



Optimalisasi Real Time PCR untuk Diagnosis Filariasis Bancrofti pada Sediaan Hapus Darah Tebal

Optimization of Real Time PCR for the Diagnosis of Bancroftian Filariasis on Thick Blood Film Preparation

Rika Ferlianti¹, Taniawati Supali², Heri Wibowo²

¹Magister Program of Biomedical Science, Faculty of Medicine University of Indonesia, Jakarta

²Department of Parasitology, Faculty of Medicine University of Indonesia, Jakarta

KATA KUNCI *filariasis bancrofti; diagnostic; Real Time PCR; sediaan hapus darah tebal*
KEYWORDS *bancroftian filariasis; diagnostic; Real Time PCR; thick blood film*

ABSTRAK *Penelitian ini bertujuan untuk menggunakan sediaan hapus darah tebal sebagai sampel untuk amplifikasi DNA dalam mendeteksi DNA Wuchereria bancrofti dengan metode Real Time PCR.*

Uji Diagnostik, dengan pemeriksaan mikroskopik sebagai gold standard.

Sampel adalah 63 sediaan hapus darah tebal dengan pewarnaan giemsa yang sudah diperiksa dengan mikroskop. Sampel positif terinfeksi filariasis bancrofti 25 sampel, dan negatif terinfeksi 38 sampel dikumpulkan dari daerah endemik Nusa Tenggara Timur. Sediaan hapus darah tebal dikerok dengan skalpel steril dan hasil kerokan sampel dimasukkan ke dalam tabung steril yang berisi phosphate buffered saline (PBS). DNA diamplifikasi dengan target Ssp I repeat untuk W. bancrofti. Hasil dari PCR akan dibandingkan dengan mikroskopik dan tes konfirmasi yaitu tes ICT (immune chromatographic card-type).

Metode Real Time PCR pada sediaan hapus darah tebal mempunyai sensitivitas dan negative predictive value yang tinggi terhadap mikroskopik. Dan hasil konfirmasi dengan metode mikroskopik dan ICT, PCR pada sediaan hapus darah tebal memberikan hasil sensitivitas, spesifisitas, positive and negative predictive value yang tinggi. Korelasi Spearman menunjukkan korelasi yang kuat antara mikroskopik dan PCR pada sediaan hapus darah tebal ($r = 0,937$). Dan korelasi negatif antara nilai Ct dengan densitas mikrofilaria ($r = -0,726$). Sediaan hapus darah tebal yang mempunyai densitas mikrofilaria yang tinggi, memberikan nilai Ct yang rendah pada metode Real Time PCR.

Metode Real Time PCR pada sediaan hapus darah tebal dapat digunakan untuk membantu mengevaluasi program eliminasi filariasis.

ABSTRACT *This study describes the use of thick blood films (TBF) as specimens for DNA amplification to detect Wuchereria bancrofti with Real Time PCR-based assay. This is a diagnostic assay, with microscopy test as the gold standard. A total of 63 Giemsa-stained clinical TBFs samples consisted of bancroftian filariasis positive (n=25) and bancroftian filariasis negative (n=38) samples were collected from East Nusa Tenggara. The Giemsa-stained TBF was scraped off by a sterile scalpel and collected into phosphate buffered saline (PBS). DNA was amplified with the Ssp I repeat Real Time PCR targeting for W. bancrofti. Results of the PCR on TBF were compared to microscopy examination and*

confirmed with immune chromatographic card-type (ICT) test. The results showed that compared to microscopy method, Real Time PCR on TBF showed the highest sensitivity and negative predictive value. If compared to microscopy and ICT test, Real Time PCR on TBF the highest sensitivity, specificity, positive and negative predictive value. Spearman's correlation showed a strong correlation between microscopy test and PCR on TBF ($r = 0,937$), but negative correlation ($r = - 0,726$) between density microfilaria and Ct value. Higher density of microfilaria in TBF, provided lower Ct-value observed in Real Time PCR. In conclusion Real Time PCR-based assay on TBF may be of beneficial tool to evaluate the Global Program to Eliminate Lymphatic Filariasis.

Filariasis limfatik disebabkan oleh *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* dan *Brugia timori*, merupakan penyakit yang ditularkan oleh nyamuk, menyerang kelenjar dan pembuluh getah bening. Sampai saat ini filariasis limfatik masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang utama (Nuchprayoon, 2009) karena berhubungan dengan kemiskinan dan merupakan penyebab kecacatan di daerah tropis dan subtropis (Supali *et al.*, 2006). Data WHO menunjukkan bahwa di dunia terdapat 1,3 miliar penduduk yang berada di lebih dari 83 negara berisiko tertular filariasis, dan lebih dari 60% berada di Asia Tenggara (DEPKES, 2010). Diperkirakan lebih dari 120 juta orang diantaranya sudah terinfeksi (Bockarie dan Deb, 2010), kira-kira 107 juta disebabkan oleh *W. bancrofti* dan 13 juta disebabkan oleh *B. malayi* atau *B. timori* (Ottesen *et al.*, 1997). Di Indonesia, diperkirakan sampai tahun 2009 penduduk berisiko tertular filariasis lebih dari 125 juta orang yang tersebar di 337 kabupaten/kota endemis filariasis dengan 11.914 kasus kronis yang dilaporkan dan diperkirakan prevalensi mikrofilaria 19% (DEPKES, 2010).

Filariasis bancrofti disebabkan oleh *W. bancrofti* mempunyai penyebaran paling luas, menginfeksi penduduk di Sub Sahara Afrika, Asia Tenggara, Karibia, Amerika Selatan, dan Pasifik bagian Barat (Fink *et al.*, 2011). Di Indonesia filariasis bancrofti terdapat di Pulau Jawa, Bali, Nusa Tenggara dan Papua

(DEPKES, 2010). Infeksi filariasis bancrofti mungkin asimtomatik tetapi sering berhubungan dengan komplikasi akut seperti limfangitis disertai demam dan komplikasi kronik seperti menyebabkan pembesaran seluruh kaki atau lengan, alat kelamin, vulva dan payudara (Weil *et al.*, 1997; Bockarie *et al.*, 2002). Secara tidak langsung, penyakit ini dapat berdampak pada penurunan produktivitas kerja penderita, beban keluarga, dan menimbulkan kerugian ekonomi bagi negara yang tidak sedikit (DEPKES, 2008).

Pada tahun 1997, *World Health Assembly* menetapkan resolusi “*Elimination of Lymphatic Filariasis as a Public Health Problem*”, yang pada tahun 2000 diperkuat dengan keputusan WHO dengan mendeklarasikan “*The Global Goal of Elimination of Lymphatic Filariasis as a Public Health Problem by Year 2020*”. Indonesia juga menetapkan eliminasi filariasis sebagai salah satu prioritas nasional pemberantasan penyakit menular sesuai dengan Peraturan Presiden Republik Indonesia nomor 7 tahun 2005. Tujuan umum dari program eliminasi filariasis adalah filariasis tidak menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia tahun 2020. Sedang-

Correspondence:

Dr. Rika Ferlianti, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta, Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta Pusat 10510, Tel. 021-4206674-76, Faksimile: 021-4244574, rika.kurniawan@yahoo.com; rika.ferlianti@yarsi.ac.id

kan tujuan khusus program adalah (a) menurunkan angka mikrofilaria (*microfilaria rate*) menjadi kurang dari 1% di setiap kabupaten/kota, (b) mencegah dan membatasi kecacatan karena filariasis (DEPKES, 2008 & DEPKES, 2010). Strategi kunci untuk mengeliminasi program ini adalah pemberian obat massal yang menggunakan diethylcarbamazine citrate (DEC; 6 mg/kg) dikombinasikan dengan albendazole (400 mg) selama 5 tahun berturut-turut (Supali *et al.*, 2006).

Metode diagnostik sangat penting untuk mendukung program eliminasi filariasis (Weil dan Ramzy, 2006). Metode diagnostik yang umum digunakan dalam evaluasi program eliminasi filariasis adalah pemeriksaan darah tebal pada malam hari, yang di dasarkan pada deteksi mikrofilaria di darah perifer secara mikroskopik.

Metode diagnosis lainnya adalah dengan mengidentifikasi cacing dewasa yang bergerak aktif dalam kelenjar dan pembuluh limfe (*filaria dance sign*) dengan ultrasonografi (USG) sangat berguna untuk diagnosis filariasis bancrofti (Usnamru2 Jakarta, 2006). Uji serologis baik antigen dan antibodi, adalah alternatif diagnostik. Untuk diagnostik antigen dapat digunakan untuk menunjukkan adanya infeksi aktif, namun tidak demikian halnya dengan deteksi antibodi yang dapat menunjukkan hasil positif yang cukup lama meskipun tidak ditemukan adanya parasit atau antigen lagi (Weil dan Ramzy, 2006). Tes ICT dapat mendeteksi antigen *W. bancrofti* tetapi tidak berguna untuk spesies lainnya (Weil *et al.*, 1997).

Pemeriksaan PCR konvensional dan *Real Time* PCR sudah dikembangkan untuk diagnosis molekular dari infeksi filariasis limfatik. Pemeriksaan dengan PCR dapat mendeteksi DNA dari *W. bancrofti*, *B. malayi* dan *B. timori* pada darah manusia dan vektor nyamuk dengan sensitivitas dan spesifitas

yang tinggi (Lizotte *et al.*, 1994; Bockarie *et al.*, 2000; Kluber *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2003; Helmy *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2006; Rahmah *et al.*, 2011). Dalam beberapa tahun terakhir *Real Time* PCR sudah mulai menggantikan PCR konvensional untuk alasan teknis (sensitivitas lebih tinggi) dan alasan praktis (hasil lebih cepat dan sedikit tenaga kerja) (Rao *et al.*, 2006).

Penelitian ini, ingin melihat amplifikasi DNA dengan metode *Real Time* PCR untuk mendeteksi DNA *W. bancrofti* pada sediaan hapus darah tebal sehingga dapat dipakai untuk membantu mengevaluasi keberhasilan program eliminasi filariasis.

BAHAN DAN CARA KERJA

Ijin Etik

Sampel ini merupakan bagian dari penelitian program eliminasi filariasis yang sudah disetujui oleh panitia etik dari FKUI No. 61/PT02.FK/ETIK/2011.

Sampel Penelitian

Sampel adalah 63 sampel sediaan hapus darah tebal tahun 2010 yang positif terinfeksi (n=25) dan negatif terinfeksi *W. bancrofti* (n=38) dari daerah endemis filariasis di Indonesia, yaitu dari Nusa Tenggara Timur. Sampel tersebut telah diperiksa menggunakan mikroskop dan ICT oleh Departemen Parasitologi FKUI.

Ekstraksi DNA

Pada permukaan sediaan hapus darah tebal diteteskan 20 µl *phosphate buffered saline* /PBS;0.02 M, pH 7.4 (Cnops *et al.*, 2010), dan dikerok dengan menggunakan skalpel steril. Kemudian masukkan kerokan sampel ke dalam tabung steril 1,5 ml yang mengandung 80 µl PBS. DNA diekstraksi dengan *spin column* menggunakan *QIAamp DNA Mini* Kit Cat. No. 51364 (Qiagen, 2010) dengan 2 cara.

Pertama, berdasarkan protokol dari *QIAamp DNA Mini Kit* dan cara kedua berdasarkan protokol lain dengan mereduksi buffer yang dipakai (Cnops *et al.*, 2010).

Tabel 1. Jumlah volume buffer yang dipakai berdasarkan kit dan jurnal

QIAamp Mini Kit	Jurnal
• 200 µl AL buffer	• 100 µl AL buffer
• 200 µl Etanol absolut	• 50 µl Etanol absolut
• 150 µl AE buffer	• 50 µl AE buffer

Real Time PCR pada Sediaan Hapus Darah Tebal

SspI repeat (GenBank No. L20344) merupakan target sekuen yang digunakan untuk amplifikasi DNA *W. bancrofti* (Zhong *et al.*, 1996). Target ini yang akan digunakan untuk metode *Real Time PCR* dengan panjang produk 134 bp. Campuran *Real Time PCR* yang digunakan dalam total volume 25 µl mengandung *Wban. forward* primer 10 µM (5'CGTGATGGCATCAAAG3'), *Wban. reverse* primer 10 µM (5'AAATAAGGTTATACCAAGCA3') dan *QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix* (Cat. No 204052) yang berisi: *HotStarTaq Plus DNA Polymerase*, *QuantiFast SYBR Green PCR buffer*, *dNTP mix* (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *ROX passive reference dye*, dan *RNAse Free Water* (Qiagen, 2010). Dilakukan optimasi untuk volume dari DNA *template* dan jumlah siklus untuk *Real Time PCR*.

Tabel 2. Optimasi yang dilakukan pada hasil isolasi DNA baik berdasarkan Kit ataupun

Jurnal
Jumlah DNA cetakan dan jumlah siklus
DNA 5 µl, 40 siklus
DNA 2,5 µl, 40 siklus
DNA 2,5 µl, 35 siklus
DNA 2,5 µl, 30 siklus
DNA 2 µl, 30 siklus

Amplifikasi diawali dengan denaturasi awal pada suhu 95° C selama 5 menit. Siklus meliputi denaturasi selama 10 detik pada suhu 95° C dan kombinasi siklus *annealing* dan ekstensi pada suhu 60° C selama 30 detik.

Digunakan *QuantiFast SYBR Green* sebagai detektor fluoresensinya. Data *fluorescence* akan diukur dengan menggunakan *Real Time thermocycler* (MiniOpticon BioRad).

Analisis Data

Data *Real Time PCR* dianalisis menggunakan program komputer dengan *software IQ5* (Versi 3.1). Dari hasil amplifikasi sampel dengan *Real Time PCR* akan diperoleh nilai *cycle threshold* atau Ct. Analisis data secara statistik dilakukan terhadap: Sensitivitas, Spesifisitas, *Positive predictive value* dan *Negative predictive value*. Korelasi antara hasil pemeriksaan mikroskopik dan pemeriksaan *Real Time PCR* akan dihitung dengan rumus *Spearman's correlation*. Hasil pemeriksaan akan dimasukkan dengan bantuan program statistik *SPSS (Statistical Product & Service solution/PASW (Predictive Analytic Software)* versi 17.0

HASIL

Ekstraksi DNA

Hasil ekstraksi DNA dengan *spin column* baik menggunakan metode Qiagen kit ataupun protokol lain (Cnops *et al.*, 2010) ditunjukkan melalui nilai Ct yang dihasilkan dari optimasi *Real Time PCR* yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil optimasi *Real Time PCR* dengan *QuantiFast SYBR Green PCR Kit*, didapatkan jumlah DNA yang akan dipakai pada sampel penelitian adalah 2 µl dengan 30 siklus.

Real Time PCR pada Sediaan Hapus Darah Tebal

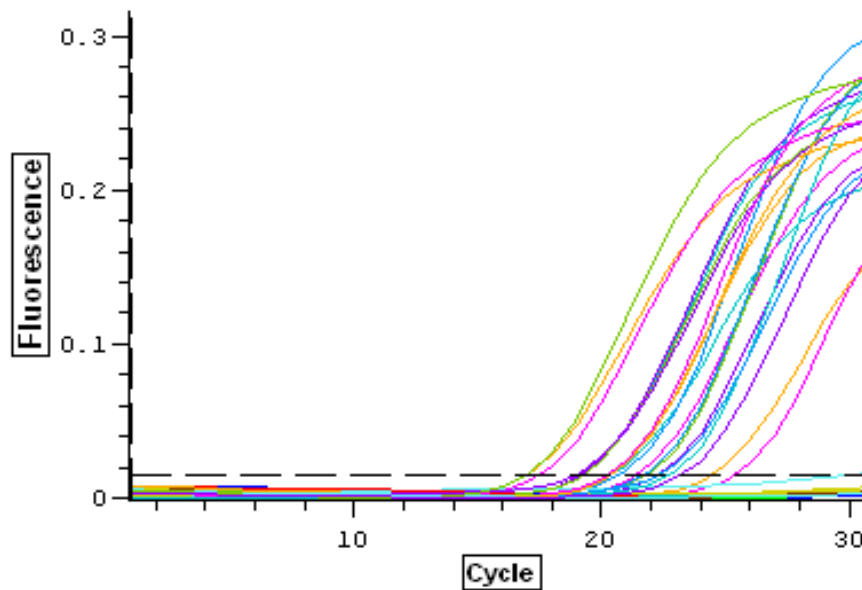
Untuk *running* PCR 65 sampel penelitian ini dibagi dua, *Running* sampel yang pertama sebanyak 45 sampel (26 sampel negatif dan 19 sampel positif dengan pemeriksaan mikroskopis), memberikan hasil 24 negatif dan 21 positif terhadap infeksi *W. bancrofti*. Kisaran nilai Ct terhadap pewarna SYBR Green pada *running* sampel pertama ini adalah antara 16,97 sampai 29,79. Sementara

itu *running* sampel sediaan yang kedua dengan *Real Time* PCR sebanyak 18 sampel (12 sampel negatif dan 6 sampel positif dengan pemeriksaan mikroskopis) menunjukkan hasil yang sama. Untuk kisaran nilai Ct pada *running* sampel sediaan yang kedua ini adalah 19,47 sampai 21,93. Kurva hasil amplifikasi pada sediaan sampel dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

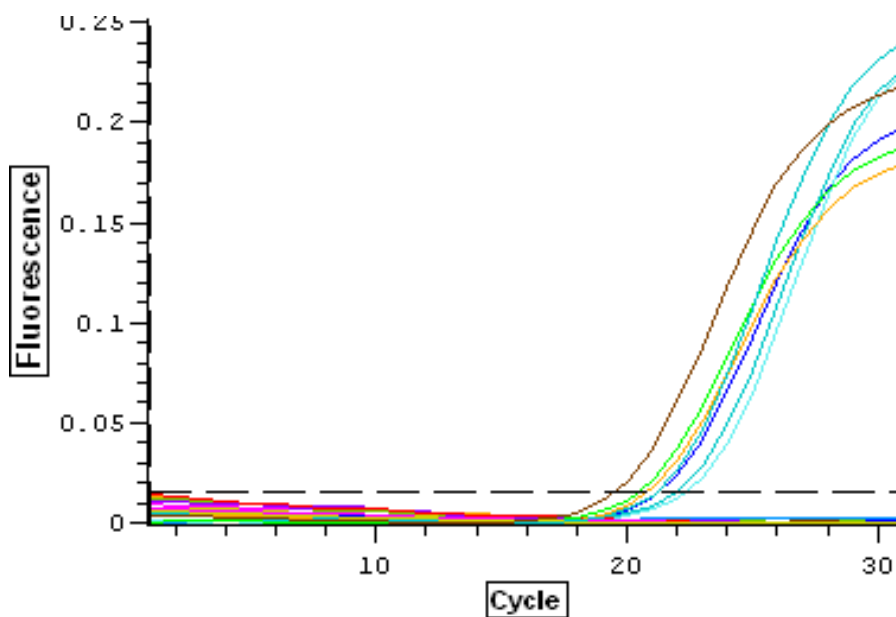
Tabel 3. Nilai Ct yang dihasilkan dari optimasi terhadap set A dan set B

Sampel	Ct Optimasi 1	Ct Optimasi 2	Ct Optimasi 3	Ct Optimasi 4	Ct Optimasi 5
Set A positif	18.67	19.13	19.17	19.20	19.31
Set A negatif	33.21	34.10	34.13	35.19	0
Set B positif	19.36	19.29	19.37	20.63	20.54
Set B negatif	31.84	32.52	32.59	0	0
Kontrol +	20.86	20.65	20.71	22.09	22.27
Kontrol -	0	0	0	0	0

Keterangan: Kontrol positif : DNA murni *W. bancrofti*
 Kontrol negatif: buffer AE (*elution buffer*)



Gambar 1. Hasil amplifikasi sampel 1-45
 Kisaran nilai Ct pada sampel pertama antara 16,97 - 29,79.



Gambar 2. Hasil amplifikasi sampel 46-63
Kisaran nilai Ct pada sampel kedua antara 19,47 - 21,93.

PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan menggunakan Kit yaitu *spin column*. Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *spin column* berdasarkan ikatan yang terbentuk antara molekul DNA dengan permukaan silika karena adanya garam-garam tertentu dan dipengaruhi oleh kondisi pH tertentu. Asam nukleat akan terabsorpsi ke permukaan silika selama sentrifugasi. Garam dan pH akan memastikan bahwa protein dan kontaminan lainnya yang dapat menghambat PCR dan reaksi enzimatis tidak akan diserap dan dihilangkan (Qiagen, 2010).

Dari hasil ekstraksi DNA dengan *spin column* didapatkan Qiagen kit lebih baik dibandingkan protokol lain (Cnops *et al.*, 2010). Hal ini mungkin disebabkan material sampel yang dikerok berdasarkan protokol Cnops *et al.* (2010) hanya 10 μ l dan volume buffer direduksi dari *QIAamp DNA Mini Kit*. Di samping itu ekstraksi DNA dengan

Qiagen kit memberikan nilai Ct yang relatif konstan dengan metode *Real Time PCR*.

Real Time PCR pada Sediaan Hapus Darah Tebal

Status diagnosis sampel tersebut positif atau negatif ditentukan berdasarkan nilai Ct yang diperoleh. Nilai Ct ditentukan terutama oleh jumlah *template* yang ada di awal reaksi amplifikasi (BioRad, 2006).

Kisaran nilai Ct untuk seluruh sampel adalah 16,97 - 29,79. Kisaran nilai Ct tersebut menunjukkan adanya amplifikasi pada *W. bancrofti*. Pada sampel penelitian ini, nilai Ct yang lebih dari 30 dinyatakan dengan N/A (*Not Applicable*). *Not Applicable* artinya sampel yang diperiksa dinyatakan negatif terhadap infeksi *W. bancrofti*.

Nilai Ct ditentukan terutama oleh jumlah cetakan yang ada di awal reaksi amplifikasi. Jika jumlah cetakan pada awal reaksi tersedia banyak maka relatif sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan agar produk memberikan sinyal fluoresensi,

sehingga reaksi ini akan memiliki nilai Ct yang rendah. Sebaliknya jika yang tersedia sedikit, maka reaksi ini akan memiliki nilai Ct yang tinggi (BioRad, 2006).

Sensitivitas *Real Time* PCR terhadap Metode Mikroskopik

Real Time PCR pada sediaan hapus darah tebal mempunyai sensitivitas dan *negative predictive value* yang tinggi terhadap metode mikroskopik. Pada perbandingan antara metode mikroskopik dengan PCR, didapatkan bahwa PCR dapat mengidentifikasi positif filariasis bancrofti (n=27) dan negatif filariasis bancrofti (n=36).

Tidak positifnya hasil pemeriksaan mikroskopik disebabkan tidak ditemukannya mikrofilaria pada darah tepi. Hal ini mungkin dikarenakan pada tubuh penderita yang terinfeksi tersebut hanya terdapat cacing filaria yang *single sex* (cacing betina atau cacing jantan saja) atau densitas mikrofilaria sangat sedikit sehingga tidak terdeteksi.

Konfirmasi Sensitivitas dan Spesifisitas Metode *Real Time* PCR dengan ICT

Pemeriksaan mikroskopik pada 38 sediaan sampel yang negatif mikrofilaria, saat dilakukan metode *Real Time* PCR didapatkan 2 sediaan yang positif terinfeksi filariasis bancrofti. Untuk menghindari positif palsu pada metode *Real Time* PCR maka dilakukan tes konfirmasi dengan menggunakan tes ICT. Hasil tes ICT pada 2 sediaan yang negatif dengan mikroskopik tersebut memberikan hasil yang positif. Hal ini mungkin disebabkan densitas mikrofilaria yang terlalu rendah sehingga tidak dapat dideteksi dengan mikroskop atau karena amikrofilaremik dimana hanya terdapat cacing filaria yang jantan atau betina saja (*single sex*). Adapun tes ICT dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen yang dikeluarkan oleh berbagai stadium cacing filaria.

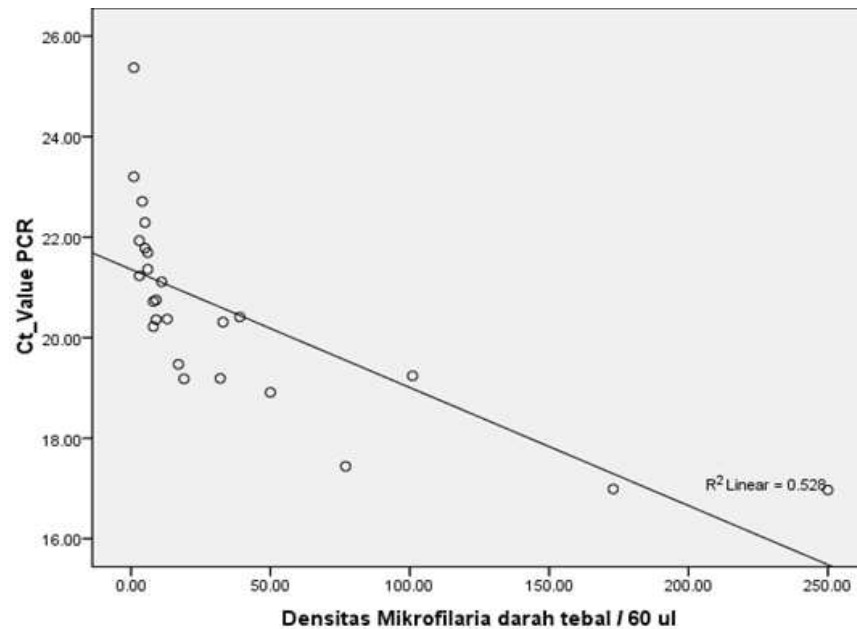
Dari hasil konfirmasi dengan tes ICT ini didapatkan nilai sensitivitas, spesifisitas, *positive* dan *negative predictive value* pada *Real Time* PCR terhadap kombinasi uji diagnostik mikroskopik dan ICT adalah 100%.

Korelasi antara Metode *Real Time* PCR dan Mikroskopik

Korelasi Spearman menunjukkan korelasi yang kuat antara metode mikroskopik dan PCR pada sediaan hapus darah tebal ($r=0,937$) dan $p<0,05$. Hasil ini menunjukkan bahwa metode *Real Time* PCR dengan menggunakan kerokan sampel sediaan hapus darah tebal dapat digunakan sebagai alat uji diagnostik untuk filariasis bancrofti karena mempunyai korelasi yang kuat dengan pemeriksaan mikroskopik.

Hubungan antara Nilai Ct pada Metode *Real Time* PCR dan Densitas Mikrofilaria pada Metode Mikroskopik

Korelasi antara nilai Ct dengan densitas mikrofilaria menggunakan analisis korelasi Spearman menunjukkan korelasi negatif ($R^2 = 0,528$; $r = - 0,726$) dengan nilai $p<0,05$ yang dapat dilihat pada Gambar 3. Korelasi negatif ini menunjukkan semakin tinggi densitas mikrofilaria pada sediaan hapus darah tebal, semakin rendah nilai Ct yang didapatkan. Sebaliknya semakin sedikit densitas mikrofilaria pada sediaan darah tebal akan menunjukkan nilai Ct yang sangat tinggi. Jika pada sediaan hapus darah tebal terdapat banyak mikrofilaria *W. bancrofti*, maka semakin banyak DNA *W. bancrofti* yang terkandung dalam sampel sediaan tersebut. Hal ini menyebabkan amplifikasi semakin cepat terjadi sehingga nilai Ct yang diperoleh akan semakin rendah (BioRad, 2006).



Gambar 3. Korelasi negatif antara densitas mikrofilaria dengan nilai Ct pada *Real Time PCR*

SIMPULAN

Metode *Real Time PCR* mempunyai sensitivitas dan *negative predictive value* yang sangat tinggi terhadap pemeriksaan mikroskopik. Oleh karena itu metode ini lebih tepat digunakan untuk mengevaluasi keberhasilan pada program eliminasi filariasis limfatik, terutama dalam membantu mengevaluasi pasca pengobatan filariasis limfatik. Setelah dilakukan pengobatan filariasis, tampak adanya kecenderungan densitas mikrofilaria yang semakin rendah. Keadaan semacam ini menyebabkan tidak terdeteksinya mikrofilaria di dalam darah tepi dengan pemeriksaan mikroskopik sehingga ditakutkan terjadi negatif palsu. Jika terjadi negatif palsu maka tujuan eliminasi filariasis tidak akan tercapai karena transmisi penyakit masih bisa terjadi.

Mempertimbangkan biaya metode *Real Time PCR* yang tidak sedikit, maka hal ini dapat disiasati dengan melakukan *pooling sample* pada saat dilakukan evaluasi pasca pengobatan. Dengan *pooling sample*, tidak

diperlukan pemeriksaan *Real Time PCR* pada setiap sampel tetapi dapat dikumpulkan dalam beberapa sampel. Jika didapatkan hasil yang positif pada *pooling sample* tersebut maka baru dilakukan pemeriksaan terhadap masing-masing sampel sehingga akan lebih *cost-effective*.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kepada Yayasan YARSI yang menjadi sumber dana untuk penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- BioRad 2006. *Real Time PCR Application Guide*. BioRad Laboratories, Inc, USA.
- Bockarie MJ, Fischer P, Williams SA, Zimmerman PA, Griffin L, Alpers MP *et al.* 2000. Application of a polymerase chain reaction-ELISA to detect *Wuchereria bancrofti* in pools of wild-caught *Anopheles punctulatus* in a filariasis control area in Papua New Guinea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 363-367.
- Bockarie MJ, Kastens TDJ, Alexander W, Dimber ND & Bockarie Z 2002. Mass treatment to eliminate filariasis in Papua New Guinea. *New Engl J Med* 347: 1841- 1848.

- Bockarie MJ & Deb RM 2010. Elimination of lymphatic filariasis: do we have the drugs to complete the job?. *Current opinion in infectious diseases* 23: 617-620.
- Cnops L, Esbroeck MV, Bottieau E & Jacobs J 2010. Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR. *Malaria Journal* 9: 1-7.
- DEPKES 2008. Pedoman program eliminasi filariasis di Indonesia. Jakarta: Bakti Husada.
- DEPKES 2010. Rencana Nasional Program Akselerasi Eliminasi Filariasis di Indonesia 2010 - 2014. Jakarta Departemen Parasitologi Medik Usnamru2 Jakarta
2006. Buku Panduan Pelatihan Diagnosa Mikroskopi Filaria (Edisi ke-2). Jakarta
- Fink DL, Fahle GA, Fischer S, Fedorko DF & Nutman TB 2011. Toward Molecular Parasitologic Diagnosis: Enhanced Diagnostic Sensitivity for Filarial Infections in Mobile Populations. *Journal of Clinical Microbiology* 1: 42-47.
- Fischer P, Wibowo H, Pischeke S, Rückert P, Liebau E, Ismid IS & Supali T 2002. PCR-based detection and identification of the filarial parasite *Brugia timori* from Alor Island, Indonesia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 8: 809-821.
- Goodman DS, Orelus JN, Roberts JM, Lammie PJ & Streit TG 2003. PCR and mosquito dissection as tools to monitor filarial infection levels following mass treatment. *Filaria Journal* 2: 11.
- Helmy H, Fischer P, Farid HA, Farid M, Bradley H & Ramzy RM 2004. Test strip detection of *Wuchereria bancrofti* amplified DNA in wild-caught *Culex pipiens* and estimation of infection rate by a Pool Screen algorithm. *Tropical Medicine and International Health* 9: 158-163.
- Kluber S, Supali T, Williams SA, Liebau E & Fischer P 2001. Rapid PCR-based detection of *Brugia malayi* DNA from blood spots by DNA detection test strips. *Transactions Royal Society Tropical Medicine & Hygiene* 95: 169-170.
- Lizotte MR, Supali T, Partono F & Williams SA 1994. A polymerase chain reaction assay for detection of *Brugia malayi* in blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51: 314-321.
- Nuchprayoon S 2009. DNA-Based Diagnosis of lymphatic filariasis. *J Trop Med Public Health* 5:904-910
- Ottesen EA, Duke BOL, Karam M & Behbehani K 1997. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bulletin of the World Health Organization* 6: 491-503.
- Qiagen 2010. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (Third Edition). QIA Inc., USA.
- Qiagen 2010. QuantiFas® SYBR® Green PCR Handbook. QIA Inc., USA.
- Rahmah N, Nurulhasanah O, Norhayati S, Zulkarnain I & Norizan M 2010. Comparison of conventional versus real-time PCR detection of *Brugia malayi* DNA from dried blood spots from school children in a low endemic area. *Tropical Biomedicine* 1: 54-59.
- Rao RU, Weil GJ, Fischer K, Supali T & Fischer P 2006. Detection of *brugia* parasite DNA in human blood by real time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 3887-3893.
- Supali T, Ismid IS, Wibowo H, Djuardi Y, Majawati E, Ginanjar P & Fischer P 2006. Estimation of the prevalence of lymphatic filariasis by a pool screen PCR assay using blood spots collected on filter paper. *Transactions Royal Society Tropical Medicine & Hygiene*. 100: 753-759.
- Weil GJ, Lammie PJ & Weiss N 1997. The ICT filariais test: A rapid-format antigen test for diagnosis of Bancroftian filariasis. *Parasitology Today* 10: 401-404.
- Weil GJ & Ramzy MR 2006. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. *TRENDS in Parasitology* 23:78-82.
- Zhong M, McCarthy J, Bierwert L, Waniewski ML, Chanteau S, Nutman TB *et al.* 1996. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54: 357-363.