

Deteksi Virus Penyebab Infeksi Saluran Pernafasan Akut di Rumah Sakit (Studi Pendahuluan dengan Uji *Fast-Track*® Diagnostik)

Detection of Viruses from Acute Respiratory Infections in Hospitals (A Preliminary Study Using Fast-Track® Diagnostic Test)

Vivi Setiawaty^{1*}, Maretra Anindya Puspaningrum², Arie Ardiansyah Nugraha¹, dan Daniel Joko Wahyono²

¹Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI, Jl. Percetakan Negara No. 29 Jakarta, Indonesia

²Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. DR. Soeparno No.63, Grendeng, Purwokerto, Indonesia

*Korespondensi Penulis: vivisetiawaty@hotmail.com

Submitted: 08-08-2018; Revised: 10-10-2018; Accepted: 15-11-2018

DOI: <https://doi.org/10.22435/mpk.v28i4.257>

Abstrak

Infeksi saluran pernafasan akut (ISPA) merupakan penyakit menular yang menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia dan Indonesia. Informasi virus penyebab ISPA masih terbatas. Tujuan dari penelitian ini adalah mendeteksi virus penyebab kasus ISPA rawat inap di tiga rumah sakit sentinel surveilans ISPA berat. Pemeriksaan pada 30 spesimen *swab* hidung dan tenggorok dari kasus ISPA rawat inap di RSUD Deli Serdang, RSUD Wonosari, dan RS Kanudjoso Djati selama bulan Agustus–September 2016. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Virologi Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan menggunakan *Fast-Track Diagnostics multiplex Real-time RT-PCR* untuk mendeteksi 21 virus. Virus-virus yang berhasil dideteksi adalah *Human Metapneumovirus* (21,2%), *Human Parainfluenza Virus 1* (12,1%), *Influenza B* (6,1%), *Human Coronavirus-OC43* (6,1%), *Human Coronavirus-NL63* (6,1%), *Human Parainfluenza Virus 2* (3,0%), *Human Rhinovirus* (3,0%), dan *Human Adenovirus* (3,0%). Dari 17 sampel yang dinyatakan positif mengandung virus, 14 diantaranya merupakan kasus infeksi tunggal sedangkan tiga lainnya merupakan kas us koinfeksi antara *Human Coronavirus-NL63* dengan *Human Parainfluenza Virus 1*, *Human Metapneumovirus* dengan *Human Coronavirus-OC43*, dan *Human Adenovirus* dengan *Human Rhinovirus*. Virus yang paling banyak terdeteksi dari spesimen kasus ISPA rawat inap adalah *Human Metapneumovirus*.

Kata kunci: *Fast-Track Diagnostics*; ISPA; *Multiplex Real-time RT-PCR*; virus saluran pernafasan

Abstract

Acute respiratory infections (ARI) is the leading cause of morbidity and mortality in the world and Indonesia. Information on the virus that causes ARI is still limited. The aim of this study was to detect the virus that causes ARI hospitalized cases in three sentinel surveillance hospitals of severe ARI. Laboratory testing of 30 nasal and throat swab specimens from ARI hospitalized cases at Deli Serdang Hospital, Wonosari Hospital and Kanudjoso Djati Hospital during August - September 2016. Laboratory testing were carried out at the Virology Laboratory of the Center for Biomedical Research and Development and Basic Health Technology. This research is a preliminary study using Fast-Track Diagnostics multiplex Real-time RT-PCR to detect 21 viruses. The viruses that have been detected are Human Metapneumovirus (21.2%), Human Parainfluenza Virus 1 (12.1%), Influenza B (6.1%), Human Coronavirus-OC43 (6.1%), Human Coronavirus-NL63 (6.1%), Human Parainfluenza Virus 2 (3.0%), Human Rhinovirus (3.0%), and Human Adenovirus

(3.0%). Of the 17 samples that tested positive for viruses, 14 of them were single cases of infection while the other three were cases of co-infection between Human Coronavirus-NL63 and Human Parainfluenza Virus 1, Human Metapneumovirus with Human Coronavirus-OC43, and Human Adenovirus with Human Rhinovirus. The most detected virus from ARI hospitalized cases are the Human Metapneumovirus.

Keywords : Fast-Track Diagnostics; ARI; Multiplex Real-time RT-PCR; eespiratory virus

PENDAHULUAN

Infeksi saluran pernafasan akut (ISPA) merupakan penyakit menular yang menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia.¹ Penderita ISPA yang memperoleh perawatan di rumah sakit (RS) merupakan kasus ISPA berat.² Periode prevalensi ISPA nasional berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013 mencapai 25% dengan 25,8% didominasi oleh kasus ISPA pada balita (1-4 tahun). Provinsi Nusa Tenggara Timur mempunyai prevalensi ISPA yang tinggi yaitu sebesar 41,7%.³

Penyebab utama kasus ISPA adalah mikroorganisme, namun 90-95% menunjukkan virus sebagai agen penginfeksi tertinggi.⁴ Tingginya angka kasus rawat inap akibat ISPA diduga disebabkan oleh sulitnya menentukan manifestasi klinis yang spesifik dari pasien. Hal ini berkaitan dengan banyaknya virus saluran pernafasan yang seringkali menimbulkan gejala yang saling tumpang tindih pada penderita.⁵ Di negara berkembang, 40-50% patogen penyebab ISPA berat adalah virus. *Respiratory Syncytial Virus*, *Parainfluenza virus*, *Influenza Virus*, dan *Adenovirus* merupakan patogen-patogen utama yang diidentifikasi menjadi penyebab ISPA berat. Selain virus-virus tersebut, kelompok dari *Picornavirus* (*Enterovirus*, *Coxsackie Virus*, dan *Rhinovirus*) juga merupakan penyebab ISPA berat pada anak-anak.⁶

Pemantauan virus-virus penyebab ISPA belum dilakukan secara rutin di Indonesia, walaupun kegiatan surveilans ISPA berat yang di rawat inap sudah dilaksanakan sejak tahun 2008, terutama untuk pemantauan virus influenza yang menyebabkan epidemi dan berpotensi pandemi.² Tantangan untuk pemeriksaan virus lain penyebab ISPA berat adalah waktu yang lama dan reagen yang banyak. *Real-time Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR) menjadi teknik yang sangat disarankan dalam pemeriksaan virus saluran pernafasan.

Pemeriksaan menggunakan teknik *monoplex* atau *singleplex Real-time PCR* kurang direkomendasikan karena teknik ini kurang efisien, mahal, membutuhkan banyak reagen dan sejumlah

besar sampel biologis. Kini telah dikembangkan modifikasi PCR untuk diagnostik cepat beberapa virus secara bersamaan yaitu *multiplex Real-time RT-PCR*. *Kit multiplex Real-time RT-PCR* menyediakan beberapa panel pemeriksaan untuk mendeteksi 12 hingga 33 patogen yang berbeda secara simultan dalam suatu spesimen klinis.⁷ Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai studi pendahuluan untuk mengetahui virus-virus penyebab ISPA berat yang di rawat inap di RS sentinel surveilans ISPA berat dengan teknik pemeriksaan diagnostik cepat *multiplex Real-time RT-PCR*.

METODE

Penelitian ini merupakan bagian dari kegiatan surveilans influenza pada kasus ISPA rawat inap di tiga RS Sentinel yaitu RSUD Deli Serdang Medan, RSUD Wonosari Daerah Istimewa Yogyakarta, dan RS Kanudjoso Djati Balikpapan dari bulan Agustus-September 2016 yang dalam kurun waktu tersebut didapatkan 30 kasus yang sesuai dengan kriteria inklusi dari surveilans influenza pada kasus ISPA berat yang di rawat inap.⁸ Spesimen *swab* hidung dan tenggorok diambil dan ditempatkan ke dalam suatu tube yang berisi *Viral Transport Medium* (VTM) dan disimpan pada suhu 2–8°C. Spesimen selanjutnya dikirim ke Laboratorium Virologi, Pusat Penelitian dan Pengembangan (Puslitbang) Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta untuk analisis lebih lanjut.⁸

RNA virus diekstraksi dari spesimen klinis menggunakan *MiniAmp Viral Isolation Kit* (*Qiagen, Germany*) sesuai dengan instruksi pabrik.^{8,9} Pemeriksaan diagnostik cepat *multiplex PCR* menggunakan *Fast Track Diagnostics* (FTD) *Respiratory Pathogens 33 Multiplex Real-time RT-PCR Kit*. Kit FTD-RP 33 ini untuk pertama kalinya digunakan di laboratorium virologi. Kit ini terdiri dari lima panel pemeriksaan untuk mendeteksi 21 macam virus saluran pernafasan. Panel pertama berisi komponen untuk pemeriksaan *Influenza A*, *Influenza B*, *Influenza A* subtype H1N1pdm09, dan *Human Rhinovirus*. Panel

kedua untuk pemeriksaan *Human Coronavirus-OC43*, *Human Coronavirus-NL63*, *Human Coronavirus-229E*, dan *Human Coronavirus-HKU1*. Panel ketiga untuk pemeriksaan *Human Parainfluenza Virus 3*, *Human Parainfluenza Virus 2*, *Human Parainfluenza Virus 4* dan untuk pengujian *Internal Control (Equine Arteritis Virus)*. Panel keempat untuk pemeriksaan *Human Metapneumovirus A* dan *B*, *Human Bocavirus*, dan *Human Parainfluenza Virus 1*. Panel kelima untuk pemeriksaan *Human Respiratory Syncytial Virus A* dan *B*, *Human Adenovirus*, *Enterovirus*, dan *Human Parechovirus*. Pengujian menggunakan *multiplex PCR* didasarkan pada prinsip *Real-time PCR* sesuai dengan manual FTD33 dengan *multiprimer* untuk mendeteksi virus-virus penyebab ISPA berat yang dirawat inap. Spesimen dinyatakan positif mengandung suatu virus yang spesifik jika menunjukkan satu kurva eksponensial dan memiliki nilai Ct < 33.10

HASIL

Spesimen yang diujikan dengan *multiplex PCR* adalah sebanyak 30. Hasil penelitian ini

menunjukkan bahwa terdapat 17 (56,67%) sampel positif mengandung virus saluran pernafasan dan tiga sampel diantaranya memberikan hasil positif pada dua virus. Tabel 1 menunjukkan bahwa *Human Metapneumovirus* terdeteksi sebagai patogen penyebab infeksi saluran pernafasan terbanyak dari keseluruhan hasil pemeriksaan kasus ISPA berat yang di rawat inap yaitu sebesar 21,2% (7/33). Kemudian disusul oleh *Human Parainfluenza Virus 1* (4/33; 12,1%),

Virus saluran pernafasan lainnya yang juga terdeteksi adalah *Influenza B* (2/33; 6,1%), *Human Coronavirus-OC43* (2/33;6,1%), *Human Coronavirus-NL63* (2/33;6,1%), *Human Parainfluenza Virus 2* (1/33; 3,0%), *Human Rhinovirus* (1/33; 3,0%), dan *Human Adenovirus* (1/33; 3,0%). Frekuensi kasus dengan koinfeksi dalam penelitian ini hanya sebesar 10% (3/30) dari populasi sampel. Kombinasi dari dua virus yang terdeteksi dari tiga sampel yaitu kombinasi antara *Human Coronavirus-NL63* dengan *Human Parainfluenza Virus 1*, *Human Metapneumovirus* dengan *Human Coronavirus-OC43*, dan *Human Adenovirus* dengan *Human Rhinovirus*.

Tabel 1. Virus-virus pada Kasus ISPA Berat yang Memerlukan Rawat Inap

Jenis Virus Saluran Pernafasan	Total	
	N	%
<i>Influenza A (FLUA)</i>	0	0
<i>Influenza B (FLUB)</i>	2	6,1
<i>Influenza A sub tipe H1N1</i>	0	0
<i>Human Rhinovirus (RV)</i>	1	3,0
<i>Human Coronavirus-OC43 (Cor43)</i>	2	6,1
<i>Human Coronavirus-NL63 (Cor63)</i>	2	6,1
<i>Human Coronavirus-229E (Cor229)</i>	0	0
<i>Human Coronavirus-HKU1 (HKU1)</i>	0	0
<i>Human Parainfluenza Virus 1 (HPIV1)</i>	4	12,1
<i>Human Parainfluenza Virus 2 (HPIV2)</i>	1	3,0
<i>Human Parainfluenza Virus 3 (HPIV3)</i>	0	0
<i>Human Parainfluenza Virus 4 (HPIV4)</i>	0	0
<i>Human Bocavirus (HBoV)</i>	0	0
<i>Human Metapneumovirus A/B (HMPV A/B)</i>	7	21,2
<i>Human Respiratory Syncytial Virus A/B (HRSV A/B)</i>	0	0
<i>Human Adenovirus (HAdV)</i>	1	3,0
<i>Enterovirus (EV)</i>	0	0
<i>Human Parechovirus (HPeV)</i>	0	0
Negatif	13	39,4
Jumlah Total	33	100

PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa dari seluruh spesimen hanya terdapat delapan macam virus yang terdeteksi, hal ini sesuai dengan pernyataan Widoretno *et al*⁶ bahwa patogen yang sering teridentifikasi sebagai penyebab kasus ISPA berat yang dirawat inap adalah *Influenza Virus*, *Respiratory Syncytial Virus*, *Parainfluenza Virus* dan *Adenovirus*.⁶ Namun seiring dengan berkembangnya teknik deteksi molekuler, di negara tropis ditemukan pula virus saluran pernafasan lainnya mencapai lebih dari 50% seperti *Human Metapneumovirus* (5,3-5,4%), *Coronavirus* (0,6%), dan *Rhinovirus strain C* (12,8-30%) yang termasuk ke dalam golongan *new emerging virus*.¹¹

Hasil penelitian bahwa *Human Metapneumovirus* merupakan virus yang paling banyak terdeteksi dari kasus ISPA berat yang dirawat inap juga didukung oleh hasil penelitian lain yang menyatakan bahwa HMPV biasanya lebih sering terdeteksi sebagai patogen penyebab ISPA pada populasi pediatrik. Namun kini, virus ini juga banyak menyerang orang dewasa. Infeksi HMPV menyebabkan peningkatan secara signifikan jumlah kasus rawat inap pada orang dewasa berusia > 50 tahun, terutama pada mereka yang berusia > 65 tahun.¹² Bronchiolitis dan asma merupakan penyakit yang paling sering terdiagnosis dari pasien positif HMPV.¹³ Panda *et al*¹⁴ dalam penelitiannya menyatakan jumlah kasus rawat inap tahunan akibat infeksi HMPV sama dengan jumlah gabungan antara kasus infeksi Influenza dan HPIV 1, 2, dan 3 dengan tingkat kematian sebesar 11%. Belum banyak diketahui mengenai distribusi musiman HMPV, tetapi HMPV cenderung akan terdeteksi pada periode waktu tertentu dalam setahun.¹⁵

Namun berkaitan dengan tingginya angka deteksi HMPV dalam penelitian ini, menunjukkan adanya ketidaksesuaian dengan hasil penelitian Purniti *et al*¹⁶ yang menyatakan bahwa virus Influenza merupakan virus penyebab ISPA yang memiliki angka infeksi tertinggi pada pasien rawat jalan maupun rawat inap dibandingkan dengan virus-virus lainnya. Ketidaksesuaian tersebut mungkin dapat dikarenakan keterbatasan jumlah spesimen yang digunakan dalam penelitian ini. Kasus yang diambil pada periode Agustus–September 2016 ini, mungkin tidak dapat menggambarkan pola kejadian ISPA berat yang sebenarnya terjadi. Perbedaan prevalensi virus yang teridentifikasi

juga tergantung pada waktu pengoleksian sampel. Pola musiman dari banyak virus-virus saluran pernafasan di negara tropis khususnya Indonesia relatif belum teridentifikasi secara jelas kecuali untuk RSV dan Influenza memiliki pola musiman dengan tingkat infeksi tertinggi yaitu pada musim hujan.¹⁷ Musim hujan di Indonesia berlangsung dari bulan Oktober hingga Maret.⁴ Hal tersebut juga dimungkinkan sebagai penyebab rendahnya angka positivities virus Influenza dalam penelitian ini.

Pada umumnya kejadian infeksi saluran pernafasan terjadi sepanjang tahun di negara tropis seperti Indonesia, dan puncak tertinggi angka kejadian infeksi biasanya berlangsung pada musim hujan setiap tahunnya. Virus-virus saluran pernafasan menggunakan aerosol sebagai mode transmisinya. Pada kelembaban atmosfer yang tinggi seperti di Indonesia ini, aerosol yang mengandung partikel virus akan bertahan lebih lama.¹⁷

Kasus koinfeksi virus terdeteksi dalam tiga spesimen, yaitu kombinasi antara Cor63 dan HPIV1, HMPV dan Cor43, HAdV dan RV. Koinfeksi biasanya menggambarkan peningkatan keparahan suatu penyakit.¹⁸ Kasus koinfeksi yang terdeteksi didukung oleh beberapa penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa HMPV sering ditemukan pada kasus koinfeksi dengan virus saluran pernafasan lainnya seperti HRSV, RV, HPIV, *Coronavirus*, dan Influenza. Salah satu kasus dengan tingkat keparahan yang tinggi adalah koinfeksi antara HMPV dengan *Coronavirus* yang menyebabkan wabah *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS).¹⁴

Coronavirus NL-63 merupakan Coronavirus yang paling sering ditemukan dalam kasus koinfeksi dengan virus lainnya. Cor63 ini memiliki periode infeksi yang sangat lama mencapai tiga minggu setelah paparan, oleh karenanya persentase kemungkinan terjadi koinfeksi mencapai 50%.⁵ Kasus koinfeksi antara HAdV dan RV juga didukung oleh hasil penelitian Calvo *et al*¹⁸ yang menyatakan bahwa HAdV dan RSV merupakan agen penginfeksi dengan presentase tertinggi dalam kasus koinfeksi RV.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Pertama, data yang disajikan hanya berupa jenis virus dan positivitiesnya, tidak menggunakan data epidemiologi sehingga hasil yang diperoleh tidak dapat mencerminkan asosiasi antara jenis virus dengan gejala maupun faktor risiko lain penyebab ISPA, seperti umur, jenis

kelamin, status kesehatan, dan lain-lain. Kedua, populasi sampel penelitian yang digunakan terbatas 30 sampel dan merupakan sampel periode Agustus-September 2016, sehingga mungkin tidak dapat mewakili keseluruhan pasien dengan kriteria ISPA berat yang dirawat inap di tiga RS dan belum dapat menggambarkan pola etiologi dari kasus ISPA berat di tahun 2016. Ketiga, studi ini tidak menganalisis hubungan antar virus, kejadian koinfeksi yang berkaitan dengan tingkat keparahan suatu penyakit.

Karakteristik dari virus-virus penyebab infeksi saluran pernafasan masih sangat penting untuk dikaji dalam penelitian-penelitian selanjutnya, karena belum ada pola etiologi secara pasti yang menggambarkan kasus ISPA berat yang dirawat inap di Indonesia. Masing-masing virus memiliki perbedaan prevalensi yang akan membentuk suatu pola sirkulasi virus yang spesifik. Oleh karenanya pemeriksaan virus penyebab ISPA dengan teknik multiplex PCR masih perlu dikembangkan untuk dapat menentukan epidemiologi virus-virus tersebut, yang mana akan membantu surveilans *Severe Acute Respiratory Infection* (SARI) Indonesia dalam pelaksanaan program pengendalian penyakit ISPA termasuk dalam pembatasan penggunaan agen antimikroba.

KESIMPULAN

Virus *Human Metapneumovirus* sebagai virus penyebab ISPA yang paling banyak terdeteksi dalam spesimen kasus ISPA berat yang dirawat inap menggunakan tehnik pemeriksaan diagnostik cepat *multiplex Real-time RT-PCR*.

SARAN

Pemeriksaan virus-virus secara *multiplex Real-time RT-PCR* sangat bermanfaat karena dapat dilakukan cepat dan secara bersamaan. Metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi virus saluran pernafasan selain influenza.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung dan didanai sepenuhnya oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Republik Indonesia. Kami menyampaikan terimakasih kepada tim surveilans di RSUD Deli Serdang Medan, RSUD Wonosari Daerah Istimewa Yogyakarta, dan RS Kanudjoso Djati Balikpapan dan seluruh pasien. Ucapan terima kasih juga kami haturkan kepada seluruh staf Laboratorium Virologi Puslitbang

Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan untuk bantuannya dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sentilhes AC, Choumlivong K, Celhay O, Sisouk T, Phonekeo D, Vongphrachanh P, et al. Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR. *Influenza and Other Respiratory Viruses Journal*. 2013;7(6):1070-1078.
2. Roselinda, Krisna NAP. Karakteristik kasus severe acute respiratory infection (SARI) di Indonesia tahun 2008-2009. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. 2013;2(2):75-82.
3. Kementerian Kesehatan RI. Laporan Risesdas tahun 2013. Jakarta: Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI; 2013.
4. Widodo YP, Rizki CD, Lintang DS. Hubungan perilaku keluarga terhadap kejadian infeksi saluran pernafasan atas (ISPA). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kesehatan*. 2016;7:1-12.
5. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(4):716-747.
6. Widoretno, Saraguh SM, Lokida D. Virus-virus saluran pernafasan yang paling banyak ditemukan pada anak balita pasien SARI (Severe acute respiratory infections). *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. 2012;1(2):93-98.
7. Salez N, Vabret A, Leruez-Ville M, Andreoletti L, Carrat F, et al. Evaluation of four commercial multiplex molecular tests for the diagnosis of acute respiratory infections. *Journal PloS ONE*. 2015;10(6):1-17.
8. Pangesti KNA, Susilarini NK, Pawestri HA, Setiawaty V. Influenza cases from surveillance acute respiratory infection in Indonesia, 2011. *Health Science Journal of Indonesia*. 2014;5(1):7-11.
9. Setiawaty V, Pawestri HA, Susilarini NK. Deteksi resistensi oseltamivir influenza A (H1N1pdm09) dari pasien infeksi saluran pernafasan akut berat di Indonesia tahun 2014. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2016;6(1):16-22. DOI : 10.22435/jki.v6i1.5415.16-22
10. Fast Track Diagnostics Ltd. Manual FTD respiratory pathogens 33. Luxembourg: Fast Track Diagnostics Ltd; 2016.
11. Khor CS, Sam IC, Hooi PS, Quek KF, Chan YF. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized

- children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 Years. *BMC Pediatrics*. 2012;12:1-9.
12. Widmer K, Zhu Y, Williams JV, Griffin MR, Edwards KM, Talbot HK. Rates of hospitalizations for respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus in older adults. *The Journal of Infectious Disease*. 2012;206(1):56-62.
 13. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *The New England of Medicine*. 2013;368(7):633-643.
 14. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014;25:45-52.
 15. Simusika P, Bateman AC, Theo A, Kwenda G, Mfula C, Chentulo E, et al. Identification of viral and bacterial pathogens from hospitalized children with severe acute respiratory illness in Lusaka, Zambia, 2011–2012: A Cross-Sectional Study. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(52):1-10.
 16. Purniti PS, Ida BS, Ida SI. Surveilans influenza pada pasien rawat jalan. *Sari Pediatri*. 2010;12:278-282.
 17. Adam K, Pangesti KN, Setiawaty V. Multiple viral infection detected from influenza-like illness cases in Indonesia. *BioMed Research International*. 2017;2017:1-5.
 18. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Pozo F, Flecha IC, Pérez-Breña P. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007;26(10):904-908.