

Evaluation of the Efficacies of Rapid Antigen Test, Multiplex PCR, and Real-time PCR for the Detection of a Novel Influenza A (H1N1) Virus

Yusun Hwang, M.D., Kyounghee Kim, M.T., and Miae Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Background : In April 2009, a novel influenza A (H1N1) virus was detected in the US, and at the time of conducting this study, H1N1 infection had reached pandemic proportions. In Korea, rapid antigen tests and PCR assays have been developed to detect the H1N1 virus. We evaluated the efficacies of rapid antigen test, multiplex PCR, and real-time PCR for detecting the H1N1 virus.

Methods : From August to September 2009, we tested 734 samples obtained from nasopharyngeal swab or nasal swab using rapid antigen test (SD Influenza Antigen, Standard Diagnostics, Inc., Korea) and multiplex PCR (Seeplex FluA ACE Subtyping, Seegene, Korea). We also tested 224 samples using the AdvanSure real-time PCR (LG Life Sciences, Korea) to compare the results obtained using real-time PCR with those obtained using multiplex PCR. Furthermore, 99 samples were tested using the AdvanSure real-time PCR and the AccuPower real-time PCR (Bioneer, Korea).

Results : In comparison with the results of multiplex PCR, the sensitivity and specificity of the rapid antigen test were 48.0% and 99.8%, respectively. The concordance rate for multiplex PCR and the AdvanSure real-time PCR was 99.6% ($\kappa=0.991$, $P=0.000$), and that for the AdvanSure real-time PCR and the AccuPower real-time PCR was 97.0% ($\kappa=0.936$, $P=0.000$).

Conclusions : The rapid antigen test is significantly less sensitive than PCR assay; therefore, it is not useful for H1N1 detection; however multiplex PCR, the AdvanSure real-time PCR, and the AccuPower real-time PCR can be useful for H1N1 detection. (*Korean J Lab Med* 2010;30:147-52)

Key Words : Novel influenza A (H1N1) virus, Rapid antigen test, Multiplex PCR, Real-time PCR

서 론

인플루엔자 A (H1N1) 바이러스는 1918년부터 1957년 사이에 유행하였고 1977년에 재출현하여 현재까지 계절성 독감으로 유행하고 있다. 2009년 4월 미국에 출현한 돼지에서 유래한 신종 인플루엔자 A (H1N1) (swine-origin influenza A [H1N1] virus)는 지속적으로 사람 간에 전파되어 10만 명 이상의 확진 환자가 발생하였고, 세계보건기구(WHO)는 인플루엔자 대유행 경고를 6단계(2개 이상의 WHO 지역의 최소 1개국 이상에서 지속적인

지역사회에서의 유행이 있는 단계)로 발표하였다[1]. 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 의한 감염의 정도는 중등도이지만, 첫 환자 발생 이후 6주 만에 전 세계로 전파되었고 인플루엔자 유행 계절인 겨울로 접어든 남반구 국가들에서 환자가 급증하는 등 감염력이 매우 크기 때문에, 인플루엔자의 증상을 보이거나 감염의 위험에 노출되었던 환자는 신속히 진단하여 격리하는 것이 감염의 확산을 막는 방법으로 생각된다[2, 3]. 인플루엔자 A를 검출하기 위한 검사로 신속항원검사(rapid antigen test)들이 개발되어 임상에서 사용되고 있고, 미국 질병통제센터(Centers for Disease Control, CDC)에서 신종 인플루엔자 A (H1N1) 검출을 위한 중합효소연쇄반응 검사 방법을 발표한 후 검사실에서 중합효소연쇄반응 검사를 이용해 확진할 수 있게 되었다[4, 5]. 저자들은 국내에서 인플루엔자 진단을 위한 신속항원검사와 함께 신종 인플루엔자 A (H1N1)를 진단할 수 있는 다중 중합효소연쇄반응 검사와 실시간 중합효소연쇄반응 검사가 개발되어 이에 대한 평가를 시행하고자 하였다.

Received : November 19, 2009

Manuscript No : KJLM09-130

Revision received : February 12, 2010

Accepted : February 18, 2010

Corresponding author : Miae Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Mokdong Hospital, School of Medicine, Ewha Womans University, 911-1 Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul 158-710, Korea
Tel : +82-2-2650-5222, Fax : +82-2-2650-5222
E-mail : miae@ewha.ac.kr

*본 연구는 일부 LG 생명과학의 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

대상 및 방법

1. 대상

2009년 8월부터 9월까지 본원에서 신종 인플루엔자 A (H1N1) 감염이 의심되어 코인두 면봉(swab)이나 비강 면봉으로 채취된 검체를 대상으로 하였다.

인플루엔자 증상을 보이는 환자에서 코인두 면봉 검체는 Flo-cked swab (Copan, Copan Diagnostics, Corona, CA, USA)을 이용하였고 비강 검체는 멸균된 면봉으로 채취하였으며, 바이러스 수송용 배지로 Hank's buffered salt solution (HBSS)을 사용하였다.

734검체를 대상으로 신속항원검사와 다중 중합효소연쇄반응 검사를 시행하였고, 다중 중합효소연쇄반응 검사를 기준으로 하여 신속항원검사의 민감도와 특이도를 산출하였다. 다중 중합효소연쇄반응 검사가 의뢰된 검체 중에서 224검체는 다중 중합효소연쇄반응 검사와 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사(LG Life Sciences, Seoul, Korea)를 동시에 시행하여 두 검사간의 일치도를 평가하였다. 224검체 중 99검체는 다중 중합효소연쇄반응과 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사 이외에 AccuPower 실시간 중합효소연쇄반응 검사(Bioneer, Daejeon, Korea)도 시행하여 두 가지 실시간 중합효소연쇄반응 검사 사이의 일치도를 평가하였다.

2. 방법

1) 신속항원검사

신속항원검사는 SD Influenza Antigen 키트(Standard Diagnostics, Inc., Yongin, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 검사를 시행하였다. 이 키트는 대조물질, 인플루엔자 A에 대한 항체 및 인플루엔자 B에 대한 항체를 스트립에 흡착시킨 후 검체와 반응시키는 면역크로마토그래피 원리를 이용하는 검사였다.

2) RNA 분리

수송 배지에 운송된 검체를 Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction 키트(iNtRON Biotechnology, Inc., Seongnam, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 RNA를 분리하였다.

3) 다중 중합효소연쇄반응 검사

다중 중합효소연쇄반응 검사는 Seeplex FluA ACE Subtyping 키트(Seegene, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 검사를 시행한 후 전기 영동에서 밴드를 판독하였다. 이 키트는 내부 대조, influenza A virus의 기질 단백질 M유전자, Human influenza A virus subtype H3, Human influenza A virus subtype H1, Avian influenza A virus subtype H5 및 Swine influenza A virus subtype H1의 특이 적혈구 응집소 유전자에 대한 시발체가 포함되어 인플루엔자의 아형에 대한 감별진단이 가능하였다.

4) AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사

AdvanSure Influenza A/Influenza A H1N1 키트(LG Life Sciences)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 실시간 중합효소연쇄반응 검사를 시행하였다. 이 키트는 CDC에서 제안한 검사 방법[4]에 기초하여 인플루엔자 A의 기질 단백질에 대한 M 유전자, 신종 인플루엔자 A의 특이 적혈구응집소 유전자 및 내부 대조로 Rnase P 시발체를 이용하여 신종 인플루엔자 A (H1N1)를 검출하였다.

5) AccuPower 실시간 중합효소연쇄반응 검사

AccuPower New Influenza A (H1N1) Real-Time RT-PCR 키트(Bioneer)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 검사를 시행하였다. 이 키트는 CDC에서 제안한 검사 방법[4]에 기초하여 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 특이적인 혈구응집소 유전자, 인플루엔자 A에 대해 특이 기질 단백질 M 유전자 그리고 내부 대조를 이용하여 신종인플루엔자 A (H1N1)를 검출하였다.

6) 염기서열분석

각 중합효소연쇄반응 검사 방법 간 결과가 일치하지 않은 검체는 클로닝 후 염기서열을 분석하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 실시하여 신종 인플루엔자 A (H1N1)를 확인하였다[6].

7) 통계 분석

통계 분석은 SPSS (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 시행하였다. 중합효소연쇄반응 검사법 사이의 일치율 평가는 kappa 통계량을 이용하였고 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 신속항원검사와 다중 중합효소연쇄반응 검사의 비교

734검체 중에서 신속항원검사의 양성과 음성은 각각 50검체, 684검체였으며, 다중 중합효소연쇄반응 검사의 양성과 음성은 각각 102검체, 632검체였다. 다중 중합효소연쇄반응을 기준으로 하여 산출한 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 대한 신속항원검사의 민감도는 48.0% (49/102), 특이도는 99.8% (631/632)였다. 다중 중합효소연쇄반응 검사에서 신종 인플루엔자 A (H1N1)가 검출되지는 않았으나 계절 인플루엔자 A H3형 6검체와 H1형 1검체가 검출되었고, 그 중 계절 인플루엔자 A H3형 1검체만 신속항원검사에서 검출되고 나머지 6검체는 신속항원검사에서 음성으로 나타났다(Table 1).

2. 다중 중합효소연쇄반응 검사와 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사의 비교

224검체 중 105검체는 다중 중합효소연쇄반응 검사와 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사 모두에서 양성이고 118검체는 모두에서 음성으로 두 검사 사이에 99.6% ($\kappa=0.991$, $P=0.000$)의 일치치를 보였다. 불일치를 보인 1검체를 염기서열분석한 결과 신종 인플루엔자 A (H1N1)로 확인되었다(Table 2).

3. AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사와 AccuPower 실시간 중합효소연쇄반응 검사의 비교

다중 중합효소연쇄반응 검사와 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사를 비교하였던 224검체 중 99검체를 두 가지 실시간 중합효소연쇄반응 검사 사이에 비교해본 결과 두 검사에

Table 1. Comparison of the efficacies of the rapid antigen test and multiplex PCR for detecting the novel influenza A (H1N1) virus

		Multiplex PCR		Total
		+	-	
Rapid antigen test	+	49	1*	50
	-	53	631 [†]	684
Total		102	632	734

*One case showing a positive result in rapid antigen test was negative for novel influenza A (H1N1), but positive for seasonal influenza A (H3) in multiplex PCR; [†]including 5 cases of seasonal influenza A (H3) and 1 case of seasonal influenza A (H1) detected using multiplex PCR.

서 모두 양성인 검체가 59, 음성인 검체가 37로 나타나서 97.0% ($\kappa=0.936$, $P=0.000$)의 일치치를 보였으며, 3검체는 불일치를 보였다. 불일치를 보인 3검체 중 1검체는 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사만 양성이고 2검체는 AccuPower 실시간 중합효소연쇄반응 검사만 양성이었는데, 염기서열분석을 실시한 결과 모두 신종 인플루엔자 A (H1N1)로 확인되었다(Table 3).

고 찰

인플루엔자를 진단할 수 있는 신속항원검사는 간단하고 빠르게 결과를 얻을 수 있으나 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 대한 민감도가 10–69%로 다양하게 보고되고 있다[7–9]. 시약에 따른 민감도를 보면 BinaxNOW Influenza A&B (Binax, Inc., Scarborough, ME, USA)는 38.3–40%, Becton Dickinson Directigen EZ Flu A+B (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)는 46.7–49%, Quidel QuickVue Influenza A+B (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA)는 53.3–69%였다[7, 8]. Ginocchio 등[9]에 의하면 바이러스 배양검사와 비교한 신속항원검사의 민감도는 BinaxNOW Influenza A&B가 9.6%, 3M Rapid Detection Flu A+B (3M Medical Diagnostics, St. Paul, MN, USA)가 40.0%였다. 본 연구에서 다중 중합효소연쇄반응 검사에 대한 신속항원검사의 민감도는 48%로 Directigen EZ Flu A+B와 비슷하였다.

Table 2. Comparison of the efficacies of multiplex PCR and AdvanSure real-time PCR for detecting the novel influenza A (H1N1) virus

		Multiplex PCR		Total
		+	-	
AdvanSure real-time PCR	+	105	1*	106
	-	0	118	118
Total		105	119	224

*Novel influenza A (H1N1) was confirmed by sequencing.

Table 3. Comparison of the efficacies of AdvanSure real-time PCR and AccuPower real-time PCR for detecting the novel influenza A (H1N1) virus

		AdvanSure real-time PCR		Total
		+	-	
AccuPower real-time PCR	+	59	2*	61
	-	1*	37	38
Total		60	39	99

*Sequencing revealed 3 cases of novel influenza A (H1N1).

대부분의 신속항원검사는 인플루엔자 A에 양성인 경우 신종 인플루엔자 A (H1N1)와 계절 인플루엔자를 구분할 수 없다. 본 연구에서도 신속항원검사에서 양성이었으나 다중 중합효소연쇄반응 검사에 의해 인플루엔자 A H3형으로 진단된 1검체가 있었다. 본격적인 계절 인플루엔자의 유행 시에 신종 인플루엔자 A는 계절 인플루엔자 A와 항바이러스 내성양상이 다르므로 이를 쉽게 감별할 수 있는 시약이 필요하다고 생각된다.

인플루엔자 감염을 확진하기 위한 방법은 바이러스 배양검사와 중합효소연쇄반응 검사가 있지만, 바이러스 배양은 결과를 얻기까지 통상적으로 일주일 이상의 시간이 소요되기 때문에 분자진단 방법이 빠르고 예민하고 특이도가 높아서 바이러스 배양을 대체할 수 있으며, 특히 인플루엔자 대유행시는 빠르고 예민하고 자동화 장비를 이용할 경우 대량의 검사를 수행할 수 있는 방법이라고 하였다[10]. 2009년 신종 인플루엔자 A (H1N1) 대유행시에 CDC에서 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 대해 적혈구응집소 유전자, 인플루엔자 A에 대해 기질 단백질 M 유전자, Rnase P 내부대조를 시발체로 이용한 통상적과 실시간 중합효소연쇄반응 검사 방법을 제시하여 각 검사실에서 신종 인플루엔자 A (H1N1)의 진단에 이용할 수 있게 되었다[4]. 이 CDC 방법을 기초로 하여 전 세계적으로 자가제조 또는 상품화된 통상적 중합효소연쇄반응법, 다중 중합효소연쇄반응법, 실시간 중합효소연쇄반응법 및 nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) 등의 분자진단법이 개발되어 신종 인플루엔자 A (H1N1)를 확진하고 있다[5, 11-16]. 이들 연구에 따르면 분자진단법은 빠르고, 예민하고, 바이러스 배양이나 염기분석으로 확인된 계절 인플루엔자 A와 B, 인플루엔자 A 아형 및 다른 호흡기 바이러스 등에 대해 교차 반응을 보이지 않았다고 하였다. 실시간 중합효소연쇄반응의 검출 한계는 $2 \times 10^{-2-3}$ 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) 정도라고 하였고, 4개 다중 중합효소연쇄반응 검사와 실시간 중합효소연쇄반응 검사를 동시에 시행하여 2개 이상에서 양성인 경우를 참고 방법으로 하여 실시간 중합효소연쇄반응의 민감도와 특이도를 90.9%와 100%라고 하였다[5, 12, 13]. 실시간 NASBA는 기존의 바이러스 배양과 CDC TaqMan 검사 및 상품화된 실시간 중합효소연쇄반응 검사에서 2개 이상 양성인 경우를 참고 방법으로 하여 민감도와 특이도가 각각 100%라고 하였다[11].

국내는 상품화된 중합효소연쇄반응 검사로 Seegene의 Seeplex FluA ACE Subtyping 키트, LG Life Sciences의 AdvanSure Influenza A/Influenza A H1N1 키트, Bioneer의 AccuPower new Influenza A (H1N1) Real-Time PCR 키트 등이 개발되어 신종 인플루엔자 A (H1N1)의 확진에 이용하고 있는

데 이에 대한 임상적 평가가 없었다.

본 연구에서 사용한 다중 중합효소연쇄반응 검사는 신종 인플루엔자 A (H1N1) 이외의 계절성 인플루엔자 A (H3, H1)와 조류 인플루엔자 (H5)에 대한 시발체를 사용해 양성인 경우 인플루엔자 A의 아형을 알 수 있다. 그러나 통상적 중합효소연쇄반응 검사는 역전사 과정에 수기법이 필요하고 검사 소요 시간이 길며, 전기 영동이 필요하여 밴드가 약한 경우는 판독이 어려울 수 있고, 한번에 많은 검사를 시행하기가 어렵다.

본 연구에 사용된 두 가지 실시간 중합효소연쇄반응 검사는 신종 인플루엔자 A (H1N1)를 검출할 수 있으나 인플루엔자 A의 아형을 구분할 수는 없다. 하지만 역전사 및 실시간 중합효소연쇄반응 검사가 동시에 진행되어 검사 과정이 간단하고 오염이 적으며, 검사 소요 시간이 짧다. 또한 threshold cycle 값을 측정하여 바이러스 양을 반정량할 수 있으며 한번에 많은 검사를 시행할 수 있다.

본 연구에서 다중 중합효소연쇄반응 검사와 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사를 동시에 검사한 224 검체에서 두 검사 간에 일치도가 99.6% (223/224, $\kappa=0.991$, $P=0.000$)로 거의 완벽히 일치하였고, 두 가지 실시간 중합효소연쇄반응 검사를 비교한 99검체도 97.0% (96/99, $\kappa=0.936$, $P=0.000$)의 거의 완벽한 일치를 보였다. 불일치 결과를 보인 검체는 RNA 농도가 매우 낮아서 클로닝 후 염기서열분석을 시행하였는데, 모두 신종 인플루엔자 A (H1N1)로 확인되었다. 국내에서 개발된 세 가지 중합효소연쇄반응 검사는 검사법 간에 일치율이 매우 높으므로, 검사실의 검사건수 등을 고려하여 세 가지 중합효소연쇄반응법 중에 선택하여 이용한다면 신종 인플루엔자 A (H1N1)의 진단에 유용할 것으로 생각된다.

결론으로 SD Influenza Antigen키트를 이용한 신속항원검사는 신종 인플루엔자 A (H1N1)와 계절성 인플루엔자 A를 감별할 수 없고, 중합효소연쇄반응 검사에 비해 민감도가 매우 낮아 음성인 경우는 중합효소연쇄반응 검사 등의 확인이 필요하여 신종 인플루엔자 A (H1N1) 진단의 선별 검사로 의의가 적다. 신종 인플루엔자 A (H1N1)에 대한 다중 중합효소연쇄반응 검사와 AdvanSure와 AccuPower 실시간 중합효소연쇄반응 검사는 일치율이 97.0-99.6%로 높아 신종 인플루엔자 A (H1N1) 진단에 유용할 것으로 생각된다.

요 약

배경 : 2009년 4월 신종 인플루엔자 A (H1N1) 바이러스가 미국에서 발견되었고 대유행 상태에 도달하였다. 국내에서 신

중 인플루엔자 A (H1N1)를 진단하기 위한 신속항원검사와 중합효소연쇄반응 검사들이 개발되었다. 저자들은 국내에서 개발된 신속항원검사, 다중 중합효소연쇄반응 검사와 실시간 중합효소연쇄반응 검사를 이용하여 신종 인플루엔자 A (H1N1)의 검출능력을 평가하고자 하였다.

방법 : 2009년 8월부터 9월까지 코인두 면봉이나 비강 면봉으로 채취한 734검체를 대상으로 하여 신속항원검사(SD Influenza Antigen, Standard Diagnostics, Inc., Korea)와 다중 중합효소연쇄반응 검사(Seeplex FluA ACE Subtyping, Seegene, Korea)를 시행하였다. 저자들은 224검체를 대상으로 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사(LG Life Sciences, Korea)를 시행하여 다중 중합효소연쇄반응 검사 결과와 비교하였다. 실시간 중합효소연쇄반응 검사간의 비교를 위해 99검체를 대상으로 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사와 AccuPower 실시간 중합효소연쇄반응 검사(Bioneer, Korea)를 시행하였다.

결과 : 다중 중합효소연쇄반응 검사와 비교했을 때 신속항원검사의 민감도는 48.0%였고 특이도는 99.8%였다. 다중 중합효소연쇄반응 검사와 AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사 사이의 일치도는 99.6% ($\kappa=0.991$, $P=0.000$)였고, 두 가지 실시간 중합효소연쇄반응 검사 간의 일치도는 97.0% ($\kappa=0.936$, $P=0.000$)였다.

결론 : 신속항원검사는 중합효소연쇄반응 검사에 비해 민감도가 상당히 낮아 신종 인플루엔자 A (H1N1)의 검출에 유용하지 않다고 생각된다. 반면 다중 중합효소연쇄반응 검사, AdvanSure 실시간 중합효소연쇄반응 검사 및 AccuPower 실시간 중합효소연쇄반응 검사는 신종 인플루엔자 A (H1N1)의 검출에 유용할 것이다.

참고문헌

1. WHO. World now at the start of 2009 influenza pandemic. http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/ (Updated on Jun 2009).
2. Peiris JS, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol* 2009; 45:169-73.
3. WHO. Assessing the severity of an influenza pandemic. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/assess/disease_swineflu_assess_20090511/en/index.html (Updated on May 2009).
4. WHO. WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans-revised. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf (Updated on Nov 2009).
5. Pabbaraju K, Wong S, Wong AA, Appleyard GD, Chui L, Pang XL, et al. Design and validation of real-time reverse transcription-PCR assays for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus. *J Clin Microbiol* 2009;47:3454-60.
6. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Sequences from pandemic (H1N1) 2009 viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html> (Updated on Nov 2009).
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus-United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:826-9.
8. Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (Swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis* 2009;49:1090-3.
9. Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol* 2009;45:191-5.
10. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis* 2006;194(S2):S98-110.
11. Ge Y, Cui L, Qi X, Shan J, Shan Y, Qi Y, et al. Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Virol Methods* 2010;163:495-7.
12. LeBlanc JJ, Li Y, Bastien N, Forward KR, Davidson RJ, Hatchette TF. Switching gears for an influenza pandemic: validation of a duplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection and confirmatory identification of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. *J Clin Microbiol* 2009;47:3805-13.
13. Poon LL, Chan KH, Smith GJ, Leung CS, Guan Y, Yuen KY, et al. Molecular detection of a novel human influenza (H1N1) of pandemic potential by conventional and real-time quantitative RT-PCR assays. *Clin Chem* 2009;55:1555-8.
14. Whiley DM, Bialasiewicz S, Bletchly C, Faux CE, Harrower B, Gould AR, et al. Detection of novel influenza A(H1N1) virus by real-time RT-PCR. *J Clin Virol* 2009;45:203-4.
15. He J, Bose ME, Beck ET, Fan J, Tiwari S, Metallo J, et al. Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (human),

- N1 (animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2009;47:2772-8.
16. Carr MJ, Gunson R, Maclean A, Coughlan S, Fitzgerald M, Scully M, et al. Development of a real-time RT-PCR for the detection of swine-lineage influenza A (H1N1) virus infections. *J Clin Virol* 2009; 45:196-9.