

Diagnostic virologique des infections respiratoires

Diagnosis of viral respiratory infections

M. Leruez-Ville

Laboratoire de virologie EA 3620, hôpital Necker–Enfants-Malades, APHP, université René-Descartes–Paris-V, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France

Disponible sur internet le 05 octobre 2006

Résumé

Les infections respiratoires de l'enfant sont à 80 % d'origine virale. La culture cellulaire était la technique de référence pour le diagnostic de ces infections mais cette technique tend à être supplantée par les techniques de biologie moléculaire et notamment la PCR en temps réel en raison de son excellente sensibilité et sa bonne praticabilité. Cependant, en pratique courante et dans la plupart des laboratoires, le diagnostic des infections virales respiratoires reste réalisé à l'aide de techniques reposant sur la mise en évidence des antigènes viraux notamment en immunofluorescence. Des tests de diagnostic rapide ou « doctors-tests », praticables en dehors d'un laboratoire, sont actuellement disponibles sur le marché, leur sensibilité reste inférieure à celle des autres techniques mais la généralisation de l'usage de ces tests notamment en cabinet médical est probable dans les années à venir. De nouvelles techniques de diagnostic des infections respiratoires reposant sur l'utilisation de puce à ADN sont en cours de mise au point et semblent très prometteuses.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

More than 80% of the cases of respiratory infections in children are of viral origin. Viral culture has been the reference method for the diagnosis of viral respiratory infections for years, but there is now a tendency to replace viral culture by molecular biology techniques, notably real-time PCR-based assay, because of its excellent sensitivity and good feasibility. Currently in most laboratories, however, diagnosis of viral respiratory infections is still done using techniques based on detection of viral antigens, especially immunofluorescence assays. Rapid diagnostic tests for use outside of laboratories are now available on the open market, and even if their sensitivity remains lower than that of other techniques, it is likely that they will become widely used, especially in doctors' offices, in the near future. New methods for the diagnosis of viral infections based on DNA microarray technologies are currently under investigation and appear to very promising.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Infections respiratoires ; Diagnostic direct ; PCR en temps réel ; Doctors tests ; Virus Respiratory infections ; Real time PCR ; Doctors tests ; Virus

Keywords: Respiratory infection; Viral infection; PCR-based assay; Immunofluorescence assay; DNA microarray test; Over-the-counter assay

1. Introduction

Les virus respiratoires sont responsables d'environ 80 % des infections respiratoires. Ils sont responsables d'infections respiratoires hautes (rhinite, laryngotrachéite) mais aussi d'infections respiratoires basses (bronchite, bronchiolite, pneumopathie) potentiellement sévères. L'incidence annuelle des

pneumonies communautaires chez l'enfant de moins de cinq ans est de 34 à 40 cas 1000, bien supérieure à celle retrouvée chez l'adulte [6]. Il y aurait de 545 000 à 840 000 hospitalisations d'enfants chaque année aux États-Unis motivées par une infection respiratoire basse. Plus de 40 % de ces hospitalisations concernent des enfants de moins d'un an. Chez les enfants de moins de cinq ans, 90 % des hospitalisations pour infection respiratoire basse seraient liées à une infection virale, alors que dans la population des 5–18 ans seulement 39 % des infections respiratoires basses nécessitant une hospitalisation seraient d'origine virale [9].

Adresse e-mail : marianne.leruez@nck.ap-hop-paris.fr (M. Leruez-Ville).

Les virus responsables d'infection respiratoire sont différents selon la localisation anatomique de l'infection, l'âge et la période de l'année. De nombreuses études épidémiologiques ont été consacrées à la recherche des agents viraux responsables d'infection respiratoire dans la communauté. Ces études montrent une répartition saisonnière de certaines infections virales respiratoires : les infections à virus respiratoire syncytial (VRS) et la grippe surviennent uniquement l'hiver ; les infections à virus parainfluenza de type 3 surviennent au printemps et surtout en été ; les infections à virus parainfluenza de type 1 surviennent en automne. Les infections à rhinovirus et à adénovirus n'ont pas une saisonnalité marquée. Les virus de la grippe sont responsables d'un syndrome grippal et de pneumopathie ; les virus parainfluenza de laryngite et de bronchiolite ; les VRS de bronchiolites et de rhumes, les adénovirus de pharyngites et de pneumopathie et les rhinovirus sont responsables d'environ 50 % des rhumes. De façon globale, les virus les plus fréquemment isolés chez les enfants hospitalisés pour infection respiratoire basse sont le VRS (58 % de l'ensemble des virus isolés), les virus influenzae A et B (21 %) puis les virus parainfluenzae (18 %). Les rhinovirus et les adénovirus sont retrouvés dans 4 % des cas [9].

Les connaissances sur l'épidémiologie des infections respiratoires virales s'affinent constamment, notamment en raison de la découverte de nouveaux virus jusque-là non identifiés, par exemple dans les dernières années le métapneumovirus et des nouveaux coronavirus ont été décrits. Ainsi, le métapneumovirus semble jouer un rôle important dans les infections respiratoires basses du nourrisson et du jeune enfant. Dans une étude rétrospective portant sur une période de 25 ans, une infection par le métapneumovirus a permis d'expliquer 20 % des cas d'infections respiratoires basses jusqu'alors d'étiologie inconnue [10]. De même deux nouveaux coronavirus ont été décrits récemment : le coronavirus NL63 et le coronavirus HKU1, ces deux coronavirus ont été retrouvés dans différents pays et semblent être des agents relativement banals d'infections respiratoires hautes et basses notamment chez le jeune enfant [11–14]. À côté de ces virus nouvellement décrits mais qui sévissent probablement depuis longtemps, des virus émergents le plus souvent issus d'une recombinaison génétique entre un virus animal et un virus humain de la même famille tels que le SARS sont une source de préoccupation majeure.

2. Outils du diagnostic virologique

2.1. Types de prélèvement

Le prélèvement de choix pour réaliser le diagnostic d'une infection respiratoire chez l'enfant est le lavage-aspiration nasale à l'aide d'un dispositif stérile. Un prélèvement par écouvillonnage nasal est une alternative, cependant la sensibilité de détection des virus respiratoires serait un peu moins bonne avec cette technique de prélèvement [15]. Les virus peuvent aussi être recherchés dans des prélèvements pulmonaires notamment dans des liquides de lavage bronchoalvéolaire ou des fragments biopsiques.

2.2. Méthodes de diagnostic

2.2.1. La culture cellulaire

La technique de diagnostic la plus classique mais aussi la plus longue et la plus coûteuse est la culture cellulaire de virus. Elle consiste à inoculer les prélèvements respiratoires sur une nappe cellulaire et à guetter l'apparition d'un effet cytopathogène lié à la multiplication virale. Cet effet survient plusieurs jours voire plusieurs semaines après l'inoculation et retarde d'autant le diagnostic. Chaque virus ayant un tropisme cellulaire propre, il n'y a pas de système de culture universel et le laboratoire doit entretenir plusieurs lignées pour obtenir la multiplication d'un grand nombre de virus. Par exemple, les virus grippaux se multiplient sur cellules MDCK (rein de chien), les VRS et les adénovirus se multiplient sur des fibroblastes embryonnaires de poumon d'origine humaine, les virus parainfluenza sur les cellules en lignée Hep-2. Par ailleurs, pour obtenir une bonne sensibilité avec la culture cellulaire, le prélèvement respiratoire doit être acheminé rapidement au laboratoire ou prélevé dans un milieu de transport pour éviter que les virus ne soient inactivés.

Malgré sa complexité, la culture cellulaire est longtemps restée la méthode de diagnostic de référence des infections respiratoires virales et les performances des autres outils diagnostiques ont été évaluées par comparaison avec cette technique.

2.2.2. Détection directe des antigènes viraux

Les techniques de diagnostic des infections respiratoires reposent sur la mise en évidence des protéines virales directement dans les prélèvements. L'avantage majeur de ces techniques par rapport à la culture cellulaire est qu'elles peuvent être pratiquées sur un prélèvement dans lequel les virus sont inactivés, il y a donc moins de contrainte dans les délais d'acheminement au laboratoire.

Deux types de techniques sont très utilisés :

- l'immunofluorescence directe qui consiste à détecter la présence d'antigènes viraux dans les prélèvements à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques liés à la fluorescéine. Dans cette technique, les cellules respiratoires récupérées après centrifugation du prélèvement sont déposées dans les différentes cupules d'une lame, puis les anticorps monoclonaux spécifiques des virus respiratoires recherchés sont déposés sur ces cupules. Des inclusions vertes sont retrouvées dans les cellules infectées lors de la lecture des lames au microscope à fluorescence. Cette technique doit être réalisée par un technicien expérimenté, car la lecture des lames est souvent délicate, implique l'utilisation d'un microscope à fluorescence et reste réservée aux laboratoires spécialisés. La sensibilité de la technique d'immunofluorescence directe est généralement un peu inférieure à celle de la culture cellulaire ;
- l'immunochromatographie sur membrane consiste à détecter la présence d'antigènes viraux à l'aide d'anticorps spécifiques (anti-VRS ou antigrippaux) adsorbés sur la membrane (Fig. 1). L'industriel prépare des bandelettes sur lesquelles

Mode opératoire

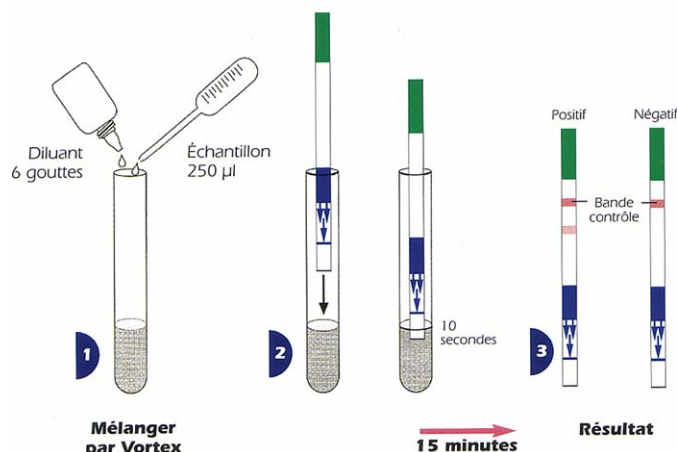


Fig. 1. Exemple d'un test rapide d'immunochromatographie.

est préabsorbé un anticorps monoclonal spécifique du virus recherché, cet anticorps est marqué par une enzyme. Le prélèvement respiratoire est mélangé par le manipulateur à quelques gouttes d'un tampon de lyse fourni dans la trousse diagnostic, ce tampon permet de détruire les cellules respiratoires et de libérer les antigènes viraux. Le mélange est déposé sur la bandelette ainsi que le substrat de l'enzyme. Lorsque le virus est présent dans le prélèvement, un complexe antigène-anticorps se forme et une bande colorée liée à la réaction enzyme-substrat apparaît sur la bandelette. Ces tests rapides permettent d'obtenir un résultat en 10 à 30 minutes et peuvent être pratiqués par un expérimentateur non spécialisé au laboratoire de biologie médicale ou directement au cabinet médical (« doctor-test »). Trois tests rapides principaux sont disponibles pour le diagnostic de la grippe (Directigen Flu A + B (Becton Dickinson) ; Now FluA–Now FluB (Binax, distribué par Oxoïd) ; Quick Vue (Quidel, distribué par Argène). Six tests rapides sont disponibles pour le diagnostic de l'infection par le VRS : ImmunoCard STAT ! RSV (Mérieux), Now RSV (Binax, distribué par Oxoïd), Directigen RSV (Becton Dickinson), *respir*

syncytial virus AG (J2L), RSV Stick (Novamed, BMD). Les tests rapides de diagnostic de grippe ou de VRS ont une sensibilité inférieure à celle de la culture variant de 75 à 95 % selon les études et à celle de la PCR (45 à 75 %) [1, 3–5,7,8,16,17] (Tableaux 1 et 2).

2.2.3. La biologie moléculaire : détection du génome viral

2.2.3.1. La détection des génomes viraux par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). Les techniques d'amplification génique consistent à copier un segment du génome à l'aide d'amorces spécifiques. Les amorces s'hybrident avec la séquence nucléotidique homologue et l'enzyme la Taq polymérase qui est présente dans le milieu réactionnel recopie le fragment d'ADN, des étapes d'hybridation et d'amplification sont répétées de 30 à 40 fois ce qui permet d'obtenir de très nombreuses copies du segment nucléotidique cible. Dans une seconde étape, la présence des produits de PCR est visualisée le plus souvent sur un gel de polyacrylamide. Ces techniques de PCR sont très sensibles mais il existe un risque de faux positifs par contamination des échantillons, notamment au niveau de la deuxième étape de révélation. En effet, à cette étape, lors de l'ouverture des tubes qui contiennent une très grande quantité de produits de PCR (jusqu'à plusieurs millions), des microaérosols de produits de PCR se produisent et la pièce peut être contaminée.

Récemment, une nouvelle technologie : la PCR en temps réel a révolutionné le diagnostic virologique. La technique de PCR temps réel consiste à réaliser une PCR en une seule étape en utilisant dans le milieu réactionnel à la fois des amorces permettant l'amplification mais aussi une sonde permettant la détection des produits de PCR au fur et à mesure de leur apparition. La sonde est marquée par un fluorochrome et une émission de fluorescence a lieu lorsque la sonde s'hybride avec l'ADN cible présent dans l'échantillon. L'émission de fluorescence est détectée à chaque cycle de PCR par la machine de PCR en temps réel ; la quantité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de cible présente dans l'échantillon.

Tableau 1

Les tests de détection rapide du VRS

Tests	Industriels	Sensibilité/ immunofluorescence (%)	Sensibilité/culture (%)	Sensibilité/PCR (%)	Spécificité (%)
Directigen RSV [2,3]	Becton-Dickinson		80,8	69,6	100
Now RSV [1]	Binax Oxoïd		89		100
RSV Stick (Freymuth, communication personnelle)	BMD	87,5			100
RSV Respi-Strip (Freymuth, communication personnelle)	Elitech	96	90		93–100

Tableau 2

Les tests de détection rapide des virus grippaux

Tests	Industriel	Lieu du test	Sensibilité/culture (%)	Sensibilité/PCR (%)	Spécificité (%)
Directigen Flu A + B [4,7,8]	Becton-Dickinson		43–95	55–85	76–83
Now FluA – FluB	Binax-Oxoïd		82		94
Quick Vue [4,5]	Quidel Argène	Labo Cabinet Lit	74–95	55–80 36–44 74	7–83 97

Cette technologie a un triple avantage par rapport à la technique de PCR traditionnelle : elle évite les contaminations puisque le tube contenant les produits de PCR n'a pas besoin d'être ouvert, elle est quantitative et elle est très facilement automatisable. On peut par ailleurs réaliser des PCR dites multiplexes c'est-à-dire que dans un même tube plusieurs génomes viraux sont détectés grâce à la présence d'un mélange d'amorces et de sondes spécifiques de plusieurs virus.

La sensibilité des techniques de PCR est bien supérieure à celle de la culture cellulaire, en effet la PCR permet d'identifier plus du double d'infections respiratoires virales [18,19] par rapport à la culture. Cependant, en raison de cette grande sensibilité des techniques de PCR, certains ont discuté la valeur d'une PCR positive, notamment en posant la question d'un possible portage de virus dans le tractus respiratoire ne reflétant pas une infection active. La cinétique de détection des virus par PCR au décours d'un épisode d'infection respiratoire aiguë a été étudiée chez le sujet immunocompétent : la PCR reste positive dans les sécrétions respiratoires environ dix jours en cas d'infection grippale [20] et jusqu'à cinq semaines après une infection à rhinovirus [21], mais à distance de l'épisode aigu (plus d'un mois) les PCR sont négatives. Par ailleurs, la détection de génome de virus respiratoire par PCR est peu fréquente chez les sujets asymptomatiques. Ainsi, la détection de l'ARN des rhinovirus est inférieure à 5 % chez des enfants asymptomatiques [22] ; et des données récentes obtenues au sein de population d'adultes montrent que la fréquence de détection de virus grippal ou du VRS par PCR chez des sujets totalement asymptomatiques en périodes d'épidémies de grippe ou de VRS est faible [23].

Ainsi, l'amplification du génome des virus respiratoires par PCR tend à devenir la nouvelle technique diagnostique de référence, notamment grâce à la diffusion des techniques de PCR en temps réel. D'ailleurs, les nouveaux outils diagnostiques et notamment les tests rapides sont maintenant validés en les comparant aux techniques de PCR.

2.2.3.2. La détection des génomes viraux par la technique des puces à ADN. Cette technique repose sur l'utilisation de « puces » ou « chips » qui sont des cartes contenant une membrane sur laquelle sont déposées des sondes à ADN spécifiques des micro-organismes recherchés. On peut déposer sur une puce de très nombreuses sondes marquées (jusqu'à plusieurs milliers). Une lyse et une extraction des acides nucléiques sont réalisées à partir de l'échantillon biologique à analyser. Les acides nucléiques extraits sont ensuite déposés sur la puce, une hybridation a lieu entre le génome viral et l'ADN de la sonde spécifique prédéposée sur la membrane de la chip. La présence de l'hybridation est révélée après lecture informatisée de la puce. Cette technologie est très prometteuse, elle permettrait en effet de rechercher en une seule analyse la présence de l'ensemble des micro-organismes connus pour être responsables de pathologie respiratoire en utilisant une puce comprenant des sondes spécifiques de chacun de ces micro-organismes. Actuellement, la réalisation de puces est très oné-

reuse et leur utilisation en diagnostic médical n'est pas validée mais cette technologie semble promise à un bel avenir.

3. Opportunité du diagnostic virologique des infections respiratoires de l'enfant

Le diagnostic virologique des infections respiratoires communautaires reste actuellement réservé au cas d'infections sévères nécessitant une hospitalisation. En effet, dans ce contexte, le diagnostic virologique va aider à la prise en charge en permettant :

- d'éviter une antibiothérapie potentiellement injustifiée ;
- de traiter avec un antiviral spécifique notamment un anti-grippal (Tamiflu® ou Relenza®) ;
- d'appliquer les mesures d'isolement strict tant que l'enfant excrète du virus afin de lutter contre les infections nosocomiales.

Cependant, depuis l'arrivée sur le marché de deux antigrippaux efficaces se pose la question de l'intérêt potentiel de la pratique du diagnostic virologique de la grippe en ville. En effet, le Relenza® et le Tamiflu® sont des inhibiteurs de la neuraminidase virale qui :

- permettent, lorsque le traitement est débuté dans les 24 heures qui suivent le début des symptômes, de raccourcir l'épisode grippal (à virus A ou B) d'une journée et demie ;
- diminuent le risque de survenue d'otites moyennes aiguës de 45 % ;
- diminuent la prescription d'antibiotique de 40 %.

Ainsi, l'utilisation d'un traitement par un antigrippal devrait diminuer le coût de la grippe en termes de consommation médicale. L'enjeu actuel est d'évaluer s'il faut :

- traiter systématiquement tous les cas de syndromes grippaux survenant pendant la période de l'épidémie de grippe et donc traiter en excès, on sait en effet que 30 à 40 % des syndromes grippaux survenant en pleine épidémie de grippe ne sont pas des infections à virus influenzae ;
- ou s'il faut traiter uniquement les cas confirmés par un test rapide positif et dans ce cas traiter de façon insuffisante puisque comme nous l'avons vu les tests rapides ont une sensibilité médiocre et ne permettent le diagnostic que de 50 à 60 % des cas de grippe.

Deux études coût-efficacité récentes indiquent qu'en période d'épidémie la stratégie du traitement systématique est celle qui permettrait la meilleure diminution des coûts [24,25].

4. Conclusion

La technique de PCR et notamment de PCR en temps réel tend à devenir la technique de référence du diagnostic des

infections respiratoires virales car elle s'avère beaucoup plus sensible que la technique de culture cellulaire. Les techniques les plus utilisées en routine dans les laboratoires restent les méthodes de diagnostic rapide par détection des antigènes viraux. Il est probable que l'on assiste dans les années à venir à la diffusion des techniques de type « doctor-test » avec notamment une utilisation dans les services d'urgences hospitalières ou au cabinet médical. Par ailleurs, les techniques de puces à ADN qui sont actuellement au stade de développement paraissent très séduisantes car elles permettraient d'envisager un diagnostic de l'ensemble des micro-organismes responsables de pathologie respiratoires.

Références

- [1] Aldous WK, Gerber K, Taggart EW, Thomas J, Tidwell D, Daly JA. A comparison of Binax NOW to viral culture and direct fluorescent assay testing for respiratory syncytial virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:265–8.
- [2] Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Ukae S, Mori T, Hotsubo T. Comparison of an immunochromatography test with multiplex reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections. *J Clin Microbiol* 2004;42:4812–4.
- [3] Slinger R, Milk R, Gaboury I, Diaz-Mitoma F. Evaluation of the QuickLab RSV test, a new rapid lateral-flow immunoassay for detection of respiratory syncytial virus antigen. *J Clin Microbiol* 2004;42:3731–3.
- [4] Rodriguez WJ, Schwartz RH, Thorne MM. Evaluation of diagnostic tests for influenza in a pediatric practice. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:193–6.
- [5] Pregliasco F, Puzelli S, Mensi C, Anselmi G, Marinello R, Tanzi ML. Influenza virological surveillance in children: the use of the QuickVue rapid diagnostic test. *J Med Virol* 2004;73:269–73.
- [6] McIntosh K. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med* 2002;346:429–37.
- [7] Noyola DE, Clark B, O'Donnell FT, Atmar RL, Greer J, Demmler GJ. Comparison of a new neuraminidase detection assay with an enzyme immunoassay, immunofluorescence, and culture for rapid detection of influenza A and B viruses in nasal wash specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:1161–5.
- [8] Chan KH, Maldeis N, Pope W, Yup A, Ozinskas A, Gill J. Evaluation of the Directigen FluA+B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:1675–80.
- [9] Henrickson KJ, Hoover S, Kehl KS, Hua W. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:S11–8.
- [10] Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingstehaus JM, Edwards KM. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;350:443–50.
- [11] Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79:884–95.
- [12] van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10:368–73.
- [13] Vabret A, Mourez T, Dina J, van der Hoek L, Gouarin S, Petitjean J. Human coronavirus NL63, France. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1225–9.
- [14] Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerg Infect Dis* 2006;12:775–9.
- [15] Heikkinen T, Salmi AA, Ruuskanen O. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of influenza. *BMJ* 2001;322:138.
- [16] Harnden A, Brueggemann A, Shepperd S, White J, Hayward AC, Zambon M. Near patient testing for influenza in children in primary care: comparison with laboratory test. *BMJ* 2003;326:480.
- [17] Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Comparison of Binax NOW and Directigen for rapid detection of influenza A and B. *J Clin Virol* 2004; 31:113–5.
- [18] Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* 2004;189:706–10.
- [19] Carrat F, Sahler C, Rogez S, Leruez-Ville M, Freymuth F, Le Gales C. Influenza burden of illness: estimates from a national prospective survey of household contacts in France. *Arch Intern Med* 2002;162:1842–8.
- [20] van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:196–200.
- [21] Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol* 2004;72:695–9.
- [22] Nokso-Koivisto J, Kinnari TJ, Lindahl P, Hovi T, Pitkaranta A. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol* 2002;66:417–20.
- [23] Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol* 2006;35:46–50.
- [24] Schwarzingler M, Housset B, Carrat F. Bedside rapid flu test and zanamivir prescription in healthy working adults: a cost-benefit analysis. *Pharmacoeconomics* 2003;21:215–24.
- [25] Sintchenko V, Gilbert GL, Coiera E, Dwyer D. Treat or test first? Decision analysis of empirical antiviral treatment of influenza virus infection versus treatment based on rapid test results. *J Clin Virol* 2002;25:15–21.