

**PENGLONAN GEN *SXP1* DAN PEMBANGUNAN IgG4-ELISA  
MENGUNAKAN ANTIGEN REKOMBINAN *BmSXP* DAN *BmR1* UNTUK  
MENGESAN JANGKITAN FILARIASIS LIMFATIK**

Oleh

**ROHANA BINTI AB RAHMAN**

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi  
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains**

**Jan 2008**

## **PENGHARGAAN**

Alhamdulillah! Segala puji dan syukur kepadaNya kerana dengan limpah kurniaNya, saya berjaya menyiapkan tesis ini.

Saya amat bersyukur kerana telah diselia oleh penyelia saya yang mempunyai semangat yang tinggi di dalam penyelidikan, seorang yang mempunyai motivasi yang tinggi dalam mendidik saya supaya menjadi seorang yang lebih berkeyakinan dalam menjalankan sesuatu penyelidikan yang diberikan. Saya ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan dan terima kasih yang tidak terhingga kepada penyelia saya, Profesor Rahmah Noordin yang telah memberi dorongan, bimbingan, tunjukajar serta galakan kepada saya selama ini sehingga siapnya tesis ini. Pengalaman penyelidikan bersama beliau tidak akan saya lupakan.

Saya juga amat menghargai kerjasama dan nasihat yang diberikan oleh pensyarah-pensyarah dari Institut Penyelidikan Perubatan Molekul iaitu Prof. Asma , Prof. Mohd Zaki, Prof. Madya (Dr) Rusli, Prof. Madya (Dr.) Ravichandran, Prof. Madya (Dr) Phua, Dr. Tang dan Dr Hamid serta Dr. Lim Boon Huat dari Pusat Pengajian Sains Kesihatan.

Penghargaan ini juga ditujukan kepada rakan-rakan di Jabatan Mikrobiologi dan Parasitologi iaitu Puan Noor Ashikin, En Chan, En Owi, Haslindawati dan En Nazri, tidak lupa juga kepada kawan-kawan iaitu Puan Suharni, Ros Azeana, Norhaida, Nor Syahida, Emilia, Cheah, Nurul serta kumpulan sokongan di INFORMM iaitu Puan

Suriati, Mohd Hafiz, Kamini, Azizi dan semua yang terlibat di dalam penyelidikan ini secara langsung dan tidak langsung.

Penyelidikan ini telah dibiayai oleh dua geran penyelidikan iaitu geran kerajaan Malaysia IRPA: 06-02-05-1007PROO2 dan geran daripada European Commission EU: ICA4-CT-2001-10081.

## SENARAI KANDUNGAN

<b>KANDUNGAN</b>	<b>Muka surat</b>
PENGHARGAAN	ii
SENARAI KANDUNGAN	iv
SENARAI JADUAL	xvi
SENARAI RAJAH	xviii
SENARAI SINGKATAAN PERKATAAN	xxi
SENARAI SIMBOL	xxiv
ABSTRAK	xxv
ABSTRACT	xxviii
<b>BAB 1        PENGENALAN</b>	
1.1    Pengenalan am	1
1.2    Taksonomi dan kitar hidup	3
1.3    Morfologi cacing filaria limfatik	6
1.4    Fenomena periodisiti mikofilaria (kekalaan)	7
1.5    Risiko jangkitan filariasis limfatik	11
1.6    Epidemiologi	12
1.7    Hubungan vektor dan parasit	14
1.8    Manifestasi klinikal	15
1.8.1    Asimptomatik amikrofilaremia	18
1.8.2    Mikroflaremia asimptomatik	18
1.8.3    Manifestasi akut	19

1.8.4	Manifestasi kronik	19
1.9	Filariasis okult	21
1.10	Patogenesis dan patologi	23
1.11	Diagnosis	24
1.11.1	Kaedah parasitologi (mikroskopi)	25
1.11.1.1	Filem Darah Tebal	25
1.11.1.2	Teknik pemekatan Knott's	26
1.11.1.3	Kaedah penurasan membran	26
1.11.2	Ujian serologi untuk pengesanan filaria limfatik	27
1.11.2.1	IFAT (ujian asai immunofluoresen)	27
1.11.2.2	Pengesanan antibodi anti-filaria	27
1.11.2.3	Ujian Pengesanan antigen	32
1.11.3	Kaedah pengesanan molekular	33
1.11.3.1	Tindakbalas rantai polimerase (PCR)	33
1.11.3.2	'Real time' PCR	34
1.11.4	Histopatologi	35
1.11.5	Radiologi	36
1.12	Rawatan	36
1.13	Strategi yang terlibat di dalam program eliminasi filariasis limfatik sedunia (GPELF)	38
1.14	Kawalan vektor	39
1.15	Penyataan masalah dan rasional kajian	40
1.16	Objektif	42

## **BAB 2            BAHAN DAN KAEDAH**

2.1	Penyediaan larutan dan penimbal am	43
2.1.1	Ampisilin (larutan stok 50 mg/ml)	43
2.1.2	Kanamisin (larutan stok 50 mg/ml)	43
2.1.3	Tetrasiklin (larutan stok 10 mg/ml)	44
2.1.4	Isoprofil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranodisa, IPTG (larutan stok 800mM)	44
2.1.5	Penimbal salin fosfat (PBS)	44
2.1.6	Penimbal salin fosfat-Tween 20 0.05% (PBS-T)	45
2.1.7	Penimbal salin Tris (TBS)	45
2.1.8	Penimbal salin Tris-Tween 20 0.05% (TBS-T)	45
2.2	Elektroforesis gel agarosa	45
2.2.1	Penyediaan gel agarosa	47
2.2.1.1	Larutan Etidium bromide, EtBr	47
2.2.1.2	Penimbal Tris-borat 5X (TBE5X)	47
2.2.1.3	Penimbal Tris-asetat EDTA (TAE) 50X	47
2.2.1.4	Penimbal muatan 10X ('Loading buffer')	48
2.2.2	Proses analisa gel elektroforesis	48
2.3	Prosedur penentuan kepekatan protein di dalam pelet bakteria rekombinan	49
2.3.1	Penyediaan stok serum albumin bovin, BSA (5 mg/ml)	50
2.3.2	Penyediaan larutan piawai BSA dan graf penentuan kepekatan protein di dalam pelet bakteria rekombinan	50
2.4	Penentuan kepekatan protein dalam sediaan antigen larut	51
2.4.1	Serum albumin bovin, BSA (1000 $\mu$ g/ml)	51

2.5	Penyediaan reagen untuk penyaringan perpustakaan cDNA	54
2.5.1	Kaldu Luria Bertani (LB broth)	54
2.5.2	Agar Luria Bertani (LB agar)	54
2.5.3	Stok Tris-Hidroklorida 1M pada pH7.5	55
2.5.4	Gelatin stok 2% (w/v)	55
2.5.5	Penimbal sodium-magnesium sulfat (SM)	55
2.5.6	Agar Top	56
2.5.7	Dimetil sulfoksida (DMSO) 7% (w/v)	56
2.5.8	Maltosa 20 % (w/v)	56
2.5.9	Magnesium klorida (MgCl <sub>2</sub> ) 10 mM	57
2.6	Penyediaan reagen untuk pengklonan TOPO-TA	57
2.6.1	Stok X-Gal 40 mg/ml	57
2.6.2	Stok IPTG100 mM	57
2.6.3	Gliserol 100%	57
2.6.4	Kalsium klorida (CaCl <sub>2</sub> )100 mM	57
2.6.5	Magnesium klorida (MgCl <sub>2</sub> ) 100 mM	58
2.7	Ekspresi dan penulenan antigen rekombinan <i>BmSXP</i>	58
2.7.1	Kaldu ‘Terrific’	58
2.7.2	Larutan garam untuk kaldu ‘Terrific’	58
2.7.3	Penimbal lisis	59
2.7.4	Stok fenilmetilsulfonilfluorida (PMSF) 100 mM	59
2.7.5	Stok Lisozim10 mg/ml	59
2.7.6	Stok dioksiribonuklease 1 (DNase1) 2500 µg/ml	59
2.8	Penyediaan penimbal untuk penulenan protein rekombinan larut <i>BmSXP</i>	60

2.8.1	Penimbang basuhan 1	60
2.8.2	Penimbang basuhan II	60
2.8.3	Penimbang basuhan III	60
2.8.4	Penimbang elusi	60
2.9	Penyediaan penimbang untuk penulenan protein rekombinan <i>BmSXP</i> secara denaturasi	61
2.9.1	Penimbang B	61
2.9.2	Penimbang C (Penimbang basuhan)	61
2.9.3	Penimbang D (Penimbang elusi)	61
2.9.4	Penimbang E (Penimbang elusi)	62
2.10	Penyediaan reagen untuk SDS-PAGE dan blot Western.	62
2.10.1	Penimbang pemisah ('resolving buffer')	62
2.10.2	Penimbang penyusun ('stacking buffer')	63
2.10.3	Penimbang elektroforesis 'running'	63
2.10.4	Penimbang sampel	63
2.10.5	Penimbang pemindahan 'transfer buffer'	63
2.11	Penyediaan gel kecil poliakrilamida	64
2.11.1	Gel pemisah 10 % (2 gel kecil 7.5 mm)	64
2.11.2	Gel penyusun 10 % (2 gel kecil 7.5 mm)	64
2.12	Pewarnaan	65
2.12.1	Pewarna Ponceau S	65
2.12.2	Pewarna Amido hitam	65
2.12.3	Pewarna biru Coomasie	65
2.12.4	Larutan penyahwarna ('destainer')	65



2.13	Penyediaan reagen untuk asai IgG4-ELISA	66
2.13.1	Penimbal salutan	66
2.13.2	Penimbal salin fosfat-Tween 20 (0.05% v/v)	66
2.13.3	Larutan pemblokkan 1%	66
2.13.4	Larutan antibodi sekunder	66
2.13.5	Substrat 2, 2'-Azino-di-[3-etilbentiazolina sulfonat] (ABTS)	67
2.14	Penyalutan antigen rekombinan <i>BmSXP</i> pada plat mikrotiter ELISA	67
2.15	Prosedur am IgG4-ELISA menggunakan antigen rekombinan <i>BmSXP</i>	67
2.16	Gambaran keseluruhan eksperimen	69
2.17	Pengklonan 'ORF' di dalam gen rekombinan SXP1	70
2.17.1	Sumber perpustakaan cDNA dan hos bakteria	70
2.17.2	Penentuan pencairan perpustakaan cDNA	71
2.17.3	Penyediaan stok perpustakaan cDNA	72
2.17.4	Amplifikasi stok klon perpustakaan cDNA	73
2.18	Optimisasi dalam kaedah PCR	74
2.18.1	Optimisasi amaun templat dengan kaedah tindakbalas rantai polimerase (PCR)	74
2.18.2	Optimisasi suhu penyepuhlindungan dengan kaedah tindakbalas rantai polimerase (PCR)	76
2.18.3	Optimisasi kepekatan magnesium klorida (MgCl <sub>2</sub> ) di dalam kaedah PCR	76
2.19	Amplifikasi jujukan DNA dengan kaedah tindakbalas rantai polimerase (PCR)	77
2.19.1	Penulenan DNA daripada jalur dalam gel agarosa	78

2.20	Pengklonan produk PCR ke dalam TOPO-TA	79
2.20.1	Penyediaan Sel kompeten <i>E.coli</i> XL1 Blue	79
2.20.2	Kaedah pengklonan produk PCR ke dalam vektor TOPO-TA dan transformasi ke dalam hos bakteria.	80
2.20.3	Saringan tindakbalas PCR selepas transformasi	82
2.20.4	Penulenan plasmid	83
2.20.5	Penjjukan bes DNA dalam plasmid rekombinan	85
2.20.6	Pembaikan jujukan bes yang terubah	85
2.20.6.1	Primer bagi pembaikan jujukan bes	85
2.20.6.2	Tindakbalas PCR untuk pembaikan bes	86
2.21	Pengklonan DNA selitan ke dalam vektor ekspresi	88
2.21.1	Pencernaan tunggal (single digestion) plasmid DNA	89
2.21.2	Ligasi diantara DNA selitan dengan DNA vektor ekspresi untuk membentuk DNA rekombinan baru.	90
2.22	Profil pertumbuhan bakteria rekombinan <i>BmSXP1/pPROEX<sup>TM</sup>HTa/TOP10F'</i> 91	
2.22.1	Optimisasi kepekatan Isopropil- $\beta$ -D-thiogalaktopiranosida (IPTG)	93
2.22.2	Optimisasi masa pos-aruhan IPTG	93
2.23	Ekspresi protein rekombinan <i>BmSXP</i> berskala besar	94
2.24	Optimisasi kepekatan PMSF	95
2.25	Sonikasi pelet bakteria rekombinan	95
2.26	Penulenan protein	96
2.26.1	Pembasuhan resin Ni-NTA “superflow”(Qiagen, USA)	96
2.26.2	Penulenan protein rekombinan larut berskala kecil	97
2.26.3	Penulenan protein rekombinan skala kecil secara denaturasi	98

2.26.4	Penulenan protein larut menggunakan kaedah kromatografi afiniti berskala besar	99
2.26.5	Pemekatan dan pembasuhan antigen rekombinan <i>BmSXP</i>	100
2.27	Analisa antigen rekombinan <i>BmSXP</i> dengan kaedah elektroforesis gel Natrium Dodesil Sulfat-Poliakrilamida (SDS-PAGE)	101
2.27.1	Sodium Dodisil Sulfat-Poliakraramida Gel Elektroforesis (SDS-PAGE)	101
2.28	Blot Western	103
2.28.1	Penyediaan membran nitroselulosa	103
2.28.2	Pemindahan protein daripada gel ke membran nitroselulosa	103
2.28.3	Penggesanan kehadiran protein rekombinan menggunakan antibodi anti-histidin	105
2.28.4	Pengesanan antigenisiti protein rekombinan menggunakan serum pesakit	105
2.28.5	Kaedah pengesanan kemiluminesen	106
2.28.5.1	Penyediaan substrat kemiluminesen (Roche diagnostics, Jerman)	106
2.29	Asai IgG4-ELISA	107
2.29.1	Sampel kajian	107
2.29.2	Optimisasi pelbagai parameter dalam asai IgG4-ELISA	107
2.29.3	Optimisasi kepekatan antigen rekombinan <i>BmSXP</i>	108
2.29.4	Optimisasi pencairan sampel serum	108
2.29.5	Asai IgG4-ELISA bagi ujian sensitiviti menggunakan antigen	

	<i>BmSXP</i> dan <i>BmR1</i>	108
2.29.6	Asai IgG4-ELISA bagi ujian sensitiviti dan spesifisiti antigen <i>BmSXP</i> , <i>BmR1</i> dan antigen campuran	110
2.29.7	Asai IgG4-ELISA bagi sensitiviti dan spesifisiti fasa II bagi antigen yang ‘disenaraipendek’	110
2.29.8	Perbandingan O.D yang diperolehi oleh antigen rekombinan <i>BmR1</i> dan <i>BmSXP</i> dalam IgG4-ELISA bagi pengesanan filariasis brugia.	111
<b>BAB 3</b>	<b>KEPUTUSAN</b>	
3.1	Penentuan pencairan perpustakaan cDNA yang sesuai	112
3.2	Optimisasi dalam kaedah PCR	112
3.2.1	Optimisasi templat dalam kaedah PCR	112
3.2.2	Optimisasi suhu penyepuhlindapan	113
3.2.3	Optimisasi kepekatan Magnesium klorida di dalam kaedah PCR	113
3.3	Pengklonan ‘ORF’ di dalam gen SXP ke dalam vektor TOPO-TA pCR 2.1	116
3.3.1	Tindakbalas PCR untuk mengamplifikasi perpustakaan cDNA.	116
3.3.2	Ujian saringan PCR selepas pengklonan produk PCR ke dalam vektor TOPO-TA pCR 2.1	116
3.3.3	Penulenan dan penjujukan plasmid rekombinan	117
3.3.4	Analisa penjajaran bes	117
3.3.5	Pembaikan susunan bes	128
3.3.6	Ujian saringan PCR ke atas koloni bakteria rekombinan yang dibaiki	128
3.3.7	Analisa jujukan bes untuk klon yang dibaiki	131

3.4	Pengklonan DNA selitan ke dalam vektor ekspresi pPROEX <sup>TM</sup> Hta	131
3.4.1	Pengklonan ORF di dalam gen <i>SXP1</i> daripada plasmid <i>BmM8</i> ke dalam vektor ekspresi pPROEX <sup>TM</sup> Hta	131
3.4.2	Ujian saringan PCR ke atas koloni bakteria rekombinan selepas pengklonan plasmid p <i>BmM8</i> ke dalam vektor ekspresi pPROEX <sup>TM</sup> Hta	135
3.4.3	Analisa jujukan bes plasmid p <i>BmRN</i>	136
3.5	Pertumbuhan bakteria rekombinan	146
3.6	IPTG	146
3.6.1	Optimisasi kepekatan akhir aruhan IPTG ke atas <i>BmSXP1/pPROEX<sup>TM</sup>Hta/TOP10F'</i>	146
3.6.2	Optimisasi masa pos-aruhan IPTG.	147
3.7	Optimisasi kepekatan PMSF ke atas kultur rekombinan dengan skala kecil	151
3.8	Pemblotan Western	151
3.8.1	Pengesanan protein rekombinan <i>BmSXP</i> dengan antibodi anti-histidin	151
3.8.2	Penentuan antigenisiti protein rekombinan menggunakan sampel serum dengan kaedah pemblotan Western.	155
3.9	Optimisasi berskala kecil penulenan antigen <i>BmSXP</i> dalam keadaan larut ('native') dan denaturasi	157
3.10	Asai IgG4-ELISA	157
3.10.1	Optimisasi kepekatan antigen dan pencairan serum untuk kaedah IgG4-ELISA	157

3.10.2	Ujian sensitiviti IgG4-ELISA menggunakan antigen rekombinan <i>BmSXP</i> dan <i>BmR1</i>	161
3.10.3	Asai IgG4-ELISA fasa I menggunakan antigen <i>BmR1</i> dan <i>BmSXP</i>	163
3.10.4	Analisa keputusan sensitiviti dan spesifisiti IgG4-ELISA bagi fasa pertama	174
3.10.5	Asai IgG4-ELISA fasa II menggunakan antigen <i>BmR1</i> dan <i>BmSXP</i>	176
3.10.6	Analisa keputusan asai IgG4-ELISA menggunakan 3 antigen Rekombinan bagi fasa II	182
3.10.7	Penentuan keseluruhan sensitiviti dan spesifisiti asai IgG4-ELISA	184
3.10.8	Perbandingan O.D yang diperolehi oleh antigen rekombinan <i>BmR1</i> dan <i>BmSXP</i> dalam IgG4-ELISA bagi filariasis brugia	186

#### **BAB 4        PERBINCANGAN**

4.1	Pengenalan	189
4.2	Amplifikasi perpustakaan cDNA melalui kaedah PCR	192
4.3	Pengklonan ke dalam vektor TOPO-TA pCR 2.1	195
4.4	Pembaikan susunan bes melalui kaedah PCR	197
4.5	Pengklonan ke dalam vektor ekspresi, pPROEX <sup>TM</sup> HT	199
4.6	Ekspresi Protein	200
4.6.1	Bahan pencetus ekspresi (IPTG)	202
4.7	Penulenan protein rekombinan	204
4.8	Pemblotan Western	205
4.8.1	Pengesanan protein <i>BmSXP</i> dengan penanda histidin melalui	

pemblotan Western	205
4.8.2 Pengesanan antigenisiti dalam kaedah pemblotan Western	206
4.9 Asai IgG4-ELISA	207
4.9.1 Ujian sensitiviti dan spesifisiti fasa I dan II	208
<b>BAB 5 KESIMPULAN</b>	212
<b>LAMPIRAN</b>	214
<b>RUJUKAN</b>	216
<b>PENERBITAN DAN PEMBENTANGAN KERTAS KERJA</b>	229

## SENARAI JADUAL

		<b>Muka surat</b>
Jadual 2.1	Pencairan bersiri kepekatan protein piawai dan nilai O.D	52
Jadual 2.2	Pencairan bersiri bagi mendapatkan kepekatan protein piawai	53
Jadual 2.3	Sampel serum yang digunakan di dalam asai IgG4-ELISA	109
Jadual 3.1	Faktor pencairan dan bilangan faj rekombinan yang diperolehi	114
Jadual 3.2	Nilai O.D bagi optimisasi kepekatan antigen dan pencairan serum bagi asai IgG4-ELISA	160
Jadual 3.3	Keputusan ujian sensitiviti menggunakan antigen rekombinan <i>BmSXP</i> dan <i>BmR1</i> .	162
Jadual 3.4	Keputusan ujian sensitiviti IgG4-ELISA fasa I	164
Jadual 3.5	Keputusan ujian spesifisiti IgG4-ELISA fasa I	169
Jadual 3.6	Analisa keputusan asai IgG4-ELISA bagi fasa I	175
Jadual 3.7	Ujian sensitiviti IgG4-ELISA fasa II	177
Jadual 3.8	Ujian spesifisiti IgG4-ELISA fasa II.	180
Jadual 3.9	Analisa Keputusan keseluruhan asai IgG4-ELISA fasa II bagi 3 penyediaan antigen yang 'disenaraipendek'.	183
Jadual 3.10	Analisa ujian sensitiviti dan spesifisiti dengan kaedah asai IgG4-ELISA menggunakan antigen rekombinan bagi mengesan filariasis brugia dan bankrofti.	185
Jadual 3.11	Serum pesakit brugia yang sensitif terhadap <i>BmR1</i> dan <i>BmSXP</i>	187
Jadual 3.12	Keputusan analisa ujian-t terhadap perbandingan min O.D bagi asai	



IgG4 ELISA ke atas 30 sampel serum *B.malayi* menggunakan antigen rekombinan *BmR1* dan *BmSXP*.

188

## SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 1.1	Taburan filariasis limfatik secara global	5
Rajah 1.2	Kitar hidup filaria limfatik	9
Rajah 1.3a	Struktur mikrofilaria <i>Bancrofti</i>	10
Rajah 1.3b	Struktur mikrofilaria <i>B.malayi</i>	10
Rajah 1.3c	Struktur mikrofilaria <i>B.timori</i>	10
Rajah 1.4	Carta spektrum penyakit filariasis	17
Rajah 1.5a	Contoh manifestasi melibatkan kaki	22
Rajah 1.5b	Contoh manifestasi kronik yang menyebabkan kaki dan lengan	22
Rajah 1.6	Hasil ujian pantas Brugia Rapid dalam bentuk kaset	30
Rajah 2.1	Graf kepekatan protein piawai melawan ketumpatan optik	52
Rajah 2.2	Graf kepekatan optik lawan kepekatan protein piawai	53
Rajah 3.1	Optimisasi templat perpustakaan cDNA	119
Rajah 3.2	Analisa gel agarosa terhadap optimisasi suhu penyepuhlindapan	120
Rajah 3.3	Analisa gel agarosa terhadap optimisasi kepekatan Magnesium klorida melalui kaedah PCR.	121
Rajah 3.4	Analisa produk PCR DNA faj rekombinan dengan 1% elektroforesis gel agarosa	122
Rajah 3.5	Keputusan ujian saringan PCR ke atas koloni rekombinan <i>BmL3</i> dan <i>BmRN</i> selepas pengklonan TOPO-TA pCR 2.1	123
Rajah 3.6	Keputusan penulenan plasmid rekombinan dianalisa	

	menggunakan 1% gel agarosa	124
Rajah 3.7	Analisa penjajaran bes bagi plasmid pTBmL3 dan pTBmRN	125
Rajah 3.8	Analisa produk PCR ‘site-directed mutagenesis’ sebelum dan selepas pemotongan dengan enzim <i>DpnI</i>	129
Rajah 3.9	Penyaringan PCR terhadap 10 koloni rekombinan <i>BmSXP1(BmRN)/TOPO/XL1 Blue site 1</i>	130
Rajah 3.10	Analisa penjajaran plasmid pBmM4 dan pBmM8	132
Rajah 3.11	Analisa 1% gel agarosa untuk vektor ekspresi pPROEX™HTa dan plasmid DNA selitan <i>BmM8</i> bagi pencernaan plasmid dengan enzim <i>EcoRI</i> .	134
Rajah 3.12	Analisa produk PCR daripada koloni bakteria rekombinan <i>BmSXP1/pPROEX™HTa/TOP10 F’</i> yang diamplifikasi dengan primer ‘internal-internal’ SXP1-F dan SXP1 R menggunakan 1% gel agarosa	137
Rajah 3.13	Analisa produk PCR daripada koloni bakteria rekombinan yang sama yang diamplifikasikan dengan primer ‘eksternal-internal’ M13pUCR dan SXP1R menggunakan 1% gel agarosa	138
Rajah 3.14	Penjajaran bes bagi 2 klon <i>BmSXP1/pPROEX™HTa/TOP10F’</i> dengan <i>BmSXP1</i> yang asal menggunakan perisian VECTOR NTI versi 9.0	139
Rajah 3.15	Susunan asid amino dan bes yang menunjukkan susunan bes bakteria rekombinan <i>BmSXP1/pPROEX™HTa/TOP10F’</i> di dalam vektor ekspresi	143
Rajah 3.16	Peta genetik <i>BmSXP</i> di dalam vektor ekspresi yang mempunyai	

pelbagai tapak pencernaan enzim	145
Rajah 3.17 Lengkok pertumbuhan log bakteria rekombinan <i>BmSXP1/pPROEXHTa/TOP10F'</i>	148
Rajah 3.18 Analisa SDS-PAGE bagi optimisasi kepekatan akhir IPTG dengan memuatkan 20 µg protein setiap lorong.	149
Rajah 3.19 Profil SDS-PAGE sebelum dan selepas aruhan IPTG (1 mM pada suhu 30°C) pada masa pos-aruhan yang berbeza	150
Rajah 3.20 Analisa SDS-PAGE bagi optimisasi kepekatan PMSF terhadap protein rekombinan <i>BmSXP</i> dengan memuatkan 200 µg setiap lorong.	153
Rajah 3.21 Pengesanan kehadiran penanda histidin	154
Rajah 3.22 Analisa pembloatan Western bagi pengesanan kehadiran antigenisiti protein rekombinan menggunakan beberapa jenis sampel serum	156
Rajah 3.23 Profil antigen rekombinan <i>BmSXP</i> yang dituliskan melalui kaedah penulenan natif dan denaturasi.	159

## SENARAI SINGKATAN PERKATAAN

1	'Ampicillin resistance ( $\beta$ -lactamase) gene'	AMP <sup>r</sup>
2	'Base pair'	bp
3	'Bovine serum albumin'	BSA
4	Cahaya ultra lembayung	UV
5	'Celsius'	C
6	'Centimeter'	cm
7	'Circulating filarial antigen'	CFA
8	'Complementary Deoksiribonucleic acid'	cDNA
9	Dermatolimfangioadenitis akut	ADLA
10	Dimetil sulfoksida	DMSO
11	Dioksiribonuklease 1	DNase1
12	Diethylcarbamizine	DEC
13	'Deoksiribonucleic acid'	DNA
14	<i>E.coli</i> TOP10F' expression host (invitrogen, USA)	TOP10F'
15	'Enzyme-inked immunosorbent assay'	ELISA
16	'Endemic normal'	EN
17	'Enhanced chemiluminescence'	ECL
18	Etidium bromida	EtBr
19	Fenilmetilsulfonilfluorida	PMSF
20	Filariasis limfatik	LF
21	Gram	g
22	'Global Programme for the Elimination of Lymphatic Filariasis'	GPELF

23	'Horse redish peroxidase'	HRP
24	'Immunochromatography test'	ICT
25	'Immunofluorescent antybody test'	IFAT
26	Imunoglobulin G	IgG
27	Imunoglobulin 1	IgG1
28	Imunoglobulin 2	IgG2
29	Imunoglobulin 3	IgG3
30	Imunoglobulin 4	IgG4
31	Imunoglobulin E	IgE
32	Isoprofil- $\beta$ -tiogalaktopiranodisa	IPTG
33	Kilo bes	Kb
34	Kilodalton	kDa
35	Luria bertani	LB
36	Miligram	mg
37	Milimolar	mM
38	Mililiter	ml
39	Mikroliter	$\mu$ l
40	Milimeter	mm
41	Mikrogram	$\mu$ g
42	Mikrometer	$\mu$ m
43	Molar	M
44	Natrium dodesil sulfat-poliakrilamida	SDS-PAGE
45	Nanogram	ng
46	Nikel-nitriлотriasetik asid	Ni-NTA

47	'Optical density'	OD
48	'Origin of replication'	ori
49	Penimbal salin fosfat	PBS
50	Penimbal salin fosfat-Tween 20	PBS-T
51	Penimbal salin tris	TBS
52	Penimbal salin tris-Tween 20	TBS-T
53	Penimbal tris-borat	TBE
54	Penimbal tris-asetat EDTA	TAE
55	'Plage forming unit'	pfu
56	'Polymerase chain reaction'	PCR
57	Polietersulfon	PES
58	Serum albumin bovin	BSA
59	Substrate 2, 2'-Azino-di-[3-etilbentiazolina sulfonat	ABTS
60	'Tropical poulmonary esinophilia'	TPE
61	Unit enzim	U
62	Volt	V
63	'World Health Organisation'	WHO

## SENARAI SIMBOL

1	Cacing <i>Brugia malayi</i> jantan dewasa	<i>BmAM</i>
2	Cacing <i>Brugia malayi</i> betina dewasa	<i>BmAF</i>
3	Cacing <i>Brugia malayi</i> larva peringkat ketiga	<i>BmL3</i>
4	Cacing <i>Wuchereria bancrofti</i> jantan dewasa	<i>WbAM</i>
5	Cacing <i>Wuchereria bancrofti</i> betina dewasa	<i>WbAF</i>
6	Larva peringkat 1	L <sub>1</sub>
7	Larva peringkat 2	L <sub>2</sub>
8	Larva peringkat 3	L <sub>3</sub>
9	Larva peringkat 4	L <sub>4</sub>
10	Larva peringkat dewasa	L <sub>5</sub>
11	Mikrofilaria <i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>WbMF</i>
12	Mikrofilaria	mf
13	Mikrofilaria positif	mf+
14	'Soil transmitted helminth'	STH



**PENGLONAN GEN *SXP1* DAN PEMBANGUNAN IgG4-ELISA  
MENGUNAKAN ANTIGEN REKOMBINAN *BmSXP* DAN *BmR1* UNTUK  
MENGESAN JANGKITAN FILARIASIS LIMFATIK.**

**ABSTRAK**

Filariasis limfatik merupakan salah satu penyakit yang disasarkan oleh Badan Kesihatan Sedunia (WHO) untuk dieliminasi. Ini direalisasikan melalui Program Eliminasi Filariasis Limfatik Peringkat Global (GPELF) dan dijangka akan menemui kejayaan pada tahun 2020. Penyakit ini disebabkan oleh tiga spesies filaria yang boleh menjangkiti nodus dan salur limfa manusia, iaitu *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* dan *B. timori*. Ketiga-tiga spesies parasit ini hadir di kawasan tropika dan sub-tropika. Sebanyak 100 juta manusia di 83 buah negara telah dijangkiti oleh filaria bankrofti manakala 13 juta lagi manusia dijangkiti filaria brugia (*B.malayi* dan *B.timori*) (WHO, 1998). Antigen rekombinan *BmR1* yang dihasilkan terdahulu telah digunakan untuk mengesan filariasis brugia. Antigen rekombinan ini memenuhi keperluan diagnostik kerana ia mempunyai sensitiviti dan spesifisiti yang tinggi di dalam kedua-dua format iaitu asai IgG4-ELISA dan ujian pantas immunokromatografi. Asai immuno untuk mengesan filariasis yang disebabkan oleh *Wuchereria bancrofti* dilaporkan menggunakan antigen yang diekspres daripada ‘ORF’ (‘open reading frame’ atau bukaan kerangka bacaan) gen *SXP*. Gabungan kedua-dua antigen rekombinan tersebut (*BmR1* dan *BmSXP*) akan dapat digunakan untuk membangunkan satu asai IgG4-ELISA untuk mengesan semua spesies filariasis limfatik. Ini sangat berguna memandangkan rawatan bagi kesemua spesies filaria tersebut menggunakan ‘drug’ yang sama. Objektif utama kajian ini adalah untuk membangunkan asai IgG4-ELISA untuk mengesan

jangkitan semua spesies filariasis limfatik dengan menggunakan antigen rekombinan *BmR1* dan *SXP*.

'ORF' gen *SXP* (462 bp, No. GenBank: M98813) diampifikasikan daripada faj perpustakaan cDNA *Brugia malayi* dan *Wuchereria bancrofti* menggunakan kaedah PCR. Amplifikasi berjaya dihasilkan daripada tiga jenis perpustakaan cDNA iaitu *BmL3*, *BmAM* dan *BmRN*. Produk PCR diklonkan ke dalam vektor TOPO-TA pCR 2.1 dan klon terhasil dianalisa melalui penjujukan DNA dan dijajarkan dengan susunan bes 'ORF' gen *BmSXP1* asal (No GenBank: M98813) menggunakan perisian VECTOR NTI 9.0. Hasilnya menunjukkan klon rekombinan *BmSXP1(BmRN)/TOPO/XL1 Blue* mengalami mutasi pada bes yang ke 104 (daripada kodon pemula 'ORF' gen *SXP*) manakala klon *BmSXP1(BmL3)/TOPO/XL1 Blue* juga mengalami beberapa mutasi. Seterusnya klon rekombinan *BmSXP1(BmRN)/TOPO/XL1 Blue* dipilih untuk pembaikan bes secara 'Quick change site-directed mutagenesis'. Klon tersebut seterusnya disub-klon ke vektor ekspresi pROEXHTa dan diekspresi dalam *E.coli* TOP10F'. Protein rekombinan ini dituliskan menggunakan kromatografi afiniti; dan melalui kaedah blot Western ia didapati bersaiz 24.7 kDa apabila diprob dengan antibodi monoklonal  $\alpha$ -His-HRP. Antigen rekombinan ini juga bertindakbalas positif dengan sampel serum pesakit *Wuchereria bancrofti*, dan tidak menunjukkan reaksi silang dengan sampel daripada jangkitan helmin lain (bukan-limfatik).

Asai IgG4-ELISA bagi jangkitan filariasis bankrofti dibangunkan selepas optimisasi kepekatan antigen rekombinan dan pencairan serum. Kajian ini menunjukkan bahawa untuk mencapai sensitiviti dan spesifisiti yang tertinggi untuk mengesan kedua-

dua filariasis brugia dan bankrofti, penggunaan dua telaga yang berasingan disalut dengan protein rekombinan *BmR1* dan *BmSXP* adalah lebih baik daripada menyalut satu telaga yang mengandungi gabungan dua protein tersebut.

Kesimpulannya, kajian ini berjaya menghasilkan antigen rekombinan *BmSXP* yang dapat mengesan jangkitan *W.bancrofti* dengan sensitiviti dan spesifisiti yang tinggi. Kajian ini juga berjaya membangunkan asai IgG4-ELISA yang sensitif dan spesifik untuk mengesan semua spesies filariasis limfatik.

**CLONING OF *SXP1* GENE AND DEVELOPMENT OF IgG4-ELISA USING  
*BmSXP* AND *BmR1* RECOMBINANT ANTIGENS FOR DETECTION OF  
LYMPHATIC FILARIASIS.**

**ABSTRACT**

Lymphatic filariasis is one of the diseases targeted for elimination by the World Health Organization (WHO). This is carried out through The Global Program for Elimination of Lymphatic Filariasis (GPELF) and is expected to succeed by the year 2020. The disease is caused by three human filarial species, which reside in lymph nodes and channels namely *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *B. timori*. All three species exist in tropical and sub-tropical areas. About 100 million people in 83 countries are infected with bancroftian filaria while 13 million people are infected with brugian filaria (*Brugia malayi* and *B.timori*) (WHO, 1998). Previously produced *BmR1* recombinant antigen has been used for the detection of brugian filariasis. This recombinant antigen fulfills the diagnostic needs because it has high sensitivity and specificity in both IgG4-ELISA and immunochromatographic rapid test formats. Immunoassay for detection of filariasis caused by *Wuchereria bancrofti* had been reported which employed an antigen expressed by the ORF (open reading frame) of *SXP* gene. A combination of both antigens (*BmR1* and *SXP*) can be employed to develop an IgG4-ELISA assay for detection of all species of lymphatic filariasis. This would be very useful since the treatments for all species of lymphatic filaria employ the same drug. Thus, the main objective of this study is to develop an IgG4-ELISA assay for

detection of all three lymphatic filarial species, by employing *BmR1* and SXP recombinant antigens.

The ORF of *SXP* gene (462bp, No GenBank: M98813) was amplified by PCR from *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti* cDNA phage libraries. Successful amplifications were produced from three kinds of libraries namely *BmL3*, *BmAM* and *BmRN*. Each amplified DNA was then cloned into TOPO-TA pCR 2.1 vector, the DNA inserts were then sequenced, followed by alignment with the ORF of the original *BmSXP1* sequence (No GenBank: M98813) using VECTOR NTI 9.0 software. The analysis showed that recombinant clone *BmSXP1(BmRN)/TOPO/XL1Blue* had one mutation at the 104<sup>th</sup> base (from start codon of ORF SXP gene), while clone *BmSXP1(BmL3)/TOPO/XL1Blue* had several mutation in its nucleotide sequence. The former recombinant clone was then chosen for base repair by 'Quick change site-directed mutagenesis'. Subsequently the plasmid was sub-cloned into pPROEXHTa expression vector and was expressed in *E.coli* TOP10F' bacteria. The recombinant protein produced was purified using affinity chromatography; and by Western blot a protein with a size of 24.7kDa was observed when probed with monoclonal anti-His-HRP. This recombinant antigen reacted positively with serum samples from *W.bancrofti* patients, and did not show cross-reaction with samples from other non-filaria helminthic infections.

An IgG4-ELISA assay for bancroftian filariasis was developed after optimizations of recombinant antigen concentration and serum dilution. The results of this study showed that to achieve the highest sensitivity and specificity to detect both

brugian and bancroftian filariasis, the use of two wells separately coated with *BmR1* and *BmSXP* recombinant proteins was better than using one well containing a mixture of those two proteins.

In conclusion, this study had successfully produced *BmSXP* recombinant antigen which is sensitive and specific for detection of *W.bancrofti* infection. This study had also successfully employed separate wells coated with *BmR1* and *BmSXP* recombinant antigens in the development of a highly sensitive and specific IgG4-ELISA for detection of all species of lymphatic filariasis.

# BAB 1

## PENGENALAN

### 1.1 Pengenalan am

Filariasis merujuk kepada sekumpulan penyakit bawaan vektor akibat daripada jangkitan cacing parasit yang kelihatan seperti bebenang dan dikenali sebagai cacing bulat atau nematoda. Terdapat dua jenis filariasis iaitu filaria limfatik (yang disebabkan oleh *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* dan *Brugia timori*) dan jangkitan filariasis bukan limfatik yang terdiri daripada loiasis (jangkitan cacing *Loa-loa* yang biasanya melibatkan bahagian mata) dan onchocerciasis (atau lebih dikenali sebagai 'river blindness') akibat jangkitan daripada spesies *Onchocerca volvulus*.

Jangkitan filariasis limfatik pada manusia yang disebabkan oleh nematoda yang menduduki saluran limfatik dan darah manusia boleh menyebabkan pelbagai manifestasi klinikal dan sub-klinikal hasil daripada kerosakan primer sistem limfatik samada disebabkan oleh cacing dewasa ataupun mikrofilaria (Ottesen, 1993). Simptom dan petanda penyakit ini adalah pelbagai mengikut peringkat jangkitan vektor serta bergantung juga samada mikrofilaria beredar dalam darah. Jangkitan ini juga menyebabkan morbiditi pada semua peringkat umur dan jantina. Mengikut perangkaan 1995 (WHO), secara global dianggarkan sebanyak 1100 juta manusia iaitu 20 % daripada populasi dunia yang tinggal di kawasan endemik mempunyai risiko mendapat jangkitan ini. Kira-kira 120 juta kes dijangkiti ataupun sedang mengalami jangkitan

kronik dilaporkan (Micheal *et al.*, 1996). Sebanyak 40 juta daripada jumlah ini menderita penyakit limfadema, elefantiasis dan hidrosil (WHO, 1994).

Badan Kesihatan Sedunia, (WHO) mencadangkan filariasis limfatik dikelaskan kepada peringkat akut dan kronik. Filariasis akut dicirikan dengan satu atau lebih demam berulang (bersama-sama atau tanpa gejala seperti sakit kepala, muntah serta loya) dan sakit pada bahagian-bahagian tertentu (pedih, panas, limfangitis atau adenolimfangitis pada lengan atau kaki, genital lelaki atau payudara) dalam tempoh sekurang-kurangnya tiga hari. Adenolimfangitis akut boleh menyebabkan kesengsaraan fizikal, penyakit kronik seperti limfadema dan hidrosil yang menyebabkan penyakit yang kekal berpanjangan serta boleh menyebabkan masalah sosio-ekonomi pada negara (Pani *et al.*, 1995). Hal ini akan memberikan kesan terhadap pekerjaan dan produktiviti, yang secara langsung dan tidak langsung akan menggugat kekuatan ekonomi sesebuah negara yang terlibat (Chandrashekar *et al.*, 1994). Penyakit kronik pula merupakan jangkitan yang berlaku dalam tempoh yang lebih lama dan dicirikan dengan kehadiran limfadema, untut dan hidrosil yang turut banyak menimbulkan masalah perubatan (WHO, 1984).

Filariasis limfatik merupakan satu daripada enam jangkitan penyakit yang dikenalpasti dan tersenarai sebagai masalah kesihatan awam. Penyakit ini terlibat di dalam program eliminasi sejagat di bawah perbadanan kesihatan sedunia yang mana matlamat program ini perlu dicapai pada tahun 2020 (WHO, 1998). Parasit menjangkiti jutaan manusia setiap tahun dan ini melemahkan individu yang dijangkiti. Ia semakin menular di negara tropika serta sub-tropika di mana taburan transmisi penyakit ini



berkaitrapat dengan status sosioekonomi dan faktor perilaku populasi di kawasan endemik. Mengikuti perangkaan WHO, penyakit ini dikenal pasti sebagai punca utama yang kedua kepada ketidakupayaan serius jangka panjang yang kekal dan menyebabkan kehilangan pekerjaan, stigmatisasi serta pengasingan diri pesakit tersebut daripada masyarakat (WHO, 1997a, b). Rajah 1.1 menunjukkan taburan filariasis limfatik secara global.

## 1.2 Taksonomi dan kitar hidup

Filaria nematoda adalah cacing multisel panjang berbentuk selinder yang jangkitannya boleh menyebabkan penyakit kepada manusia. Filaria boleh dikelaskan seperti berikut:

Alam	: Haiwan
Filum	: Nematoda
Kelas	: Secernentea
Ordo	: Spirurida
Famili	: Onchocercidae
Genus/spesies	: Limfatik dan bukan limfatik

Limfatik	Bukan limfatik
<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
<i>Brugia malayi</i>	<i>Loa-loa</i>
<i>Brugia timori</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>


Kitar hidup cacing brugia dan wuchereria adalah serupa. Habitat cacing jantan dan betina dewasa biasanya hadir di dalam nodul limfa dan saluran limfa yang berdekatan dengan nodul ini. Cacing betina adalah ovoviviparous yang dapat menghasilkan ratusan mikrofilaria atau larva peringkat 1 ( $L_1$ ). Mikrofilaria berada di peredaran darah yang kebanyakannya memperlihatkan mikrofilaria jenis periodik nokturnal yang dijumpai di dalam darah periferi antara jam 10 malam hingga 2 pagi. Kebanyakan cacing dewasa filaria limfatik hidup di antara 7 hingga 10 tahun tetapi jangka hayat parasit ini boleh mencecah sehingga 40 tahun (Leeuwin, 1962).

Perumah perantaraan (genera *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia*) menghisap darah daripada perumah yang dijangkiti dan mikrofilaria akan masuk ke dalam perut nyamuk dimana ia kehilangan sarung dalam masa 2 hingga 6 jam pertama. Selepas itu, parasit ini memasuki dinding usus dan rongga badan lalu memasuki otot rongga dada. Pembentukan sarung larva berlaku dua hari kemudian. Larva peringkat kedua ( $L_2$ ) adalah berbentuk sosej dan masa yang diambil untuk membentuk  $L_2$  adalah dua minggu. Larva kemudian memanjang dan cacing filaria sekunder peringkat ketiga terbentuk. Panjang cacing larva peringkat ketiga ( $L_3$ ) adalah 1.4 hingga 2 mm.

Larva peringkat ketiga bergerak daripada labium nyamuk menjangkiti perumah baru bila vektor ini menggigit. Ia memasuki kulit melalui luka hasil daripada gigitan nyamuk, dan menghasilkan larva peringkat keempat ( $L_4$ ) sehingga menghasilkan cacing jantan dewasa. Cara larva ini memasuki perumah tidak diketahui sepenuhnya tetapi ia berpindah daripada saluran limfa dan akhirnya kebanyakannya berada dalam kelenjar limfa di pangkal paha dan ke bahagian bawah badan manusia. Dalam filariasis bankrofti,



Rajah 1.1 Taburan filariasis limfatik secara global (WHO, 2001)

 Kawasan endemik filariasis

ia juga mungkin berada di kelenjar limfa di bahagian tangan dan payudara.

Cacing dewasa betina dan jantan mengawan dan melepaskan beribu-ribu mikrofilaria ke dalam darah dan seterusnya boleh dipindahkan ke dalam vektor nyamuk. (Nanduri & Kazura, 1989). Rajah 1.2 merupakan ringkasan kitar hidup filaria limfatik.

### **1.3 Morfologi cacing filaria limfatik**

Cacing betina dewasa mempunyai dua uterus yang berisi penuh dengan mikrofilaria dan biasanya terdapat di dalam salur limfa (kehadiran parasit ini dalam tisu nodus jarang dilaporkan). Morfologi cacing *W.bancrofti* amat berbeza daripada spesies lain. Bagi spesies *W.bancrofti* jenis periodik nokturnal, ia mempunyai sarung pada peringkat mikrofilaria (larva) yang bersaiz diantara 245 hingga 300  $\mu\text{m}$ . Pada peringkat ini, cacing berbentuk panjang, halus dengan lengkung badan yang licin (tidak bersudut), lebar ruang sefalik adalah 1:1 (nisbah panjang dan lebar kepala), nukleus badan adalah jelas dan tidak bertindih, tidak terdapat dua nukleus ekor diujung posterior (yang mana taburan nukleus berhenti mendadak). Mikrofilaria mengambil masa beberapa bulan untuk mencapai peringkat seksual yang matang. Apabila dewasa, ia boleh hidup selama beberapa tahun (John & William., 2006a). Cacing jantan dewasa mempunyai pelbagai saiz iaitu diantara 4 hingga 6 cm panjang dan 0.2 mm lebar manakala cacing dewasa betina pula mempunyai saiz diantara 6 hingga 10 cm panjang dan 0.2 mm lebar.

Walaupun secara kasarnya, morfologi cacing *Brugia malayi* adalah kelihatan sama seperti *W.bancrofti*, namun spesies ini boleh dibezakan antara satu sama lain. Sebanyak 50 hingga 80 peratus mikrofilaria periodik nokturnal *B.malayi* terlepas

daripada sarung dalam apusan berwarna. Ia berbentuk panjang halus dengan lengkung badan yang bersudut. Badannya berukuran 170 hingga 260  $\mu\text{m}$  panjang dan 5-6  $\mu\text{m}$  lebar, ruang lebar sefalik adalah 2:1, nukleus badan berkelompok, tidak teratur, kasar dan bertindih antara satu sama lain (kelihatan tidak begitu jelas) dan dua nukleus ekor (nukleus hujung atau terminal) terpisah diujung posterior (Noor Hayati, 2000). Ia mempunyai sarung luar yang lebih panjang daripada badannya. Hujung anteriornya bulat tanpa nukleus dan mempunyai dua stilet (ekornya menajam). Cacing betina dewasa mempunyai panjang 5  $\mu\text{m}$  X 160  $\mu\text{m}$  belahan melintang dan cacing jantan dewasa berukuran 2.2 mm hingga 2.5  $\mu\text{m}$  panjang X 90  $\mu\text{m}$  belahan melintang (Thomas, 1983). Ciri-ciri morfologi bagi *B.malayi* subperiodik nokturnal adalah sama dengan periodik nokturnal tetapi 100 peratus mikrofilarianya kekal di dalam sarung (Noor Hayati, 2000).

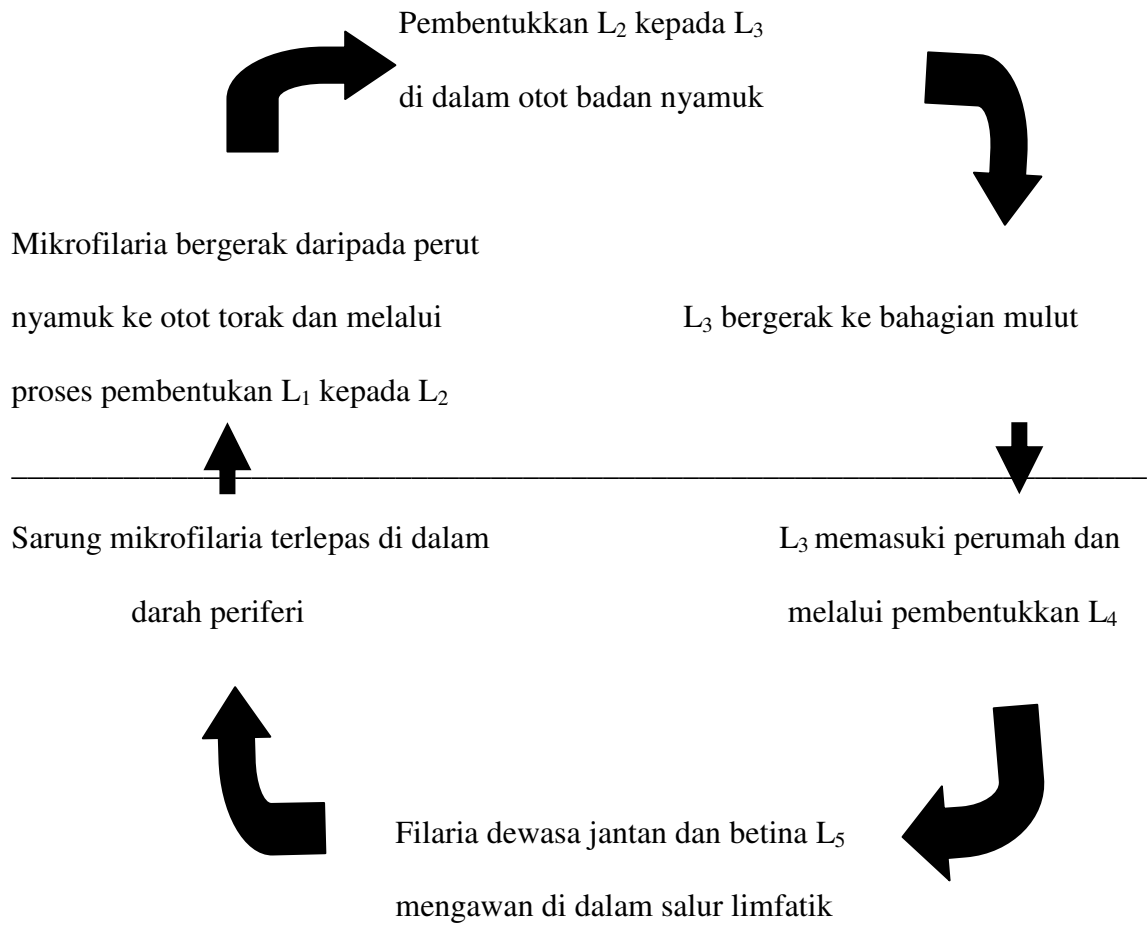
Morfologi cacing dewasa *Brugia timori* seakan-akan cacing dewasa *B.malayi* tetapi ekornya panjang meruncing dan saiznya lebih besar iaitu 310  $\mu\text{m}$  (John *et al.*, 2006b). Rajah 1.3a, b, dan c menunjukkan perbezaan struktur mikrofilaria *W.bancrofti*, *B.malayi* dan *B.timori*.

#### **1.4 Fenomena periodisiti mikofilaria (kekalaan)**

Keunikan mikrofilaria *W.bancrofti* dan *B.malayi* ialah bilangan atau kepekatan yang pelbagai di dalam peredaran darah periferi (Turner *et al.*, 1957). Pada asasnya, parasit filaria dibahagikan kepada dua kumpulan berdasarkan periodisiti mikrofilaria iaitu strain periodisiti nokturnal dan subperiodik nokturnal. Bagi strain periodisiti nokturnal, puncak kepekatan mikrofilaria adalah diantara jam 10 malam hingga 2 pagi.

Tiada parasit yang boleh dikesan di dalam darah periferi semasa siang hari. Strain subperiokdik nokturnal juga menunjukkan tahap parasitemia yang tinggi pada malam hari, tetapi 40% hingga 60% tahap puncak ini adalah sama pada siang hari (Dondero *et al.*, 1971 & Guptavanij dan Harinasrta, 1971). Selain daripada itu terdapat spesies *W.bancrofti* diurnal subperiodik di beberapa Kepulauan Pasifik Selatan dan Kepulauan India yang mana mikrofilaria beredar dalam darah periferi hanya pada siang hari terutamanya di waktu pagi dan senja (McCavthy, 2000). Periodisiti spesies *W.bancrofti* dan *B.malayi* bergantung kepada aktiviti harian perumah dan bukan giliran siang atau malam hari. Oleh itu sekiranya perumah tidur pada siang hari dan bekerja pada malam hari maka periodisiti mikrofilaremia juga terbalik. Kajian ke atas spesies *W.bancrofti* dan *B.malayi* mencadangkan bahawa periodisiti adalah berkait dengan perubahan tekanan oksigen di antara salur arteri dan vena di dalam paru-paru (Hawking & Gammage, 1968 & Burren, 1972). Apabila mikrofilaria tiada dalam peredaran darah periferi, ia sebenarnya berkumpul di dalam arteriol paru-paru.

## PEMBENTUKAN PERINGKAT VEKTOR

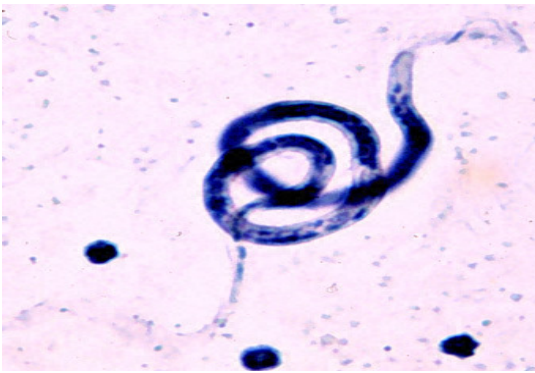


## PEMBENTUKAN PERINGKAT VERTEBRATA

Rajah 1.2: Kitar hidup filaria limfatik (Schott, 2000)



(a) Mikrofilaria *W.bancrofti* (1000X)



(b) Mikrofilaria *B.malayi* (1000X)



(c) Mikrofilaria *B.timori* (1000X)

Rajah 1.3a, b, c: Perbezaan struktur mikrofilaria *W.bancrofti*, *B. malayi* dan *B.timori*

Nota: Anak panah menunjukkan dua nukleus pada ekor filaria *B.timori*

(Rujukan: <http://www.biologie.de/biowiki/Fadenw%C3%BCrmer>)



Kajian mendapati bahawa jika terdapat perbezaan tekanan oksigen kurang daripada 50 mm raksa di dalam arteri-venus, maka mikrofilaria berkumpul di dalam paru-paru (Hawking *et al.*, 1966 & Hawking, 1967). Apabila perbezaan tekanan oksigen di dalam arteri-vena melebihi 50 mm tekanan raksa semasa tidur, mikrofilaria akan berpindah daripada vaskular paru-paru dan muncul di dalam peredaran darah periferi (Hawking & Gammage, 1968).

### **1.5 Risiko Jangkitan filariasis limfatik**

Risiko jangkitan adalah bergantung kepada tempoh pendedahan seseorang individu tersebut pada vektor yang terjangkit di kawasan yang endemik bagi penyakit ini. Bilangan nyamuk yang menggigit lebih daripada beberapa bulan hingga ke tahun diperlukan untuk membolehkan seseorang itu dijangkiti fiariasis limfatik. Dalam erti kata lain, lebih lama individu tersebut tinggal dikawasan-kawasan seperti ini, maka risiko yang besar untuk memperolehi jangkitan ini adalah tinggi dan sebaliknya (Nanduri & Kazura, 1989). Kaum lelaki dilaporkan mempunyai kadar jangkitan lebih tinggi berbanding kaum perempuan pada umur yang sama. Perbezaan kadar jangkitan adalah berhubung secara langsung dengan tingkah laku vektor dan tabiat sosial sesetengah komuniti (Grove *et al.*, 1978). Contohnya ialah kanak-kanak dan perempuan dewasa tidak menghabiskan masa yang banyak di lapangan sedangkan kaum lelaki terlibat sepenuhnya dengan penanaman dan penuaian yang menyebabkan mereka mungkin lebih terdedah kepada gigitan nyamuk yang terinfeksi (Valeza & Grove, 1979). Imuniti transplasenta dan penyusuan ibu yang terjangkit kepada anak juga mempengaruhi penyebaran dan intensiti jangkitan terutama kanak-kanak di bawah umur 5 tahun (Schrater *et al.*, 1983).

## 1.6 Epidemiologi

Faktor terpenting penyebaran jangkitan di dalam komuniti adalah kekerapan pendedahan jangkitan terhadap larva peringkat ketiga (Piessens & Partono, 1980a). Ini kerana keadaan persekitaran diantara kawasan endemik yang pelbagai, iaitu di kawasan tersebut mungkin mempunyai komuniti yang berbeza dari segi umur, prevalen yang spesifik terhadap jantina, intensiti jangkitan di kawasan yang berbeza atau dalam negara yang sama (Grove *et al.*, 1978).

Lebih kurang 90% jangkitan filaria pada manusia adalah disebabkan oleh jangkitan filaria *W.bancrofti* dan meliputi kawasan Ásia Tenggara, China, India, Amerika Latin, Afrika dan Kepulauan Pasifik. Ia disebarkan oleh nyamuk daripada genus *Culex*, *Anopheles* dan *Aedes* (WHO, 1998). Filaria *B.malayi* dan *B.timori* pula dianggarkan sebanyak 13 juta iaitu 10% manusia dijangkiti di India, China, Indonesia, Filipina, India, Korea, Jepun, Thailand, Vietnam dan di Malaysia (Ottesen *et al.*, 1997). Parasit ini disebarkan oleh nyamuk daripada genus *Mansonia*, *Anopheles* dan *Aedes* (WHO, 1998).

Parasit filariasis *B.timori* adalah endemik di bahagian timur Indonesia dan menjadi masalah kesihatan awam (Partono *et al.*, 1978). Kehadiran spesies ini di Pulau Timor dilaporkan pada tahun 1964. Ia disebarkan oleh nyamuk daripada spesies *Anopheles barbirostris* iaitu vektor yang mengigit pada waktu malam (John *et al.*, 2006a). Di Alor pula, prevalen jangkitan *B.timori* di kawasan penanaman padi adalah diantara 5 hingga 25 peratus manakala prevalen jangkitan filariasis *W.bancrofti* pula adalah di kawasan pantai yang melibatkan 20 % jangkitan pada penduduknya (Supali *et al.*, 2002).

Filaria *Brugia malayi* dan *W.bancrofti* merupakan filariasis limfatik utama yang menjangkiti manusia di Malaysia tetapi hanya 12% sahaja individu normal dijangkiti filaria bankrofti iaitu 0.75% (4/530). Pada tahun 1990 manakala kadar tertinggi adalah pada tahun 1998 iaitu 11.3% (31/275) dan kebanyakannya adalah berpunca daripada pekerja asing. Strain nyamuk yang menyebarkan filaria *W.bancrofti* adalah *Culex quinquefasciatus* yang hidup di air bersih dan di kubahan najis tetapi strain ini jarang ditemui. Filariasis limfatik utama yang menjangkiti individu di Semenanjung Malaysia adalah daripada filaria *Brugia malayi* iaitu melebihi 85% daripada kes filariasis yang dikesan; Sabah dan Sarawak merupakan negeri yang paling endemik. Kawasan endemik adalah di kawasan hutan hujan yang berpayau juga menjadi habitat bagi nyamuk *Mansonia* (Kementerian Kesihatan Malaysia, 1990-1999)

Penyelidikan filariasis limfatik di Malaysia melibatkan tiga fasa iaitu memfokuskan ke atas pembawa mikrofilaria yang melibatkan hospital Kuala Lumpur dan Raub (1908-1952). Hospital ini telah membuat analisa untuk mengenalpasti kawasan endemik bagi kawasan filariasis brugia dan bankrofti dengan mengenalpasti pembawa atau vektor bagi kedua-dua filariasis tersebut. Daripada kajian tersebut mendapati bahawa kawasan endemik bagi filariasis brugia adalah di Seberang Prai, Sabak Bernam, persisiran pantai (Perak dan Pahang) dan kawasan penanaman di Kedah manakala vektor jangkitan adalah terdiri daripada nyamuk daripada spesies *Mansonia annulata*, *M.annulifera*, *M.longipalpis* dan *M.uniformis*. Filariasis bankrofti pula dibawa oleh pendatang asing daripada negara China dan India. Fasa kedua pula (1953-1961) melibatkan pemetaan bagi kawasan endemik di Pahang, Terengganu, Kedah dan Pahang. Dua strain dikenalpasti iaitu strain periodik di kawasan penanaman padi di Kedah dan

strain subperiodik nokturnal di kawasan hutan hujan di Pahang. Fasa ketiga (1962 dan ke atas) melibatkan pengenalpastian kaedah yang sesuai untuk kawalan filariasis limfatik di Malaysia (Mak, 1983).

### **1.7 Hubungan vektor dan parasit**

Zoonosis diistilahkan sebagai sebarang jangkitan penyakit yang boleh dipindahkan daripada haiwan (liar atau domestik) kepada manusia atau daripada manusia kepada haiwan melalui vektor atau pembawa. Nyamuk merupakan vektor bagi filaria brugia dan bankrofti tetapi hanya filariasis brugia merupakan jangkitan zoonotik. Kecekapan spesies nyamuk yang spesifik bagi pemindahan jangkitan filaria kepada manusia ditentukan oleh pelbagai faktor. Sesetengah spesies tidak memindahkan parasit kerana gagal untuk melepaskan mikrofilaria ke dalam perumah baru bagi membolehkan aktiviti jangkitan berlaku. Sesetengah nyamuk mungkin vektor yang sangat lemah kerana populasi terlalu rendah atau tidak menggigit manusia kerana ia mungkin menghisap darah binatang lain (Mattingly *et al.*, 1969 & Wharton, 1962)

Jangkitan *B.malayi* nokturnal dikategorikan sebagai bukan zoonosis kerana vektor strain *Anopheles* dan *Aedes* ditemui terutamanya di dalam kawasan pertanian di mana kedua-dua bilangan dan diversiti haiwan liar adalah terhad (Laing *et al.*, 1961). *B.malayi* daripada strain subperiodik adalah zoonotik dan nyamuk *Mansonia* adalah vektor dan strain jenis ini biasanya menggigit manusia dan perumah haiwan liar seperti monyet hutan (Wharton, 1963 & Wijers & Kinyanjui, 1977). Filariasis bankrofti tidak dikategorikan sebagai zoonosis kerana ia tidak menjangkiti haiwan lain. Penyebaran filariasis ini terhad kepada manusia sahaja kerana tiada haiwan yang berpotensi

dijangkiti oleh filaria tersebut, dan ia hanya disebarkan oleh nyamuk daripada jenis periodik nokturnal yang menjadikan filaria ini sukar menjangkiti haiwan lain (Molynux *et al.*, 2003).

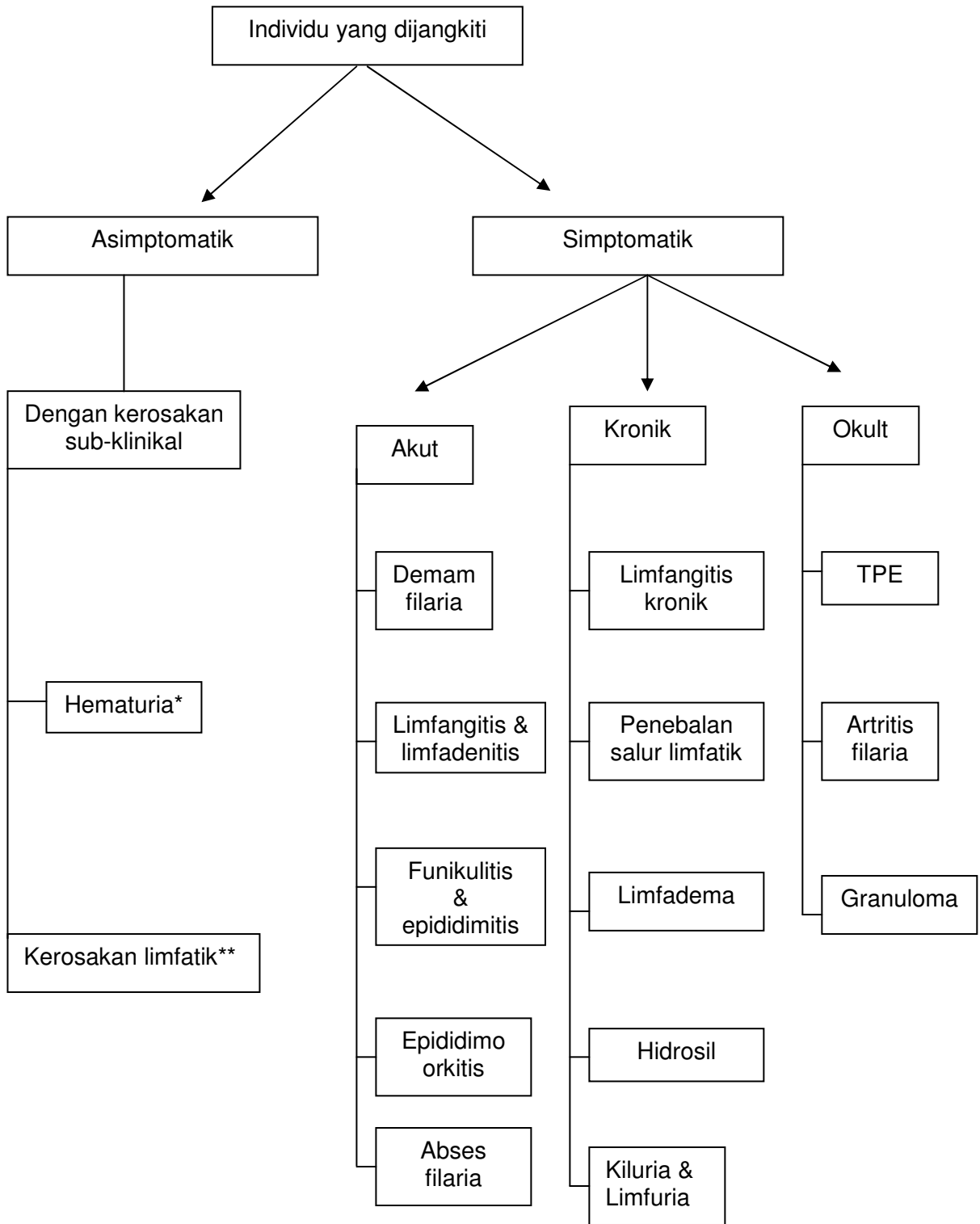
## **1.8 Manifestasi klinikal**

Manifestasi klinikal filariasis limfatik adalah pelbagai dan ia disebabkan oleh kehadiran cacing dalam sistem limfa yang boleh menyebabkan kerosakan pada dinding serta kelenjar. Penyakit ini biasanya tidak mengancam nyawa namun ia boleh merosakkan sistem limfa dan ginjal kerana salur limfa tidak boleh berfungsi secara normal. Kebanyakan pesakit tidak mengetahui bahawa mereka mendapat jangkitan filariasis kerana tiada sebarang simptom yang ketara ditunjukkan pada peringkat awal.

Selepas cacing dewasa di dalam badan mati, tanda dan simptom tertentu boleh dikesan pada pesakit. Tindakbalas keradangan atau infamasi pada tubuh menandakan kehadiran parasit itu dan jangkitan sekunder juga dicirikan dengan kerosakan pada sistem limfatik. Pengeraman L<sub>3</sub> sehinggalah cacing dewasa mati biasanya mengambil masa 8 hingga 16 bulan (WHO, 1984). Namun begitu, masa pengeraman paling pendek apabila L<sub>3</sub> memasuki perumah adalah empat minggu sebelum mencetuskan simptom klinikal. Selang masa ini juga berbeza daripada satu kawasan ke kawasan endemik lain iaitu ada di antara dua hingga lebih daripada 10 tahun.

Pengumpulan cecair yang menyebabkan bengkak pada bahagian lengan, payu dara dan kaki dikenali sebagai limfadema. Bagi lelaki pula, jangkitan *W.bancrofti* boleh menyebabkan kawasan genital menjadi bengkak dan keadaan ini dipanggil hidrosel.

Kaki, lengan atau kawasan genital mengalami pembengkakan beberapa kali lebih besar daripada saiz normal. Bengkak dan pengurangan fungsi sistem limfa menjadikan sistem imun badan pesakit itu sukar untuk melawan jangkitan lain terutamanya jangkitan kulat. Pesakit akan berisiko dijangkiti pelbagai jangkitan bakteria dalam kulit dan sistem limfa, seterusnya menyebabkan penebalan serta kekerasan pada kulit yang dikenali sebagai elephantiasis. Pengkelasan jenis jangkitan terbahagi kepada empat iaitu asimptomatik amikrofilaremia, mikrofilaremia asimptomatik, manifestasi akut dan kronik. Carta spektrum manifestasi klinikal filariasis limfatik ditunjukkan pada rajah 1.4.



Nota: \* berlaku pada semua pesakit yang mempunyai mikrofilaria, \*\* berlaku pada semua pesakit

Rajah 1.4: Carta spektrum penyakit filariasis

### **1.8.1 Asimptomatik amikrofilaremia**

Manifestasi ini biasanya berlaku di kawasan endemik di mana pesakit yang mendapat jangkitan filariasis tidak menunjukkan tanda-tanda atau sebarang simptom penyakit (Neva & Ottesen, 1978). Keadaan ini mungkin disebabkan oleh pendedahan pesakit terhadap filaria adalah tidak mencukupi untuk menunjukkan tanda-tanda jangkitan atau individu tersebut telahpun imun dengan jangkitan filaria.

Ada juga individu yang tinggal di kawasan endemik tetapi tidak menunjukkan kehadiran mikrofilaria dalam peredaran darah iaitu amikrofilariamik. Individu seperti ini mungkin telah resistan atau rintang terhadap jangkitan dan memperlihatkan kandungan limfosit yang banyak untuk bertindakbalas dengan antigen filaria (Piessens *et al.*, 1980b). Pesakit dalam kategori ini pula mengalami kerosakan limfa sub-klinik.

### **1.8.2 Mikroflaremia asimptomatik**

Kebanyakan pesakit filariasis limfatik menunjukkan klinikal asimptomatik, walaupun mereka mempunyai mikrofilaria di dalam peredaran darah. Golongan ini mengalami kerosakan limfa sub-klinik serta hematuria mikroskopik akibat kerosakan pada ginjal. Sebilangan individu yang tinggal di kawasan endemik mempunyai mikrofilaremia tetapi tidak menunjukkan manifestasi klinikal yang ketara. Sesetengah pula kekal mikrofilaremik tetapi asimptomatik bertahun-tahun lamanya. Kebanyakan individu di dalam kategori ini mengandungi limfosit-T yang secara spesifiknya tidak bertindakbalas dengan antigen filaria (antigen larut yang disediakan di dalam penimbal akuas) (Piessens *et al.*, 1980b).



### **1.8.3 Manifestasi akut**

Pesakit yang mengalami manifestasi ini dicirikan dengan beberapa manifestasi akut yang berlainan. Setiap manifestasi ini mempunyai penyebab mekanisma dan implifikasi patogenik yang berbeza. Inflamasi akut berulang pada anggota badan atau skrotum berkait rapat dengan jangkitan bakteria atau fungus yang merosakkan fungsi limfatik dan merupakan punca penyakit yang amat penting dalam manifestasi akut.

Demam filaria ialah keadaan dimana inflamasi bermula dalam nodul limfa dan berlanjutan hingga ke saluran limfa pada bahagian bawah badan manusia serta diiringi dengan demam dan oedema. Inflamasi terjadi disebabkan oleh rangsangan imun terhadap cacing dewasa yang mati dalam saluran limfatik atau mungkin disebabkan oleh tindakbalas imun hipersensitif semasa proses untuk pembentukan larva. (Turner *et al*, 1957 & Von Lichtenberg, 1957).

### **1.8.4 Manifestasi kronik**

Cacing dewasa yang dibawa oleh nyamuk dan menjangkiti individu secara berterusan sehingga bertahun-tahun akan menyebabkan individu tersebut mengalami manifestasi kronik. Jangkitan menyebabkan limfadema pada lengan, kaki, payudara dan genital akibat daripada pengumpulan cecair sehinggalah ke peringkat yang lebih kronik iaitu elephantiasis (Ottesen, 1992). Pembengkakan di kawasan genital kaum lelaki dikenali sebagai hidrosil. Hidrosil adalah manifestasi klinikal bagi filariasis limfatik yang ditemui hanya dengan jangkitan *W.bancrofti*. Manifestasi ini jarang berlaku pada kanak-kanak tetapi insidennya meningkat secara progresif mengikut peringkat umur. Sebanyak 40-60 peratus kaum lelaki dewasa mempunyai hidrosil di dalam kebanyakan

komuniti endemik. Ia berlaku disebabkan oleh tindakbalas inflamasi atau keradangan di dalam salur limfatik. Ada dikalangan pesakit mengalami hidrosil tetapi masih mempunyai mikrofilaria yang beredar dalam sistem peredaran darah. Ultrasonografi secara langsung boleh memperlihatkan cacing filaria bankrofti pada salur limfatik skrotum yang menjadi tapak sasaran bagi lokasi cacing dewasa. Cacing dewasa yang bertapak di dalam salur limfatik yang semakin menebal dapat dirasai dengan tangan apabila pemeriksaan secara fizikal dilakukan terhadap pesakit yang mengalami simptom hidrosil. Hidrosil yang terhasil di dalam penis dan skrotum boleh menjadi lebih besar tetapi ia tetap berlaku tanpa limfadema atau elefantiasis apabila pengaliran cecair di dalam tisu limfatik mengalir keluar daripada tisu limfatik dan memasuki tisu yang berdekatan dengan tisu tersebut (Nanduri & Kazura, 1989)

Limfadema merupakan peringkat manifestasi klinikal yang paling teruk di dalam filariasis limfatik. Ia boleh diklasifikasikan kepada empat gred iaitu:

Gred 1: Edema awal yang berbalik sepenuhnya secara spontan

Gred 2: Edema kaki separuh berbalik tanpa penebalan kulit bukan secara spontan

Gred 3: Edema kaki yang tidak berbalik dengan penebalan kulit bukan secara spontan.

Gred 4: Edema kaki yang tidak berbalik dengan pertumbuhan kapilari dan nodul (elefantiasis)

Individu yang mengalami limfadema gred tiga dan empat biasanya amikrofilaremia. Limfadema bagi pesakit filariasis brugia biasanya melibatkan kaki dan lengan tetapi limfadema kaki lebih kerap berlaku berbanding genital dan lengan (WHO, 1992).

Elefantiasis pula merupakan peringkat yang paling kronik kerana pada peringkat ini pembengkakan anggota tidak boleh surut. Ia disebabkan oleh penyumbatan salur limfatik yang mengakibatkan pembengkakan, pengerasan, pengerutan dan pemecahan yang progresif pada kulit. Peringkat kronik memakan masa antara 10 hingga 15 tahun selepas jangkitan filaria. Pesakit yang mengalami penyakit ini mestilah menjaga kebersihan diri supaya tiada jangkitan sekunder seperti pertumbuhan kulat dan bakteria berlaku (Nelson, 1979). Contoh manifestasi kronik yang melibatkan kaki pada rajah 1.5a dan kaki serta lengan pada rajah 1.2b

## **1.9 Filariasis okult**

Filariasis okult berlaku disebabkan oleh jangkitan filariasis di mana mikrofilaria dalam badan dimusnahkan oleh tindakbalas hiperimun perumah. Mikrofilaria tidak akan dilihat dalam darah periferi kerana ia terkumpul dalam paru-paru dan merosakkan organ ini. Pesakit akan kehilangan fungsi paru-paru yang menyebabkan fibrosis kronik. Kesan lain yang dapat dilihat ialah pesakit mengalami pembesaran nodul limfa, kerosakan salur pernafasan dan sindrom esinophilia tropika (TPE) (WHO, 1992). Manifestasi klinikal bagi pesakit TPE adalah seperti serangan batuk di waktu malam, sesak nafas yang seakan-akan mengalami asma bronkial, demam yang tidak terlalu tinggi, sakit dada, suara menjadi kasar dan pembesaran kelenjar limfa di leher dan siku. Titer bagi tahap Ig E spesifik antifilaria yang terdapat pada pesakit TPE adalah sangat tinggi. Pesakit tersebut mengandungi eosinofilia yang tinggi iaitu melebihi 3000/ml darah iaitu 3 kali ganda daripada individu normal (<http://www.filariasis.org/index.p/>).



(a)



(b)

- Rajah 1.5:
- a) Manifestasi kronik melibatkan kaki (elefantiasis atau untut)
  - b) Manifestasi kronik melibatkan kaki dan lengan.

### **1.10 Patogenesis dan patologi**

Patologi filariasis limfatik adalah hasil daripada kesan patogenik parasit yang kompleks, rangsangan imun perumah dan jangkitan luaran bakteria dan fungus. Patologi limfatik dan disfungsi peringkat awal boleh dikesan melalui teknologi ultrasonografi dan limfositigrafik iaitu teknik piawai untuk melihat salur limfa. Teknik ini membolehkan kita melihat pergerakan cacing secara langsung dari salur limfa. Ia digunakan untuk mengesan cacing dewasa di dalam skrotum, payudara (Amaral *et al.*, 1994 & Dreyer *et al.*, 1996a,b 1999c) dan pelbagai cacing di dalam kanak-kanak (Dreyer *et al.*, 1999a). Disfungsi salur limfa disebabkan oleh kehadiran cacing dewasa yang boleh menyebabkan dilatasi saluran limfatik. Pengumpulan cecair yang kaya dengan protein pada salur tersebut mengakibatkan jangkitan bakteria dan fungus yang berulang. Jangkitan yang berulang ini seterusnya boleh menyebabkan berlakunya dermatolymphangioadenitis akut (ADLA) dan akhirnya mendorong kepada pembentukan elefantiasis (Das *et al.*, 1994 & Dreyer *et al.*, 1999).

Populasi di kawasan endemik boleh dibahagikan kepada dua kumpulan iaitu individu amikrofilaremik dan asimptomatik manakala kumpulan kedua adalah individu mikrofilaremik yang kemudiannya amikrofilariamik dan akhirnya mengalami patologi limfatik tidak berbalik (Pani, 1998). Pada peringkat awal, individu mikrofilaremik asimptomatik mengalami tindakbalas imun di mana sitokin Th 2 menghasilkan interleukin-4, -5 dan -10 yang membolehkan mikrofilaria terus hidup (Maizel *et al.*, 1993). Kehadiran interleukin 4 telah merangsang pembiakan sel-B untuk menghasilkan antibodi IgG4 dan IgE. Antibodi IgG4 tersebut bertindak sebagai penghalang antibodi yang boleh mengurangkan aktiviti inflamatori IgE (Maizels & Lawrence, 1991).

Sebaliknya, pesakit yang mengalami filariasis limfatik peringkat kronik (elefantiasis) pula mempunyai tahap IgE, IgG1 dan IgG2 yang meningkat manakala tahap IgG4 pula menurun. Kematian larva peringkat terakhir yang diperantarai dengan IgE boleh menyebabkan terjadinya elefantiasis. Elefantiasis juga disebabkan oleh tindakbalas pasif hasil daripada kematian cacing dewasa secara semulajadi yang mencetuskan tindakbalas antibodi IgG1 dan IgG2 yang diperantarai tindakbalas inflamatori. Tindakbalas yang melampau ('hyper responses') ini mungkin boleh menyingkirkan parasit daripada sistem peredaran pada individu yang mengalami limfadema (Olszewski *et al.*, 1997).

### **1.11 Diagnosis**

Hingga kini diagnosis jangkitan filaria banyak bergantung kepada pemerhatian mikrofilaria secara langsung di dalam darah pesakit menggunakan teknik konvensional. Kaedah alternatif berdasarkan pengesanan antibodi dan antigen melalui ujian immunodiagnosis menggunakan antigen larut dan antibodi poliklon tidak sesuai kerana gagal untuk membezakan antara jangkitan aktif dan pasif. Ia juga mempunyai masalah spesifisiti kerana terdapat reaktiviti silang dengan sampel pesakit yang dijangkiti parasit saluran usus dan organisma lain. Oleh itu peningkatan kaedah pengesanan diperlukan untuk mendiagnosis filarisis limfatik.

Banyak pesakit limfatik filariasis adalah bersifat amikrofilariamik. Diagnosis jangkitan ini perlu dilakukan secara klinikal dengan sokongan daripada ujian makmal. Kebanyakan diagnosis klinikal adalah daripada sindrom esinophilia tropika (TPE) yang mempunyai jumlah serum IgE (kebanyakan lebih daripada 10000 ng/ml) dan antibodi antifilaria spesifik (IgG dan IgE). Bagi sindrom amikrofilariamik, pengesanan antibodi