

Deteksi Penyebab dan Sebaran Kasus Kejadian Luar Biasa *Hand Foot and Mouth Diseases* (HFMD) Tahun 2008-2012

Nike Susanti¹, Herna¹, Sinta Purnamawati¹, Vivi Setiawaty¹,

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI
email: nikesusanti74@gmail.com

Abstract

Hand, foot, and mouth disease (HFMD) is a common disease caused by human enterovirus (HEV). The symptoms and signs of infection among children typically present with vesicular exanthema on the soles of their feet, the palms of their hands and in their mouths, causing discomfort and feeding difficulties. The disease is caused by mainly Coxsackie virus A16 (CVA16) serotype. It has recently been associated with EV-71 serotype which can also cause outbreak and mortality. Currently the data of HFMD cases in Indonesia is not available yet therefore this study aims to identify and determine the distribution of HFMD cases in Indonesia from the outbreak. HFMD can be identified by RT-PCR that recognize PAN-EV gene in the first place and has to be continued to EV-71 in VP1 area. Besides using PCR, we use isolation method using tissue cultures which are RD and 293 cell lines. From 48 suspected cases were received in virology lab CBBTH, NIHRD. 26 out of 48 cases (54%) were caused by enterovirus and 3 out of 26 were EV-71 (6,25%). The HFMD cases distribute in all group of ages and sex but children under five is the most susceptible.

Key words: *HFMD, Enterovirus, Outbreak, EV71*

Abstrak

Hand Foot and Mouth Diseases (HFMD) atau dalam bahasa Indonesianya dikenal sebagai penyakit Kaki Tangan Kuku dan Mulut. Penyakit ini umumnya menyerang anak-anak dan menimbulkan gejala yang khas seperti terbentuknya vesikula di telapak tangan, kaki dan di rongga mulut sehingga menimbulkan rasa tidak nyaman dan susah menelan. Penyebab Utama penyakit ini adalah enterovirus teruma Coxsackie A16. Belakangan ini penyakit HFMD juga berkaitan dengan EV-71 yang bisa menimbulkan Kejadian Luar Biasa dan kematian. Saat ini belum tersedia data penyebab kasus HFMD di Indonesia, oleh karna itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mengidentifikasi penyebab kasus HFMD di Indonesia dari kasus kejadian luar biasa. Identifikasi penyebab penyakit HFMD bisa dilakukan dengan menggunakan metode PCR dengan mengidentifikasi adanya gen Pan EV terlebih dahulu dan dilanjutkan dengan EV-71 spesifik di area VP1. Isolasi virus juga dilakukan dengan mengkultur virus di sel RD dan 293 untuk tujuan identifikasi dan memperbanyak serta memurnikan virus dari spesimen asli. Dari 48 kasus yang diterima laboratorium Virologi Pusat BTDK, Badan Litbang Jakarta, diketahui 26 kasus (54%) disebabkan oleh enterovirus dan 3 diantaranya adalah EV-71 (6.25%). Kasus HFMD dapat terjadi pada semua golongan umur dan jenis kelamin, akan tetapi anak-anak yang berumur antara 1-5 tahun sangat rentan menderita penyakit ini

Kata kunci : *HFMD, Enterovirus, KLB, EV71*

Pendahuluan

Hand Foot and Mouth Diseases (HFMD) atau dalam bahasa Indonesianya dikenal sebagai Penyakit Kaki Tangan dan Mulut (PMK), sudah ada sejak tahun 1957 dan pertama kali muncul di Toronto, Kanada. Penyakit ini juga dikenal dengan nama “Flu Singapura” karena gejalanya yang mirip dengan flu dan pada saat itu banyak terjadi kasus dan kematian akibat penyakit ini di Singapura. Beberapa negara di sekitar Indonesia selain Singapura yaitu Australia, Brunei, Malaysia, dan Vietnam bahkan melaporkan adanya wabah HFMD ini.¹ Penyakit ini berbeda dengan PMK yang biasa menyerang hewan (sapi/kambing).²

HFMD merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *enterovirus* terutama virus *Coxsackie A16* (CA 16) dan *Enterovirus 71* (EV 71), sedangkan serotipe lain yang juga dapat menyebabkan penyakit ini adalah CA 6 dan CA 10. Penyakit ini sering menyerang anak-anak. Gejala umum yang timbul diakibatkan terinfeksi penyakit ini adalah demam dan terbentuknya vesikula di kulit telapak tangan, kaki, dengan atau tanpa ulkus di rongga mulut sehingga menimbulkan rasa tidak nyaman dan susah menelan. Kadang-kadang bercak dapat hanya berupa makulopapular tanpa vesikel dan mengenai area pantat, lutut atau siku. Infeksi HFMD yang disebabkan oleh CA 16 pada umumnya dapat sembuh sendiri, bila ada komplikasi akan sangat ringan. Komplikasi yang lebih berat seperti edem paru, gagal jantung, infeksi pada sistem saraf (ensefalitis, meningitis aseptik, *acute flaccid paralysis*) bahkan kematian terutama disebabkan oleh EV71.^{1,2} Terakhir wabah HFMD karena EV 71 terjadi di Cina pada tahun 2007 dan menyebabkan kematian.

Di Indonesia, penyakit HFMD masih belum mendapat perhatian besar dari klinisi, masyarakat dan pemerintah, karena

umumnya penyakit ini ringan dan dapat sembuh sendiri. Penyakit ini bisa terjadi sepanjang tahun karena iklim di Indonesia yang tropis sehingga menyebabkan temperatur hangat sepanjang tahun. Virus penyebab HFMD ini dapat ditularkan melalui *fecal-oral*, rute pernafasan, atau melalui kontak langsung dengan sekret dari hidung dan tenggorok, air liur, cairan dari vesikel atau feses dari kasus yang terinfeksi virus ini.² Kepadatan penduduk dan sanitasi yang buruk menyebabkan penyakit ini mudah menyebar. Penyakit ini bisa berpotensi menyebabkan Kejadian Luar Biasa (KLB) karena penyebarannya yang sangat mudah.

Hampir setiap tahunnya Laboratorium Virologi Pusat BTDK, Badan Litbangkes Jakarta menerima spesimen dari kasus HFMD. Spesimen dapat berasal dari seluruh daerah di Indonesia sebagai kasus KLB. Metode deteksi penyebab penyakit HFMD ini dapat dilakukan dengan pemeriksaan laboratorium menggunakan metode PCR dan isolasi virus.

Saat ini belum tersedia data penyebab kasus HFMD di Indonesia, oleh karna itu penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi penyebab dan mengetahui sebaran kasus HFMD di Indonesia dari kasus kejadian luar biasa.

Metode

Pengambilan dan Penanganan Spesimen

Spesimen diterima dari 48 kasus penderita HFMD berupa swab tenggorok, *swab* vesikel, *swab rectal* dan *feces* yang berasal dari Provinsi DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Tengah, Lampung dan Kepulauan Riau. Pasien yang diambil spesimennya adalah pasien yang mengalami gejala infeksi HFMD seperti vesikel/ulkus di daerah tangan, kaki dan mulut. Jenis spesimen yang diambil berupa swab tenggorok, vesikel/ulkus, rektal dan tinja.

Swab diusap ke tenggorok/rektal dengan cara memutar swab yang telah dibasahi NaCl 0.9%. Pengambilan cairan vesikel dilakukan dengan menusuk vesikel dengan jarum steril secara hati-hati kemudian bagian dasar vesikel diswab. Swab tersebut lalu dimasukkan ke dalam medium transport untuk virus atau *viral transport medium* (VTM). Satu VTM hanya diperuntukkan satu swab. Tutup dan *seal* tabung VTM untuk menghindari bocor, beri identitas di tabung secara akurat. Spesimen tinja diambil, dimasukkan di wadah botol plastik yang kuat dan mempunyai ulir di bagian luar, tutup dan beri identitas yang tepat. Semua spesimen dikirim segera ke Laboratorium Virologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (BTDK), Badan Litbang Kesehatan Kementerian Kesehatan dengan menggunakan *cool box* yang berisi *ice pack/gel* dalam jumlah yang cukup sehingga suhu di dalam box tetap berkisar antara 2-8°C. Jika tidak segera dikirim ke laboratorium, tabung yang berisi spesimen disimpan di suhu 4°C, jangan disimpan di suhu -20°C. Spesimen yang diterima di Laboratorium Virologi Pusat BTDK Badan Litbangkes setelah dilakukan pengecekan terhadap kondisi spesimen, maka spesimen tersebut akan disimpan pada suhu 2-8°C.

Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan laboratorium meliputi pemeriksaan dengan cara *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan isolasi virus yang dilakukan untuk mendeteksi adanya enterovirus dan virus EV-71. VTM yang berisi swab spesimen diekstraksi terlebih dahulu dengan menggunakan kit ekstraksi RNA yang dijual secara komersial. Prosedur yang digunakan mengikuti prosedur yang dikeluarkan pabrik. Tahap selanjutnya dilakukan pemeriksaan Pan Enterovirus RT-PCR di 5'UTR dengan menggunakan primer MD 90 (5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3') dan MD 91 (5' -CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA T-3') untuk mendeteksi

adanya gen *Enterovirus*.³ Jika dideteksi adanya gen Pan Enterovirus maka dilanjutkan dengan pemeriksaan RT-PCR spesifik untuk EV-71 di VP1 dengan menggunakan primer MAS01S dan MAS02A dengan urutan asam basa MAS01S (5'- ATAATAGCA(C/T)T (A/G)GCGGCAGCCCA -3') dan MAS02A (5' - AGAGGGAG(A/G) TCT ATCTC(C/T)CC -3').⁴

PCR dilakukan dengan dua tahap yaitu tahap untuk mendapatkan cDNA dan dilanjutkan dengan tahap PCR dimana proses *denaturing*, *annealing* dan *extension* dilakukan sebanyak 35 siklus. Elektroforesis menggunakan agar *agarose* dengan konsentrasi 3% untuk pemeriksaan Pan EV dan 2% untuk pemeriksaan EV-71 spesifik dengan *pita/band* diharapkan berada pada posisi 154 bps untuk Pan EV dan 300-400 bps untuk EV-71 spesifik.⁴

Isolasi virus dilakukan dengan cara ekstraksi tinja dengan menggunakan larutan kloroform dan PBS yang mengandung Ca²⁺, Mg²⁺ dengan perbandingan 1:9, 1 gr *glass bead* dan 2 gram tinja. Campuran tersebut diaduk selama 20 menit menggunakan *mechanical shaker*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C dan diambil supernatannya. Sedangkan VTM yang berisi *swab* spesimen di saring dengan menggunakan *syringe filter* 0.22 µm. Ekstrak dan filtrasi VTM diambil sebanyak 0.2 ml dan dikultur di sel *rhabdomyosarcoma* (RD) dan B 293. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 14 hari. Sel RD sangat sensitif untuk menumbuhkan semua virus entero (*enterovirus*) dan sel 293 spesifik untuk EV-71. Pertumbuhan virus diamati setiap hari ditandai dengan adanya CPE (*cytopathic effect*) saat diamati di bawah mikroskop *inverted*. Jika ditemukan positif CPE sebelum 14 hari, isolat disimpan di freezer -20 °C untuk dilakukan pasase. Kultur yang tidak menunjukkan CPE hingga hari ketujuh inkubasi, disimpan di freezer -20 °C. Isolat yang

sudah beku dikeluarkan dari freezer -20 °C untuk dilakukan pasase dengan mengambil isolat sebanyak 0.2 ml dan dikultur di sel yang sama lalu diinkubasi di suhu 37 °C, pengamatan di bawah mikroskop inverted dilakukan selama 14 hari. Jika ditemukan negatif CPE pada sel 293 tetapi positif CPE pada sel RD maka isolat dari sel RD selajutnya dikultur juga di sel B 293.⁵

Hasil

Dalam kurun waktu tahun 2008 – 2012 Laboratorium Virologi Pusat BTDK Badan Litbang Kesehatan menerima spesimen kasus HFMD berupa swab tenggorokan, vesikel dan rektal yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia. Dari 48 kasus yang diterima, kasus tertinggi ditemukan pada tahun 2008 dan terbanyak berasal dari Provinsi DKI Jakarta. (Tabel 1).

Tabel 1. Sebaran Kasus Berdasarkan Asal Kasus Tahun 2008-2012

Provinsi	Tahun				
	2008	2009	2010	2011	2012
	n = 20	n = 10	n = 0	n = 4	n = 14
DKI	17 (85,0 %)	5 (50,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Jawa Barat	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	11 (78,6 %)
Jawa Timur	1 (5,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Lampung	0 (0,0 %)	5 (50,0 %)	0 (0,0 %)	4 (100,0 %)	3 (21,4 %)
Batam	1 (5,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
SulTeng	1 (5,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)

Kejadian kasus HFMD yang diterima selama kurun waktu 5 tahun (2008-2012) berasal dari semua golongan umur dan jenis kelamin, terbanyak ditemukan pada anak-anak yang berumur di bawah 5 tahun terutama rentang umur antara 1- 5 tahun akan tetapi tidak terlihat adanya perbedaan proporsi jenis kelamin. (Tabel 2). Pada pemeriksaan secara PCR yang dilakukan terhadap amplicon dari spesimen swab tenggorok, vesikel, dan

rektal dengan menggunakan sepasang primer MD90/91 didapatkan pita/band yang berada di kisaran posisi 150 - 200 bps. (Gambar 1). Dari semua kasus yang diperiksa hanya 26 kasus (54.2%) ditemukan positif Pan Enterovirus (Pan EV) yang tersebar di setiap tahunnya (Tabel 3). Tabel 3. Kasus dengan Positif Pan EV.

Tabel 2. Sebaran Kasus Berdasarkan Umur dan Jenis Kelamin

Karateristik	Tahun				
	2008 n = 20	2009 n = 10	2010 n = 0	2011 n = 4	2012 n = 14
Umur					
0-1 tahun	8 (40,0 %)	2 (20,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	3 (21,4 %)
>1-5 tahun	7 (35,0 %)	6 (60,0 %)	0 (0,0 %)	4 (100,0 %)	11 (78,6 %)
>5-15 tahun	4 (20,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
>15 tahun	1 (5,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Tanpa data umur	0 (0,0 %)	2 (20,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
Jenis Kelamin					
Laki-laki	11 (55,0 %)	3 (30,0 %)	0 (0,0 %)	3 (75,0 %)	7 (50,0 %)
Wanita	9 (45,0 %)	7 (70,0 %)	0 (0,0 %)	1 (25,0 %)	7 (50,0 %)



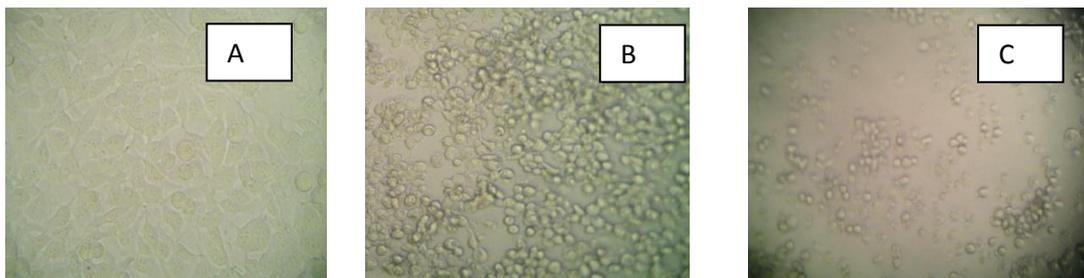
Gambar 1. Amplifikasi EV Menggunakan Primer MD90/91

Tabel 3. Kasus dengan Positif Pan EV

Kasus	Tahun				
	2008 n = 20	2009 n = 10	2010 n = 0	2011 n = 4	2012 n = 14
Positif	1 (5,0 %)	1 (10,0 %)	0 (0,0 %)	1 (25,0 %)	0 (0,0 %)
Negatif	19 (95,0 %)	9 (90,0 %)	0 (0,0 %)	3 (75,0 %)	14 (100,0 %)

Spesimen HFMD dikultur di sel RD dan 293 dan diobservasi selama 28 hari yang dilakukan 2 tahap. Masing-masing tahap diinkubasi dan observasi selama 14 hari. Virus yang tumbuh di sel akan memberikan gambaran CPE yang khas di

sel ketika diamati di bawah mikroskop. Virus yang tidak bereplikasi di sel tidak akan menyebabkan perubahan morfologi sel yang akan terlihat sama seperti sel kontrol (Gambar 3).



Gambar Sel RD dengan perbesaran 100 X . (A) Sel RD kontrol yang tidak dinokulasi virus, (B) Sel RD yang mengalami CPE 50% dan (C) Sel RD yang mengalami CPE 100%

Pembahasan

Dalam penelitian ini menunjukkan adanya variasi jumlah kasus yang diterima setiap tahunnya. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi jumlah temuan kasus HFMD di antaranya jumlah penduduk di masing-masing daerah, kepadatan penduduk, sanitasi juga pengetahuan dan keaktifan petugas terhadap temuan kasus HFMD. Pendapat ini didukung oleh WHO dan beberapa penelitian yang dilakukan oleh Dhenni ditahun 2008 dan Kuramitsu di tahun 2005.^{6,7} Kasus HFMD ditemukan hampir setiap tahun, ini dikarenakan Indonesia mempunyai iklim tropis dimana temperatur yang hangat terjadi sepanjang tahun, ini sesuai dengan pernyataan WMI serta Rotbart dan kawan-kawan.^{8,9}

Kasus HFMD hanya sebagian kecil yang disebabkan oleh virus EV-71. Sebagian besar kasus HFMD disebabkan oleh virus entero (*enterovirus*) lainnya. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Mong How Ooi, dkk, yang dilakukan di Malaysia, virus coxackie A16 memberikan kontribusi besar sebagai penyebab penyakit HFMD.¹⁰ Hal serupa diutarakan oleh Wi-Sun Ryu pada kasus HFMD juga ditemukan virus entero lainnya seperti Coxsackie A, Coxsackie B dan Echovirus.¹¹

Kejadian luar biasa kasus HFMD yang disebabkan oleh EV 71 selama 5 tahun tersebut belum dilaporkan adanya komplikasi penyakit berat berupa manifestasi gangguan neurologis seperti kasus KLB EV71 di negara lain. Australia bagian barat pada tahun 1999 dan Brunei pada tahun 2006, melaporkan adanya KLB EV 71 dengan komplikasi neurologis.^{12,13} Tidak adanya data komplikasi yang berat dapat disebabkan kurangnya informasi yang diberikan oleh dokter pada saat mengirimkan spesimen ke laboratorium. Keterangan gejala penyakit yang lengkap dari para klinisi pada saat mengirimkan spesimen sangatlah penting untuk upaya tindak lanjut.

Perbedaan jenis kelamin tidak mempengaruhi kepekaan seseorang untuk terinfeksi *enterovirus* sebagai penyebab penyakit HFMD. Menurut WHO penyebaran *enterovirus* lebih oleh tingkat kebersihan, kepadatan penduduk, kualitas

air dan kekebalan tubuh seseorang. Pernyataan ini juga diperkuat oleh hasil penelitian Dietz, dkk (1995) dan Elisabet Witso (2006) yang menyatakan bahwa tidak adanya hubungan antara jenis kelamin dengan infeksi *enterovirus*.^{14,15}

Anak-anak balita terutama yang berumur antara 1-5 tahun rentan menderita penyakit HFMD. Hal ini diperkuat oleh Jin-feng Wang, dkk pada penelitiannya, yang menemukan bahwa bayi dan anak-anak yang berumur dibawah 5 tahun sangat rentan menderita penyakit HFMD yang disebabkan oleh *enterovirus*.¹⁶ Hal serupa juga diungkapkan oleh Dhenni (2008), Pallancsh dan Roos (2006) dan juga Dietz, dkk (1995), menyatakan umur menyebabkan perbedaan kepekaan terhadap infeksi enterovirus. Walaupun vaksin untuk mencegah penyakit ini belum ada tapi resiko penularan penyakit ini dapat diturunkan dengan perilaku hidup sehat.^{6,14,17}

Kesimpulan

Kasus HFMD di Indonesia hanya sebagian kecil yang disebabkan oleh EV-71, sebagian besar disebabkan oleh enterovirus type lainnya. Penyakit HFMD lebih rentan diderita oleh anak-anak berumur di bawah 5 tahun akan tetapi tidak berpengaruh terhadap perbedaan jenis kelamin.

Saran

Masih sedikitnya daerah yang mengirimkan sampel HFMD ke laboratorium virologi PBTDK menunjukkan masih belum adanya kewaspadaan menyeluruh di seluruh wilayah Indonesia. Oleh sebab itu, data yang ada masih belum menggambarkan

distribusi penyakit ini di Indonesia dan pola penyebarannya secara keseluruhan juga terkesan masih sporadis. Penulis merasa masih perlunya sosialisasi mengenai penyakit ini dan surveilans aktif untuk penyakit HFMD.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada teman-teman peneliti dan perekayasa di laboratorium Virologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbang Kesehatan Jakarta yang telah membantu dalam identifikasi virus dari kasus KLB HFMD.

Daftar Rujukan

- Public Health Agency of Canada. 2008. Hand-Foot-Mouth Disease related to Enterovirus 71. Diunduh dari <http://www.phac-aspc.gc.ca/id-mi/ev71-eng.php>. Diakses pada 11 April 2014.
- World Health Organization. 2002. Hand, Foot and Mouth Disease. Diunduh dari http://www.wpro.who.int/mediacentre/factsheets/fs_10072012_HFMD/en/. Diakses pada 11 April 2014.
- Romero JR and Rotbart HA. PCR detection of the human enterovirus. In: Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds).1993:p401-406.
- Perera D, Podin Y, Akin W, Tan C and Cardoso MJ. Incorrect identification of recent Asian strains of Coxsackievirus. Article BMC Infectious Diseases. 2004;4;11.
- WHO. 2004. Polio Laboratory Manual, 4th edition.
- Dhenni R. Deteksi dan Identifikasi Enterovirus pada anak-anak Balita di Desa Antajaya, Kecamatan Tanjung Sari, Kabupaten Bogor, Universitas Indonesia, 2008
- Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okumura J, Sshimizu H, Nayantura L, Ochir D. Non-Polio Enterovirus Among Families in Ulaanbaatares in Ulaanbaatar and Tov Province, Mongolia : Prevalence, Intrafamilial S and Tov Province, Mongolia: Prevalence, Intrafamilial Spread, and Risk Factors for Infectpread, and Risk Factors for Infection, *Epidemiology of Infection*. 2005;133;1131–1142.
- World of Microbiology and Immunology (WMI). Enterovirus Infection. Thompson Cooperation. 2005-2006.
- Rotbart HA. Enterovirus. *Clinical Virology*. 2th Ed. 2002;p. 971-989.
- Ooi MH, Solomon T, Podin Y, et.al. Evaluation of Different Clinical Sample Types in Diagnosis of Human Enterovirus 71-Associated Hand-Foot-and-Mouth Disease. *J. Clin. Microbiol.*,2007;45(6);1858.
- Ryu WS, Kang B, Hong J, Hwang S, Kim J, Cheon D. Clinical and Etiological Characteristics of Enterovirus 71-Related Diseases during a Recent 2-Year Period in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*.2010;p.2490-2494.
- McMinn P, Stratov I, Nagarajan L and Davis S. Neurological manifestation of EV 71 Infection in Children during an Outbreak of Hand, Foot, and Mouth Disease in Western Australia. *Clin.Infect.Dis*.2001;32(2):236-242.
- Abubakar S, Sam I, Yusof J, Lim MK, Misbah S, et.al. Enterovirus 71 Outbreak, Brunei. *Emerg.Inf.Dis*.2009;15(1);79-82.
- Dietz V, Andrus J, eive JMO, Cochi S and Quadros C. Epidemiology and Clinical Characteristics of Acute Flaccid Paralysis Associated with Nonpolio Enterovirus Isolation: The Experience in The Americas, *Bulletin of the World Health Organization*. 1995;73(5):597-603.
- Witso E, Palacios G, Cinek O, et.al. High Prevalence of Human Enterovirus A Infections in Natural Circulation of Human Enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*.2006;p.4095–4100.
- Wang J, Guo Y, Christakos G, et.al. Hand, foot and mouth disease: spatiotemporal transmission and climate. *Journal at International Journal of Health Geographics*, 2011;10;25.
- Pallansch MA and Roos RP. Enterovirus: Polioviruses, Coxsackie viruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In D.M.Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman & S.E. Straus (Eds.). *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadel-phia, PA. 2006:723–775.