

原著文章

新上市流感快篩試劑之檢測效能評估

楊季融、郭權益、林昭樺、吳和生、劉銘燦

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

摘要

流行性感冒(Influenza)病毒為全世界重要之呼吸道病原體，每年皆可引起人類嚴重感染及死亡。早期診斷是防治流感疫情的重要利器，早期使用克流感等抗病毒藥物亦可大幅提升患者治療效果。由於流感病毒活躍時，國內各級醫院及各地區診所往往為診斷患者的第一線場所，為協助臨床醫師於診間快速檢測流感病毒，以達早期用藥之效，並探討此種快篩試劑對疾病管制署（簡稱疾管署）防疫業務的實質幫助，本研究以 73 件臨床檢體，針對目前新上市流感快篩試劑 Sofia FIA 之檢測靈敏度及特異性進行評估，並與 real-time RT-PCR 的檢驗結果比較。評估結果顯示，與 real-time RT-PCR 相比，Sofia 快篩試劑對 A 型流感的整體檢測靈敏度為 68.2%；對 B 型流感則為 45.5%。當檢體為 A 型流感陽性且 real-time RT-PCR 之檢測 Cp 值小於 30 時，Sofia FIA 的檢測靈敏度可達 85%以上（對 H1N1pdm09 病毒為 92%；對 H3N2 病毒為 85%）；B 型流感陽性且 Cp 值小於 30 時，Sofia 檢測靈敏度則為 69%。特異性評估結果則為 100%，並無偽陽性現象產生。綜合上述發現，Sofia FIA 快篩試劑對於 A 型流感的檢測能力較 B 型流感為高，且表現較傳統型流感快篩試劑佳。此種新式流感快篩試劑應可有效幫助不具專業流感檢測實驗室之醫療機構進行患者初步檢測；同時可協助疾管署於機場或港口的邊境檢疫業務，防堵新型流感（如 H5N1 或 H7N9 等）藉由境外移入方式侵襲我國。

關鍵字：流感病毒、流感快篩試劑、Sofia FIA

前言

流感病毒是一種可引起人類急性呼吸道疾病的病原體，在世界各地呈現週期性大流行。依據世界衛生組織的估計，此病毒每年約可造成 25-50 萬名受感染者死亡 [1]。在分類學上，流感病毒屬於正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae)，為一種具套膜的 RNA 病毒，依照其核蛋白(nucleoprotein, NP)的抗原性，可進一步分成 A、B、C 型流感病毒 [1] (influenza A, influenza B and influenza C viruses)；A 型流感病毒又可再依其表面之兩種糖蛋白 (glycoprotein)：紅血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 以及神經胺酸酶

(neuraminidase, NA)細分成多種亞型 (subtype)。根據先前文獻報導，目前共定義 18 種 HA (H1-H18)以及 11 種 NA (N1-N11)蛋白，其中 H1-H16 以及 N1-N9 等亞型皆可於禽鳥中發現。在三型流感病毒中，A 型和 B 型流感病毒較常感染人類且引起明顯的症狀，而 H1N1、H2N2 以及 H3N2 等三種 A 型流感病毒曾在人類引起大流行，至今 H1N1 與 H3N2 病毒仍持續感染人類 [2]。除了上述病毒之外，其他亞型之 A 型流感病毒 (包含 H1、H2 以及 H3)主要感染對象為禽鳥，惟 H5、H6、H7、H9、H10 等病毒仍曾引起人類偶發感染。A 型及 B 型流感病毒基因體由 8 段分節的 RNA 組成，病毒在複製過程中容易引發突變，導致此病毒經常藉由基因之點突變或重組發生變異(抗原飄移或抗原轉移)，其中尤以 A 型流感病毒最為頻繁且快速；A 型流感於人類所引起的症狀亦較 B 型流感嚴重。

為有效控制流感病毒所造成之大規模傳染疫情，早期診斷病毒感染是一個重要的工作。即時且正確的診斷除可幫助臨床醫師有效使用抗病毒藥物 (如克流感)，使藥物可有效降低感染者體內之病毒量，亦可改善病情較為嚴重且需住院者患者之預後情形 [3]。一般來說，具專業設施的醫學實驗室常以傳統病毒學方法檢驗流感病毒，即藉由細胞培養，使病毒感染細胞後先在其中大量增殖複製，再以各型別之流感病毒抗體針對受染細胞進行免疫螢光染色，鑑定該病毒型別。此法的優點為所需成本低、亦可同時操作大量檢體；惟其需要較有經驗的專業檢驗人員操作並進行結果研判，且病毒培養較為耗時，自檢體接種至得到檢驗結果約需 7-10 天，對於較為緊急之感染個案檢驗較不適宜。有鑑於此，隨著分子生物學技術的迅速發展，檢測流感病毒基因體 RNA 逐漸成為檢驗流感病毒的主流方法之一。聚合酶鏈鎖反應法 (polymerase chain reaction, PCR)是目前最廣為使用的病毒分子生物學檢測法，利用具有專一性之引子對 (Primer Pair)，使 DNA 聚合酶 (DNA polymerase)可在特定溫度條件複製目標片段並將其增殖，之後再藉由偵測增殖後產物做為結果研判的依據。此外，近年來又進一步將此方法延伸出以螢光染劑搭配高敏感度偵測系統之即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)，使聚合酶反應結果可由電腦訊號偵測利於及時判讀，大幅縮短檢驗所需時間；且利用儀器偵測螢光訊號的敏感度亦較傳統 PCR 需以特殊染劑染色後再用肉眼觀察為高。雖然如此，這些分子生物法檢驗所需成本往往較傳統細胞培養為高，對於較為小型的臨床實驗室來說，常因檢驗成本負擔過大而無法常規使用。

雖然上述各種流感病毒檢驗法各有其優缺點，但其共通特性為需在具有特殊儀器設備之操作環境進行，這對於許多在診所、急診室、醫師診療室或病房看診的臨床醫師來說，常因需等待檢驗結果而造成診療之不連貫，因此具床邊檢驗 (point-of-care testing) 特性的流感快篩試劑 (rapid influenza antigen test, RIAT)隨即成為另一種病毒檢驗利器 [3- 4]。流感快篩試劑是一種以抗原抗體反應為原理的抗原檢測法，利用相同型別流感病毒 (例如 A 型流感之間)核蛋白 (nucleoprotein, NP)具有序列保守性 (conservation)的特性，可藉由該蛋白之單株抗體與待測檢體中流感病毒 NP 蛋白抗原相結合，再以膠體金 (Colloidal gold)呈色法偵測抗原抗體聚合物。根據先前的文獻報導，市售流感快篩試劑的專一性約可達 95% 以上 [5- 6]。此方法的優點在於不需要在具有特殊儀器設備之專業實驗室內即可進行病毒檢驗，且操作步驟簡單，亦僅需短時間 (約 15-20 分鐘)即可得到檢驗結果。因此當病患於診間內呈現快篩試劑結果陽性，醫師即可依此

結果及時給予抗流感藥物治療。然而。此法檢測靈敏度與分子生物檢測法或病毒培養相比並不高 [5- 6]，容易出現偽陰性結果，這表示一個陰性結果並不能確認該病患檢體中沒有流感病毒存在；此外大多數流感快篩試劑的結果僅能呈現A型或B型流感病毒陽性，無法進一步針對A型流感進行後續亞型 (例如H1、H3、H5及H7等)分析。為了改善傳統流感快篩試劑敏感性不高的困境，近期國外生技公司成功研發一種新式流感快篩試劑「Sofia Influenza A+B FIA」，改良傳統快篩試劑所用之NP單株抗體，將其由原本以酵素標示 (enzyme-labeled)改由以螢光物質標示 (fluorescence-labeled)，並搭配簡易型螢光測讀儀偵測抗原抗體結合後所產生的螢光訊號。此種新式快篩試劑的優點在於以機器取代肉眼判讀陽性訊號，預期可提升檢測靈敏度。因此種試劑陸續被國內醫療院所採用，為實地評估其檢測效能，本研究利用73件臨床檢體為材料以該試劑進行檢驗，並將所得結果與 real-time RT-PCR比較，進而探討此類新上市快篩試劑未來於非專業型實驗室使用地可行性。

材料與方法

一、臨床檢體

本研究共挑選 73 件具類流感症狀患者的呼吸道檢體為樣本進行 Sofia FIA 快篩試劑測試。每件檢體均以 rayon transportation swab (Copan, Italy)採集患者咽喉，並於採集後於低溫 (4°C)環境下運送至疾管署研究檢驗中心呼吸道病毒實驗室進行流感病毒檢驗。當實驗室收到檢體後，先加入 1 ml 之 DMEM 培養液 (Invitrogen) 並與棉棒做劇烈混合，該混合後之懸浮液則作為待測檢體。

二、檢體核酸萃取

待測檢體以 real-time RT-PCR 進行檢測前，需萃取病毒核酸。病毒核酸萃取係使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 手動方法或 MagNa Pure Compact (Roche)自動化系統。使用手動方法時，首先取 140 μ l 之檢體懸浮液與 560 μ l Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 μ l 絕對酒精再次混合。之後將混合液通過 QIAamp spin column，並陸續以緩衝液 AW1 及 AW2 清洗 column，最後以 60 μ l 純水 (ddH₂O)將 RNA 自 column 溶出。若使用自動化系統，則取 200 μ l 之檢體懸浮液至萃取試劑中，依照原廠設定流程進行自動化萃取。萃取後的 RNA 可直接作為 real time RT-PCR 之模板；剩餘 RNA 將置於-20°C 冰箱中保存。

三、流感病毒 real-time RT-PCR 檢驗

流感病毒 real-time RT-PCR 檢驗係以 Roche LightCycler 480 儀器，進行 one-step real-time RT-PCR。使用之引子 (primer)與專一性探針 (Taqman probe)序列乃依據世界衛生組織資料並經疾管署實驗室改良 (7-9)，檢測標的包括：(1) A 型流感病毒之 M (Matrix)基因，所有 A 型流感病毒均可偵測、(2) B 型流感病毒之 M (Matrix) 基因，所有 B 型流感病毒均可偵測。當待測檢體呈現 A 型流陽性時，則繼續進行以下兩個檢測反應進行病毒亞型分析：(3) H1N1pdm09 病毒之 HA 基因，可鑑定 H1N1pdm09 病毒、(4) H3N2 病毒之 HA 基因，可鑑定 H3N2 病毒。當檢體呈現 A 型流感陽性但 H1N1pdm09 及 H3N2 分型陰性時，則繼續以 H5、H6、H7、H9 及 H10 等反應進行特殊亞型鑑定。檢測試劑係使用 LightCycler 480 RNA Master

Hydrolysis Probes，配方則依照原廠建議並作些許調整。內容物包括：DEPC 純水 3.8 μl 、各專一性引子與探針 0.5 μl 、activator 1.3 μl 、enzyme master mix 7.4 μl 、enhancer 1 μl 以及病毒 RNA 模板 5 μl 。反應條件為 63°C 3 分鐘，95°C 30 秒。再以 95°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 3 秒重複進行 45 個循環。檢測時間約需 1 小時 30 分鐘，反應結束後可由電腦訊號進行結果判讀。

四、Sofia FIA 流感快篩試劑檢驗

Sofia 快篩試劑 (Quidel, San Diego, CA, United States) 之操作流程係依照原廠操作指引。首先將 260 μl 檢體懸浮液加入 lysis buffer 均勻混合並反應 1 分鐘。之後吸取 120 μl 檢體/lysis buffer 混合液至快篩試劑樣本槽中反應 15 分鐘，再將試劑放入 Sofia Analyzer 分析器進行判讀，約 40 秒鐘後可得到檢驗結果。經儀器判讀後的每一筆檢驗結果均以紙本方式列印，其上可顯示 Flu A:(positive/negative)、Flu B:(positive/negative) 以及 Control (valid)。

結果

一、評估 Sofia FIA 流感快篩試劑所需臨床檢體選取

為評估 Sofia FIA 流感快篩試劑的檢測靈敏度 (sensitivity) 及特異性 (specificity)，本研究共選取 73 件通報流感併發症或其他流感，且於疾管署呼吸道病毒實驗室經 real-time RT-PCR 檢驗後之防疫檢體，重新以 Sofia 流感快篩試劑進行檢測，並比較兩種方法的檢驗結果。每件檢體皆為患者之咽喉拭子，並經實驗室前處理步驟 (詳材料與方法) 製成檢體懸浮液。為可同時評估快篩試劑於不同病毒量的檢測靈敏度，檢體選取時已依照 PCR 之檢驗結果，於 A 型流感 H1N1pdm09、A 型流感 H3N2 以及 B 型流感陽性檢體各選擇 22 件，另選擇 7 件流感檢測陰性檢體。此外，各流感陽性檢體選擇時亦同時參考其 real-time RT-PCR 之檢測 Cp (cycle of crossing point) 值，並於各 Cp 值區間隨機選擇檢體。該 73 件檢體的 real-time RT-PCR 檢驗結果以及其 Cp 值分布如表一所示。各患者年齡、性別分布整理如表二，其中患者男女比為 38:35，年齡分布主要集中於 60 歲以上，比例為 58.9%(43/73)。

表一、Sofia FIA 待測檢體之 real-time RT-PCR 檢驗結果及其 Cp 值分布

Cp value	Influenza A		Influenza B	Negative	Total
	H1N1pdm09	H3N2			
20-25	4	5	4	-	13
25-30	8	8	9	-	25
30-35	10	9	9	-	28
Negative	-	-	-	7	7
Total	22	22	22	7	73

表二、73 名採檢患者之年齡、性別分布

Age, years	No. (%) of subjects		
	M	F	Total
≤15	6	5	11
16-30	0	4	4
31-45	3	3	6
46-60	5	4	9
61-75	11	9	20
≥76	13	10	23
Total	38	35	73

二、Sofia FIA 快篩試劑與 real-time RT-PCR 檢測結果比較

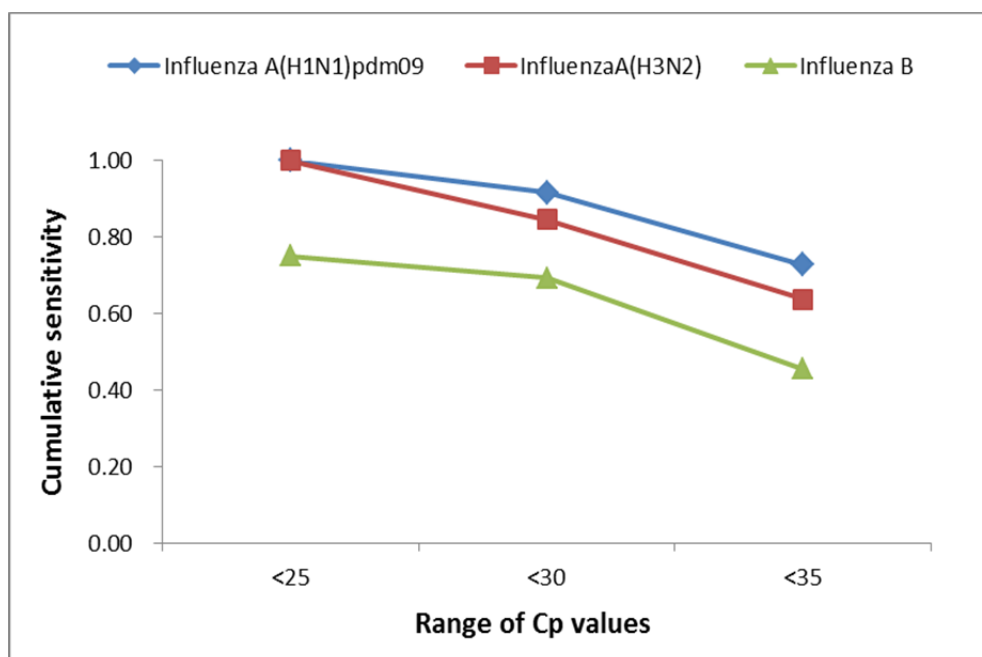
以 Sofia FIA 流感快篩試劑對 73 件檢體懸浮液之檢測結果如表三所示。與 real-time RT-PCR 方法相比，Sofia 快篩試劑對 A 型流感的整體檢測靈敏度為 68.2% (30/44)；對 B 型流感則為 45.5% (10/22)。進一步將 A 型流感分為 H1N1pdm09 以及 H3N2 亞型分析，則 Sofia 對 A/H1N1pdm09 病毒之檢測靈敏度為 72.7% (16/22)；對 A/H3N2 病毒則為 63.6% (14/22)。若依照各檢體 real-time RT-PCR 的 Cp 值分析，Sofia FIA 對三種病毒的檢測靈敏度均隨 Cp 值上升 (即病毒量下降)而降低，各 Cp 值區間之檢測靈敏度詳如表四。以累積靈敏度 (cumulative sensitivity)來看 (如圖一)，當檢體為 A 型流感陽性且 real-time RT-PCR 的 Cp 值小於 30 時，Sofia FIA 對該檢體之檢測靈敏度可達 85%以上 (對 H1N1pdm09 病毒為 92%；對 H3N2 病毒為 85%)；當檢體為 B 型流感陽性且 Cp 值小於 30 時，Sofia 對其檢測靈敏度則為 69%。以 28 件 real-time RT-PCR 檢測陽性且 Cp 值大於 30 的檢體評估 Sofia FIA 對 H1N1、H3N2、B 型流感病毒之陽性預測值(Positive predict value)分別為 5/10 (50%)；3/9(33.3%)以及 1/9(11.1%)。綜合上述結果顯示，Sofia FIA 快篩試劑對於 A 型流感的檢測能力較 B 型流感為高。在檢測特異性方面，Sofia FIA 對於 7 件流感陰性檢體的檢驗結果皆為陰性，此外對 66 件 A 型或 B 型流感 real-time RT-PCR 陽性檢體之檢測亦無交叉反應等偽陽性結果出現，顯示此快篩試劑對 73 件檢體的檢測特異性為 100%。

表三、Sofia FIA 對 73 件檢體懸浮液之檢測結果

Sofia FIA	Real-time RT-PCR				Total
	Influenza A		Influenza B	Negative	
	H1N1pdm09	H3N2			
Flu A	16	14	0	0	30
Flu B	0	0	10	0	10
Negative	6	8	12	7	33
Total	22	22	22	7	73

表四、Sofia FIA 對各 real-time RT-PCR Cp 值區間檢體之檢測靈敏度

Sofai FIA	Influenza viruses grouped by Cp values								
	H1N1pdm09			H3N2			Influenza B		
	20-25	25-30	30-35	20-25	25-30	30-35	20-25	25-30	30-35
Flu A	4	7	5	5	6	3	0	0	0
Flu B	0	0	0	0	0	0	3	6	1
N	0	1	5	0	2	6	1	3	8
Total	4	8	10	5	8	9	4	9	9
Sensitivity	1.00	0.88	0.50	1.00	0.75	0.33	0.75	0.67	0.11



圖一、Sofia FIA 對各 real-time RT-PCR Cp 值區間檢體之累積檢測靈敏度。

圖中分別顯示 Sofia FIA 針對 A 型流感 H1N1pdm09 (藍色)、H3N2 (紅色)以及 B 型流感 (淺綠色)病毒於各檢體 real-time RT-PCR Cp 值區間的累積靈敏度。

討論

流感快篩試劑於病毒檢測上的訴求主要是利用其操作便利性，使臨床醫師於診間、急診室或病房等非專業實驗室場所對患者進行診療時，可於檢體採集後 30 分鐘內迅速得知該病患是否感染流感病毒。雖然其檢測靈敏度與分子生物學檢測法相比仍低，但對於急性期的患者來說，由於檢體中的病毒量可能相對較高，以快篩試劑檢測陽性的機率可能同時增加，因此快篩試劑除可幫助臨床醫師對於急性期患者之早期診斷、即時且正確的使用抗病毒藥物，亦可同時減少細菌用抗生素不當的使用，避免其他抗藥性細菌衍生其他醫療問題 [3, 4]。此外，雖流感快篩試劑僅能顯示 A 型或 B 型流感陽性，對於 A 型流感陽性結果無法進一步細分亞型，但這對於醫師的用藥並無重大影響，因此一個具有相當程度以上檢測靈敏度的流感快篩試劑對於不具備專業實驗室之區域及地區醫院，或是小型診所等仍可提供流感診斷的實質助益。

根據本研究對於新上市快篩試劑 Sofia FIA 之評估結果顯示，其對於 A 型流感檢測靈敏度較 B 型為高，這個現象與先前的評估結果類似 [10]。在 A 型流感的檢測上，Sofia FIA 對於 H1N1pdm09 病毒的靈敏度稍高於 H3N2 病毒，整體來說，其對 Cp 值小於 30 之檢體具有 85% 以上檢測靈敏度，這個數據表示此種新式流感快篩試劑與傳統快篩試劑相比具有較佳的檢測能力 [5]；而以偵測螢光訊號代替傳統酵素免疫呈色之設計未來應可做為持續改善流感快篩試劑檢測能力的實證基礎。在操作上，

此種新式快篩試劑的結果係使用專屬儀器進行判讀，可避免傳統快篩試劑以人工肉眼判讀所產生的差異，所得結果也較易與其他實驗室互相比較。雖然如此，在66件 real-time RT-PCR 檢測陽性檢體中高達 42.4% (28/66)的 C_p 值大於 30，而 Sofia FIA 對 H1N1、H3N2、B 型流感病毒之陽性預測值(Positive predict value)僅 50% (5/10); 33.3% (3/9)以及 11.1% (1/9)，顯示流感快篩試劑對此類檢體的檢測能力仍顯薄弱。流感快篩試劑普遍被認為具良好專一性，惟本研究因經費限制，導致無法以 Sofia FIA 測試更多 real-time RT-PCR 檢測陰性檢體(僅測試 7 件陰性檢體)以評估其專一性，這是有所不足(limitation)之處。此外，本研究以 real-time RT-PCR 檢測臨床檢體時所採用的兩種核酸萃取方法(手工法以及機器自動萃取法)，經先前測試結果顯示，對於流感病毒的核酸萃取效力並無明顯差異，故可排除不同萃取方法對病毒檢出率產生 bias 的可能性，也不會影響以 real-time RT-PCR 比較 Sofai FIA 表現能力的結果。

疾管署研究檢驗中心對於流感通報檢體的常規檢驗並非使用流感快篩試劑，而以 real-time RT-PCR 搭配病毒培養進行，主因在於 PCR 目前仍為最具靈敏度以及特異性的檢測技術之一，且分子生物學方法可進一步區分 A 型流感之亞型，使疾管署可掌握各類流感病毒於我國流行情形。此外，病毒分離培養可使疾管署持續收集病毒株，並於取得病毒株後分析其抗原性、抗藥性以及演化情形等重要資訊，掌握各病毒流行株與當年疫苗株之吻和狀況。雖然如此，流感快篩試劑仍可有效協助疾管署防疫業務進行。舉例來說，2012 年 9 月一種新興病毒「中東呼吸症候群冠狀病毒(MERS-CoV)」首度於中東地區出現 [11]，並且陸續於沙烏地阿拉伯、約旦、卡達、英國、德國、法國等國造成人類感染病例，並造成多名死亡病例 [12]。由於 MERS-CoV 病毒屬於呼吸道相關病原體，於感染人類後主要可引起急性的嚴重呼吸系統疾病，症狀包括發燒、咳嗽、呼吸急促與呼吸困難等，與流感病毒感染症狀類似。因此在 MERS-CoV 疫情開始之初，疾管署為利於我國各機場及港口實施邊境檢疫，便利用流感快篩試劑，針對於各機場或港口所掌握具發燒症狀之旅客進行初步檢驗，以利於短時間內釐清該旅客是否為流感病毒感染，進而排除感染 MERS-CoV 的可能性。同樣的，對於各種新型流感病毒例如 H7N9 或 H5N1 之防疫業務來說，由於國內並無本土病毒株盛行，被此類病毒感染的患者幾乎都先於境外感染後回國，屬境外移入病例。因此，流感快篩試劑同樣可幫助邊境單位針對具特定旅遊史且出現類流感症狀之旅客進行初步檢查，以利於第一時間將快篩試劑檢驗陽性的患者隔離，防止新型流感趁隙入侵我國，並且降低後續因人群密切接觸而可能出現之人傳人傳播情形。鑒於 Sofia FIA 較傳統快篩試劑更具良好檢測敏感性，此種新上市試劑應可更有效協助疾管署於機場或港口等邊境檢疫業務。另根據研究人員自行調查結果，Sofia FIA 快篩試劑目前已於國內多家醫學中心以及區域醫院內使用，本評估結果將可提供這些醫療院所參考，這也是本研究選擇 Sofia FIA 為評估標的主因之一。最後需特別聲明，本研究僅以科學方法客觀評估本快篩試劑之檢測能力，所得結果並非為特定試劑推廣或背書。期望相關結果對於我國流感相關檢驗、治療、防疫等業務可有實質助益。

參考文獻

1. WHO. Influenza (Seasonal). Fact sheet N°211. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>. (accessed May, 25, 2014). 2014.
2. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med.* 2000;51:407-21.
3. Bonner AB, Monroe KW, Talley LI, et al. Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the pediatric emergency department: results of a randomized, prospective, controlled trial. *Pediatrics.* 2003 Aug;112(2):363-7.
4. Agoritsas K, Mack K, Bonsu BK, et al. Evaluation of the Quidel QuickVue test for detection of influenza A and B viruses in the pediatric emergency medicine setting by use of three specimen collection methods. *Journal of clinical microbiology.* 2006 Jul;44(7):2638-41.
5. Ruest A, Michaud S, Deslandes S, et al. Comparison of the Directigen flu A+B test, the QuickVue influenza test, and clinical case definition to viral culture and reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of influenza virus infection. *Journal of clinical microbiology.* 2003 Aug;41(8):3487-93.
6. Cazacu AC, Chung SE, Greer J, et al. Comparison of the directigen flu A+B membrane enzyme immunoassay with viral culture for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *Journal of clinical microbiology.* 2004 Aug;42(8):3707-10.
7. Yang JR, Lo J, Liu JL, et al. Rapid SYBR green I and modified probe real-time reverse transcription-PCR assays identify influenza H1N1 viruses and distinguish between pandemic and seasonal strains. *Journal of clinical microbiology.* 2009 Nov;47(11):3714-6.
8. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, et al. Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of the real-time RT-PCR assay. *Journal of clinical microbiology.* 2013 Oct 23.
9. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, et al. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2004 Mar;29(3):179-88.
10. Lee CK, Cho CH, Woo MK, et al. Evaluation of Sofia fluorescent immunoassay analyzer for influenza A/B virus. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2012 Nov;55(3):239-43.
11. Coleman CM, Frieman MB. Emergence of the middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS pathogens.* 2013 Sep;9(9):e1003595.
12. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) summary and literature update-as of 9 May 2014. http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_CoV_Update_09_May_2014.pdf?ua=1 (accessed May 30, 2014). 2014.