

2008-2010年越南中部地区呼吸道病毒实验室流感大流行计划和监测

Thomas Tran^a, Bui Trong Chie^b, Georgina Papadakis^a, Julian Druce^a, Chris Birch^a, Doris Chibo^a, Truong Phuoc An^c, Le Thi Kim Trang^b, Nguyen Bao Trieu^b, Doan Thi Thanh Thuy^b, Mike Catton^a 和 Trinh Xuan Mai^b

通讯作者: Thomas Tran (e-mail: thomas.tran@mh.org.au)。

引言: 在越南中部地区, 实验室需要具备为公共卫生当局提供威胁人群健康的呼吸道疾病暴发早期预警的能力, 如2009年暴发的流感A(H1N1)大流行。作为能力建设的一部分所建立起来的聚合酶链反应(PCR)程序, 被应用于在一个以前很少开展研究工作的地区进行前瞻性的呼吸道疾病监测。

方法: 自2008年10月至2010年9月, 在宁和市总医院收治的成人和儿童急性呼吸系统病例中, 每周采集约20份鼻、咽拭子。同一天, 由当地经过培训的专业人员开展13种呼吸道病毒的PCR检测并报告结果。

结果: 共检测了2144份监测样本, 1235份(57.6%)至少有一种病毒的检测结果阳性。检测出的病毒中, 最常见的是A型流感病毒(17.9%), 其中, 大流行流感A(H1N1)2009和季节性H3N2毒株分别占52%和43%。其他检测到的病毒包括: 鼻病毒(12.4%)、肠道病毒(8.9%)、B型流感病毒(8.3%)、腺病毒(5.3%)、副流感病毒(4.7%)、呼吸道合胞病毒(RSV, 3.9%)、人类冠状病毒(3.0%)和人类偏肺病毒(0.3%)。0-5岁年龄组检出率最高。共发现病毒联合感染148例(6.9%)。

讨论: 2009年暴发的流感A(H1N1)大流行株, 为实验室流感大流行计划提供了一个确实的检验机会。本研究表明, 在容易受新发传染病威胁的地区, 配备适宜的设备和具备分子水平检测能力, 对于保障个人健康和公众健康都具有重要的作用。

急 性呼吸道病毒感染是越南人群发病和住院的重要原因, 越南当前的社会和人口条件, 又使这类暴发引起疾病广泛传播和死亡的风险大大增加。2003年以来, 越南陆续发现人感染禽流感A(H5N1)病例^[1], 2004年还发生了严重急性呼吸综合征(SARS)病例。关于越南这些病例的社会人口学和临床特征已经进行过报道^[2-7]。虽然SARS未再发现, 但散在的人感染禽流感病例不断发生, 截至2011年11月, 越南的人感染禽流感病例数列全球第三位, 死亡数列全球第二位^[5]。最近, 迅速蔓延的流感A(H1N1)大流行2009株(下称A[H1N1]pdm09)传入越南, 在第一波流行期间就导致成千上万的实验室确诊病例和58例死亡病例^[8]。在越南, 一些常见的非流感呼吸道病毒也是急性呼吸道感染的重要原因^[9,10]。

本研究的主要目的是协助芽庄巴斯德研究所(NTPI)的病毒学实验室做好呼吸道病毒暴发的实验室准备, 包括针对常见呼吸道病毒和禽流感病毒的准备。这样的实验室能力将能为越南公共卫生当局提供威胁公众健康的传染病暴发早期预警, 进而为包括澳大利亚在内的该地区的其他国家提供经验和警示。本研究的第二个目的则是利用建立起来的聚合酶链反应(PCR)方法, 对当地一所综合医院就诊病人采集的呼

吸道样本进行检测, 以检验职员培训和技术转移的有效性。监测期间恰逢A(H1N1)pdm09发生, 这样就使得我们能够在实践过程中对所建立的实验室能力进行评估。

方法

背景和研究对象

样本采集自越南中南部农村到庆和省宁和市总医院就诊的患者。芽庄市是庆和省的省会, 位于东南沿海, 距宁和市总医院38公里。该地区属热带气候, 平均气温27°C到33°C, 全年分两个季节: 1月到8月为旱季, 9月至12月为雨季。2009年人口数为241 173人。同一年, 有200张病床的这所医院共收治病人19 516例, 其中, 927例为疑似肺炎, 1654例为上呼吸道感染。越南卫生部决定选择NTPI作为项目参与实验室, 是基于当时越南北部(河内)和南部(胡志明市)的实验室能力比较健全, 但中部地区则能力不足。对NTPI的支持, 包括检测方法的技术转移以及相应的设备购置, 使其能够进行快速高通量的检测。根据建立的操作程序, 要求由经过培训的越南当地的专业人员在收到样本后立即开展检测, 并在同一天出具报告。

^a 澳大利亚维多利亚州墨尔本北区维多利亚传染病参比实验室。

^b 越南芽庄巴斯德研究所。

^c 越南庆和省宁和市总医院。

投稿日期: 2012年5月20日; 刊发日期: 2012年7月31日

doi: 10.5365/wpsar.2012.3.2.012

表1. 病毒、目标基因以及使用的引物和探针的序列

病毒 (目标基因)	方法	第一轮引物/探针序列 (5'→3')	第二轮引物序列 (5'→3')
A型流感 (基质蛋白基因)	多重巢式 RT-PCR	FAMF1: CAGAGACTTGARRATGTYTTTGC FAMR1: GGCAAGYGCACCRGYWGARTARCT	FAMF2: GACCRATCCTGTACCTCTGACT FAMR2: AYYTCYTTGCCCATGGAATGT
人类冠状病毒-NL63 (1b复制酶)	多重巢式 RT-PCR	CORF1: CTAATAAGTTAGTWCCWGGTATG CORR1: CACTATAACACTCAACYCKRG	CORF2: GTCCTCCTGGTAGTGGWAARTC CORR2: CACAKARSGAATCAACAGCAG
肠道病毒 (5' -UTR)	多重巢式 RT-PCR	ENTD: STCACC GGATGGCCAATCC ENTC: GGCCCCTGAATGCGGCTAAT	ENTB: ATTGTCACCATAAGCAGCCA ENTC: GGCCCCTGAATGCGGCTAAT
A型流感 (基质蛋白基因)	多重 Real-time PCR	FLAMF: MGAGGTCGAAACGTAYGTTCTCT FLAMR: GTCTTGTCTTTAGCCAYTCCATGA FLAMP: CCCCCTCAAAGCCGA	
牛病毒性腹泻病毒 (5' UTR-蛋白酶)	多重 Real-time PCR	BVDVF: TCAGCGAAGGCCGAAAAG BVDVR: TGCTACCCCCTCCATTATGC BVDVP: VIC-CTAGCCATGCCCTTAGT	
A(H1N1)pdm09 (血凝素基因)	Real-time PCR	ASwiF: GGAAAGAAATGCTGGATCTGGTA ASwiR: ACCCTTGGGTGTCTGACAAGTT ASwiP: CAGTCCACGATTGCAAT	
禽流感A (H5) (血凝素基因)	Real-time PCR	H5F: TGGTATGGGTACCACCATAGCA H5R: GGCTCAAACCTGAGTGTTTCATT H5P: CTGCAGACAAAGART	

样本采集

2008年10月至2010年9月, 在征得病人同意的基础上, 每周采集约20名符合呼吸道感染症状的病人的鼻、咽拭子。在A(H1N1)pdm09暴发期间, 样本数增加至每周约40份。拭子样本在现场转移至1.5毫升病毒运送培养液中, 在4°C条件下储存, 并在4°C条件下每周两次运送至NTPI, 送达当天由该所经过培训的专业人员进行常见呼吸道病毒的PCR检测。在2009年大流行期间, NTPI也接受与监测无关的样本, 但对这些样本只进行A(H1N1)pdm09的检测。所有样本均不检测细菌和其它可引起呼吸道症状的非病毒性病原体。在越南农历新年期间即2009年1月和2010年2月样本采集工作暂停。

核酸提取和逆转录

病毒核酸的获取是利用70μL洗脱液, 使用QIAextractor自动提取仪(美国加利福尼亚州瓦伦西亚Qiagen公司)和Qiagen DX试剂盒, 从200μL的样本中提取。作为对核酸提取、逆转录和PCR扩增步骤的质量控制, 每个样本在核酸提取之前均掺入微量的非人类RNA病毒(牛病毒性腹泻病毒[BVDV]), 并用BVDV-特异性引物进行扩增。使用随机六聚体引物在10μL提取物中进行逆转录, 方法见既往报道^[11]。

呼吸道病毒PCR检测

呼吸道病毒检测利用文献报道的多重PCR检测方法^[11,12]。检测的病毒种类包括: A型流感、B型流感、副流感病毒(PIV, 1、2、3型)、呼吸道合胞病

毒(RSV)、小核糖核酸病毒(鼻病毒和肠道病毒)、腺病毒、人类偏肺病毒(hMPV)和人类冠状病毒(HCoV, OC43、229E和NL63型)。本研究在文献方法基础上, 用A型流感特异性引物替换了H1、H3亚型引物, 并添加了可检测HCoV-NL63型的引物, 具体引物序列见表1。鼻病毒和肠道病毒的判别是对于肠道病毒特异性巢式PCR检测小核糖核酸病毒呈阳性的样本, 将2.5μL互补脱氧核糖核酸(cDNA)加入到添加了肠毒素C(ENTC)和肠毒素D(ENTD)引物的40μL的基本反应液中(见表1)。随后的条件设置是95°C条件下3分钟预变性, 然后进行35个循环, 每个循环均为在95°C条件下30秒变性, 53°C条件下30秒退火, 72°C条件下30秒延伸, 最后一个循环后在72°C条件下延伸五分钟。第一轮2μL的PCR产物转移到包含肠毒素B(ENTB)和肠毒素C(ENTC)引物的基本反应液中, 第二轮在相同的条件下扩增25个循环。最终的PCR产物在琼脂糖凝胶上用溴化乙锭染色显色分析。

A型流感毒株的分型检测

在出现A(H1N1)pdm09之前, A型流感病毒的分型检测是使用半巢式凝胶实验。A(H1N1)pdm09暴发期间, 所有的样本均进行两种不同方法的检测, 一种是针对流感病毒的基质蛋白和BVDV引物的real-time PCR检测, 一种是多重呼吸道病毒检测系统^[11]。使用特异性引物的PCR方法对流感阳性样本进行A(H1N1)pdm09的确认, A(H1N1)pdm09阴性的样本还要进行A(H3N2)或季节性流感A(H1N1)的检测, 方法如文献所述^[11]。禽流感H5N1的确认使用real-time PCR方法(引物和探针序列见表1)。最终反应体积为20μL, 先在95°C条件下反应20秒, 然后进行45个循环, 每

表2. 2008年10月至2010年9月越南庆和省监测病人的人口学特征、是否住院和病毒分离情况

特征	总计		门诊病人		住院病人	
	n	%	n	%	n	%
病例数	2144	100.0	1606	75.0	538	25.0
男性	1177	55.0	856	72.7	321	27.3
女性	967	45.0	750	77.6	217	22.4
年龄组 (岁)						
0-5	966	45.1	750	46.7	216	40.1
6-10	335	15.6	255	15.9	80	14.9
11-15	235	11.0	144	9.0	92	17.1
16-25	210	9.8	137	8.5	73	13.6
26-45	247	11.5	191	11.9	56	10.4
46-65	115	5.4	97	6.0	18	3.3
≥66	35	1.6	32	2.0	3	0.6
病毒阳性	1235	57.6	931	57.9	304	56.5
病毒阴性	909	42.4	679	42.3	230	42.7
病毒联合感染	148	6.9	111	6.9	37	6.9
检测到的病毒						
A型流感	384	17.9	234	14.6	150	27.9
A(H1N1)pdm09	200	9.3	101	6.3	99	18.4
A(H1N1)	18	0.8	13	0.8	5	0.9
A(H3N2)	165	7.7	120	7.5	45	8.3
A(H5N1)	1	0.1	0	0.0	1	0.2
鼻病毒	266	12.4	211	6.2	55	10.2
肠道病毒	191	8.9	149	9.3	42	7.8
B型流感	178	8.3	156	9.7	22	4.1
腺病毒	114	5.3	89	5.5	24	4.5
副流感病毒*	101	4.7	85	5.3	16	3.0
RSV	83	3.9	61	3.8	22	4.1
HCoV [†]	64	3.0	53	3.3	11	2.0
hMPV	7	0.3	6	0.4	1	0.2

RSV-呼吸道合胞病毒; HCoV-人类冠状病毒; 和 hMPV-人类偏肺病毒。

* PIV-1 型(53.5%), PIV-2 型(13.9%), PIV-3 型(26.7%), 和 PIV-未分型(5.9%)。

† HCoV-OC43型(72%), HCoV-229E型(4.7%), 和HCoV-NL63型(23.4%)。

个循环包括95°C条件下反应3秒和60°C条件下反应30秒。

结果

样本和病人

共对2144份病人的样本进行了检测, 这些病例中有1/4为住院病人(见表2)。在A(H1N1)pdm09暴发期间, 实验室还收到1541份宁和市总医院以外的其他医院送来进行流感病毒检测的病人样本(这些病人的数据没有纳入本监测研究中)。患者年龄从0.1个月至85岁不等, 平均13岁, 中位数为7岁, 其中, 5岁以下的儿童占45.1%, 男性多于女性(各占55%及45%, 见表2)。

流感病毒检测

在检测的2144份监测样本中, 1235份(57.6%)至少有一种病毒的检测结果阳性(见表2)。最常见的是流感病毒株, 其中一半以上为A(H1N1)pdm09, 该毒株在2009年早季末第一次检测到, 然后在当年雨季持续存在(见表2、图1), 并取代了2009年早季一直流行的A(H3N2)流感毒株。2010年, A(H3N2)流感毒株再次

出现, 并在2010年早季末达到高峰。A(H1N1)pdm09主要感染儿童和青壮年, 而A(H3N2)流感主要感染5岁以下儿童(见表3)。研究过程中发生了两次大的B型流感流行, 高峰分别发生在2008年和2010年的雨季, 并在这两年的早季维持低水平流行。季节性A(H1N1)毒株很少被检测到。从一名3岁儿童检测到非致病性H5N1(见表3), 这名儿童未发现有家禽或其他鸟类接触史, 但居住地一公里范围内有一个鸵鸟养殖场。

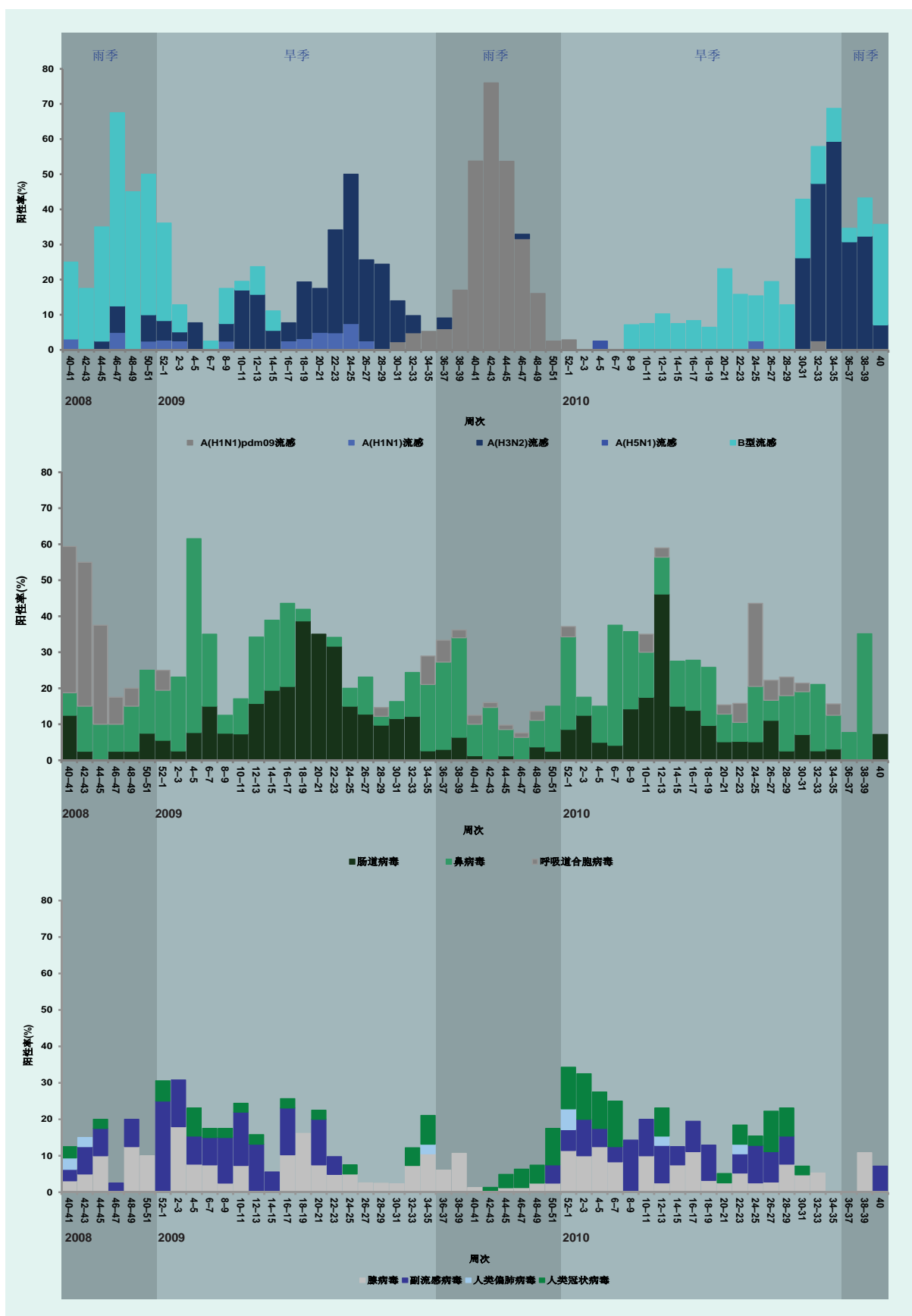
2009年6月至12月, 还对1541份非监测样本进行了流感大流行株检测, 结果637份(41%)为阳性。

非流感病毒检测

两年监测过程中, 一直检测到小核糖核酸病毒, 但只发现鼻病毒在持续循环(见表2、图1)。两次规模较大的肠道病毒暴发主要局限在2009年和2010年的早季(见图1)。两种病毒所致病例的年龄分布相似(见表3)。

有几种呼吸道病毒检出率较低, 包括腺病毒(占检测到的病毒总数的5.3%)、PIV(4.7%)、RSV(3.9%)、HCoV(3.0%)和hMPV(0.3%)。副流感病毒在整个2009年和2010年均持续循环, 以副流感病

图1. 2008年10月至2010年9月越南庆和省呼吸道病毒的两周分布及检出率



RSV - 道合胞病毒; PIV - 副流感病毒; hMPV - 人类偏肺病毒; 和 HCoV - 人类冠状病毒。

表3. 2008年10月至2010年9月越南庆和省检出病毒病人的年龄分布

检出病毒情况	年龄组 (岁)													
	0-5		6-10		11-15		16-25		26-45		46-65		≥ 66	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
阳性病例	660	68.3	213	60.9	143	60.9	89	42.2	84	34.0	36	31.3	10	28.6
联合感染	107	11.1	15	4.2	14	6.0	6	2.8	5	2.0	0	0.0	1	2.9
阴性病例	306	31.7	122	34.4	92	39.1	122	57.8	163	66.0	79	68.7	25	71.4
A型流感	145	15.0	79	22.3	93	39.6	35	16.6	23	9.3	7	6.1	2	5.7
A(H1N1)pdm09	23	2.4	49	13.8	81	34.5	27	12.8	17	6.9	3	2.6	0	0.0
A(H1N1)	11	1.1	4	1.1	0	0.0	2	0.9	0	0.0	1	0.9	0	0.0
A(H3N2)	113	11.7	25	7.0	10	4.3	6	2.8	6	2.4	3	2.6	2	5.7
A(H5N1)	1	0.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
鼻病毒	140	14.5	33	9.3	27	11.5	22	10.4	31	12.6	10	8.7	3	8.6
肠道病毒	128	13.3	24	6.8	12	5.1	19	9.0	7	2.8	1	0.9	0	0.0
B型流感	85	8.8	54	15.2	15	6.4	5	2.4	14	5.7	4	3.5	1	2.9
腺病毒	93	9.6	10	2.8	3	0.0	4	1.9	1	0.4	2	1.7	1	2.9
副流感病毒	69	7.1	20	5.6	3	1.3	3	1.4	2	0.8	3	2.6	1	2.9
RSV	66	6.8	4	1.1	2	0.9	2	0.9	5	2.0	2	1.7	2	5.7
HCoV	37	3.8	6	1.7	2	0.0	5	2.4	7	2.8	6	2.2	1	2.9
hMPV	6	0.6	0	0.0	0	0.0	1	0.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
合计	966		335		235		211		247		115		35	

RSV - 呼吸道合胞病毒; HCoV - 人类冠状病毒; 和 hMPV - 人类偏肺病毒。

毒1型最为常见(见表2)。RSV感染无明显的季节性分布特征,发生于很小的儿童、生育年龄的成人和老年人。HCoVs一年四季在所有年龄组都可检测到,但检出率很低。冠状病毒最常见的是OC43型,时间分布横跨2008年至2009年雨季和旱季,以及2009年至2010年的雨季和旱季(见表2、图1)。

有148例(6.9%)存在至少两种病毒的联合感染(见表4)。鼻病毒(所有联合感染的50.7%)和腺病毒(39.9%)是最常见的联合感染病毒。

讨论

本研究的主要目的是建立稳定的实验室能力,为公共卫生当局提供高致病性禽流感病毒或其他呼吸道病

毒流行的早期预警。在为期两年的研究期间,由越南本地经过培训的专业人员共对2144份样本进行了检测,结果一半以上的样本至少有一种病毒检测结果阳性。检测到的病毒包括流感,最常见的是A(H1N1)pdm09,以及鼻病毒、肠道病毒和腺病毒。2009年暴发的A(H1N1)流感大流行株,为实验室在大流行条件下发挥其作用提供了重要机遇,在此期间他们额外接收了1541份样本。

越南最近开展了关于其它呼吸道病毒的两项研究,两者都涉及到我们进行调查的中部地区或越南南部地区的住院儿童^[9,10]。在南部开展的相关研究时间超过三年即自2004至2008年,使其能揭示呼吸道病毒感染的季节性分布。其所得出的流感流行模式与我们其后观察到的结果类似,即流行高峰出现在雨

表4. 2008年10月至2010年9月越南庆和省检测的2144份标本中检出病毒联合感染的数量及类型

	Flu B	ADV	RSV	EV	HRV	PIV	HCoV	hMPV	Flu B + RSV	EV + ADV	HRV + ADV
Flu A	1	1	1	5	23	2	2	0	0	1	0
Flu B		9	2	6	5	2	0	0	0	0	0
ADV			2	14	22	6	1	0	0	0	0
RSV				1	5	0	2	1	0	0	1
EV					0	4	6	1	0	0	0
HRV						9	7	1	1	0	0
PIV							1	1	0	0	0
HCoV								0	0	1	1

Flu A - A型流感病毒; Flu B - B型流感病毒; ADV - 腺病毒; RSV - 呼吸道合胞病毒; EV - 肠道病毒; HRV - 人类鼻病毒; PIV - 副流感病毒; HCoV - 人类冠状病毒; 和 hMPV - 人类偏肺病毒。

季, 其他时间维持在较低水平。虽然在越南南部的研究没有区分A型流感和B型流感, 我们的研究表明, 这两类病毒在全年均可检测出, 只是在雨季条件下更有利于出现较高的循环和感染水平。

A(H1N1)pdm09在越南中部地区的传播与其他地区有相似性, 也存在不同。2009年, 和温带地区的澳大利亚、美国、欧洲一样, 越南当时已经暴发的A(H3N2)流感很快被大流行病毒取代^[13-15]。然而, 与澳大利亚2010年、欧洲2010年和2011年冬季流感中A(H1N1)pdm09占主导地位^[16,17]不同, 2010年芽庄及其周边地区流感大流行病毒的检出率非常低。在2010年流感大流行后的第一个流感流行季节, A(H3N2)和B型流感在越南的这一地区同时流行, 这种模式与亚洲北部、美国和加拿大的流感活动模式更为相似^[18]。

在越南中部地区, RSV和hMPV只在雨季流行, 与之前在越南南部开展的研究结果一致^[10]。与之不同, 冠状病毒、鼻病毒和腺病毒则呈全年循环。腺病毒经常与其他病毒联合感染, 使其临床意义不太清楚。副流感病毒的传播跨越雨季和旱季。

在越南, 肠道病毒引起神经系统疾病^[19,20]、手足口病和胃肠炎均有报道^[19,21], 但没有关于其与呼吸系统综合征关系的调查。本研究发现, 肠道病毒循环在两个研究年均局限于旱季。因为不是所有的肠道病毒血清型都被认为可引起呼吸道症状, 目前正在对感兴趣的肠道病毒血清型进行鉴定。之前越南南部开展的涉及住院儿童的研究也显示了肠道病毒在呼吸系统疾病中的重要作用, 但可能是因为未开展C型鼻病毒检测, 并没有像我们的研究那样充分显示鼻病毒的作用^[10]。与之相反, 以前芽庄监测发现大量鼻病毒感染病例, 但并未将最有可能显示肠道病毒重要性的检测包括在内^[9]。

本研究的一个局限性是首先这不是一项临床调查, 所以我们并没有获得所采集样本病例的详细临床信息。因此, 关于检测到的病毒的临床意义我们只能得出有限的结论。

总体而言, 采集样本的患者中只有1/4为住院病例。但A(H1N1)pdm09暴发期间例外, 一半以上的实验室确诊病例为住院病例。在越南中部出现流感大流行株之后, 将疑似病例收住入院似乎成为一种谨慎的做法, 同时, 在这段时间内对这种新毒株的临床严重程度信息进行了收集。

与越南之前报道的两个只涉及儿童的分子学水平研究不同^[9,10], 我们的研究既有儿童, 也有成人,

故本研究能够展示流感等常见病毒以及RSV、PIV和冠状病毒等非常见病毒的循环和发病均具有广泛的年龄分布。A(H1N1)pdm09的应对在一定程度上阻碍了我们研究越南这一地区其它呼吸道病毒季节性分布的努力, 然而, 却提供了我们对上一年刚制定的流感大流行计划进行评估的机会。在非流感样症状的病人样本中检测到的一株H5流感病毒虽然是非致病毒株, 但还是启动了对无症状家庭接触者的调查, 结果均为阴性。2009年流感暴发期间, 当地经过培训的医疗、护理和科研人员采集、运输和检测了大量样本, 并在很短时间内给出结果。在这个过程中, 技术转让和当地专业人员培训是基本保证。我们的研究表明, 在容易受到新发传染病影响的地区, 具备适当的设备和分子水平的诊断检测能力对于保障个人和公众健康具有重要作用。

利益冲突

无申报。

致谢和经费

本研究由澳大利亚国际发展署通过澳大利亚-越南实验室合作伙伴项目提出并予以资金支持。

引用本文地址:

Tran T et al. Respiratory virus laboratory pandemic planning and surveillance in central Viet Nam, 2008–2010. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2012, 3(3):49–56. doi:10.5365/wpsar.2012.3.2.011

参考文献:

1. Tran TH et al; World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *The New England Journal of Medicine*, 2004, 350:1179–1188. doi:10.1056/NEJMoa040419 pmid:14985470
2. Kawachi S et al. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome and avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009, 200:510–515. doi:10.1086/605034 pmid:19591579
3. Liem NT et al. Clinical features of human influenza A (H5N1) infection in Viet Nam: 2004–2006. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48:1639–1646. doi:10.1086/599031 pmid:19435433
4. Vu HT et al. Clinical description of a completed outbreak of SARS in Vietnam, February–May 2003. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10:334–338. doi:10.3201/eid1002.030761 pmid:15030707
5. *Avian Influenza Weekly Update No. 307 (18 November 2011)*. Manila, World Health Organization Western Pacific Regional Office, 2011 (<http://www.wpro.who.int/entity/>)

- emerging_diseases/documents/AI.Weekly.18Nov2011.pdf, accessed 1 December 2011).
6. Hui DS et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS): epidemiology and clinical features. *Postgraduate Medical Journal*, 2004, 80:373–381. doi:10.1136/pgmj.2004.020263 pmid:15254300
 7. Dinh PN et al.; World Health Organization/Global Outbreak Alert and Response Network Avian Influenza Investigation Team in Vietnam. Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12:1841–1847. doi:10.3201/eid1212.060829 pmid:17326934
 8. Hien TT et al. Early pandemic influenza (2009 H1N1) in Ho Chi Minh City, Vietnam: a clinical virological and epidemiological analysis. *PLoS Medicine*, 2010, 7(5):e1000277. doi:10.1371/journal.pmed.1000277 pmid:20502525
 9. Yoshida LM et al. Viral pathogens associated with acute respiratory infections in central vietnamese children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2010, 29:75–77. doi:10.1097/INF.0b013e3181af61e9 pmid:19907358
 10. Do AH et al. Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized Vietnamese children in Ho Chi Minh City, 2004–2008. *PLoS ONE*, 2011, 6:e18176. doi:10.1371/journal.pone.0018176 pmid:21455313
 11. Druce J et al. Laboratory diagnosis and surveillance of human respiratory viruses by PCR in Victoria, Australia, 2002–2003. *Journal of Medical Virology*, 2005, 75:122–129. doi:10.1002/jmv.20246 pmid:15543580
 12. Birch CJ et al. Human coronavirus OC43 causes influenza-like illness in residents and staff of aged-care facilities in Melbourne, Australia. *Epidemiology and Infection*, 2005, 133:273–277. doi:10.1017/S0950268804003346 pmid:15816152
 13. Catton M et al. Reality check of laboratory service effectiveness during pandemic (H1N1) 2009, Victoria, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17:963–968. doi:10.3201/eid1706.101747 pmid:21749755
 14. Amato-Gauci A et al. Surveillance trends of the 2009 influenza A(H1N1) pandemic in Europe. *Eurosurveillance*, 2011, 16(26):pii=19903. pmid:21745444
 15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity - United States, 2009–10 season. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2010, 59:901–908. pmid:20671661
 16. Grant KA et al. Continued dominance of pandemic A(H1N1) 2009 influenza in Victoria, Australia in 2010. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2011, 2(3). doi:10.5365/wpsar.20112.2.009
 17. *Australian influenza surveillance report 2010 - 30 October–5 November 2010 (#44/10)*. Canberra, Australian Government Department of Health and Ageing, 2010 (<http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-ozflu-no44-10.htm>, accessed 8 December 2011).
 18. *Weekly epidemiological record No. 22, 2011*. Geneva, World Health Organization, 2011, 86:221–232 (<http://influenzatraining.org/documents/s18761en/s18761en.pdf>, accessed 16 December 2011).
 19. Le VT et al. Viral etiology of encephalitis in children in southern Vietnam: results of a one-year prospective descriptive study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2010, 4:e854. doi:10.1371/journal.pntd.0000854 pmid:21049060
 20. Tu PV et al. Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13:1733–1741. doi:10.3201/eid1311.070632 pmid:18217559
 21. Phan TG et al. Identification of enteroviral infection among infants and children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Medical Virology*, 2005, 77:257–264. doi:10.1002/jmv.20445 pmid:16121381