

INFEKSI HUMAN PARAINFLUENZA VIRUS (HPIV) PADA BALITA DENGAN INFEKSI SALURAN PERNAFASAN AKUT BERAT DI RSU PROPINSI NUSA TENGGARA BARAT TAHUN 2014

Hartanti Dian Ikawati, Kartika Dewi Puspa, Vivi Setiawaty, Ni Ketut Susilarini*
Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan
Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
*email: niketutsusi@yahoo.com

Abstract

Acute respiratory infection (ARI) is a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially in children. An estimated 1.9 million children die because of ARI each year, with 70% of deaths occurred in Africa and Southeast Asia. Human Parainfluenza Virus (HPIV) is the second etiology of ARI in children after Respiratory Syncytial Virus (RSV). This study aims to determine the infection of HPIV in children under 5 years old with ARI at Nusa Tenggara Barat Province Hospital in 2014. Seventy five of 88 archived RNA from children under 5 years old with C_T (RNP) number <27 were selected with proportional random sampling. The specimens were tested for HPIV with gel-based RT-PCR using spesific primer for HPIV 1, 2 and 3. Of 75 specimens tested, none is positive for HPIV-2 and only one specimen positive for HPIV-3. This specimen came from 1 year old female from Mataram District. Primer for HPIV-1 failed to optimized, therefore none of the sample is tested with HPIV-1. This finding proved that there was HPIV infection in children under 5 years old with severe cases of ARI at Tenggara Barat Province Hospital in 2014.

Keywords: *Human Parainfluenza Virus (HPIV), Severe Acute Respiratory Infection, children*

Abstrak

Infeksi saluran pernapasan akut (ISPA) merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia, terutama pada anak-anak. Diperkirakan 1,9 juta anak meninggal akibat ISPA setiap tahun, dengan 70% kematian yang terjadi di Afrika dan Asia Tenggara. Sebagian besar ISPA disebabkan oleh virus, salah satunya adalah *Human Parainfluenza Virus* (HPIV). HPIV penyebab kejadian ISPA pada anak nomor dua setelah *Respiratory Syncytial Virus* (RSV). Studi ini bertujuan mengetahui adanya infeksi HPIV pada pasien balita ISPA berat di RSU Propinsi Nusa Tenggara Barat tahun 2014. Sampel pada studi ini berupa 75 dari 88 RNA tersimpan dari pasien balita di RSU Propinsi Nusa Tenggara Barat dengan nilai C_T RNP <27 yang dipilih secara *proporsional random sampling*. Pemeriksaan virus HPIV 1,2 dan 3 terhadap spesimen dilakukan dengan metode gel based RT-PCR. Dari 75 spesimen yang diperiksa, tidak didapatkan virus HPIV-2 dan hanya 1 sampel positif HPIV-3. Spesimen tersebut berasal dari pasien perempuan berusia 1 tahun yang berasal dari Kecamatan Mataram. Primer HPIV-1 tidak berhasil dioptimasi sehingga tidak dilakukan deteksi HPIV-1 terhadap sampel yang diperiksa. Hal ini membuktikan adanya infeksi HPIV pada pasien balita di RSU Propinsi Nusa Tenggara Barat pada tahun 2014.

Kata kunci: *Human Parainfluenza Virus (HPIV), ISPA berat, Balita*

Pendahuluan

Penyakit infeksi saluran pernapasan akut (ISPA) merupakan penyakit yang umum terjadi pada semua golongan umur. Prevalensi ISPA nasional berdasarkan data Riskesdas 2013 mencapai 4,5% dengan 35% didominasi oleh kasus ISPA pada balita. Provinsi Nusa Tenggara Barat mempunyai prevalensi ISPA yang tinggi yaitu sebesar 28,3%.^{1,2} Sejak tahun 2013, Badan Litbangkes telah melaksanakan Surveilans ISPA Berat di Indonesia (SIBI)

di enam sentinel rumah sakit yaitu RSUD Deli Serdang Sumatera Utara, RSUD Kanujoso Djati Kalimantan Timur, RSUD Wonosari DIY Yogyakarta, RSUD Bitung Sulawesi Utara, RSUD Haulussy Ambon dan RSU Propinsi Nusa Tenggara Barat. Surveilans SIBI ini fokus kepada deteksi dan monitoring kasus Influenza di Indonesia.

Sejumlah virus telah teridentifikasi menyebabkan ISPA, diantaranya influenza, *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) dan

Human Parainfluenza Virus (HPIV) tipe 1, 2 maupun 3. Rhinovirus, Coronavirus, *Human Metapneumovirus* (hMPV), Bocavirus, Adenovirus.^{1,3} HPIV termasuk dalam keluarga Paramyxoviridae dan merupakan penyebab kedua terbanyak infeksi saluran napas pada anak-anak setelah RSV.^{4,5} Virus RNA ini terdiri dari empat tipe yaitu tipe 1, 2, 3 dan 4. Tipe 1,2 dan 3 adalah tipe yang paling sering menyebabkan penyakit saluran pernapasan pada manusia dan menjadi penyebab infeksi nosokomial pada saluran pernapasan.⁶ Studi sebelumnya di Amerika menyebutkan bahwa sebanyak 40% ISPA berat pada anak disebabkan oleh HPIV dengan 20% diantaranya perlu mendapatkan perawatan di RS.⁷ Kekebalan tubuh yang rendah, *overcrowding*, malnutrisi, status pemberian ASI eksklusif dan polusi menjadi faktor yang berpengaruh terhadap infeksi HPIV.^{4,5} Bila dilihat dari jenis kelamin, laki-laki cenderung lebih rentan terinfeksi oleh HPIV.^{5,8}

Di daerah tropis, kasus HPIV positif mencapai puncaknya antara bulan Januari sampai April walaupun jenis serotipe yang muncul tidak terbatas pada satu serotipe saja. Studi mengenai infeksi HPIV di Thailand menemukan bahwa kasus HPIV terbanyak terjadi di bulan Februari sampai Maret.⁹

Studi ini bertujuan mengetahui adanya infeksi HPIV pada pasien usia balita dengan ISPA berat yang berasal dari RS sentinel surveilans ISPA berat di RSU Propinsi Nusa Tenggara Barat.

Metode

a. Pemilihan sampel

Sampel yang akan diperiksa untuk HPIV berasal dari RSU Propinsi Nusa Tenggara Barat berupa bahan biologi tersimpan berupa *Ribo Nucleic Acid* (RNA) virus hasil ekstraksi spesimen swab hidung dan/atau tenggorok kasus ISPA berat tahun 2014 dari anak usia balita. Total kasus ISPA Berat pada balita di RSU Propinsi Nusa Tenggara Barat adalah 276. Sampel RNA yang akan digunakan dalam penelitian adalah sampel dengan nilai C_t RNase P (RNP) <27. **Dari 88 sampel** dengan nilai *cycle threshold* (C_t) RNase P (RNP) <27 dipilih sebanyak 75 sampel secara *proporsional random sampling* untuk diperiksa lebih lanjut. Nilai C_t RNP ini menggambarkan kualitas RNA yang disimpan. Semakin rendah nilai C_t RNP maka kualitas RNA tersebut semakin baik.¹⁰

b. Pemeriksaan *gel based* RT-PCR

Pemeriksaan HPIV dilakukan dengan mengamplifikasi gen target HPIV menggunakan metode *gel based* PCR. Primer yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya.⁵

Tabel 1. Sekuen primer HPIV-1, HPIV-2 dan HPIV-3

Primer	Sekuen	Panjang target PCR (bp)
HPIV-1		477
Forward	CCT TAA ATT CAG ATA TGT AT	
Reverse	CGT ATC AAT AAT TAT TTA TC	
HPIV-2		502
Forward	AAC AAT CTG CTG CAG CAT TT	
Reverse	ATG TCA GAC AAT GGG CAA AT	
HPIV-3		477
Forward	CTG TAA ACT CAG ACT TGG TA	
Reverse	TTT AAG CCC TTG TCA ACA AC	

Bahan biologi tersimpan yang berupa RNA diamplifikasi dengan menggunakan primer yang telah dioptimasi sebelumnya. Optimasi primer dilakukan untuk memastikan *repeatability* dan *reproducibility* metode yang digunakan. Uji *repeatability* ini dilakukan oleh satu orang operator dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Sedangkan untuk memastikan *reproducibility* uji coba dilakukan pada sampel yang sama oleh dua operator yang berbeda tanpa pengulangan. Kontrol positif yang digunakan untuk optimasi primer HPIV-1 dan HPIV-2 adalah isolat virus HPIV-1 dan HPIV-2 dari WHO Collaborating Center (CC) for Influenza di Melbourne, Australia. Sedangkan untuk HPIV-3 digunakan sampel tersimpan yang telah dikonfirmasi positif HPIV-3. Reagen yang digunakan adalah *Super Script III One-Step RT PCR System with Platinum Taq High Fidelity kit* (Cat.12574035). *Master mix* yang terdiri dari : 3 μL *nuclease free water*, 2,5 μL MgSO_4 5 μM , 12,5 μL *2X reaction mix*, 0,5 μL primer F dan R masing-masing dengan konsentrasi 20 μL , 0,5 μL enzim. Jumlah reaksi disesuaikan dengan jumlah sampel yang dikerjakan ditambah dengan kontrol negatif dan kontrol positif sebagai pembanding. Penambahan 5 μL RNA sampel ke dalam *tube* yang berisi *master mix* dilakukan terakhir. Program *cycle RT-PCR* merujuk pada penelitian sebelumnya.⁵

Hasil RT-PCR diinterpretasi dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa konsentrasi 2% dengan tegangan 100 Volt selama 45 menit (*Mupid-Ex*) yang kemudian divisualisasikan di bawah sinar UV (*Gel Doc XR*). Pita yang terbentuk pada sampel dibandingkan dengan pita kontrol positif maupun kontrol negatif.

Untuk mengkonfirmasi hasil pemeriksaan dengan *gel based PCR*, dilakukan sekuensing terhadap spesimen yang positif HPIV 1, 2 maupun 3. Sekuensing dilakukan dengan metode Sanger dengan primer yang sebelumnya telah digunakan untuk pemeriksaan *gel based PCR*. Data sekuen kemudian dicari kesamaannya dengan data sekuen yang ada di NCBI (*National Center for Biology Information*) menggunakan *software BLAST (Basic Local Alignment Tool)*.

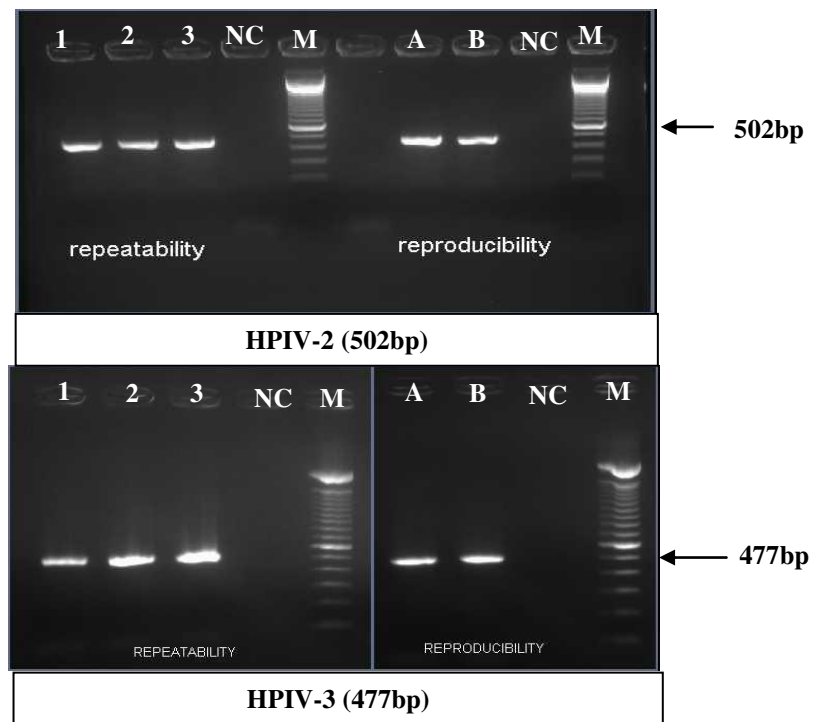
Studi ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan Nomor LB.02.01/5.2/KE.081/2015 tanggal 16 Februari 2015.

Hasil

Hasil optimasi primer HPIV-1 terhadap isolat HPIV-1 dari WHO CC Melbourne dengan elektroforesis tidak menunjukkan pita yang spesifik dengan panjang basa yang diinginkan yaitu 477 bp (gambar 1)

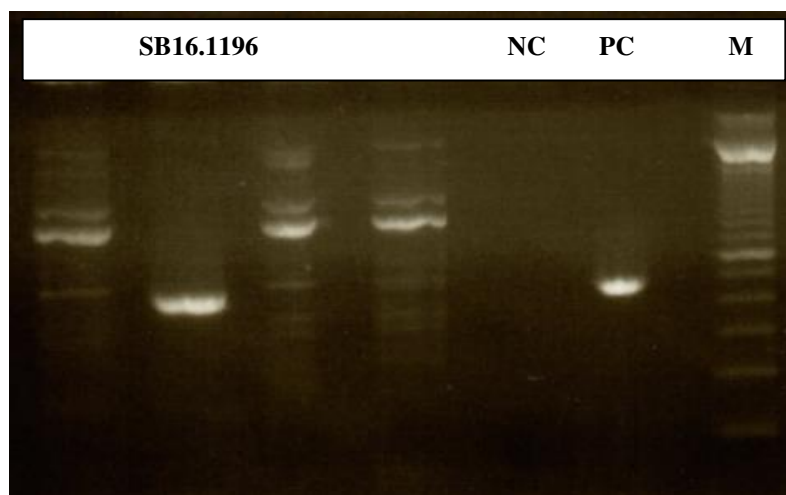
Pemeriksaan HPIV-1 terhadap sampel tidak bisa dilanjutkan karena tidak berhasilnya optimasi RT-PCR terhadap isolat HPIV-1 menggunakan primer yang digunakan, sehingga masih terdapat kemungkinan diantara sampel yang diperiksa terdapat sampel yang positif HPIV-1.

Primer HPIV-2 dan HPIV-3 berhasil dioptimasi dan memperlihatkan pita yang sesuai dengan target yang diharapkan yaitu 502 dan 477 bp (Gambar 4).



Keterangan : 1,2,3 : ulangan A,B : operator NC : *Negative control* M : Marker

Gambar 4. Hasil optimasi primer HPIV-2 dan HPIV-3.



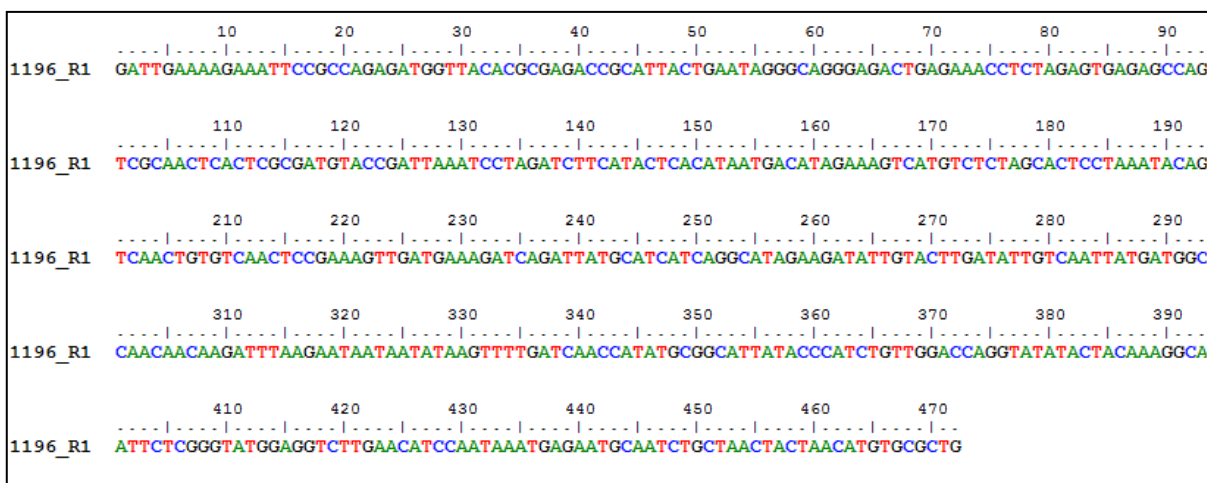
Gambar 5. Hasil positif pemeriksaan HPIV-3 sampel SB16.1196 NC: *Negative control* PC: *Positive control* M: Marker

Dari 75 spesimen yang diperiksa tidak ditemukan adanya HPIV-2 dan hanya 1 sampel (SB16.1196) yang menunjukkan hasil positif HPIV-3 (Gambar 5).

Selanjutnya, untuk memastikan bahwa hasil positif tersebut valid, dilakukan sekuensing terhadap 1 sampel yang positif terinfeksi HPIV-3 tersebut. Sekuen hasil sekuensing disajikan pada gambar 6.

Alignment Tool). Hasil BLAST terhadap sekuen tersebut mengkonfirmasi bahwa

sekuen tersebut positif HPIV-3. (Gambar 7) Data sekuen kemudian dicari kesamaannya dengan data sekuen yang ada di NCBI (*National Center for Biology Information*) menggunakan *software* BLAST (*Basic Local*



Gambar 6. Hasil sekuensing sampel SB16.1196



Gambar 7. Hasil BLAST sekuen sampel SB16.1196

Pasien adalah seorang anak perempuan, berusia 1 tahun yang berasal dari kecamatan Mataram. Pasien tersebut

datang dengan keluhan demam (38,7°C), batuk, diare, muntah dan sesak napas dengan frekuensi napas 55x/menit.

Terlihat tarikan dinding dada dan terdengar ronki ketika mengambil napas. Pasien juga mengalami kejang namun tidak ditemukan adanya tanda-tanda kesadaran yang menurun. Tidak ditemukan penyakit komorbid (**diabetes, penyakit ginjal kronis, tuberkulosis aktif, penyakit kardiovaskuler, Penyakit Paru Obstruktif Kronik, penyakit hati kronis, kelainan hematologis, kanker, asma**) yang menyertai. Berdasarkan hasil pemeriksaan pasien didiagnosa sebagai *bronchopneumonia* dengan hasil pemeriksaan X-ray nampak adanya infiltrat yang merupakan indikasi pneumonia. Selama dirawat diberikan antibiotik berupa ampicillin dan chloramphenicol. Pasien ini tidak memerlukan ventilator maupun perawatan di ruang ICU. Pasien dinyatakan sembuh setelah dirawat selama 7 hari (9-15 November 2014).

Pembahasan

Penentuan etiologi gangguan saluran pernapasan secara klinis maupun laboratorium masih menjadi tantangan tersendiri. Dalam 2 dekade terakhir, teknik pemeriksaan dengan menggunakan metode PCR telah berkembang pesat dan digunakan secara luas sebagai alat diagnostik. Metode ini dipilih karena spesifisitasnya yang tinggi untuk mendeteksi target gen suatu organisme.¹¹ Metode PCR yang digunakan untuk mendeteksi *Human Parainfluenza Virus* (HPIV) pada pasien ISPA berat usia balita di RSUD Propinsi Nusa Tenggara Barat adalah metode *gel based PCR*.

Dalam percobaan yang telah dilakukan, hanya primer HPIV-2 dan HPIV-3 saja yang berhasil dioptimasi sehingga perlu dilakukan desain ulang terhadap primer HPIV-1 dan optimasi kembali untuk memperoleh hasil yang diharapkan. Optimasi lanjut terhadap primer HPIV-1 dapat dilakukan dengan

menurunkan volume *template* DNA yang ditambahkan dalam *mix reagen*, menaikkan suhu *annealing*, menurunkan konsentrasi enzim DNA *polymerase*, menurunkan konsentrasi Mg yang digunakan, memperpanjang waktu denaturasi, menaikkan suhu denaturasi, menurunkan jumlah siklus PCR, menerapkan *hot start*, memendekkan waktu elongasi dan mengevaluasi kembali desain primer yang digunakan.¹²

Human Parainfluenza Virus-2 tidak terdeteksi dari 75 sampel yang diuji dan hanya 1 sampel yang menunjukkan hasil positif HPIV-3. Hasil positif ini telah dikonfirmasi dengan metode sekuensing. Sekuensing merupakan metode yang sangat sensitif untuk mendeteksi keberadaan suatu organisme pada sampel. Teknik ini memungkinkan kita mengetahui dengan tepat urutan basa sekuen target yang kita inginkan untuk kemudian dicocokkan dengan sekuen *reference* di *public genetic sequence database* seperti NCBI dan sebagainya. Keberadaan HPIV-3 pada sampel balita dengan ISPA ini mendukung temuan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan di daerah tropis dan subtropis yaitu bahwa HPIV-3 sebagai penyebab ISPA pada anak.¹³⁻¹⁸ Studi serologi juga menyebutkan bahwa 50% anak telah mempunyai antibodi terhadap HPIV-3 saat mereka berusia 1 tahun. Sedangkan untuk HPIV-1 dan HPIV-2 lebih sering menginfeksi anak di usia pra sekolah.^{7,19} Sebanyak 40% infeksi oleh HPIV-3 terjadi pada bulan-bulan awal kehidupan.²⁰ Hal ini disebabkan organ pada bayi masih belum matang dan sistem kekebalan tubuh yang belum tumbuh sempurna.⁵

Secara umum, tingkat morbiditas dan mortalitas pada pria lebih tinggi dibanding wanita. Hal ini terjadi karena meningkatnya suseptibilitas dan tingkat keparahan terhadap infeksi penyakit pada pria. Pada manusia, wanita dilaporkan mempunyai respon imun humoral dan

selular yang lebih kuat daripada pria. Tingginya level imunitas ini bisa menjadi proteksi terhadap infeksi patogen. Mekanisme yang mendasari hal ini meliputi efek endokrin dan genetik sistem imun, fisiologi dan perilaku yang berbeda.²¹

Gejala klinis yang muncul pada kasus positif HPIV sesuai dengan gejala khas infeksi HPIV yaitu sesak napas, diare, adanya ronki, kejang dan tarikan dinding dada serta adanya gambaran pneumonia. Munculnya diare pada pasien dengan HPIV membuktikan adanya aktivitas patogenik virus ini pada saluran pencernaan.¹⁴ Studi terdahulu telah membuktikan kaitan antara infeksi HPIV-3 dengan gangguan neurologis akut maupun kronis. Anak yang dirawat akibat HPIV-3 berpotensi untuk mengalami kejang demam.^{20,22}

Gambaran X-ray terhadap pasien A menunjukkan adanya infiltrat yang merupakan indikasi pneumonia. Henrickson dkk menyatakan infeksi HPIV-3 menyebabkan peradangan akut di saluran pernapasan yang memicu respon imun yang berakibat pada *acute pulmonary changes*. Meskipun begitu, infeksi virus ini sangat jarang menimbulkan kematian kecuali pada individu dengan gangguan imunitas.²³ Pada pasien ini tidak ditemukan riwayat penyakit penyerta (*comorbid*). Selain itu, tidak ditemukan indikasi keparahan sehingga tidak diperlukan ventilator dan pasien cukup dirawat di ruang rawat biasa. Pasien dinyatakan sembuh setelah dirawat selama 7 hari.

Di Indonesia sendiri studi mengenai HPIV sangat terbatas. Studi *cohort* mengenai virus saluran pernapasan pada populasi anak di Bandung tidak menemukan adanya infeksi oleh virus HPIV.²⁴ Studi lain di Semarang dan Solo terbatas pada kasus HPIV dari pasien dewasa.^{25,26} Studi infeksi HPIV pada balita dengan ISPA di RSUD

Propinsi Nusa Tenggara Barat ini membuktikan bahwa infeksi virus HPIV-3 pada balita dapat menyebabkan infeksi saluran pernafasan berat. Data mengenai infeksi HPIV pada balita di Indonesia masih sangat terbatas. Namun begitu studi ini mempunyai beberapa keterbatasan diantaranya jumlah sampel yang terlalu sedikit sehingga tidak cukup mewakili populasi kasus ISPA berat pada balita di RSUD Propinsi Nusa Tenggara Barat. Roder dkk menyatakan bahwa DNA akan mengalami fragmentasi setelah 18 kali siklus beku-cair. Stabilitas DNA maupun RNA sangat dipengaruhi oleh faktor pH, substansi pengoksidasi dan faktor fisik seperti kristal es. Sampel RNA yang diperiksa merupakan sampel tersimpan sehingga telah melewati siklus beku-cair. RNA mempunyai stabilitas yang lebih rendah dibanding DNA. Siklus beku-cair ini dapat merusak struktur RNA virus hasil ekstraksi dan berpengaruh terhadap hasil deteksi oleh primer yang digunakan.

Kesimpulan

Adanya infeksi HPIV yaitu HPIV-3 pada pasien balita di RSUD Propinsi Nusa Tenggara Barat pada tahun 2014.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai desain primer HPIV-1 agar dapat mendeteksi seluruh tipe HPIV termasuk HPIV-1.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kami haturkan kepada Drs. Ondri Sampurno, M.Si., Apt dan Dr.dr.Felly Philipus Senewe, M.Kes yang telah memberi bimbingan pada pelaksanaan Risbinkes 2015, dan kepada Badan Litbang Kesehatan yang telah memberikan dana penelitian ini melalui Risbinkes. Terima kasih juga kami sampaikan pada rekan-rekan peneliti di Laboratorium Virologi Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

Daftar Rujukan

1. Matu M, Kikui G, Wanzala P, Karama M, Symekher S. Aetiology of acute respiratory infections in children under five years in Nakuru, Kenya. *Journal of Microbiology & Experimentation* 2014
2. Laporan Riskesdas tahun 2013. Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI 2013
3. Njouom R, Yekwa E.L, Cappy P, Vabret A, Boisier P, Rousset D. Viral etiology of influenza-like illnesses in Cameroon, January–December 2009. *The Journal of Infectious Diseases* 2012;206 (S1):S29–35.
4. Liu WK, Liu Q, Chen D, Liang H, Chen X, Huang W *et al.* Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infectious Disease*.2013.
5. Villaran MV, Garcia J, Gomez J, Arango A.E, Gonzales M, Chicaiza W, *et al.* Human parainfluenza virus in patients with influenza-like illness from Central and South America during 2006–2010. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014;8(2):217-27.
6. Siu-yan L. Multiplex reverse transcription-PCR for detection and identification of human parainfluenza viruses 1,2,3 and 4 infection in hospitalized children with respiratory disease in Hong Kong. University of Hongkong (thesis).2007.
7. Reed G, Jewett PH, Thompson J, Tollefson S, Wright PF. Epidemiology and clinical impact of human parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children >5 years old. *The Journal of Infectious Diseases*.1997; 175:807 – 13.
8. Hall, CB. Medical Process: Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *The New England Journal of Medicine*. 2001; 344:1917-1928
9. Ruampunpong H, Payungporn S, Samransamruajkit R, Pratheepamornkul T, Theamboonlers A, Poovorawan Y.. Human parainfluenza virus infection in Thai children with lower respiratory tract infection from 2010 to 2013. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2014; 45 (3):610-21.
10. Duchamp MB, Casalegno JS, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V *et al.* Pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(4):317-21.
11. Van de Pol AC, Van Loon AM, Wolfs TFW, Jansen NJG, Nijhuis M, Breteler EK, *et al.* Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses and adenoviruses with real time PCR in samples from patient with respiratory symptoms. *J. Clin. Microbiol*.2007;45(7):2260-2262.
12. Grunewald, H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. *Methods in Molecular Biology*.Vo.226.PCR Protocol.2nd ed. Humana Press.2003
13. Shi W, Cui S, Gong C, Zhang T, Yu X, Li A *et al.* Prevalence of human parainfluenza virus in patients with acute respiratory tract infections in Beijing, 2011–2014. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015. doi: 10.1111/irv.12336
14. Kuan-Liu, W, Liu Q, Chen DH, Liang HX, Chen XK, Huang WB *et al.* Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infectious Diseases*.2013;13:28. doi: 10.1186/1471-2334-13-28.
15. Hon K.L, Leung TF, Cheung KL, Ng PC, Chan PK. Influenza and parainfluenza associated pediatric ICU morbidity. *Indian J Pediatr*.2010;77(10):1097–101.
16. Chan PKS, Tam WWS, Lee TC, Hon KL, Lee N, Chan MCW *et al.* Hospitalization incidence, mortality, and seasonality of common respiratory viruses over a period of 15 years in a developed subtropical city. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(46): e2024.
17. Bonire FS. A Serological survey of human parainfluenza viruses (HPIVs) among children in Kaduna Metropolis, Nigeria. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*.2015;10(1):60-65.
18. Freitas FT. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000–2010. *The Brazilian Journal for Infectious Disease and Contexto Publishing*.2013;17(1):62-68.
19. Marx A, Gary HE, Marston BJ, Erdman DD, Breiman RF, Torok TJ *et al.* Parainfluenza virus infection among adults hospitalized for lower respiratory tract infection. *Clinical Infectious Diseases*.1999;29(1):134–40
20. Henrickson K J. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*.2003;16(2):242
21. Muenchhoff M, Goulder PJR. Sex differences in pediatric infectious diseases. *The Journal of Infectious Diseases* 2014;209(S3):S120–126.
22. Belshe RB, Van Voris LP, Mufson MA. Impact of viral respiratory diseases on infants and young children in a rural an urban area of southern West Virginia. *Am J Epidemiol*.1983;117:467–474.
23. Butnor KJ, Sporn TA. Human Parainfluenza Virus giant cell pneumonia following cord

- blood transplant associated with pulmonary alveolar proteinosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(2):235–238.
24. Ling, SSW. Molecular epidemiology of respiratory virus in a pediatric cohort in Indonesia. Thesis at Queensland University of Technology.2010.unpublished
 25. Farida H, Gasem MH, Suryanto A, Keuter M, Zulkarnain N, Satoto B *et.al.* Viruses and Gram-negative bacilli dominate the etiology of community-acquired pneumonia in Indonesia, a cohort study.2015. *International Journal of Infectious Diseases* 38: 101–107
 26. Prasetyo AA, Desyardi MN, Tanamas J, Suradi, Reviono, Harsini *et.al.* Respiratory Viruses and Torque Teno Virus in Adults with Acute Respiratory Infections. *Intervirology* 2015;58:57–68
 27. Röder B, Frühwirth K, Vogl C, Wagner M, Rossmann P. Impact of long-term storage on stability of standard dna for nucleic acid-based methods. *J. Clin. Microbiol.* November 2010 vol. 48 no. 11 4260-4262