

2016 年流感快篩試劑 Alere i Influenza A & B 檢測效能評估

楊季融*、許書禎、郭權益、劉銘燦

摘要

流感病毒 (Influenza virus) 為全世界重要的呼吸道病原體，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。在每年的流感季，國內各級醫院及地區診所往往為診斷患者的第一線場所，適當的使用流感快篩試劑可做為臨床醫師診斷的輔助工具，有助於治療藥物的選擇。本研究以 112 件臨床檢體，針對市售利用分子生物學為檢測原理的 Alere i Influenza A & B 流感快篩試劑，評估其檢測率及特异性，並與世界衛生組織建議的即時螢光聚合酶鏈鎖反應 (real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR) 標準方法的檢驗結果比較。結果顯示，與 real-time RT-PCR 相比，Alere i 快篩試劑針對交叉點循環數值 (cycle of crossing point, Cp) 區間介於 28–35 的 A 型流感病毒陽性檢體，整體檢測率為 43.8%；對區間為 26–33 的 B 型流感陽性檢體則為 38.5%。細部分析顯示，Alere i 對 A 型流感病毒檢測表現較佳的 Cp 值區間為 28–29，檢測率為 88%，對 2009 年大流行 H1N1 病毒 (H1N1pdm09) 為 75%，對 H3N2 病毒為 100%；對 B 型流感病毒於 Cp 值 26–33 間的累計檢測率差異並不明顯，約為 38–44%。特异性評估結果為 100%，檢測流感陰性檢體並無偽陽性現象產生。綜合上述結果，Alere i Influenza A & B 快篩試劑對於 A 型流感的檢測能力較 B 型流感為高，其中又以針對 H3N2 亞型病毒的檢測具最佳表現。本研究結果將可提供實驗室參考，對於臨床醫師以及我國流感相關檢驗、治療、防疫等業務應有實質助益。

關鍵字：流感病毒、流感快篩試劑、Alere i Influenza A & B

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流行，每年約可造成 25–50 萬名受感染者死亡 [1]。流感病毒屬於正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae*)，為一種具套膜的 RNA 病毒，可分為 A、B、C 三型 [1]。A 型流感病毒可再依其表面的紅血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 與神經胺酶 (neuraminidase, NA) 蛋白，細分為多種亞型 (subtype)；目前已定義 18 種 HA (H1–H18) 以及 11 種 NA (N1–N11) 蛋白 [2]。B 型流感病毒則依其 HA 蛋白的抗原性

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心
通訊作者：楊季融*
E-mail: ggyang@cdc.gov.tw

投稿日期：2017 年 01 月 03 日
接受日期：2017 年 05 月 01 日
DOI: 10.6524/EB.20170905.33(17).002

分成兩個血統株(lineage)，包括維多利亞株(Victoria lineage)與山形株(Yamagata lineage)。現今引起人類感染的季節性流感病毒以兩種 A 型(H1N1 與 H3N2 亞型)與兩種 B 型(維多利亞株與山形株)為主 [3]，惟其他亞型的 A 型流感病毒包括 H5、H6、H7、H9、H10 等仍曾引起人類偶發感染 [4-9]。

早期診斷流感病毒感染症在臨床上扮演重要角色。即時且正確的診斷往往可幫助臨床醫師盡早使用抗病毒藥物，使其有效降低感染者體內病毒量，避免引起更為嚴重的併發症 [10]。目前常用的流感病毒實驗室檢測法大致分為兩大類，其一為傳統病毒學技術，即在試管內以病毒感染宿主細胞後，再搭配不同方法進行後續病毒鑑定。例如以各流感病毒型別或亞型的專一性抗體，針對受感染的細胞進行免疫螢光染色，再以螢光訊號作為鑑定結果的研判依據。其二則以分子生物學技術檢測病毒基因體，例如最被廣為應用的聚合酶鏈鎖反應法(polymerase chain reaction, PCR)，即利用具有專一性的引子對(primer pair)，使 DNA 聚合酶 (DNA polymerase)在特定溫度條件增殖病毒的目標基因，經後續偵測做為結果研判依據。這兩類方法各有優缺點，病毒培養的優點為成本低，且可取得病毒株做為後續分析的材料，惟其較為耗時，取得檢驗結果約需 7-10 天，亦需有經驗的專業人員操作與判讀結果，對於較為緊急的檢體檢驗較不適用。分子生物法的檢驗成本較高，對於小型的臨床實驗室可能負擔較大，惟其檢測速度快，且靈敏度高，目前幾乎已成為病毒檢驗的黃金標準(golden standard)。

上述兩類流感病毒檢驗法均須在實驗室進行，因此在小型診所、急診室或病房看診的臨床醫師，無法在檢體採集後短時間內得到結果，導致診斷不連貫。因此，具床邊檢驗(point-of-care testing) 特性的流感快篩試劑(rapid influenza antigen test)，已成為可在實驗室外快速檢測病毒的有效方法[10,11]。此方法的優點在於不需特殊儀器即可進行病毒檢驗，且操作步驟簡單，在短時間(約15-20分鐘)內即可得到結果。目前已上市的流感快篩試劑多以抗原抗體反應為原理，利用針對病毒核蛋白(nucleoprotein, NP)的專一性抗體，與待測檢體中流感病毒核蛋白結合，最後再以膠體金(colloidal gold)呈色法偵測抗原抗體聚合物。選擇病毒核蛋白作為偵測目標的，主因為其序列在流感病毒間具高度保守性，對A型流感病毒來說，檢測對象可擴及多種病毒亞型；B型流感病毒則可包含兩種血統株。但也因如此，多數流感快篩試劑僅能進行病毒的型別鑑定，無法進一步分析病毒亞型。近年來，以改良式抗原抗體檢測法為原理的流感快篩試劑已上市，這類產品將傳統快篩試劑所用的單株抗體，由原本以膠體金標示改由標定螢光物質，並搭配小型螢光測讀儀，偵測抗原抗體聚合物所累積的螢光訊號。此種新式快篩試劑的優點在於以機器取代肉眼判讀結果，預期可提升檢測靈敏度[12]。根據先前的文獻報導，這些以抗原抗體反應為原理的流感快篩試劑具良好專一性，約達95%以上 [13,14]，然而，他們的檢測靈敏度仍較傳統病毒培養或分子生物檢測法低，容易出現偽陰性結果 [13,14]。

為了持續提高流感快篩試劑的檢測靈敏度，近期以分子生物學為原理的新式快篩試劑已在市面販售，本研究擬針對一種被美國食品藥物管理署認可的「Alere i Influenza A & B」進行評估 [15]，探討此類試劑的檢測表現。該試劑以類似即時聚合酶鏈鎖反應(real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR)的定溫核酸增幅(isothermal nucleic acid amplification)方式進行病毒核酸放大與偵測；偵測標的為病毒的聚合酶基因(polymerase basic protein 2 gene, PB2 gene) [16]，並將病毒偵測所需的核酸萃取與增殖等步驟整合，於15分鐘內得到結果。評估時，本研究以回溯性方式選取112件臨床檢體為材料，以Alere i Influenza A & B進行偵測，並將所得結果與世界衛生組織 (WHO)公布的流感病毒real-time RT-PCR標準檢驗方法比較，探討其檢測率與專一性。相關結果將可提供實驗室參考，對於臨床醫師以及我國流感相關檢驗、治療、防疫等業務應有實質助益。

材料與方法

一、臨床檢體選取

為評估 Alere i Influenza A & B 流感快篩試劑的檢測率(detection rate)及特异性(specificity)，本研究直接利用疾病管制署（以下簡稱疾管署）現有且經良好保存的防疫檢體為對象，以回溯性方式選取採集於 2015 年 1 月 1 日至 2016 年 2 月 28 日間，經該署檢驗中心呼吸道病毒實驗室以 real-time RT-PCR 標準方法檢驗確認流感陽性或陰性，通報流感併發重症（79 件）或群聚（33 件）的 112 件防疫檢體，重新以 Alere i 快篩試劑進行檢測，並比較兩種方法的檢驗結果。這些檢體先前均由 rayon transportation swab (Copan)採集患者咽喉，於低溫（4°C）環境下運送至實驗室。檢體送抵後，均先加入 1 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培養液(ThermoFisher Scientific)，與棉棒劇烈混合，製備檢體懸浮液，並適當保存於-80°C 冰箱。為全面評估此快篩試劑於不同病毒量的檢測能力，檢體選取時依照其經由 real-time RT-PCR 檢測後的交叉點循環數值(cycle of crossing point, Cp)，於各特定 Cp 值區間隨機選擇。此外，參考先前針對多種傳統快篩試劑的評估結果[17]，本研究選擇 A 型流感 H1N1pdm09 與 H3N2 亞型陽性檢體的 Cp 值區間為 28–35；B 型流感為 26–33。該 112 件檢體的 real-time RT-PCR 檢驗結果以及 Cp 值分布如表一。A 型流感 H1N1pdm09、H3N2 以及 B 型流感陽性檢體分別選擇 32、32 與 39 件，另選擇 9 件流感檢測陰性檢體評估專一性。

表一、Alere i Influenza A & B 流感快篩試劑待測檢體的 real-time RT-PCR 檢驗結果及 Cp 值分布

Cp value	Influenza A		Influenza B	Negative	Total
	H1N1pdm09	H3N2			
26–27	-	-	9	-	9
28–29	8	8	12	-	28
30–31	8	8	10	-	26
32–33	8	8	8	-	24
34–35	8	8	-	-	16
Negative	-	-	-	9	9
Total	32	32	39	9	112

二、檢體核酸萃取

流感病毒 real-time RT-PCR 檢測所需核酸萃取使用自動化系統 TANBead OptiPure Viral Auto Tube (Taiwan Advanced Nanotech)或 MagNa Pure Compact (Roche)進行。操作均依各試劑的原廠建議流程，前者取 300 μ l，後者取 200 μ l 的檢體懸浮液至萃取試劑中，萃取後的 RNA 體積分別約為 70 μ l 與 100 μ l；剩餘 RNA 將置於-20°C 冰箱中保存。

三、流感病毒 real-time RT-PCR 檢驗

Real-time RT-PCR 檢驗係以 Roche LightCycler 480 儀器進行。反應使用的專一性引子與探針(Taqman probe)序列乃依據 WHO 資料，並經疾管署改良 [18,19]，檢測標的包括：(1) A 型流感病毒 M (Matrix)基因，所有 A 型流感病毒均可偵測、(2) B 型流感病毒 M 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分析病毒亞型：(3) H1N1pdm09 病毒 HA 基因，可鑑定 H1N1pdm09 病毒、(4) H3N2 病毒 HA 基因，可鑑定 H3N2 病毒。檢測試劑使用 LightCycler Multiplex RNA Virus Master (Roche)，配方依照原廠建議並作些許調整。內容物包括：DEPC 純水 10.4 μ l、各專一性引子 1.0 μ l、探針 0.5 μ l、RT-qPCR Reaction Mix 2.0 μ l、RT-Enzyme Solution 0.1 μ l 以及病毒 RNA 模板 5 μ l。反應條件為 50°C 10 分鐘，95°C 30 秒。再以 95°C 15 秒、53°C 30 秒、60°C 3 秒重複進行 45 個循環，反應結束後由電腦訊號進行結果判讀。

四、Alere i Influenza A & B 流感快篩試劑檢驗

Alere i Influenza A & B 快篩試劑的操作係依照原廠指引進行。測試時以 200 μ l 咽喉拭子懸浮液為檢體，加入反應試劑槽，約 15 分鐘可得到檢驗結果。經儀器判讀後的檢驗結果顯示為 Flu A：(positive/negative)與 Flu B：(positive/negative)；若某欄位出現 Invalid，表示核酸萃取或增幅過程可能出現問題，該結果不予採信，需重新反應。依據各檢體的檢測結果，計算 Alere i 對於各型／亞型病毒的檢測率 (real-time RT-PCR 陽性的待測檢體中，快篩檢測結果為陽性的比率)、累計檢測率 (不同 Cp 值區間的 real-time RT-PCR 陽性待測檢體中，快篩檢測結果為陽性的累積比率)、檢測特異性 (real-time RT-PCR 檢測陰性的待測檢體中，快篩檢測結果亦為陰性的比率)。

五、資料分析

本研究比較 Alere i 針對各病毒於不同 Cp 值區間的檢測率時，係以 Chi square 檢定進行統計分析。當 p 值小於 0.05 時視為具統計顯著意義，表示兩區間的檢測率差異明顯。

結果

以 Alere i Influenza A & B 流感快篩試劑對 112 件咽喉拭子檢體懸浮液進行檢測結果 (表二)，與 real-time RT-PCR 方法相比，Alere i 快篩試劑對於 Cp 值區間介於 28–35 的 A 型流感陽性檢體整體檢測率為 43.8% (28/64)；對區間為 26–33 的

B 型流感陽性檢體則為 38.5% (15/39)。進一步將上述檢體中的 A 型流感病毒細分為 H1N1pdm09 以及 H3N2 亞型，則 Alere i 對 H1N1pdm09 病毒的檢測率為 34.4% (11/32)；對 H3N2 病毒則為 53.1% (17/32)。若依照各檢體 real-time RT-PCR 的 Cp 值分析，Alere i 對三種病毒的檢測率均隨 Cp 值上升（即病毒量下降）而降低。統計分析顯示，Alere i 對 Cp 值 28–29 與 30–35 的 A 型流感病毒，無論是 H1N1pdm09 或 H3N2 亞型，檢測率呈現明顯差異 ($p < 0.05$ ，表三 A)；對 B 型流感的檢測率差異則不明顯 ($p = 0.67$ ，表三 B)。Alere i 對 A 型流感病毒檢測表現較佳的 Cp 值區間為 28–29（圖一上），檢測率為 88%（對 H1N1pdm09 病毒為 75%；對 H3N2 病毒為 100%）；對 B 型流感病毒於 Cp 值 26–33 間的累計檢測率差異並不明顯，約為 38%–44%（圖一下）。綜合上述結果顯示，Alere i Influenza A & B 流感快篩試劑對於 A 型流感的檢測表現較 B 型流感佳。在檢測特異性方面，Alere i 對於 9 件流感陰性檢體的檢驗結果皆為陰性，此外對 103 件 A 型或 B 型流感陽性檢體的檢測亦無交叉反應等偽陽性結果，顯示此快篩試劑對研究檢體的檢測特異性為 100%。

表二、Alere i Influenza A & B 對 112 件檢體檢測結果

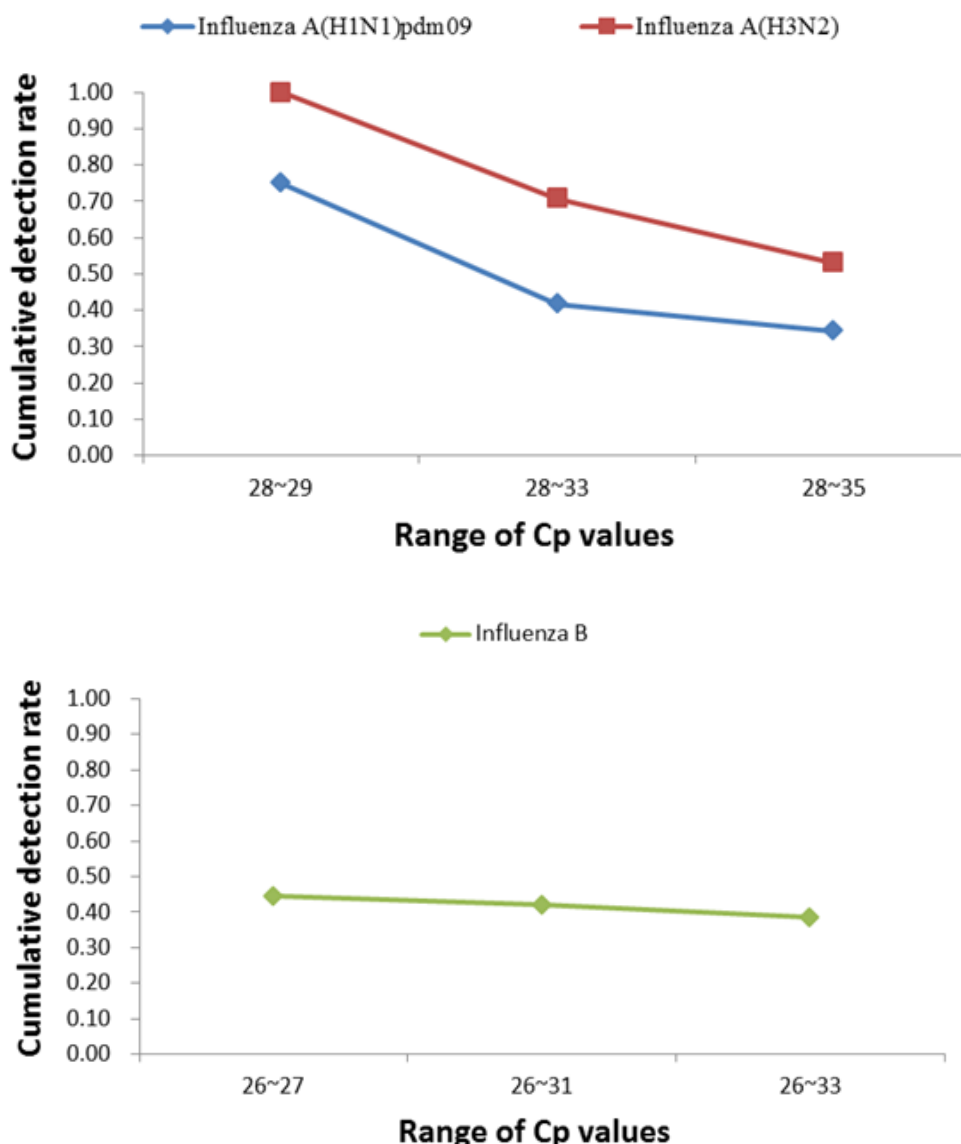
Alere i	Real-time RT-PCR				Total
	Influenza A		Influenza B	Negative	
	H1N1pdm09	H3N2			
Flu A	11	17	0	0	28
Flu B	0	0	15	0	15
Negative	21	15	24	9	69
Total	32	32	39	9	112

表三 A、Alere i Influenza A & B 對各 real-time RT-PCR Cp 值區間檢體的檢測率

Alere i Influenza A	Influenza viruses grouped by Cp values			
	A(H1N1)pdm09		A(H3N2)	
	28–29	30–35	28–29	30–35
Flu A	6	5	8	9
Flu B	0	0	0	0
Negative	2	19	0	15
Total	8	24	8	24
Detection rate (%)	75	21	100	38
<i>p</i> value	$p < 0.05$		$p < 0.05$	

表三 B、Alere i Influenza A & B 對各 real-time RT-PCR Cp 值區間檢體的檢測率

Alere i Influenza B	Influenza viruses grouped by Cp values	
	Influenza B	
	26–27	28–33
Flu A	0	0
Flu B	4	11
Negative	5	19
Total	9	30
Detection rate (%)	44	37
<i>p</i> value	$p = 0.67$	



圖一、Alere i Influenza A & B 對各 real-time RT-PCR Cp 值區間檢體的累計檢測率。上圖分別顯示 Alere i 針對 A 型流感 H1N1pdm09 亞型(藍色)以及 H3N2 亞型(紅色)病毒陽性檢體於各 real-time RT-PCR Cp 值區間(28-29、28-33 以及 28-35)的累計檢測率。下圖顯示 Alere i 針對 B 型流感(淺綠色)病毒陽性檢體於各 real-time RT-PCR Cp 值區間(26-27、26-31 以及 26-33)的累計檢測率。

討論

流感快篩試劑在病毒檢測的訴求是利用其操作便利性，使臨床醫師可於病患檢體採集後迅速得結果。雖其檢測靈敏度與實驗室檢測法相比仍低，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，以快篩試劑檢出陽性的機率同時增加，因此快篩試劑除可幫助醫師對於患者的早期診斷，亦可因正確用藥而減少抗生素的不當使用，衍生其他醫療問題[10,11]。此外，雖然流感快篩試劑僅能鑑定病毒型別，但此結果已足夠作為臨床醫師治療選擇的依據。基於這些考量，以流感快篩試劑進行病毒檢測，在臨床上仍相當普遍。

根據本研究對於 Alere i 快篩試劑的評估結果顯示，對於 A 型流感病毒的檢測表現較 B 型為佳，整體檢測率分別為 43.8% 與 38.5%；A 型流感中又以針對 H3N2 亞型病毒的檢測具最佳表現，此數據與先前針對同一試劑評估的研究相比為低 [15,20]。對 A 型流感病毒來說，可能原因之一為本研究所挑選的陽性臨床檢體 Cp 值區間為 28–35，相對於其他研究的 Cp 值 15–30，病毒含量較少。此外，檢體 Cp 值 28–29 的病毒含量約為先前針對傳統抗原抗體型流感快篩試劑評估後的檢測極限 [17]。因此，分子生物學的檢測原理已提升 Alere i 的檢測能力。對於 B 型流感病毒來說，根據試劑原廠提供的資料顯示，Alere i 對於 B 型流感病毒維多利亞株的檢測表現較山形株佳，前者檢測陽性的基因含量區間約為 2.55×10^2 – 1.13×10^3 Genome Equivalent/Swab；後者則為 1.13×10^3 – 2.00×10^4 genome equivalent/swab。由於本次所選的 B 型流感陽性檢體大多採集於 2015 年，且當年度我國的 B 型流感病毒以山形株為主流，故不同病毒血統株對檢測率的影響有待後續釐清。此外，由於本研究設計以回溯性方式比較 Alere i Influenza A & B 流感快篩試劑與 real-time RT-PCR 的檢驗結果，在臨床咽喉拭子檢體只有一套的情形下，無法直接以待測檢體置入快篩試劑的裂解液 (lysis buffer)，而需先以 DMEM 培養液製備檢體懸浮液再進行測試。由於 Alere i 原廠指引並無特別載明使用 DMEM 作為輸送培養基 (transport medium) 的適用性，為初步釐清此疑義，在以大量臨床檢體測試前，曾先以 5 株病毒懸浮液 (2 株 H1N1pdm09、1 株 H3N2 與 2 株 FluB) 評估 DMEM 對 Alere i 的可能影響。相較於懸浮在磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS) 的病毒檢測結果，以 DMEM 培養液製成的 A 型流感 H1N1pdm09 與 B 型流感病毒懸浮液，在病毒量相似的情形下可能有出現偽陰性檢測結果的疑慮 (表四；DMEM 組 v.s. PBS 組)。雖然此現象並不絕對，且因測試樣本數太少，無法獲致確切的結論。但待測檢體中 DMEM 對於 Alere i Influenza A & B 快篩試劑檢測率的可能影響仍需考慮。本研究以 real-time RT-PCR 檢測臨床檢體時所採用的兩種自動化核酸萃取方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產生的誤差，也不會影響以 real-time RT-PCR 比較 Alere i Influenza A & B 表現能力的結果。另因檢體來源受限，本研究所使用的檢體多數為採集自通報流感併發重症的患者，可能無法確實代表採集於診間輕症患者的檢體族群，此為本研究的限制。流感快篩試劑普遍被認為具良好專一性，本研究因經費限制，無法測試更多流感陰性檢體 (僅測試 9 件)，專一性的評估規模略顯不足。

本研究結果雖證實分子生物學的應用已可提高流感快篩試劑的檢測能力，但在檢體病毒含量低時，此方法仍無法避免偽陰性 (false negative) 的結果。因此，在必要情形下，針對流感 (包含新型 A 型流感) 疑似患者，雖快篩試劑檢測為陰性，仍需額外採集檢體送往專業實驗室進行檢驗。此外，為達縮短檢驗時間的目的，Alere i 檢測病毒時所需的核酸萃取僅能以簡便方法進行，其品質與穩定性仍有突破空間，未來針對更新一代試劑的研發，應持續精進此關鍵步驟，期能再次增加流感快篩試劑於診間的檢測表現。

表四、Alere i Influenza A & B 對懸浮於不同輸送培養基 A(H1N1)pdm09、A(H3N2)及 B 型流感病毒的檢測結果

Influenza A(H1N1)pdm09									
Group	Virus in DMEM medium					Virus in PBS			
Tested virus	A/TW/84498/2015		A/TW/96851/2015			A/TW/84498/2015		A/TW/96851/2015	
Cp value	28.62	31.65	29.32	31.65	34.75	28.71	31.86	32.92	35.13
Alere i	-	-	+	+	-	+	-	+	-

Influenza A(H3N2)						
Group	Virus in DMEM medium				Virus in PBS	
Tested virus	A/TW/82486/2014					
Cp value	28.58	31.48	34.65	28.87	31.83	34.74
Alere i	+	+	+	+	+	+

Influenza B							
Group	Virus in DMEM medium				Virus in PBS		
Tested virus	A/TW/96752/2015		A/TW/96671/2015		A/TW/96752/2015		A/TW/96671/2015
Cp value	28.7	31.5	29.56	31.88	28.61	32.23	32.27
Alere i	-	-	+	+	+	-	+

流感快篩試劑為臨床醫師診斷疑似病例時的有效輔助工具。本研究針對市售利用分子生物學為檢測原理的 Alere i Influenza A & B 快篩試劑評估結果顯示，其對 A 型流感病毒的檢測表現較 B 型流感佳，尤以 H3N2 亞型最優；特異性表現良好，均無交叉反應等偽陽性結果產生。與先前研究結果相比，分子生物學原理已提升 Alere i 對於流感病毒的檢測能力。期望相關結果對於臨床醫師以及我國流感相關檢驗、治療、防疫等業務可有實質助益。

免責暨利益衝突聲明

本研究僅以科學方法客觀評估 Alere i 快篩試劑的表現，所得結果並非為特定試劑推廣或背書。

本研究之所有共同作者聲明，此研究未接受任何機構之補助，亦未因執行此研究，而接受任何機構或廠商提供之資金或利益。

參考文獻

1. WHO. Influenza (Seasonal). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
2. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; 79: 2814–22.
3. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med* 2000; 51: 407–21.

4. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998; 351: 472–7.
5. Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. *N Engl J Med* 2013; 368(20): 1888–97.
6. Wei SH, Yang JR, Wu HS, et al. Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 771–8.
7. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999; 354: 916–7.
8. Chen H, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet* 2014; 383: 714–21.
9. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009; 459: 931–9.
10. 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; 112: 363–7.
11. 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. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2638–41.
12. Lewandowski K, Tamerius J, Menegus M, et al. Detection of influenza A and B viruses with the Sofia analyzer: a novel, rapid immunofluorescence-based in vitro diagnostic device. *Am J Clin Pathol* 2013; 139: 684–9.
13. 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. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3487–93.
14. 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. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3707–10.
15. Chapin KC, Flores-Cortez EJ. Performance of the molecular Alere I influenza A&B test compared to that of the xpert flu A/B assay. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 706–9.
16. Nolte FS, Gauld L, Barrett SB. Direct Comparison of Alere i and cobas Liat Influenza A and B Tests for Rapid Detection of Influenza Virus Infection. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 2763–6.

17. Yang JR, Lo J, Ho YL, et al. Pandemic H1N1 and seasonal H3N2 influenza infection in the human population show different distributions of viral loads, which substantially affect the performance of rapid influenza tests. *Virus Res* 2011; 155: 163–7.
18. 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. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 76–82.
19. 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. *J Clin Virol* 2004; 29: 179–88.
20. Nie S, Roth RB, Stiles J, et al. Evaluation of Alere i Influenza A&B for rapid detection of influenza viruses A and B. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3339–44.