

DETEKSI DAN SPESIASI PARASIT MALARIA SAMPEL MONITORING PENGOBATAN *DIHYDROARTEMISININ-PIPERAQUINE* DI KALIMANTAN DAN SULAWESI: MIKROSKOPIS VS *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Reni Herman,* Endah Ariyanti,* Ervi Salwati,* Delima,* Emiliana Tjitra*

DETECTION AND SPECIATION OF MALARIA PARASITES SAMPLES IN MONITORING DIHYDROARTEMISININ-PIPERAQUINE TREATMENT IN KALIMANTAN AND SULAWESI: MICROSCOPIC VS POLYMERASE CHAIN REACTION

Abstract

*In monitoring the treatment of malaria with Dihydroartemisinin-piperaquine (DHP), microscopic cross check and Polymerase Chain Reaction (PCR) performed to validate the results of laboratory examinations in the field. This study used finger prick samples from subjects with a diagnosis of malaria in monitoring the treatment of malaria with DHP in Kalimantan and Sulawesi. Samples taken at day 0, blood smears made on slides for microscopic and blood spot on filter paper for PCR examination. The PCR method used is a single-round multiplex polymerase chain reaction that has been modified, the examination of each species carried out in different tubes to distinguish the species *P. falciparum* or *P. Vivax*. Target of DNA amplification is a species-specific gene sequences in the small-subunit ribosomal RNA (SSUrRNA), 300 bp for *P. falciparum* and 276 bp for *P.vivax*. *P. falciparum* and *P.vivax* identified in 229 samples of blood smears and blood spots. Microscopic and PCR gave the same results, positive 93.4% and negative 6.6% with a sensitivity of 99% and specificity 93.3%. *P.falciparum* sensitivity and specificity of 92% and 99%, *P.vivax* 97% and 94%, PCR as a gold standard. There are differences in the results of examination of 5 samples, ie with microscopic examination identified as *P.vivax* while the PCR as *P. falciparum*. In this study, identification of the microscopic parasite similar to the results of identification by PCR, but differ in determining the types of parasites. In general, the ability to microscopic diagnosis of malaria is very good, but confirmation by PCR is still needed.*

Key words : Malaria, microscopic, PCR, Plasmodium falcifarum, Plasmodium vivax

Abstrak

*Pada monitoring pengobatan malaria dengan Dihydroartemisinin-piperaquine (DHP),cek silang mikroskopis dan Polymerase Chain Reaction (PCR) dilakukan untuk memvalidasi hasil pemeriksaan di laboratorium lapangan. Penelitian ini menggunakan sediaan darah jari dari subyek dengan diagnosis malaria pada monitoring pengobatan malaria dengan DHP di Kalimantan dan Sulawesi. Sampel diambil pada hari 0, dibuat sediaan apus darah pada kaca benda dan sediaan tetes darah (Blood spot) pada kertas saring. Terhadap sediaan apus darah dilakukan pemeriksaan mikroskopis, dan terhadap sediaan tetes darah dilakukan pemeriksaan PCR. Metode PCR yang digunakan adalah multiplex single round Polymerase Chain Reaction yang telah dimodifikasi, pemeriksaan masing-masing spesies dilakukan pada tabung yang berbeda untuk membedakan spesies *P.falciparum* atau *P. Vivax*. Target amplifikasi DNA adalah gen species-specific sequences pada small-subunit ribosomal RNA (SSUrRNA),*

300 bp untuk *P.falciparum* dan *P.vivax*. *P.falciparum* dan *P.vivax* diidentifikasi pada 229 sampel berupa sediaan apus darah pada kaca benda dan blood spot. Hasil identifikasi dengan mikroskopis dan PCR, sampel positif 93,4% dan negatif 6,6% dengan sensitifitas 99% dan spesifisitas 93,3%. Sensitifitas dan spesifisitas *P.falciparum* adalah 92% dan 99%, *P.vivax* 97% dan 94%, dihitung dengan PCR sebagai baku standar. Terdapat perbedaan hasil pemeriksaan terhadap 5 sampel, yaitu dengan pemeriksaan mikroskopis diidentifikasi sebagai *P.vivax* sementara pada pemeriksaan PCR sebagai *P.falciparum*. Pada penelitian ini, hasil identifikasi parasit dengan mikroskopis sama dengan hasil identifikasi dengan PCR, namun berbeda pada penentuan jenis parasit. Secara umum kemampuan tenaga mikroskopis pusat untuk menegakkan diagnosis malaria sudah sangat baik, namun untuk penentuan jenis *Plasmodium* masih memerlukan konfirmasi PCR.

Kata kunci: Malaria, mikroskopis, PCR, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*

Submit: 5 Juli 2011, Review 1: 6 Juli 2011, Review 2: 6 Juli 2011, Eligible article: 9 September 2011

Pendahuluan

Ada dua metode pemeriksaan yang rutin dilakukan untuk mendeteksi parasit malaria, yaitu *Rapid diagnostic Test* (RDT) dan pemeriksaan mikroskopis. Pilihan untuk menggunakan pemeriksaan mikroskopis atau RDT tergantung dari keadaan daerah, jumlah kasus, epidemiologi malaria dan kemungkinan untuk menggunakan pemeriksaan mikroskopis pada penyakit lain. Pemeriksaan mikroskopis memiliki keuntungan lain karena selain dapat mendeteksi spesies parasit juga dapat ditentukan jumlah parasit sehingga dapat diketahui kemajuan pengobatannya.¹

Pemeriksaan mikroskopis sangat memerlukan keterampilan petugas, karena akurasi dari hasil pemeriksaan mikroskopis dapat menurun 64 % sampai dengan 95% bila jumlah parasit dalam darah menurun atau pada kasus infeksi campuran dimana hanya satu parasit yang terdeteksi.² Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat menjadi pelengkap untuk mengkonfirmasi hasil pemeriksaan mikroskopis. Analisis PCR dapat mendeteksi parasit pada jumlah yang sangat sedikit.³ Walaupun begitu, beberapa studi juga melaporkan bahwa sensitifitas PCR tergantung dari kepadatan parasit.^{4,5}

Hasil pemeriksaan PCR juga dipengaruhi oleh cara pengumpulan dan penyimpanan sampel, ekstraksi

Dalam rangka studi monitoring resistensi obat pada subyek dengan *P.falciparum* dan

P.vivax di Kalimantan dan Sulawesi, pendekatan molekuler digunakan untuk melengkapi data *in-vivo* dan farmakovigilans. Pada studi ini, spesimen darah dari penderita diidentifikasi parasitnya dengan menggunakan pemeriksaan mikroskopis yang dilakukan oleh petugas di Puskesmas. Spesimen darah juga diperiksa ulang oleh petugas di Badan Litbangkes untuk cek silang. Selanjutnya pemeriksaan PCR dilakukan untuk konfirmasi hasil pemeriksaan mikroskopis.

Untuk menentukan kualitas hasil pemeriksaan mikroskopis dan PCR pada penelitian ini, maka hasil identifikasi parasit dengan pemeriksaan mikroskopis oleh tim pusat dibandingkan dengan hasil pemeriksaan PCR.

Metode

Sampel

Sebanyak 229 sampel yang terkumpul pada penelitian ini berasal dari penderita tersangka malaria yang diambil pada hari 0, sebelum pemberian terapi. Sampel berupa sediaan apus darah jari pada kaca benda dan sediaan tetes darah pada kertas saring *Whatman* (*Blood spot*). Terhadap sediaan apus darah dilakukan pemeriksaan mikroskopis oleh petugas di Puskesmas kemudian dilakukan pengecekan kembali di Laboratorium Parasitologi Badan Litbangkes. Sementara terhadap sediaan tetes darah pada kertas saring dilakukan pemeriksaan PCR.

* Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Pemeriksaan mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan untuk identifikasi parasit yang meliputi jenis/spesies, stadium dan kepadatan parasit. Sediaan apus darah tebal pada kaca benda diwarnai dengan larutan Giemsa 3%. Sediaan diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x. Kepadatan parasit dihitung berdasarkan jumlah parasit per 200 leukosit, dengan asumsi jumlah leukosit 5000/ml. Hasil pemeriksaan dinyatakan negatif apabila tidak ditemukan parasit dalam 100 lapang pandang. Semua hasil final pemeriksaan mikroskopis selanjutnya dikonfirmasi spesiesnya dengan pemeriksaan PCR.

Pemeriksaan PCR

Pemeriksaan PCR meliputi 3 tahap yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi DNA dan elektroforesis DNA pada gel agarose. Ekstraksi DNA dari kertas filter *Whatman* menggunakan metode filtrasi kolom (kit Qiagen) dengan metode kerja sesuai dengan instruksi dari produsen.

Metode yang digunakan adalah *multiplex single round Polymerase Chain Reaction* yang telah digunakan oleh *Menzies School of Health Research* (MSHR), ada modifikasi pada volume reagen dan suhu pada prosedur PCR. Target amplifikasi DNA adalah gen *species-specific sequences* pada *small-subunit ribosomal RNA* (SSUrRNA). Meskipun dilakukan dengan metode *multiplex*, namun reaksi untuk masing-masing spesies dilakukan pada tabung yang berbeda karena sulit untuk membedakan spesies *P.falciparum* atau *P.vivax* dengan panjang pita yang hampir sama.

Primer yang digunakan untuk pemeriksaan PCR adalah; Universal (RevMal) arah *reverse* dengan urutan basa GTA TCT GAT CGT CTT

CAC TCCC (jumlah basa 22), *P.falciparum*: arah primer *forward* dengan urutan basa AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT GAG (jumlah basa 24) dan *P.vivax* : arah primer *forward* dengan urutan basa CGG CTT GGA AGT CCT TGT (jumlah basa 18).

Reagen PCR yang digunakan adalah produksi *Applied Biosystem*, yang komposisinya 10 x PCR buffer (without MgCl₂) 5 µl, dNTP mix (10 mM) 1 µl, MgCl₂ (25mM) 5 µl, Rev Mal primer (10 µM each) 0,6 µl, Primer PF/PV (10 µM each) 0,6 µl, Tag DNA polymerase 5 U/µl 0,25 µl. Volume campuran reagen sampai 45 µl,

lalu ditambahkan sampel DNA 5 ul. Prosedur PCR yang digunakan; tahap I suhu 95 ° C -- 10 menit jumlah siklus 1, dan tahap 2 : suhu 95 ° C – 45 detik, 62 ° C – 90 detik dan 72 ° C – 5 menit dengan jumlah siklus 43. Selanjutnya produk PCR dielektroforesis pada gel agarose 2%. Hasil elektroforesis produk DNA sampel akan menunjukkan panjang pita 300 bp untuk *P.falciparum* dan 276 bp untuk *P.vivax*

Analisis data

Analisis data menggunakan program SPSS 15.0 dan program *excel*. Hasil pemeriksaan PCR digunakan sebagai baku standar untuk menentukan nilai sensitifitas dan spesifisitas. Variabel yang diukur adalah nilai *True positive* (TP), *True negative* (TN), *False positive* (FP) dan *False negative* (FN). Nilai sensitifitas diukur dengan menghitung TP/ (TP +FN), dan spesifisitas TN/(TN+FP). Nilai duga positif dihitung berdasarkan TP/(TP+FP) dan nilai duga negatif TN/(FN+TN). Nilai rasio kemungkinan positif diukur dengan menghitung nilai sensitifitas/(1-spesifisitas). Nilai rasio kemungkinan negatif dihitung berdasarkan (1-sensitifitas)/ spesifisitas. Adapun akurasi dihitung berdasarkan (TP+TN)/jumlah sampel. Perhitungan nilai pemeriksaan seperti yang dilakukan oleh Tjitra *et al.*⁷

Hasil

Pada penelitian ini masing-masing terkumpul 229 sediaan darah jari dan *blood spot* dari penderita malaria yang diambil pada hari 0. Proporsi *Plasmodium* yang positif pada pemeriksaan mikroskopis baik bentuk seksual maupun aseksual sama dengan pemeriksaan PCR, yaitu 214 (93,4%). Dari jumlah yang positif, 1 sampel ditemukan 1 parasit dalam bentuk seksual. Penemuan *Plasmodium* dari pemeriksaan mikroskopis terhadap PCR memiliki sensitifitas dan spesifisitas diatas 93%, demikian juga dengan nilai duga positif dan negatif. Rasio kemungkinan positif lebih dari 10 sementara ratio kemungkinan negatif kurang dari 0,1. Akurasi pada penentuan *Plasmodium* adalah 99%. Pada penentuan *P.falciparum*, nilai sensitifitas dan spesifisitas ≥ 92%, dengan nilai duga positif dan negatif ≥ 91%. Rasio kemungkinan positif adalah 94,8 dan ratio kemungkinan negatif 0,08. Akurasi pada penentuan *P.falciparum* 95%. Pada *P.vivax*, nilai

sensitifitas dan spesifisitas $\geq 94\%$, nilai duga positif dan negatif ≥ 93 . Rasio kemungkinan positif 18 dan nilai duga negatif 0,02. Nilai akurasi pada penentuan *P.vivax* adalah 96%.(Tabel 1).

Berdasarkan Tabel 2, komposisi jenis parasit yang positif berdasarkan pemeriksaan mikroskopis sedikit berbeda dengan hasil pemeriksaan PCR. *Plasmodium falciparum* ditemukan 114 dengan pemeriksaan mikroskopis sementara dengan pemeriksaan PCR 119. *Plasmodium vivax* ditemukan 97 dengan pemeriksaan mikroskopis sementara dengan PCR 88. Infeksi campuran lebih banyak ditemukan pada pemeriksaan PCR.

Jumlah parasit pada penelitian ini berada pada kisaran 0 sampai 122.413 parasit/ul, dengan *mean* 10224 parasit/ul. Jumlah parasit terbanyak adalah pada kisaran > 5000 /ul, dan semakin rendah jumlah parasit, semakin kecil proporsi jumlah sampel. Hasil temuan ini sama dengan pemeriksaan mikroskopis maupun pada pemeriksaan PCR. (Gambar 1 & gambar 2).

Pada penelitian ini, proporsi *P.falciparum* tampak lebih tinggi pada jumlah parasit ≥ 5000 (Gambar 1), sementara proporsi *P. vivax* lebih tinggi pada jumlah parasit 500-4999/ul (Gambar 2). Jumlah parasit ≤ 50 dan ≥ 5000 dengan pemeriksaan mikroskopis dan PCR memberikan hasil yang sama. Sementara pada jumlah parasit 51-4999 tampak ada perbedaan (Gambar 1 dan gambar 2)

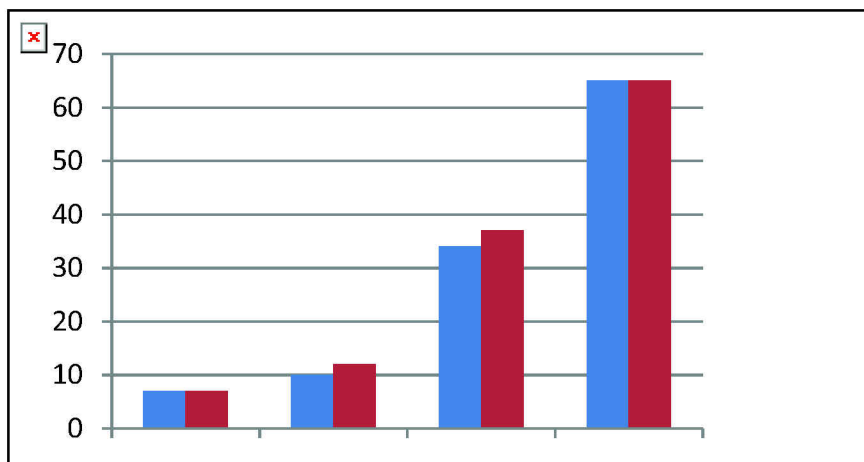
Tabel 1. Kualitas Hasil Pemeriksaan Mikroskopis* Terhadap PCR Pada Monitoring Pengobatan Malaria Dengan DHP di Kalimantan dan Sulawesi

	Sensitifitas (%) CI 95%	Spesifisitas (%) CI 95%	Nilai duga Positif (%)	Nilai duga negatif (%)	Rasio kemungkinan		Akurasi (%)
					Positif (CI 95%)	Negatif (CI 95%)	
<i>Plasmodium sp</i>	99 (97.4-99.9)	93.3 (70-98.8)	99 (97-99.9)	93.3 (70-98.8)	14.14 (2.24-99.1)	0.005 (0.001-0.036)	99
<i>P.falciparum</i>	92 (86-95.6)	99 (94.79.8)	99 (94.6-99.9)	91 (83.8-95.4)	94.8 (13.4-667.2)	0.08 (0.04-0.145)	95
<i>P.vivax</i>	97 (92.6-99.4)	94 (89.6-97.4)	93 (85.6-96.8)	98 (92.9-99.7)	18 (CI 9.1- 38.5)	0.02 (0.006-0.088)	96

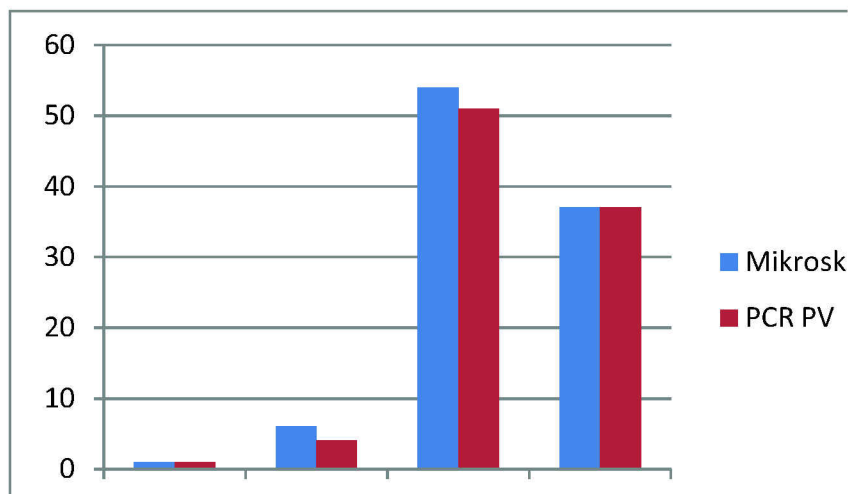
*Parasit seksual dan aseksual

Tabel 2. Distribusi Frekuensi *Plasmodium Sp* Berdasarkan Hasil Pemeriksaan Mikroskopis dan PCR Pada Monitoring Pengobatan Malaria dengan DHP di Kalimantan dan Sulawesi

	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum & P.vivax</i>	Jumlah
Mikroskopik	114 (53.3%)	97 (45.3%)	3 (1.4%)	214
PCR	119 (55.6%)	88 (41.1%)	7 (3.2%)	214



Gambar 1. Distribusi Frekwensi Hasil Identifikasi *P. Falciparum*
Berdasarkan Jumlah Parasit dengan Pemeriksaan Mikroskopis dan PCR Pada Monitoring Pengobatan Malaria dengan DHP di Kalimantan dan Sulawesi



Gambar 2. Distribusi Frekuensi Hasil Identifikasi *P. Vivax*
Berdasarkan Jumlah Parasit Dengan Pemeriksaan Mikroskopis dan PCR Pada Monitoring Pengobatan Malaria dengan DHP di Kalimantan dan Sulawesi

Tabel 3. Komposisi Parasit pada Jumlah 51-4999/ul

Jumlah (parasit/ul)	Mikro skopis		PCR	
	PF	PV	PF	PV
51-499	10	6	12	4
500-4999	34	54	37	51

Terdapat 5 sampel yang ditemukan *P. vivax* dengan pemeriksaan mikroskopis, namun dengan pemeriksaan PCR diidentifikasi sebagai *P. falciparum*. Satu sampel yang teridentifikasi sebagai *P. vivax* dengan pemeriksaan mikroskopis, dengan PCR diidentifikasi sebagai infeksi campuran (Tabel 3).

Pembahasan

Sampel dari penelitian ini diperoleh dari penderita malaria yang direkrut untuk studi monitor resistensi obat pada penderita dengan infeksi *P.falciparum* dan *P.vivax*. Oleh karena itu, hasil pemeriksaan pada penelitian ini yang mestinya positif untuk parasit tersebut, dalam kenyataannya masih ditemukan hasil yang negatif. Karena keterampilan petugas sangat mempengaruhi hasil pemeriksaan mikroskopis,² dan sangat bervariasi keterampilan dan pengalaman petugas di lapangan untuk pemeriksaan mikroskopis, maka dapat terjawab pertanyaan mengapa masih ada hasil pemeriksaan yang negatif. Namun begitu secara umum keterampilan petugas pusat dalam mengidentifikasi parasit malaria sudah baik, dengan nilai sensitifitas dan spesifisitas cukup tinggi (92%-99%). Demikian juga dengan nilai duga positif dan negatif yang cukup tinggi. Nilai diagnosis pada penelitian ini juga baik karena rasio kemungkinan positif di atas 10 dan rasio kemungkinan negatif di bawah 0,1 serta akurasi $\geq 95\%$.(Tabel 1).

Hasil identifikasi spesies parasit sedikit berbeda antara pemeriksaan mikroskopis dan PCR (Tabel 2). Beberapa hal yang dapat menjadi penyebabnya adalah; berbedanya sediaan darah yang diperiksa. Pada pemeriksaan mikroskopis sampel yang diperiksa adalah sediaan apus darah pada *kaca benda*, sementara pada pemeriksaan PCR menggunakan sediaan tetes darah pada kertas saring. Perbedaan juga dapat disebabkan oleh jumlah darah pada kedua sediaan berbeda, kesalahan di lapangan seperti tertukarnya sampel antara satu subyek penelitian dengan yang lain, atau kesalahan pada saat penomoran sediaan darah. Perbedaan ini dapat ditelusuri penyebabnya bila dilakukan pemeriksaan PCR dari kerokan darah pada *kaca benda* setelah pemeriksaan mikroskopis. Penyebab lain adalah jumlah parasit yang rendah, sehingga parasit yang ditemukan berbeda pada pemeriksaan dengan kedua metode.²

Oleh karena jumlah parasit dapat mempengaruhi hasil identifikasi pada pemeriksaan mikroskopis² demikian juga dengan pemeriksaan PCR,⁶ maka dilakukan pemisahan jumlah parasit untuk melihat sebaran jumlah parasit terbanyak. Secara umum hampir sama jumlah parasit yang ditemukan antara pada pemeriksaan mikroskopis dan PCR berdasarkan jenis parasit. Namun ada sedikit perbedaan frekwensi jenis parasit pada kedua jenis pemeriksaan dengan jumlah parasit antara 51-499/ul dan 500-4999/ul.(Gambar 1 & 2). Parasitemia pada *P. falciparum* lebih tinggi dibandingkan dengan *P. vivax*, terlihat pada frekuensi *P. falciparum* paling banyak pada jumlah parasit $\geq 5000/\text{ul}$, *P.vivax* frekuensi terbanyak pada jumlah parasit 500-4999/ul. Kenyataan ini dapat dijelaskan dengan melihat jenis sel darah merah yang diinfeksi oleh kedua parasit, *Plasmodium falciparum* menyerang sel darah merah dewasa, sementara *P.vivax* menyerang sel darah merah muda yang jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan sel darah merah dewasa.

Secara umum pemeriksaan PCR lebih sensitif dan spesifik dibandingkan pemeriksaan mikroskopis.^{8,9} Pada penelitian ini terdapat 5 sampel ditemukan *P. vivax* dengan pemeriksaan mikroskopis namun diidentifikasi sebagai *P. falciparum* dengan pemeriksaan PCR (Tabel 3). Hasil ini memerlukan pemeriksaan lebih lanjut, mengingat jumlah parasit pada kelima sampel tersebut tidak sedikit sehingga kecil kemungkinan kesalahan deteksi oleh tenaga mikroskopis.

Kesimpulan

Pada penelitian monitoring resistensi obat pada subyek dengan *P.falciparum* dan *Plasmodium vivax* di Kalimantan dan Sulawesi, hasil identifikasi parasit dengan pemeriksaan mikroskopis sama dengan hasil identifikasi dengan PCR, namun berbeda pada penentuan jenis parasit. Secara umum kemampuan tenaga mikroskopis pusat sudah sangat baik untuk menegakkan diagnosis malaria, namun untuk penentuan jenis *Plasmodium* masih memerlukan konfirmasi dengan pemeriksaan PCR.

Ucapan Terima kasih

Terima kasih diucapkan kepada berbagai pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ,Global Fund (yang telah membantu

pendanaan sehingga penelitian ini dapat terlaksana), Dirjen PP & PL (selaku Sub Resipient), Kepala Badan Litbang Kesehatan dan Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi (selaku Pelindung dan Koordiantor yang telah membantu memfasilitasi kegiatan penelitian), Kepala Dinas Kesehatan Propinsi Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Sulawesi Utara dan Sulawesi Tengah dan Staf serta Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Pontianak, Katingan, Minahasa Tenggara dan Sigi beserta staf (yang banyak membantu perijinan dan pelaksanaan penelitian di lapangan), Kepala Puskesmas Toho, Anjungan, Kasongan Tumbang Samba, Touluaan, Tambelang, Baluase dan Banpres beserta staf (yang banyak membantu pengumpulan sampel dan spesimen malaria di lapangan)

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. Diagnosis of malaria. Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. World Health Organization 2010.
2. Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC: Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1994, 47:740-742.
3. Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Int Health* 2003; 8 : 876-83.
4. Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain KC: Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *P.falciparum* malaria in travelers. *Am J Trop Med Hyg* 1997, 56:44-48.
5. Hanscheid T, Valadas E: Poor accuracy of rapid diagnostic tests and misdiagnosis of imported malaria: are PCR-based reference laboratories the answer? *J Clin Microbiol* 2002, 40:736-737.
6. Jelinek T, Prohl S, Hess F, Kabagambe G, von Sonnenburg F, Loscher T, Kilian AH: Geographic differences in the sensitivity of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1996, 55:647-651.
7. Tjitra E, Suprianto S, Dyer M, Currie BJ, Anstey NM: Field evaluation of the ICT malaria P.F/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. *J Clin Microbiol* 1999, 37:2412-2417.
8. Makler MT, Palmer CJ, Ager AL: A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998, 92:419-433.
9. Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwongtragoon K, Wirth DF: *Plasmodium falciparum* and *P.vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCR based diagnosis of malaria. *Exp Parasitol* 1994, 79:41-49.