

## **Pelacakan Virus *Bovine Viral Diarrhea* pada Darah yang Dikoleksi dengan Kertas Saring Flinders *Technology Associates*<sup>TM</sup>**

*(DETECTION OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS FROM BLOOD  
SAMPLES COLLECTED USING FLINDERS TECHNOLOGY  
ASSOCIATES<sup>TM</sup> CARDS)*

**Hastari Wuryastuti<sup>1</sup>, Raden Wasito<sup>2</sup>, Prabowo Purwono Putro<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Penyakit Dalam, <sup>2</sup>Departemen Patologi,  
<sup>3</sup>Departemen Reproduksi dan Teknologi Reproduksi,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Fauna No 2 Kompleks Karangmalang, Yogyakarta 55281, Indonesia  
Telp. (0274) 560861, E-mail hastari\_ugm@yahoo.com

### **ABSTRAK**

*Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) merupakan salah satu agen penyakit penyebab kerugian ekonomi utama pada industri sapi perah di seluruh dunia. Amplifikasi gen 5'-UTR virus BVD dalam sampel darah dengan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) merupakan uji yang sensitif dan akurat untuk deteksi adanya BVDV. Keterbatasan untuk deteksi virus secara molekuler adalah kemampuan untuk memperoleh kualitas asam nukleat yang tinggi dalam sampel. Kondisi penyimpanan yang kurang tepat dapat berakibat terjadinya hasil uji negatif palsu. Lima sampel darah- *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) dari sapi penderita infeksi persisten BVDV digunakan dalam penelitian ini. Darah ditetaskan dibagian tengah dari setiap kertas saring Flinders *Technology Associates*<sup>TM</sup> (FTA) yang telah diberi kode sampel dan dibiarkan mengering pada suhu ruang selama sekitar dua jam. Pada setiap sampel dilakukan 10 kali ulangan. Efektivitas penggunaan kertas saring FTA<sup>TM</sup> dalam penyimpanan dan perolehan kembali RNA BVDV dari sampel darah diuji dan dievaluasi secara molekuler dengan teknik RT-PCR. Hasil membuktikan bahwa kertas saring FTA<sup>TM</sup> efektif dan aman untuk penyimpanan genom BVDV dalam waktu lama pada temperatur ruang. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa di bidang Kedokteran Hewan, aplikasi teknologi FTA perlu diperluas untuk berbagai jenis sampel dan layak digunakan secara rutin untuk pengambilan sampel yang mengandung agen infeksi.

Kata-kata kunci : *bovine viral diarrhoea virus, reverse-transcriptase polymerase chain reaction, kertas saring Flinders Technology Associates*<sup>TM</sup> (FTA), sampel darah.

### **ABSTRACT**

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a common pathogen that causes major economic losses to dairy industry worldwide. Amplification of 5'-UTR regions of BVDV genome from blood samples using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is one of sensitive and accurate techniques for BVDV detection. A common limitation for molecular detection of virus is the ability to obtain high quality of nucleic acid in the samples. Inappropriate storage conditions will result in a false negative test. Five EDTA-blood samples collected from BVDV persistently infected cattle were used in the present study. Ten repetitions were done for each sample. The blood were then dripped in the middle part of the Flinders *Technology Associates*<sup>TM</sup> (FTA) cards and let it dried for approximately 2 hours. The effectiveness of the FTATM cards for storage and retrieval of BVDV RNA from blood samples molecularly using RT-PCR technique were tested and evaluated. The results proved that FTATM cards are effective and safe for the storage of BVDV genome for a long period at room temperature. Based on the result of the present study, it can be concluded that in veterinary medicine field, the application of FTATM technology needs to be developed to various type of samples and should be used routinely for collecting samples containing infectious agents.

Keywords: Bovine viral diarrhoea virus, reverse-transcriptase polymerase chain reaction, FTA<sup>TM</sup> cards, blood samples.

## PENDAHULUAN

*Bovine Viral Diarrhea* (BVD) atau diare ganas pada sapi merupakan salah satu penyakit hewan penyebab kerugian ekonomi pada industri sapi perah di seluruh dunia yang disebabkan oleh virus RNA genus *Pestivirus* family *Flaviridae* (Wengler *et al.*, 1995). Konsekuensi klinis yang ditimbulkan oleh infeksi virus BVD sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat subklinis hingga infeksi yang bersifat fatal. Kerugian ekonomi yang terbesar akibat infeksi oleh *Bovine Viral Diarrhea Virus* (BVDV) berhubungan dengan gangguan reproduksi (Brock *et al.*, 2005). Gangguan reproduksi akibat infeksi oleh BVDV antara lain kegagalan konsepsi, kematian awal embrio, abortus, malformasi kongenital, pedet lahir lemah, dan pedet terinfeksi virus secara persisten (Baker, 1995). Pedet yang terinfeksi BVDV secara persisten adalah konsekuensi yang paling merugikan karena bersifat imunotoleran dan merupakan pabrik penghasil BVDV yang menularkan virus secara cepat dan terus menerus sepanjang hidupnya melalui kontak langsung dengan sapi-sapi yang peka dan belum divaksinasi (Fulton *et al.*, 2005; 2006). Oleh karena itu, diagnosis yang akurat adanya infeksi persisten BVDV sangat penting untuk manajemen kesehatan kelompok sapi di tingkat lokal dan pengembangan program pengendalian penyakit di tingkat nasional (Lindberg dan Houe, 2005).

Hingga saat ini, isolasi virus merupakan *gold standar* untuk diagnosis BVDV. Waktu uji yang relatif lama dan ketergantungan adanya BVDV hidup di dalam sampel memicu terjadinya hasil uji negatif palsu. Metode deteksi BVDV yang lain seperti *capture ELISA* dan imunohistokimia memiliki keterbatasan karena sensitivitas yang bervariasi. Metode *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen 5'-UTR virus BVD dalam sampel darah merupakan uji yang cepat dan tepat untuk deteksi adanya infeksi persisten BVDV pada pedet karena dapat mengeliminasi pengaruh antibodi induk yang dapat mengganggu hasil (Weinstock *et al.*, 2001; Kozasa *et al.*, 2005). Keterbatasan yang sering terjadi untuk mempelajari virus pada level molekuler adalah kemampuan untuk mendapatkan kualitas asam nukleat yang tinggi dalam sampel. Sampel harus dikoleksi dan diawetkan untuk mempertahankan integritas asam nukleat

sampai sampel dapat diproses. Kondisi penyimpanan yang kurang tepat karena suhu yang tinggi dan jarak waktu yang terlalu lama antara koleksi sampel dengan uji laboratorik akan mengakibatkan terjadinya hasil uji negatif palsu. Berdasarkan hal tersebut, diperlukan alternatif cara untuk pengambilan, penyimpanan, dan mendapatkan kembali genomik RNA BVDV sehingga diperoleh hasil uji yang akurat.

Kertas saring Flinders *Technology Associates* (FTA<sup>TM</sup> cards) adalah membran selulosa berbahan dasar katun yang berisi senyawa *chaotropic* sehingga mampu menginaktivasi mikro-organisme, melisiskan materi seluler, dan memfiksasi DNA dan/atau RNA dalam serat matriks (Whatman, 2004). Penggunaan kertas saring FTA<sup>TM</sup> terbukti efektif untuk deteksi berbagai agen infeksius dari berbagai jenis sampel biologis (Smith dan Burgoyne, 2004; Picard-Meyer *et al.*, 2007; Omoigui *et al.*, 2011) terutama beberapa virus unggas seperti virus tetelo (Perozo *et al.*, 2006), virus *infectious bronchitis* (Moscoso *et al.*, 2005), virus gumboro (Moscoso *et al.*, 2006), dan virus flu burung (Abdelwhab *et al.*, 2011; Kraus *et al.*, 2011).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari kemampuan kertas saring FTA<sup>TM</sup> dalam penyimpanan dan memperoleh kembali RNA BVDV secara molekuler dengan PCR dari sampel darah sapi penderita infeksi persisten BVDV setelah disimpan dalam berbagai waktu dan suhu penyimpanan yang berbeda.

## METODE PENELITIAN

Sebanyak lima sampel darah yang diberi antikoagulan *ethylene diamine tetra acetic acid* (darah-EDTA) yang dikoleksi dari sapi penderita infeksi persisten BVDV digunakan dalam penelitian ini. Segera sesudah darah dikoleksi, 40 µL diteteskan di bagian tengah dari setiap kertas saring FTA<sup>TM</sup> (Whatman International Ltd. Springfield Mill, James Whatman Way Sandling Road, Maidstone Kent ME 14 2 LE, UK) yang telah diberi kode sampel yang sesuai dan sampel dibiarkan mengering pada suhu ruang selama sekitar dua jam. Untuk setiap sampel dilakukan 10 pengulangan. Segera sesudah sampel kering lima kertas saring FTA<sup>TM</sup> diambil untuk analisis PCR hari ke-0. Sisa kertas saring FTA<sup>TM</sup> (45 kartu) dibagi menjadi tiga kelompok (masing-masing kelompok 15 kartu). Kelompok 1 disimpan di

dalam *freezer*, kelompok 2 disimpan di dalam almari pendingin, dan kelompok 3 (sisanya) disimpan pada suhu ruang. Pada hari ke-7 (minggu pertama sesudah masa penyimpanan) lima kartu dari setiap kelompok kertas saring FTA™ diambil untuk analisis PCR minggu I. Cara ini diulang pada minggu ke-2 dan ke-4 sesudah penyimpanan. Hasil analisis PCR kemudian dibandingkan dan dianalisis secara deskriptif.

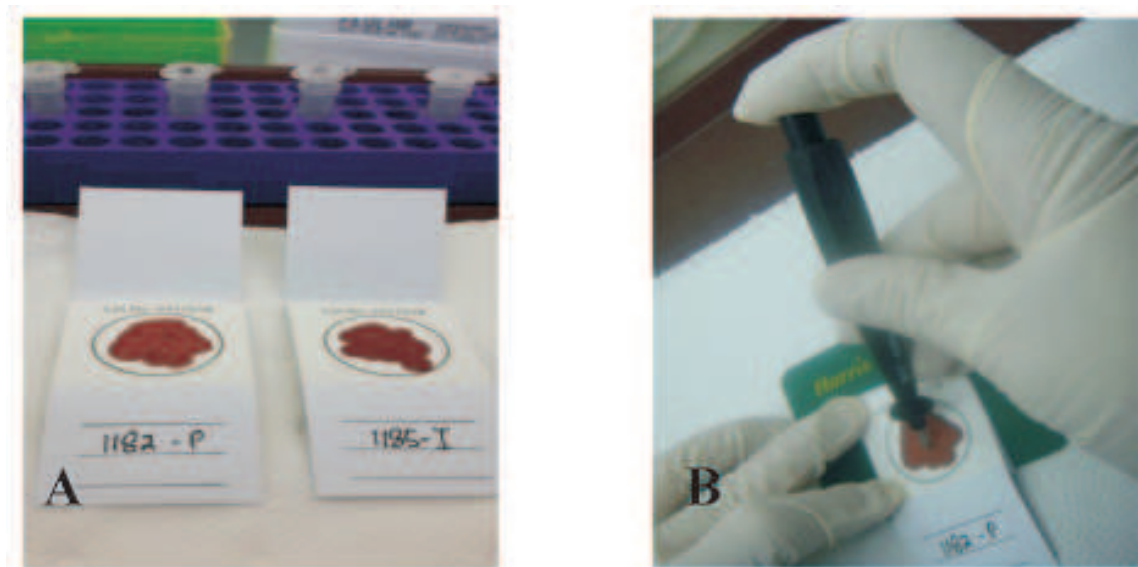
#### Persiapan Sampel untuk Analisa RT-PCR

Bagian tengah dari kertas saring FTA™ yang telah ditetesi sampel darah dilubangi dengan menggunakan alat *Harris Uni-Core* berdiameter 2,0 mm (Gambar 1). Alat selalu dibersihkan dengan alkohol di antara pengambilan sampel untuk mencegah terjadinya kontaminasi silang. Sampel pada kertas saring FTA™ kemudian dimasukkan kedalam tabung ependorf 1,5 mL yang berisi 200 µL larutan purifikasi FTA. Tabung diinkubasi pada suhu ruang selama lima menit. Sesudah inkubasi, larutan dibuang dengan cara dipipet. Langkah pencucian ini diulang sebanyak tiga kali. Sesudah pembuangan larutan purifikasi FTA yang terakhir, 200 µL bufer TE ditambahkan kedalam tabung ependorf yang berisi sampel. Tabung diinkubasi pada suhu ruang selama lima menit. Sesudah inkubasi, bufer TE dibuang dengan cara dipipet. Langkah pencucian ini diulang sebanyak dua kali. Sesudah pembuangan bufer TE yang terakhir, kertas

saring FTA™ dibiarkan mengering pada suhu ruang sekitar satu jam. Sampel pada kertas saring FTA™ yang sudah dipurifikasi siap ditambahkan ke dalam setiap reaksi PCR.

#### Uji *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

Untuk amplifikasi gen 5'-UTR *virus bovine viral diarrhea* digunakan pasangan primer 5'-TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC-3' dan 5'-ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC-3'. Amplifikasi genom virus dilakukan dalam tabung tunggal dengan satu enzim RT-PCR. Ke dalam setiap tabung PCR dimasukkan campuran reaksi yang mengandung satu kali buffer, masing-masing *deoxynucleotide triphosphate* 400 µM, 4 mM *manganese acetate*, 5 U enzim *rTth* DNA polymerase, sampel pada kertas saring FTA™ yang sudah dipurifikasi, *forward* primer dan *reverse* primer masing-masing 0,60 µM dan *RNase-free* H<sub>2</sub>O hingga volume keseluruhan menjadi 50 µL. Campuran reaksi awalnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 62°C dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 94°C selama dua menit dan 40 siklus amplifikasi yang masing-masing terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, tahap *annealing*-ekstensi pada temperatur 62°C selama satu menit dan tahap ekstensi akhir pada temperatur 65°C selama 10 menit. Produk amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis pada *agarose gel* 2% dan diwarnai dengan *ethidium bromide* (Weinstock *et al.*, 2001).



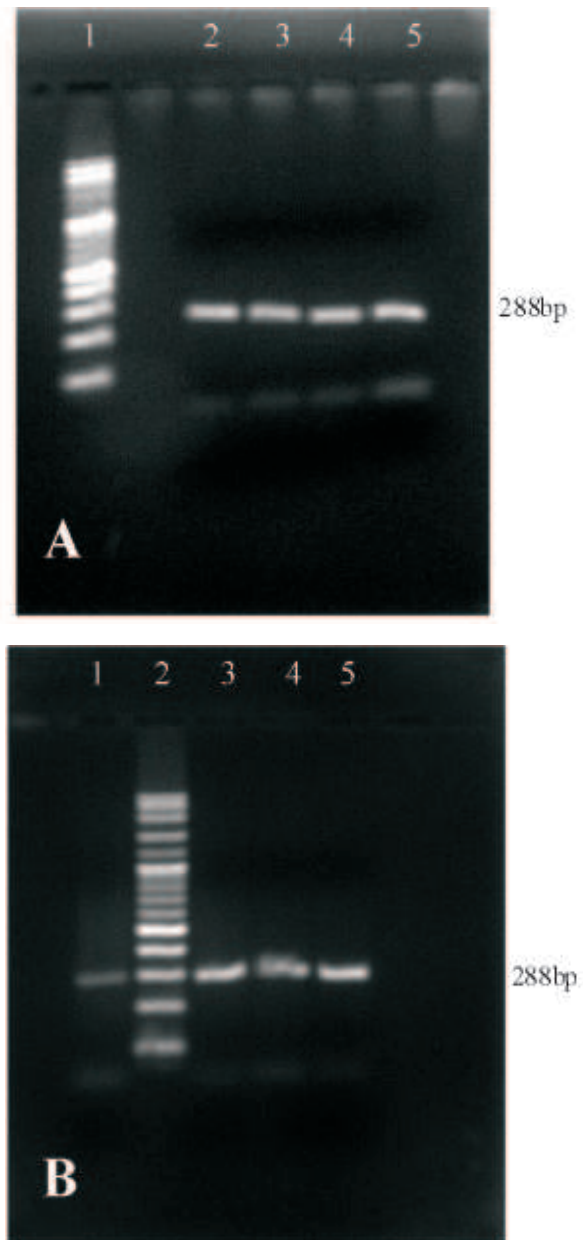
Gambar 1. A. Kertas saring FTA™ yang telah ditetesi sampel darah sapi penderita BVDV .  
B. Cara pengambilan sampel untuk analisis molekuler.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Menggunakan uji RT-PCR, *virus* penyebab BVD dalam sampel darah yang diteteskan pada kertas saring FTA™ dan disimpan pada suhu serta waktu yang berbeda berhasil teridentifikasi secara efektif (Gambar 2 dan 3). Hasil penelitian membuktikan bahwa pengambilan dan penyimpanan sampel menggunakan kertas saring FTA™ mempercepat proses deteksi virus dibandingkan dengan isolasi virus menggunakan biak sel maupun ELISA. Menurut Mullen *et al.* (2009) segera setelah sampel diaplikasikan di permukaan kertas saring FTA™ membran sel dan organel-organel sel akan dilisiskan dan asam nukleat yang dilepas terperangkap di dalam matriks.

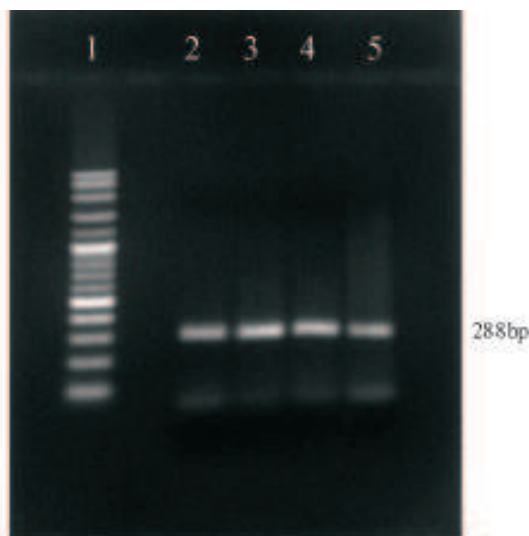
Asam nukleat di dalam matriks tidak bergerak dan stabil untuk transportasi, pemrosesan sampel secara langsung atau penyimpanan dalam waktu lama pada suhu kamar. Selanjutnya, RNA/DNA dalam sampel yang ada di dalam kertas saring FTA™ dapat diekstraksi dengan prosedur ekstraksi yang sederhana karena hanya melibatkan serangkaian pencucian menggunakan larutan purifikasi dan pipet dalam tabung ependorf tunggal. Teknologi FTA mengeliminasi penggunaan bahan kimia yang berbahaya dan peralatan pendingin serta sentrifugasi. Hasil penelitian membuktikan bahwa asam nukleat yang diaplikasikan dan disimpan pada kertas saring FTA™ empat minggu sebelumnya berhasil diamplifikasi dengan uji RT-PCR. Hal ini menunjukkan bahwa asam nukleat dari sampel yang digunakan dalam penelitian ini tidak mengalami degradasi selama proses pengambilan dan penyimpanan sampel. Keberhasilan uji PCR secara umum tergantung pada sampel yang bebas dari penghambat enzim polimerase seperti hemoglobin, laktoferin (Abu Al-Soud dan Radstrom, 2001) dan IgG (Abu Al-Soud *et al.*, 2000) yang umum ditemukan dalam darah, 0,004% v/v darah dalam suatu reaksi mampu menghambat suatu uji RT-PCR (Radstrom *et al.*, 2003). Terjadinya hambatan PCR pada sampel sesudah ekstraksi asam nukleat terjadi untuk bahan seperti tinja dan darah.

Pada penelitian ini juga dibuktikan bahwa tidak ada virus hidup yang dapat terdeteksi di dalam kertas saring FTA™. Sampel yang sudah tidak infeksi ini dapat dibawa atau dikirimkan dengan mudah dan aman. Hal ini disebabkan karena matriks dalam kertas saring dari sistem FTA diresapi dengan agen *chaotropic* yang



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR dari DNA sampel darah sapi penderita infeksi persisten BVDV yang dikoleksi dengan kertas saring FTA™. **A.** Pita 1: DNA *Marker* 100 bp; Pita ke-2 sampai 5 : masing-masing berasal dari sampel hari ke-0, minggu ke-1, minggu ke-2 dan minggu ke-4 setelah penyimpanan pada suhu ruang (28°C). **B.** Pita 1: Kontrol positif (sampel hari ke-0); Pita 2: DNA *Marker* 100 bp; Pita ke-3 sampai 5: masing-masing berasal dari sampel minggu ke-1, minggu ke-2 dan minggu ke-4 setelah penyimpanan pada suhu 5°C.





Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR dari DNA sampel darah sapi penderita infeksi persisten BVDV yang dikoleksi dengan kertas saring FTA<sup>TM</sup>. Pita ke-1: DNA *Marker* 100 bp; Pita ke-2: Kontrol positif (sampel hari ke-0); Pita ke-3 sampai 5: masing-masing berasal dari sampel minggu ke-1, minggu ke-2 dan minggu ke-4 setelah penyimpanan pada suhu -20°C.

membuat mikroorganisme tidak aktif. Flinders *Technology Associates* tersebut akan menjadi alat yang penting untuk transportasi BVDV genom ke laboratorium untuk pelaksanaan studi epidemiologi dan genetik. Di daerah endemik wabah penyakit sering dilaporkan terjadi di berbagai lokasi baik yang mudah maupun yang sulit didatangi. Sehingga, pada kebanyakan kasus, koleksi, penyimpanan, dan pengiriman sampel dikerjakan dalam kondisi tidak ideal. Hal ini berakibat konfirmasi dan identifikasi laboratorik menjadi sulit. Oleh karena itu, penggunaan kertas saring FTA<sup>TM</sup> merupakan upaya untuk meningkatkan efisiensi pengambilan sampel melalui prosedur yang lebih sederhana. Prosedur ini akan membantu dalam memperoleh informasi penting tentang prevalensi penyakit di seluruh lokasi di Indonesia. Flinders *Technology Associates cards*, oleh karena itu, akan menjadi alat yang berguna untuk koleksi, pengawetan dan pengiriman sampel ke laboratorium tanpa takut adanya risiko terhadap kesehatan manusia

maupun lingkungan yang ditimbulkan oleh mikroorganisme seperti BVDV maupun risiko kehilangan materi diagnostik (RNA) yang penting. Hal ini akan bermanfaat tidak hanya di tempat dimana penyakit sedang mewabah tetapi juga di tempat lain dimana laboratorium rujukan berada. Sampai saat ini, pengiriman sampel yang diduga mengandung mikroorganisme infeksi ke laboratorium rujukan sering melibatkan beberapa prosedur yang rumit atau terhalang biaya transport yang mahal. Flinders *Technology Associates cards* akan memiliki nilai yang sangat besar untuk pengiriman sampel dari satu tempat ke tempat lain dalam suatu daerah, antar daerah, antar pulau bahkan antar negara tanpa diperlukan alat pendingin. Penggunaan kertas saring FTA<sup>TM</sup> juga sangat bermanfaat baik bagi pengirim maupun penerima karena pengiriman sampel dari lokasi wabah ke laboratorium dapat berjalan cepat dan aman.

Selain hal tersebut, penggunaan kertas saring FTA<sup>TM</sup> akan mempercepat identifikasi genom sehingga tindakan pengendalian di tempat kejadian dapat dilakukan sesegera mungkin. Meskipun demikian, kertas saring FTA<sup>TM</sup> tidak dapat menggantikan prosedur koleksi sampel yang rutin diperlukan untuk isolasi virus dan karakterisasi lain dari agen penyebab. Virus hidup tidak akan dapat diperoleh dari kertas saring FTA<sup>TM</sup> hal ini dapat dianggap sebagai salah satu kelemahan dari kertas saring FTA<sup>TM</sup>. Hal ini dapat diatasi dengan pengambilan sampel secara paralel yaitu dengan menggunakan kertas saring FTA<sup>TM</sup> dan cara pengambilan sampel secara umum untuk meyakinkan bahwa genom dari virus dapat terdeteksi seawal mungkin dan juga secara bersamaan dapat dikerjakan isolasi dan karakterisasi virus.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kertas saring FTA<sup>TM</sup> merupakan teknik yang sangat efektif, ekonomis, dan sensitif untuk pengambilan, penyimpanan dan perolehan kembali genom BVDV yang berasal dari sampel darah secara molekuler dengan teknik berbasis PCR.

## SARAN

Di bidang kedokteran hewan, aplikasi teknologi kertas saring FTA™ perlu dikembangkan untuk berbagai jenis sampel biologis yang lain serta layak diterapkan secara rutin untuk pengambilan sampel yang diduga mengandung agen infeksius.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan yang telah memberi dana melalui Hibah Penelitian Bagian tahun 2015 sehingga penelitian dapat berjalan dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelwhab EM, Luschow D, Harder TC, Hafez HM. 2011. The use of FTA filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *J Virol Methods* 174: 120-122.
- Abu Al-Soud W, Johnsson LJ, Radstrom P. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 38: 345-350.
- Abu Al-Soud W, Radstrom P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 39: 485-493.
- Baker JC. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 425-445.
- Brock KV, Grooms DL, Givens MD. 2005. Reproductive disease and persistent infections. Dalam: Goyal SM, Ridpath JF. (Ed). *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. Hlm. 145-156.
- Fulton RW, Ridpath JF, Ore S, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. 2005. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2 subgenotypes. *Vet Microbiol* 111: 35-40.
- Fulton RW, Whitley EM, Johnson BJ, Ridpath JF, Kapil S, Burge LJ, Cook BJ, Confer AW. 2006. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Can J Vet Res* 73: 283-291.
- Kozasa T, Tajima M, Yasutomi I, Sano K, Ohashi K, Onuma M. 2005. Relationship of bovine viral diarrhoea virus persistent infection to incidence of disease on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR. *Vet Microbiol* 106: 41-47.
- Lindberg A, Houe H. 2005. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control: A Review. *Vet Q* 25(1): 16. [Medline].
- Kraus RHS, vanHooft P, Waldenstrom J, Latorre-Margalef N, Ydenberg RC, Prins HHT. 2011. Avian influenza surveillance with FTA Cards: Field Methods, biosafety, and transportation issues solved. *J Vis Exp* 54: 2832-2839.
- Moscoso H, Raybon EO, Thayer SG, Hofacre CL. 2005. Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA® filter paper. *Avian Dis* 49: 24-29.
- Moscoso H, Alforado L, Hofacre CL. 2006. Molecular analysis of infectious bursal disease virus from bursal tissues collected on FTA® filter paper. *Avian Dis* 50:391-396.
- Mullen MP, Howard DJ, Powell R, Hanrahan JP. 2009. A note on the use of FTA™ for storage of blood samples for DNA analysis and removal of PCR inhibitors. *Irish J Agric and Food Res* 48: 109-113.
- Omoigui LO, Ishiyaku MF, Ousmane B, Gowda BS, Timko MP. 2011. Application of fast technology for analysis (FTA) for sampling and recovery of deoxyribonucleic acid (DNA) for molecular characterization of cowpea breeding lines for *Striga* resistance. *Afr J Biotechnol* 10(85): 19681-19686.
- Perozo F, Villegas P, Estevez C, Alvarado I, Purvis LB. 2006. Use of FTA® filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. *Avian Pathol* 35(2): 93-98.
- Picard-Meyer E, Barrat J, Cliquet F. 2007. Use of filter paper (FTA®) technology for sampling, recovery and molecular characterization of rabies virus. *J Virol Methods* 138: 66-69.

- Radstorm P, Knutsson R, Wolffs P, Dahlenborg M, Lofstrom C. 2003. PCR detection of microbial pathogens. *Methods in Molecular Biol* 216: 31-50.
- Smith LM, Burgoyne LA. 2004. Collection, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® data basing paper. *BMC Ecology* (4): 4.
- Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE. 2001. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *J Clin Microbiol* (39): 343-346.
- Wengler G, Bradley DW, Collett MS, Heinz FX, Schlesinger RW, Strauss JH. 1995. Family flaviridae, Dalam: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop CM. (Ed.) *Viral Taxonomy* NewYorkSpringer-Verlag. Hlm. 415-427.
- Whatman. 2004. Application of FTA-based technology for sample collection, transport, purification and storage of PCR-ready plant DNA. [[http://www.whatman.co.uk / repository/documents/s3/usFtaPlanDna.pdf](http://www.whatman.co.uk/repository/documents/s3/usFtaPlanDna.pdf)].