFF, et al. Phylogenetic and nucleotide sequence analysis of influenza A (H1N1) HA and NA genes of strains isolated from Saudi Arabia. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2017; 11, 81.<https://doi.org/10.3855/jidc.9259>.

- [11] Agrawal AS, Sarkar M, Chakrabarti S, Rajendran K, Kaur H, Mishra AC, et al. Comparative evaluation of real-time PCR and conventional RT-PCR during a 2 year surveillance for influenza and respiratory syncytial virus among children with acute respiratory infections in Kolkata, India, reveals a distinct seasonality of infection. *Journal of Medical Microbiology*. 2009; 58, 1616–1622. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.011304-0>
- [12] WHO information for molecular diagnostic of influenza virus humans-update. Geneva: World Health Organization; 2011
(http://www.who.int/influenza/resources/documents/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201108, accessed 12 October 2018).
- [13] Manual for the laboratory diagnostic and virological surveillance of influenza. Geneva: World Health organization; 2011
(http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/, accessed 12 October 2018).
- [14] Okomo-Adhiambo M, Mishin VP, Sleeman K, Sagar E, Guevara H, Reisdorf E, et al. Standardizing the influenza neuraminidase inhibition assay among United States public health laboratories conducting virological surveillance. *Antiviral Research*. 2016; 128, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.01.009>.
- [15] Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility geneva, November 2011 and June 2012. *Wkly Epidemiol Rec*.2012; 87(39):369-380.
- [16] Chutinimitkul S, Herfst S, Steel J, Lowen AC, Ye J, van Riel D, et al. Virulence-Associated Substitution D222G in the Hemagglutinin of 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Affects Receptor Binding . *Journal of Virology*.2010; 84(22), 11802–11813. <http://doi.org/10.1128/JVI.01136-10>.
- [17] Belser JA, Jayaraman A, Raman R, Pappas C, Zeng H, Cox NJ, Tumpey TM. Effect of D222G Mutation in the Hemagglutinin Protein on Receptor Binding, Pathogenesis and Transmissibility of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *PLoS ONE*. 2011; 6(9), e25091. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025091>.
- [18] Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *AntivirTher*. 2012;17(1 pt B):159–73.
- [19] Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* .2012; 88, 226–249. <https://doi.org/10.2183/pjab.88.226>.
- [20] Koel BF, Mögling R, Chutinimitkul S, Fraaij PL, Burke DF, vander Vliet S ,et al. Identification of Amino Acid Substitutions Supporting Antigenic Change of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses. *Journal of Virology* .2015; 89, 3763–3775. <https://doi.org/10.1128/JVI.02962-14>.

- [21] Glinsky GV. Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations. *Cell Cycle* 9. 2010; 958–970. <https://doi.org/10.4161/cc.9.5.10913>.
- [22] Melidou A, Gioula G, Exindari M, Chatzidimitriou D, Diza E, Malisiovas N. Molecular and phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of pandemic influenza H1N1 2009 viruses associated with severe and fatal infections. *Virus Research* . 2010 ; 151, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.005>.
- [23] Cherry JL, Lipman DJ, Nikolskaya A, & Wolf YI. Evolutionary Dynamics of N-Glycosylation Sites of Influenza Virus Hemagglutinin. *PLoS Currents*. 2009;1, RRN1001. <http://doi.org/10.1371/currents.RRN1001>.
- [24] Job ER, Deng YM, Barfod KK, Tate MD, Caldwell N, Reddiex S, et al. Addition of Glycosylation to Influenza A Virus Hemagglutinin Modulates Antibody-Mediated Recognition of H1N1 2009 Pandemic Viruses. *The Journal of Immunology*. 2013; 190, 2169–2177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202433>.
- [25] Fry A, Gubareva LV. Understanding Influenza Virus Resistance to Antiviral Agents; Early Warning Signs for Wider Community Circulation. *Journal of Infectious Diseases* . 2012; 206, 145–147. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis338>.
- [26] Richard M, Deléage C, Barthélémy M, Lin YP, Hay A, Lina B, et al. Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors. *Journal of Clinical Virology*. 2008; 41, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.021>.
- [27] Gíria MT, Rebelo de Andrade H, Santos LA, Correia VM, Pedro,SV, Santos MA. Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09. *Journal of Clinical Virology*. 2012 ; 53, 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.11.002>

Circulation of Respiratory Syncytial Virus in Morocco during 2014-2016: Findings from a sentinel-based virological surveillance system for influenza

A. Bimouhen¹, F. El Falaki¹, H. Ihazmad¹, Z. Regragui¹, S. Benkerroum¹ and A. Barakat¹

تجوال الفيروس المخلوي التنفسي في المغرب خلال الأعوام 2014-2016: نتائج مأخوذة من نظام لترصد فيروس الإنفلونزا

عبد الرحمان بيموحن، فاطمة الفلكي، حسن احزامض، زكية الركاكي، سميرة بنكروم، أمال بركات

الخلاصة: على الرغم من أن الفيروس المخلوي التنفسي يعتبر أحد الأسباب الرئيسية للوفيات والمراضة في أوساط صغار الرضع فلم يكن معروفاً سوى القليل عن أنماط وطُرُز تجواله في المغرب. أجرينا دراسة استباقية لترصد الإنفلونزا للكشف عن الفيروس المخلوي التنفسي بواسطة "تفاعل البلمرة المتسلسل - الزمن الحقيقي" لدى مرضى مصابين بأمراض تنفسية حادة سُجلوا خلال موسمين (2014-2015، 2015-2016). من الفترة ما بين سبتمبر/أيلول 2014 إلى أبريل/نيسان 2016 حصلنا على 1450 عينة، ثبتت إصابة 267 (18.4%) منها بالفيروس المخلوي التنفسي. وكانت نسبة العدوى المثبتة بالفيروس المخلوي التنفسي أعلى لدى المرضى الذين أدخلوا إلى المستشفى لإصابتهم بمرض تنفسي حاد مقارنة مع المصابين بأمراض خفيفة في العيادات الخارجية. وكانت أعلى نسب العدوى بالفيروس المخلوي التنفسي لدى الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 0 و 6 أشهر (45%; $p < 0.001$). وقد لوحظ ارتفاع في معدل الإيجابية بين ديسمبر/كانون الأول ومارس/آذار. لا يزال الفيروس المخلوي التنفسي عاملاً سببياً فيروسياً مهماً يسبب أمراضاً شبيهة بالإنفلونزا وأمراضاً تنفسية حادة وخيمة؛ خصوصاً في أوساط الرضع في المغرب. المطلوب مزيد من الترصد - باستخدام النظام الحالي - للوصول إلى فهم أفضل لوبائيات العدوى بالفيروس المخلوي التنفسي ولعوامل خطر الإصابة به.

ABSTRACT Respiratory syncytial virus (RSV) is a leading cause of mortality and morbidity in young infants, little was known on its circulation types and patterns in Morocco. We conducted a prospective study using sentinel-based influenza surveillance to detect RSV by real time PCR in patients with acute respiratory infections, enrolled during two seasons (2014/15, 2015/16). During September 2014–April 2016, we obtained 1450 specimens, of which 267(18.4%) tested positive for RSV. The proportion of positive RSV infection was higher in patients hospitalized with acute respiratory infection compared to those with mild symptoms in out-patient clinics. The proportion of RSV infection was highest in children aged 0–6 months (45%; $P < 0.001$). Higher positivity rate was observed between months of December and March. RSV remains important viral etiological agent causing influenza-like illness and severe acute respiratory infections especially among infants in Morocco. Further surveillance, is required to understand better the risk factors of RSV infections.

Circulation du virus respiratoire syncytial au Maroc de 2014 à 2016 : constatations provenant du système de surveillance virologique sentinelle de la grippe

RÉSUMÉ Bien que le virus respiratoire syncytial (VRS) soit l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les jeunes nourrissons, les modes et les tendances de la circulation de ce virus au Maroc sont très peu connus. Nous avons réalisé une étude prospective en recourant à la surveillance de la grippe basée sur des sites sentinelles dans le but de dépister le VRS grâce à la PCR en temps réel chez des patients souffrant d'infections respiratoires aiguës recrutés au cours de deux saisons (2014-2015 et 2015-2016). De septembre 2014 à avril 2016, nous avons prélevé 1450 échantillons, parmi lesquels 267 (18,4 %) se sont avérés positifs au VRS. La proportion d'infections positives au VRS était plus élevée chez les patients hospitalisés pour une infection respiratoire aiguë que chez les patients en consultation externe souffrant de légers symptômes. Cette proportion était la plus élevée chez les enfants de 0 à 6 mois (45 % ; $p < 0,001$). Le pic du taux de positivité a eu lieu de décembre à mars. Le VRS demeure un agent étiologique viral important au Maroc, responsable de syndromes de type grippal et d'infections respiratoires aiguës sévères, en particulier chez les nourrissons. Une surveillance renforcée est indispensable pour mieux comprendre les facteurs de risque des infections à VRS.

¹ Centre National de Référence de la Grippe, Institut National d'Hygiène, Ministère de la Santé, Rabat, Maroc.

Received: 25/08/2016; accepted: 22/09/2016

Introduction

Respiratory syncytial virus (RSV) is a leading cause of severe respiratory disease in infants, young children and immunocompromised and elderly populations worldwide with highest burden of disease in low-income and middle-income countries. (1). The RSV infects more than 60% of children in their first year of life (almost 100%) by age of 2 years) with peak hospital admission from RSV-related disease at 2-3 months. (2). In Morocco, 13% of paediatric deaths during 2012 were due to acute respiratory infections (3). The burden of RSV as attributable cause of death amongst these paediatric patients remained unknown.

Although respiratory infections can be caused by bacteria and fungi, viruses remain the most frequent etiological agents (4). Respiratory syncytial virus (RSV) is recognized to be the most important viral pathogen causing acute lower respiratory tract infection in young children less than five years of age causing seasonal outbreaks worldwide (5,6). While RSV is a common agent of respiratory infections causing bronchiolitis, pneumonia, and chronic obstructive pulmonary infections in people of all ages, RSV is also responsible for nosocomial infections resulting in prolonged hospital stay in intensive care units resulting in worsening the prognosis of the patients. RSV is seasonal, occurring in the winter months in temperate climates (7).

RSV is a non-segmented negative-sense single-stranded enveloped RNA virus that belongs to the family of *Paramyxoviridae*, genus *Pneumovirus*, subfamily *Pneumovirinae*. There are two subgroups of the virus, A and B, which distinguishes on both genetic and antigenic sides (8).

In Morocco, there are limited data on the circulation of RSV, its sub-types as well as the pre-dominant epidemiological and clinical characteristics of the

RSV infection. In an effort to address this gap, virological data from the existing influenza surveillance system in the country was used to understand characteristics and circulating patterns of RSV in patients with acute respiratory infections admitted in either hospitals or seen at out-patient clinics in Morocco over the period of 2014-2016.

Methods

Study design and case definition

The Ministry of Health of Morocco established a sentinel-based influenza surveillance system in 1996 (9). The surveillance system for influenza and influenza-like illness (ILI) was revamped in 2014 that currently includes- (i) surveillance system for severe acute respiratory infection (SARI) using the WHO's case definition for SARI (10). The system collects data from 8 public sector general hospitals located in all the eight regions in the country; (ii) surveillance system for influenza-like illness (ILI) using the WHO's case definition for ILI (10). The system collects data from out-patients over 425 out-patient clinics in both public and private sector.

While the SARI surveillance is conducted throughout the year for hospitalized patients. Both epidemiological and virological data are collected from all SARI cases that meet the WHO's case definition for SARI. The patients admitted in either paediatrics, pneumology or internal medicine are enrolled for the SARI surveillance system.

The surveillance system for ILI is conducted in 375 public sector out-patient clinics and aggregated data (number of ILI cases out of total consultations, etc) on total ILI and ARI consultations are collected from all these 375 public sector clinics. Of these, 8 out-patient clinics collect specimen for virological testing only. The first five

cases meeting the WHO's case definition for ILI are enrolled for specimen collection.

In addition to the public sector clinics, the ILI surveillance system in Morocco also uses a private practitioner network comprising of 50 physicians (including general practitioners, pediatricians and lung specialists) located in 9 large cities across the country (Tanger, Fès, Meknès, Oujda, Casablanca, Rabat, Marrakech, Agadir and Laayoune). The physicians enroll the first 5 ILI cases per day during October through April for specimen collection

For the purpose of understanding the circulation and characteristic of circulating RSVs, the National Influenza Center (NIC), based in Rabat, Morocco, collected and tested the patient's specimens from its existing influenza surveillance system for RSVs over a period from September 2014 to April 2016. Additional epidemiological data using a standardized data collection instrument were also collected from 8 SARI and 33 ILI sites. Patient's specimens from a total of 1450 patients meeting the case definition for either ILI and SARI were collected.

Sample and data collection

Both nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs were collected from 1450 patients who met the case definition for either ILI or SARI. The specimens were placed in tube containing 3 mL of viral transportation medium (VICUM), stored at 4°C at the health facilities, and sent to the NIC within 48 hours. A standardized questionnaire with patient-specific information (medical history, clinical symptoms, demographic and epidemiological data) was filled up by trained personnel.

Nucleic acid extraction

Total nucleic acids were extracted automatically from 400 µL of samples, using a High Pure Viral Nucleic Acid Kit and iPrep instrument, according to the manufacturer's instructions

(Lifetechnologies, Carlsbad, USA), thereafter (RNaseP) was considered as the internal control during extraction of human specimens. 100µL of extracted nucleic acids were stored at -70°C until processing.

Detection of RSV& Influenza by real time RT-PCR

All enrolled patients were tested for both influenza and RSV viruses. Detection of these two viruses was performed in 5µL volume using Invitrogen' Super-script III Platinum' One-step RT-PCR, amplification and reaction conditions were in accordance to the protocols developed by Centers for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, GA) (11,12), with an ABI 7500 Fast Sequence Detection System.

Subtyping of RSV by real time RT-PCR

The real-time RT-PCR for Subtyping RSV was performed with primers specific to the N gene of RSVA and RSVB, the amplification protocol was 50°C for 30 min, followed by 95°C for 2 min, and then by and 45 cycles of 15 s at 94°C, and 35 s at 55°C (13,14).

Statistical analysis

To describe the temporal distribution of RSV positive cases, we aggregated RSV results as obtained by RT-PCR by calendar month and week. Demographic, clinical and virological data for all enrolled patients were entered into a database created using Epi Info 7.1. Group comparisons were performed using χ^2 or Fisher's exact test for the dependency/relationship between two variables. P-values <0.05 were considered statistically significant. Data analysis was conducted using the same software.

Ethical considerations

The protocol was approved by the Ministry of Health for the objective of conducting surveillance of respiratory diseases with epidemic potential, in

which participants remain anonymous, and therefore did not require an assessment of the ethics committee or IRB approval. Verbal consent was obtained from all patients.

Results

Demographic characteristics

During the period of 2014–2016, patient's specimens were collected from 1450 patients meeting the WHO's case definition for ILI and SARI from all age groups from 41 sentinel sites for SARI and ILI. An NP/OP swab was collected from all those patients. Of those, 842 (58%) patients specimens were collected from the ILI sites while the remaining 608 (42%) patients specimens were enrolled from the SARI sentinel sites. The proportion of females was slightly greater than the proportion of males whose specimens were collected during the period of 2014–2016. (52.2% vs. 47.8%). The mean age in years of patients was 24.41 years (± 23.69) and the median age was 18.00 years [0.08–89.00]. A total of 503 cases (35%) were younger than 5 years, 608 cases (42%) were aged between 5–49 years while 283 patients (20%) were older than 50 years (Table 1). Among the eight regions, highest number of patients specimens were collected from Fes-Meknes (549/38%) followed by Rabat –Sale –Kenitra (405/28%). Patients were enrolled for this study throughout the year but during the first quarter (January–April), the number of enrollment was higher compared to other quarters.

Detection rates of RSV, percentages of positives and subgroups

Of the 1450 specimens tested from both ILI and SARI, a total of 267 specimens were positive for RSV by RT-PCR resulting in the detection rate of 18.4% (267/1450). The detection rate for RSV, plausibly, was comparably

higher amongst the patients presenting with SARI than ILI (73% vs. 27%). The proportion of RSV infection detection was highest in children ($P < 0.001$), aged between 0–6 months (45% ;121/267) followed by those aged between 7–23 months old (19%; 52/267), children aged between 2–4 years (12%;31/267) and adults between 15–49 years (9%; 25/267).

We were able to determine the subtypes of RSV in all 267 samples that were positive for RSV. During 2014/15 season, 92%(80 of 87) of RSV strains were sub-typed as RSV A which was the predominant strain compared to only 8%(7 of 87) of RSV strains sub-typed as RSV-B. On the other hand, RSV B was the predominantly circulating during 2015/16 season accounting for 70.5% of all RSV strains circulating in the country during this period (127 patients with RSV Group B among 180 RSV positive samples in 2015/16) (Figure 1).

RSV seasonal distribution and co-circulation with influenza viruses

Throughout the period under observation, the RSV showed a periodic circulating pattern. Positivity rate is predominately observed to have occurred from November to March of the year (during the fourth and the first quarters of year each season; $P < 0.001$); peaks were detected during week 52 of 2014 and week 03 of 2016 (Figure 2).

The largest proportion of samples (89%) were collected from patients in main five regions of the country: Fes-Meknes, Rabat-Sale-Kenitra, Souss-Massa, Beni mellal-Khenifra and Oriental. Most of RSV-positive samples (97%; $P < 0.001$) were collected from these 5 regions. During the period of 2014–2016, both the RSV and Influenza viruses (Table 2) were also observed to be co-circulating (18%; 267/1450 versus 31%; 447/1450)

Table 1: Demographic and clinical characteristics of patients with influenza-like illness (ILI) and severe acute respiratory infections by Respiratory Syncytial Virus infection status, Morocco, 2014–2016.

	No of patients enrolled N=1450 n (%)	RSV-Positive N=267 (18%) n (%)	RSV-Negative N=1183 (82%) n (%)	P-value	
Age (n=1395)					
0-6 month	217 (15)	121 (45)	96 (8)		
7-23 month	153 (11)	52 (19)	101 (9)		
2-4 year	134 (9)	31 (12)	103 (9)		
5-14 year	150 (10)	7 (3)	143 (12)	< 0.001	
15-49 year	458 (32)	25 (9)	433 (37)		
50-64 year	200 (14)	16 (6)	184 (16)		
>65 year	83 (6)	7 (3)	76 (6)		
unknown	55 (4)	8 (3)	47 (4)		
Sex					
Female	757 (52)	129 (17)	628 (83)	0.159	
Male	693 (48)	138 (20)	555 (80)		
Clinical symptoms					
onset of symptoms					
>10 days		35 (15)	198 (85)	0.145	
<10 days		232 (19)	985 (81)		
Fever (n=752)					
≤ 37.5 C		3 (12)	22 (88)	0.458	
>37.5 C		129 (18)	598 (82)		
Cough					
Yes		246 (20)	975 (80)	< 0.001	
No		21 (9)	208 (91)		
The regions (n=1450)					
Fes-Meknes	549 (38)	133 (50)	416 (35)		
Rabat-Sale-Kenitra	405 (28)	49 (18)	356 (30)		
Souss-Massa (Agadir)	159 (11)	41 (15)	118 (10)		
Beni mellal-Khenifra	98 (7)	27 (10)	71 (6)	< 0.001	
Oriental (Oujda)	88 (6)	9 (3)	79 (7)		
Tanger-Tetouan	92 (6)	4 (2)	88 (7)		
Marrakech-Safi	52 (4)	4 (2)	48 (4)		
Laayoune-Dakhla	7 (0)	0 (0)	7 (0)		
Season					
First Quarter	1033 (71)	230 (86)	803 (68)		
Second quarter	41 (3)	1 (0)	40 (3)		< 0.001
Third quarter	11 (1)	0 (0)	11 (1)		
Fourth quarter	365 (25)	36 (13)	329 (28)		
Syndrome					
ILI	842 (58)	73 (27)	769 (65)	< 0.001	
SARI	608 (42)	194 (73)	414 (35)		

*Some data variables from age, clinical syndrome and regions have not been included in the analysis owing to incomplete data.

Clinical manifestations

For all age groups, the commonest presenting symptoms of RSV-positive

cases were cough (92.1%; $P < 0.001$).

The onset of symptoms for RSV-positive patients was in 19% of patients

within 10 days of admission while it

was 81% for RSV-negative patients (81%; $P = 0.145$). Fever (>37.5 C) was

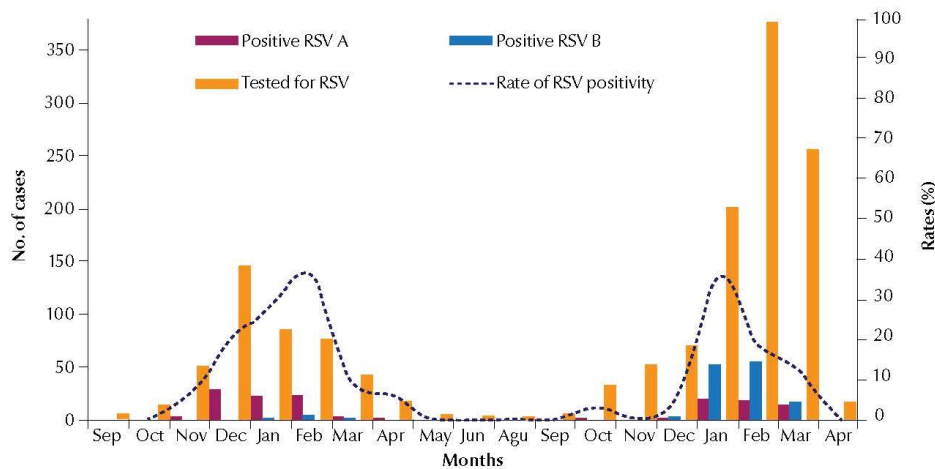


Figure 1 Samples tested for RSV, proportion positive for RSV A and RSVB, and positivity rates by months, Morocco, September 2014–April 2016.

found in only 18% (129/752) of RSV-positive patients compared with RSV-negative patients (82.0%; $P = 0.458$). Further, in infants aged between 0–6 months affected by RSV, only 60.3% (73/121) presented with fever during the period the data were collected.

Discussion

Using data from sentinel-based surveillance system for influenza, we report for the first time ever the circulating patterns of RSV in Morocco during 2014–2016. We have detected RSV by singleplex Real-Time RT-PCR in patients with severe acute respiratory infections who were enrolled in the sentinel-based influenza surveillance network in Morocco during the period of 2014–2016. Among the patients whose specimens were collected during 2014–2016 from the SARI and ILI sentinel sites, the rate of RSV positivity was 18.4%.

Although, RSV was detected in all age groups, the proportion of positive cases for RSV was comparatively higher in children aged between 0–6 months amongst all age groups which

was statistically significant. Children below 5 years of age comprised of 35% of all patients enrolled in this study while the RSV detection rate in children under 5 years of age was 76%. This rate was high compared to the findings reported in USA and Turkey with 18% and 24.5% respectively (6–15). Similar to our findings, Weber et al. reported higher percentage of RSV-infection in children less than 6 months of age in developing countries (16). In this study, the higher percentage of RSV infection among infants may probably be due to nosocomial spread of the virus within paediatric care units during the high circulating season of RSV. However, there is no data to substantiate this assumption. Indeed, some authors suggested RSV as the major cause of nosocomial outbreak during its annual outbreaks, specially among the children admitted in the paediatric unit (17).

Consistent with other studies (1, 4–6), we also found that proportion of patients with respiratory illness who tested positive for RSV varied with age, with the highest overall detection rate occurring in infants less than 6 months

of age during 2014–2016 (45%; $P < 0.001$) making this age category the highest priority target population for the candidate vaccines (1,18).

The circulation of RSV follows a clear seasonality pattern. In temperate climate, RSV usually circulates during the winter season from November to April. Epidemics of RSV occurs when the circulation of influenza virus peak in the period from October through April (9). Although no clear seasonal pattern on the circulation of RSVs could be gathered from these data, the detection rate for RSV-positive infection was highest from November to March every year (during the fourth and the first quarter; $P < 0.001$) while the detection rate was observed to have peaked in our study during week 52 of 2014 and week 3 of 2016. Similar circulating pattern has been observed in other temperate countries, where RSV-positive infection rate begins in late fall or early winter, peaks between mid-December and early February, and offset in late spring (7,8,16). Alternating strong early onset epidemics with more moderate and

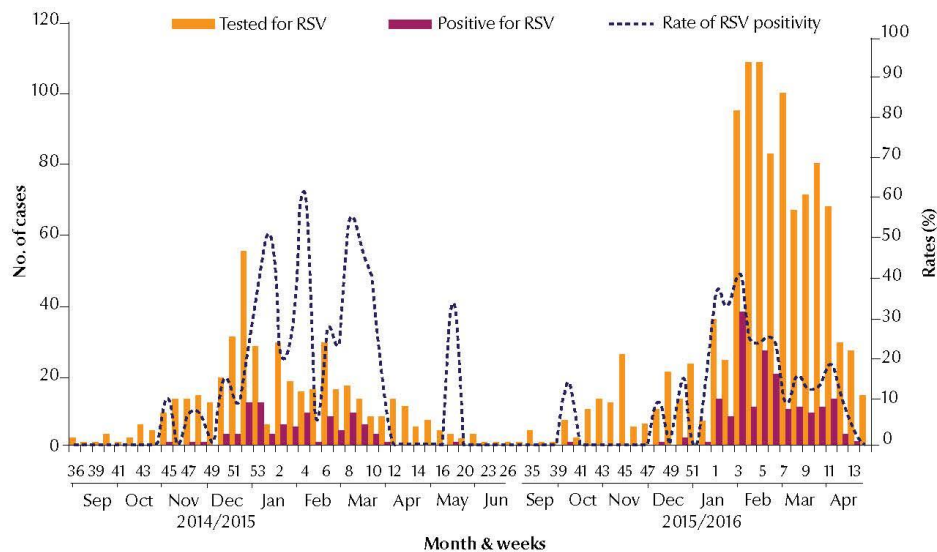


Figure 2: Samples tested for RSV and proportion positive for RSV by weeks and -months, Morocco, September 2014–April 2016

later epidemics have also been reported in the temperate region (19).

The data reveal that that RSV positivity was highest among patients enrolled from five regions (Fes-Meknes, Rabat -Sale -Kenitra, Souss-Massa, Oriental and Beni mellal-Khenifra) reaching to a combined rate of approximately 97%. This could be due to fact that these regions are most populated in Morocco and therefore, comparatively higher numbers of patients were enrolled (89%) from these regions than the other remaining regions in the SARI and ILI surveillance system.

In addition to the higher percentage of RSV infection in infants aged

0–6 months, we also observed in our study that 40% of these infants infected with RSV did not have fever as the predominant presenting symptom during 2014–2016. Indeed, WHO reported that nearly half of RSV-infected children do not show fever as the presenting symptom (20). Another report found that the burden of RSV would have been under-estimated by 50–85% among young children if only SARI and ILI case definitions are used to pick up a probable RSV infected children. This underlines the importance of using WHO's case definition for ARI as more suitable and highly sensitive for RSV surveillance amongst children (21).

In our data, both subtypes of RSV were detected during each season. While higher number of RSV group A viruses (92%) were detected amongst patients who were tested positive for RSV during 2014/15, the pattern was changed during the following season of 2015/16. During this period, there was a decline in the circulation of RSV group A viruses and RSV group B viruses predominantly circulated during this season accounting for 70.5% of all RSV-infected cases. Esposito et al. reports that RSV has complex circulation patterns characterized by periodic replacement of the predominant genotypes with new one during successive epidemic seasons (22). Additional investigations are needed to determine the genotypes of RSV strains circulating in Morocco, since many reports described the novel RSVA genotype ON1 in the world as well as the increasing spread of the RSV group B virus genotype BA.

There are several limitations to the way these data presented in this

Table 2 Influenza and RSV positivity rate among ILI and SARI patients, Morocco, 2014–2016.

Pathogen	RT-PCR Test Results		Total
	Negative	Positive	
RSV	1,183 (82%)	267 (18%)	1,450 (100%)
Influenza virus	1,003 (69%)	447 (31%)	1,450 (100%)

manuscript need to be interpreted. First, our sample size was small. We did not collect swab specimens from all patients meeting the case definition for ILI and the possibilities that some SARI patients that were eligible for enrolment were not included for patient's specimen collection owing to either incorrect use of case definition or selection bias cannot be ruled out. Hence there are possibilities for sampling bias in some cases. Second, data on the full epidemiological spectrum of patients positive for RSV infection including the risk factors were not collected. Third, owing to small sample size, the association between RSV subtypes and other clinical and epidemiological characteristics and severity of infection could not be established. Fourth, to establish seasonality of the RSV's circulating patterns,

more time-series analysis of data are required over 3 to 5 year period. Finally, the molecular characterization of the RSV group viruses could not be done during this study.

Conclusion

This study underscored the importance of RSV as a viral aetiological agent causing both mild and severe acute respiratory infections in Morocco, especially in children aged less than 5 years. Additional sentinel based surveillance embedded in influenza surveillance will be required to be established in order to fully understand the burden of disease caused by RSVs including epidemiology, seasonality and risk factors for the RSV infection in Morocco. Further research will also be required

using molecular epidemiology for characterization of predominantly prevalent RSV strains in different regions of Morocco and its prevalent age groups for early detection of emerging genotypes responsible for causing periodic outbreaks.

Acknowledgments

We would like to acknowledge all the physicians and nurses in the public and private network who have contributed to the collection of samples at the sentinel sites.

Funding: This work was supported through funding by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) grant no. 5U51CI000469 and PIP.

Conflicting interests: None declared.

References

- Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res.* 2011 Dec;162(1-2):80-99. PMID:21963675
- WHO. The World Health Report 2003: Shaping the Future. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
- Imane Jroundi, Chafiq Mahraoui, Rachid Benmessaoud, Cinta Moraleda, Badr Sououd Benjelloun and Quique Bassat. Knowledge gaps on paediatric respiratory infections in Morocco, Northern Africa. *Archives of Public Health* 12/2015; 73(1). DOI:10.1186/s13690-015-0076-x.
- Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TF, Silveira HL, Nepomuceno LL, et al. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 May;101(3):301-6. PMID:16862327
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010 May 1;375(9725):1545-55. PMID:20399493
- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009 Feb 5;360(6):588-98. PMID:19196675
- Aitken C, Jeffries DJ. Nosocomial spread of viral disease. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jul;14(3):528-46. PMID:11432812
- Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus—a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013 Dec;45(3):331-79. PMID:23575961
- Barakat A, Ihazmad H, Benkaroum S, Cherkaoui I, Benmamoun A, Youbi M, et al. Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996-2009. *PLoS One.* 2011;6(9):e24579. PMID:21931764
- World Health Organization (WHO). WHO surveillance case definitions for ILI and SARI. Geneva: WHO. January 2014. [Accessed 11 Jul 2016.] Available from: <http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/ili_sari_surveillance_case_definition/en/>
- Centers for Disease Control and Prevention. Real-time RT-PCR assays for non-influenza respiratory viruses. Version 1.4 (unpublished), Atlanta: CDC, 2009.
- WHO. CDC protocol of real time RT-PCR for detection and characterization influenza 2009 A (H1N1) pdm virus. 2009.
- Hu A, Colella M, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):149-54. PMID:12517840
- de-Paris F, Beck C, Machado AB, Paiva RM, da Silva Menezes D, de Souza Nunes L, et al. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods.* 2012 Dec;186(1-2):189-92. PMID:22796284
- Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, Yalaz M, Saz EU, Pullukçu H, et al. [Prevalence and seasonal distribution of respiratory viruses in patients with acute respiratory tract infections, 2002-2014]. *Mikrobiyol Bul.* 2015 Apr;49(2):188-200. PMID:26167819
- Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health.* 1998 Apr;3(4):268-80. PMID:9623927
- Mlinaric-Galinovic G, Varda-Brkic D. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000 Aug;37(4):237-46. PMID:10974574
- Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine.* 2013 Apr 18;31 Suppl 2:B209-15. PMID:23598484

19. Freymuth F, Vabret A, Dina J, Cu villon-Nimal D, Lubin C, Vau-decrane A, et al. Les virus des bronchiolites aiguës. *Arch Pediatr*. 2010 Aug;17(8):1192–201. PMID:20558050
20. Global Influenza Programme WHO. Informal Consultation on Surveillance of RSV on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) Platform. Geneva. World Health Organisation, 2015(WHO/HSE/PED/GIP/RSV/2015.01).
21. Saha S, Pandey BG, Choudekar A, Krishnan A, Gerber SI, Rai SK, et al. Evaluation of case definitions for estimation of respiratory syncytial virus associated hospitalizations among children in a rural community of northern India. *J Glob Health*. 2015 Dec;5(2):010419. PMID:26649172
22. Esposito S, Piralla A, Zampiero A, Bianchini S, Di Pietro G, Scala A, et al. Characteristics and Their Clinical Relevance of Respiratory Syncytial Virus Types and Genotypes Circulating in Northern Italy in Five Consecutive Winter Seasons. *PLoS One*. 2015 06 05;10(6):e0129369. PMID:26047100

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Distribution of influenza virus types by age using case-based global surveillance data from twenty-nine countries, 1999-2014

Saverio Caini^{1*}, Peter Spreeuwenberg¹, Gabriela F. Kuszniarz², Juan Manuel Rudi², Rhonda Owen³, Kate Pennington³, Sonam Wangchuk⁴, Sonam Gyeltshen⁴, Walquiria Aparecida Ferreira de Almeida⁵, Cláudio Maiorovitch Pessanha Henriques⁵, Richard Njouom⁶, Marie-Astrid Vernet⁶, Rodrigo A. Fasco⁷, Winston Andrade⁷, Hongjie Yu⁸, Luzhao Feng⁸, Juan Yang⁸, Zhibin Peng⁸, Jenny Lara⁹, Alfredo Bruno¹⁰, Doménica de Mora¹⁰, Celina de Lozano¹¹, Maria Zambon¹², Richard Pebody¹³, Leticia Castillo¹⁴, Alexey W. Clara¹⁵, Maria Luisa Matute¹⁶, Herman Kosasih¹⁷, Nurhayati¹⁷, Simona Puzelli¹⁸, Caterina Rizzo¹⁹, Herve A. Kadjo²⁰, Coulibaly Daouda²¹, Lyazzat Kiyanbekova²², Akerke Ospanova²³, Joshua A. Mott^{24,25}, Gideon O. Emukule²⁴, Jean-Michel Heraud²⁶, Norosoa Harline Razanajatovo²⁶, Amal Barakat²⁷, Fatima el Falaki²⁷, Sue Q. Huang²⁸, Liza Lopez²⁸, Angel Balmaseda²⁹, Brechla Moreno³⁰, Ana Paula Rodrigues³¹, Raquel Guiomar³², Li Wei Ang³³, Vernon Jian Ming Lee³⁴, Marietjie Venter^{35,36}, Cheryl Cohen^{37,38}, Selim Badur³⁹, Meral A. Ciblak³⁹, Alla Mironenko⁴⁰, Olha Holubka⁴⁰, Joseph Bresee⁴¹, Lynnette Brammer⁴¹, Phuong Vu Mai Hoang⁴², Mai Thi Quynh Le⁴², Douglas Fleming⁴³, Clotilde El-Guerche Séblain⁴⁴, François Schellevis^{1,45}, John Paget¹ and Global Influenza B Study group

Abstract

Background: Influenza disease burden varies by age and this has important public health implications. We compared the proportional distribution of different influenza virus types within age strata using surveillance data from twenty-nine countries during 1999-2014 (N=358,796 influenza cases).

Methods: For each virus, we calculated a Relative Illness Ratio (defined as the ratio of the percentage of cases in an age group to the percentage of the country population in the same age group) for young children (0-4 years), older children (5-17 years), young adults (18-39 years), older adults (40-64 years), and the elderly (65+ years). We used random-effects meta-analysis models to obtain summary relative illness ratios (sRIRs), and conducted meta-regression and sub-group analyses to explore causes of between-estimates heterogeneity.

Results: The influenza virus with highest sRIR was A(H1N1) for young children, B for older children, A(H1N1)pdm2009 for adults, and (A(H3N2) for the elderly. As expected, considering the diverse nature of the national surveillance datasets included in our analysis, between-estimates heterogeneity was high ($I^2 > 90%$) for most sRIRs. The variations of countries' geographic, demographic and economic characteristics and the proportion of outpatients among reported influenza cases explained only part of the heterogeneity, suggesting that multiple factors were at play.

(Continued on next page)

* Correspondence: scaini@nivel.nl

¹Netherlands Institute for Health Services Research (NIVEL), Otterstraat 118-124, 3513, CR, Utrecht, The Netherlands

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Conclusions: These results highlight the importance of presenting burden of disease estimates by age group and virus (sub)type.

Keywords: Influenza, Age distribution, Influenza A virus, H3N2 subtype, Influenza A virus, H1N1 subtype, Influenza B virus, Meta-analysis

Background

Several studies have shown that the disease burden and costs of influenza vary considerably by age group [1, 2]. Among adults, influenza is usually a self-limiting disease and the social costs are mainly due to loss of productivity and workdays and to absenteeism due to the need to care for family members [3]. At the extremes of age there is a much higher risk of complications, hospitalization and influenza-associated death [4, 5], especially among older people with underlying conditions such as chronic heart disease or diabetes [6]. In these age groups, the costs for society are mainly related to healthcare.

The influenza burden of disease varies substantially across seasons [1]. This depends on the circulating virus strains and, where vaccination campaigns are implemented, on the vaccine uptake rate as well. Overall, the disease burden of influenza is thought to be higher in seasons dominated by A(H3N2) or A(H1N1)pdm2009 influenza viruses, and lower in seasons where pre-pandemic A(H1N1) or influenza B account for the majority of cases [7, 8].

The dependency of the disease burden in a given season on circulating influenza virus (sub)types may be due to two factors that are complementary to each other. On one hand, influenza viruses may differ between one another in terms of their ability to induce a severe or complicated clinical illness, for instance by favouring bacterial co-infections, worsening of underlying conditions, or other life-threatening events. This hypothesis has been questioned by studies showing that there were only negligible differences in the age-adjusted clinical presentation and severity of the illness caused by different influenza virus types and subtypes [9–12]. On the other hand, the influenza viruses may differ between one another in how frequently they affect certain age groups. For instance, school-age children are more affected during influenza seasons dominated by pre-pandemic A(H1N1) and B virus strains than during A(H3N2)-dominated season [13].

The age distribution of influenza cases is likely to be affected by several other factors beyond the mix of circulating virus (sub)types, which may vary considerably in space and time. These include the country's demographic and geographic characteristics, the implementation of vaccination campaigns against influenza, and past epidemics that affect the immunity of the different

population age groups. In addition, how the influenza surveillance system is structured, the general perception of the severity of the season (for example, during the 2009 pandemic), and health care seeking behaviour may determine how many and what influenza cases are seen in each season and country. The availability of a global database with age-specific data enables an analysis of patterns across different settings and facilitates stronger conclusions, provided there is careful examination of how the age distribution of influenza cases fluctuated across countries and seasons, and investigating the influence of potential confounding factors.

Here, we compared the proportional distribution of different influenza virus (sub)types within age strata using the database of the Global Influenza B Study (GIBS).

Methods

Sources of data and definitions

The GIBS was launched in 2012 with the aim of increasing the scientific evidence needed to optimize the influenza prevention policies worldwide [14]. Experts from over fifty countries from all continents were invited to provide data on the weekly number of influenza cases reported to their national influenza surveillance system during recent years (ideally, from 2000 onwards) (N=948,646). Importantly, and in contrast to other global surveillance databases (e.g. Flu-Net) [15], the GIBS database also includes the age (exact age or age group) of each reported influenza case. From large countries we asked to provide data stratified at a sub-national level, if available (for brevity, we will use the term “country” to refer to a whole country or to a sub-national region of it hereinafter). Experts from participating countries were also requested to describe the main characteristics of their influenza surveillance system.

Country-specific geographic, demographic and socioeconomic information necessary for the analyses was derived from the US Central Intelligence Agency World Factbook website [16]. This includes information on the population age structure, the ageing index (defined as the number of people aged 65 years or older per hundred people aged 14 years or younger), the latitude of the population centroid (when available) or of the largest city, and the per capita gross

domestic product (GDP). In terms of latitude, a country was considered as being situated in the Northern or Southern hemisphere or in the inter-tropical belt based on the latitude of its centroid/largest city.

Statistical analysis

For brevity, we will describe the outcome variable by referring to “influenza”, and the method was applied to A(H1N1), A(H1N1)pdm2009, A(H3N2), and influenza B viruses separately; influenza cases that could not be classified in an unambiguous way to any of the above (for instance, those classified as “unsubtyped influenza A”) were not included in the analysis. The statistic used to describe the age distribution of influenza cases in each season and country is the Relative Illness Ratio (RIR) [17], which is defined as the ratio of the percentage of influenza cases in a given age group to the percentage of the general population belonging to the same age group. We considered the following age groups: 0–4 years (referred to as “young children” hereinafter), 5–17 years (“older children”), 18–39 years (“young adults”), 40–64 years (“older adults”), and 65+ years (“elderly”). A RIR was calculated for each of these five age groups in each influenza season in which there were at least 100 reported influenza cases overall; 95% confidence intervals (95% CI) were calculated by using an exact method based on the Poisson distribution [18].

When calculating a RIR, the null hypothesis is that the chance of being infected with influenza is the same for all people irrespective of their age, implying an age distribution of influenza cases perfectly equal to that of the general population and the RIR equal to 1 in each age group. Therefore, a RIR equal to 3 for influenza B in the age group 5–17 years would mean that, in that season, the proportion of influenza B cases aged 5–17 years was three times the proportion of the general population of the same age group, i.e. three times higher than expected if all age groups would be equally affected by influenza.

All RIRs obtained in the different seasons and countries were pooled into a summary Relative Illness Ratio (sRIR) (separately for each age group) through random-effects meta-analysis models by using the method by DerSimonian and Laird [19]. Comparisons between pairs of sRIRs were conducted, within each age group, through meta-regression models that included an interaction term for the virus (sub)type.

We assessed the between-estimates heterogeneity by using the I^2 statistics, which can be interpreted as the percentage of total variation that is attributable to heterogeneity [20]. We expected a high degree of heterogeneity (this was an a priori consideration), as many factors combine to determine the age distribution of influenza surveillance cases in any given

country and season. In order to assess this point in detail, we fitted meta-regression models and performed sub-group analysis to explore possible correlates of between-estimates heterogeneity, using the proportion of outpatients among reported influenza cases, the percentage of all influenza cases caused by each influenza virus (sub)type in the same or in the previous season, and the country's latitude, ageing index and per capita GDP.

All analyses were conducted using Stata version 14 (Stata Corp, College Station, TX). We used the *metan* command (with the option *random*) to pool the country- and season-specific RIR into a sRIR, obtain forest plots, and calculate the I^2 statistics [21]. The study of between-estimates heterogeneity was conducted by using the *metareg* command [21]. Maps were prepared using freely available software (<http://mapchart.net/>).

All statistical tests were two-sided, and *p*-values of less than 0.05 were considered as statistically significant.

Comparing the age of influenza cases

The interpretation of sRIRs requires caution. The age distribution of patients infected with any given influenza virus in each season and country is affected by a number of socio-economic factors, including health-care seeking behaviour, influenza testing by age, and the way primary and hospital care are organized and delivered. The chance of seeking medical attention (and consequently being seen by an influenza surveillance system) once a person is infected is very probably not the same in all age groups across all participating countries. For instance, children and the elderly might be over-represented in both general practitioners- and (especially) hospital-based surveillance systems, as they seek medical attention more frequently when they are sick compared to adults. Therefore, we believe a “same virus, different age groups” approach (i.e. a comparison of sRIRs between people of different age groups infected with the same influenza virus) is not correct. In other words, it is not possible to answer the question “*Are young children more or less affected than adults (or another age group) by influenza and by how much?*” by inferring from the age distribution of cases reported to the influenza surveillance system.

Instead, there is no major obstacle in ranking the sRIRs for people of the same age group who are infected with different influenza virus (sub)types (“different viruses, same age group” approach). As mentioned, there are only minor differences in the clinical presentation of influenza illness produced by the different virus types within each age group [9–12]. This implies that the likelihood of seeking medical attention is likely to be similar for people of

any given age group in the same country who are infected with different influenza viruses. It is therefore possible to answer the question "Are young children more or less affected by influenza B compared to influenza A(H3N2)?".

Results

The GIBS database that was used for the analysis included 358,768 influenza cases reported between 1999 and 2014 in twenty-nine countries (Table 1 and Fig. 1), of which four were in the Southern hemisphere, fifteen in

Table 1 Selected features of countries included in the study of age distribution of influenza cases. The Global Influenza B Study, 1999-2014

Country	Latitude ^(a)	Population (million)	Ageing index ^(b)	GDP per capita (USD)	% of outpatients ^(c)	No. influenza cases (seasons) included in the analysis:			
						A(H1N1)	A(H1N1)pdm2009	A(H3N2)	B
Southern hemisphere									
New Zealand	41.8 S	4.5	0.72	30,400	30%	2,274 (5)	3,763 (3)	4,840 (8)	2,763 (7)
Chile	35.8 S	16.6	0.48	19,100	5%	403 (1)	5,399 (3)	3,540 (3)	897 (2)
South Africa	29.0 S	53.0	0.22	11,500	0%	- (0)	432 (3)	421 (3)	527 (3)
Australia	25.8 S	23.4	0.84	43,000	50%	3,614 (6)	50,096 (4)	13,286 (9)	28,673 (12)
Inter-tropical belt									
Madagascar	19.4 S	21.3	0.08	1,000	100%	109 (1)	1,101 (2)	579 (4)	1,004 (4)
Brazil ^(d)	10.8 S	201.0	0.32	12,100	NA	- (0)	- (0)	- (0)	665 (4)
Ecuador	2.0 S	15.4	0.24	10,600	0%	- (0)	673 (2)	713 (3)	185 (1)
Indonesia	1.7 S	237.4	0.25	5,200	95%	720 (2)	- (0)	1,397 (4)	1,281 (4)
Kenya	0.4 S	44.4	0.07	1,800	40%	365 (2)	1,285 (3)	1,183 (5)	1,454 (5)
Singapore	1.2 N	5.4	0.63	62,400	100%	- (0)	2,634 (3)	1,436 (3)	1,483 (3)
Cameroon	5.7 N	22.5	0.07	2,400	90%	- (0)	- (0)	259 (2)	102 (1)
Ivory Coast	7.6 N	23.2	0.09	1,800	83%	- (0)	344 (2)	171 (1)	446 (2)
Panama	8.6 N	3.7	0.28	16,500	39%	- (0)	744 (1)	321 (2)	154 (1)
Costa Rica	10.0 N	4.6	0.30	12,900	27%	- (0)	4,069 (2)	1,026 (4)	387 (2)
Nicaragua	12.9 N	6.1	0.16	4,500	43%	- (0)	3,113 (3)	1,089 (4)	699 (3)
El Salvador	13.8 N	6.1	0.25	7,500	22%	- (0)	858 (2)	317 (2)	437 (3)
Honduras	14.8 N	8.2	0.11	4,800	56%	- (0)	656 (2)	277 (2)	- (0)
Guatemala	15.7 N	15.4	0.12	5,300	72%	263 (1)	1,681 (3)	169 (1)	316 (2)
Viet Nam	16.7 N	89.7	0.23	4,000	40%	1,218 (2)	1,368 (3)	2,781 (6)	2,982 (8)
Northern hemisphere									
Bhutan	27.4 N	0.7	0.22	2,600	97%	- (0)	510 (2)	130 (1)	101 (1)
China South ^(e)	31.1 N	969.4	0.56	9,800	100%	5,530 (5)	40,754 (2)	30,299 (7)	35,910 (8)
Morocco	32.0 N	33.2	0.24	5,500	70%	- (0)	2,076 (2)	354 (2)	- (0)
Turkey	39.0 N	76.7	0.26	15,300	100%	1,298 (2)	- (0)	- (0)	289 (1)
Portugal	39.3 N	10.4	1.17	22,900	97%	- (0)	648 (3)	2,085 (8)	733 (4)
China North ^(e)	39.5 N	370.9	0.56	9,800	100%	3,900 (5)	22,951 (3)	13,054 (7)	19,956 (7)
Italy	42.9 N	59.9	1.52	29,600	60%	- (0)	3,880 (2)	1,900 (2)	493 (1)
Kazakhstan	48.0 N	17.9	0.28	14,100	5%	- (0)	108 (1)	421 (3)	163 (1)
Ukraine	49.1 N	44.6	1.14	7,400	NA	- (0)	104 (1)	- (0)	- (0)
England ^(f)	52.3 N	53.0	0.91	37,300	57%	179 (1)	2,438 (3)	1,743 (6)	1,319 (3)
						19,873 (33)	151,685 (60)	83,791 (102)	103,419 (93)

NA: not available

^(a) Latitude of centroid (when available) or largest city

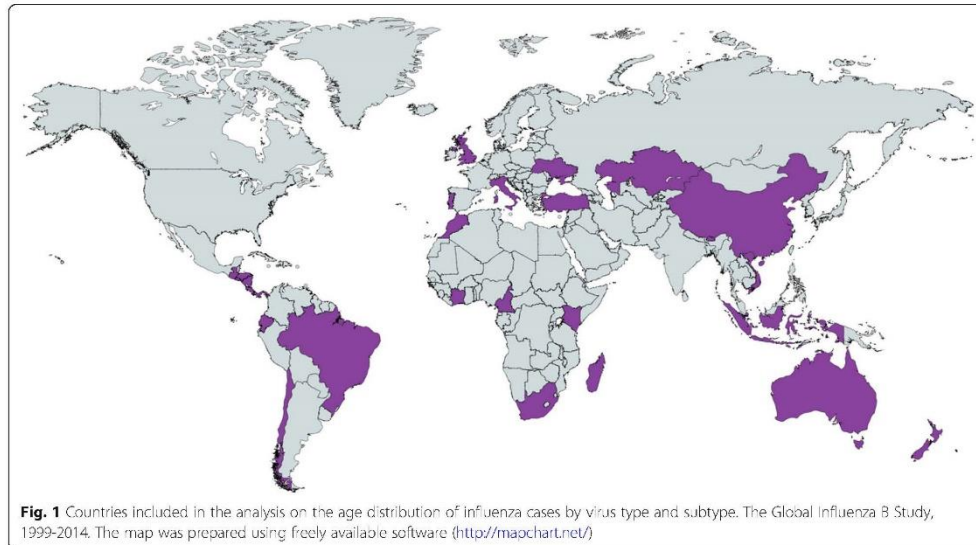
^(b) Defined as the number of people aged 65 years or older per hundred people aged 14 years or younger

^(c) Proportion of outpatients among reported influenza cases

^(d) Information on subtype of influenza A cases was not available for Brazil

^(e) Ageing index and GDP per capita of China (whole country)

^(f) Ageing index and GDP per capita of United Kingdom



the inter-tropical belt, and ten in the Northern hemisphere. In detail, there were 19,873 influenza A(H1N1) cases from 33 seasons in twelve countries; 151,685 influenza A(H1N1)pdm2009 cases from 60 seasons in twenty-five countries; 83,791 influenza A(H3N2) cases from 102 seasons in twenty-six countries; and 103,419 influenza B cases from 93 seasons in twenty-six countries. The number of influenza cases (by influenza virus) that was available for the analysis in each country and season (i.e. with age information available and at least 100 cases reported in the season, and after excluding non-subtyped influenza A cases) is reported in the Additional file 1.

The overall age distribution of influenza cases was as follows: 19% in young children, 33% in older children, 30% in young adults, 14% in older adults and 4% in the elderly. The sRIRs for each influenza virus (sub)type by age group are reported in Table 2 (we provide a sample of the corresponding forest plots, namely those for A(H1N1), in the Additional file 2). The sRIR for young children was highest for influenza A(H1N1) (3.57, 95%CI 3.00-4.14) and lowest for influenza A(H1N1)pdm2009 (2.93, 95%CI 2.68-3.19); for older children, the sRIR was highest for influenza B (1.69, 95%CI 1.53-1.85) and lowest for influenza A(H3N2) (1.04, 95%CI 0.93-1.14); for both young and older adults, it was highest for influenza A(H1N1)pdm2009 (0.94, 95%CI 0.87-1.01 and 0.62, 95%CI 0.55-0.69, respectively) and lowest for influenza B (0.65, 95%CI 0.59-0.71 and 0.41, 95%CI 0.37-0.45, respectively); for the elderly it was highest for influenza A(H3N2) (0.74, 95%CI 0.66-0.83) and lowest for influenza A(H1N1) (0.16, 95%CI 0.12-0.20). The

between-estimates heterogeneity was large, as it exceeded 95% for all of the sRIRs among young children, older children and young adults, and was above 90% for all of the sRIRs calculated among older adults and the elderly (with the only exception of the elderly infected with influenza A(H1N1), where it was 73.9%) (Table 2). Because of the large between-estimates heterogeneity, the summary estimates should not be interpreted in a precise manner, and the reported 95% confidence intervals most likely underestimate the real uncertainty in the data and should be considered with caution.

Latitude, ageing index, GDP per capita and the proportion of outpatients among reported influenza cases were significantly ($p < 0.05$) correlated with sRIRs for most influenza virus (sub)types and age groups (Table 3). Countries' geographic, demographic, economic and epidemiological characteristics explained a smaller part of between-estimates heterogeneity for A(H1N1) compared to the other influenza virus (sub)types.

Inspection of stratified sRIRs (available in the Additional file 3) revealed some additional patterns. Pre-pandemic A(H1N1) was the most frequent virus subtype in the 0-4 years age group only in the Northern hemisphere, while A(H3N2) prevailed in the inter-tropical belt and the Southern hemisphere. The proportion of outpatients among reported cases consistently affected the sRIRs among young children and the elderly (sRIR was highest when the proportion of outpatients accounted for less than 40% in the data), and the country's demographic structure consistently

Table 2 Summary Relative Illness Ratio (sRIR), lower and upper 95% confidence intervals (CI), and between-estimates heterogeneity (as measured by the I^2 statistics) for A(H1N1), A(H1N1)pdm2009, A(H3N2) and B influenza virus within each age group. The Global Influenza B Study, 1999-2014

Influenza virus	sRIR	lower CI ^(a)	upper CI ^(a)	I^2
Young children (0-4 years)				
A(H1N1)	3.57	3.00	4.14	97.5%
A(H1N1)pdm2009	2.28	2.10	2.46	97.8%
A(H3N2)	3.30	2.95	3.64	98.2%
B	2.93	2.68	3.19	97.5%
Older children (5-17 years)				
A(H1N1)	1.36	1.19	1.54	95.2%
A(H1N1)pdm2009	1.23	1.02	1.45	99.5%
A(H3N2)	1.04	0.93	1.14	97.2%
B	1.69	1.53	1.85	98.4%
Young adults (18-39 years)				
A(H1N1)	0.84	0.72	0.96	97.1%
A(H1N1)pdm2009	0.94	0.87	1.01	97.5%
A(H3N2)	0.73	0.68	0.78	96.0%
B	0.65	0.59	0.71	98.1%
Older adults (40-64 years)				
A(H1N1)	0.49	0.41	0.57	95.2%
A(H1N1)pdm2009	0.62	0.55	0.69	98.7%
A(H3N2)	0.59	0.55	0.63	93.5%
B	0.41	0.37	0.45	96.6%
Elderly (65+ years)				
A(H1N1)	0.16	0.12	0.20	73.9%
A(H1N1)pdm2009	0.27	0.24	0.31	94.7%
A(H3N2)	0.74	0.66	0.83	95.2%
B	0.38	0.33	0.43	92.4%

^(a)Because of the between-estimates heterogeneity being above 50%, the reported 95% CI very likely underestimate the real uncertainty in the data, and should be considered with caution.

affected the sRIRs among older children and young adults (sRIR was highest when ageing index >0.50). Importantly, the stratified analysis indicated that the results for countries with 70% or more reported influenza cases from outpatients mirror those for the whole database, with pre-pandemic A(H1N1), B, pandemic A(H1N1)2009 and A(H3N2) being the most frequently detected virus strain among young children, older children, young adults and the elderly, respectively. For the other variables, the pattern of sRIRs across values was inconsistent across influenza virus (sub)types, making it difficult to identify a clear pattern. The between-estimates heterogeneity remained very high (>90%) for most stratified sRIRs, irrespective of the influenza virus (sub)type and age group.

Discussion

We compared the age distribution of influenza cases across different influenza viruses relative to that of the general population using the GIBS database, which encompasses case-based influenza data from twenty-nine countries during 1999-2014. We found that each influenza virus had a relatively higher frequency in a certain age group: influenza A(H1N1) appeared to be relatively more frequent among young children, B among older children, A(H1N1)pdm2009 among young and older adults, and A(H3N2) among the elderly. These results were confirmed in the analysis limited to countries with most reported influenza cases coming from the outpatient setting. In addition, the RIR was highest for young children and lowest for older adults and the elderly whatever the virus strain examined, suggesting that the young children are the age group most affected by influenza in relation to their size in the country's population. Importantly, however, because of the possible over-representation of children and elderly people in our study sample and of the large (but expected) heterogeneity, we have restrained ourselves from, and cautioned against, interpreting the point estimates in a precise way. In addition, it is very likely that the confidence intervals underestimate the real uncertainty in the data. As a result, we have limited ourselves to ranking the sRIRs for the different influenza virus (sub)types within any given age group (i.e. following a "different viruses, same age group" approach, as explained), and to drawing more cautious conclusions regarding the results.

Many factors affect the probability of being infected with influenza and of being captured by a national influenza surveillance system in each age group. The factors include epidemiological characteristics like the number of effective contacts among susceptible people, the country's population density and mobility [22, 23], the typical family composition and the average number of people living in a household [24, 25], and the pattern of contacts between people of different age groups [26-28]. Other important factors include influenza vaccine uptake and how national surveillance systems are structured (e.g. community and/or hospital based). These many factors, and the virus strains that are circulating, interact in a complex way to produce a net effect that defines the cases that are captured by the national surveillance systems. This situation may explain the large degree of heterogeneity in our data, which persisted also when conducting the stratified analysis. Because of this, we opted to (i) analyse our data by age group (to control for some of the factors listed above, e.g. the different probability by age of being tested and therefore being reported to the national surveillance system), (ii) present patterns for each influenza virus (sub)type, and (iii) draw

Table 3 Between-estimates heterogeneity (as measured by the I^2 statistics) for summary relative illness ratio calculated for each influenza virus within each age group, and variables significantly ($p < 0.05$) correlating with them. The Global Influenza B Study, 1999-2014

Influenza virus	I^2	Variables significantly ($p < 0.05$) correlating with sIRs	% of cases accounted for in the same season	% of cases accounted for in the previous season	Ageing Index	GDP per capita	% of outpatients ^(a)
Young children (0-4 years)							
A(H1N1)	97.5%						
A(H1N1)pdm2009	97.8%	✓	✓				✓
A(H3N2)	98.2%			✓		✓	✓
B	97.5%			✓		✓	✓
Older children (5-17 years)							
A(H1N1)	95.2%			✓			
A(H1N1)pdm2009	99.5%	✓	✓				✓
A(H3N2)	97.2%	✓		✓		✓	✓
B	98.4%	✓	✓	✓		✓	✓
Young adults (18-39 years)							
A(H1N1)	97.1%			✓		✓	
A(H1N1)pdm2009	97.5%	✓		✓		✓	
A(H3N2)	96.0%	✓		✓		✓	
B	98.1%	✓	✓	✓		✓	✓
Older adults (40-64 years)							
A(H1N1)	95.2%						
A(H1N1)pdm2009	98.7%		✓			✓	✓
A(H3N2)	93.5%			✓		✓	
B	96.6%	✓		✓		✓	
Elderly (65+ years)							
A(H1N1)	73.9%						
A(H1N1)pdm2009	94.7%	✓		✓		✓	✓
A(H3N2)	95.2%	✓		✓		✓	✓
B	92.4%	✓					✓

GDP: gross domestic product.

^(a)Proportion of outpatients among reported influenza cases

cautious conclusions and avoid giving precise effect estimates.

The main strength of our study is the wealth of data included in the GIBS database and the large diversity of countries in terms of their geographical, socio-economic and epidemiological characteristics. This allowed us to investigate simultaneously the effect of several factors on the age distribution of influenza cases relative to that of the general population, which would not have been possible by using data from a single country (or a few countries that are very similar to one another) or for a limited number of seasons. The large heterogeneity in the data prevented us from quantifying the effect of the virus (sub)type on the age distribution of influenza cases in a precise way, and therefore, to answer in a definitive way our study question. However, the adoption of a meta-analytical approach allowed us to describe the between-estimates heterogeneity both analytically and graphically, and was especially useful in exploring the many factors that contribute to determine the age distribution of influenza cases in any given country and season.

The main limitation of the paper is its reliance on data that was not purposely collected to answer the main study question. Passive influenza surveillance systems only allow inferences regarding medically-attended influenza virus infections, and are inherently unable to capture infected people who do not seek medical care. While this does not represent a limitation for the main goals of surveillance (i.e. early warning of epidemics), the data collected within a passive surveillance system may be sub-optimal for purely research purposes. In particular, influenza surveillance systems differ across countries included in GIBS in terms of the proportion of outpatients compared to all reported influenza cases, which may represent an important source of bias for the present analysis [14]. Reassuringly, our results were confirmed when limiting the analysis to countries in which over 70% of influenza cases were outpatients (i.e. originated from a community-based surveillance system). However, meta-regression and subgroup analysis are not as powerful as an analysis which takes advantage of individual-level data, which is warranted in order to confirm or refute our findings. In general, the “same virus, different age groups” interpretation of results is not possible using passive surveillance data. To allow for a more reliable comparison of influenza burden between age groups using surveillance data, each country would need to adopt a sampling protocol for virological testing that allows the probability to sample a (suspected) influenza case in each age group to be known in advance. Despite being quite expensive, active surveillance based on participatory cohorts would allow a better understanding of influenza epidemiology by providing the opportunity to

estimate key epidemiological parameters, including the age distribution of cases and the age-specific attack rate, frequency of complications and mortality [29]. A further limitation of our study is the lack of age data for countries in North America, in particular for United States; in addition, some countries contributed data for only a limited number of seasons. The proportion of influenza patients being typed and subtyped may depend on the patient’s age: this may have introduced a bias whose magnitude, however, should have been attenuated by our decision to analyse the data separately within each age group. Finally, we could not run separate analyses by influenza B virus lineage (Yamagata vs. Victoria), as this information was available in only a small percentage of influenza B cases.

Conclusions

Global surveillance data for the start of the 21st century suggest that the relative proportion of influenza cases caused by each influenza virus (sub)type may differ by age group. Our results suggest that the mix of circulating influenza viruses is one among several factors that are at play in determining the differing age distribution of influenza surveillance cases, and highlight the importance of presenting disease burden estimates by age group and virus (sub)type.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Number of influenza cases caused by the difference influenza viruses that were included in the analysis. The Global Influenza B Study, 1999-2014. (DOCX 24 kb)

Additional file 2: Figure S1. Forest plot of the Relative Illness Ratio for patients aged 0-4 years infected with A(H1N1) influenza virus. The Global Influenza B Study, 1999-2014. **Figure S2.** Forest plot of the Relative Illness Ratio for patients aged 5-17 years infected with A(H1N1) influenza virus. The Global Influenza B Study, 1999-2014. **Figure S3.** Forest plot of the Relative Illness Ratio for patients aged 18-39 years infected with A(H1N1) influenza virus. The Global Influenza B Study, 1999-2014. **Figure S4.** Forest plot of the Relative Illness Ratio for patients aged 40-64 years infected with A(H1N1) influenza virus. The Global Influenza B Study, 1999-2014. **Figure S5.** Forest plot of the Relative Illness Ratio for patients aged 65+ years infected with A(H1N1) influenza virus. The Global Influenza B Study, 1999-2014. (DOCX 44 kb)

Additional file 3: Table S2. Summary Relative Illness Ratio (sRIR), 95% confidence intervals (95% CI) across age groups and influenza viruses by categories of country ageing index. The Global Influenza B Study, 1999-2014. **Table S3.** Summary Relative Illness Ratio (sRIR), 95% confidence intervals (95% CI) across age groups and influenza viruses by percentage of outpatients among cases reported to the influenza surveillance system. The Global Influenza B Study, 1999-2014. **Table S4.** Summary Relative Illness Ratio (sRIR), 95% confidence intervals (95% CI) across age groups and influenza viruses by country latitude. The Global Influenza B Study, 1999-2014. **Table S5.** Summary Relative Illness Ratio (sRIR), 95% confidence intervals (95% CI) across age groups and influenza viruses by percentage of influenza cases caused by that influenza virus in the same season. The Global Influenza B Study, 1999-2014. **Table S6.** Summary Relative Illness Ratio (sRIR), 95% confidence intervals (95% CI) across age groups and influenza viruses by percentage of influenza cases caused by that influenza virus in the previous season. The Global Influenza B Study,

1999-2014. **Table S7.** Summary Relative Illness Ratio (sRIR), 95% confidence intervals (95% CI) across age groups and influenza viruses by categories of country gross domestic product (GDP) per capita. The Global Influenza B Study, 1999-2014. (DOCX 46 kb)

Abbreviations

GIBS: Global Influenza B Study; RIR: Relative Illness Ratio; sRIR: Summary Relative Illness Ratio

Acknowledgements

The Global Influenza B Study group also includes the following members: Binay Thapa⁴, Sangay Zangmo⁴, Guy Vernet⁶, Patricia Bustos⁷, Patricia Loyola⁷, Joanna Ellis¹², Antonino Bella¹⁹, Maria Rita Castrucci¹⁸, Gulzhan Muratbayeva⁴⁵, Julia Guillebaud²⁶, Laurence Randrianasolo⁴⁶, Ausenda Machado⁴⁷, Pedro Pechira³², Jeffery Cutter³⁴, Raymond Tzer Pin Lin³⁴,⁴⁵ Centers for Disease Control and Prevention, Central Asia Regional Office, Almaty, Kazakhstan
⁴⁶ Epidemiology Unit, Institut Pasteur of Madagascar, Antananarivo, Madagascar
⁴⁷ National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal

Funding

The Global Influenza B Study is funded by an unrestricted research grant from Sanofi Pasteur. The study sponsor had no role in study design, data collection and analysis, and had no access to the data. The study sponsor was not involved in the writing of the paper (including the main conclusion of the study) nor in the decision to submit the paper for publication.

Availability of data and materials

The database of the Global Influenza B Study was created by collecting surveillance datasets from each of the participating countries. These national datasets are owned by the participating countries, and thus cannot be shared publicly. Researchers interested in obtaining the country-specific datasets may contact the individuals listed below for further details regarding data access.

Argentina (Santa Fe Province): Gabriela Kuszniarz (labconi@yahoo.com.ar)

Australia: Kate Pennington (kate.pennington@health.gov.au)

Bhutan: Sonam Wangchuk (swangchuk@health.gov.bt)

Brazil: Cláudio Maierovitch Pessanha Henriques

(claudio.henriques@saudef.gov.br)

Cameroon: Guy Vernet (vernet@pasteur-yaounde.org)

Chile: Rodrigo Fasce (rfasce@ispch.cl)

China: Feng Luzhao (fenglz@chinacdc.cn)

Costa Rica: Alexey W. Clara (wclara@cdc.gov)

Ecuador: Alfredo Bruno (alfredobruno@yahoo.es)

El Salvador: Alexey W. Clara (wclara@cdc.gov)

England: Maria Zambon (mariazambon@phe.gov.uk)

Guatemala: Alexey W. Clara (wclara@cdc.gov)

Honduras: Alexey W. Clara (wclara@cdc.gov)

Indonesia: Herman Kosasih (hermaninarespond@gmail.com)

Italy: Caterina Rizzo (caterina.rizzo@iss.it)

Ivory Coast: Herve A. Kadjo (hervekadjo@pasteur.ci)

Kazakhstan: Gulzhan Muratbayeva (hmv2@cdc.gov)

Kenya: Joshua Mott (zud9@cdc.gov)

Madagascar: Jean-Michel Heraud (jmheraud@pasteur.mg)

Morocco: Amal Barakat (amal.barakat@yahoo.fr)

New Zealand: Sue Huang (sue.huang@esr.cri.nz)

Nicaragua: Alexey W. Clara (wclara@cdc.gov)

Panama: Alexey W. Clara (wclara@cdc.gov)

Portugal: Ana Paula Rodrigues (ana.rodrigues@insa.min-saude.pt)

Singapore: Vernon Lee (vernonljm@hotmail.com)

South Africa: Cheryl Cohen (cheryl@nicd.ac.za)

Turkey: Meral Akcay Ciblak (ciblakm@yahoo.com)

Ukraine: Alla Mironenko (miralla@ukr.net)

Viet Nam: Le Thi Quinh Mai (lom9@hotmail.com)

Authors' contributions

SC, JP, CEGS, PS and FS conceived the study. GFK, JMR, RO, KP, SW, SG, WAFdA, CMPH, RN, MAV, RAF, WA, HY, LF, JY, ZP, JL, AB, DdM, CdL, MZ, RP, LC, AWC, MLM, HK, N, SP, CR, HAK, CD, LK, AO, JAM, GOE, JMH, NHR, AB, FeF,

SQH, LL, AB, BM, APR, RG, LWA, VJML, MV, CC, SB, MAC, AM, OH, JB, LB, PVMH, MTQL, DF and members of the Global Influenza B Study group collected the data. SC and PS performed the statistical analysis. SC, JP and CEGS interpreted the results. SC and JP wrote the first draft of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved its final version.

Ethics approval and consent to participate

In all participating countries, the collection and analysis of respiratory specimens was undertaken as part of routine influenza surveillance, and no specific ethical approval was required for the statistical analysis of the resulting anonymized surveillance data according to local laws and regulations.

Competing interests

Clotilde El-Guerche Séblain is an employee of Sanofi Pasteur. She was involved in the debate about the interpretation of the results but had no role in study design, data collection, data analysis, decision on what results to present, and writing of the manuscript (including the main conclusion of the study). All the other authors declare they have no conflict of interests to disclose. All the other Authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Netherlands Institute for Health Services Research (NIVEL), Otterstraat 118-124, 3513, CR, Utrecht, The Netherlands. ²Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. Emilio Coni", Santa Fe, Argentina. ³Vaccine Preventable Diseases Surveillance Section, Health Policy Protection branch, Office for Health Protection, Department of Health, Woden, Canberra, Australia. ⁴Public Health Laboratory, Department of Public Health, Ministry of Health, Thimphu, Bhutan. ⁵Ministry of Health, Brasília, DF, Brazil. ⁶Virology Department, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon. ⁷Sección Virus Respiratorios, Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile. ⁸Division of Infectious Disease, Key Laboratory of Surveillance and Early-warning on Infectious Disease, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China. ⁹National Influenza Center, Ministry of Health, San José, Costa Rica. ¹⁰Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), Centro de Referencia Nacional de Influenza y otros Virus Respiratorios, Guayaquil, Ecuador. ¹¹National Influenza Center, Ministry of Health, San Salvador, El Salvador. ¹²Respiratory Virus Unit, Public Health England, London, Colindale, UK. ¹³Respiratory Diseases Department, Public Health England, London, Colindale, UK. ¹⁴National Influenza Center, Ministry of Health, Guatemala City, Guatemala. ¹⁵US Centers for Disease Control, Central American Region, Guatemala City, Guatemala. ¹⁶National Influenza Center, Ministry of Health, Tegucigalpa, Honduras. ¹⁷US Naval Medical Research Unit No.2, Jakarta, Indonesia. ¹⁸National Influenza Center, National Institute of Health, Rome, Italy. ¹⁹National Center for Epidemiology, Surveillance and Health Promotion, National Institute of Health, Rome, Italy. ²⁰Department of Epidemic Virus, Institut Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire. ²¹Service of Epidemiological Diseases Surveillance, National Institute of Public Hygiene, Abidjan, Côte d'Ivoire. ²²National Center of Expertise, Committee of Consumer Right Protection, Astana, Kazakhstan. ²³Zonal Virology Laboratory, National Center of Expertise, Committee of Consumer Right Protection, Astana, Kazakhstan. ²⁴Centers for Disease Control and Prevention - Kenya Country Office, Nairobi, Kenya. ²⁵US Public Health Service, Rockville, Maryland, USA. ²⁶National Influenza Center, Virology Unit, Institut Pasteur of Madagascar, Antananarivo, Madagascar. ²⁷National Influenza Center, Institut National d'Hygiène, Ministry of Health, Rabat, Morocco. ²⁸Institute of Environmental Science and Research, Wellington, New Zealand. ²⁹National Influenza Center, Ministry of Health, Managua, Nicaragua. ³⁰National Influenza Center, IC Gorgas, Panama City, Panama. ³¹Department of epidemiology, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal. ³²National Influenza Reference Laboratory, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal. ³³Epidemiology and Disease Control Division, Ministry of Health, Singapore, Singapore. ³⁴Communicable Diseases Division, Ministry of Health, Singapore, Singapore. ³⁵Global Disease Detection, US-CDC, Pretoria, South Africa. ³⁶Zoonoses Research Center, Department of Medical Virology, University of Pretoria, Pretoria, South Africa. ³⁷Centre for Respiratory

Diseases and Meningitis (CRDM), National Institute for Communicable Diseases, Johannesburg, South Africa. ³⁸School of Public Health, Faculty of Health Science, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa. ³⁹Istanbul University, Istanbul, Turkey. ⁴⁰L.V.Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases National Academy of Medical Science of Ukraine, Reiv, Ukraine. ⁴¹Epidemiology and Prevention Branch, Influenza Division, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. ⁴²National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. ⁴³Independent scientist, Birmingham, UK. ⁴⁴Sanofi Pasteur, Lyon, France. ⁴⁵Department of General Practice & Elderly Care Medicine, Amsterdam Public Health Research Institute, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands.

Received: 7 February 2017 Accepted: 30 May 2018

Published online: 08 June 2018

References

- Cromer D, van Hoek AJ, Jit M, Edmunds WJ, Fleming D, Miller E. The burden of influenza in England by age and clinical risk group: a statistical analysis to inform vaccine policy. *J Infect*. 2014;68(4):363–71.
- Cheng PY, Palekar R, Azziz-Baumgartner E, Iuliano D, Alencar AP, Bresee J, et al. Burden of influenza-associated deaths in the Americas, 2002–2008. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015;(Suppl 1):13–21.
- Keech M, Beardsworth P. The impact of influenza on working days lost: a review of the literature. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(11):911–24.
- Reed C, Chaves SS, Daily Kitley P, Emerson R, Aragon D, Hancock EB, et al. Estimating influenza disease burden from population-based surveillance data in the United States. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118369.
- Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Simmerman JM, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;378(9807):1917–30.
- Quandelacy TM, Viboud C, Charu V, Lipsitch M, Goldstein E. Age- and sex-related risk factors for influenza-associated mortality in the United States between 1997–2007. *Am J Epidemiol*. 2014;179(2):156–67.
- Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA*. 2004;292(11):1333–40.
- Chaves SS, Aragon D, Bennett N, Cooper T, D’Mello T, Farley M, et al. Patients hospitalized with laboratory-confirmed influenza during the 2010–2011 influenza season: exploring disease severity by virus type and subtype. *J Infect Dis*. 2013;208(8):1305–14.
- Mosnier A, Caini S, Daviaud I, Nauleau E, Bui TT, Debost E, et al. Clinical characteristics are similar across type A and B influenza virus infections. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136186.
- Irving SA, Patel DC, Kieke BA, Donahue JG, Vandermause MF, Shay DK, et al. Comparison of clinical features and outcomes of medically attended influenza A and influenza B in a defined population over four seasons: 2004–2005 through 2007–2008. *Influenza Other Respir Viruses*. 2012;6(1):37–43.
- Cohen AL, Hellefsee O, Pretorius M, Treumicht F, Walaza S, Madhi S, et al. Epidemiology of influenza virus types and subtypes in South Africa, 2009–2012. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(7):1162–9.
- Silvennoinen H, Huusko T, Vuorinen T, Heikkinen T. Comparative burden of influenza A/H1N1, A/H3N2 and B infections in children treated as outpatients. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(10):1081–5.
- Turbelin C, Souty C, Pelat C, Hanslik T, Sarazin M, Blanchon T, et al. Age distribution of influenza like illness cases during post-pandemic A(H3N2): comparison with the twelve previous seasons in France. *PLoS One*. 2013;8(6):e65919.
- Caini S, Huang QS, Ciblak MA, Kuszniarz G, Owen R, Wangchuk S, et al. Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. *Influenza Other Respir Viruses*. 2005;9(Suppl 1):3–12.
- World Health Organization FluNet website. http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/fluNet/en/. Accessed 26 Oct 2016.
- US Central Intelligence Agency World Factbook website. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/>. Accessed 26 Oct 2016.
- Lemaitre M, Carrat F. Comparative age distribution of influenza morbidity and mortality during seasonal influenza epidemics and the 2009 H1N1 pandemic. *BMC Infect Dis*. 2010;10:162.
- Armitage P, Berry G, Matthews JNS. *Statistical methods in medical research*. Blackwell Pub; 2002.
- DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials*. 1986;7(3):177–88.
- Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med*. 2002;21(11):1539–58.
- JAC S, editor. *Meta-analysis In Stata: An Updated Collection From The Stata Journal*. Texas: Stata Press; 2009.
- Fang LQ, Wang LP, de Vlas SJ, Liang S, Tong SL, Li YL, et al. Distribution and risk factors of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in mainland China. *Am J Epidemiol*. 2012;175(9):890–7.
- Chandra S, Kassens-Noor E, Kuljanin G, Vertalka J. A geographic analysis of population density thresholds in the influenza pandemic of 1918–19. *Int J Health Geogr*. 2013;12:9.
- Liu F, Enanoria WT, Ray KJ, Coffee MP, Gordon A, Aragón TJ, et al. Effect of the one-child policy on influenza transmission in China: a stochastic transmission model. *PLoS One*. 2014;9(2):e84961.
- Brown CR, McCaw JM, Fairmaid EJ, Brown LE, Leder K, Sinclair M, et al. Factors associated with transmission of influenza-like illness in a cohort of households containing multiple children. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015;9(5):247–54.
- Glasser J, Feng Z, Moylan A, Del Valle S, Castillo-Chavez C. Mixing in age-structured population models of infectious diseases. *Math Biosci*. 2012;235(1):1–7.
- Eames KT, Tilston NL, Brooks-Pollock E, Edmunds WJ. Measured dynamic social contact patterns explain the spread of H1N1v influenza. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(3):e1002425.
- Towers S, Feng Z. Social contact patterns and control strategies for influenza in the elderly. *Math Biosci*. 2012;240(2):241–9.
- Razuri H, Romero C, Tinoco Y, Guezaia MC, Ortiz E, Silva M, et al. Population-based active surveillance cohort studies for influenza: lessons from Peru. *Bull World Health Organ*. 2012;90(4):318–20.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

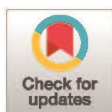
Learn more biomedcentral.com/submissions



RESEARCH ARTICLE

The epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century

Saverio Caini^{1*}, Gabriela Kuszniarz², Verónica Vera Garate², Sonam Wangchuk³, Binay Thapa³, Francisco José de Paula Júnior⁴, Walquiria Aparecida Ferreira de Almeida⁵, Richard Njouom⁵, Rodrigo A. Fasce⁶, Patricia Bustos⁶, Luzhao Feng⁷, Zhibin Peng⁷, Jenny Lara Araya⁸, Alfredo Bruno^{9,10}, Doménica de Mora⁹, Mónica Jeannette Barahona de Gámez¹¹, Richard Pebody¹², María Zambon¹², Rocio Higueros¹³, Rudevelinda Rivera¹⁴, Herman Kosasih¹⁵, Maria Rita Castrucci¹⁶, Antonino Bella¹⁷, Hervé A. Kadjó¹⁸, Coulibaly Daouda¹⁹, Ainash Makusheva²⁰, Olga Bessonova²¹, Sandra S. Chaves^{22,23}, Gideon O. Emukule²³, Jean-Michel Heraud²⁴, Norosoa H. Razanajatovo²⁴, Amal Barakat²⁵, Fatima El Falaki²⁵, Adam Meijer²⁶, Gé A. Donker¹, Q. Sue Huang²⁷, Tim Wood²⁷, Angel Balmaseda²⁸, Rakhee Palekar²⁹, Brechla Moreno Arévalo³⁰, Ana Paula Rodrigues³¹, Raquel Guiomar³², Vernon Jian Ming Lee³³, Li Wei Ang³³, Cheryl Cohen^{34,35}, Florette Treurnicht³⁴, Alla Mironenko³⁶, Olha Holubka³⁶, Joseph Bresee³⁷, Lynnette Brammer²², Mai T. Q. Le³⁸, Phuong V. M. Hoang³⁸, Clotilde El Guerche-Séblain³⁹, John Paget¹, the Global Influenza B Study team¹



OPEN ACCESS

Citation: Caini S, Kuszniarz G, Garate VV, Wangchuk S, Thapa B, de Paula Júnior FJ, et al. (2019) The epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century. PLoS ONE 14(9): e0222381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222381>

Editor: Maria Serena Beato, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, ITALY

Received: February 7, 2019

Accepted: August 29, 2019

Published: September 12, 2019

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

Data Availability Statement: The database of the Global Influenza B Study was created by collecting surveillance datasets from each of the participating countries. These national datasets are owned by the participating countries and thus cannot be shared publicly by the study group at NIVEL. Researchers interested in accessing the complete GIBS database can contact John Paget (j.paget@nivel.nl) or Saverio Caini (s.caini@nivel.nl); any request to access the GIBS database will need, however, to be approved by the study group at NIVEL and by contributors from each participating

1 Netherlands Institute for Health Services Research (Nivel), Utrecht, The Netherlands, 2 National Institute of Respiratory Diseases "Emilio Coni", Santa Fe, Argentina, 3 Royal Centre for Disease Control, Department of Public Health, Ministry of Health, Thimphu, Bhutan, 4 Ministry of Health, Department of Surveillance of Transmissible Diseases, Brasília/DF, Brazil, 5 Virology Department, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon, 6 Sub-Department of Viral Diseases, Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile, 7 Division of Infectious Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, P.R. China, 8 National Influenza Center, Ministry of Health, San José, Costa Rica, 9 National Institute of Public Health Research (INSPI), National Reference Centre for Influenza and Other Respiratory Viruses, Guayaquil, Ecuador, 10 Agricultural University of Ecuador, Guayaquil, Ecuador, 11 National Influenza Center, Ministry of Health, San Salvador, El Salvador, 12 Public Health England, London, England, United Kingdom, 13 National Influenza Center, Ministry of Health, Guatemala City, Guatemala, 14 National Influenza Center, Ministry of Health, Tegucigalpa, Honduras, 15 US Naval Medical Research Unit No. 2, Jakarta, Indonesia, 16 National Influenza Center, Department of Infectious Diseases, National Institute of Health, Rome, Italy, 17 Department of Infectious Diseases, National Institute of Health, Rome, Italy, 18 Department of Epidemic Virus, Institut Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire, 19 Service of Epidemiological Diseases Surveillance, National Institute of Public Hygiene, Abidjan, Côte d'Ivoire, 20 National Center of Expertise, Committee of Public Health Protection, Ministry of Health, Astana, Kazakhstan, 21 National Center of Expertise, Committee of Public Health Protection, Ministry of Health, Uralsk City, Kazakhstan, 22 Influenza Division, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America, 23 Influenza Program, Centers for Disease Control and Prevention, Nairobi, Kenya, 24 National Influenza Center, Virology Unit, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar, 25 National Influenza Center, Institut National d'Hygiène, Ministry of Health, Rabat, Morocco, 26 National Institute for Public Health and the Environment, Centre for Infectious Diseases Research, Diagnostics and Laboratory Surveillance, Bilthoven, The Netherlands, 27 Institute of Environmental Science and Research, Wellington, New Zealand, 28 National Influenza Center, Ministry of Health, Managua, Nicaragua, 29 Pan American Health Organization, Washington, District of Columbia, United States of America, 30 National Influenza Center, IC Gorgas, Panama City, Panama, 31 Department of epidemiology, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal, 32 National Influenza Reference Laboratory, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal, 33 Public Health Group, Ministry of Health, Singapore, Singapore, 34 Centre for Respiratory Diseases and Meningitis, National Institute for Communicable Diseases of the National Health Laboratory Service, Johannesburg, South Africa, 35 School of Public Health, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, 36 L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases, National Academy of Medical Science of Ukraine, Department of Respiratory and other Viral Infections, Kyiv, Ukraine, 37 Influenza Division, National Center for Immunizations and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America, 38 National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam, 39 Global

country. Researchers interested in obtaining the country-specific datasets may instead contact the individuals listed in the Supporting Information.

Funding: The study is supported by a research grant from Sanofi Pasteur: the 'Global Epidemiology of Influenza B' research project. The funder provided support in the form of salaries for two authors (CEGS and JP) but did not have any additional role in the data collection, analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the "author contribution section". None of the surveillance schemes in the participating countries was supported by this grant.

Competing interests: Clotilde El-Guerche Séblain is an employee of Sanofi Pasteur. She was the coordinator of the research project at Sanofi Pasteur, she helped define the study objectives, and critically revised the manuscript. When reviewing the manuscript, the revisions concerned the epidemiological findings of the study and not the public health findings or conclusions. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. Cheryl Cohen has received grant support from Sanofi Pasteur, Advanced Vaccine Initiative, US Centers for Disease Control and Prevention, and payment of travel costs from Parexel. All of the other authors declare that they have no conflict of interests to disclose.

Vaccine Epidemiology and Modeling Department (VEM), Franchise Epidemiologist, Sanofi Pasteur, Lyon, France

¶ The complete membership of the author group can be found in the Acknowledgments.
* s.caini@nivel.nl

Abstract

We describe the epidemiological characteristics, pattern of circulation, and geographical distribution of influenza B viruses and its lineages using data from the Global Influenza B Study. We included over 1.8 million influenza cases occurred in thirty-one countries during 2000–2018. We calculated the proportion of cases caused by influenza B and its lineages; determined the timing of influenza A and B epidemics; compared the age distribution of B/Victoria and B/Yamagata cases; and evaluated the frequency of lineage-level mismatch for the trivalent vaccine. The median proportion of influenza cases caused by influenza B virus was 23.4%, with a tendency (borderline statistical significance, $p = 0.060$) to be higher in tropical vs. temperate countries. Influenza B was the dominant virus type in about one every seven seasons. In temperate countries, influenza B epidemics occurred on average three weeks later than influenza A epidemics; no consistent pattern emerged in the tropics. The two B lineages caused a comparable proportion of influenza B cases globally, however the B/Yamagata was more frequent in temperate countries, and the B/Victoria in the tropics ($p = 0.048$). B/Yamagata patients were significantly older than B/Victoria patients in almost all countries. A lineage-level vaccine mismatch was observed in over 40% of seasons in temperate countries and in 30% of seasons in the tropics. The type B virus caused a substantial proportion of influenza infections globally in the 21st century, and its two virus lineages differed in terms of age and geographical distribution of patients. These findings will help inform health policy decisions aiming to reduce disease burden associated with seasonal influenza.

Introduction

Influenza causes a major burden of disease on populations globally [1]. The impact of seasonal and pandemic influenza on population health in high-income countries has been described extensively [2]. In Europe, influenza ranks first among infectious diseases in terms of burden, accounting for 30% of the total disability-adjusted life years (DALYs) lost due to infectious diseases annually [3]. More recently, evidence has been accumulating that the burden of disease associated with influenza is high in low- and middle-income countries as well [4]. Type A viruses cause most influenza cases and are responsible for pandemics, but influenza B is an important cause of morbidity and mortality during interpandemic periods, and its prevention represents an important public health priority globally [5–6]. Influenza B viruses split into two antigenically distinct phylogenetic lineages (B/Victoria/2/87 representative, abbreviated B/Victoria, and B/Yamagata/16/88 representative, abbreviated B/Yamagata) in the early 1980s [7]. Whilst the circulation of the Victoria lineage was geographically limited to eastern Asia for most of the 1990s, the two lineages have co-circulated globally in the 21st century [8–9].

The mainstay of influenza prevention is vaccination, aimed primarily at individuals who are at greater risk of developing complications when infected, like the elderly, pregnant

women, and people with underlying medical conditions, and more recently at children to provide both direct protection to the children and indirect protection to the wider population [10]. Both the composition and period of administration of the vaccine are crucial to ensure adequate immunity against influenza; thus, investigating the timing of influenza epidemics and the patterns of circulation of the different influenza virus types, subtypes and lineages is of great importance from a public health perspective [11]. Until 2012, trivalent influenza vaccines (TIV) were available that contained only one type B influenza virus, belonging to either the B/Victoria or B/Yamagata lineage. Each year, the WHO issued recommendations for the B virus strain to be included in the TIV, but the frequency of lineage-level vaccine mismatch has been high (around 50%) [5]. This often resulted in unsatisfactory protection, considering the limited efficacy against the mismatched lineage [12], and substantial health impact [13]. Quadrivalent influenza vaccine (QIV), containing one B/Victoria and one B/Yamagata virus strain, were first approved by the US Food and Drug Administration (US-FDA) in 2012. This prompted the establishment of several studies that aimed to describe the epidemiology, clinical characteristics and burden of disease of influenza B in more depth, and to compare the cost-effectiveness of QIV vs. TIV in different settings and populations.

Despite significant advances in our understanding of influenza B [14], important knowledge gaps persist, in particular concerning the pattern of circulation and geographical distribution of B/Victoria and B/Yamagata viruses, and the age distribution of patients who are most often infected with either lineage. These aspects are of great importance, however, for instance in order to evaluate the cost-effectiveness of alternative influenza prevention strategies and thus enable more appropriate public health choices (e.g. around the choice of tri- and quadrivalent vaccines) [15]. In fact, while some reports have addressed this topic in single countries [16–22], a global overview is still lacking. Here, we conducted a global analysis of the epidemiology of influenza B virus and its lineages using the database of the Global Influenza B Study (GIBS).

Methods

The Global Influenza B Study

The rationale and methodology of the Global Influenza B Study has been described in detail elsewhere [14,23–24]. The GIBS database encompasses epidemiological and virological influenza surveillance data from thirty-one countries around the world (Fig 1). Participating countries were classified as located in the Northern hemisphere ($n = 11$), inter-tropical belt ($n = 15$), or Southern hemisphere ($n = 5$) based on the latitude of the country's population centre [25]. Participating countries were required to make available influenza surveillance data for as many consecutive years as possible (from 2000 onwards). Data include the weekly number of laboratory-confirmed influenza cases broken down by virus type (A, B), type A subtype (H1N1, 2009 pandemic H1N1, H3N2, A not subtyped), and type B lineage (Victoria, Yamagata, B not characterized) and weekly influenza-like illness/acute respiratory infection rates (per 100,000 population or 100 consultations, depending on country). Information on age (exact age or age groups) was also available. In most participating countries, the influenza surveillance system covers the whole national territory, and a sample of influenza virus positive specimens or virus isolates is routinely sent to a WHO collaborating centre for further investigations. However, countries differ in other important aspects of their surveillance system, e.g. the clinical case definition in use, the distribution of outpatients and inpatients being sampled, and the availability of population denominators [14,24]. The GIBS database was initially assembled in 2013–14 by merging influenza surveillance data up to as late as December 2013 from thirty countries [14], but was updated for the purposes of this paper with data until 2015

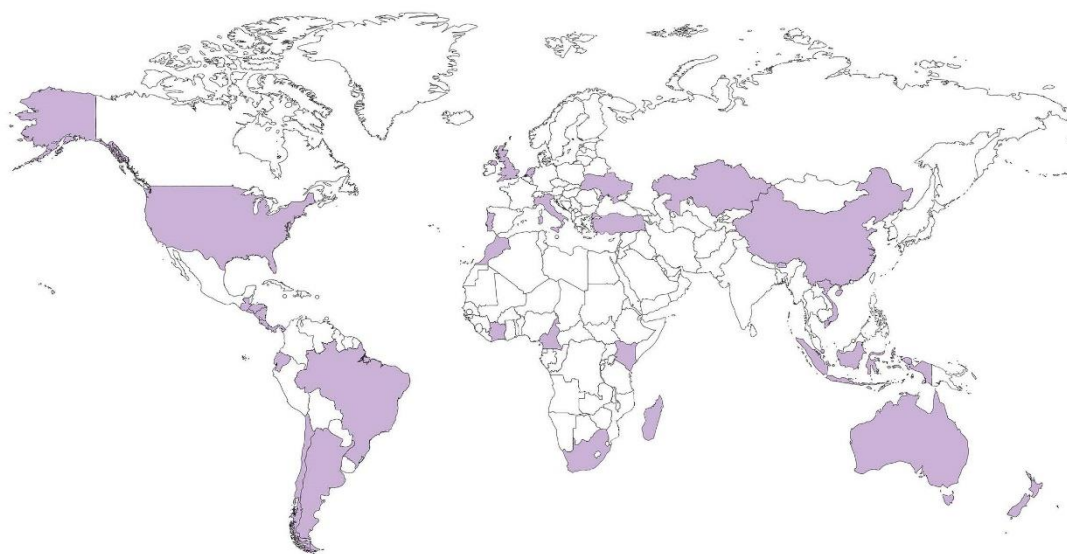


Fig 1. Countries participating in the Global Influenza B Study (GIBS), 2000–2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222381.g001>

to 2018 (depending on the country) for twenty-five countries. The Netherlands joined the project in 2018, bringing the total number of participating countries to thirty-one.

Data for China were provided separately for the Northern and Southern parts of the country, which were therefore entered separately in the analyses (for brevity, however, we will use the term “country” to refer to a whole country or a part of it henceforth). Brazil also provided data stratified by sub-national regions (i.e. five administrative regions: north, north-east, central-west, south, and south-east); however, geographically-stratified data were too sparse in some years, thus we opted to treat Brazil as a single country in the analysis.

Statistical methods

Similar to previous GIBS publications [14,23–24], the unit of analysis was the “season”: this corresponded to the calendar year in tropical countries and countries located in the Southern hemisphere, and was defined as the period between the 27th week of a year and the 26th week of the following year for countries located in the Northern hemisphere. As previously explained [23], the purpose of this methodological approach is to give each “season” an equal weighting in the analysis, thus limiting the impact on results arising from any differences in reporting between countries (e.g. high- vs. low-resources countries) and over time within the same country (e.g. before vs. after the 2009 pandemic).

For each country, we included in the analyses the seasons with at least 20 weeks of reported data and at least 100 laboratory-confirmed influenza cases. In each season, we calculated the percentage of influenza cases that were due to influenza B. We then determined the percentage of cases that were caused by viruses belonging to the B/Victoria or B/Yamagata lineage: in this analysis, to increase the stability of the results, we only included (for each country) the subset of seasons with 50 or more characterized influenza B viruses. The non-parametric Kruskal-

Wallis test was applied to compare the median proportion of influenza A and B cases (over all influenza cases) and B/Victoria and B/Yamagata cases (over all cases with characterized influenza B viruses) between countries based on their latitude (Northern hemisphere, inter-tropical belt, or Southern hemisphere) and population age structure (median age below 30 years, between 30 and 35 years, or above 35 years) [25].

We compared the timing of the primary peak of influenza A and B epidemics in each country using the EPIPOI software [26]. For this analysis, we excluded data from the 2009 season (2009–2010 in Northern hemisphere countries) because of the markedly atypical timing of the influenza A(H1N1)pdm09 pandemics. Time series were first standardized by dividing the weekly number of influenza cases by the maximum weekly number (per country by defined season). Next, a periodic annual function (PAF) was generated by summing up the annual, semi-annual and quarterly harmonics (obtained by Fourier decomposition). The timing of the primary peak (defined as the month where the PAF reaches its maximum value) was then compared for A and B epidemics in each country.

We aimed to evaluate the frequency of influenza B lineage-level vaccine mismatch, which was defined as a mismatch between the lineage that caused the majority (>50%) of influenza B cases in a given season and country, and the lineage included in the trivalent vaccine. Information on influenza vaccine formulation was retrieved from the WHO website [27]. The above definition is straightforward for temperate countries in the Northern and Southern hemisphere, but much less so for countries of the inter-tropical belt. While the WHO issues recommendations on the composition of influenza vaccines to be used in tropical countries [28], these countries often adopt either formulation based on local considerations or make no specific recommendations [29]. To cope with this and consider all possible scenarios (and also for consistency with previous GIBS publications [14]), the frequency of B lineage-level vaccine mismatch in tropical countries was calculated by assuming that: (i) all countries situated north of the equator use the northern hemisphere vaccine, and all countries south of the equator use the southern hemisphere vaccine formulation; (ii) all countries use the northern hemisphere vaccine formulation; or (iii) all countries use the southern hemisphere vaccine formulation.

The recent update of the GIBS database and the resulting increase in the number of cases with characterized influenza B viruses made it possible to compare the age distribution of influenza B/Victoria and B/Yamagata cases in a similar way to what had been done previously for influenza B vs. A (and its subtypes) [14,24]. This analysis was limited to countries for which information on the exact age was available for at least 50 B/Victoria and at least 50 B/Yamagata influenza cases over all seasons available. The virus-lineage-specific age distribution of influenza B cases was visualized, separately in each country, using histograms with 5-age-year-wide bars. Since the distributions were skewed to the right, we used the non-parametric Wilcoxon rank sum test to compare the median age of influenza B cases by virus lineage.

Statistical analyses were conducted using Stata software version 14 (StataCorp LP, College Station, TX, USA). All statistical tests were two-sided, and p-values were considered statistically significant when below 0.05.

Results

The database of the Global Influenza B Study encompassed a total of 1,820,301 influenza cases between 2000 and 2018, of which 419,167 (23.0%) had type B influenza. Cases were unevenly distributed between countries, with USA and Australia contributing 54.1% and 25.3% of all influenza cases to the database, respectively. Information on age was not available for the USA; for the remaining countries, information on age was available for most (95.0%) influenza cases. After applying our exclusion criteria, 299 seasons with 100 or more reported influenza

cases overall were included in the analysis, of which 110 were from Northern hemisphere countries, 131 from countries located in the inter-tropical belt, and 58 from Southern hemisphere countries. The median number of seasons per country was nine, ranging from three (for Turkey) to eighteen (for New Zealand). The number of overall and influenza B cases in each country and season included in the analysis, the proportion of influenza B cases of which the virus was characterized, and their breakdown into B/Victoria and B/Yamagata lineages, are provided in [S1 Table](#).

Frequency of influenza B

Influenza B virus caused a median 23.4% (interquartile range [IQR] 9.3–38.9%) of reported influenza cases in a season. More specifically, the proportion of influenza cases caused by the virus type was <20% in 118 seasons (42.3%), between 20% and 50% in 125 seasons (41.8%), and above 50% in 45 seasons (15.1%). The proportion of influenza B cases over all influenza cases reported in the season varied geographically ([Fig 2](#)): its median value tended to be higher (with borderline statistical significance, $p = 0.060$) in countries of the inter-tropical belt (27.4%, IQR 12.2–41.7%) compared to temperate countries of the Northern (21.0%, IQR 7.3–37.4%) and Southern (22.2%, IQR 9.1–34.5%) hemispheres. The proportion of seasons in which influenza B cases constituted between 20 and 50% or more than 50% of all reported influenza cases did not significantly differ ($p = 0.275$) between tropical countries (47.3% and 16.0%, respectively) and temperate countries of the two hemispheres (39.9% and 14.3%, respectively).

Timing of influenza A and B epidemics

In countries of the Southern hemisphere, influenza A epidemics typically peaked in July–September, on average 1.1 month earlier than influenza B (August–September) ([Table 1](#)). Influenza epidemics also peaked in the winter months of Northern hemisphere countries, earlier for influenza A (January–February, except Ukraine, in March) than for influenza B (February–March, except England, in January), with an average difference of 0.6 months. The only exception was Bhutan (i.e. the southernmost countries among those situated in the Northern hemisphere), where both influenza A and B epidemics typically peaked in August. There was more variability in countries of the inter-tropical belt: the timing of the primary peak varied widely between countries and could take place in practically any month of the year, with a small difference in timing (0.3 months earlier on average) for the primary peak of influenza A and B epidemics.

Frequency of B/Victoria and B/Yamagata lineages viruses

There were 84 seasons where the virus lineage was determined for 50 or more influenza B cases (out of a total 299 seasons, 28.1%) and this data covered 18 countries (out of 31). In these seasons, the B/Victoria and B/Yamagata lineage viruses caused a similar range of proportions of influenza B cases. More precisely, the median proportion of influenza B cases reported in a season that were caused by B/Victoria lineage viruses was 46.0% (IQR 5.3–89.6%). The range of the proportion of B/Victoria over all influenza B cases was 0%–100%, meaning that there were seasons in which all influenza B cases were caused by either virus lineage. Co-circulation of the two lineages was frequent: in 27 (32.1%) of 84 seasons, both lineages accounted for at least 20% of influenza B cases, while the B/Victoria and B/Yamagata lineages caused over 80% of all influenza B cases in 27 (32.1%) and 30 (35.8%) seasons, respectively.

The proportion of either lineage over all influenza B cases varied according to the age structure of countries, and consequently, according to the countries' latitude as well ([Fig 3](#)). The

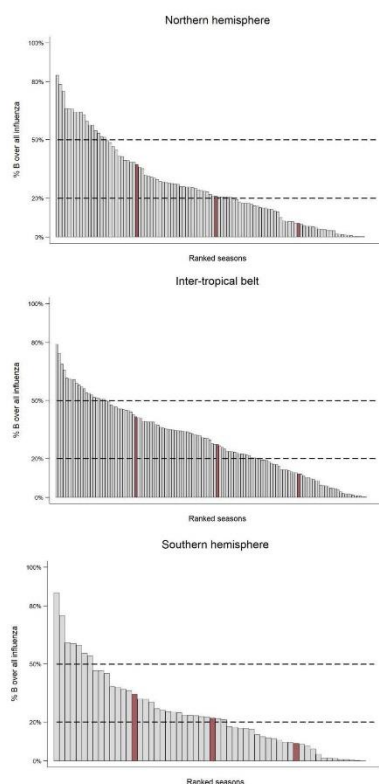


Fig 2. Distribution of influenza seasons by proportion of influenza B cases and geographical area (Inter-tropical belt, Northern hemisphere, Southern hemisphere). Red bars indicate 25th, 50th (median) and 75th percentiles. The Global Influenza B Study, 2000–2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222381.g002>

proportion of influenza B cases caused by the B/Victoria lineage in a given season varied widely (ranging from 0% to nearly 100%) also in the analyses stratified by the country's age structure and latitude. However, the B/Victoria lineage was more frequent (p-value 0.049) in countries with a median age below 30 years (median proportion over all influenza B cases = 67.0%) compared to countries with a median age was 30–35 years (42.0%) or above 35 years (36.2%). Likewise, the median proportion of B/Victoria over all characterized influenza B cases in a season was higher in countries of the inter-tropical belt (57.5%) compared to temperate countries of the Northern (27.9%) and the Southern hemisphere (43.8%) (p-value = 0.048).

Age distribution of B/Victoria and B/Yamagata influenza cases

In Table 2, we compared the median age of influenza B cases according to virus lineage. In Australia, B/Victoria cases were non-significantly older than B/Yamagata cases: the median

Table 1. Typical timing of the peak of influenza A and B epidemics according to countries' latitude. The Global Influenza B Study, 2000–2018.

Country	Latitude	Typical timing of influenza peak	
		A	B
Southern hemisphere			
New Zealand	41.8 S	Aug (1 st half)	Aug (2 nd half)
Chile	35.8 S	Jul (2 nd half)	Sep (2 nd half)
Argentina (Santa Fe)	31.4 S	Aug (1 st half)	Sep (2 nd half)
South Africa	29.0 S	Jul (1 st half)	Sep (2 nd half)
Australia	25.8 S	Sep (1 st half)	Sep (1 st half)
Inter-tropical belt			
Madagascar	19.4 S	Feb (1 st half)	Mar (1 st half)
Brazil	10.8 S	Jun (2 nd half)	Oct (1 st half)
Ecuador	2.0 S	May (1 st half)	Jul (1 st half)
Indonesia	1.7 S	Feb (1 st half)	Apr (2 nd half)
Kenya	0.4 S	Jul (2 nd half)	Mar (2 nd half)
Singapore	1.2 N	Jun (1 st half)	May (2 nd half)
Cameroon	5.7 N	Nov (1 st half)	Nov (1 st half)
Ivory Coast	7.6 N	Nov (2 nd half)	Oct (1 st half)
Panama	8.6 N	Jun (2 nd half)	Jul (2 nd half)
Costa Rica	10.0 N	Dec (2 nd half)	Oct (1 st half)
Nicaragua	12.9 N	Nov (1 st half)	Aug (2 nd half)
El Salvador	13.8 N	Jun (2 nd half)	Jul (1 st half)
Honduras	14.8 N	Nov (1 st half)	Jul (1 st half)
Guatemala	15.7 N	Mar (2 nd half)	Sep (1 st half)
Viet Nam	16.7 N	Aug (1 st half)	Dec (1 st half)
Northern hemisphere			
Bhutan	27.4 N	Aug (2 nd half)	Aug (2 nd half)
China South	31.1 N	Feb (2 nd half)	Mar (2 nd half)
Morocco	32.0 N	Jan (2 nd half)	Feb (1 st half)
Turkey	39.0 N	Feb (1 st half)	Feb (2 nd half)
Portugal	39.3 N	Jan (2 nd half)	Feb (1 st half)
China North	39.5 N	Jan (2 nd half)	Mar (1 st half)
Italy	42.9 N	Feb (2 nd half)	Feb (2 nd half)
USA	45.6 N	Feb (1 st half)	Mar (2 nd half)
Kazakhstan	48.0 N	Feb (2 nd half)	Feb (2 nd half)
Ukraine	49.1 N	Mar (1 st half)	Mar (1 st half)
Netherlands	52.3 N	Feb (1 st half)	Mar (1 st half)
England	52.3 N	Jan (2 nd half)	Jan (2 nd half)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222381.t001>

age was 11 vs. 8 years, respectively. In all other countries, B/Yamagata cases were older than B/Victoria cases, and the difference between the median age was always significant except in Madagascar (p-value 0.248) and in Ukraine (p-value 0.082).

The visual inspection of the graphs revealed a fairly consistent pattern in the age distribution of B/Victoria and B/Yamagata cases (S1 File). In most countries, influenza B/Victoria cases tended to be distributed according to their age along a unimodal curve, with a peak below 10 years of age, while the age distribution of B/Yamagata cases frequently followed a bimodal curve, with an earlier, larger peak below 10 years of age, and a smaller, yet discernible peak at older age, mostly between 25 and 50 years of age. The adult age peak of B/Yamagata

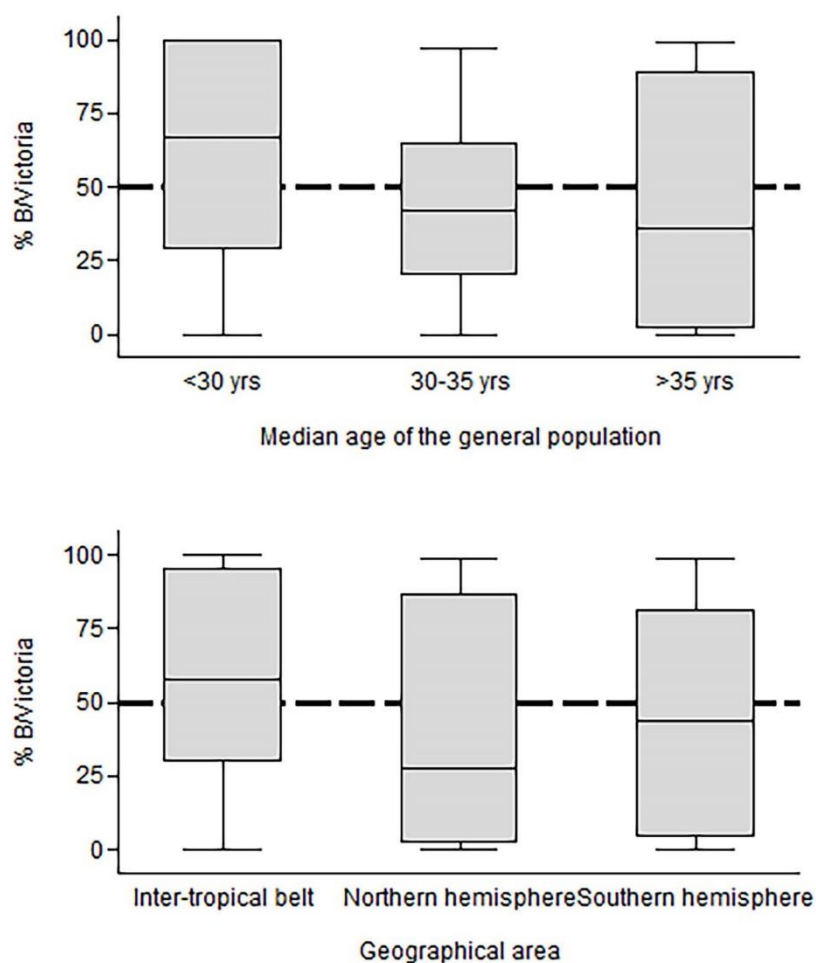


Fig 3. Proportion of influenza B cases in a season that were caused by the B/Victoria lineage viruses, according to countries median age (top) and geographical area (bottom). The Global Influenza B Study, 2000–2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222381.g003>

cases was barely noticeable in countries where the majority of inhabitants are younger than 25 years (e.g. Madagascar and Ivory Coast), and became increasingly evident as the median age of the country population increased. A partial exception was Portugal, where the peak in the age

Table 2. Age distribution of influenza B/Victoria and B/Yamagata patients by country (sorted by median age of the general population). The Global Influenza B Study, 2000–2018.

Country ^(a)	Median age general population	No. influenza B cases		Median age (IQR)		p-value ^(b)
		Victoria	Yamagata	Victoria	Yamagata	
Madagascar	19.7	787	405	7 (4–16)	8 (3–17)	0.248
Ivory Coast	20.9	240	153	3 (1–8)	5 (2–32)	0.002
South Africa	27.1	61	102	3 (1–29)	29 (1–54)	0.003
Indonesia	30.2	422	235	10 (6–20)	25 (7–36)	<0.001
Turkey	30.9	98	339	12 (6–22)	34 (11–48)	<0.001
Chile	34.4	1351	1950	8 (3–18)	14 (6–21)	<0.001
Singapore	34.6	413	921	15 (8–32)	35 (12–51)	<0.001
New Zealand	37.9	232	1036	15 (7–33)	35 (11–52)	<0.001
Australia	38.7	648	276	11 (5–23)	8 (3–36)	0.468
England	40.5	478	877	16 (8–29)	40 (17–53)	<0.001
Ukraine	40.6	109	186	13 (8–19)	15 (7–32)	0.082
Portugal	42.2	57	183	19 (13–36)	46 (34–57)	<0.001
Netherlands	42.6	354	773	19 (7–36)	46 (26–58)	<0.001
Italy	45.5	68	510	10 (6–19)	12 (6–47)	0.009

IQR: inter-quartile range

^(a) Countries were included if information on exact age was available for ≥ 50 B/Victoria and ≥ 50 B/Yamagata influenza cases.

^(b) Wilcoxon rank-sum test for comparison of medians

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222381.t002>

distribution of B/Victoria cases was between 10 and 20 years of age, and B/Yamagata distributed along a unimodal curve peaking at above 50 years of age.

Frequency of lineage-level influenza B trivalent vaccine mismatches

The proportion of influenza B lineage-level vaccine mismatch was 54.2% in countries in the Southern hemisphere, and 42.9% in countries of the Northern hemisphere. For countries in the inter-tropical belt, the proportion of seasons with a lineage-level vaccine mismatch was 29.6% in the scenario in which these countries use the vaccine composition recommended for the hemisphere they are situated in; 40.7% assuming all these countries used the recommended vaccine composition for the Northern hemisphere; and 22.2% if all countries used the recommended vaccine composition for the Southern hemisphere.

Discussion

Our analysis found that influenza B virus was responsible for nearly one fourth of all influenza cases in an average season between 2000 and 2018. More specifically, influenza B virus accounted for over 20% of all influenza cases in more than half of the seasons, and was the dominant virus type in about one out of every seven seasons. This proportion varied geographically, as the proportion of influenza B over all influenza cases tended to be higher on average in tropical countries compared to countries of the Northern and Southern hemispheres. These findings were broadly in line with reports from countries around the world [5,9,20–21,30–31] and with GIBS data published in 2015 [14], with moderate discrepancies (less than 5%) being most likely linked to the variability of the time span covered by different studies. Influenza B epidemics tended to peak on average three weeks later than influenza A epidemics during the winter period in temperate countries of both hemispheres, which is consistent with previous country reports [21,30,32–34]. The timing of influenza A and B epidemics was different in

tropical countries where they were highly heterogeneous and showed no consistent pattern in the timing of the different epidemics. Influenza viruses exhibit differential ability to induce temporary immunity against re-infection with other viruses in experimental settings [35]. This “viral hierarchy” may help explain the differences in timing of epidemics caused by different virus types and subtypes where the weather conditions that are most favourable to the occurrence of influenza epidemics (e.g. cold-dry) last for only a limited number of weeks each year.

The study of patterns of circulation of B/Victoria and B/Yamagata lineages revealed two main findings. Firstly, the proportion of B cases caused by either lineage in a given season ranged between 0% and nearly 100% in each geographical area (i.e. anywhere around the world seasons occurred where all influenza B cases were caused by either the B/Victoria or the B/Yamagata lineage), which emphasizes the challenges faced when trying to predict which lineage will cause most influenza B cases next season. This helps explain the very high frequency of lineage-level vaccine mismatch for the TIV which was around 50% (i.e. close to the scenario in which the choice of the vaccine lineage is made at random) in temperate countries of the two hemispheres, which has been reported in the past [30,36–37].

The second important finding that emerges from the B/Victoria-B/Yamagata lineage analysis is that whilst the two lineages caused a comparable proportion of influenza B cases globally during the study period, their distribution varied geographically, as B/Victoria was relatively more frequent in tropical countries, while B/Yamagata was more frequent in temperate climate countries of the Southern and Northern hemispheres. The reason for this pattern of circulation of the two lineages is not clear. One possibility is that the survival and transmissibility of B/Victoria and B/Yamagata viruses is differentially affected by “cold-dry” and “humid-rainy” environmental conditions that drive the occurrence of influenza epidemics in temperate and tropical countries, respectively [38]. This hypothesis does not seem, however, to be supported by the available evidence, which suggests instead that influenza viruses of different types and subtypes (e.g. A(H3N2), A(H1N1)pdm09, and B) are similarly affected by weather conditions [39]. Based on our findings on the differential age distribution of B/Victoria and B/Yamagata infected cases, a more likely explanation for the unequal geographical distribution of the two B lineages lies in the diverse demographic structure of world countries, with those located around the tropics having a lower median age, on average, than those in temperate climates.

In this regard, our study showed consistently at a global level (i.e. across countries that differ greatly under many aspects, including the type of influenza surveillance system) that B/Yamagata cases are on average older than B/Victoria cases, and in particular, that the former virus lineage infects adult individuals (≥ 25 years) more frequently than the latter. The only exception (i.e. the only country in which B/Victoria cases were older than B/Yamagata cases, albeit not significantly) was Australia. The reason for this divergent pattern is not clear; however, since the majority of B/Yamagata cases in the database from Australia occurred in 2008 (see S1 Table), this finding might be driven by a single season with an unusual age distribution of B/Yamagata patients. Importantly, our findings support earlier work showing that each influenza A subtype (H3N2, pre-2009-pandemic H1N1, and H1N1pdm09) tends to affect a different age group [24]. A recent study has shown that the B/Victoria viruses antigenic drift parallels that of A(H3N2), with limited cross-reactivity between phylogenetic clusters compared to B/Yamagata (which, in contrast, resembled A(H1N1) under this regard, with multiple variants circulating and greater levels of antigenic cross-reactivity) [40]. According to these observations, one would expect re-infection among adult individuals to occur more frequently for B/Victoria rather than B/Yamagata, but the observed pattern runs counter to this expectation. Vijaykrishna and colleagues suggested that the observed differential age distribution may be explained by either the higher effective reproductive number of B/Victoria; a broader response against B/Victoria viruses in older people; and/or differences in the prevalence of

receptor binding molecules that help B/Victoria and B/Yamagata viruses infect respiratory tract cells in young children and adults [40]. Another hypothesis is that the bimodal age distribution of B/Yamagata cases may be the result of a shorter duration of acquired immunity developed after infection with B/Yamagata vs. B/Victoria viruses [41]. Finally, antigenic original sin (i.e. preferential response to influenza B viruses encountered in the past [42]) may also play a role. If this were true, the mean age of patients infected with either B lineage would be expected to drift over time: this has occurred in Australia between 2008–2011 [40], but we were unable to replicate these results in the GIBS database (results not shown).

These findings have important implications for assessing the impact of influenza B viruses in a population each season. Knowing early in the season (through surveillance activities) which influenza B lineage virus is circulating will allow one to predict which age groups will be more affected, with B/Yamagata seasons being generally characterized by more adults and elderly people being infected and, therefore, by a greater burden of disease compared to B/Victoria seasons. This appears to have been the case during the 2017/18 season in Europe, when B/Yamagata was dominant (and there was a lineage-level vaccine mismatch) and a high burden of influenza B was observed in many European countries [43].

We analyzed influenza surveillance data from around the world to determine the epidemiology of influenza B virus and its lineages in the 21st century. We have enriched the analysis of an earlier GIBS paper [14] by including more countries (31 vs. 26) and additional years (data to up to 2018): the overall number of reports analysed is now twice as large (>1.8 million vs. 935,000 cases). This allowed us to conduct a comprehensive comparative analysis of the epidemiological characteristics of B/Victoria and B/Yamagata virus lineages, thus achieving a better understanding of the epidemiology of influenza B globally. The most important limitation of our study is that it relies on data that were collected within national surveillance systems rather than for research purposes. Countries participating in GIBS inevitably differ in terms of a number of important characteristics, including percentage of out- and in-patients included, number of years with data and average number of influenza cases reported per year, proportion of influenza B viruses that were characterized availability of information on age of these cases and sampling strategies across age groups. In each individual country, changes in the aforementioned characteristics may have occurred over time, for instance before and after the 2009 pandemic. Another limitation of our study is the uneven distribution of cases among countries and seasons, which is partly due to differences among countries in terms of population, the intensity of surveillance activities, and the coverage of each country's influenza surveillance system. Throughout this paper, we have used statistical methods that were intended to minimize the impact of this variability on the results. These include the use of the 'season' as a unit of analysis for the comparison of the frequency of B influenza across countries, the standardization offered by the EPIPOI software in the analysis of temporal patterns of influenza epidemics, and the use of medians to compare the age distribution of influenza cases between countries. However, we acknowledge that these sources of variability may have affected our findings to an extent that is difficult to quantify precisely, and a further improvement in the harmonization of influenza surveillance data remains desirable as it would allow researchers to conduct more detailed and in-depth analyses and obtain more reliable results.

In conclusion, our study provides important new information that describes the epidemiology of influenza B viruses and its lineages during the start of the 21st century. We showed that influenza B virus caused nearly one fourth (on average) of all influenza cases occurring annually in the world during 2000–2018, and that both lineages accounted each for a comparable proportion of all influenza B cases globally. We also observed that cases infected with the B/Victoria or B/Yamagata lineages differed consistently (i.e. in a similar fashion across countries) in terms of their age distribution, and suggested that this may help explain the uneven

geographical distribution of the two lineages globally. Finally, we confirmed that the TIV suffers from a high frequency of lineage-level mismatch, especially in temperate countries of the two hemispheres. While expanding our knowledge of the epidemiology and pattern of circulation of influenza B virus, these findings will help inform health policy decisions aiming to reduce disease burden associated with seasonal influenza locally, regionally and globally.

Supporting information

S1 Table. Laboratory-confirmed influenza cases reported in each country and season, and proportion of those caused by the influenza B virus type (overall and by lineage). The Global Influenza B Study, 2000–2018.

^(a) A season was defined as the period between the 27th week of a given year and the 26th week of the following year for countries in the Northern hemisphere, and as the period between the first and last week of a given year for other countries.

^(b) Seasons with fewer than 100 influenza cases were not included.

^(c) Number of influenza B cases in each season, and proportion of influenza B over all influenza cases in the same season.

^(d) Number of influenza B cases for which the virus lineage was characterized, and proportion over all influenza B cases in the same season.

^(e) Number of influenza B cases caused by viruses belonging to the Victoria and Yamagata lineages, and proportion over all characterized influenza B viruses in the same season. Not reported in seasons with fewer than 50 characterized influenza B cases.

(DOCX)

S1 File. Age distribution of laboratory-confirmed influenza patients infected with type B viruses belonging to the Victoria or Yamagata lineage. Countries which provided information on exact age for ≥ 50 B Victoria and ≥ 50 B Yamagata influenza for the whole study period cases were included. Countries were ordered according to the median age of the general population. The Global Influenza B Study, 2000–2018.

(PDF)

S2 File. Contact information of data owners.

(DOC)

Acknowledgments

The “Global Influenza B Study team” (group authorship) includes the following scientists: Juan Manuel Rudi (jmrudi@anlis.gov.ar), National Institute of Respiratory Diseases “Emilio Coni”, Santa Fe, Argentina; Dorji Wangchuk (dorjiwangchuk@health.gov.bt) and Sangay Zangmo (szangmo@health.gov.bt), Royal Centre for Disease Control, Department of Public Health, Ministry of Health, Thimphu, Bhutan; Daiana Araujo da Silva (daiana.silva@saude.gov.br), Ministry of Health, Department of Surveillance of Transmissible Diseases, Brasília/DF, Brazil; Winston Andrade (wandrade@ispch.cl), Sub-Department of Viral Diseases, Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile; Jiandong Zheng (zhengjd@chinacdc.cn) and Ying Qin (qinying@chinacdc.cn), Division of Infectious Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, P.R. China; Joanna Ellis (joanna.ellis@phe.gov.uk), Public Health England, London, United Kingdom; Simona Puzelli (simona.puzelli@iss.it), National Influenza Center, Department of Infectious Diseases, National Institute of Health, Rome, Italy; Caterina Rizzo (rizzocaterina@gmail.com), Bambino Gesù Children’s Hospital, Rome, Italy; Linus Ndegwa (ikf7@cdc.gov), Influenza Program, Centers for Disease Control and Prevention, Nairobi, Kenya; Marit MA de Lange (marit.de.lange@rivm.nl) and Anne C. Teirlinck

(anne.teirlinck@rivm.nl), National Institute of Public Health and the Environment, Centre for Infectious Diseases, Epidemiology and Surveillance, Bilthoven, The Netherlands; Jeffery Cutter (jeffery_cutter@moh.gov.sg) and Raymond Tzer Pin Lin (raymond_lin@moh.gov.sg), Public Health Group, Ministry of Health, Singapore, Singapore; Than T. Le (lmot82@yahoo.com), National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam; Peter Kinuthia ⁴² (polorien@gmail.com), IHRC Inc., Atlanta, USA.

We thank the Australia Influenza Surveillance Network for making their data publically available to researchers. In the Netherlands, we would like to thank the general practitioner network coordinated by Nivel and their patients for participation in the surveillance of influenza-like illness and other acute respiratory infections; the technicians who did all the laboratory analyses of the surveillance specimens; and epidemiologists with which this surveillance collaboratively has been performed (Marit de Lange, MSc; Dr. Anne Teirlinck; Dr. Wim van der Hoek). Influenza surveillance data Turkey were provided by Meral A. Ciblak (Sanofi Pasteur, Lyon, France) while working at the Istanbul University, Istanbul, Turkey. The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the Centers for Disease Control and Prevention.

Author Contributions

Conceptualization: Saverio Caini, Clotilde El Guerche-Séblain, John Paget.

Data curation: Saverio Caini, Gabriela Kuszniierz, Verónica Vera Garate, Sonam Wangchuk, Binay Thapa, Francisco José de Paula Júnior, Walquiria Aparecida Ferreira de Almeida, Richard Njouom, Rodrigo A. Fasce, Patricia Bustos, Luzhao Feng, Zhibin Peng, Jenny Lara Araya, Alfredo Bruno, Doménica de Mora, Mónica Jeannette Barahona de Gámez, Richard Pebody, Maria Zambon, Rocío Higueros, Rudevelinda Rivera, Herman Kosasih, Maria Rita Castrucci, Antonino Bella, Hervé A. Kadjo, Coulibaly Daouda, Ainash Makusheva, Olga Bessonova, Sandra S. Chaves, Gideon O. Emukule, Jean-Michel Heraud, Norosoa H. Razanajatovo, Amal Barakat, Fatima El Falaki, Adam Meijer, Gé A. Donker, Q. Sue Huang, Tim Wood, Angel Balmaseda, Rakhee Palekar, Brechla Moreno Arévalo, Ana Paula Rodrigues, Raquel Guiomar, Vernon Jian Ming Lee, Li Wei Ang, Cheryl Cohen, Florette Treurnicht, Alla Mironenko, Olha Holubka, Joseph Bresee, Lynnette Brammer, Mai T. Q. Le, Phuong V. M. Hoang, John Paget.

Formal analysis: Saverio Caini.

Funding acquisition: Clotilde El Guerche-Séblain, John Paget.

Investigation: Saverio Caini, John Paget.

Methodology: Saverio Caini, Clotilde El Guerche-Séblain, John Paget.

Project administration: Clotilde El Guerche-Séblain, John Paget.

Resources: Gabriela Kuszniierz, Verónica Vera Garate, Sonam Wangchuk, Binay Thapa, Francisco José de Paula Júnior, Walquiria Aparecida Ferreira de Almeida, Richard Njouom, Rodrigo A. Fasce, Patricia Bustos, Luzhao Feng, Zhibin Peng, Jenny Lara Araya, Alfredo Bruno, Doménica de Mora, Mónica Jeannette Barahona de Gámez, Richard Pebody, Maria Zambon, Rocío Higueros, Rudevelinda Rivera, Herman Kosasih, Maria Rita Castrucci, Antonino Bella, Hervé A. Kadjo, Coulibaly Daouda, Ainash Makusheva, Olga Bessonova, Sandra S. Chaves, Gideon O. Emukule, Jean-Michel Heraud, Norosoa H. Razanajatovo, Amal Barakat, Fatima El Falaki, Adam Meijer, Gé A. Donker, Q. Sue Huang, Tim Wood, Angel Balmaseda, Rakhee Palekar, Brechla Moreno Arévalo, Ana Paula Rodrigues, Raquel Guiomar, Vernon Jian Ming Lee, Li Wei Ang, Cheryl Cohen, Florette Treurnicht, Alla

Mironenko, Olha Holubka, Joseph Bresee, Lynnette Brammer, Mai T. Q. Le, Phuong V. M. Hoang, Clotilde El Guerche-Séblain.

Supervision: John Paget.

Visualization: Saverio Caini.

Writing – original draft: Saverio Caini, John Paget.

Writing – review & editing: Gabriela Kuszniarz, Verónica Vera Garate, Sonam Wangchuk, Binay Thapa, Francisco José de Paula Júnior, Walquiria Aparecida Ferreira de Almeida, Richard Njouom, Rodrigo A. Fasce, Patricia Bustos, Luzhao Feng, Zhibin Peng, Jenny Lara Araya, Alfredo Bruno, Doménica de Mora, Mónica Jeannette Barahona de Gámez, Richard Pebody, Maria Zambon, Rocio Higueros, Rudevelinda Rivera, Herman Kosasih, Maria Rita Castrucci, Antonino Bella, Hervé A. Kadjo, Coulibaly Daouda, Aïnash Makusheva, Olga Bessonova, Sandra S. Chaves, Gideon O. Emukule, Jean-Michel Heraud, Norosoosa H. Raza-najatovo, Amal Barakat, Fatima El Falaki, Adam Meijer, Gé A. Donker, Q. Sue Huang, Tim Wood, Angel Balmaseda, Rakhee Palekar, Brechla Moreno Arévalo, Ana Paula Rodrigues, Raquel Guiomar, Vernon Jian Ming Lee, Li Wei Ang, Cheryl Cohen, Florette Treurnicht, Alla Mironenko, Olha Holubka, Joseph Bresee, Lynnette Brammer, Mai T. Q. Le, Phuong V. M. Hoang, Clotilde El Guerche-Séblain, John Paget.

References

1. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018; 391(10127):1285–1300. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2) PMID: 29248255
2. Rolfes MA, Foppa IM, Garg S, Flannery B, Brammer L, Singleton JA et al. Annual estimates of the burden of seasonal influenza in the United States: A tool for strengthening influenza surveillance and preparedness. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018; 12(1):132–137. <https://doi.org/10.1111/irv.12486> PMID: 29446233
3. Cassini A, Colzani E, Piri A, Mangen MJ, Plass D, McDonald SA, et al. Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013. *Euro Surveill*. 2018; 23(16).
4. Lee VJ, Ho ZJM, Goh EH, Campbell H, Cohen C, Cozza V, et al. Advances in measuring influenza burden of disease. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018; 12(1):3–9. <https://doi.org/10.1111/irv.12533> PMID: 29460425
5. Paul Glezen W, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ, Oxford J. The burden of influenza B: a structured literature review. *Am J Public Health*. 2013; 103(3):e43–51. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2012.301137> PMID: 23327249
6. Tafalla M, Buijssen M, Geets R, Vonk Noordegraaf-Schouten M. A comprehensive review of the epidemiology and disease burden of Influenza B in 9 European countries. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(4):993–1002. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1111494> PMID: 26890005
7. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*. 1990; 175(1):59–68. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90186-u](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90186-u) PMID: 2309452
8. Paiva TM, Benega MA, Silva DB, Santos KC, Cruz AS, Hortenci MF, et al. Evolutionary pattern of reemerging influenza B/Victoria lineage viruses in São Paulo, Brazil, 1996–2012: Implications for vaccine composition strategy. *J Med Virol*. 2013; 85(11):1983–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.23684> PMID: 23926069
9. Jennings L, Huang QS, Barr I, Lee PI, Kim WJ, Buchy P, et al. Literature review of the epidemiology of influenza B disease in 15 countries in the Asia-Pacific region. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018; 12(3):383–411. <https://doi.org/10.1111/irv.12522> PMID: 29127742
10. Mertz D, Kim TH, Johnstone J, Lam PP, Science M, Kuster SP, et al. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2013; 347:f5061. <https://doi.org/10.1136/bmj.f5061> PMID: 23974637

11. Caini S, Schellevis F, El-Guerche Séblain C, Paget J. Important changes in the timing of influenza epidemics in the WHO European Region over the past 20 years: virological surveillance 1996 to 2016. *Euro Surveill*. 2018; 23(1).
12. Tricco AC, Chit A, Soobiah C, Hallett D, Meier G, Chen MH, et al. Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2013; 11:153. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-153> PMID: 23800265
13. Heikkinen T, Ikonen N, Ziegler T. Impact of influenza B lineage-level mismatch between trivalent seasonal influenza vaccines and circulating viruses, 1999–2012. *Clin Infect Dis*. 2014; 59(11):1519–24. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu664> PMID: 25139969
14. Caini S, Huang QS, Ciblak MA, Kuszniierz G, Owen R, Wangchuk S, et al. Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015; 9 Suppl 1:3–12.
15. de Boer PT, van Maanen BM, Damm O, Ultsch B, Dolk FCK, Crépey P, et al. A systematic review of the health economic consequences of quadrivalent influenza vaccination. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2017; 17(3):249–265. <https://doi.org/10.1080/14737167.2017.1343145> PMID: 28613092
16. Sočan M, Prošenc K, Učakar V, Berginc N. A comparison of the demographic and clinical characteristics of laboratory-confirmed influenza B Yamagata and Victoria lineage infection. *J Clin Virol*. 2014; 61(1):156–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.018> PMID: 25034374
17. Le TT, Pham TH, Pham TH, Nguyen le KH, Nguyen CT, Hoang VM, et al. Circulation of influenza B lineages in northern Viet Nam, 2007–2014. *Western Pac Surveill Response J*. 2015; 6(4):17–23. <https://doi.org/10.5365/WPSAR.2015.6.1.022> PMID: 26798557
18. Xu C, Chan KH, Tsang TK, Fang VJ, Fung RO, Ip DK, et al. Comparative epidemiology of influenza B Yamagata- and Victoria-lineage viruses in households. *Am J Epidemiol*. 2015; 182(8):705–13. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv110> PMID: 26400854
19. Barr IG, Vijaykrishna D, Sullivan SG. Differential age susceptibility to influenza B/Victoria lineage viruses in the 2015 Australian influenza season. *Euro Surveill*. 2016; 21(4).
20. Seleka M, Treurnicht FK, Tempia S, Hellferscee O, Mtshali S, Cohen AL, et al. Epidemiology of influenza B/Yamagata and B/Victoria lineages in South Africa, 2005–2014. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0177655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177655> PMID: 28542324
21. Moa AM, Muscatello DJ, Tumer RM, MacIntyre CR. Epidemiology of influenza B in Australia: 2001–2014 influenza seasons. *Influenza Other Respir Viruses*. 2017; 11(2):102–109. <https://doi.org/10.1111/irv.12432> PMID: 27650482
22. Lapinski B, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, Riediger I, Debur MC, et al. Molecular epidemiology of influenza B virus and implications in immunization strategy, Southern Brazil. *Vaccine*. 2018; 36(1):107–113. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.033> PMID: 29174679
23. Caini S, Andrade W, Badur S, Balmaseda A, Barakat A, Bella A, et al. Temporal patterns of influenza A and B in tropical and temperate countries: what are the lessons for influenza vaccination? *PLoS One*. 2016; 11(3):e0152310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152310> PMID: 27031105
24. Caini S, Spreuwenberg P, Kuszniierz GF, Rudi JM, Owen R, Pennington K, et al. Distribution of influenza virus types by age using case-based global surveillance data from twenty-nine countries, 1999–2014. *BMC Infect Dis*. 2018; 18(1):269. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3181-y> PMID: 29884140
25. Central Intelligence Agency. The World Factbook. Available from <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/> Cited 20 June 2018
26. Alonso WJ, McCormick BJ. EPIPOI: a user-friendly analytical tool for the extraction and visualization of temporal parameters from epidemiological time series. *BMC Public Health*. 2012; 12(1):982.
27. World Health Organization. Recommendations on the composition of influenza virus vaccines. <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/> Cited 18 June 2018
28. World Health Organization. Which vaccine formulation to use—Northern or Southern hemisphere? http://www.who.int/influenza/vaccines/tropics/vaccination_formulation/en/ Cited 18 June 2018
29. Hirve S, Lambach P, Paget J, Vandemaële K, Fitzner J, Zhang W. Seasonal influenza vaccine policy, use and effectiveness in the tropics and subtropics—a systematic literature review. *Influenza Other Respir Viruses*. 2016; 10(4):254–67. <https://doi.org/10.1111/irv.12374> PMID: 26842617
30. Mosnier A, Caini S, Daviaud I, Bensoussan JL, Stoll-Keller F, Bui TT, et al. Ten influenza seasons in France: distribution and timing of influenza A and B circulation, 2003–2013. *BMC Infect Dis*. 2015; 15:357. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1056-z> PMID: 26289794
31. Barros EN, Cintra O, Rossetto E, Freitas L, Colindres R. Patterns of influenza B circulation in Brazil and its relevance to seasonal vaccine composition. *Braz J Infect Dis*. 2016; 20(1):81–90. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.09.009> PMID: 26626166

32. Pan Y, Zhang Y, Yang P, Qian H, Shi W, Wu S, et al. Epidemiological and phylogenetic characteristics of influenza B infection in severe acute respiratory infection cases in Beijing, 2014 to 2015. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(52):e2399.
33. van Asten L, Bijkerk P, Fanyo E, van Ginkel A, Suijkerbuijk A, van der Hoek W, et al. Early occurrence of influenza A epidemics coincided with changes in occurrence of other respiratory virus infections. *Influenza Other Respir Viruses*. 2016; 10(1):14–26. <https://doi.org/10.1111/irv.12348> PMID: 26369646
34. Caini S, Alonso WJ, Séblain CE, Schellevis F, Paget J. The spatiotemporal characteristics of influenza A and B in the WHO European Region: can one define influenza transmission zones in Europe? *Euro Surveill*. 2017; 22(35).
35. Laurie KL, Guarnaccia TA, Carolan LA, Yan AW, Aban M, Petrie S, et al. Interval between infections and viral hierarchy are determinants of viral interference following influenza virus infection in a ferret model. *J Infect Dis*. 2015; 212(11):1701–10. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv260> PMID: 25943206
36. Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, Woo JC, Wu X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. *Vaccine*. 2010; 28(9):2149–56. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.068> PMID: 20003926
37. de Boer PT, Kelso JK, Halder N, Nguyen TP, Moyes J, Cohen C, et al. The cost-effectiveness of trivalent and quadrivalent influenza vaccination in communities in South Africa, Vietnam and Australia. *Vaccine*. 2018; 36(7):997–1007. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.073> PMID: 29373192
38. Tamerius JD, Shaman J, Alonso WJ, Bloom-Feshbach K, Uejio CK, Comrie A, et al. Environmental predictors of seasonal influenza epidemics across temperate and tropical climates. *PLoS Pathog*. 2013; 9(3):e1003194. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003194> PMID: 23505366
39. Lowen AC, Steel J. Roles of humidity and temperature in shaping influenza seasonality. *J Virol*. 2014; 88(14):7692–5. <https://doi.org/10.1128/JVI.03544-13> PMID: 24789791
40. Vijaykrishna D, Holmes EC, Joseph U, Fourment M, Su YC, Halpin R, et al. The contrasting phylogenetics of human influenza B viruses. *Elife*. 2015; 4:e05055. <https://doi.org/10.7554/eLife.05055> PMID: 25594904
41. Nyirenda M, Omori R, Tessmer HL, Airmura H, Ito K. Estimating the lineage dynamics of human influenza B viruses. *PLoS One*. 2016; 11(11):e0166107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166107> PMID: 27629056
42. Skowronski DM, Hottes TS, De Serres G, Ward BJ, Janjua NZ, Sabaiduc S, et al. Influenza B/Victoria antigen induces strong recall of B/Yamagata but lower B/Victoria response in children primed with two doses of B/Yamagata. *Pediatr Infect Dis J*. 2011; 30(10):833–9. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31822db4dc> PMID: 21857263
43. Adlhoch C, Snacken R, Melidou A, Ionescu S, Penttinen; The European Influenza Surveillance Network. Dominant influenza A(H3N2) and B/Yamagata virus circulation in EU/EEA, 2016/17 and 2017/18 seasons, respectively. *Euro Surveill*. 2018; 23(13).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Establishing seasonal and alert influenza thresholds in Morocco



Ahmed Rguig¹, Imad Cherkaoui^{1*}, Margaret McCarron², Hicham Oumzil³, Soumia Triki⁴, Houria Elmbarki¹, Abderrahman Bimouhen³, Fatima El Falaki³, Zakia Regragui³, Hassan Ihazmad³, Chakib Nejari⁵ and Mohammed Youbi¹

Abstract

Background: Several statistical methods of variable complexity have been developed to establish thresholds for influenza activity that may be used to inform public health guidance. We compared the results of two methods and explored how they worked to characterize the 2018 influenza season performance–2018 season.

Methods: Historical data from the 2005/2006 to 2016/2018 influenza season performance seasons were provided by a network of 412 primary health centers in charge of influenza like illness (ILI) sentinel surveillance. We used the WHO averages and the moving epidemic method (MEM) to evaluate the proportion of ILI visits among all outpatient consultations (ILI%) as a proxy for influenza activity. We also used the MEM method to evaluate three seasons of composite data (ILI% multiplied by percent of ILI with laboratory-confirmed influenza) as recommended by WHO.

Results: The WHO method estimated the seasonal ILI% threshold at 0.9%. The annual epidemic period began on average at week 46 and lasted an average of 18 weeks. The MEM model estimated the epidemic threshold (corresponding to the WHO seasonal threshold) at 1.5% of ILI visits among all outpatient consultations. The annual epidemic period began on week 49 and lasted on average 14 weeks. Intensity thresholds were similar using both methods. When using the composite measure, the MEM method showed a clearer estimate of the beginning of the influenza epidemic, which was coincident with a sharp increase in confirmed ILI cases.

Conclusions: We found that the threshold methodology presented in the WHO manual is simple to implement and easy to adopt for use by the Moroccan influenza surveillance system. The MEM method is more statistically sophisticated and may allow a better detection of the start of seasonal epidemics. Incorporation of virologic data into the composite parameter as recommended by WHO has the potential to increase the accuracy of seasonal threshold estimation.

Keywords: Influenza seasonality, Average epidemic curve, Seasonal threshold, Alert threshold

Background

Seasonal influenza epidemics result in considerable annual morbidity and mortality, with an estimated 291,243 to 645,832 deaths per year globally [1]. Associated with these seasonal epidemics are substantial economic losses due to absenteeism, lost wages and increased utilization

of health care services [2]. The influenza-associated respiratory annual mortality rate for people aged 65 and older in Morocco has been recently estimated by the US Centers for Disease Control and Prevention (US CDC) at 3.7 per 100,000 (95% Credible Interval of 0.4–22.3) [1]. The risk of hospitalization due to influenza is 5 to 10 times greater in high-risk populations in Morocco (e.g., the elderly and people with chronic disease) than in the general population [3]. The most effective ways to

* Correspondence: cherkaoui_imad@yahoo.fr

¹Direction of Epidemiology and Disease Control, MoH, Rabat, Morocco
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

prevent or mitigate these effects are through vaccination combined with appropriate clinical management of persons infected with influenza. Optimal impact of vaccination campaigns is achieved by timing them prior to the beginning of the influenza season to ensure maximum coverage and protection among the population. Likewise, a timely signal to healthcare providers that the influenza season is underway helps to guide their patient management decisions and to mitigate the effects of illness in the individual and in the community.

Local patterns of influenza virus circulation and seasonality may differ geographically, necessitating national estimates of seasonal influenza activity to inform public health guidance. National surveillance data is essential for understanding those patterns and establishing signals for the beginning of the influenza season and epidemic periods. Establishing baseline activity, epidemic and alert thresholds is a useful tool to inform recommendations for timely influenza vaccination to lessen the burden of seasonal epidemics [4].

While several statistical methods are commonly used, there is no gold standard for calculating influenza epidemic thresholds. The methods developed to date vary in their complexity and calculate either time-varying or fixed thresholds. The simplest ones use visual inspection of historical data to create a fixed threshold indicating the expected level of activity throughout the year [5, 6]. Statistical methods include regression models [7–10], time series methods [11], adaptation of industrial control processes such as Shewart charts [12], Cumulative Sum (CuSum) [13] and rate difference models [14].

Methods that involve calculation of means and medians are of medium complexity but are practical as they may be simple to implement. The objective of this study was to evaluate the performance of two methods using means and medians to establish thresholds using data from the Moroccan national influenza-like illness (ILI) syndromic surveillance system. We compare the results of the World Health Organization averages method (WHO method) with the Moving Epidemics Method (MEM) which is recommended by both the WHO and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). As a complement to the thresholds using syndromic data, we also calculated a threshold using a composite parameter integrating both syndromic and virologic surveillance data. Following these direct comparisons of the methodologies, we explored the best method for characterizing the 2017/2018 influenza activity.

Methods

Data collection

In 2004, the Epidemiology Department of the Ministry of Health of Morocco launched a year-round public sector syndromic surveillance system for ILI comprised of

412 primary health centers, with a catchment population of almost 12 million people. Sites report weekly ILI activity to the regional and central levels, where health officials aggregate the surveillance data. A case definition similar to the 1999 WHO ILI case definition recommended for public health surveillance, defined as “a sudden onset of fever, a temperature $>38^{\circ}\text{C}$ and cough or sore throat in the absence of another diagnosis” was used from 2004 to 2015 [15, 16]. In 2015, Morocco adopted the updated WHO standard ILI case definition [5] developed in 2011 as “an acute respiratory illness with a measured temperature of $\geq 38^{\circ}\text{C}$ and cough, with onset within the past 10 days” [17]. Reporting includes the total number of ILI consultations aggregated by gender and age group, as well as total outpatient consultations. The proportion of ILI visits among all outpatient consultations is used as a proxy for influenza activity.

In 2007, the Moroccan National Influenza Center (NIC) began a virologic surveillance system in both ambulatory and hospital sites to complement the syndromic system and provide data on laboratory-confirmed influenza activity [18]. After an interruption in data collection beginning in 2010, virologic surveillance was resumed in 8 sentinel sites in 2014. Specimens were collected and characterized between September and June. Enrolling patients from both out- and in-patient facilities allowed the integration of epidemiologic and virologic data representing the spectrum of illness from mild (ILI) to severe (e.g. severe acute respiratory infection or SARI) [17].

We used 11 seasons of syndromic surveillance data (2005/2006 to 2016/2017, excluding the 2009/2010 pandemic year from analysis as influenza activity was not reflective of a typical season); this was described elsewhere [19]. We compared two methodologies for establishing seasonal baseline activity and epidemic thresholds. We also compared the calculated thresholds with the observed weeks for the start and end of the 2017/2018 season. Using three seasons of virologic ILI surveillance data (2014/2015 to 2016/2017), we used the MEM method to make calculations using the composite parameter recommended by WHO [20]; this method estimates the proportion of laboratory-confirmed influenza ILI consultations among all outpatient consultations, or the product of weekly ILI consultations of total outpatient visits and weekly percentage of influenza-positive specimens among respiratory tests.

Methodology & statistical procedures

Overview of WHO and MEM methods

The methods discussed in order to standardize country information on influenza activity, have raised basic concepts summarized in Table 1.

Table 1 Summary of WHO method and MEM concepts

Concepts	WHO method (5, 20)	MEM (20, 26)
<i>Average epidemic curve</i>	Find 3-week moving average of ILI%. Find median peak week for each season. Align the multiple seasons on median peak week. Calculate the average ILI% for each week. <i>Indicates the usual level of influenza activity that occurs during a typical year.</i>	MEM software produces an average curve, lower interval, and higher interval.
<i>Alert threshold</i>	Calculate the mean and standard deviation (SD) of the average epidemic curve. For each week, the alert threshold is 1.645 SD above the weekly ILI% mean. ILI% > 1.645 SD indicates high ILI activity or outbreaks and may be used to characterize a severe season.	
<i>Alert curve</i>	A graph consisting of the alert thresholds for each epidemic week.	
<i>Seasonal threshold (WHO) or pre-epidemic threshold (MEM)</i>	Median weekly ILI% over all weeks (i.e., the average epidemic curve is not used). <i>Indicates the level of influenza activity that signals the start and end of the annual influenza season(s).</i>	For prospective surveillance: upper limit of the 95% one-sided confidence interval of the arithmetic mean of the 30 highest pre-epidemic weekly ILI% values. <i>Parameter value which marks the start of the epidemic period.</i>
<i>Post-epidemic threshold (MEM)</i>		For prospective surveillance: upper limit of the 95% one-sided confidence interval of the arithmetic mean of the 30 highest post-epidemic weekly ILI% values.
<i>Epidemic period start</i>	The third of three consecutive weeks with ILI% above seasonal threshold. <i>Indicates that influenza activity occurs consistently.</i>	For retrospective analysis of individual season data: see "length of epidemic period".
<i>Epidemic period end</i>	The third of three consecutive weeks with ILI% below seasonal threshold	For retrospective analysis of individual season data: see "length of epidemic period".
<i>Length of epidemic period</i>	Weeks from epidemic start to end.	For retrospective analysis of individual season data: MEM software uses a "maximum accumulated proportions percentage (MAP)" algorithm to split the season into three periods: a pre-epidemic, an epidemic, and a post-epidemic period.
<i>Epidemic percentage</i>	Proportion of total cases that occurred during the epidemic period	
<i>Moderate (WHO) or medium (MEM) intensity</i>	Upper 40% limit of 1-sided CI of mean of all peak values.	Upper 40% limit of the one-sided confidence interval of the geometric mean of the 30 highest epidemic weekly ILI% values.
<i>High intensity</i>	Upper 90% limit of 1-sided CI of mean of all peak values.	Upper 90% limit of the one-sided confidence interval of the geometric mean of the 30 highest epidemic weekly ILI% values.
<i>Extraordinary (WHO) or very high (MEM) intensity</i>	Upper 97.5% limit of 1-sided CI of mean of all peak values.	Upper 95% limit of the one-sided confidence interval of the geometric mean of the 30 highest epidemic weekly ILI% values.

The WHO method

The 2012 WHO Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza (WHO Manual) [5] included a simple method to establish an average epidemic curve to identify the beginning of the influenza season using national influenza surveillance data. This method characterizes the intensity of influenza activity each year and may be used to describe the seasonality of influenza virus circulation. Using ILI as a proxy for influenza virologic activity [21, 22], we used weekly proportion of ILI among all outpatient consultations as our indicator of influenza activity.

With this method, we were able to produce an average epidemic curve. Using data from the average epidemic curve, we used statistical measures of variance to establish an alert threshold.

We determined the flat baseline for expected influenza activity throughout the year in order to develop an indicator for the onset of influenza season (seasonal threshold). Sustained influenza activity (i.e., three consecutive weeks) above this baseline indicated the start of the influenza season or the epidemic period [5]. In the final step, moderate, high, and extraordinary intensity thresholds were estimated as described in the WHO Pandemic Influenza Severity Assessment manual [20], (Fig. 1).

The moving epidemic method

The Moving Epidemic Method (MEM) [23–28] is an alternative tool developed to help model influenza epidemics also using retrospective national surveillance data. It may be described as a combination rate-difference model that uses cumulative differences in

Table 2 Model estimators using WHO and Moving Epidemics Method (MEM), 2005/2006 to 2016/2017 seasons, Morocco (*)

Estimators used	Analysis method		
	WHO	MEM	MEM
Type of data used	Weekly proportion of ILI patients among all outpatients	Weekly proportion of ILI patients among all outpatients	Estimated weekly proportion of confirmed ILI patients ^a among all outpatients
Number of seasons analyzed	11	11	3
Average epidemic start week	46 ^b	49	50
Average peak week of the seasons 43 to 46	3	3	3
Average epidemic length (in weeks)	24	14	15
Epidemic percentage ^c	38.06%	45.62%	95.41%
Seasonal (WHO) or pre epidemic threshold (MEM)	0.90%	1.51%	0.03%
Intensity thresholds			
Moderate/medium threshold ^d	2.13%	2.12%	0.59%
High threshold	2.77%	2.81%	1.5%
Very high threshold (extraordinary)	3.06%	3.19%	2.05%

(*) 2009/2010 pandemic year excluded

^aComposite parameter defined as the product of the ILI proportion and the percentage positive^bGiven the three-consecutive-week-declaration rule considered for the WHO method^cPercentage of the cumulative sum of values in the epidemic period of the seasons in the model^dModerate threshold is used for WHO method and medium threshold for MEM

rates to determine epidemic periods and intensity of activity [27, 28].

Using the free software R for statistical computing and graphics [25] and its open source user interface RStudio [26], we uploaded our surveillance data via the MEM application [23], and fit the model using three steps. We first visually compared activity over the 11 seasons in order to compare the timing of peak activity and activity trends across seasons. The MEM procedure has three main steps: First, the length, start and the end of the annual epidemics are determined, splitting the season in three periods: a pre-epidemic, an epidemic and a post-epidemic period [27, 28]. In the second step, we built the model by using retrospective data from all 11 seasons. The MEM app calculated the pre-epidemic threshold that marks the start of the epidemic period (analogous to the seasonal threshold in the WHO method). In the third step, medium, high, and very high intensity thresholds were estimated (Table 2). Using the app, we produced graphs of each season showing the pre-epidemic, epidemic and post-epidemic periods (Fig. 2). In addition, as the assumption that ILI activity is reflecting influenza virus circulation has limitations, we created a second seasonal threshold with this methodology using the composite parameter recommended by WHO for three seasons of virologic ILI surveillance (Fig. 3).

Lastly, we calculated indicators of performance of the app to detect epidemics, using values from the model for

sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, percent agreement and the Matthew correlation coefficient (Table 3). The application allowed us to optimize the model by searching the optimum slope of the MAP curve to optimize the goodness-of-fit of the model for detecting epidemics.

The MEM app calculates goodness-of-fit indicators in an iterative process using a cross-validation procedure [27]. True positives (TP) were then defined as values of epidemic period above the threshold, true negatives (TN) as values of the non-epidemic period below the threshold, false positives (FP) as values of the non-epidemic period above the threshold and false negatives (FN) as values of epidemic period below the threshold. The process was repeated for each season in the dataset and all TP, TN, FP and FN were pooled. To measure the performance of the threshold, the following statistics and definitions were used [27]:

1. Sensitivity: The number of epidemic weeks above the pre-epidemic threshold and above the post-epidemic threshold divided by the number of epidemic weeks (epidemic length).
2. Specificity: The number of non-epidemic weeks below the pre-epidemic threshold and below the post-epidemic threshold divided by the number of non-epidemic weeks.
3. Positive predictive value (PPV): The number of epidemic weeks above the threshold divided by the number of weeks above the threshold.

Table 3 Indicators of the model performance to detect the beginning of an epidemic period (goodness of the Moving Epidemic Method) (MEM) for detecting the epidemics Morocco

Used method	MEM	MEM
Estimators of goodness		
Historical data	2005/2006 to 2016/2017	2014/2015 to 2016/2017
Type of data used	Influenza Like Illnessproportion (%ILI)	Composite ^a
Sensitivity	0.81	0.76
Specificity	0.92	0.95
Positive predictive value	0.71	0.80
Negative predictive value	0.95	0.93
Percent agreement	0.90	0.91
Matthews correlation coefficient	0.70	0.72

^aILI% multiplied by percent of ILI with laboratory-confirmed influenza

- Negative predictive value (NPV): The number of non-epidemic weeks below the threshold divided by the number of weeks below the threshold.

Ethics statement

The ILI sentinel surveillance system is a public health activity organized by the Ministry of Health of Morocco. Personally identifiable data is excluded from this surveillance system; as a result, no request for authorization from the National Ethics Committees was required. Indeed, the Royal Dahir N°1–15–110 dated August 4, 2015, promulgating the law N°28–13 relating to the protection of persons participating in biomedical research, provides for special provisions for non-interventional or observational researches as stipulated in its articles 2 and 26.

Results

Average ILI activity thresholds: WHO methodology

When applying the WHO method to our 11 years of surveillance data, we estimated that the seasonal threshold was the point at which more than 0.9% of outpatient consultations were due to ILI (Table 2). Influenza activity crossed this threshold on average at week 43 and the beginning of the epidemic period would be declared after three consecutive weeks of activity above this threshold, on average at week 46. The typical epidemic period lasted 24 weeks, finishing at week 18, when activity was below the seasonal threshold for three consecutive weeks. The average peak activity occurred during week 3. Seasons where ILI activity regularly crossed the alert threshold may be characterized as severe (Fig. 1 and Table 2). Intensity thresholds were ILI% of 2.13, 2.77 and 3.06% for moderate, high and extraordinary intensity thresholds) (Fig. 1 and Table 2).

Average ILI activity thresholds: MEM methodology

The MEM model produced an estimate that the average annual influenza epidemic period began on week 49, and that the epidemic period lasted on average 14 weeks. The epidemic threshold (corresponding to the WHO

seasonal threshold) was higher, at 1.51% of ILI patients among all outpatients. The average peak activity occurred during week 3, consistent with the estimate using the WHO method. Intensity thresholds were of 2.12, 2.81 and 3.19% of ILI patients among all outpatients for respectively medium, high and very high intensity thresholds (Fig. 2 and Table 2).

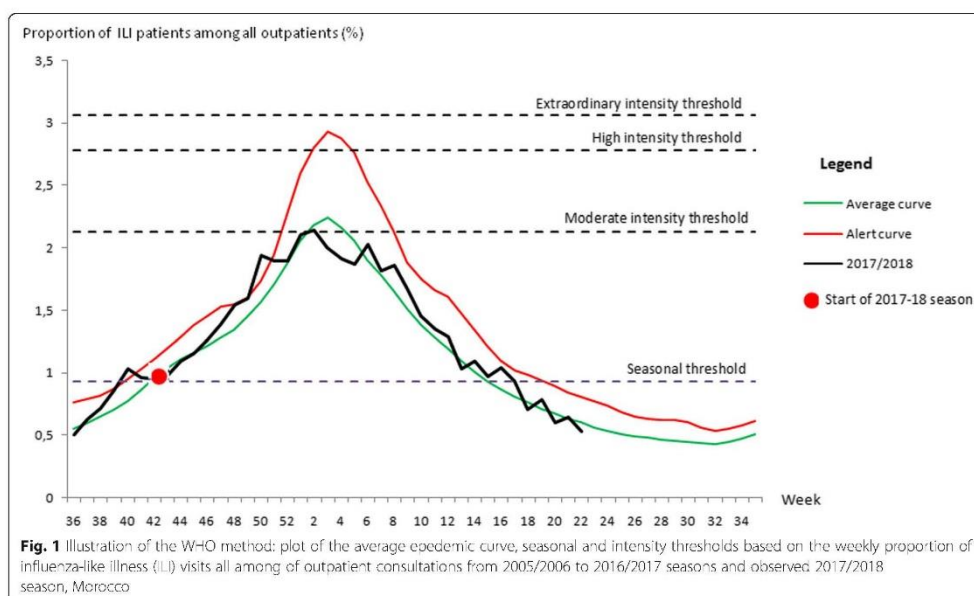
Indicators related to the goodness-of-fit of the MEM model for detecting the epidemics, using these retrospective data showed that the sensitivity of the MEM epidemic threshold was 0.81 whereas the specificity was 0.92. Positive predictive value was 0.71 and negative predictive value was 0.95 (Table 3).

Average laboratory-confirmed influenza activity thresholds: MEM methodology

Using three seasons of virologic data, we established a third seasonal baseline based on the composite parameter recommended by WHO, which integrated both laboratory-confirmed influenza and syndromic ILI reporting (Fig. 3). This method allowed us to compare the results of characterizing seasonality using these data types to identify the beginning of the influenza season. Applying the MEM methodology to our combined data, we determined that the average epidemic began at week 50, average peak activity occurred at week 3 and the average epidemic period lasted 15 weeks. Using this method, medium, high and very high intensity thresholds were set at 0.59, 1.5 and 2.05% of laboratory-confirmed ILI patients among all outpatients (Fig. 3 and Table 2). Goodness-of-fit indicators showed a sensitivity of 76%, specificity of 95%, positive predictive value of 80% and negative predictive value of 93% (Table 3).

2017/2018 influenza season performance

2018 ILI data with the WHO/2018 ILI data with the WHO thresholds, the curve overlapped the average epidemic curve and activity crossed the seasonal



threshold during week 43 of 2017 and was sustained after this time, confirming that this was the start of the epidemic period (Fig. 1).

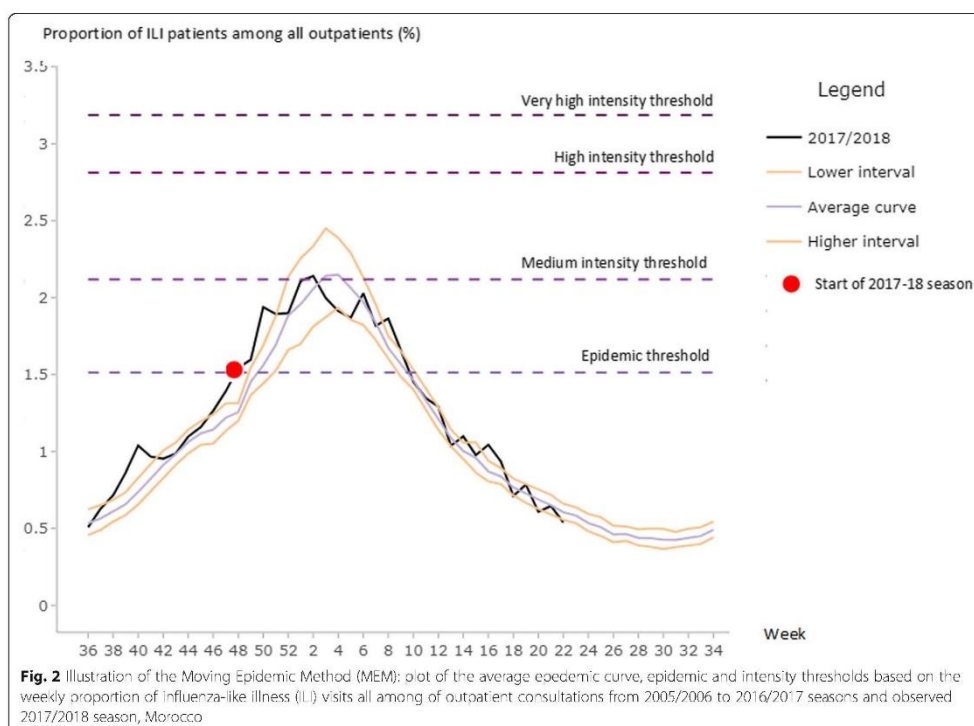
The season peaked during the second week of 2018, 1 week earlier than the average identified by the WHO methodology (week 3); we observed peak activity of 2.14% of ILI patients among all outpatients (Fig. 1).

When using the MEM method with ILI proportions, the epidemic period began at week 47, or the end of November 2017. This finding indicated an early season, beginning 2 weeks before the average epidemic start week of 49. The season peaked at week 2 of 2018 (beginning of January), 1 week before the average peak week determined by MEM (week 3), with peak activity above 2% of ILI patients among all outpatients. This season was characterized as one of medium intensity (Fig. 2).

When considering the composite parameter, the MEM method showed that the epidemic period began at week 48, or the end of November 2017, with a sharp increase of the epidemic curve 2 weeks prior to the average start (week 50). The seasonal peak occurred at week 2 of 2018, 1 week before the average peak week (week 3), with peak activity above 1.25% of confirmed ILI patients among all outpatients. This season almost reached the threshold for high intensity (Fig. 3).

Discussion

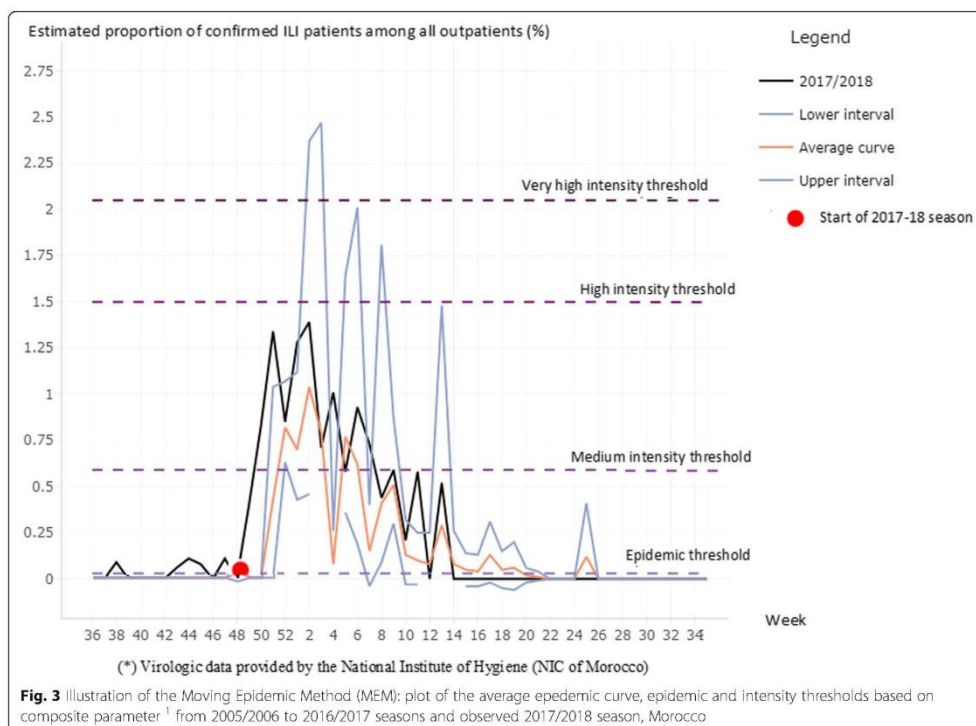
The occurrence of the 2009 H1N1 pandemic highlighted the need for a robust and standardized method to make timely assessments of the severity of influenza activity that may be used as an indicator of an unusual event. WHO developed and began implementing a framework on pandemic influenza severity assessment (PISA) [20] in March 2017. Member States are encouraged to establish influenza baseline and epidemic alert thresholds from surveillance data and to monitor and describe the severity of each influenza season (seasonal, epidemic or pandemic influenza) using these thresholds. For this purpose, a simple method proposed by the WHO was used [22, 29, 30]. WHO is now recommending MEM, which is a more sophisticated method of reporting influenza activity adopted by the European Centre for Disease Prevention and Control [31–34] and adopted by several countries from other regions [35, 36]. The analysis using the MEM application with 11 seasons of syndromic surveillance data showed clear seasonality to ILI activity and visual inspection of graphed data revealed a single seasonal peak per year. The data show seasonal peaks between December and March, varying by year, as described by Barakat et al. based on visual analysis [18], matching trends observed in other northern hemisphere countries [37]. The average seasonal peak in Morocco occurs at week 3 (mid-January) using either method.



The seasonal threshold established using the method described in the WHO influenza surveillance guidelines was lower than the epidemic threshold calculated by the MEM method when ILI proportions are considered (0.9% versus 1.51% of ILI patients among all outpatients). The average epidemic start week was estimated to be earlier when using the WHO method, with an average start at week 46 versus week 49 or 50 by using respectively ILI proportions or the composite parameter with the MEM method. There is a three- to four-week difference between these 2 methods when describing the typical start to a season; the optimal timing of a seasonal influenza vaccination campaign might vary accordingly. Public health officials must weigh the costs and benefits of the optimal campaign period. Influenza vaccine administration is ideally timed at least several weeks prior to influenza virus circulation as antibody response is achieved on average 2 weeks post vaccination [38]. The average epidemic period estimated by the WHO method was longer compared with the MEM method (24 weeks vs. 14 or 15 weeks respectively). There are few publications with estimates of the typical duration of an influenza season [37]. According to the available evidence, the duration of the

influenza season in the temperate zone of the northern hemisphere, ranges 12–19 weeks in Europe [39].

The goodness-of-fit calculations from the MEM application indicate that the MEM capacity for detecting epidemic activity had a sensitivity of 81% and a specificity of 92% when using ILI proportions, implying that it is better for eliminating false signals than it is for detecting a true signal. Our finding is similar to that of Vega et al., who also found the sensitivity to be significantly lower than the specificity [27]. Using Cambodian surveillance data, Ly et al. [30] also found that the WHO methodology appeared to have a higher sensitivity for detecting early epidemic activity, but a lower specificity than MEM, implying a greater risk of signalling false starts to the season. Timely detection of the start of seasonal epidemics may be important to alert health services and to mitigate morbidity, mortality and economic costs by allowing resource allocation and adjusting response measures to face the seasonal overload in the healthcare system. The public health implications for this difference between methodologies are that using the MEM method without applying the seasonal threshold established using the WHO method, there is a risk of missing the



beginning of the epidemic period and not providing timely guidance to clinicians to indicate influenza season has begun, and to manage patient treatment accordingly. Using the lower WHO threshold for public health messaging regarding the beginning of the influenza season may pose the risk of a false alert and perhaps over-prescribing antiviral medications. From another point of view, using a low seasonal threshold could influence decision-makers to recommend earlier vaccination. As our results showed that the seasonal threshold typically occurs between mid-November and mid-December in Morocco, appropriate timing for vaccination could be about 1 month before this date. Of note, the US Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) recommends that vaccination should be offered by the end of October, considering the unpredictability of timing of onset of the influenza season and concerns that vaccine-induced immunity might wane over the course of a season [40].

Low seasonal thresholds may be crossed multiple times as was the case in our application of the WHO threshold for several seasons (2005/2006, 2006/2007,

2010/2011, 2011/2012 and 2013/2014 [not shown]), due perhaps to variability in reporting by the surveillance sites. Because of this variability, it is possible that declaring the start of the influenza season after two or three sustained weeks of activity above the threshold as recommended by WHO, is a prudent option for considering influenza transmission as epidemic. The MEM methodology, however, calculates the length of the epidemic period during each season separately in order to determine the average length. Thus, the epidemic threshold calculated with the MEM method could be preferable to that established with the WHO method.

MEM was first used in in the WHO European Region to estimate epidemic period and intensity using a minimum of five historical seasons for the calculations and the target season [27]. Despite the availability of only 3 years of virologic data in Morocco, we followed a WHO recommendation to use the composite parameter with MEM [20]. This allowed a clearer cut estimation of the beginning of the influenza epidemic period, characterized by a sharp increase in influenza-confirmed ILI cases.

When ILI proportions are used, the two methods produce similar values for each intensity threshold considered in the PISA assessment of seasonal transmissibility; WHO has adopted the MEM for this purpose. When comparing the highest weekly activity per season (the seasonal peak) to the intensity thresholds established by WHO and MEM procedures, the 2017/2018 season was of moderate intensity (Figs. 1 and 2). Using the composite parameter, the 2017/2018 seasonal peak nearly reached the high intensity threshold, whereas this curve did not cross the medium intensity threshold when using only ILI proportions.

Our study has several limitations. First, the assumption that ILI activity reflects influenza virus circulation is limited because of possible concurrent circulation of other respiratory viruses (e.g., RSV) [41, 42]. WHO recommends using a composite parameter defined as the product of the ILI or ARI proportion and the percentage positive for the transmissibility indicator of the PISA tools [20]. Unfortunately, virologic data collected prior to 2014 was not consistently available for the period of our study as virologic surveillance was disrupted between 2010 and 2014. Despite this limitation, our laboratory-confirmed data showed something different than the syndromic data as the start of the virologic activity occurs suddenly and is therefore clearly identified. It is obvious that the inclusion of virologic data increases the specificity of seasonal threshold estimation. According to the WHO guidelines [5], *“a combination of parameters may be preferable. For example, a seasonal threshold could be defined as the week in which the ILI rate crosses a certain value and the percentage of specimens testing positive reaches a certain point”*.

Given the long life of our surveillance system, our data were limited by changes in data collection practices, inconsistency of reporting by surveillance sites, and variable access to primary health care. These problems are not unique to the Morocco ILI surveillance system, and we believe they are the nature of routine, sentinel surveillance. Another limitation was the adoption of a new case definition in 2015, at which point we also relaunched our surveillance system using a new protocol. These changes may have affected the trends that we observed in ILI activity from that year forward. Since both methods we used to establish thresholds recommend using a minimum of three to five seasons of data, we would not have enough data to run the models if we used only data from 2015 onward.

Determining a gold standard for influenza epidemic and intensity thresholds has been a long-standing research question for both international organizations and country-level public health authorities, and there is no consensus on the best method [5, 27, 28, 37, 43–45]. Both the WHO method and the Moving Epidemic

Method translate quantitative trend data into standardized qualitative intensity levels, which permit countries to determine if the current season is atypical or to assess country or regional differences in activity and intensity. Both methods identified that the 2006/2007 season was the most active in Morocco, excluding the 2009/2010 pandemic season according to non-published observations. Both methods are coherent to identify excess activity or high intensity thresholds even though with adequate laboratory data MEM with the use of the composite parameter, gives a theoretically better qualitative measure of the level of activity.

Conclusions

This comparative study has shown that the threshold methodology presented in the WHO manual is simple to implement and easy to adopt for use by the influenza surveillance system in Morocco or the national surveillance systems of other similar countries. MEM is more statistically sophisticated and may provide a more accurate detection of the start of seasonal epidemics in temperate countries with clear seasonal circulation of influenza viruses, especially if virologic data are considered. Whichever method is used, analysis of surveillance data will provide information about seasonal thresholds and epidemic curves that may help health care personnel in the clinical management of respiratory illness after the start of influenza season. Establishing a seasonal threshold for influenza helps health authorities to identify suitable periods for annual vaccination campaigns and for health practitioners to administer influenza vaccines or prescribe influenza antiviral drugs. Computerization of the influenza surveillance system improves timeliness and assessment of the intensity of the influenza epidemic early in its course will guide policymakers in ensuring the appropriate allocation of resources to control seasonal epidemics.

Abbreviations

ACIP: US Advisory Committee on Immunization Practices; ARI: Acute respiratory infection; CI: Confidence interval; ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control; FN: False negative; FP: False positive; ILI: Influenza like illness; ILI%: Proportion of ILI visits among all outpatient consultations; MAP: Maximum accumulated proportions percentage; MEM: Moving epidemic method; NIC: National Influenza Center; NPV: Negative predictive value; PISA: Pandemic Influenza Severity Assessment; PPV: Positive predictive value; RSV: Respiratory Syncytial Virus; SARI: Severe acute respiratory infection; SD: Standard deviation; TN: True negative; TP: True positive; US CDC: US Centers for Disease Control and Prevention; WHO: World Health Organization

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Amgad Elkholy and Dr. Mohamed Elhakim from Infectious Hazard Management (IHM)/EMRO at World Health Organization and Dr. Henry Laurenson-Schafer for organizing training sessions on statistical methods for analyzing data provided by influenza surveillance systems as well as Pr. Abderrahmane Maaroufi, former Director of Epidemiology at the Ministry of Health of Morocco. A pilot study to assess the historical surveillance data of influenza in Morocco and to compare the WHO method

with MEM for 2015/2016 and 2016/2017 was published in the national bulletin of Epidemiology of the Ministry of Health, Morocco.

Authors' contributions

AR and IC designed the study. IC performed data analysis, interpretation of results and drafted the manuscript. MMC helped with study design, data analysis, interpretation of results, and drafting of the manuscript. AR and MY assisted with study implementation and provided oversight of study personnel. HO, AB, FEF, ZR and HI assisted with access to and interpretation of laboratory testing results. ST and HE helped with data collection and study design and implementation. CN read and approved the final manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Funding

None.

Availability of data and materials

Datasets were collected by each participating site including the National Influenza Center and gathered on a pooled database at the Direction of Epidemiology and Disease Control of the Ministry of Health of Morocco. Data cannot be publicly shared due to internal regulations of the Ministry of Health of Morocco. The datasets analyzed during the current study could be available from the corresponding author on reasonable request and with special authorization of the Ministry of Health of Morocco.

Ethics approval and consent to participate

The ILI sentinel surveillance system is a public health activity organized by the Ministry of Health of Morocco. Personally identifiable data is excluded from this surveillance system; as a result, no request for authorization from the National Ethics Committees was required. Indeed, the Royal Dahir N°1–15-110 dated August 4, 2015, promulgating the law N°28–13 relating to the protection of persons participating in biomedical research, provides for special provisions for non-interventional or observational researches as stipulated in its articles 2 and 26.

Consent for publication

Not applicable.

The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the US Centers for Disease Control and Prevention.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Direction of Epidemiology and Disease Control, MoH, Rabat, Morocco. ²Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. ³National Institute of Hygiene, NIC, MoH, Rabat, Morocco. ⁴WHO Office of Morocco, Rabat, Morocco. ⁵University Mohammed VI of Health Sciences, Casablanca, Morocco.

Received: 7 April 2020 Accepted: 18 June 2020

Published online: 29 June 2020

References

1. Iuliano AD, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018;391:1285–300.
2. World Health Organization. Influenza (Seasonal) Fact sheet 6 November 2018. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>. Accessed 7 Mar 2020.
3. Ezzine H, Cherkaoui I, Oumzil H, Mirabet M, et al. Épidémiologie de la grippe et facteurs de risque d'infection Respiratoire Aiguë Sévère au Maroc, saisons 2016/2017 et 2017/2018. *Bulletin d'Epidémiologie et de Santé Publique*. 2018;2018:27–33 https://www.sante.gov.ma/Publications/Pages/Bulletin_%c3%89pid%C3%A9miologie.aspx. Accessed 7 Mar 2020.
4. Cox N. Influenza seasonality: timing and formulation of vaccines. *Bull World Health Organ*. 2014;92(5):311.
5. World Health Organization. Global epidemiological surveillance standards for influenza. 2014. https://www.who.int/influenza/resources/documents/WHO_Epidemiological_influenza_Surveillance_Standards_2014.pdf. Accessed 7 May 2020.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Overview of Influenza Surveillance in the United States. 2017. <https://www.cdc.gov/flu/weekly/overview.htm>. Accessed 7 May 2020.
7. Kuang J, Yang WZ, Zhou DL, Li ZL, Lan YJ. Epidemic features affecting the performance of outbreak detection algorithms. *BMC Public Health*. 2012;12:418.
8. Alonso TV, Alonso JEL, de Lejarazu RO, Perez MG. Modelling influenza epidemic -can we detect the beginning and predict the intensity and duration? *Options control influenza*. V. 2004;1263:281–3.
9. Cooper DL, Verlander NQ, Elliot AJ, Joseph CA, Smith GE. Can syndromic thresholds provide early warning of national influenza outbreaks? *J Public Health*. 2009;31:17–25.
10. Cowling BJ, Wong JOL, Ho LM, Riley S, Leung GM. Methods for monitoring influenza surveillance data. *Int J Epidemiol*. 2006;35:1314–21.
11. Costagliola D, Flahault A, Galinec D, Garnerin P, Menares J, et al. A routine tool for detection and assessment of epidemics of influenza-like syndromes in France. *Am J Public Health*. 1991;81:97–9.
12. Farrington CP, Andrews NJ, Beale AD, Catchpole MA. A statistical algorithm for the early detection of outbreaks of infectious disease. *J R Stat Soc A Statist Soc*. 1996;159:547–63.
13. O'Brien SJ, Christie P. Do CuSums have a role in routine communicable disease surveillance? *Public Health*. 1997;111:255–8.
14. Jansen AG, Sanders EA, Wallinga J, Groen EJ, van Loon AM, Hoes AW, Hak E. Rate-difference method proved satisfactory in estimating the influenza burden in primary care visits. *J Clin Epidemiol*. 2008;61(8):803–12.
15. Fitzner J, et al. Revision of clinical case definitions: influenza-like illness and severe acute respiratory infection. *Bull World Health Organ*. 2018;96:122–8.
16. Ministry of Health of Morocco. Ministerial circular N°54 dated on July 23, 2004 and having for object: "the epidemiologic surveillance for clinical influenza from September 1, 2004".
17. Ministry of Health of Morocco, Directorate of Epidemiology and Disease Control. Procedure manual of the influenza surveillance system in Morocco, 2015. Internal document in French.
18. Barakat A, Iahzmad H, Benkaroum S, Cherkaoui I, Benmamoun A, Youbi M, El Aouad R. Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996–2009. *PLoS One*. 2011;6(9):1–7.
19. Barakat A, Iahzmad H, El Falaki F, Tempia S, Cherkaoui I, El Aouad R. 2009 Pandemic influenza A virus subtype H1N1 in Morocco, 2009–2010: epidemiology, transmissibility, and factors associated with fatal cases. *JID*. 2012;206(Suppl 1):S94–100.
20. World Health Organization. Pandemic Influenza Severity Assessment. 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259392/WHO-WHE-IHM-GIP-2017.2-eng.pdf;jsessionid=3189E863262FEF205C421D44707175B4?sequence=1>. Accessed 7 May 2020.
21. Patterson-Lomba O, et al. Utilizing Syndromic surveillance data for estimating levels of influenza circulation. *Am J Epidemiol*. 2014;179(11):1394–401.
22. Tay EL, Grant K, Kirk M, Mounis A, Kelly H. Exploring a proposed WHO method to determine thresholds for seasonal influenza surveillance. *PLoS One*. 2013;8(10):1–10.
23. Lozano JE and Vega T. The moving epidemic method: the web MEM application, technical manual V10. 2018. https://drive.google.com/file/d/0B0Uo_0NhtOoX29zc2p5RmlBUWw/view. Accessed 7 May 2020.
24. Vega T, Camahan AS, Lozano JE, Bergström J. The Moving Epidemic Method: Guidelines to monitor influenza and other respiratory virus infections epidemics and pandemic; 2017.
25. The R Project for Statistical Computing. The R Foundation. R version 4.0.0; 2020. <https://www.r-project.org/>. Accessed 7 May 2020.
26. R Studio Team. RStudio. Integrated Development for R: RStudio, Inc.; 2016. www.rstudio.com/products/rstudio/download/. Accessed 7 May 2020.
27. Vega T, Lozano JE, Meerhoff T, et al. Influenza surveillance in Europe: establishing epidemic thresholds by the moving epidemic method. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(4):546–58.
28. Vega T, Lozano JE, Meerhoff T, et al. Influenza surveillance in Europe: influenza surveillance in Europe: comparing intensity levels calculated using the moving epidemic method. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015;9(5):234–46.
29. Lucero A, et al. National Influenza Surveillance in the Philippines from 2006 to 2012: seasonality and circulating strains. *BMC Infect Dis*. 2016;16:762.
30. Ly S, et al. Establishing seasonal and alert influenza thresholds in Cambodia using the WHO method: implications for effective utilization of influenza surveillance in the tropics and subtropics. *WPSAR*. 2017;8(1):1–12.
31. Green HK, Charlett A, Moran-Gilad J, Fleming D, Durnall H, Thomas DR, et al. Harmonizing influenza primary-care surveillance in the United Kingdom:

- piloting two methods to assess the timing and intensity of the seasonal epidemic across several general practice-based surveillance schemes. *Epidemiol Infect.* 2015;143:1–12.
32. Murray JLK, Marques DFP, Cameron RL, Potts A, Bishop J, von Wissmann B, et al. Moving epidemic method (MEM) applied to virology data as a novel real time tool to predict peak in seasonal influenza healthcare utilization. The Scottish experience of the 2017/18 season to date. *Eurosurveillance.* 2018;23:11.
 33. Rakocevic B, Grgurevic A, Trajkovic G, Mugosa B, Sipetic Grujicic S, Medenica S, et al. Influenza surveillance: determining the epidemic threshold for influenza by using the moving epidemic method influenza seasons. *Eurosurveillance.* 2019;24:12.
 34. Torner N, Basile L, Martínez A, et al. Assessment of two complementary influenza surveillance systems: sentinel primary care influenza-like illness versus severe hospitalized laboratory-confirmed influenza using the moving epidemic method. *BMC Public Health.* 2019;19:1–10.
 35. Vette K, Bareja C, Clark R and Lala A. Establishing thresholds and parameters for pandemic influenza severity assessment, Australia. *Bull World Health Organ* 2018; 96:558–567.
 36. Abd El Gawad B, Vega T, El Houssinie M, et al. Evaluating tools to define influenza baseline and threshold values using surveillance data, Egypt, season 2016/17. *J Infect Pub Health.* 2020;430–7 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034119301728?via%3Dihub>. Accessed 7 May 2020.
 37. Aziz-Baumgartner E, et al. Seasonality, timing, and climate drivers of influenza activity worldwide. *J Infect Dis.* 2012;206(6):838–46.
 38. Künzel W, Glathe H, Engelmann H, Hoecke CV. Kinetics and humoral antibody response to trivalent inactivated split influenza vaccine in subjects previously vaccinated for the first time. *Vaccine.* 1996;14(12):1108–10.
 39. Paget J, Marquet R, Meijer A, van der Velden K. Influenza activity in Europe during eight seasons (1999–2007): an evaluation of the indicators used to measure activity and an assessment of the timing, length and course of peak activity (spread) across Europe. *BMC Infect Dis.* 2007;7(1):141.
 40. Grohskopf LA, Alyanak E, Broder KR, et al. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices - United States, 2019–20 influenza season. *MMWR Recomm Rep.* 2019;68:5–6.
 41. Opatowski L, Baguelin M, Eggo RM. Influenza interaction with cocirculating pathogens and its impact on surveillance, pathogenesis, and epidemic profile: a key role for mathematical modelling. *PLoS Pathog.* 2018;14(2):1–28.
 42. Zheng X, Song Z, Li Y, Zhang J, Wang X-L. Possible interference between seasonal epidemics of influenza and other respiratory viruses in Hong Kong, 2014–2017. *BMC Infect Dis.* 2017;17:1–7.
 43. Watts CG, Andrews RM, Druce JD, Kelly HA. Establishing thresholds for influenza surveillance in Victoria. *Aust N Z J Public Health.* 2003;27:409–12.
 44. European Centre for Disease Prevention and Control. Indicators of influenza activity. <https://ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/surveillance-and-disease-data/facts-indicators>. Accessed 7 May 2020.
 45. Steiner SH, Grant K, Coory M, Kelly HA. Detecting the start of an influenza outbreak using exponentially weighted moving average charts. *BMC Med Inform Decis Making.* 2010;10(37):1–8.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Research



Influenza epidemiology and risk factors for severe acute respiratory infection in Morocco during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons

Hind Ezzine, Imad Cherkaoui, Ahmed Rguig, Hicham Oumzil, Mouad Mrabet, Abderrahman Bimouhen, Fatima El Falaki, Zakia Regragui, Zineb Tarhda, Mohammed Youbi, Mariam Naciri

Corresponding author: Hind Ezzine, Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Morocco. hindezzine3@gmail.com

Received: 09 Dec 2019 - **Accepted:** 02 Feb 2020 - **Published:** 07 Jul 2020

Keywords: Influenza positivity rate, influenza risk factor, influenza-like illness, severe acute respiratory infections, co-morbidity

Copyright: Hind Ezzine et al. Pan African Medical Journal (ISSN: 1937-8688). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution International 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this article: Hind Ezzine et al. Influenza epidemiology and risk factors for severe acute respiratory infection in Morocco during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons. Pan African Medical Journal. 2020;36(159). 10.11604/pamj.2020.36.159.21239

Available online at: <https://www.panafrican-med-journal.com//content/article/36/159/full>

Influenza epidemiology and risk factors for severe acute respiratory infection in Morocco during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons

Hind Ezzine^{1,2,*}, Imad Cherkaoui¹, Ahmed Rguig¹, Hicham Oumzil³, Mouad Mrabet¹, Abderrahman Bimouhen³, Fatima El Falaki³, Zakia Regragui³, Zineb Tarhda¹, Mohammed Youbi¹, Mariam Naciri²

¹Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Morocco, ²Research Center (BIOBIO), Laboratory of Biodiversity, Ecology and Genome, Faculty of Sciences, University Mohammed V of Rabat, Morocco, ³National Influenza Center, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Morocco

*Corresponding author

Hind Ezzine, Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Morocco

Abstract

Introduction: In order to implement an influenza vaccination program for high-risk-groups in Morocco, as recommended by the World Health Organization, an epidemiological study indicating the influenza virus effect in the development of complicated influenza for subjects with co-morbidity was required. The present study aims to evaluate the risk factors for severe acute respiratory infections caused by influenza in risk groups. **Methods:** this research is based on the epidemiological and virological surveillance data of severe acute respiratory infections and influenza-like illness during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons. It was realized using a retrospective series study with a descriptive and analytical purpose. **Results:** the over-recruitment of pediatric cases with a severe acute respiratory infection has been significantly rectified because cases of severe acute respiratory infections under 15 years old in the 2017/2018 season represent only 57.9%, whereas they represented 75.9% of the total cases of severe acute respiratory infections during the 2016/2017 season. The influenza positivity rate has increased globally and specifically by age group, clinical service and co-morbidity. The risk factors considered were significantly associated with hospitalization for influenza-associated severe acute respiratory infections. The multivariate logistic regression analysis considers male sex (OR=2.1), age ≥ 65 years (OR=5.4), presence of influenza cases in the surroundings (OR=0.1), diabetes (OR=7.5) and chronic respiratory disease (OR=10.9) as risk factors influenza-associated severe acute respiratory infections. **Conclusion:** the risk assessment of influenza-associated severe acute respiratory infections in high-risk groups revealed national epidemiological findings, particularly for diabetics and the elderly. An influenza vaccination program for these high-risk-groups becomes much recommended in Morocco.

Introduction

The seasonal influenza is an acute viral infection of the respiratory tract with high contagious effects. Both type A and B influenza viruses are responsible for seasonal epidemics of clinical influenza [1] which progress as Influenza-like illness (ILI), generally benign. Hence, in terms of morbidity, mortality and social costs, they impose a huge burden [2]. Hospitalization and deaths mainly occur in high-risk-groups due to severe acute respiratory infections (SARI). The seasonal epidemics affect about 9% of the world population each year [3] and cause about 3 to 5 million cases of serious diseases. Six hundred and fifty thousand deaths annually are associated with respiratory diseases caused by seasonal influenza [4]. Since the 1960s, the World Health Organization (WHO) has produced numerous resolutions and recommendations to take into account the morbidity and mortality burden of seasonal influenza epidemics. It also invited the member states to strengthen active influenza surveillance and vaccination programs, particularly for specific risk groups [5-8]. However, many countries around the world continue to have low immunization rates due to skepticism about the vaccine's efficacy [9-11]. The Moroccan sentinel system for epidemiological and virological surveillance of SARI and IU was implemented in 2007 as part of the pandemic influenza response with the support of the Centers for Disease Control and Prevention of Atlanta, United States of America (US-CDC) [12].

Then, in 2014, it was redeployed in eight hospital and ambulatory sentinel sites. In 2013, the Moroccan Ministry of Health, responding to the recommendations of the WHO-SAGE committee concerning the influenza vaccination of risk groups [8], established a cooperation agreement with the US-CDC in order to extend the influenza vaccination to other risk groups in addition to health personnel. This project aims to conduct epidemiological and operational studies in order to demonstrate, to the national immunization technical advisory group (national technical and

scientific advisory vaccination committee), the relevance of the influenza vaccination strategy [13]. Thus, the Moroccan Ministry of Health established in 2015 a prevention and control program for SARI and IU, which expressed its information and monitoring needs. The evaluation of the surveillance system data collected during the 2015/2016 season revealed an over-recruitment bias in cases of pediatric SARI at sentinel hospital sites. 59.3% of the total cases of SARI recruited during this season are less than 4 years old [14]. Hence, many activities have been planned and carried out during the 2017/2018 season to rectify the recruitment bias observed at sentinel hospital sites in the previous season. In the present study, the results of epidemiological and virological surveillance of SARI and IU in the 2016/2017 season were compared with those of the 2017/2018 season and the risk factors for influenza-associated SARI hospitalization were evaluated whatever the type of influenza viruses identified in confirmed influenza cases during the two seasons.

Methods

Type of study: in this research, we have used a retrospective case series study with descriptive and analytical purpose.

Study sample: the case series includes cases of SARI and IU collected as part of the epidemiological and virological surveillance that was implemented by the Moroccan Ministry of Health during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons. The definition of IU and SARI cases is the same as that used in the surveillance system which was updated in 2014 by the Ministry of Health [15] according to WHO's definitions [16].

Severe acute respiratory infection: this is a person suffering from an acute respiratory infection that includes: fever or a history of fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$; cough; beginning of the disease in the last ten days; and which requires hospitalization. According to clinicians in sentinel hospitals, some patients may not develop a fever even if they have a viral infection due to metabolic and immune disorders.

Therefore, some cases of SARI with co-morbidity were considered for recruitment purposes as meeting the case definition despite the absence of fever.

Cases of IU: it is an acute respiratory infection that includes: measured fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$; cough; and the beginning of the disease in the last ten days.

Study sites: eight public ambulatory and hospital sentinel sites: Rabat, Tangiers, Fez, Marrakech, Meknes, Beni Mellal, Oujda and Agadir and the private ambulatory network of medical practitioners were included in this study.

Data collection: the cases of SARI were collected by realizing a nasal and pharyngeal sampling immediately after admission to pediatric, pulmonary, medical and emergency wards or intensive care units as well as to the maternity wards of the sentinel hospital sites. The cases of IU were collected in sentinel health centers. A questionnaire was successfully completed with patient identification data, clinical data, epidemiological data including vaccination, notion of travel and similar cases in the surroundings; results of virological analysis and information on the patient's evolution, particularly his death during hospitalization.

Sample analysis: the samples were sent to the National Influenza Center at the National Institute of Hygiene (CNR-INH) and analyzed on the same day using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method. A dynamic web application has been implemented for entering data from questionnaires of SARI and IU cases, managing these data and reporting results back to sentinel sites.

Statistical analysis: data collected from the questionnaires of SARI and IU cases were extracted as an Excel file from the web application. The statistical analysis was carried out using the Epi-Info 7 and SPSS software in 2 phases: 1°) a descriptive phase of epidemiological and virological surveillance data of SARI and IU cases; 2°) an

analytical phase (bivariate and multivariate analysis by logistic regression) in order to identify the risk factors of influenza-associated SARI whatever the type of influenza viruses identified. Only the cases of influenza confirmed by the laboratory during the two influenza seasons 2016/2017 and 2017/2018 were included in this analysis. The variable of interest in this study was the hospitalization due to the development of an influenza-associated SARI. The explicative variables studied were the potential risk factors related to personal socio-demographic characteristics, epidemiological context and the presence of co-morbidity. The statistical significance level was fixed at 5%.

Results

A total of 2622 patients were recruited during the two seasons. In 2016/2017 season, 1359 samples were collected and 1263 samples in 2017/2018 season (Figure 1). The proportion of SARI increased from one season to the other from 51.8% (n=704) to 64.8% (n=819). As shown in Figure 2, the proportion of SARI under 15 years old in the 2017/2018 season was 57.9%, while it represented 75.9% of the total number of SARI recruited during the 2016/2017 season. In Table 1, it is noted that the increase in recruitment of non-pediatric SARI cases has mainly concerned pulmonology, medicine and emergency wards as well as intensive care units. Similarly, the recruitment of SARI with co-morbidity has also increased from one season to the other, as shown in Table 2. According to the case definition used for recruitment, fever, cough and the beginning of signs within ten days were found in respectively 89.1%, 91.5% and 90.7% of SARI cases and in respectively 98.0%, 95.6% and 98.0% of ILI cases when both seasons cases were considered. The overall positivity rate is statistically higher during the 2017/2018 season compared to the 2016/2017 season (respectively 20.1% versus 10.4%, $p < 10^{-6}$). This increase is also individually observed for ILI and SARI as illustrated in Figure 1. The specific positivity rate per co-morbidity has also increased significantly, reaching values higher than 6% of the global positivity during the 2017/2018

season, particularly for diabetes, asthma and chronic respiratory disease.

The participation of pregnant women remained very low during both seasons, as shown in Table 2, with recruitment of 9 and 5 pregnancy cases respectively. Figure 3 and Figure 4 illustrate that during the two seasons, the age range of 65 years and over in SARI cases and 5-15 years in ILI cases had the highest positivity rates with 20.7% and 36.0% respectively. The analysis of hospitalization risk factors for influenza-associated SARI was conducted on a sample of 381 influenza positive cases whatever clinical syndrome during the two seasons (except for pregnancy where only 198 female cases were considered). The risk factors considered in the bivariate analysis as shown in Table 3 and found significantly associated with hospitalization caused by influenza-associated SARI, included male sex (OR=2.2), age >65 years (OR=10.6), presence of influenza cases in the surroundings (OR=0.1), diabetes (OR=8.8), asthma (OR=10.1), chronic respiratory disease (OR=17.7), chronic heart disease (OR=4.2), chronic renal failure (OR=12.2) and chronic hematological disease (OR indeterminate). The multivariate analysis by logistic regression after adjustment for all previous risk factors, retained in the final model the male sex (OR=2.1 with CI 95%=[1.3-3.5] and $p=0.005$), age ≥ 65 years (OR=5.4 with CI 95%=[1.9-15.6] and $p=0.002$), the presence of influenza cases in the surroundings (OR=0.1 with CI 95%=[0.05-0.3] and $p < 10^{-3}$), diabetes (OR=7.5 with CI 95%=[1.7-32.8] and $p=0.007$) and chronic respiratory disease (OR=10.9 with CI 95%=[2.0-58.4] and $p=0.005$). These results are summarized in Table 4.

Discussion

Since 2006, in response to the pandemic risk, several international and governmental institutions, such as WHO and US-CDC, have invested in partnership with African countries to develop their epidemiological surveillance and laboratory diagnostic capacities in the field of influenza. In 2009, the African network for influenza surveillance and epidemiology (ANISE),

Involving more than 30 African countries, was deployed to generate and disseminate data on influenza morbidity and mortality in Africa [17]. Influenza surveillance data from 2006 to 2010 obtained in 15 African countries, including two North African countries, Morocco and Egypt [18], showed that 21.7% of ILI cases (5165/69860) and 10.1% of SARI cases (4427/43620) were tested positive for influenza [19]. Similar to our case series, influenza is therefore detected consistently with a higher proportion for ILI cases compared to SARI cases, which probably reflects the higher sensibility of the ILI case definition compared to the SARI case definition. However, these results are slightly higher than those reported by other resource-limited countries outside Africa such as Bangladesh where the positivity rate is only 10% for ILI cases and 6% for SARI cases [20] as well as Cambodia and Indonesia with similar results [21,22]. In the African multicenter study, the burden of respiratory diseases and influenza was highest among children less than 5 years of age, which is consistent with other studies conducted in the region [23,24].

The children are probably over-represented, which explains the low proportions of influenza infection in the older age range. The efforts made at the start and during the 2017/2018 influenza season to reactivate the sentinel system of epidemiological and virological surveillance in Morocco have successfully limited the recruitment bias of cases of pediatric, while the recruitment of ILI cases was adequately represented in each age range from one season to the other. The influenza positivity rate results obtained in 2017/2018 season, with 11.9% for SARI cases, were very close to the average of 15 African countries. However, the influenza positivity rate was 34.8% for ILI cases, which is much higher, indicating a better recruitment of ILI cases in Morocco. The risk assessment of influenza infection according to age group in the two seasons 2016/2017 and 2017/2018 has revealed that influenza infection in Morocco mainly affects SARI cases over the age of 65 with an influenza positivity rate of 20.7%. The influenza positivity rate in SARI cases under 2 years of age remains relatively low in

Morocco during the study period with 4.4%, which is consistent with the results of international [25-28] and national [29] studies showing the preponderance of other viruses such as rhinovirus and RSV in children with bronchoalveolitis.

In contrast, the 5-15 age range has the highest influenza positivity rate in ILI cases, with 36.0%, probably due to school exposure. Despite the progress in the management of serious infectious diseases, community pneumonia, which is the major clinical presentation of SARI cases, remains the primary cause of hospitalization and death in developed countries [30, 31]. The influenza virus causes about 6.5% of all cases of pneumonia [32] and up to 64% of their viral cause [33]. Available studies on the impact of influenza virus infection on morbidity and mortality in low-income countries are particularly limited, although this impact may be amplified by specific factors such as overpopulation and inadequate access to health services. However, if the vast majority of patients have benign influenza during seasonal peaks, other patients with specific risk factors will develop a severe acute respiratory infection [34]. Hence, an increase in the number of cases of acute asthma [35], acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [36], decompensating of metabolic diseases (diabetes) [37], cardiac diseases [38] or other [39-41] and an increase in hospitalizations for extreme ages (children and elderly people) [42] as well as pregnant women [43] are usually observed. This leads rapidly to an overload of admission capacities of emergency wards and intensive care units (ICUs) [44], where clinical management of this type of infection will depend mainly on the patient's condition rather than the virulence of the virus.

In bivariate analysis of our study for both seasons, the majority of co-morbidities recommended by WHO for influenza vaccination are strongly associated with the hospitalization for influenza-associated SARI whatever the type of virus identified (age ≥ 65 years, diabetes, asthma, chronic respiratory disease, chronic heart disease, chronic kidney failure and hematologic disease). The other

factors such as pregnancy and neurological disease recruited in very small numbers did not have sufficient statistical power to assess their risk. Thus, the multivariate logistic regression model retains only three risk factors after adjustment, namely age ≥ 65 years, diabetes and chronic respiratory disease. The risk associated with chronic renal failure remains at the limit of statistical significance where $p=7\%$ whereas the risk of chronic heart disease is certainly the subject of a confounding effect due to the statistical association with the presence of diabetes. It should be noted that the last two diseases are often associated in current clinical practice. These risk factors are usually found associated with hospitalization for influenza-associated SARI cases in several studies carried out in both low-income and developed countries in particular for extremes of age, diabetes, chronic respiratory diseases as asthma and HIV when the prevalence is high [45-49]. In addition, male sex is statistically strongly associated with the hospitalization for influenza-associated SARI due to the over-recruitment of women with IU at sentinel health centers. Moreover, the presence of influenza cases in the surroundings appears to have a protective effect on the risk of hospitalization for SARI due to the fact that ambulatory subjects recruited from sentinel health centers are more exposed to the dissemination of the virus than subjects with SARI recruited in a closed hospital environment.

Conclusion

In this study, the analysis of epidemiological and virological sentinel surveillance data collected during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons allowed us to assess the risk of hospitalization due to the occurrence of influenza-associated SARI. Consequently, this evaluation provides national epidemiological evidence, particularly for diabetics and elderly persons. As recommended by the WHO, an influenza vaccination program for these high-risk-groups is therefore highly appropriate in Morocco. Finally, in order to assess other risk

factors, particularly pregnancy, further studies should be conducted with larger samples.

What is known about this topic

- *Following a comprehensive review of the influenza disease burden, vaccine performance and safety in populations of all ages and at-risk groups, incorporating available data from low and middle-income country settings, the WHO strategic advisory group of experts (SAGE) on immunization met on 10-12 April 2012 in Geneva, Switzerland and recommended pregnant women as the most important risk group for inactivated seasonal influenza vaccination. Other risk groups to be considered, in no specific priority order were: health-care workers; children aged 6-59 months; the elderly and those with high risk conditions (Reference: WER No. 21, 2012, 87, 201-216).*

What this study adds

- *At the request of the Morocco national immunization technical advisory group (NITAG) and before the implementing of the Morocco influenza vaccination strategy targeting high risk groups as recommended by WHO, the influenza surveillance team carried out epidemiological studies based on data provided by the influenza surveillance system to produce the evidence in Morocco of the influenza vaccination benefit as done by WHO at international level.*

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Authors' contributions

EH, CI and MM designed the study, performed data analysis and interpretation of results; CI helped with data collection; OH, BA, FF, RZ assisted with access to laboratory data and interpretation of laboratory results; YM assisted with study implementation; EH, CI and TZ wrote the paper; TZ

assisted with editing of the manuscript; NM provided pedagogic support, corrected the manuscript and has given approval of the final version to be published. All the authors have read and agreed to the final manuscript.

Acknowledgments

We acknowledge support from the National Influenza Center at the National Institute of Hygiene and the Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, of Morocco. We also thank Professor Maaroufi Aberrahmane for his contribution.

Tables and figures

Table 1: number of SARI cases recruited and their influenza positivity rates per clinical ward (2016/2017 and 2017/2018 season)

Table 2: number of SARI cases with co-morbidities sampled and their influenza positivity rate (2016/2017 and 2017/2018 season)

Table 3: bi-variate analysis for evaluating the risk factors of influenza-associated SARI with a sample of 381 influenza-positive cases (2016/2017 and 2017/2018 season)

Table 4: multivariate logistic regression model for evaluating the risk factors of influenza-associated SARI with a sample of 381 influenza-positive cases (2016/2017 and 2017/2018 season)

Figure 1: influenza positivity rate by clinical syndrome (2016/2017 and 2017/2018 season)

Figure 2: SARI cases per age range (2016/2017 and 2017/2018 season)

Figure 3: positive rate per age range of SARI cases, all-season combined (2016/2017 and 2017/2018 season)

Figure 4: positive rate per age range of ILI cases, all seasons combined (2016/2017 and 2017/2018 season)

References

1. World Health Organization. **Influenza (Seasonal)**. 2018. Accessed on December 09 2019.
2. Keech M, Scott AJ, Ryan PJ. The impact of influenza and influenza-like illness on productivity and health care resource utilization in a working population. *Occup Med*. 1998;48(2): 85-90. **PubMed| Google Scholar**
3. Ghendon Y. Influenza- its impact and control. *Rapp Trimest Statist Sanit Mond*. 1992;45(2-3): 306-311. **PubMed| Google Scholar**
4. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S *et al*. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*. 2018;391(10127): 1285-1300. **PubMed| Google Scholar**
5. World Health Organization. Twenty-second World Health Assembly: Boston, Massachusetts, 8-25 July 1969: part I: resolutions and decisions: annexes. WHO. 1969. **Google Scholar**
6. World Health Organization. Forty-eighth World Health Assembly Geneva, 1-12 MAY 1995 resolutions and decisions annexes. WHO. 1995.
7. World Health Organization. Prevention and control of influenza pandemics and annual epidemics WHA56.19. WHO. 2003.
8. World Health Organization. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, April 2012--conclusions and Recommendations. *Weekly Epidemiological Record (WER)*. 2012; 87(21): 201-216. **PubMed| Google Scholar**
9. Kurinczuk JJ, Nicholson KG. Uptake of influenza vaccination by patients with serious cardiac disease. *BMJ*. 1989;299(6695): 367. **PubMed| Google Scholar**
10. Nicholson KG, Wiselka MJ, May A. Influenza vaccination of the elderly: perceptions and policies of general practitioners and outcome of the 1985-86 immunisation program in Trent, UK. *Vaccine*. 1987;5(4): 302-6. **PubMed| Google Scholar**

11. Lennox IM, Macphee GJA, Mc Alpine CH, Cameron SO, Leask BGS, Somerville RG. Use of influenza vaccine in long-stay geriatric units. *Age Ageing*. 1990;19(3): 169-72. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
12. Barakat A, Ithazmad H, Benkaroum S, Cherkaoui I, Benmamoun A, Youbi M *et al.* Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996-2009. *PLoS ONE*. 2011;6(9): e24579. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
13. Ministry of Health. Decision of the Ministry of Health No. 12536 of 6 July 2015 establishing a National Technical and Scientific Advisory Committee on Immunization. 2015. Accessed on December 09 2019.
14. Sakhri N. Rapport: analyse des données et évaluation du système de surveillance épidémiologique et virologique de la grippe au Maroc. Cycle de Mastère en Administration Sanitaire et Santé Publique Promotion: 2015-2017- Filière: Epidémiologie de Santé Publique. Ecole National de Santé Publique (Maroc). (Internal document of the National Public Health School of Morocco).
15. Manuel de procédures du système de surveillance de la grippe au Maroc (2014). Ministère de la santé, Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte contre les Maladies. (Internal document of the Ministry of Health of Morocco).
16. World Health Organization. **WHO surveillance case definitions for ILI and SARI**. 2014. Accessed on December 09 2019.
17. Centers for Disease Control and Prevention. **The African Network for Influenza Surveillance and Epidemiology (ANISE)**. Accessed on December 09 2019.
18. Elhakim M, Rasooly MH, Fahim M, Ali SS, Haddad N, Cherkaoui I *et al.* Epidemiology of severe cases of influenza and other acute respiratory infections in the Eastern Mediterranean Region, July 2016 to June 20. *J Infect Public Health*. 2020 Mar;13(3): 423-429. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
19. Radin JM, Katz MA, Tempia S, Nzussouo NT, Davis R, Duque J *et al.* Influenza surveillance in 15 countries in Africa, 2006-2010. *JID*. 2012;206(Suppl 1): S14-S21. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
20. Zaman RU, Alamgir AS, Rahman M, Azziz-Baumgartner E, Gurley ES, Sharker MAY *et al.* Influenza in outpatient ILI case-patients in national hospital-based surveillance, Bangladesh, 2007-2008. *PLoS One*. 2009;4(12): e8452. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
21. Mardy S, Ly S, Heng S, Vong S, Huch C, Nora C *et al.* Influenza activity in Cambodia during 2006-2008. *BMC Infect Dis*. 2009;9: 168. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
22. Beckett CG, Kosasih H, Ma'roef C, Listiyaningsih E, Elyazar IR, Wuryadi S *et al.* Influenza surveillance in Indonesia: 1999-2003. *Clin Infect Dis*. 2004;39(4): 443-9. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
23. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA *et al.* Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;378(9807): 1917-30. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
24. Razanajatovo NH, Richard V, Hoffmann J, Reynes J, Razafitrimo GM, Randremarana RV *et al.* Viral etiology of influenza-like illnesses in Antananarivo, Madagascar, July 2008 to June 2009. *PLoS One*. 2011;6(3): e17579. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
25. Demers AM, Morency P, Mberyo-Yaah F, Jaffar S, Blais C, Somse P *et al.* Risk factors for mortality among children hospitalized because of acute respiratory infections in Bangui, Central African Republic. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19(5): 424-32. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
26. Djelantik IG, Gessner BD, Sutanto A, Steinhoff M, Linehan M, Moulton LH *et al.* Case fatality proportions and predictive factors for mortality among children hospitalized with severe pneumonia in a rural developing country setting. *J Trop Pediatr*. 2003;49(6): 327-32. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)

27. Suwanjutha S, Ruangkanhasetr S, Chantarojanasiri T, Hotrakitya S. Risk factors associated with morbidity and mortality of pneumonia in Thai children under 5 years, Southeast Asian. *J Trop Med Public Health*. 1994;25(1): 60-6. **PubMed** | **Google Scholar**
28. Tiewsoh K, Lodha R, Pandey RM, Broor S, Kalavani M, Kabra SK. Factors determining the outcome of children hospitalized with severe pneumonia. *BMC Pediatr*. 2009;9: 15. **PubMed** | **Google Scholar**
29. Jroundi I, Mahraoui C, Benmessaoud R, Moraleda C, Tligui H, Seffar M *et al*. Risk factors for a poor outcome among children admitted with clinically severe pneumonia to a university hospital in Rabat, Morocco. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014;28: 164-170. **PubMed** | **Google Scholar**
30. Marrie TH, Durant H, Yates L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5-year prospective study. *Rev Infect Dis*. 1989;11(4): 86-99. **PubMed** | **Google Scholar**
31. Torres A, Serra-Batlles J, Ferrer A, Jiménez P, Celis R, Cobo E *et al*. Severe community acquired pneumonia: epidemiology and prognostic factors. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144(2): 312-318. **PubMed** | **Google Scholar**
32. Lauderdale TL, Chang FY, Ben RJ, Yin HC, Ni YH, Tsai JW *et al*. Etiology of community acquired pneumonia among adult patients requiring hospitalization in Taiwan. *Respiratory Medicine*. 2005;99(9): 1079-86. **PubMed** | **Google Scholar**
33. De Roux A, Marcos MA, Garcia E, Mensa J, Ewig S, Lode H *et al*. Viral community-acquired pneumonia in non-immuno-compromised adults. *Chest*. 2004;125(4): 1343-51. **PubMed** | **Google Scholar**
34. Thomas RE. Do we have enough evidence how seasonal influenza is transmitted and can be prevented in hospitals to implement a comprehensive policy. *Vaccine*. 2016;34(27): 3014-21. **PubMed** | **Google Scholar**
35. Kurai D, Saraya T, Ishii H, Takizawa H. Virus-induced exacerbations in asthma and COPD. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4: 293. **PubMed** | **Google Scholar**
36. Donaldson GC, Wedzicha JA. The causes and consequences of seasonal variation in COPD exacerbations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9: 1101-10. **PubMed** | **Google Scholar**
37. Yende S, van der Poll T, Lee M, Huang DT, Newman AB, Kong L *et al*. The influence of pre-existing diabetes mellitus on the host immune response and outcome of pneumonia: analysis of two multicenter cohort studies. *Thorax*. 2010 October;65(10): 870-877. **PubMed** | **Google Scholar**
38. Boari B, Mari E, Gallerani M, Fabbian F, Pala M, Tiseo R *et al*. Temporal variation of heart failure hospitalization: does it exist. *Rev Cardio Vasc Med*. 2011;12(4): 211-8. **PubMed** | **Google Scholar**
39. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. *Am J Med*. 2008; 121(4): 258-64. **PubMed** | **Google Scholar**
40. Walter ND, Taylor TH, Shay DK, Thompson WW, Brammer L, Dowell SF *et al*. Influenza Circulation and the Burden of Invasive Pneumococcal Pneumonia During a Non-Pandemic Period in the United States. *Clin Infect Dis*. 2010;50(2): 175-83. **PubMed** | **Google Scholar**
41. Brundage JF. Interactions between influenza and bacterial respiratory pathogens: implications for pandemic preparedness. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(5): 303-12. **PubMed** | **Google Scholar**
42. Fiore AE, Ujeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA *et al*. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendation of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2010; 59(RR-8): 1-62. **PubMed** | **Google Scholar**
43. Anselem O, Floret D, Tsatsaris V, Goffinet F, Launay O. Grippe au cours de la grossesse. *Presse Med*. 2013;42(11): 1453-1460. **PubMed** | **Google Scholar**

44. Schanzer DL, Schwartz B. Impact of seasonal and pandemic influenza on emergency department visits, 2003-2010, Ontario, Canada. *Acad Emerg Med.* 2013 Apr;20(4): 388-97. **PubMed** | **Google Scholar**
45. Tempia S, Walaza S, Moyes J, Cohen AL, von Mollendorf C, Treurnicht FK *et al.* Risk factors for influenza-associated severe acute respiratory illness hospitalization in South Africa, 2012-2015. *OFID.* 2017;4(1): ofw262. **PubMed** | **Google Scholar**
46. Abadom TR, Smith AD, Tempia S, Madhi SA, Cohen C, Cohen AL. Risk factors associated with hospitalization for influenza associated severe acute respiratory illness in South Africa: a case-population study. *Vaccine.* 2016 November 04;34(46): 5649-5655. **PubMed** | **Google Scholar**
47. Ho A, Mallewa J, Peterson I, SanJoaquin M, Garg S, Bar-Zeev N *et al.* Epidemiology of severe acute respiratory illness and risk factors for influenza infection and clinical severity among adults in Malawi, 2011-2013. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99(3): 772-779. **PubMed** | **Google Scholar**
48. Durigon GS, Oliveira DBL, Felicio MCC, Finelli C, Pereira MFB, Storni JG *et al.* Poor outcome of acute respiratory infection in young children with underlying health condition in Brazil. *Int J of Inf Disease.* 2015;34: 3-7. **PubMed** | **Google Scholar**
49. Launes C, Garcia-Garcia JJ, Martínez-Planas A, Moraga F, Soldevila N, Astigarraga I *et al.* Clinical features of influenza disease in admitted children during the first post pandemic season and risk factors for hospitalization: a multicentre Spanish experience. *Clinical Microbiology and Infection, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI.* 2012;19(3): E157-E162. **PubMed** | **Google Scholar**

Table 1: number of SARI cases recruited and their influenza positivity rates per clinical ward (2016/2017 and 2017/2018 season)

Clinical service	2016-2017 season	2017-2018 season
Pediatrics	527 0,4%	434 7,6%
Pulmonology	89 3,4%	142 7,6%
Medicine	1 0,0%	40 22,5%
Intensive Care Unit	66 9,1%	87 20,7%
Emergencies	7 0,0%	33 9,4%

(*) Source : NIC-INH

Table 2: number of SARI cases with co-morbidities sampled and their influenza positivity rate (2016/2017 and 2017/2018 season)

Risk factor (or comorbidity)		2016-2017 season	2017-2018 season	Both seasons
Diabetes	Number	19	56	75
	Risk factor proportion	2,7%	6,8%	4,9%
	Risk factor positivity rate	5,3%	32,6%	24,6%
Obesity	Number	10	9	19
	Risk factor proportion	1,4%	1,1%	1,2%
	Risk factor positivity rate	10,0%	37,5%	22,2%
Asthma	Number	39	68	107
	Risk factor proportion	5,5%	8,3%	7,0%
	Risk factor positivity rate	15,4%	11,9%	13,2%
Chronic Respiratory Disease	Number	40	75	115
	Risk factor proportion	5,7%	9,2%	7,6%
	Risk factor positivity rate	7,5%	18,3%	14,4%
Chronic Heart Disease	Number	24	35	59
	Risk factor proportion	3,4%	4,3%	3,9%
	Risk factor positivity rate	0,0%	32,3%	18,2%
Chronic Renal Failure	Number	6	23	29
	Risk factor proportion	0,9%	2,8%	1,9%
	Risk factor positivity rate	0,0%	27,3%	21,4%
Chronic Neurological Disease	Number	2	4	6
	Risk factor proportion	0,3%	0,5%	0,4%
	Risk factor positivity rate	0,0%	25,0%	16,7%
Chronic Hematological Disease	Number	13	13	26
	Risk factor proportion	1,8%	1,6%	1,7%
	Risk factor positivity rate	7,7%	25,0%	16,0%
Pregnancy (**)	Number	9	5	14
	Risk factor proportion	3,10%	1,80%	2,40%
	Risk factor positivity rate	11,1%	40,0%	21,4%

(*) Source : NIC-INH (**) Only females

Table 3: bi-variate analysis for evaluating the risk factors of influenza-associated SARI with a sample of 381 influenza-positive cases (2016/2017 and 2017/2018 season)

Variable		SARI Positive n (%)	ILI Positive n (%)	OR Crude	CI95%	P Value
Socio-demographic characteristics						
Male sex	Yes	79 (61.2%)	105 (41.7%)	2.2	[1.4-3.4]	<0.001
	No	50 (38.8%)	147 (58.3%)			
Age > 65 years	Yes	30 (23.3%)	7 (2.8%)	10.6	[4.5-24.9]	<10-11
	No	99 (76.7%)	245 (97.2%)			
Context						
Influenza vaccination during the current season	Yes	2 (1.6%)	7 (2.8%)	0.6	[0.1-2.7]	0.36(*)
	No	127 (98.4%)	245 (97.2%)			
Existence of cases in the surroundings	Yes	9 (7.0%)	95 (37.3%)	0.1	[0.06-0.3]	<10-11
	No	120 (93.0%)	157 (62.3%)			
Co-morbidities						
Diabetes	Yes	16 (12.4%)	4 (1.6%)	8.8	[2.9-26.9]	<10-5
	No	113 (87.6%)	248 (98.4%)			
Asthma	Yes	14 (10.9%)	3 (1.2%)	10.1	[2.8-35.9]	<10-4
	No	115 (89.1%)	249 (98.8%)			
Chronic Respiratory Disease	Yes	16 (12.4%)	2 (0.8%)	17.7	[4.0-78.3]	<10-5
	No	113 (87.6%)	250 (99.2%)			
Chronic Heart Disease	Yes	10 (7.8%)	5 (2.0%)	4.2	[1.4-12.4]	0.006
	No	119 (92.2%)	247 (98.0%)			
Chronic Renal Failure	Yes	6 (4.7%)	1 (0.4%)	12.2	[1.5-102.8]	0.007(*)
	No	123 (95.3%)	251 (99.6%)			
Chronic Neurological Disease	Yes	1 (0.8%)	0 (0.0%)	Ind.	Ind.	0.33(*)
	No	128 (99.2%)	252 (100.0%)			
Chronic Hematological Disease	Yes	4 (3.1%)	0 (0.0%)	Ind.	Ind.	0.01(*)
	No	125 (96.9%)	252 (100.0%)			
Pregnancy	Yes	3 (5.9%)	2 (1.4%)	4.5	[0.7-27.9]	0.11(*)
	No	48 (94.1%)	145 (98.6%)			
Obesity	Yes	4 (3.1%)	2 (0.8%)	4.0	[0.7-22.1]	0.10 (*)
	No	125 (96.9%)	250 (99.2%)			

(*) Use of the exact Fisher test because of the too small number in cells. (**) Only females

Table 4: multivariate logistic regression model for evaluating the risk factors of influenza-associated SARI with a sample of 381 influenza-positive cases (2016/2017 and 2017/2018 season)

Variable	OR adjusted	CI 95%		P-Value
Male sex (Yes/No)	2.1	1.3	3.5	0.005
Age >=65 years (Yes/No)	5.4	1.9	15.6	0.002
Existence of cases in the surroundings (Yes/No)	0.1	0.05	0.3	<0.001
Diabetes (Yes/No)	7.5	1.7	32.8	0.007
Asthma (Yes/No)	2.9	0.7	12.2	0.15
Chronic Respiratory Disease (Yes/No)	10.9	2.0	58.4	0.005
Chronic Heart Disease (Yes/No)	2.3	0.5	10.5	0.29
Chronic Renal Failure (Yes/No)	8.2	0.8	79.7	0.07

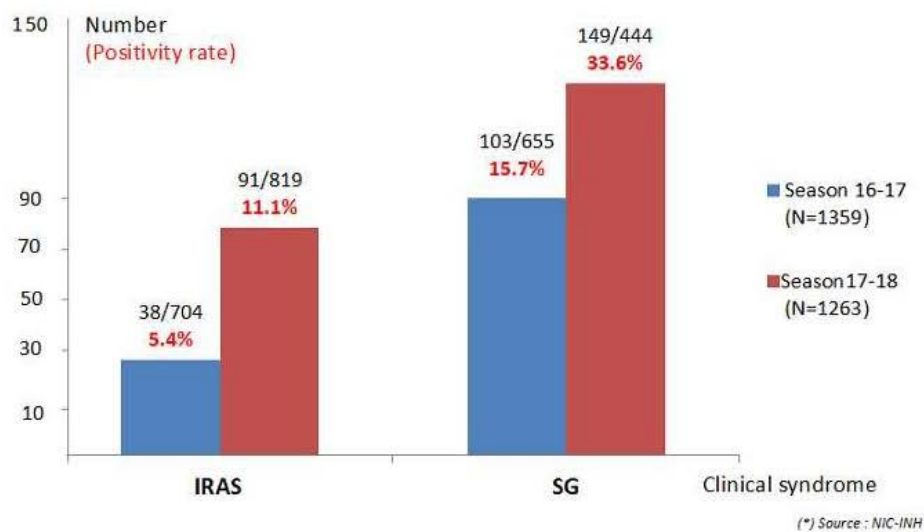


Figure 1: influenza positivity rate by clinical syndrome (2016/2017 and 2017/2018 season)

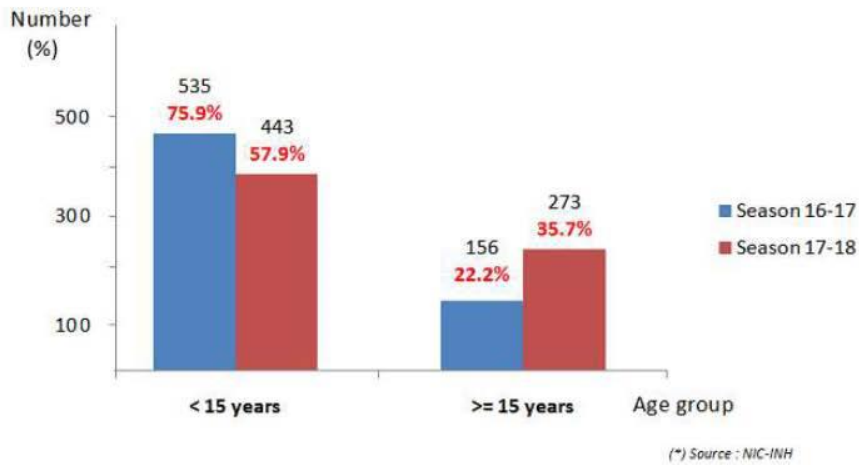


Figure 2: SARI cases per age range (2016/2017 and 2017/2018 season)

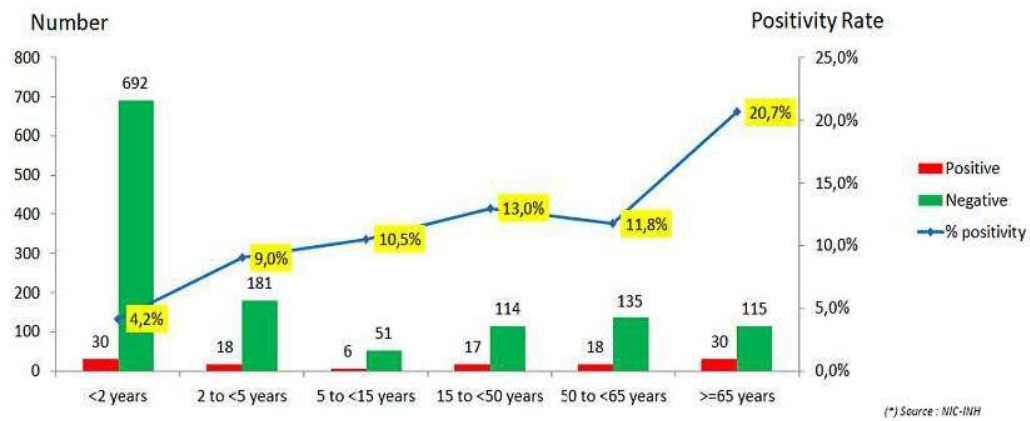


Figure 3: positive rate per age range of SARI cases, all-season combined (2016/2017 and 2017/2018 season)

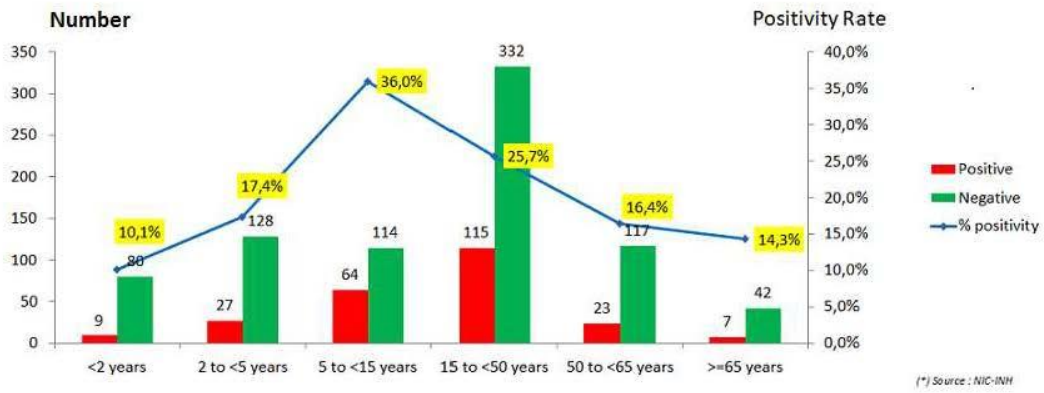


Figure 4: positive rate per age range of ILI cases, all seasons combined (2016/2017 and 2017/2018 season)



Références Bibliographiques



- Abed, Y., Hardy, I., Li, Y., Boivin, G., 2002a. Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A:H3N2 viruses isolated in Canada. *J. Med. Virol.* 67, 589–595. <https://doi.org/10.1002/jmv.10143>
- Abed, Y., Pizzorno, A., Bouhy, X., Rheume, C., Boivin, G., 2014. Impact of Potential Permissive Neuraminidase Mutations on Viral Fitness of the H275Y Oseltamivir-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Virus In Vitro, in Mice and in Ferrets. *Journal of Virology* 88, 1652–1658. <https://doi.org/10.1128/JVI.02681-13>.
- Abed Y, Baz M, Boivin G. 2006. Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir. Ther.* 11:971–976.
- Akarsu, H., Burmeister, W.P., Petosa, C., Petit, I., n.d. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein 10.
- Alame, M.M., Massaad, E., Zaraket, H., 2016. Peramivir: A Novel Intravenous Neuraminidase Inhibitor for Treatment of Acute Influenza Infections. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00450>.
- Eshaghi A, Shalhoub S, Rosenfeld P, Li A, Higgins RR, Stogios P J, A, Savchenko A, Nathalie Bastien N, Li Y, Rotstein C, and Gubbay J B. Multiple Influenza A (H3N2) Mutations Conferring Resistance to Neuraminidase Inhibitors in a Bone Marrow Transplant Recipient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec; 58(12): 7188–7197. doi: 10.1128/AAC.03667-14.
- Anne, M., 2005. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *The New England Journal of Medicine* 11.
- Baek, Y.H., Song, M.-S., Lee, E.-Y., Kim, Y., Kim, E.-H., Park, S.-J., Park, K.J., Kwon, H., Pascua, P.N.Q., Lim, G.-J., Kim, S., Yoon, S.-W., Kim, M.H., Webby, R.J., Choi, Y.-K., 2015. Profiling and Characterization of Influenza Virus N1 Strains Potentially Resistant to Multiple Neuraminidase Inhibitors. *J. Virol.* 89, 287–299. <https://doi.org/10.1128/JVI.02485-14>
- Barakat, A., Ihazmad, H., El Falaki, F., Tempia, S., Cherkaoui, I., El Aouad, R., 2012. 2009 Pandemic Influenza A Virus Subtype H1N1 in Morocco, 2009–2010: Epidemiology, Transmissibility, and Factors Associated With Fatal Cases. *The Journal of Infectious Diseases* 206, S94–S100. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis547>
- Barr, I.G., McCauley, J., Cox, N., Daniels, R., Engelhardt, O.G., Fukuda, K., Grohmann, G., Hay, A., Kelso, A., Klimov, A., Odagiri, T., Smith, D., Russell, C., Tashiro, M., Webby, R., Wood, J., Ye, Z., Zhang, W., 2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: Basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine* 28, 1156–1167. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.043>
- Baudin, F., Petit, I., Weissenhorn, W., Ruigrok, R.W.H., 2001. In Vitro Dissection of the Membrane and RNP Binding Activities of Influenza Virus M1 Protein. *Virology* 281, 102–108. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0804>

- Baz, M., Abed, Y., Simon, P., Hamelin, M., Boivin, G., 2010. Effect of the Neuraminidase Mutation H274Y Conferring Resistance to Oseltamivir on the Replicative Capacity and Virulence of Old and Recent Human Influenza A(H1N1) Viruses. *J INFECT DIS* 201, 740–745. <https://doi.org/10.1086/650464>
- Bedford, T., Riley, S., Barr, I.G., Broor, S., Chadha, M., Cox, N.J., Daniels, R.S., Gunasekaran, C.P., Hurt, A.C., Kelso, A., Klimov, A., Lewis, N.S., Li, X., McCauley, J.W., Odagiri, T., Potdar, V., Rambaut, A., Shu, Y., Skepner, E., Smith, D.J., Suchard, M.A., Tashiro, M., Wang, D., Xu, X., Lemey, P., Russell, C.A., 2015. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature* 523, 217–220. <https://doi.org/10.1038/nature14460>
- Bedford, T., Suchard, M.A., Lemey, P., Dudas, G., Gregory, V., Hay, A.J., McCauley, J.W., Russell, C.A., Smith, D.J., Rambaut, A., 2014. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *eLife* 3, e01914. <https://doi.org/10.7554/eLife.01914>
- Bérard, V., Lesniewska, E., Andrès, C., Pertuy, D., Laroche, C., Pourcelot, Y., 2002. Dry powder inhaler: influence of humidity on topology and adhesion studied by AFM. *International Journal of Pharmaceutics* 232, 213–224. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00913-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00913-9)
- Bloom, J.D., Gong, L.I., Baltimore, D., 2010. Permissive Secondary Mutations Enable the Evolution of Influenza Oseltamivir Resistance. *Science* 328, 1272–1275. <https://doi.org/10.1126/science.1187816>
- Boivin, G., 2013. Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses* 7, 18–23. <https://doi.org/10.1111/irv.12176>
- Bouvier, N.M., Palese, P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26, D49–D53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
- Bright, R.A., Medina, M., Xu, X., Perez-Oronoz, G., Wallis, T.R., Davis, X.M., Povinelli, L., Cox, N.J., Klimov, A.I., 2005. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern 366, 7.
- Burch, J., Corbett, M., Stock, C., Nicholson, K., Elliot, A.J., Duffy, S., Westwood, M., Palmer, S., Stewart, L., 2009. Prescription of anti-influenza drugs for healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 9, 537–545. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70199-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70199-9)
- Burmeister, W.P., Ruigrok, R.W.H., Cusack, S., n.d. neuraminidase and its complex with sialic acid 8.
- Burnham, A.J., Baranovich, T., Govorkova, E.A., 2013. Neuraminidase inhibitors for influenza B virus infection: Efficacy and resistance. *Antiviral Research* 100, 520–534. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.023>
- Butler, J., Hooper, K.A., Petrie, S., Lee, R., Maurer-Stroh, S., Reh, L., Guarnaccia, T., Baas, C., Xue, L., Vitesnik, S., Leang, S.-K., McVernon, J., Kelso, A., Barr, I.G., McCaw, J.M., Bloom, J.D., Hurt, A.C., 2014. Estimating the Fitness Advantage Conferred by

Permissive Neuraminidase Mutations in Recent Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses. *PLoS Pathog* 10, e1004065. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004065>

- Cass, L.M.R., Efthymiopoulos, C., Bye, A., 1999. Pharmacokinetics of Zanamivir After Intravenous, Oral, Inhaled or Intranasal Administration to Healthy Volunteers: *Clinical Pharmacokinetics* 36, 1–11. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936001-00001>
- Chen, D., Wen, X., Sun, Y., Mao, H., Zhang, Y., Chen, Y., Wang, Xinying, Sun, B., Wang, Xin, Zhang, X., 2016. Multiple viral introductions: molecular characterization of influenza B virus in Wenzhou, Zhejiang, China, from 2011 to 2014 based on hemagglutinin and neuraminidase genes. *Arch Virol* 161, 1005–1013. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2721-7>
- Chen, H., Cheung, C.L., Tai, H., Zhao, P., Chan, J.F.W., Cheng, V.C.C., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2009. Oseltamivir-Resistant Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Hong Kong, China. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1970–1972. <https://doi.org/10.3201/eid1512.091057>
- Chen, R., Holmes, E.C., 2008. The Evolutionary Dynamics of Human Influenza B Virus. *J Mol Evol* 66, 655–663. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9119-z>
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O’Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7, 1306–1312. <https://doi.org/10.1038/nm1201-1306>
- Cheung, T.K.W., Poon, L.L.M., 2007. Biology of Influenza A Virus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1102, 1–25. <https://doi.org/10.1196/annals.1408.001>
- Coleman, A.P., 2012. Antivirals for Treatment of Influenza: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *The Journal of Emergency Medicine* 43, 547. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2012.07.034>
- Colman, P.M., 1994. Influenza virus neuraminidase: Structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci.* 3, 1687–1696. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031007>
- Comerlato Scotta, M., Greff Machado, D., Goecks Oliveira, S., de Moura, A., Rhoden Estorgato, G., de Souza, A.P.D., Nery Porto, B., de Araújo, P.D., Sarria, E.E., Pitrez, P.M., Jones, M.H., Araújo Pinto, L., Tetelbom Stein, R., Polack, F.P., Mattiello, R., 2019. Evaluation of nasal levels of interferon and clinical severity of influenza in children. *Journal of Clinical Virology* 114, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.02.003>
- Covalciuc, K.A., Webb, K.H., Carlson, C.A., 1999. Comparison of Four Clinical Specimen Types for Detection of Influenza A and B Viruses by Optical Immunoassay (FLU OIA Test) and Cell Culture Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3971–3974. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.3971-3974.1999>

- Crossley, B.M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M.L., Clement, T., Toohey-Kurth, K., 2020. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J VET Diagn Invest* 32, 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- de Chasse, B., Aublin-Gex, A., Ruggieri, A., Meyniel-Schicklin, L., Pradezynski, F., Davoust, N., Chantier, T., Tafforeau, L., Mangeot, P.-E., Ciancia, C., Perrin-Cocon, L., Bartenschlager, R., André, P., Lotteau, V., 2013. The Interactomes of Influenza Virus NS1 and NS2 Proteins Identify New Host Factors and Provide Insights for ADAR1 Playing a Supportive Role in Virus Replication. *PLoS Pathog* 9, e1003440. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003440>
- Drake, J.W., 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 4171–4175. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4171>
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29, 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Dudas, G., Bedford, T., Lycett, S., Rambaut, A., 2015. Reassortment between Influenza B Lineages and the Emergence of a Coadapted PB1–PB2–HA Gene Complex. *Molecular Biology and Evolution* 32, 162–172. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu287>
- Eckert, D.M., Kim, P.S., 2001. Mechanisms of Viral Membrane Fusion and Its Inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 777–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.777>
- Edinger, T.O., Pohl, M.O., Stertz, S., 2014. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *Journal of General Virology* 95, 263–277. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059477-0>
- Eigner, U., Reucher, S., Hefner, N., Staffa-Peichl, S., Kolb, M., Betz, U., Holfelder, M., Spier, G., Pfefferle, S., Lütgehetmann, M., 2019. Clinical evaluation of multiplex RT-PCR assays for the detection of influenza A/B and respiratory syncytial virus using a high throughput system. *Journal of Virological Methods* 269, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.03.015>
- El Ramahi, R., Freifeld, A., 2019. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention of Influenza Infection in Oncology Patients. *JOP* 15, 177–184. <https://doi.org/10.1200/JOP.18.00567>
- Elton, D., Medcalf, L., Bishop, K., Harrison, D., Digard, P., 1999. Identification of Amino Acid Residues of Influenza Virus Nucleoprotein Essential for RNA Binding. *J. Virol.* 73, 7357–7367. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7357-7367.1999>
- Eshaghi, A., Shalhoub, S., Rosenfeld, P., Li, A., Higgins, R.R., Stogios, P.J., Savchenko, A., Bastien, N., Li, Y., Rotstein, C., Gubbay, J.B., 2014. Multiple Influenza A (H3N2) Mutations Conferring Resistance to Neuraminidase Inhibitors in a Bone Marrow Transplant Recipient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7188–7197. <https://doi.org/10.1128/AAC.03667-14>

- Farrukee, R., Hurt, A.C., 2017. Antiviral Drugs for the Treatment and Prevention of Influenza. *Curr Treat Options Infect Dis* 9, 318–332. <https://doi.org/10.1007/s40506-017-0129-5>
- Ferguson, N.M., Galvani, A.P., Bush, R.M., 2003. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 422, 428–433. <https://doi.org/10.1038/nature01509>
- Ferraris, O., Escuret, V., Bouscambert-Duchamp, M., Lina, B., Morfin, F., 2010. Intérêts des inhibiteurs de la neuraminidase dans la prise en charge des infections dues aux virus influenza. *Pathologie Biologie* 58, e69–e78. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2010.01.011>
- Ferraris, O., Kessler, N., Lina, B., 2005. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: A study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Research* 68, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.07.004>
- Fry, A.M., Gubareva, L.V., 2012. Understanding Influenza Virus Resistance to Antiviral Agents; Early Warning Signs for Wider Community Circulation. *Journal of Infectious Diseases* 206, 145–147. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis338>
- Gaglani, M., Pruszyński, J., Murthy, K., Clipper, L., Robertson, A., Reis, M., Chung, J.R., Piedra, P.A., Avadhanula, V., Nowalk, M.P., Zimmerman, R.K., Jackson, M.L., Jackson, L.A., Petrie, J.G., Ohmit, S.E., Monto, A.S., McLean, H.Q., Belongia, E.A., Fry, A.M., Flannery, B., 2016. Influenza Vaccine Effectiveness Against 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Differed by Vaccine Type During 2013–2014 in the United States. *J Infect Dis.* 213, 1546–1556. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv577>
- Ganzenmueller, T., Kluba, J., Hilfrich, B., Puppe, W., Verhagen, W., Heim, A., Schulz, T., Henke-Gendo, C., 2010. Comparison of the performance of direct fluorescent antibody staining, a point-of-care rapid antigen test and virus isolation with that of RT-PCR for the detection of novel 2009 influenza A (H1N1) virus in respiratory specimens. *Journal of Medical Microbiology* 59, 713–717. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.017244-0>
- Gao, J., Couzens, L., Burke, D.F., Wan, H., Wilson, P., Memoli, M.J., Xu, X., Harvey, R., Wrammert, J., Ahmed, R., Taubenberger, J.K., Smith, D.J., Fouchier, R.A.M., Eichelberger, M.C., 2019. Antigenic Drift of the Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Neuraminidase Results in Reduced Effectiveness of A/California/7/2009 (H1N1pdm09)-Specific Antibodies. *mBio* 10, e00307-19, [/mbio/10/2/mBio.00307-19](https://doi.org/10.1128/mBio.00307-19). <https://doi.org/10.1128/mBio.00307-19>
- Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W.M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C.B., Emery, S.L., Hillman, M.J., Rivaller, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D.F., Fouchier, R.A.M., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C.M., Lopez-Gatell, H., Olivera, H., Lopez, I., Myers, C.A., Faix, D., Blair, P.J., Yu, C., Keene, K.M., Dotson, P.D., Boxrud, D., Sambol, A.R., Abid, S.H., St. George, K., Bannerman, T., Moore, A.L., Stringer, D.J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G.J., Ginsberg, M., Kriner, P.,

- Waterman, S., Smole, S., Guevara, H.F., Belongia, E.A., Clark, P.A., Beatrice, S.T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C.B., Shaw, M., Jernigan, D.B., Uyeki, T.M., Smith, D.J., Klimov, A.I., Cox, N.J., 2009. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science* 325, 197–201. <https://doi.org/10.1126/science.1176225>
- Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P.L., Panatto, D., 2012. Clinical and socioeconomic impact of seasonal and pandemic influenza in adults and the elderly. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8, 21–28. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.17622>
- Gíria, M.T., Rebelo de Andrade, H., Santos, L.A., Correia, V.M., Pedro, S.V., Santos, M.A., 2012. Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09. *Journal of Clinical Virology* 53, 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.11.002>
- Glanz, V.Y., Myasoedova, V.A., Grechko, A.V., Orekhov, A.N., 2018. Inhibition of sialidase activity as a therapeutic approach. *DDDT Volume 12*, 3431–3437. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S176220>
- Greber, U.F., 2016. Virus and Host Mechanics Support Membrane Penetration and Cell Entry. *J. Virol.* 90, 3802–3805. <https://doi.org/10.1128/JVI.02568-15>
- Gregoriades, A., 1980. Interaction of influenza M protein with viral lipid and phosphatidylcholine vesicles. *Journal of Virology* 36, 470–479. <https://doi.org/10.1128/JVI.36.2.470-479.1980>
- Griffin, M.R., Monto, A.S., Belongia, E.A., Treanor, J.J., Chen, Q., Chen, J., Talbot, H.K., Ohmit, S.E., Coleman, L.A., Lofthus, G., Petrie, J.G., Meece, J.K., Hall, C.B., Williams, J.V., Gargiullo, P., Berman, L., Shay, D.K., for the U.S. Flu-VE Network, 2011. Effectiveness of Non-Adjuvanted Pandemic Influenza A Vaccines for Preventing Pandemic Influenza Acute Respiratory Illness Visits in 4 U.S. Communities. *PLoS ONE* 6, e23085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023085>
- Gu, R.-X., Liu, L.A., Wei, D.-Q., Du, J.-G., Liu, L., Liu, H., 2011. Free Energy Calculations on the Two Drug Binding Sites in the M2 Proton Channel. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 10817–10825. <https://doi.org/10.1021/ja1114198>
- Gubareva, L.V., 2004. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Research* 103, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.02.034>
- Gubareva, L.V., Besselaar, T.G., Daniels, R.S., Fry, A., Gregory, V., Huang, W., Hurt, A.C., Jorquera, P.A., Lackenby, A., Leang, S.-K., Lo, J., Pereyaslov, D., Rebelo-de-Andrade, H., Siqueira, M.M., Takashita, E., Odagiri, T., Wang, D., Zhang, W., Meijer, A., 2017. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015–2016. *Antiviral Research* 146, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.08.004>
- Gubareva2000.pdf, n.d.

- Hak, E., 2005. Clinical Effectiveness of Influenza Vaccination in Persons Younger Than 65 Years With High-Risk Medical Conditions: The PRISMA Study. *Arch Intern Med* 165, 274. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.3.274>
- Hamilton, B.S., Whittaker, G.R., Daniel, S., 2012. Influenza Virus-Mediated Membrane Fusion: Determinants of Hemagglutinin Fusogenic Activity and Experimental Approaches for Assessing Virus Fusion. *Viruses* 4, 1144–1168. <https://doi.org/10.3390/v4071144>
- Harper, S.A., Bradley, J.S., Englund, J.A., File, T.M., Gravenstein, S., Hayden, F.G., McGeer, A.J., Neuzil, K.M., Pavia, A.T., Tapper, M.L., Uyeki, T.M., Zimmerman, R.K., 2009. Seasonal Influenza in Adults and Children—Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 48, 1003–1032. <https://doi.org/10.1086/598513>
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Brecher, M., White, J.M., Steven, A.C., 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19123–19127. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607614103>
- Hata, A., Akashi-Ueda, R., Takamatsu, K., Matsumura, T., 2014. Safety and efficacy of peramivir for influenza treatment. *DDDT* 2017. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S46654>
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J., Smith, M.H., 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *The EMBO Journal* 4, 3021–3024. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb04038.x>
- Hayden, F., 2009. Developing New Antiviral Agents for Influenza Treatment: What Does the Future Hold? *CLIN INFECT DIS* 48, S3–S13. <https://doi.org/10.1086/591851>
- Hayden, F.G., Fritz, R., Lobo, M.C., Alvord, W., Strober, W., Straus, S.E., 1998. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. *J. Clin. Invest.* 101, 643–649. <https://doi.org/10.1172/JCI1355>
- Hayden, F.G., Pavia, A.T., 2006. Antiviral Management of Seasonal and Pandemic Influenza. *J INFECT DIS* 194, S119–S126. <https://doi.org/10.1086/507552>
- Hazelton, B., Gray, T., Ho, J., Ratnamohan, V.M., Dwyer, D.E., Kok, J., 2015. Detection of influenza A and B with the Alere™ i Influenza A & B: a novel isothermal nucleic acid amplification assay. *Influenza Other Respi Viruses* 9, 151–154. <https://doi.org/10.1111/irv.12303>
- He, G., Massarella, J., Ward, P., 1999. Clinical Pharmacokinetics of the Prodrug Oseltamivir and its Active Metabolite Ro 64-0802: *Clinical Pharmacokinetics* 37, 471–484. <https://doi.org/10.2165/00003088-199937060-00003>
- Helmeke, C., Gräfe, L., Irmscher, H.-M., Gottschalk, C., Karagiannis, I., Oppermann, H., 2015. Effectiveness of the 2012/13 Trivalent Live and Inactivated Influenza Vaccines

- in Children and Adolescents in Saxony-Anhalt, Germany: A Test-Negative Case-Control Study. *PLoS ONE* 10, e0122910.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122910>
- Herlocher, M.L., Carr, J., Ives, J., Elias, S., Truscon, R., Roberts, N., Monto, A.S., 2002. Influenza virus carrying an R292K mutation in the neuraminidase gene is not transmitted in ferrets. *Antiviral Research* 54, 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(01\)00214-5](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00214-5)
- Hoffmann, E., Mahmood, K., Chen, Z., Yang, C.-F., Spaete, J., Greenberg, H.B., Herlocher, M.L., Jin, H., Kemble, G., 2005. Multiple Gene Segments Control the Temperature Sensitivity and Attenuation Phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66. *JVI* 79, 11014–11021. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11014-11021.2005>
- Huang, Z.-Z., Yu, L., Huang, P., Liang, L.-J., Guo, Q., 2017. Charged amino acid variability related to N-glyco -sylation and epitopes in A/H3N2 influenza: Hem -agglutinin and neuraminidase. *PLoS ONE* 12, e0178231.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178231>
- Hurt, A.C., 2014. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Current Opinion in Virology* 8, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.04.009>
- Hurt, A.C., Besselaar, T.G., Daniels, R.S., Ermetal, B., Fry, A., Gubareva, L., Huang, W., Lackenby, A., Lee, R.T.C., Lo, J., Maurer-Stroh, S., Nguyen, H.T., Pereyaslov, D., Rebelo-de-Andrade, H., Siqueira, M.M., Takashita, E., Tashiro, M., Tilmanis, D., Wang, D., Zhang, W., Meijer, A., 2016. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014–2015. *Antiviral Research* 132, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.06.001>
- Hurt, A.C., Hardie, K., Wilson, N.J., Deng, Y.M., Osbourn, M., Leang, S.K., Lee, R.T.C., Iannello, P., Gehrig, N., Shaw, R., Wark, P., Caldwell, N., Givney, R.C., Xue, L., Maurer-Stroh, S., Dwyer, D.E., Wang, B., Smith, D.W., Levy, A., Booy, R., Dixit, R., Merritt, T., Kelso, A., Dalton, C., Durrheim, D., Barr, I.G., 2012. Characteristics of a Widespread Community Cluster of H275Y Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza in Australia. *The Journal of Infectious Diseases* 206, 148–157.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jis337>
- Iuliano, A.D., Roguski, K.M., Chang, H.H., Muscatello, D.J., Palekar, R., Tempia, S., Cohen, C., Gran, J.M., Schanzer, D., Cowling, B.J., Wu, P., Kyncl, J., Ang, L.W., Park, M., Redlberger-Fritz, M., Yu, H., Espenhain, L., Krishnan, A., Emukule, G., van Asten, L., Pereira da Silva, S., Aungkulanon, S., Buchholz, U., Widdowson, M.-A., Bresee, J.S., Azziz-Baumgartner, E., Cheng, P.-Y., Dawood, F., Foppa, I., Olsen, S., Haber, M., Jeffers, C., MacIntyre, C.R., Newall, A.T., Wood, J.G., Kundi, M., Popow-Kraupp, T., Ahmed, M., Rahman, M., Marinho, F., Sotomayor Proschle, C.V., Vergara Mallegas, N., Luzhao, F., Sa, L., Barbosa-Ramírez, J., Sanchez, D.M., Gomez, L.A., Vargas, X.B., Acosta Herrera, aBetsy, Llanés, M.J., Fischer, T.K., Krause, T.G., Mølbak, K., Nielsen, J., Trebbien, R., Bruno, A., Ojeda, J., Ramos, H., an der Heiden, M., del Carmen Castillo Signor, L., Serrano, C.E., Bhardwaj, R., Chadha, M., Narayan, V., Kosen, S., Bromberg, M., Glatman-Freedman, A.,

- Kaufman, Z., Arima, Y., Oishi, K., Chaves, S., Nyawanda, B., Al-Jarallah, R.A., Kuri-Morales, P.A., Matus, C.R., Corona, M.E.J., Burmaa, A., Darmaa, O., Obtel, M., Cherkaoui, I., van den Wijngaard, C.C., van der Hoek, W., Baker, M., Bandaranayake, D., Bissielo, A., Huang, S., Lopez, L., Newbern, C., Flem, E., Grøneng, G.M., Hauge, S., de Cosío, F.G., de Moltó, Y., Castillo, L.M., Cabello, M.A., von Horoch, M., Medina Osis, J., Machado, A., Nunes, B., Rodrigues, A.P., Rodrigues, E., Calomfirescu, C., Lupulescu, E., Popescu, R., Popovici, O., Bogdanovic, D., Kostic, M., Lazarevic, K., Milosevic, Z., Tiodorovic, B., Chen, M., Cutter, J., Lee, V., Lin, R., Ma, S., Cohen, A.L., Treurnicht, F., Kim, W.J., Delgado-Sanz, C., de mateo Ontañón, S., Larrauri, A., León, I.L., Vallejo, F., Born, R., Junker, C., Koch, D., Chuang, J.-H., Huang, W.-T., Kuo, H.-W., Tsai, Y.-C., Bundhamcharoen, K., Chittaganpitch, M., Green, H.K., Pebody, R., Goñi, N., Chiparelli, H., Brammer, L., Mustaquim, D., 2018. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet* 391, 1285–1300. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2)
- Ives, J.A.L., Carr, J.A., Mendel, D.B., Tai, C.Y., Lambkin, R., Kelly, L., Oxford, J.S., Hayden, F.G., Roberts, N.A., 2002. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 55, 307–317. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00053-0)
- Jagadesh, A., Salam, A.A.A., Mudgal, P.P., Arunkumar, G., 2016. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Arch Virol* 161, 2087–2094. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2907-7>
- Jefferson, T., Demicheli, V., Di Pietrantonj, C., Rivetti, D., 2006. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001169.pub3>
- Jefferson, T., Jones, M., Doshi, P., Del Mar, C., 2009. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 339, b5106–b5106. <https://doi.org/10.1136/bmj.b5106>.
- Jefferson T, Di Pietrantonj C, Al Ansary L, Ferroni E, Throning S, Thomas E R. 2010. Vaccines for preventing influenza in the elderly, 2010. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 17 February 2010. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004876.pub3>.
- Johnson, F.B., n.d. Transport of Viral Specimens. *CLIN. MICROBIOL. REV.* 12.
- Katz, M.A., Gessner, B.D., Johnson, J., Skidmore, B., Knight, M., Bhat, N., Marshall, H., Horne, D.J., Ortiz, J.R., Fell, D.B., 2017. Incidence of influenza virus infection among pregnant women: a systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth* 17, 155. <https://doi.org/10.1186/s12884-017-1333-5>
- Keyser, L.A., Karl, M., Nafziger, A.N., Bertino, J.S., 2000. Comparison of Central Nervous System Adverse Effects of Amantadine and Rimantadine Used as Sequential Prophylaxis of Influenza A in Elderly Nursing Home Patients. *Arch Intern Med* 160, 1485. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.10.1485>

- Kim, C.U., Lew, W., Williams, M.A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M.S., Mendel, D.B., Tai, C.Y., Laver, W.G., Stevens, R.C., 1997. Influenza Neuraminidase Inhibitors Possessing a Novel Hydrophobic Interaction in the Enzyme Active Site: Design, Synthesis, and Structural Analysis of Carbocyclic Sialic Acid Analogues with Potent Anti-Influenza Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 681–690. <https://doi.org/10.1021/ja963036t>
- Kim, P., Jang, Y., Kwon, S., Lee, C., Han, G., Seong, B., 2018. Glycosylation of Hemagglutinin and Neuraminidase of Influenza A Virus as Signature for Ecological Spillover and Adaptation among Influenza Reservoirs. *Viruses* 10, 183. <https://doi.org/10.3390/v10040183>
- Kimura, N., Nishida, M., Nagata, K., Ishihama, A., Oda, K., Nakada, S., 1992. Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *Journal of General Virology* 73, 1321–1328. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-6-1321>
- Klumpp, K., 1997. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *The EMBO Journal* 16, 1248–1257. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.6.1248>
- Kornfeld, R., Kornfeld, S., n.d. ASSE1\1BLY OF ASPA:RAGINE-LINKED OLIG(SACCHARIDES 34.
- Krammer, F., Palese, P., 2015. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat Rev Drug Discov* 14, 167–182. <https://doi.org/10.1038/nrd4529>
- Kwong, J.C., Campitelli, M.A., Rosella, L.C., 2011. Obesity and Respiratory Hospitalizations During Influenza Seasons in Ontario, Canada: A Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases* 53, 413–421. <https://doi.org/10.1093/cid/cir442>
- Lackenby, A., Besselaar, T.G., Daniels, R.S., Fry, A., Gregory, V., Gubareva, L.V., Huang, W., Hurt, A.C., Leang, S.-K., Lee, R.T.C., Lo, J., Lollis, L., Maurer-Stroh, S., Odagiri, T., Pereyaslov, D., Takashita, E., Wang, D., Zhang, W., Meijer, A., 2018. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017. *Antiviral Research* 157, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.001>
- Lackenby, A., Democratis, J., Siqueira, M.M., Zambon, M.C., 2008. Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasispecies. *Antiviral Therapy* 12.
- Lalayanni, C., Sirigou, A., Iskas, M., Smias, C., Sakellari, I., Anagnostopoulos, A., 2010. Outbreak of novel influenza A (H1N1) in an adult haematology department and haematopoietic cell transplantation unit: Clinical presentation and outcome. *Journal of Infection* 61, 270–272. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.06.013>
- Lamb, R.A., Choppin, P.W., 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4908–4912. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.4908>

- Lamb, R.A., Lai, C.J., Choppin, P.W., 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 4170–4174. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4170>
- Langat, P., Raghwani, J., Dudas, G., Bowden, T.A., Edwards, S., Gall, A., Bedford, T., Rambaut, A., Daniels, R.S., Russell, C.A., Pybus, O.G., McCauley, J., Kellam, P., Watson, S.J., 2017. Genome-wide evolutionary dynamics of influenza B viruses on a global scale. *PLoS Pathog* 13, e1006749. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006749>
- Lee, H.K., Tang, J.W.-T., Kong, D.H.-L., Koay, E.S.-C., 2013. Simplified Large-Scale Sanger Genome Sequencing for Influenza A/H3N2 Virus. *PLoS ONE* 8, e64785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064785>
- Lee, N., Chan, P.K.S., Hui, D.S.C., Rainer, T.H., Wong, E., Choi, K., Lui, G.C.Y., Wong, B.C.K., Wong, R.Y.K., Lam, W., Chu, I.M.T., Lai, R.W.M., Cockram, C.S., Sung, J.J.Y., 2009. Viral Loads and Duration of Viral Shedding in Adult Patients Hospitalized with Influenza. *J INFECT DIS* 200, 492–500. <https://doi.org/10.1086/600383>
- Lei, N., Wang, H., Zhang, Y., Zhao, J., Zhong, Y., Wang, Y., Huang, L., Ma, J., Sun, Q., Yang, L., Shu, Y., Li, S., Sun, L., 2019. Molecular evolution of influenza B virus during 2011–2017 in Chaoyang, Beijing, suggesting the free influenza vaccine policy. *Sci Rep* 9, 2432. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38105-1>
- Li, T., Chan, M., Lee, N., 2015. Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza. *Viruses* 7, 4929–4944. <https://doi.org/10.3390/v7092850>
- Liu, S., Jiao, X., Wang, S., Su, W., Jiang, L., Zhang, X., Ke, C., Xiong, P., 2017. Susceptibility of influenza A(H1N1)/pdm2009, seasonal A(H3N2) and B viruses to Oseltamivir in Guangdong, China between 2009 and 2014. *Sci Rep* 7, 8488. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08282-6>
- Linderman, S.L., Chambers, B.S., Zost, S.J., Parkhouse, K., Li, Y., Herrmann, C., Ellebedy, A.H., Carter, D.M., Andrews, S.F., Zheng, N.-Y., Huang, M., Huang, Y., Strauss, D., Shaz, B.H., Hodinka, R.L., Reyes-Teran, G., Ross, T.M., Wilson, P.C., Ahmed, R., Bloom, J.D., Hensley, S.E., 2014. Potential antigenic explanation for atypical H1N1 infections among middle-aged adults during the 2013-2014 influenza season. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 15798–15803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409171111>
- Marmier, E., Llavador, V., Malato, L., Roncin, L., Fleury, H.J., 2010. La résistance du virus de la grippe aux antiviraux : méthodes d'identification. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010, 63–68. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70511-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70511-6)
- Matsuoka, Y., Swayne, D.E., Thomas, C., Rameix-Welti, M.-A., Naffakh, N., Warnes, C., Altholtz, M., Donis, R., Subbarao, K., 2009. Neuraminidase Stalk Length and Additional Glycosylation of the Hemagglutinin Influence the Virulence of Influenza H5N1 Viruses for Mice. *JVI* 83, 4704–4708. <https://doi.org/10.1128/JVI.01987-08>

- McCullers, J.A., Wang, G.C., He, S., Webster, R.G., 1999. Reassortment and Insertion-Deletion Are Strategies for the Evolution of Influenza B Viruses in Nature. *J. Virol.* 73, 7343–7348. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7343-7348.1999>
- McGeer, A., Green, K.A., Plevneshi, A., Shigayeva, A., Siddiqi, N., Raboud, J., Low, D.E., Toronto Invasive Bacterial Diseases Network, 2007. Antiviral Therapy and Outcomes of Influenza Requiring Hospitalization in Ontario, Canada. *Clinical Infectious Diseases* 45, 1568–1575. <https://doi.org/10.1086/523584>
- McGraw, C., 2008a. Vaccines for preventing influenza in healthy children (Review). *Primary Health Care* 18, 31–31. <https://doi.org/10.7748/phc.18.8.31.s23>
- McGraw, C., 2008b. Vaccines for preventing influenza in healthy adults (Review). *Primary Health Care* 18, 31–31. <https://doi.org/10.7748/phc.18.8.31.s24>
- McKimm-Breschkin, J.L., 2013. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance: Resistance to influenza neuraminidase inhibitors. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7, 25–36. <https://doi.org/10.1111/irv.12047>
- McLaughlin, M.M., Skoglund, E.W., Ison, M.G., 2015a. Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 16, 1889–1900. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1066336>
- McLaughlin, M.M., Skoglund, E.W., Ison, M.G., 2015b. Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 16, 1889–1900. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1066336>
- Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., Martin, J., Nieto, A., Ortin, J., Portela, A., 1994. Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia virus-T7 RNA polymerase expression system. *Journal of General Virology* 75, 2109–2114. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-8-2109>.
- Meijer A, Rebelo-de-Andrade H, Correia V, Besselaar T, Drager-Dayal R, Fry A, Gregory V, Gubareva L, Kageyama T, Lackenby A, Lo J, Odagiri T, Pereyaslov D, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Wang D, Wong S, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral Res.* 2014 Oct; 110():31-41
- Miller, P.E., Rambachan, A., Hubbard, R.J., Li, J., Meyer, A.E., Stephens, P., Mounts, A.W., Rolfes, M.A., Penn, C.R., 2013. Supply of neuraminidase inhibitors related to reduced influenza A (H1N1) mortality during the 2009-2010 H1N1 pandemic: summary of an ecological study. *Influenza Other Respi Viruses* 7, 82–86. <https://doi.org/10.1111/irv.12092>
- Mohn, K.G.-I., Smith, I., Sjursen, H., Cox, R.J., 2018. Immune responses after live attenuated influenza vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 14, 571–578. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1377376>

- Monto, A.S., McKimm-Breschkin, J.L., Macken, C., Hampson, A.W., Hay, A., Klimov, A., Tashiro, M., Webster, R.G., Aymard, M., Hayden, F.G., Zambon, M., 2006. Detection of Influenza Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Global Surveillance during the First 3 Years of Their Use. *AAC* 50, 2395–2402. <https://doi.org/10.1128/AAC.01339-05>
- Moscona, A., 2005. Oseltamivir Resistance — Disabling Our Influenza Defenses. *N Engl J Med* 353, 2633–2636. <https://doi.org/10.1056/NEJMp058291>
- Mukherjee, A., Nayak, M.K., Dutta, S., Panda, S., Satpathi, B.R., Chawla-Sarkar, M., 2016. Genetic Characterization of Circulating 2015 A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses from Eastern India. *PLoS ONE* 11, e0168464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168464>
- Neumann, G., Castrucci, M.R., Kawaoka, Y., 1997. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *Journal of virology* 71, 9690–9700. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9690-9700.1997>
- Nguyen, H.T., Fry, A.M., Gubareva, L.V., 2012. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther* 17, 159–173. <https://doi.org/10.3851/IMP2067>
- Nichol, K.L., Mullooly, J.P., 2007. Effectiveness of Influenza Vaccine in the Community-Dwelling Elderly. *n engl j med* 9.
- Nishimura, K., Kim, S., Zhang, L., Cross, T.A., 2002. The Closed State of a H⁺ Channel Helical Bundle Combining Precise Orientational and Distance Restraints from Solid State NMR †. *Biochemistry* 41, 13170–13177. <https://doi.org/10.1021/bi0262799>
- Norowitz, Y.M., Kohlhoff, S., Smith-Norowitz, T.A., 2016. Relationship of influenza virus infection to associated infections in children who present with influenza-like symptoms. *BMC Infect Dis* 16, 304. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1642-8>
- Okomo-Adhiambo, M., Nguyen, H.T., Abd Elal, A., Sleeman, K., Fry, A.M., Gubareva, L.V., 2014. Drug susceptibility surveillance of influenza viruses circulating in the United States in 2011-2012: application of the WHO antiviral working group criteria. *Influenza Other Respi Viruses* 8, 258–265. <https://doi.org/10.1111/irv.12215>
- Okomo-Adhiambo, M., Nguyen, H.T., Sleeman, K., Sheu, T.G., Deyde, V.M., Garten, R.J., Xu, X., Shaw, M.W., Klimov, A.I., Gubareva, L.V., 2010a. Host cell selection of influenza neuraminidase variants: Implications for drug resistance monitoring in A(H1N1) viruses. *Antiviral Research* 85, 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.005>
- Okomo-Adhiambo, M., Sleeman, K., Ballenger, K., Nguyen, H.T., Mishin, V.P., Sheu, T.G., Smagala, J., Li, Y., Klimov, A.I., Gubareva, L.V., 2010b. Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Testing in Human Influenza Viruses: A Laboratory Surveillance Perspective. *Viruses* 2, 2269–2289. <https://doi.org/10.3390/v2102269>

- Okomo-Adhiambo, M., Sleeman, K., Lysén, C., Nguyen, H.T., Xu, X., Li, Y., Klimov, A.I., Gubareva, L.V., 2013. Neuraminidase inhibitor susceptibility surveillance of influenza viruses circulating worldwide during the 2011 Southern Hemisphere season. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7, 645–658. <https://doi.org/10.1111/irv.12113>
- O’Neill, R.E., 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal* 17, 288–296. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.288>
- Oong, X.Y., Ng, K.T., Lam, T.T.-Y., Pang, Y.K., Chan, K.G., Hanafi, N.S., Kamarulzaman, A., Tee, K.K., 2015. Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Influenza B Viruses in Malaysia, 2012-2014. *PLoS ONE* 10, e0136254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136254>
- Organisation Mondiale de la Santé. CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza (H1N1). World Health Organization, Geneva, <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/index.html>. 2009.
- Organisation Mondiale de la Santé. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.2011 https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/
- Organisation Mondiale de la Santé .Réunion du groupe de travail de l’OMS pour la surveillance de la sensibilité aux antiviraux contre la grippe. Relevé épidémiologique hebdomadaire.2012, 87 (39), 369–380. <http://www.who.int/wer>.
- Organisation Mondiale de la Santé .Réunion du groupe de travail de l’OMS pour la surveillance de la sensibilité aux antiviraux contre la grippe. Relevé épidémiologique hebdomadaire.2013, 88 (44-45), 477–488 <http://www.who.int/wer>.
- Organisation Mondiale de la Santé. Practical guidance for national influenza centers establishing or implementing neuraminidase inhibitor susceptibility surveillance. World Health Organization, Geneva, www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html. 2016
- Organisation Mondiale de la Santé. Revision of clinical case definitions: influenza-like illness and severe acute respiratory infection World Health Organization, 2018a, (96), 122–128, <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.17.194514>
- Organisation Mondiale de la Santé.WHO information for the molecular detection of influenza viruses. Health Organization, 2018b [1 http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/collaborating_centres/list/en/index.html](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/collaborating_centres/list/en/index.html)
- Paget, C., Trottein, F., 2019. Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role for Unconventional T Cells. *Front. Immunol.* 10, 336. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00336>

- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., Compans, R.W., 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61, 397–410. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90276-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90276-1)
- Patel, K., Rayner, C.R., Giraudon, M., Kamal, M.A., Morcos, P.N., Robson, R., Kirkpatrick, C.M., 2015. Pharmacokinetics and safety of oseltamivir in patients with end-stage renal disease treated with automated peritoneal dialysis: Pharmacokinetics of oseltamivir in automated peritoneal dialysis. *Br J Clin Pharmacol* 79, 624–635. <https://doi.org/10.1111/bcp.12526>
- Pebody, R., Warburton, F., Ellis, J., Andrews, N., Potts, A., Cottrell, S., Johnston, J., Reynolds, A., Gunson, R., Thompson, C., Galiano, M., Robertson, C., Byford, R., Gallagher, N., Sinnathamby, M., Yonova, I., Pathirannehelage, S., Donati, M., Moore, C., de Lusignan, S., McMenam, J., Zambon, M., 2016. Effectiveness of seasonal influenza vaccine for adults and children in preventing laboratory-confirmed influenza in primary care in the United Kingdom: 2015/16 end-of-season results. *Eurosurveillance* 21. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.38.30348>
- Peng, A.W., Miller, S., Stein, D.S., 2000. Direct Measurement of the Anti-Influenza Agent Zanamivir in the Respiratory Tract following Inhalation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1974–1976. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1974-1976.2000>
- Perdue, M.L., Arnold, F., Li, S., Donabedian, A., Cioce, V., Warf, T., Huebner, R., 2011. The future of cell culture-based influenza vaccine production. *Expert Review of Vaccines* 10, 1183–1194. <https://doi.org/10.1586/erv.11.82>
- Petric, M., Comanor, L., Petti, C.A., 2006. Role of the Laboratory in Diagnosis of Influenza during Seasonal Epidemics and Potential Pandemics. *J INFECT DIS* 194, S98–S110. <https://doi.org/10.1086/507554>
- Pielak, R.M., Schnell, J.R., Chou, J.J., 2009. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 7379–7384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902548106>
- Poon, L.L.M., Leung, C.S.W., Chan, K.H., Lee, J.H.C., Yuen, K.Y., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2005. Detection of Human Influenza A Viruses by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 427–430. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.427-430.2005>
- Portela, A., Digard, P., 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology* 83, 723–734. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-723>
- Potier, M., Mameli, L., Blisle, M., Dallaire, L., Melanon, S.B., n.d. Fluorometric Assay of Neuraminidase with a Sodium (4-Methylumbelliferyl- α -D-N-Acetylneuraminic) Substrate. *Journal of Clinical Microbiology* 10.
- Pozo, F., Lina, B., Andrade, H.R. de, Enouf, V., Kossyvakis, A., Broberg, E., Daniels, R., Lackenby, A., Meijer, A., 2013. Guidance for clinical and public health laboratories testing for influenza virus antiviral drug susceptibility in Europe. *Journal of Clinical Virology* 57, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.01.009>

- Quinton, L.J., Walkey, A.J., Mizgerd, J.P., 2018. Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiological Reviews* 98, 1417–1464. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2017>
- Raj, R.S., Bonney, E.A., Phillippe, M., 2014. Influenza, Immune System, and Pregnancy. *Reprod Sci* 21, 1434–1451. <https://doi.org/10.1177/1933719114537720>
- Rambaut, A., Pybus, O.G., Nelson, M.I., Viboud, C., Taubenberger, J.K., Holmes, E.C., 2008. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* 453, 615–619. <https://doi.org/10.1038/nature06945>
- Reece, P.A., 2007. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses. *J. Med. Virol.* 79, 1577–1586. <https://doi.org/10.1002/jmv.20951>
- Rguig, A., Cherkaoui, I., McCarron, M. et al. Establishing seasonal and alert influenza thresholds in Morocco. *BMC Public Health* 20, 1029 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09145-y>
- Richard, M., Deléage, C., Barthélémy, M., Lin, Y.P., Hay, A., Lina, B., Ferraris, O., 2008. Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors. *Journal of Clinical Virology* 41, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.021>
- Rolfes, M.A., Foppa, I.M., Garg, S., Flannery, B., Brammer, L., Singleton, J.A., Burns, E., Jernigan, D., Olsen, S.J., Bresee, J., Reed, C., 2018. Annual estimates of the burden of seasonal influenza in the United States: A tool for strengthening influenza surveillance and preparedness. *Influenza Other Respi Viruses* 12, 132–137. <https://doi.org/10.1111/irv.12486>
- Rossman, J.S., Jing, X., Leser, G.P., Lamb, R.A., 2010. Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission. *Cell* 142, 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.029>
- Rossman, J.S., Lamb, R.A., 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.003>
- Ruangrung, K., Suptawiwat, O., Maneechotesuwan, K., Boonarkart, C., Chakritbudsabong, W., Assawabhumi, J., Bhattarakosol, P., Uprasertkul, M., Puthavathana, P., Wiriyarat, W., Jongkaewwattana, A., Auewarakul, P., 2016. Neuraminidase Activity and Resistance of 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus to Antiviral Activity in Bronchoalveolar Fluid. *J. Virol.* 90, 4637–4646. <https://doi.org/10.1128/JVI.00013-16>
- Ruigrok, R.W.H., Barge, A., Durrer, P., Brunner, J., Ma, K., Whittaker, G.R., 2000. Membrane Interaction of Influenza Virus M1 Protein. *Virology* 267, 289–298. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0134>
- Russell, R.J., Haire, L.F., Stevens, D.J., Collins, P.J., Lin, Y.P., Blackburn, G.M., Hay, A.J., Gamblin, S.J., Skehel, J.J., 2006. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 443, 45–49. <https://doi.org/10.1038/nature05114>

- Rust, M.J., Lakadamyali, M., Zhang, F., Zhuang, X., 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* 11, 567–573. <https://doi.org/10.1038/nsmb769>
- Saito, R., Sakai, T., Sato, I., Sano, Y., Oshitani, H., Sato, M., Suzuki, H., 2003. Frequency of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses during Two Seasons Featuring Cocirculation of H1N1 and H3N2. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2164–2165. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2164-2165.2003>
- Salvatore, M., Basler, C.F., Parisien, J.-P., Horvath, C.M., Bourmakina, S., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., García-Sastre, A., 2002. Effects of Influenza A Virus NS1 Protein on Protein Expression: the NS1 Protein Enhances Translation and Is Not Required for Shutoff of Host Protein Synthesis. *JVI* 76, 1206–1212. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.3.1206-1212.2002>
- Schirmer, P., Holodniy, M., 2009. Oseltamivir for treatment and prophylaxis of influenza infection. *Expert Opinion on Drug Safety* 8, 357–371. <https://doi.org/10.1517/14740330902840519>
- Schrader, C., Süß, J., 2003. Genetic Characterization of a Porcine H1N2 Influenza Virus Strain Isolated in Germany. *Intervirology* 46, 66–70. <https://doi.org/10.1159/000068124>
- Schulze, I.T., 1997. Effects of Glycosylation on the Properties and Functions of Influenza Virus Hemagglutinin. *J INFECT DIS* 176, S24–S28. <https://doi.org/10.1086/514170>
- Sharma, V., Chaudhry, D., Kaushik, S., 2018. Evaluation of clinical applicability of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection and subtyping of Influenza A viruses. *Journal of Virological Methods* 253, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.12.005>
- Shi, Y., Zhang, B., Lu, Y., Qian, C., Feng, Y., Fang, L., Ding, Z., Cheng, D., 2017. Antiviral activity of phenanthrenes from the medicinal plant *Bletilla striata* against influenza A virus. *BMC Complement Altern Med* 17, 273. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1780-6>
- Shtyrya, Y.A., Mochalova, L.V., Bovin, N.V., 2009. Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. *Acta Naturae* 1, 26–32. <https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-2-26-32>
- Shun-Shin, M., Thompson, M., Heneghan, C., Perera, R., Harnden, A., Mant, D., 2009. Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 339, b3172–b3172. <https://doi.org/10.1136/bmj.b3172>
- Skehel, J.J., Bayley, P.M., Brown, E.B., Martin, S.R., Waterfield, M.D., White, J.M., Wilson, I.A., Wiley, D.C., 1982. Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 968–972. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.4.968>

- Sleeman, K., Guo, Z., Barnes, J., Shaw, M., Stevens, J., Gubareva, L.V., 2013. R292K Substitution and Drug Susceptibility of Influenza A(H7N9) Viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1521–1524. <https://doi.org/10.3201/eid1909.130724>
- Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S.M., Guan, Y., Rambaut, A., 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459, 1122–1125. <https://doi.org/10.1038/nature08182>
- Sridhar, S., Brokstad, K., Cox, R., 2015. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines* 3, 373–389. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020373>
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Su, W.-C., Yu, W.-Y., Huang, S.-H., Lai, M.M.C., 2017. Ubiquitination of the Cytoplasmic Domain of Influenza A Virus M2 Protein is Crucial for Production of Infectious Virus Particles. *J. Virol.* JVI.01972-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01972-17>
- Sugaya, N., Mitamura, K., Yamazaki, M., Tamura, D., Ichikawa, M., Kimura, K., Kawakami, C., Kiso, M., Ito, M., Hatakeyama, S., Kawaoka, Y., 2007. Lower Clinical Effectiveness of Oseltamivir against Influenza B Contrasted with Influenza A Infection in Children. *Clinical Infectious Diseases* 44, 197–202. <https://doi.org/10.1086/509925>
- Sun, S., Wang, Q., Zhao, F., Chen, W., Li, Z., 2012. Prediction of Biological Functions on Glycosylation Site Migrations in Human Influenza H1N1 Viruses. *PLoS ONE* 7, e32119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032119>
- Takeda, M., Pekosz, A., Shuck, K., Pinto, L.H., Lamb, R.A., 2002. Influenza A Virus M2 Ion Channel Activity Is Essential for Efficient Replication in Tissue Culture. *JVI* 76, 1391–1399. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.3.1391-1399.2002>
- Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC, Tashiro M. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. *Antiviral Res.* 2015 May; 117():27-38.
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu eY, Shimomura T, Watanabe S, Odagiri T. The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir due to a dual H275Y/G147R substitution, Japan, March 2016. *EuroSurveill.* 2016;21(24):pii=30258. <https://doi.org/10.2807/15607917.ES.2016.21.24.3028>
- Tamura, D., Nguyen, H.T., Sleeman, K., Levine, M., Mishin, V.P., Yang, H., Guo, Z., Okomo-Adhiambo, M., Xu, X., Stevens, J., Gubareva, L.V., 2013. Cell Culture-Selected Substitutions in Influenza A(H3N2) Neuraminidase Affect Drug

- Susceptibility Assessment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 6141–6146.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01364-13>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Taubenberger, J.K., Morens, D.M., 2008. The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3, 499–522.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>
- Tisdale, M., Daly, J., Gor, D., 2001. Methods for determining resistance to neuraminidase inhibitors. *International Congress Series* 1219, 879–886.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(01\)00656-2](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(01)00656-2)
- Tobita, K., Sugiura, A., Enomoto, C., Furuyama, M., 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* 162, 9–14.
<https://doi.org/10.1007/BF02123572>
- Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D.A.A., Chen, L.-M., Recuenco, S., Ellison, J.A., Davis, C.T., York, I.A., Turmelle, A.S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M.R., Tang, K., Rowe, L.A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, K.A., Cox, N.J., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E., Donis, R.O., 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 4269–4274. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116200109>
- Treanor, J.J., Hayden, F.G., Vrooman, P.S., Barbarash, R., Bettis, R., Riff, D., Singh, S., Kinnersley, N., Ward, P., Mills, R.G., for the US Oral Neuraminidase Study Group, 2000. Efficacy and Safety of the Oral Neuraminidase Inhibitor Oseltamivir in Treating Acute Influenza: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 283, 1016.
<https://doi.org/10.1001/jama.283.8.1016>
- Treanor, J.J., Talbot, H.K., Ohmit, S.E., Coleman, L.A., Thompson, M.G., Cheng, P.-Y., Petrie, J.G., Lofthus, G., Meece, J.K., Williams, J.V., Berman, L., Breese Hall, C., Monto, A.S., Griffin, M.R., Belongia, E., Shay, D.K., for the US Flu-VE Network, 2012. Effectiveness of Seasonal Influenza Vaccines in the United States During a Season With Circulation of All Three Vaccine Strains. *Clinical Infectious Diseases* 55, 951–959. <https://doi.org/10.1093/cid/cis574>
- Tripathi, S., White, M.R., Hartshorn, K.L., 2015. The amazing innate immune response to influenza A virus infection. *Innate Immun* 21, 73–98.
<https://doi.org/10.1177/1753425913508992>
- Trushakova, S., Kisteneva, L., Guglieri-López, B., Mukasheva, E., Kruzhkova, I., Mira-Iglesias, A., Krasnoslobodtsev, K., Morozova, E., Kolobukhina, L., Puig-Barberà, J., Burtseva, E., 2019. Epidemiology of influenza in pregnant women hospitalized with respiratory illness in Moscow, 2012/2013–2015/2016: a hospital-based active surveillance study. *BMC Pregnancy Childbirth* 19, 72. <https://doi.org/10.1186/s12884-019-2192-z>

- Turner, S.J., Doherty, P.C., Kelso, A., 2010. Q&A: H1N1 pandemic influenza - what's new? *BMC Biol* 8, 130. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-130>
- Van de Wakker, S.I., Fischer, M.J.E., Oosting, R.S., 2017. New drug-strategies to tackle viral-host interactions for the treatment of influenza virus infections. *European Journal of Pharmacology* 809, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.038>
- Van der Vries, E., Jonges, M., Herfst, S., Maaskant, J., Van der Linden, A., Guldemeester, J., Aron, G.I., Bestebroer, T.M., Koopmans, M., Meijer, A., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., Boucher, C.A., Schutten, M., 2010. Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. *Journal of Clinical Virology* 47, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.09.030>
- Varghese JN, Smith PW, Sollis SL, Blick TJ, Sahasrabudhe A, McKimm-Breschkin JL, Colman PM. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure*. 1998 Jun 15;6(6):735-46. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00075-6. PMID: 9655825.
- Varghese, J.N., Smith, P.W., Sollis, S.L., Blick, T.J., Sahasrabudhe, A., McKimm-Breschkin, J.L., Colman, P.M., 1998. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure* 6, 735–746. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00075-6)
- Vemula, S., Zhao, J., Liu, J., Wang, X., Biswas, S., Hewlett, I., 2016. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses* 8, 96. <https://doi.org/10.3390/v8040096>
- Vigerust, D.J., Ulett, K.B., Boyd, K.L., Madsen, J., Hawgood, S., McCullers, J.A., 2007. N-Linked Glycosylation Attenuates H3N2 Influenza Viruses. *JVI* 81, 8593–8600. <https://doi.org/10.1128/JVI.00769-07>
- Vijaykrishna, D., Holmes, E.C., Joseph, U., Fourment, M., Su, Y.C., Halpin, R., Lee, R.T., Deng, Y.-M., Gunalan, V., Lin, X., Stockwell, T.B., Fedorova, N.B., Zhou, B., Spirason, N., Kühnert, D., Bošková, V., Stadler, T., Costa, A.-M., Dwyer, D.E., Huang, Q.S., Jennings, L.C., Rawlinson, W., Sullivan, S.G., Hurt, A.C., Maurer-Stroh, S., Wentworth, D.E., Smith, G.J., Barr, I.G., 2015. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *eLife* 4, e05055. <https://doi.org/10.7554/eLife.05055>
- Vigerust DJ, Ulett KB, Boyd KL, Madsen J, Hawgood S, McCullers JA. N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J Virol*. 2007 Aug;81(16):8593-600. doi: 10.1128/JVI.00769-07. Epub 2007 Jun 6. PMID: 17553891; PMCID: PMC1951338.
- von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, Van Phan T, Smythe ML, White HF, Oliver SW, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*. 1993 Jun 3;363(6428):418-23. doi: 10.1038/363418a0. PMID: 8502295.
- Wang, Jun, Wu, Y., Ma, C., Fiorin, G., Wang, Jizhou, Pinto, L.H., Lamb, R.A., Klein, M.L., DeGrado, W.F., 2013. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of

- the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 1315–1320.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A., Garcia-Sastre, A., 2000. Influenza A Virus NS1 Protein Prevents Activation of NF- κ B and Induction of Alpha/Beta Interferon. *J. VIROL.* 74, 8.
- Waris, M., Ziegler, T., Kivivirta, M., Ruuskanen, O., 1990. Rapid detection of respiratory syncytial virus and influenza A virus in cell cultures by immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1159–1162.
<https://doi.org/10.1128/JCM.28.6.1159-1162.1990>
- Whitley, R.J., Hayden, F.G., Reisinger, K.S., Young, N., Dutkowski, R., Ipe, D., Mills, R.G., Ward, P., 2001. Oral oseltamivir treatment of influenza in children: The Pediatric Infectious Disease Journal 20, 127–133. <https://doi.org/10.1097/00006454-200102000-00002>
- Wiley, D.C., n.d. THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE HEMAGGLUTININ MEMBRANE GLYCOPROTEIN OF INFLUENZA VIRUS 32.
- World Health Organization (Ed.), 2011. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization, Geneva.
- Wu, N.C., Wilson, I.A., 2017. A Perspective on the Structural and Functional Constraints for Immune Evasion: Insights from Influenza Virus. *Journal of Molecular Biology* 429, 2694–2709. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.06.015>
- Xu, X., Zhu, X., Dwek, R.A., Stevens, J., Wilson, I.A., 2008. Structural Characterization of the 1918 Influenza Virus H1N1 Neuraminidase. *JVI* 82, 10493–10501.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00959-08>
- Yaqin Bai, Jeremy C. Jones, Sook-San Wong, and Mark Zanin. Antivirals Targeting the Surface Glycoproteins of Influenza Virus: Mechanisms of Action and Resistance. *Viruses*. 2021 Apr; 13(4): 624. doi: 10.3390/v13040624
- Ye, Z., Liu, T., Offringa, D.P., McInnis, J., Levandowski, R.A., 1999. Association of Influenza Virus Matrix Protein with Ribonucleoproteins. *J. Virol.* 73, 7467–7473.
<https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7467-7473.1999>
- Ye, Z.P., Pal, R., Fox, J.W., Wagner, R.R., 1987. Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *Journal of Virology* 61, 239–246.
<https://doi.org/10.1128/JVI.61.2.239-246.1987>
- York, I.A., Stevens, J., Alymova, I.V., 2019. Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. *Bioscience Reports* 39, BSR20171505.
<https://doi.org/10.1042/BSR20171505>
- Zaraket, H., 2016. Peramivir: A Novel Intravenous Neuraminidase Inhibitor for Treatment of Acute Influenza Infections. *Frontiers in Microbiology* 7, 14.
- Zhao, J., Liu, J., Vemula, S.V., Lin, C., Tan, J., Ragupathy, V., Wang, X., Mbondji-wonje, C., Ye, Z., Landry, M.L., Hewlett, I., 2016. Sensitive Detection and Simultaneous

Discrimination of Influenza A and B Viruses in Nasopharyngeal Swabs in a Single Assay Using Next-Generation Sequencing-Based Diagnostics. PLoS ONE 11, e0163175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163175>

Zhao, X.-N., Zhang, H.-J., Li, D., Zhou, J.-N., Chen, Y.-Y., Sun, Y.-H., Adeola, A.C., Fu, X.-Q., Shao, Y., Zhang, M.-L., 2020. Whole-genome sequencing reveals origin and evolution of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Lincang, China, from 2014 to 2018. PLoS ONE 15, e0234869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234869>



Annexes



Annexe : 1

PRIMER et PROBE pour la détection du A(H1N1) pdm09 par RT-PCR temps réel (OMS., 2009)

Primers and Probes	Sequence (5'>3')	Working Concentration
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40 µM
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	40 µM
InfA Probe	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	10 µM
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40 µM
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40 µM
SW InfA Probe	CYA CTG CAA GCC CA”T” ACA CAC AAG CAG GCA	10 µM
SW H1 Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40 µM
SW H1 Reverse	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC	40 µM

Les sondes TaqMan® sont marquées à l'extrémité 5 'avec la molécule rapporteur (FAM) et avec Quencher 1, Blackhole (BHQ1) à l'extrémité 3 '.

Annexe : 2

Annexe 2 : Référence des séquences du gène NA des souches A(H1N1) pdm09 isolées au Maroc

Segment ID	Segment	Country	Collection date	Isolate-ID	Isolate name
<u>EPI1437408</u>	NA	Morocco	13/12/2018	<u>EPI_ISL_355415</u>	A/Meknes/217/2018
<u>EPI1255241</u>	NA	Morocco	09/03/2018	<u>EPI_ISL_314700</u>	A/Oujda/1493/2018
<u>EPI1255227</u>	NA	Morocco	23/02/2018	<u>EPI_ISL_314693</u>	A/Meknes/1302/2018
<u>EPI1255225</u>	NA	Morocco	20/02/2018	<u>EPI_ISL_314692</u>	A/Meknes/1286/2018
<u>EPI1252733</u>	NA	Morocco	02/03/2018	<u>EPI_ISL_314266</u>	A/Tanger/1388/2018
<u>EPI1252727</u>	NA	Morocco	27/02/2018	<u>EPI_ISL_314263</u>	A/Rabat /1320/2018
<u>EPI1252719</u>	NA	Morocco	15/03/2018	<u>EPI_ISL_314259</u>	A/Meknes/1477/2018
<u>EPI1223067</u>	NA	Morocco	23/01/2018	<u>EPI_ISL_308505</u>	A/Rabat/921/2018
<u>EPI1223047</u>	NA	Morocco	13/12/2017	<u>EPI_ISL_308494</u>	A/Agadir/408/2017
<u>EPI1222998</u>	NA	Morocco	18/12/2018	<u>EPI_ISL_308469</u>	A/Temara/423/2017
<u>EPI1222992</u>	NA	Morocco	26/01/2018	<u>EPI_ISL_308466</u>	A/Marrakech/963/2018
<u>EPI1222978</u>	NA	Morocco	01/02/2018	<u>EPI_ISL_308459</u>	A/Meknes/1070/2018
<u>EPI1222972</u>	NA	Morocco	18/12/2017	<u>EPI_ISL_308456</u>	A/Agadir/469/2017
<u>EPI748991</u>	NA	Morocco	21/01/2016	<u>EPI_ISL_219674</u>	A/Meknes/344/2016
<u>EPI748907</u>	NA	Morocco	22/02/2016	<u>EPI_ISL_219632</u>	A/Fès/644/2016
<u>EPI748905</u>	NA	Morocco	15/01/2016	<u>EPI_ISL_219631</u>	A/Fès/231/2016
<u>EPI748821</u>	NA	Morocco	18/02/2016	<u>EPI_ISL_219589</u>	A/Benimellal/615/2016
<u>EPI921448</u>	NA	Morocco	25/02/2016	<u>EPI_ISL_249599</u>	A/ Morocco /654/2016
<u>EPI921377</u>	NA	Morocco	18/02/2016	<u>EPI_ISL_249596</u>	A/ Morocco /568/2016
<u>EPI921270</u>	NA	Morocco	09/02/2016	<u>EPI_ISL_249584</u>	A/ Morocco /472/2016
<u>EPI317175</u>	NA	Morocco	28/12/2009	<u>EPI_ISL_90153</u>	A/Morocco/93/2009
<u>EPI317172</u>	NA	Morocco	29/12/2009	<u>EPI_ISL_90152</u>	A/Morocco/344/2009
<u>EPI317169</u>	NA	Morocco	01/11/2009	<u>EPI_ISL_90151</u>	A/Morocco/274/2009
<u>EPI317166</u>	NA	Morocco	23/11/2009	<u>EPI_ISL_90150</u>	A/Morocco/22/2009
<u>EPI317163</u>	NA	Morocco	22/10/2009	<u>EPI_ISL_90149</u>	A/Morocco/439/2009
<u>EPI317161</u>	NA	Morocco	18/05/2009	<u>EPI_ISL_90148</u>	A/Morocco/1515/2009
<u>EPI317158</u>	NA	Morocco	16/11/2009	<u>EPI_ISL_90147</u>	A/Morocco/889/2009
<u>EPI317155</u>	NA	Morocco	12/11/2009	<u>EPI_ISL_90146</u>	A/Morocco/276/2009
<u>EPI317152</u>	NA	Morocco	22/10/2009	<u>EPI_ISL_90145</u>	A/Morocco/436/2009

Annexe 2 : Référence des séquences du gène NA des souches A(H1N1) pdm09 isolées au Maroc (suite)

Segment ID	Segment	Country	Collection date	Isolate-ID	Isolate name
<u>EPI317149</u>	NA	Morocco	16/11/2009	<u>EPI ISL 90144</u>	A/Morocco/671/2009
<u>EPI317146</u>	NA	Morocco	16/11/2009	<u>EPI ISL 90143</u>	A/Morocco/608/2009
<u>EPI317143</u>	NA	Morocco	09/11/2009	<u>EPI ISL 90142</u>	A/Morocco/442/2009
<u>EPI317140</u>	NA	Morocco	02/12/2009	<u>EPI ISL 90141</u>	A/Morocco/270/2009
<u>EPI317133</u>	NA	Morocco	16/11/2009	<u>EPI ISL 90140</u>	A/Morocco/893/2009
<u>EPI317130</u>	NA	Morocco	01/01/2010	<u>EPI ISL 90139</u>	A/Morocco/1598/2009
<u>EPI317127</u>	NA	Morocco	16/11/2009	<u>EPI ISL 90138</u>	A/Morocco/618/2009
<u>EPI317124</u>	NA	Morocco	16/11/2009	<u>EPI ISL 90137</u>	A/Morocco/606/2009
<u>EPI316939</u>	NA	Morocco	12/11/2009	<u>EPI ISL 90086</u>	A/ Morocco /49/2009
<u>EPI316936</u>	NA	Morocco	13/11/2009	<u>EPI ISL 90085</u>	A/ Morocco /51/2009
<u>EPI316933</u>	NA	Morocco	05/11/2009	<u>EPI ISL 90084</u>	A/Morocco/11/2009
<u>EPI737407</u>	NA	Morocco	29/01/2016	<u>EPI ISL 215756</u>	A/ Morocco /344/2016
<u>EPI729913</u>	NA	Morocco	17/02/2016	<u>EPI ISL 215611</u>	A/ Morocco 602/2016
<u>EPI729911</u>	NA	Morocco	15/01/2016	<u>EPI ISL 215610</u>	A/ Morocco /231/2016
<u>EPI729111</u>	NA	Morocco	04/02/2015	<u>EPI ISL 215490</u>	A/Morocco/161/2015
<u>EPI255990</u>	NA	Morocco	16/12/2009	<u>EPI ISL 74517</u>	A/Morocco/901H/2009
<u>EPI255988</u>	NA	Morocco	21/12/2009	<u>EPI ISL 74516</u>	A/Morocco/1024H/2009
<u>EPI255986</u>	NA	Morocco	23/12/2009	<u>EPI ISL 74515</u>	A/Morocco/1088H/2009
<u>EPI210539</u>	NA	Morocco	02/07/2009	<u>EPI ISL 60281</u>	A/RABAT/72/2009
<u>EPI210521</u>	NA	Morocco	23/06/2009	<u>EPI ISL 60272</u>	A/MARRAKECH/47/2009

Annexe : 3

Annexe 3 : Référence des séquences du gène NA des souches A(H3N2) isolées au Maroc

Segment ID	Segment	Country	Collection date	Isolate-ID	Isolate name
<u>EPI1255201</u>	NA	Morocco	18/02/2018	<u>EPI ISL 314680</u>	A/Rabat/1229/2018
<u>EPI1255183</u>	NA	Morocco	23/02/2018	<u>EPI ISL 314671</u>	A/Meknes/1299/2018
<u>EPI1252576</u>	NA	Morocco	20/03/2018	<u>EPI ISL 314186</u>	A/Tanger/1449/2018
<u>EPI1252554</u>	NA	Morocco	13/02/2018	<u>EPI ISL 314175</u>	A/Meknes/1218/2018
<u>EPI1252536</u>	NA	Morocco	26/02/2018	<u>EPI ISL 314165</u>	A/Fes/1440/2018
<u>EPI1223516</u>	NA	Morocco	18/12/2018	<u>EPI ISL 308731</u>	A/Temara/422/2017
<u>EPI1223514</u>	NA	Morocco	12/12/2017	<u>EPI ISL 308730</u>	A/Temara/370/2017
<u>EPI1223512</u>	NA	Morocco	16/01/2018	<u>EPI ISL 308729</u>	A/Rabat/799/2018
<u>EPI1223508</u>	NA	Morocco	09/01/2018	<u>EPI ISL 308727</u>	A/Meknes/662/2018
<u>EPI1223506</u>	NA	Morocco	11/12/2017	<u>EPI ISL 308726</u>	A/Meknes/376/2017
<u>EPI1223504</u>	NA	Morocco	22/11/2017	<u>EPI ISL 308725</u>	A/Marrakech/280/2017
<u>EPI1223485</u>	NA	Morocco	04/01/2018	<u>EPI ISL 308715</u>	A/Beni Mellal/735/2018
<u>EPI1223479</u>	NA	Morocco	13/01/2018	<u>EPI ISL 308712</u>	A/Agadir/757/2018
<u>EPI1223477</u>	NA	Morocco	09/11/2017	<u>EPI ISL 308711</u>	A/Agadir/206/2017
<u>EPI991824</u>	NA	Morocco	28/12/2016	<u>EPI ISL 262318</u>	A/Beni Mellal/339/2016
<u>EPI991708</u>	NA	Morocco	07/11/2016	<u>EPI ISL 262264</u>	A/Temara/50/2016
<u>EPI991664</u>	NA	Morocco	02/11/2016	<u>EPI ISL 262242</u>	A/Meknes/42/2016
<u>EPI991660</u>	NA	Morocco	03/11/2016	<u>EPI ISL 262241</u>	A/Marrakech/58/2016
<u>EPI991658</u>	NA	Morocco	01/11/2016	<u>EPI ISL 262240</u>	A/Marrakech/37/2016
<u>EPI991554</u>	NA	Morocco	08/11/2016	<u>EPI ISL 262200</u>	A/Fes/67/2016
<u>EPI991552</u>	NA	Morocco	10/01/2017	<u>EPI ISL 262199</u>	A/Fes/534/2017
<u>EPI991548</u>	NA	Morocco	29/12/2016	<u>EPI ISL 262198</u>	A/Fes/365/2016
<u>EPI991545</u>	NA	Morocco	16/11/2016	<u>EPI ISL 262197</u>	A/Fes/123/2016
<u>EPI967202</u>	NA	Morocco	27/12/2016	<u>EPI ISL 257370</u>	A/Fes/315/2016
<u>EPI960145</u>	NA	Morocco	23/11/2016	<u>EPI ISL 256058</u>	A/Tanger/333/2016
<u>EPI746068</u>	NA	Morocco	17/01/2016	<u>EPI ISL 218962</u>	A/Temara/235/2016
<u>EPI746046</u>	NA	Morocco	21/01/2016	<u>EPI ISL 218951</u>	A/Rabat/274/2016
<u>EPI746044</u>	NA	Morocco	21/01/2016	<u>EPI ISL 218950</u>	A/Rabat/259/2016
<u>EPI746036</u>	NA	Morocco	06/01/2016	<u>EPI ISL 218946</u>	A/Meknes/168/2016
<u>EPI746030</u>	NA	Morocco	20/01/2016	<u>EPI ISL 218943</u>	A/Fes/238/2016
<u>EPI746028</u>	NA	Morocco	18/01/2016	<u>EPI ISL 218942</u>	A/Fes/207/2016
<u>EPI746026</u>	NA	Morocco	07/01/2016	<u>EPI ISL 218941</u>	A/Fes/161/2016

Annexe : 3

Annexe 3 : Référence des séquences du gène NA des souches A(H3N2) isolées au Maroc
(suite)

Segment ID	Segment	Country	Collection date	Isolate-ID	Isolate name
<u>EPI745994</u>	NA	Morocco	14/01/2016	<u>EPI_ISL_218924</u>	A/Agadir/217/2016
<u>EPI1091663</u>	NA	Morocco	30/01/2017	<u>EPI_ISL_283697</u>	A/MOROCCO/534/2017
<u>EPI1091658</u>	NA	Morocco	01/12/2016	<u>EPI_ISL_283694</u>	A/MOROCCO/195/2017
<u>EPI921761</u>	NA	Morocco	28/12/2016	<u>EPI_ISL_249623</u>	A/MOROCCO/367/2016
<u>EPI393503</u>	NA	Morocco	24/11/2011	<u>EPI_ISL_128350</u>	A/MOROCCO/49H/2011
<u>EPI393495</u>	NA	Morocco	12/12/2011	<u>EPI_ISL_128347</u>	A/MOROCCO/184/2011
<u>EPI393381</u>	NA	Morocco	26/10/2011	<u>EPI_ISL_128315</u>	A/MOROCCO/47/2011
<u>EPI345999</u>	NA	Morocco	26/01/2011	<u>EPI_ISL_99638</u>	A/Meknes/109/2011
<u>EPI345985</u>	NA	Morocco	19/01/2011	<u>EPI_ISL_99631</u>	A/Tanger/144/2011
<u>EPI345982</u>	NA	Morocco	07/01/2011	<u>EPI_ISL_99630</u>	A/Agadir/50/2011
<u>EPI737406</u>	NA	Morocco	04/02/2016	<u>EPI_ISL_215757</u>	A/MOROCCO/430/2016
<u>EPI729908</u>	NA	Morocco	17/03/2015	<u>EPI_ISL_215609</u>	A/Morocco/184/2015
<u>EPI729905</u>	NA	Morocco	25/03/2015	<u>EPI_ISL_215608</u>	A/Morocco/190/2015
<u>EPI393501</u>	NA	Morocco	03/01/2012	<u>EPI_ISL_128349</u>	A/MOROCCO/144H/2012
<u>EPI574635</u>	NA	Morocco	20/11/2014	<u>EPI_ISL_175046</u>	A/Meknes/24/2015
<u>EPI563208</u>	NA	Morocco	16/12/2014	<u>EPI_ISL_172394</u>	A/Marrakech/79/2014
<u>EPI352802</u>	NA	Morocco	01/12/2011	<u>EPI_ISL_103305</u>	A/Oujda/144H/2011
<u>EPI352762</u>	NA	Morocco	28/11/2011	<u>EPI_ISL_103286</u>	A/Meknes/136H/2011
<u>EPI352760</u>	NA	Morocco	28/12/2011	<u>EPI_ISL_103285</u>	A/Rabat/197/2011
<u>EPI352758</u>	NA	Morocco	26/12/2011	<u>EPI_ISL_103284</u>	A/Tiznit/167/2011
<u>EPI352756</u>	NA	Morocco	26/12/2011	<u>EPI_ISL_103283</u>	A/Casablanca/155/2011
<u>EPI352754</u>	NA	Morocco	12/12/2011	<u>EPI_ISL_103282</u>	A/Agadir/87/2011
<u>EPI215121</u>	NA	Morocco	20/12/2008	<u>EPI_ISL_61768</u>	A/Tanger/533/2009

Annexe : 4

Annexe 4 : Référence des séquences du gène NA des souches influenza B isolées au Maroc

Segment ID	Segment	Country	Collection date	Isolate-ID	Isolate name
EPI1252256	NA	Morocco	05/02/2018	EPI ISL 314082	B/Meknes/1104/2018
EPI1252250	NA	Morocco	08/02/2018	EPI ISL 314079	B/Oujda/1182/2018
EPI1252248	NA	Morocco	13/02/2018	EPI ISL 314078	B/Oujda/1186/2018
EPI1252246	NA	Morocco	26/02/2018	EPI ISL 314077	B/Oujda/1371/2018
EPI1223298	NA	Morocco	20/12/2017	EPI ISL 308620	B/Meknes/491/2017
EPI1223296	NA	Morocco	18/12/2017	EPI ISL 308619	B/Marrakech/487/2017
EPI1223294	NA	Morocco	14/12/2017	EPI ISL 308618	B/Meknes/412/2017
EPI1223292	NA	Morocco	14/12/2017	EPI ISL 308617	B/Meknes/411/2017
EPI1223290	NA	Morocco	13/12/2017	EPI ISL 308616	B/Agadir/407/2017
EPI1223288	NA	Morocco	08/12/2017	EPI ISL 308615	B/Marrakech/343/2017
EPI1223286	NA	Morocco	22/12/2017	EPI ISL 308614	B/Marrakech/489/2017
EPI1223284	NA	Morocco	04/12/2017	EPI ISL 308613	B/Tanger/396/2017
EPI1223280	NA	Morocco	07/12/2017	EPI ISL 308611	B/Marrakech/342/2017
EPI1223278	NA	Morocco	04/01/2018	EPI ISL 308610	B/Fès/619/2018
EPI1223276	NA	Morocco	08/01/2018	EPI ISL 308609	B/Fès/649/2018
EPI902742	NA	Morocco	03/01/2011	EPI ISL 246637	B/Agadir/156/2011
EPI1091672	NA	Morocco	11/04/2017	EPI ISL 283701	B/ Morocco /1412/2017
EPI1091670	NA	Morocco	06/03/2017	EPI ISL 283700	B/ Morocco 1185/2017
EPI1091668	NA	Morocco	24/01/2017	EPI ISL 283699	B/ Morocco /708/2017
EPI1091666	NA	Morocco	28/02/2017	EPI ISL 283698	B/ Morocco /1157/2017
EPI1091661	NA	Morocco	15/03/2017	EPI ISL 283696	B/ Morocco /1292/2017
EPI734129	NA	Morocco	15/01/2015	EPI ISL 216533	B/Morocco/CP10/2015
EPI733904	NA	Morocco	09/03/2016	EPI ISL 216461	B/Morocco/829/2016

Annexe 4 :

Référence des séquences du gène NA des souches influenza B isolées au Maroc
(Suite)

Segment ID	Segment	Country	Collection date	Isolate-ID	Isolate name
EPI921609	NA	Morocco	20/12/2016	EPI_ISL_249614	B/MOROCCO/316/2016
EPI450057	NA	Morocco	18/02/2013	EPI_ISL_141515	B/ Casablanca /247/2013
EPI450054	NA	Morocco	19/02/2013	EPI_ISL_141514	B/Casablanca/246/2013
EPI393499	NA	Morocco	05/03/2012	EPI_ISL_128348	B/ Morocco /836/2012
EPI393378	NA	Morocco	06/06/2012	EPI_ISL_128314	B/ Morocco /940/2012
EPI346955	NA	Morocco	18/01/2011	EPI_ISL_100080	B/Marrakech/281/2011
EPI346953	NA	Morocco	13/12/2010	EPI_ISL_100079	B/Tanger/63/2010
EPI346950	NA	Morocco	24/02/2011	EPI_ISL_100078	B/Rabat/406/2011
EPI346484	NA	Morocco	13/12/2010	EPI_ISL_99808	B/Safi/176/2010
EPI346481	NA	Morocco	27/01/2011	EPI_ISL_99807	B/Tanger/146/2011
EPI346224	NA	Morocco	04/03/2011	EPI_ISL_99727	B/Fés/428/2011
EPI346221	NA	Morocco	01/03/2011	EPI_ISL_99726	B/Marrakech/418/2011
EPI346218	NA	Morocco	01/01/2011	EPI_ISL_99725	B/Sale/355/2011
EPI346009	NA	Morocco	22/02/2011	EPI_ISL_99643	B/Rabat/164/2011
EPI346005	NA	Morocco	03/01/2011	EPI_ISL_99641	B/Agadir/156/2011
EPI346002	NA	Morocco	26/01/2011	EPI_ISL_99640	B/Rabat/123/2011
EPI730808	NA	Morocco	10/02/2015	EPI_ISL_215754	B/Morocco/176H/2015
EPI730553	NA	Morocco	07/01/2015	EPI_ISL_215717	B/Morocco/102/2015
EPI730551	NA	Morocco	17/12/2014	EPI_ISL_215716	B/ Morocco /43H/2014
EPI1098486	NA	Morocco	17/01/2017	EPI_ISL_284682	B/ Morocco /620/2017
EPI574837	NA	Morocco	13/12/2014	EPI_ISL_175142	B/Sale/70/2014
EPI574831	NA	Morocco	27/11/2014	EPI_ISL_175139	B/Meknes/35/2014
EPI574725	NA	Morocco	12/12/2014	EPI_ISL_175086	B/Agadir/68/2014
EPI562358	NA	Morocco	23/12/2014	EPI_ISL_171966	B/Oujda/96/2014
EPI562354	NA	Morocco	16/12/2014	EPI_ISL_171964	B/Meknes/32/2014
EPI562352	NA	Morocco	07/01/2015	EPI_ISL_171963	B/Meknes/102/2015
EPI305370	NA	Morocco	03/01/2011	EPI_ISL_86985	B/Agadir/156/2011

Résumé

Les épidémies de grippe sont responsables d'une mortalité et d'une morbidité importante. Bien que la vaccination reste le principal moyen de prévention, les antiviraux constituent un élément clé en termes de prophylaxie et de traitement. Les inhibiteurs de la neuraminidase sont actuellement la seule classe d'antiviraux disponible. Compte tenu de ces options limitées de thérapie antivirale, la résistance aux médicaments antigrippaux constitue une préoccupation constante. Au Maroc, les données relatives aux profils de sensibilité des virus grippaux aux INAs sont rares. Cette étude constitue une première évaluation nationale du degré de sensibilité des virus grippaux à ces deux antiviraux. Au cours de la période d'étude (quatre saisons grippales). L'évaluation phénotypique, complétée par l'analyse génotypique du gène NA, révèle une sensibilité normale pour les deux médicaments. Aucune mutation de résistance n'a été identifiée. Cependant, une diminution de l'affinité du virus A (H1N1) pdm09 pour l'oseltamivir a été détectée. Probablement liée aux mutations situées au voisinage du site actif de la neuraminidase. D'autre part, la dynamique d'évolution du gène NA des virus grippaux isolés pendant les saisons grippales 2009/2010 à 2017/2018, déterminée selon la méthode (MCMC) complétée par un suivi de la dynamique de migration des sites de N-glycosylation, révèle une dérive génétique associée à un taux de substitution plus accentué pour les virus grippaux type A que type B, particulièrement chez le A (H1N1) pdm09. A cette dérive s'ajoute une dynamique de migration des sites de glycosylation en faveur d'une diminution de l'affinité pour l'Oseltamivir et d'un échappement au système immunitaire. Les résultats obtenus grâce à cette première étude documentée démontrent clairement l'importance de la surveillance des profils de sensibilité des virus grippaux aux antiviraux et du suivi de la dynamique d'évolution du gène de la NA.

Mots clés : Influenza, neuraminidase, INAs, profil de sensibilité, Dynamique d'évolution

Abstract

Influenza epidemics are responsible for significant mortality and morbidity. Although vaccination remains the primary means for the prevention of influenza, antiviral drugs are a key component in the prophylaxis and treatment. Neuraminidase inhibitors are currently the only class of antiviral available. Given these limited antiviral therapy options, resistance to anti-influenza drugs is constant concern. In Morocco, data relating to the sensitivity profiles of influenza viruses to the two INAs are scarce. This study constitutes a first national assessment of the degree of sensitivity of influenza viruses to two antiviral drugs. During the study period (four influenza seasons), using the phenotypic NA inhibition assay as well as sequencing of the NA gene. We found that all the influenza viruses exhibited normal sensitivity for both drugs. The mutations in the NA polypeptide associated with drug resistance in Influenza virus were not detected in any of the Moroccan isolates analyzed in this study. However, a decrease in the affinity of influenza A (H1N1) pdm09 to Oseltamivir was detected. Probably related to mutations detected in the vicinity of the active site of the NA polypeptide. The evolution dynamics of the NA gene of influenza viruses isolated during the influenza seasons 2009/2010 to 2017/2018, determined using the Bayesian method (MCMC). Completed by a follow-up of the migration dynamics of the N-glycosylation sites. The results obtained reveal a genetic drift associated with a substitution rate at the nucleotide scale that is relatively more accentuated in the case of influenza viruses type A than type B. In addition to this drift, there is a migration dynamic of the glycosylation sites in favor of a decrease in affinity to Oseltamivir and escape to the immune system. The results obtained through this first documented study clearly demonstrate the importance of monitoring the susceptibility profiles of influenza viruses to antiviral.

Keywords: Influenza, neuraminidase, INAs, sensitivity profile, Evolutionary dynamic