

NGHIÊN CỨU VỀ BỆNH NGUYÊN VIRUS GÂY NHIỄM TRÙNG HÔ HẤP DƯỚI Ở TRẺ EM NHẬP VIỆN TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ TỪ THÁNG 3 NĂM 2010 ĐẾN THÁNG 4 NĂM 2011

Lê Văn An^{1,2}, Huỳnh Thị Hải Đường^{1,2}, Nguyễn Chiến Thắng^{1,2}, Nguyễn Hoàng Bách^{1,2}, Lê Thị Bảo Chi^{1,2}, Phan Thị Bích Chi³, Lê Thị Ngọc Việt³, Đinh Quang Tuấn³, Cappuccinelli Piero².

(1) Bộ môn Vi sinh, Đại học Y Dược Huế

(2) Trung Tâm Carlo Urbani, Đại học Y Dược Huế

(3) Khoa Nhi, Bệnh viện Trung ương Huế

Tóm tắt

Giới thiệu: Nhiễm trùng hô hấp dưới do virus đóng vai trò có ý nghĩa trong bệnh tật và tử vong ở trẻ em, xác định các virus gây nhiễm trùng thường khó khăn ở các nước đang phát triển do thiếu phương tiện chẩn đoán virus. Nghiên cứu này nhằm khảo sát các bệnh nguyên virus gây nhiễm trùng hô hấp dưới ở trẻ em nhập viện. **Phương pháp:** Bệnh phẩm ngoáy họng ở 216 trẻ em nhập viện với lâm sàng nhiễm trùng hô hấp dưới được thu tập và xác định các virus gây nhiễm trùng bằng các quy trình PCR và RT-PCR. **Kết quả:** Nhiễm trùng virus được xác định ở 91 bệnh nhân (42%) với 107 virus, hầu hết (92%) bệnh nhân bị nhiễm trùng ở độ tuổi dưới 5 tuổi, trong đó 76 bệnh nhân (84%) bị nhiễm trùng do 1 virus và 15 bệnh nhân (16%) có nhiễm trùng do 2 hay 3 virus. Các virus gây nhiễm trùng gồm virus cúm A có 41 trường hợp (tỷ lệ 45%), virus cúm B 7 (8%), RSV có 38 (42%), adenovirus có 11 trường hợp (12%), các parainfluenza typ 1 và typ 3 mỗi loại 5 (5%). Trong các nhiễm trùng phối hợp, sự phối hợp RSV và virus cúm A là thường gặp (8), tiếp đến là RSV và adenovirus (3). Nhiễm trùng RSV xảy ra trong nhiều tháng, trong khi nhiễm trùng do virus cúm tập trung vào các tháng từ 10/2010 đến tháng 2 năm 2011, virus cúm A(H1N1)pdm09 là dưới typ nổi trội trong nhiễm trùng do virus cúm A. **Kết luận:** Các virus hô hấp được tìm thấy với một tỷ lệ đáng kể ở bệnh nhân nhập viện do nhiễm trùng hô hấp cấp dưới, các virus thường gặp là RSV và virus cúm A thuộc dưới typ A(H1N1)pdm09.

Từ khóa: các virus đường hô hấp, virus cúm, RSV, nhiễm trùng hô hấp dưới, kỹ thuật khuếch đại gen.

Abstract

A STUDY ON VIRAL ETIOLOGIES OF LOWER RESPIRATORY INFECTIONS IN CHILDREN HOSPITALIZED IN HUE CENTRAL HOSPITAL FROM MARCH 2010 TO APRIL 2011

Le Van An^{1,2}, Huynh Thi Hai Duong^{1,2}, Nguyen Chien Thang^{1,2}, Nguyen Hoang Bach^{1,2}, Le Thi Bao Chi^{1,2}, Phan Thi Bich Chi³, Le Thi Ngoc Viet³, Dinh Quang Tuan³, Cappuccinelli Piero²

(1) Department of Medical Microbiology, HUMP

(2) Carlo Urbani Centre, HUMP

(3) Department of Pediatrics, Hue Central Hospital

Introduction: Lower respiratory infections caused by respiratory viruses have played an important role in morbidity and mortality in young children. Identification of viral etiologies has not been done in poor countries due to the lack of laboratory facilities for viral diagnosis. This study was to determine viral etiologies in children hospitalized with lower respiratory infections. **Patients and methods:** Nasal pharyngeal swabs or throat swabs were collected from 216 children hospitalized

clinically with lower respiratory infections and processed for viral identification by RT-PCR and PCR. **Results:** Viral respiratory infections were detected in 91 children (42%) with 107 respiratory viruses, majority of infected children were younger than 5 years of age. among them 76 children (84%) have single infection and 15 children (16%) have co-infections of 2 or 3 viruses. The most common respiratory virus was influenza A virus with 41 cases (45%), followed by RSV with 38 cases (42%), adenovirus in 11 cases (12%), influenza B virus in 7 (8%) and parainfluenza virus type 1 and 3 in 5 cases (5%) each. RSV infections were found in several months, whereas, influenza virus infections were found in high numbers in rainy and cold months from October of 2010 to February of following year, influenza A(H1N1)pdm09 was the predominant subtype of influenza A virus. **Conclusion:** Respiratory viruses were found with the high rate in children hospitalized with lower respiratory infections; the common viruses detected were influenza A(H1N1) pdm09 virus and RSV.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng hô hấp là một nguyên nhân quan trọng của bệnh tật và tử vong ở trẻ em dưới 5 tuổi, theo báo cáo của WHO năm 2004 về số bệnh nhân tử vong do nhiễm trùng hô hấp dưới trên toàn thế giới là 4.2 triệu người ở mọi lứa tuổi, chiếm tỷ lệ 7.1% số tử vong do tất cả các nguyên nhân [15]. Nhiễm trùng hô hấp dưới gồm viêm phế quản, viêm tiểu phế quản, viêm phổi [18], trong đó viêm phổi là nguyên nhân gây chết hàng đầu ở trẻ em dưới 5 tuổi, tỷ lệ tử vong do viêm phổi ở trẻ em ở các nước châu Phi là 50%, ở các nước Đông Nam Á là 25%, và ở các nước còn lại là 25% [15].

Về khía cạnh bệnh nguyên, nhiều vi khuẩn gây nhiễm trùng hô hấp truyền thống ở trẻ em được mô tả bao gồm *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenza*, *Bordetella pertussis*. Các virus hô hấp cũng đóng một vai trò quan trọng trong nhiễm trùng hô hấp cấp, đặc biệt là nhiễm trùng hô hấp dưới ở trẻ em và người lớn, tuy vậy, nguyên nhân virus thường không được chẩn đoán ở các nước đang phát triển do chẩn đoán virus cần có phương tiện và phòng thí nghiệm có trang bị hoặc cần có nuôi cấy tế bào để phân lập virus. Trong 20 năm trở lại đây, với sự hỗ trợ của các kỹ thuật phân tử dùng trong chẩn đoán virus học, nhiều phòng thí nghiệm ở các nước đang phát triển đã có thể chẩn đoán được các virus gây nhiễm trùng hô hấp, đặc biệt hơn nhiều tác nhân virus mới gây nhiễm trùng hô hấp cũng đã được phát hiện như human metapneumovirus (hMPV), coronavirus-HKU1 (CoV-HKU1), human coronavirus -NL63 (HCoV-NL63) và human bocavirus (HBov) [9]. Khảo sát gần đây ở Việt Nam cho thấy bệnh

nguyên virus đóng một vai trò quan trọng trong gây nhiễm trùng hô hấp cấp ở trẻ em nhập viện cũng như trong cộng đồng. Nghiên cứu của Do AHL và các tác giả ở Trung Tâm bệnh nhiệt đới thuộc đại học Oxford, đặt tại Tp HCM cho thấy từ năm 2004- 2008 trên tổng số 306 trẻ em dưới 5 tuổi nhiễm trùng hô hấp nhập viện, các tác giả ghi nhận nhiễm trùng do virus hợp bào đường hô hấp (RSV) chiếm tỷ lệ 24%, tiếp đến là virus cúm 17%, parainfluenza virus (PIV) 7%, và adenovirus 5% [1]. Ở miền trung Việt Nam từ trước đến nay chưa có một nghiên cứu nào khảo sát về tình hình nhiễm trùng hô hấp do virus ở các bệnh nhân bị nhiễm trùng hô hấp. Nhằm hiểu rõ vai trò các virus gây nhiễm trùng hô hấp dưới ở trẻ em nhập viện ở Thừa Thiên Huế, chúng tôi thực hiện nghiên cứu về bệnh nguyên virus gây nhiễm trùng hô hấp dưới nhập viện ở Bệnh viện Trung ương Huế từ năm 2010- 2011.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện trên 216 bệnh nhi nhiễm trùng hô hấp dưới (NTHHD) nhập viện tại khoa hô hấp Bệnh viện Trung ương Huế. Chẩn đoán lâm sàng dựa vào hướng dẫn của WHO với các biểu hiện chảy mũi nước, sốt, viêm họng, ho, thở nhanh, co kéo (trẻ em < 2 tuổi), âm rít, và ran ẩm [4, 5, 6, 16, 17].

Không đưa vào nghiên cứu các bệnh nhân bị hen phế quản hoặc có bệnh sử bị hen phế quản, bệnh nhân có các triệu chứng của hô hấp dưới có công thức máu với số lượng bạch cầu > 7. 10⁹ tế bào/L.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Bệnh phẩm ngoáy họng hoặc ngoáy mũi hầu được cho vào môi trường vận chuyển VTM (viral transport medium, Becton Dickinson) và chuyển về phòng thí nghiệm trong khoảng 2 giờ, trường hợp chưa chuyển ngay được đặt vào tủ lạnh âm 20°C.

Ở phòng thí nghiệm, bệnh phẩm được trộn đều và tách chiết RNA bằng bộ sinh phẩm và quy trình Qiagen (Qiagen viral RNA mini kit) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, dịch tách RNA được giữ ở nhiệt độ âm 20°C. Mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân được xét nghiệm tìm các virus cúm A và B, dưới typ cúm A, RSV, adenovirus, và parainfluenza virus typ 1, 2, 3, 4 bằng các quy trình khuếch đại gen dưới đây:

- Định type virus cúm A và B bằng quy trình multiplex RT-PCR được mô tả bởi Boonsuk P và các đồng tác giả [3] và xác định dưới typ cúm A(H1N1)pdm09 bằng RT-PCR của viện nghiên cứu nhiễm trùng, Tokyo, Nhật Bản [19], định typ H3N2 và H1N1 mùa bằng quy trình multiplex RT-PCR của Percivalle E và đồng tác giả [11]; Chứng dương các virus cúm A và B được cung cấp từ các nguồn sau: Influenza A(H1N1)pdm09 virus, viện Pasteur HCM, H3N2/HongKong/8/68; seasonal H1N1/Puerto Rico/8/34; Flu B/Lee/40 từ GS Clementi, phòng thí nghiệm virus học bệnh viện San Raffaele Hospital, Milan.

- Xác định virus RSV bằng quy trình RT-PCR tổ với cấu trúc mô và quy trình đã mô tả của Rohwedder A [12], chứng dương là virus RSV được cung cấp từ TS. Helmer và GS. Christian Drosten, Viện virus học Bonn.

- Xác định các parainfluenza virus bằng quy trình RT-PCR tổ hai bước với gen mô đã được dùng bởi Lam và đồng tác giả [8]. Trong đó chương trình nhiệt có thay đổi với bước đầu 95°C/15min, tiếp theo 40 chu kỳ với 95°C/1min, 55°C/1 min và 72°C/1min, và bước 2 với 95°C/5 min tiếp theo 40 chu kỳ với 95°C/1 min, 50°C/1min và 72°C/2 min, kéo dài cuối cùng 72°C/5 min. Các chứng dương parainfluenza virus typ 1, 2, 3, 4 do TS. Helmer và GS. C. Drosten thuộc viện virus học Bonn cung cấp.

- Xác định adenovirus với gen mô và quy trình khuếch đại theo mô tả của McDonough [10]. Chứng dương do GS. Caterina Serra, phòng thí nghiệm vi sinh học lâm sàng Đại học Sassari cung cấp.

Bệnh nhân được xác định nhiễm trùng virus khi bệnh phẩm của bệnh nhân cho kết quả dương tính với một trong các virus nêu trên. Nhiễm trùng đơn độc khi bệnh phẩm chỉ dương tính với 1 virus xác định. Nhiễm trùng hỗn hợp khi có 2 hay nhiều hơn virus dương tính trong mẫu bệnh phẩm.

2.3. Xử lý số liệu

Dùng chương trình thống kê của phần mềm MedCalc phiên bản 8.0.1.0.

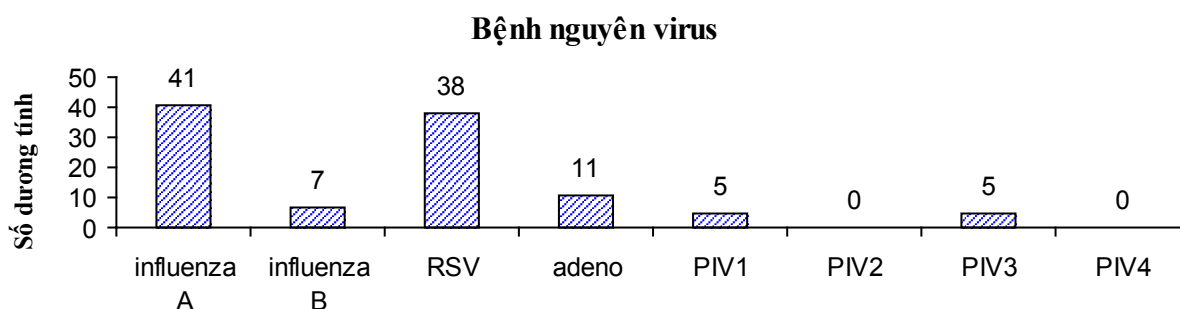
3. KẾT QUẢ

Bảng 1. Dữ liệu về tuổi và giới của bệnh nhân

Đặc điểm	Số trẻ em NTHHD nhập viện (N= 216)	Bệnh nhân nhiễm virus hô hấp (N = 91)
Tuổi	3 tháng đến 15 tuổi	3 tháng đến 12 tuổi
0.3- 1	99 (46%)	42 (46%)
>1- 2	64 (30%)	22 (24%)
>2- 5	38 (17%)	20 (22%)
> 5	16 (7%)	7 (8%)
Tuổi trung bình	2	2.1
Trung vị	1.2	1.1
Nam	127 (59%)	58 (64%)
Nữ	89 (41%)	33 (36%)

216 bệnh nhi nhập viện với nhiễm trùng hô hấp cấp dưới và 91 (42%) bệnh nhi được xác định dương tính với các virus hô hấp thử nghiệm. Tuổi trung bình của bệnh nhi nhập viện và bệnh nhi có nhiễm virus là 2 và 2.1 theo thứ tự. Nhóm tuổi trẻ em nhập viện và trẻ em có virus hô hấp dương tính được trình bày chi tiết ở Bảng 1

3.1. Bệnh nguyên virus



Biểu đồ 1. Phân bố bệnh nguyên virus hô hấp

Có 107 virus được xác định ở 91 bệnh nhân, trong số này 76 (84%) là nhiễm trùng do 1 virus và 15 bệnh nhân (16%) nhiễm trùng phối hợp 2 hay 3 virus. Sự thường gặp của các virus gồm virus cúm A 45%, virus cúm B là 8%, virus hợp bào hô hấp là 42%, adenovirus là 12%, parainfluenza typ 1 là 5% và parainfluenza typ 3 là 5%. Phân bố các virus hô hấp được mô tả ở biểu đồ 1

3.2. Nhiễm trùng do 1 virus và nhiễm phối hợp

Bảng 2. Các phối hợp virus trong nhiễm trùng phối hợp

Phối hợp các virus gây bệnh	Số lượng
RSV + virus cúm A	8
RSV + adenovirus	3
Parainfluenza virus 1 and 3	2
RSV + parainfluenza virus	1
RSV + adenovirus + virus cúm A	1
Tổng số	15

Trên bảng 2, chúng ta thấy trong nhiễm trùng đơn độc, có 32 trường hợp (42%) do virus cúm A, tiếp đến RSV 26 (34%) adenovirus và virus cúm B đều có 7 trường hợp (9%), parainfluenza typ 1 và 3, mỗi typ có 2 trường hợp (3%).

Trong 15 nhiễm trùng phối hợp, có 10 bệnh nhân bị viêm phổi trong đó 5 trường hợp do virus cúm A và RSV, 2 bệnh nhân do RSV và adenovirus, 1 bệnh nhân bị nhiễm 3 virus là RSV, adenovirus và virus cúm A, 2 bệnh nhân nhiễm trùng do parainfluenza typ 1 và typ 3. Có 4 bệnh nhân viêm tiểu phế quản có nhiễm trùng phối hợp trong đó 3 trường hợp phối hợp virus cúm A và RSV và 1 bệnh nhân có phối hợp RSV và parainfluenza. Chỉ có 1 trường hợp viêm phế quản do phối hợp adenovirus và RSV.

3.3. Nguyên nhân virus và các vị trí nhiễm trùng

Bảng 3. Các virus được xác định trong các NTHHD

	Viêm phổi	Viêm tiểu phế quản	Viêm phế quản	Tổng số
Virus cúm A	18 (34%)	10 (42%)	13 (43%)	41
Virus cúm B	2	3	2	7
RSV	19 (36)	7 (29)	12 (40)	38
Adeno virus	7	2	2	11
PIV1	2	2	1	5
PIV3	5	0	0	5
Tổng số	53	24	30	107

Theo bảng 3, vị trí nhiễm trùng hô hấp dưới có 42 (46%) trẻ bị viêm phổi, 20 (22%) trẻ bị viêm tiểu phế quản và 29 (32%) trẻ bị viêm phế

quản. Các virus cúm A và RSV là các nguyên nhân virus thường gặp trong các nhiễm trùng hô hấp dưới.

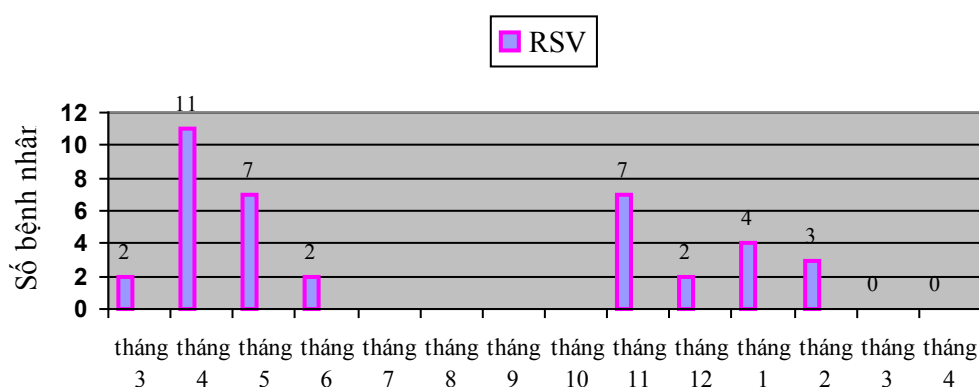
3.4. Phân bố nguyên nhân virus và nhóm tuổi

Bảng 4. Phân bố virus gây nhiễm trùng theo các nhóm tuổi

Các virus	3 tháng - 1 tuổi	> 1 - 2 tuổi	>2 - 5 tuổi	> 5 tuổi
Virus cúm A	19	9	10	3
Virus cúm B	3	1	2	1
RSV	20	9	7	2
Adenovirus	5	4	1	1
PIV1	2	2	1	0
PIV2	0	0	0	0
PIV3	2	2	1	0
PIV4	0	0	0	0

Virus cúm A và RSV là các virus nổi trội trong các nhóm tuổi.

3.5. Phân bố theo thời gian virus RSV và virus cúm

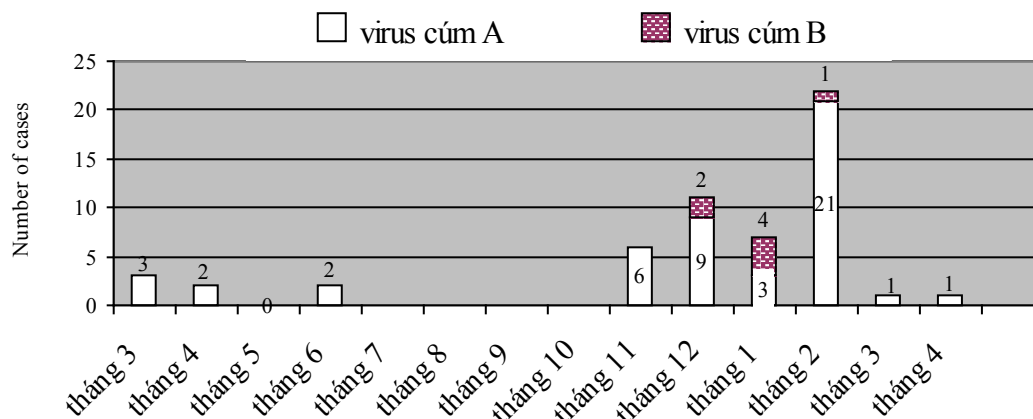


Biểu đồ 2. Phân bố các nhiễm trùng do RSV trong thời gian nghiên cứu

Nhiễm virus cúm xảy ra với số bệnh nhân cao vào tháng 11 năm 2010 đến tháng 2 năm 2011, trong tổng số 41 trường hợp nhiễm trùng với virus cúm A, khi xác định dưới typ cho thấy có 31 (76%) trường hợp do dưới typ A(H1N1)pdm09, 7 trường hợp (17%) do A(H1N1) mùa và 3 trường hợp (7%) do dưới typ A(H3N2).

Hai virus hô hấp có số bệnh nhân cao gồm

virus cúm và virus RSV ở Bảng 3, số trường hợp nhiễm virus RSV được tìm thấy rải đều ở các tháng với số lượng từ 2 đến 11 trường hợp. Trong các tháng từ tháng 6 đến tháng 10-2010 do bệnh phòng phải nhận thêm bệnh nhân trẻ em bị sốt xuất huyết và số bệnh nhân hô hấp nhập viện thấp nên bệnh phẩm không được lấy vào thời gian này.



Biểu đồ 3. Phân bố các nhiễm trùng do virus cúm trong thời gian nghiên cứu

4. BÀN LUẬN

Qua nghiên cứu này chúng tôi tìm thấy rằng nhiễm trùng hô hấp dưới do các virus chiếm tỷ lệ 42% trong số những trẻ em nhiễm trùng hô hấp dưới nhập viện, các virus hô hấp thường gặp đứng hàng đầu là virus cúm A với tỷ lệ 45%, tiếp đến là virus hợp bào hô hấp 42%, adenovirus là 12%, virus cúm B là 8%, parainfluenza typ 1 là 5% và parainfluenza typ 3 là 5%. Số liệu của chúng tôi về nguyên nhân virus trong nhiễm trùng hô hấp dưới tương tự với các kết quả của các nghiên cứu gần đây ở châu Á, tổng hợp các số liệu từ các nghiên cứu này cho thấy rằng bệnh nguyên virus gây nhiễm trùng hô hấp dưới được xác định thay đổi từ 32.3% đến 73.92% [7, 14]. Về các virus nhiễm trùng hô hấp, tỷ lệ thường gặp của các virus thay đổi phụ thuộc vào danh sách các virus được bao gồm trong các nghiên cứu, hầu hết các khảo sát đều cho thấy RSV luôn là virus đứng hàng đầu với tỷ lệ từ 23.6 đến 58%, tiếp theo là hMPV có tỷ lệ 6.1 đến 27.1% và parainfluenza typ 3 có tỷ lệ từ 4.3 đến 20.7%. virus cúm A thường có tỷ lệ thấp từ 2% đến 8.5%, adenovirus có tỷ lệ từ 1.7 đến 7.5% [1, 7, 13, 14]. Cụ thể như nghiên cứu Bharaj và đồng tác giả ở Ấn Độ khảo sát trên 301 trẻ em bị nhiễm trùng hô hấp dưới, có 35.2% bệnh nhân nhiễm trùng với các virus hô hấp, trong đó RSV là tác nhân nổi trội với tỷ lệ là 57.5%, với tỷ lệ giảm dần tiếp đến là PIV3 20.7%, PIV2 16%, hMPV 10.4%, PIV1 9.4% và influenza A virus 8.5% [1]. Nghiên cứu của Yin và đồng tác giả ở Trung Quốc trên 813 trẻ em dưới 14 tuổi bị NTHHD từ năm 2006 đến 2009, các virus hô hấp được xác định ở 601 bệnh nhi với tỷ lệ 73.92%, trong đó virus RSV có tỷ lệ 40.71%, hMPV là 6.15%, virus cúm A là 7.13%, virus cúm B 0.98%, PIV

typ 1 và typ 3 là 7.87%, HCoV-HKU1 là 2.21%, HCoV-NL63 là 3.8%, human rhinovirus (hRV) là 19.9%, Adenovirus là 7.5% và HBoV là 11.56% [7]. Các quy trình khuếch đại gen trong nghiên cứu chúng tôi chỉ tập trung xác định những virus gây nhiễm trùng hô hấp thông thường là virus cúm A, virus cúm B, RSV, adenovirus và các virus á cúm mà chưa bao gồm các virus mới như hMPV, HBoV, HCoV-HKU1 và HCoV-NL63, hRV, đây là những virus hô hấp mới đã được xác định có vai trò gây nhiễm trùng hô hấp dưới ở trẻ em trong những năm gần đây [9]. Những nghiên cứu của chúng tôi trong thời gian đến về các virus hô hấp sẽ bao gồm những virus mới này vào trong danh sách các virus khảo sát.

Khi đối chiếu phân bố thời gian nhiễm trùng virus cúm và các dưới typ virus cúm A gây bệnh trong nghiên cứu của chúng tôi với báo cáo của TCYTTC về tình hình nhiễm trùng virus cúm năm 2010 và 2011 của Việt Nam [21], chúng tôi nhận thấy tình hình nhiễm virus cúm ở Thừa Thiên Huế phù hợp với số liệu của TCYTTC là bệnh tăng lên vào những tháng mưa lạnh từ tháng 10 năm 2010 đến tháng 3 năm 2011 và dưới typ virus cúm A(H1N1)pdm09 mới hiện đã thay thế các dưới typ H3N2 và H1N1 mùa gây dịch trước đây. Sự thay thế dưới typ virus cúm A(H1N1)pdm09 không những gặp ở Việt Nam mà hiện đang xảy ra ở khắp nơi trên thế giới [20].

5. KẾT LUẬN

Khảo sát này cho thấy các virus hô hấp gây nhiễm trùng khá thường gặp ở trẻ em bị nhiễm trùng hô hấp dưới. Các virus hợp bào hô hấp và virus cúm là các tác nhân thường gặp, dưới typ cúm A(H1N1)pdm09 hiện đang là dưới typ lưu hành nổi trội gây nhiễm trùng cúm A ở trẻ em.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anh Ha LD, H. Van Doorn HR, Ngoc MN, Juliet E. Bryant, Thanh Hang TH, Ha DQ, Tan LV, Tan TT, Wills B, Chau VVN, Hien MV, Khanh CV, Dung NM, Farrar J, Hien TT, de Jong MD (2011) Viral Etiologies of Acute Respiratory Infections among Hospitalized Vietnamese Children in Ho Chi Minh City, 2004–2008, PLoS ONE 6: e18176.
2. Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, Mani K, Cherian J, Tyagi V, Chahar HS, Kaushik S, Dar L and Broor S (2009) Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. Virol J 6:89.
3. Boonsuk P, Payungporn S, Cheochansin T, Samransamruajkit R, Amonsin A, Songserm T,

- Chaisingh A, Chamnanpood P, Cgitinimitkul S, Theamboonlers A, Poovorawan Y (2008), detection of influenza virus types A and B and type A subtypes (H1, H3, H3 and H5) by multiplex polymerase chain reaction, *Tohoku J Exp Med* 215: 247-255.
4. Boyer KM, and Cherry JD, Nonbacterial pneumonia, in Feigin & Cherry eds, *Textbook of Pediatric infectious diseases*, 1st ed, vol. 1, Philadelphia: W.B Saunders Company, 1981: 186-196.
 5. Cherry JD (1981) Acute Bronchitis. In Feigin & Cherry, editors, *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. Philadelphia: W.B Saunders Company.1:174-177.
 6. Cherry JD (1981) Bronchiolitis and Asthmatic Bronchitis. In Feigin & Cherry, editors. *Textbook of Pediatric infectious diseases*. Philadelphia: W.B Saunders Company. 1:178-186.
 7. Jin Y, Zhang RF, Xie ZP, Yan KL, Gao HC, Song JR, Yuan XH, Cheng WX, Hou YD, Duan ZJ (2011) Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzhou, China, from 2006 to 2009. *Clin Microbiol Infect* 18:74-80.
 8. Lam WY, Yeung ACM, Tang JW, Ip M, Chan EWC, Hui M and Chan PKS (2007) Rapid Multiplex Nested PCR for Detection of Respiratory Viruses, *J Clin Microbiol*. 45: 3631–3640.
 9. Mahony JB (2008) Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods, *Clin Microbiol Rev* 21: 716-47.
 10. McDonough M, Kew O, Hierholzer J (1993) PCR detection of human adenoviruses. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington DC: American Society for Microbiology. 389-93
 11. Percivalle E, Rovida F, Piralla A, Rognoni V, Zavattoni M, Baldanti F, Marchi A, Gerna G (2008) Rapid typing, subtyping and RNA quantification of influenza virus type A strains in respiratory secretions. *New Microbiol* 31:319-327.
 12. Rohwedder A, Keminer O, Forster J, Schneider K, Schneider E and Werchau H (1998) Detection of Respiratory Syncytial Virus RNA in Blood of Neonates by Polymerase Chain Reaction, *J Med Virol* 54: 320–327.
 13. Sung CC, Chi H, Chiu NC, Huang DTN, Weng LC, Wang NY, Huang FY (2011), Viral etiology of acute lower respiratory tract infections in hospitalized young children in Northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 44: 184-190.
 14. Tang LF, Wang TL, Tang HF, Chen ZM (2008), Viral pathogens of Acute Lower Respiratory Infection in China, *Indian Pediatrics* 45: 971-975.
 15. World Health Organization (2008), *The Global Burden of Disease 2004 Update*.1-146.
 16. World Health Organization (1985), Respiratory infection: case management of ARI in children in developing countries. Report of a Working group meeting, Geneva, 3-6 April 1984 (document WHO/RSD/85.15 Rev. 2)
 17. World Health Organization (1986), Respiratory infection in children: management at small hospitals. Background notes and a manual for doctors (document WHO/RSD/86.26).
 18. World Health Organization (1985), Proposal for the classification of ARI and tuberculosis for the tenth revision of the international classification of diseases. Report of Ad Hoc Working group meeting: WHO Collaborating Centre for research on ARI academic department of community Medicine, St Mary's Hospital London and the international union Against Tuberculosis (document WHO/RSD/85.25).
 19. World Health Organization (2009). WHO information for laboratory Diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans - revised 23 November: 1-49
 20. World Health Organization (2012) Influenza update No-159.10/5. http://who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_peer_reviewed.
 21. World Health Organization (2012) Influenza Laboratory Surveillance Information - The Chart of Number of specimens positive for influenza virus by subtypes in Vietnam from weeks 22 of 2010 to weeks 22 of 2011, FluNet (www.who.int/flunet), Global Influenza Surveillance Network (GISN), generated on 12th/ May/ 2012.