

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20955> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Djuardi, Yenny

Title: Development of immune responses in early life : a longitudinal study in Indonesia

Issue Date: 2013-06-12

Summary

Early childhood is a critical period where the maturation of the immune system occurs while it receives various challenges from the environment shared with the mother. Children growing in an environment rich in microorganisms and parasites are thought to have a different pattern of immune response compared to those children growing in a more hygienic environment. This difference might contribute to the lower prevalence of allergic and autoimmune disorders in developing countries compared to affluent countries. Within this context, a number of cohort studies mostly performed in developed countries have focused on finding the link between the pattern of immune responses in early life and health outcomes in later life. In this thesis, we studied child's innate and adaptive responses during the first 4 years of life in a helminth-endemic area in Indonesia.

Chapter 1 provides a general introduction to the development of immune responses in early childhood. It describes and reviews how the maternal environment and exposures (for example farming environment or parasitic infections) during pregnancy might affect the child's immune responses in later life. The immune system of a child, in turn, is an important determinant of responses to vaccinations, allergens or parasitic and other infections. This chapter also describes the aim, the study population and the longitudinal design of the study.

In **Chapter 2**, we measured the different immunological patterns. Put in a very simplified way, the immune system can be characterized by two types of immune responses: TH₁ and TH₂. We analyzed TH₂-type cytokines and antibodies in young children from 2 months to 4 years of age. TH₂ responses increased significantly with age and to higher levels compared to what was seen in children of developed countries. Maternal education and socioeconomic status influenced the production of child's general TH₂ responses, while maternal filarial infection was more associated with the child's helminth-specific TH₂ responses. Maternal education was also shown to affect the child's skin prick test reactivity to allergen more strongly compared to other factors such as maternal helminth infection. Although both helminth infection and allergy are known to induce TH₂-type immune responses, our findings show that measured maternal helminth infections were not the most prominent contributors to the development of TH₂ responses in early life, indicating that more attention should be paid to find out what specific stimuli can skew immune responses toward TH₂.

In **Chapter 3**, we compared the development of innate and adaptive responses in children before and after BCG vaccination. While innate responses (early cytokines taking part in innate responses: IL-10 and TNF- α) induced by PPD & LPS were not affected, both TH₁- and TH₂-type responses against PPD were increased after vaccination and only TH₁-type was sustained into later age. BCG vaccination was also shown to stimulate child's general adaptive responses in response to mitogen-stimulation of whole blood, which correlated with PPD-specific responses till 1 year of age. All these in vitro findings still need to be studied further in relation to the effect of BCG on the maturation of innate and adaptive immune responses in vivo, in order to explain the reported beneficial bystander effects of BCG on morbidity and mortality of children. Surprisingly we found that maternal intestinal protozoan infection (*Blastocystis hominis*) but no other measured factors during pregnancy, was associated with lower child's immune responses to mycobacterial antigen, again stressing the importance of exploring the contribution of a wide range of factors during early life for shaping immune responses later in life.

Chapter 4 described the relationship between maternal and child's cytokine responses at the age of 2 months, before any vaccination was given. The high production of IL-10 and IFN- γ in mitogen-stimulated whole blood from the mother was significantly associated with higher corresponding child's cytokine production. On the other hand the child's innate responses, represented by LPS-induced IL-10 and TNF- α , were more associated with area of residence than with maternal cytokines. We conclude that mother-child cytokine relationship at early infancy is seen in the adaptive responses but not in innate immune responses. Again maternal *B. hominis* infection was found to affect child's cytokine responses, warranting further research on the contribution of this particular parasitic infection on the developing immune system of the child starting from *in utero* period.

In **Chapter 5**, we followed the mother-child cytokine relationship up to 4 years of age and related this to gene polymorphisms as well as other factors. Our finding of strong mother-child cytokine relationship in early age was consistently found till 1 year of age, albeit in a decreasing strength. The genetic factors, either maternal or child's gene polymorphisms, were shown to be more associated with child's cytokines at later life. We concluded that during the first year of life the child's cytokine responses were more affected by cytokine responses of mothers, possibly through in utero preconditioning or breastfeeding which over rules the genetic

influences. Larger studies are needed to dissect this in more detail with sufficient power.

Chapter 6 discusses the findings in this thesis, together with previous studies in both developed and developing countries. Emphasis was put on the contribution of maternal parasitic infections and other environmental factors to the child's immune responses and atopy, as well as to mother-child cytokine relationship. At the end, the possible consequences of the findings and future research have been discussed.

Altogether, this thesis has provided a case for the importance of studying early life events not only in affluent countries but also in low to middle income countries where the changes in life style and environmental factors are the most dynamic and therefore informative for understanding development of diseases later in life.

Samenvatting

De vroege kinderjaren zijn een kritieke periode, waarin de rijping van het afweersysteem plaatsvindt terwijl het de verschillende uitdagingen vanuit de omgeving ondervindt, die gedeeld worden met de moeder. Er wordt gedacht dat kinderen die opgroeien in een omgeving die rijk is aan micro-organismen en parasieten andere patronen van afweerreacties hebben in vergelijking met kinderen die opgroeien in een meer hygiënische omgeving. Dit verschil zou kunnen bijdragen aan het minder vóórkomen van allergische en auto-immuun aandoeningen in ontwikkelingslanden dan in welvarende landen. Binnen deze context is een aantal cohortstudies uitgevoerd, veelal in ontwikkelde landen, gericht op het vinden van het verband tussen het patroon van de afweerreacties in de vroege levensjaren en gezondheidsuitkomsten in het latere leven. In dit proefschrift, hebben wij de aangeboren en verworven afweerreacties bestudeerd van kinderen tijdens de eerste vier levensjaren in een gebied waar worminfecties voorkomen in Indonesië.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding over de ontwikkeling van afweerreacties in de vroege kinderjaren. Het beschrijft en vat samen hoe de omgeving (bijvoorbeeld een plattelandsomgeving) en de blootstelling bijvoorbeeld aan infecties met parasieten van de moeder tijdens de zwangerschap de afweerreacties van het kind op latere leeftijd kunnen beïnvloeden. Het afweersysteem van een kind is heel belangrijk voor reacties op vaccinaties, allergenen of parasitaire en andere infecties. Dit hoofdstuk beschrijft ook het doel, de onderzoekspopulatie en de longitudinale opzet van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift.

In **hoofdstuk 2**, hebben we de verschillende patronen in afweerreacties gemeten. Op een zeer vereenvoudigde manier kan het afweersysteem worden gekenmerkt door twee soorten afweerreacties: T helper (TH)₁ en TH₂. We analyseerden TH₂ type cytokinen en antilichamen bij jonge kinderen van 2 maanden tot 4 jaar oud. De TH₂ reactie nam aanzienlijk toe met de leeftijd en was veel hoger in vergelijking met wat werd gezien bij kinderen in ontwikkelde landen. Het opleidingsniveau en de sociaal-economische status van de moeder beïnvloeden de productie van algemene TH₂ reacties van het kind, terwijl filaria infectie (een worminfectie) van de moeder meer geassocieerd was met TH₂ reacties van

het kind die specifiek gericht zijn tegen wormen . Het opleidingsniveau van de moeder bleek de huid-prik allergie-test van het kind sterker te beïnvloeden dan andere factoren. Hoewel het bekend is dat zowel worminfecties als allergie tot afweerreacties van het TH₂ type leiden, blijkt uit onze bevindingen dat de worminfecties van de moeder niet de meest prominente bijdrage leverden aan de ontwikkeling van TH₂ reacties in het begin van het leven. Dit geeft aan dat er meer aandacht moet worden besteed aan het uitzoeken van welke specifieke stoffen TH₂-type afweerreacties tot gevolg kunnen hebben.

In **hoofdstuk 3** vergeleken we de ontwikkeling van de aangeboren en verworven afweer bij kinderen voor en na BCG-vaccinatie (tegen tuberculose). Terwijl aangeboren reacties (gemeten met cytokines Interleukine-10 [IL-10] en Tumor Necrose Factor- α [TNF- α]) niet werden beïnvloed, waren zowel TH₁ als TH₂-type reacties tegen Purified Protein Derivatives (PPD, bestanddeel van tuberculose) na vaccinatie verhoogd. Alleen type TH₁ bleef tot op latere leeftijd verhoogd. Er werd ook aangetoond dat BCG-vaccinatie de verworven afweer van kinderen stimuleert in reactie op algemene stimulatie van bloed, wat in verband werd gebracht met de reactie tegen PPD tot de kinderen 1 jaar oud waren. Al deze *in vitro* bevindingen moeten nog verder worden onderzocht in verband met het effect van BCG op de rijping van aangeboren en verworven afweerreacties *in vivo*, teneinde de mogelijke positieve effecten van BCG op de morbiditeit en mortaliteit in kinderen te kunnen verklaren. Verrassend genoeg vonden we dat infectie van moeders met de parasitaire eencellige *Blastocystis hominis* in de darmen tijdens de zwangerschap is geassocieerd met een verminderde afweerreactie van het kind tegen tuberculose. Dit wijst nogmaals op het belang van het verkennen van de rol van een breed scala van factoren tijdens het vroege leven op het vormgeven van afweerreacties later in het leven.

Hoofdstuk 4 beschrijft de relatie tussen de cytokine reacties van de moeder en haar kind op de leeftijd van 2 maanden, voordat vaccinaties werden gegeven. De hoge productie van cytokines IL-10 en IFN- γ in algemeen gestimuleerd bloed van de moeder leidde tot hogere cytokine productie van haar kind. Anderzijds waren de aangeboren afweerreacties van het kind, in dit geval vertegenwoordigd door IL-10 en TNF- α na stimulatie met lipopolysacchariden (LPS, het belangrijkste bestanddeel van

de buitenmembraan van gram-negatieve bacteriën), hadden meer te maken met de woonomgeving dan met de afweerreacties van de moeder. We concludeerden hieruit dat er een relatie tussen de cytokines van moeder en kind in de vroege kindertijd wordt gezien in de verworven, maar niet in de aangeboren afweer. Wederom bleek *B. hominis* infectie van de moeder de afweerreacties van het kind te beïnvloeden. Dit rechtvaardigt verder onderzoek naar de bijdrage van deze specifieke parasitaire infectie op de ontwikkeling van het afweersysteem van het kind vanaf de periode in de baarmoeder.

In **hoofdstuk 5** volgden we de relatie tussen de cytokines van moeder en kind tot vier jaar oud, en hebben we gekeken naar genpolymorfismen (genveranderingen) en andere factoren. Onze bevinding omtrent de sterke moeder-kind cytokine-relatie op vroege leeftijd bleef inderdaad aanwezig tot de kinderen 1 jaar oud waren, zij het steeds minder sterk. De genetische factoren, ofwel de genpolymorfismen van moeder en kind, bleken meer geassocieerd te zijn met afweerreacties van het kind op latere leeftijd. We concludeerden dat tijdens het eerste jaar van het leven cytokinereacties van het kind primair beïnvloed werden door cytokinereacties van de moeder. Deze ontwikkeling lijkt gestuurd te worden door factoren in de baarmoeder of tijdens de borstvoeding, en lijken de invloed van genetische factoren te overstemmen. Grotere studies met voldoende deelnemers zijn nodig om deze relaties in meer detail te ontleden.

In **hoofdstuk 6** worden de bevindingen in dit proefschrift besproken in de context van eerdere studies in zowel ontwikkelde als ontwikkelingslanden. Nadruk werd gelegd op de bijdrage van parasitaire infecties van de moeder, en op de rol van omgevingsfactoren. Gezamenlijk vormen zij de basis van de ontwikkeling van de afweer en de allergische reacties van het kind. Tot slot worden de mogelijke gevolgen van deze bevindingen en enkele mogelijkheden voor toekomstig onderzoek besproken. Al met al, heeft dit proefschrift het belang aangetoond van het bestuderen van de gebeurtenissen in het vroege leven, niet alleen in welvarende landen, maar ook in lage tot midden-inkomenslanden waar de veranderingen in levensstijl en omgevingsfactoren het meest dynamisch zijn. Deze veranderingen zijn daarom zeer informatief voor het begrijpen van de ontwikkeling van ziekten later in het leven.

het kind die specifiek gericht zijn tegen wormen . Het opleidingsniveau van de moeder bleek de huid-prik allergie-test van het kind sterker te beïnvloeden dan andere factoren. Hoewel het bekend is dat zowel worminfecties als allergie tot afweerreacties van het TH₂ type leiden, blijkt uit onze bevindingen dat de worminfecties van de moeder niet de meest prominente bijdrage leverden aan de ontwikkeling van TH₂ reacties in het begin van het leven. Dit geeft aan dat er meer aandacht moet worden besteed aan het uitzoeken van welke specifieke stoffen TH₂-type afweerreacties tot gevolg kunnen hebben.

In **hoofdstuk 3** vergeleken we de ontwikkeling van de aangeboren en verworven afweer bij kinderen voor en na BCG-vaccinatie (tegen tuberculose). Terwijl aangeboren reacties (gemeten met cytokines Interleukine-10 [IL-10] en Tumor Necrose Factor- α [TNF- α]) niet werden beïnvloed, waren zowel TH₁ als TH₂-type reacties tegen Purified Protein Derivatives (PPD, bestanddeel van tuberculose) na vaccinatie verhoogd. Alleen type TH₁ bleef tot op latere leeftijd verhoogd. Er werd ook aangetoond dat BCG-vaccinatie de verworven afweer van kinderen stimuleert in reactie op algemene stimulatie van bloed, wat in verband werd gebracht met de reactie tegen PPD tot de kinderen 1 jaar oud waren. Al deze *in vitro* bevindingen moeten nog verder worden onderzocht in verband met het effect van BCG op de rijping van aangeboren en verworven afweerreacties *in vivo*, teneinde de mogelijke positieve effecten van BCG op de morbiditeit en mortaliteit in kinderen te kunnen verklaren. Verrassend genoeg vonden we dat infectie van moeders met de parasitaire eencellige *Blastocystis hominis* in de darmen tijdens de zwangerschap is geassocieerd met een verminderde afweerreactie van het kind tegen tuberculose. Dit wijst nogmaals op het belang van het verkennen van de rol van een breed scala van factoren tijdens het vroege leven op het vormgeven van afweerreacties later in het leven.

Hoofdstuk 4 beschrijft de relatie tussen de cytokine reacties van de moeder en haar kind op de leeftijd van 2 maanden, voordat vaccinaties werden gegeven. De hoge productie van cytokines IL-10 en IFN- γ in algemeen gestimuleerd bloed van de moeder leidde tot hogere cytokine productie van haar kind. Anderzijds waren de aangeboren afweerreacties van het kind, in dit geval vertegenwoordigd door IL-10 en TNF- α na stimulatie met lipopolysacchariden (LPS, het belangrijkste bestanddeel van

de buitenmembraan van gram-negatieve bacteriën), hadden meer te maken met de woonomgeving dan met de afweerreacties van de moeder. We concludeerden hieruit dat er een relatie tussen de cytokines van moeder en kind in de vroege kindertijd wordt gezien in de verworven, maar niet in de aangeboren afweer. Wederom bleek *B. hominis* infectie van de moeder de afweerreacties van het kind te beïnvloeden. Dit rechtvaardigt verder onderzoek naar de bijdrage van deze specifieke parasitaire infectie op de ontwikkeling van het afweersysteem van het kind vanaf de periode in de baarmoeder.

In **hoofdstuk 5** volgden we de relatie tussen de cytokines van moeder en kind tot vier jaar oud, en hebben we gekeken naar genpolymorfismen (genveranderingen) en andere factoren. Onze bevinding omtrent de sterke moeder-kind cytokine-relatie op vroege leeftijd bleef inderdaad aanwezig tot de kinderen 1 jaar oud waren, zij het steeds minder sterk. De genetische factoren, ofwel de genpolymorfismen van moeder en kind, bleken meer geassocieerd te zijn met afweerreacties van het kind op latere leeftijd. We concludeerden dat tijdens het eerste jaar van het leven cytokinereacties van het kind primair beïnvloed werden door cytokinereacties van de moeder. Deze ontwikkeling lijkt gestuurd te worden door factoren in de baarmoeder of tijdens de borstvoeding, en lijken de invloed van genetische factoren te overstemmen. Grotere studies met voldoende deelnemers zijn nodig om deze relaties in meer detail te ontleden.

In **hoofdstuk 6** worden de bevindingen in dit proefschrift besproken in de context van eerdere studies in zowel ontwikkelde als ontwikkelingslanden. Nadruk werd gelegd op de bijdrage van parasitaire infecties van de moeder, en op de rol van omgevingsfactoren. Gezamenlijk vormen zij de basis van de ontwikkeling van de afweer en de allergische reacties van het kind. Tot slot worden de mogelijke gevolgen van deze bevindingen en enkele mogelijkheden voor toekomstig onderzoek besproken. Al met al, heeft dit proefschrift het belang aangetoond van het bestuderen van de gebeurtenissen in het vroege leven, niet alleen in welvarende landen, maar ook in lage tot midden-inkomenslanden waar de veranderingen in levensstijl en omgevingsfactoren het meest dynamisch zijn. Deze veranderingen zijn daarom zeer informatief voor het begrijpen van de ontwikkeling van ziekten later in het leven.

Curriculum Vitae

Yenny Djuardi was born on May 21th 1972 in Jakarta, Indonesia. In 1990 she graduated from the Christian Senior High School (SMAK) I BPK Penabur, Jakarta, and started her medical education at Faculty of Medicine University of Padjadjaran, Bandung. She received her medical degree in 1997. In 1999 she started to work at Department of Parasitology Faculty of Medicine University of Indonesia (FMUI/FKUI), as a research assistant at Mycology Division under supervision of Prof.Dr. Jan Susilo, before she moved to work at the Filariasis Center in Helminthology Division. Since 2000 she has conducted several field studies in areas endemic for filariasis in different parts of Indonesia and performed data analysis under supervision of Dr. Taniawati Supali.

In 2001 she was involved in the first NWO-WOTRO funded research project on a longitudinal study of pregnant women and their babies up to 1 year of age. The work was conducted in collaboration with her senior colleague Dr. Heri Wibowo. During that period she visited LUMC several times to be trained in immunological laboratory work. In 2004 she enrolled as a PhD student at Leiden University Medical Center. She received a second NWO-WOTRO grant from 2005-2009 to continue to study the maturation of the immune system of children who were born during the first NWO-WOTRO study. The follow up of the children would continue until they reached 4 years of age. Her research project was carried out in the Department of Parasitology at FMUI and in the Department of Parasitology at LUMC. She spent most of her time at LUMC between 2009 and 2012 to analyze samples, to perform data analysis and to write manuscripts.

Yenny Djuardi has intermittently been a tutor for medical undergraduate students of FMUI, and after finishing her PhD, she will continue working at University of Indonesia as a lecturer and researcher.

1. Supali T, Wibowo H, Rückert P, Kerstin F, Ismid IS, Purnomo, **Djuardi Y**, Fischer P (2002) High prevalence of *Brugia timori* infection in the highland of Alor Island, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 66(5): 560-565.
2. Fischer P, **Djuardi Y**, Ismid IS, Rückert P, Bradley M, Supali T (2003) Long-lasting reduction of *Brugia timori* microfilariae following a single dose of diethylcarbamazine combined with albendazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97(4): 446-448.
3. Supali T, Rahmah N, **Djuardi Y**, Sartono E, Rückert P, Fischer P (2004) Detection of filaria-specific IgG4 antibodies using Brugia Rapid test in individuals from an area highly endemic for *Brugia timori*. *Acta Tropica* 90(3): 255-261.
4. 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100(8): 753-759.
5. Mand S, Supali T, **Djuardi J**, Kar S, Ravindran B, Hoerauf A (2006) Detection of adult *Brugia malayi* filariae by ultrasonography in humans in India and Indonesia. *Trop Med Int Health* 11(9): 1375-1381.
6. Supali T, **Djuardi Y**, Pfarr KM, Wibowo H, Taylor MJ, Hoerauf A, Houwing-Duistermaat JJ, Yazdanbakhsh M, Sartono E (2008) Doxycycline treatment of *Brugia malayi*-infected persons reduces microfilaremia and adverse reactions after diethylcarbamazine and albendazole treatment. *Clin Infect Dis* 46(9): 1385-1393.
7. **Djuardi Y**, Wibowo H, Supali T, Ariawan I, Bredius RG, Yazdanbakhsh M, Rodrigues LC, Sartono E (2009) Determinants of the relationship between cytokine production in pregnant women and their infants. *PLoS One* 4(11): e7711.
8. Wiria AE, Prasetyani MA, Hamid F, Wammes LJ, Lell B, Ariawan I, Uh HW, Wibowo H, **Djuardi Y**, Wahyuni S, Sutanto I, May L, Luty AJ, Verweij JJ, Sartono E, Yazdanbakhsh M, Supali T (2010) Does treatment of intestinal helminth infections influence malaria? Background and methodology of a longitudinal study of clinical, parasitological and immunological parameters in Nangapanda, Flores, Indonesia (ImmunoSPIN Study). *BMC Infect Dis* 25;10:77.
9. Supali T, **Djuardi Y**, Wibowo H, van Ree R, Yazdanbakhsh M, Sartono E (2010) Relationship between Different Species of Helminths and Atopy: A Study in a Population Living in Helminth-Endemic Area in Sulawesi, Indonesia. *Int Arch Allergy Immunol* 153(4): 388-394.

List of Publications

10. Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, **Djuardi Y**, Hamid F, Kaiser MM, Wammes LJ, van Lieshout L, Luty AJ, Sartono E, Yazdanbakhsh M (2010) Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int J Parasitol* 40(10): 1171-1176.
11. **Djuardi Y**, Sartono E, Wibowo H, Supali T, Yazdanbakhsh M (2010) A longitudinal study of BCG vaccination in early childhood: the development of innate and adaptive immune responses. *PLoS One* 5(11): e14066.
12. Hamid F, Wiria AE, Wammes LJ, Kaiser MM, Lell B, Ariawan I, Uh HW, Wibowo H, **Djuardi Y**, Wahyuni S, Schot R, Verweij JJ, van Ree R, May L, Sartono E, Yazdanbakhsh M, Supali T (2011) A longitudinal study of allergy and intestinal helminth infections in semi urban and rural areas of Flores, Indonesia (ImmunoSPIN Study). *BMC Infect Dis* 11;11:83.
13. **Djuardi Y**, Wammes LJ, Supali T, Sartono E, Yazdanbakhsh M (2011) Immunological footprint: the development of a child's immune system in environments rich in microorganisms and parasites. *Parasitology* 138(12): 1508-1518.
14. Wiria AE, **Djuardi Y**, Supali T, Sartono E, Yazdanbakhsh M (2012) Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: a friend or foe? *Semin Immunopathol* 34(6): 889-901.
15. Wiria AE, Hamid F, Wammes LJ, Kaiser MM, May L, Prasetyani MA, Wahyuni S, **Djuardi Y**, Ariawan I, Wibowo H, Lell B, Sauerwein R, Brice GT, Sutanto I, van Lieshout L, de Craen AJ, van Ree R, Verweij JJ, Tsonaka R, Houwing-Duistermaat JJ, Luty AJ, Sartono E, Supali T, Yazdanbakhsh M (2013) The effect of three-monthly albendazole treatment on malarial parasitemia and allergy: a household-based cluster-randomized, double blind, placebo-controlled trial. *PLoS One* 8(3): e57899.
16. **Djuardi Y**, Supali T, Wibowo H, Kruize YCM, Versteeg SA, van Ree R, Sartono E, Yazdanbakhsh M (2013) The development of TH₂ responses from infancy to 4 years of age and atopic sensitization in areas endemic for helminth infections. *Allergy Asthma Clin Immunol* 9(1): 13.

Acknowledgement ~ *Dankwoord*

The work in this thesis could only be accomplished because of good collaboration and support from the peoples whom I would like to acknowledge:

First of all I would like to thank all participants and their families in Jati Sampurna and Jati Karya village, who willingly participated in this longitudinal study. The most difficult part of the study was to have to bleed such small children several times, while hearing them cry. I hope the results of my study can be used to further the research on mother and child's health in Indonesia. I have received tremendous support from the health staff of Puskesmas Jati Sampurna: The former heads of Puskesmas dr. Esther and dr. Emma; the midwives (Bu Maria, Bu Baedah) who were essential in the recruitment of pregnant mothers and opened their homes for the research team and participants; Bu Lilis, Pak Nian and Nia always cheerful and ready to help during the follow up of the mothers and children. I would like to thank the cadres in Jati Karya and Jati Sampurna, who accompanied the team during the follow up; without them we could not easily trace the participants residing in such a large area. I am grateful to the venipuncturists Pak Widi, Adam, and Heru, whose expertise in drawing blood of infants and young children have made the work possible. I also thank dr. Frieda Bolang from UKI and dr. Stefanus Ariyanto for their contributions to the follow-up study.

For my senior and junior colleagues from Department of Parasitology FMUI: I would like to thank Prof. Is Suhariah and Prof. Saleha Sungkar, our former and present Heads of Department, who gave me their support to pursue my PhD study. I am indebted to Dr. Taniawati Supali, my mentor, supervisor, and friend, who became one of my biggest supporters in my study and work. I learnt much from you on how to be a researcher, which is not only about science but also human relations. I thank Dr. Heri Wibowo, my research partner in this study, whom I admire for his patience and communication skills in dealing with people. I am grateful to Pak Dirman, the senior technician of Filariasis Center, who helped much from the beginning of the study and is an excellent microscopist and venipuncturist. I also thank Mbak Nina, dr. Aprilianto Eddy, and dr. Margaretha Prasetyaningsih, Heni Suryani, Tryana, for giving their help during the numerous visits to participants, as well as the laboratory work and data collection. I thank Erlinda Marthias, for her careful and excellent

work in the luminex measurements. Special thank goes to Pak Udin, for his great help in driving the team to many of participants' houses that were sometimes without numbers. I also thank the administrative staff (Tatang & Ivo) and all other teaching staff whom I could not mention one by one here, who have given me their physical and mental supports.

Leiden University Medical Center is my second homebase for my work, where most papers from this study have been written. Prof. Maria Yazdanbakhsh, I feel blessed to become your student. From you I learnt to be a more mature scientist, and I thank you for your invaluable guidance, support and encouragement, and especially your great patience in mentoring me. I am grateful to have been a member of your multinational group. Dr. Erliyani Sartono, my dear supervisor and friend, I thank you for your guidance and help from the beginning of the study till the finalization of my thesis, I can see your many small and big "footsteps" in this work. Yvonne Kruize and Yvonne Fillie, I thank you for your kind support and sincere concerns for me during the ups and downs in my study. Senior researchers Dr. Franca Hartgers, Dr. Hermelijn Smits and Dr. Linda May, I thank you all for your guidance and help during my study. Alwin and Sharon, I thank you for your help and hospitality; I am happy I got to know you both. I also thank Arifa, Kit Yeng, and all former and recent PhD students colleagues (Benedicta, Dr. Akim, Dr. Elly, Dr. Bart, Dr. Anouk, Firdaus, Linda, Aprilianto Eddy, Abena, Lucja, Regina, Lucien, Leonie, Sanne, Ulysse, Mustapha, Maria Kaisar) and former master students (Mary Ngendo, Jacqueline) for fruitful discussions, sharing fun and meal times during our study and stay in Holland. Dr. Sitti Wahyuni, I thank you for introducing me to the survival kit as a PhD student: how to cycle and to cook, as well as to get to know the Indonesian community in Holland. Prof. Andre Deelder, thank you so much for giving me the opportunity to learn in your Department during my training and my PhD study period. Dr. Jaco Verweij and Hans Kroeze, thank you for your help and advice in doing parts of the molecular works. Thank you Linda Wammes, Dr. Ton Polderman and Dr. Ron Hokke for your time to improve my Dutch summary. Caroline Remmerswaal and Jantien, thank you for taking care of lots of my administrative works. Caroline, thank you for making me learn good Dutch, it was a great pleasure to have been your student! Corrie, thank you so much for helping me greatly in dealing with papers and procedures especially for my defence. Besides the above mentioned people, I would like to thank all other colleagues in the Department of Parasitology LUMC,

for sharing your ideas and advice as well as the great time we had together.

Another part of my study that I enjoyed very much was to visit different laboratories and to learn from expertise. I would like to thank Prof. MO Hoekstra (Wilhelmina Children's Hospital), who gave me the opportunity to learn how to perform the skin prick testing in infants and young children. Dr. Robbert Bredius (Dept of Pediatrics, LUMC), I appreciate your advice in designing the child questionnaires. During my training in luminex assay, I received many support from Sanquin-CLB staff: Henk te Velthuis and JM Klaasse Bos, thank you for supervising me during my first luminex analysis in your lab and for kind subsequent communications about reagents. Prof. Ronald van Ree and Serge Versteeg (AMC), I thank you for supervising me in your lab and for helping me in data analyses. Three great statisticians have helped me a lot in understanding and using basic and advanced statistics: Prof. Laura Rodrigues (LSTMH), Dr. Iwan Ariawan (School of Public Health, UI), Prof. Jeanine Houwing (Medical Statistics, LUMC); I thank you all. In the last part of my study, I learned much from Prof. Eline Slagboom, Dr. Bastian Heijmans and Dennis Kremer about molecular genetics. Thank you Eline and Bastian for the fruitful discussions and advice, and Dennis for having me practice in the laboratory under your supervision.

To all my friends in St. James, Voorschoten, I thank you all for your supports and prayers. I enjoyed your hospitality and am proud to be the family member of St. James. Thank you Melanie, Om Tan and Tante Hwa, Johannes Linandi & family, Niniek & family; you and your surroundings have helped to feel less home sick. In Francien, I thank you for your encouragements and prayers. I will always remember Ms. De Groot and Mr. Max Henninger, *hartelijk dank voor uw steun bij mijn studie.*

Last but not the least, my biggest support comes from Papa, Mama, Aunties, my brother Peter and his wife Lina, who have supported my study and life with their love in many ways. I thank you all from the bottom of my heart.

Gaarne, wil ik een ieder van u hartelijk bedanken voor de hulp bij het afronden van mijn proefschrift. De Here zegende u.