

PEMBANGUNAN DAN PENILAIAN KAEDAH PCR-ELISA DALAM

PENGESANAN JANGKITAN *BRUGIA MALAYI*

Oleh

NOOR A'SHIKIN AZAHRI

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi

keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains

Januari 2001

Dedikasi istimewa khas untuk

Suami, Muhammad Zaini Mustapha

Kedua-dua bonda, Kamariah Mat Daud dan Siti Esah Saman

Kedua-dua ayahanda, Azahri Awang Teh dan Mustapha Saidina

Anakanda Muhammad Ibad Mukhlis

Serta seluruh ahli keluarga

PENGHARGAAN

Alhamdulillah.....Segala puji dan syukur kepada Allah s.w.t kerana dengan limpah rahmat dan kurniaNya, saya telah berjaya juga menyiapkan tesis ini.

Kepada penyelia saya Prof. Madya Dr. Rahmah Noordin, jutaan terima kasih diucapkan kerana telah menerima saya sebagai pelajarnya dan di atas segala tunjukajar, bantuan, nasihat dan dorongan serta sokongan yang diberikan tidak kira masa dan ketika selama ini. Tidak lupa juga kepada Dr. Ravi di atas ilmu yang dicurahkan.

Penghargaan juga ditujukan kepada En. Mehdi, En. Abdullah, Kak Nik Norliza, Ridhuan, Suharni, Cikgu Lim, Kiren, Suriati, Zahera, Hafiz, K. Na, Kak Jie, Robaiza serta seluruh kakitangan makmal yang turut membantu saya dalam kerja-kerja penyelidikan saya.

Akhir sekali, penghargaan dan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada suami, ma, ayah serta seluruh ahli keluarga di atas dorongan dan galakan serta doa mereka sepanjang tempoh pengajian saya.

Kandungan	Muka surat
Tajuk	
Dedikasi	ii
Penghargaan	iii
Senarai kandungan	iv
Senarai rajah	x
Senarai jadual	xii
Abstrak	xiv
Abstract	xvi
Bab 1 : Pengenalan	
1.1 Pengenalan kepada penyakit filariasis	1
1.2 Sejarah penemuan dan penamaan <i>Brugia malayi</i>	3
1.3 Toksonomi dan struktur morfologi <i>B. malayi</i>	3
1.4 Kitar hidup <i>B. malayi</i>	5
1.5 Transmisi <i>B. malayi</i>	7
1.6 Ciri-ciri klinikal dan patologi penyakit filariasis limfatik (Manifestasi klinikal dan patogenesis)	8
1.6.1 Amikrofilaremik asimptomatik (infeksi kriptik)	9
1.6.2 Mikrofilaremik asimptomatik	9
1.6.3 Manifestasi akut	10
1.6.4 Manifestasi kronik	10
1.6.5 Manifestasi okult	11
1.7 Diagnosis penyakit filariasis	12
1.7.1 Kaedah parasitologi (mikroskopi)	12
1.7.1.1 Filem darah tebal	12
1.7.1.2 Teknik pemekatan	13

2.1	Penyediaan reagen am	36
2.2	Sampel kajian	37
2.2.1	Sampel darah	37
2.2.1a	Pengumpulan sampel darah	38
2.2.1b	Penyediaan titik darah kering	39
2.2.1c	Penyediaan plasma	39
2.2.2	Spesis organisma perbandingan	39
2.3	Ujian mikroskopi	42
2.3.1	Analisis smir darah tebal	42
2.3.2	Analisis pemekatan Knott	43
2.4	Pengekstrakan DNA	44
2.4.1	Prosedur pengekstrakan DNA daripada sampel darah/plasma	45
2.4.2	Prosedur pengekstrakan DNA daripada titik darah kering	45
2.5	Elektroforesis gel agarosa	46
2.6	Pengesanan DNA menggunakan kaedah pemblotan Southern dan penghibridan prob	48
2.6.1	Pemblotan Southern	51
2.6.2	Penghibridan dan pengesanan prob	52
2.6.3	Kaedah pengesanan kemiluminesen	52
2.7	Brugia-ELISA	53

Bab 3 : Pembangunan format hibridisasi PCR-ELISA sebagai ujian diagnosis yang spesifik dan sensitif

3.1	Pengenalan	56
3.2	Prosedur Penyelidikan	59
3.2.1	Pemilihan primer untuk pembangunan sistem PCR	59
3.2.2	Penyediaan larutan stok kerja primer	60
3.2.3	PCR	62

3.2.3.1	Program PCR	64
3.2.3.2	Kawalan mutu PCR	64
3.2.4	Ujian optimisasi parameter PCR	65
3.2.4.1	Parameter asas tindakbalas amplifikasi PCR	66
3.2.4.2	Suhu penyepuhlindungan primer	66
3.2.4.3	Kepekatan primer	70
3.2.4.4	Kepekatan magnesium klorida (MgCl ₂)	72
3.2.4.5	Kepekatan deoksinukleotida trifosfat (dNTP)	74
3.2.4.6	Jumlah templat DNA	76
3.2.4.7	Jumlah enzim	78
3.2.5	Keputusan akhir ujian optimisasi parameter PCR	79
3.2.6	Penentuan spesifisiti primer menggunakan ujian PCR	81
3.2.7	Pembangunan kaedah PCR-ELISA	84
3.2.7.1	Pemilihan prob kajian	84
3.2.7.2	Penyediaan larutan stok kerja prob	85
3.2.7.3	Pengesanan produk PCR yang dilabel dengan digoksinen (DIG)	85
3.2.7.4	ELISA	88
3.2.7.4a	Penyediaan sampel dan reagen	88
3.2.7.4b	Prosedur ujian ELISA	89
3.2.7.5	Ujian optimisasi kaedah PCR-ELISA	90
3.2.7.5a	Optimisasi jumlah prob	91
3.2.7.5b	Optimisasi suhu hibridisasi	94
3.2.7.5c	Optimisasi jumlah produk PCR	94
3.2.7.5d	Pemilihan penimbal basuhan	96
3.2.7.6	Keputusan akhir ujian optimisasi parameter PCR-ELISA	99
3.2.8	Pemilihan jenis sampel untuk pengekstrakan DNA	99

3.2.9	Penilaian kaedah pengekstrakan DNA daripada titik darah kering yang mempunyai nilai densiti mikrofilaria yang tinggi.	102
3.2.10	Penentuan sensitiviti dan spesifisiti PCR-ELISA	103
3.2.10.1	Penentuan sensitiviti	103
3.2.10.2	Penentuan spesifisiti	106
3.3	Perbincangan	109
Bab 4	: Perbandingan antara kaedah PCR-ELISA dengan kaedah makmal mikroskopi dan kaedah pengesanan DNA lain dalam diagnosis jangkitan <i>B. malayi</i>	
4.1	Pengenalan	117
4.2	Prosedur penyelidikan	118
4.2.1	Kaedah mikroskopi	118
4.2.2	PCR	118
4.2.2.1	Analisis produk PCR	119
4.2.2.1a	Elektroforesis gel agarosa	119
4.2.2.1b	Penghibridan Southern	119
4.2.2.1c	PCR-ELISA	120
4.3	Keputusan	121
4.3.1	Analisis nilai titik positif dalam PCR-ELISA	121
4.3.2	Penilaian kaedah PCR-ELISA sebagai ujian diagnostik	121
4.3.2.1	Penilaian kaedah PCR-ELISA berbanding kaedah lain menggunakan sampel kumpulan I	123
4.3.2.1a	Keputusan ujian penilaian sensitiviti dan spesifisiti ke atas sampel kumpulan I	124
4.3.2.2	Penilaian kaedah PCR-ELISA menggunakan sampel kumpulan II	130
4.4	Perbincangan	144

Bab 5	: Perbandingan kaedah PCR-ELISA dengan kaedah pengesanan antibodi spesifik (Brugia -ELISA) dalam diagnosis jangkitan <i>Brugia malayi</i>	
5.1	Pengenalan	152
5.2	Prosedur kajian	156
5.2.1	Populasi kajian	156
5.2.2	Brugia -ELISA	156
5.3	Keputusan	157
5.3.1	Analisis nilai titik positif	157
5.3.2	Analisis sampel kumpulan I dan kumpulan II	157
5.4	Perbincangan	171
Bab 6	: Perbincangan Am	174
	Senarai rujukan	183
	Penerbitan dan pembentangan kertas kerja	195

Rajah	Muka surat
1.1 Struktur morfologi mikrofilaria <i>B. malayi</i> (L ₀)	4
1.2 Kitar hidup <i>B. malayi</i>	6
1.3 Carta aliran PCR	25
1.4 Ringkasan perancangan kerja dalam keseluruhan kajian	35
3.1 Kedudukan set primer yang digunakan dalam kajian ini berdasarkan jujukan berulang bagi famili <i>Hha</i> I pada genom <i>B. malayi</i>	61
3.2 Hasil analisis elektroforesis ke atas produk PCR yang dijalankan menggunakan suhu penyepuhlindapan primer yang berbeza.	69
3.3 Hasil analisis elektroforesis ke atas produk PCR yang dijalankan menggunakan kepekatan primer yang berbeza.	71
3.4 Hasil analisis elektroforesis ke atas produk PCR yang dijalankan menggunakan kepekatan MgCl ₂ yang berbeza.	73
3.5 Hasil analisis elektroforesis ke atas produk PCR yang dijalankan menggunakan kepekatan dNTP yang berbeza.	75
3.6 Hasil analisis elektroforesis ke atas produk PCR yang dijalankan menggunakan jumlah templat yang berbeza.	77
3.7 Hasil analisis elektroforesis ke atas produk PCR yang dijalankan menggunakan jumlah enzim yang berbeza.	80
3.8a Hasil analisis elektroforesis dan penghibridan Southern ke atas produk PCR yang dijalankan ke atas sampel DNA daripada beberapa kultur tulen bakteria dan parasit.	82
3.8b Hasil analisis elektroforesis dan penghibridan Southern ke atas produk PCR yang dijalankan ke atas sampel DNA daripada beberapa kultur tulen bakteria dan parasit.	83
3.9 Carta aliran kerja dan ringkasan format hibridisasi PCR-ELISA	87

3.10	Keputusan ujian optimisasi jumlah prob	92
4.1	Taburan nilai densiti optik sampel kumpulan II yang diuji dengan PCR-ELISA.	143

Jadual	Muka surat
2.1 Senarai DNA organisma yang digunakan dalam kajian ini	40
3.1 Keputusan bacaan purata densiti optik PCR-ELISA yang diperolehi dalam ujian optimisasi jumlah prob	93
3.2 Keputusan bacaan purata densiti optik yang diperolehi di bawah keadaan suhu hibridisasi yang berbeza	95
3.3 Keputusan bacaan purata densiti optik apabila jumlah produk PCR yang berbeza digunakan.	97
3.4 Keputusan bacaan densiti optik bagi penggunaan penimbal basuhan yang berbeza.	98
3.5 Keputusan purata bacaan densiti optik apabila sampel positif yang disimpan dalam keadaan berbeza digunakan dalam langkah pengekstrakan DNA.	101
3.6 Keputusan bacaan densiti optik PCR-ELISA menggunakan templat DNA yang diekstrak daripada sampel darah dan titik darah kering bagi sampel yang mempunyai densiti mikrofilaria yang tinggi.	104
3.7 Keputusan PCR-ELISA dengan menggunakan jumlah templat DNA yang berbeza	105
3.8 Ringkasan keputusan yang diperolehi apabila tiga kaedah pengesanan produk amplifikasi PCR yang berbeza iaitu elektroforesis-gel agarosa, penghibridan Southern dan ELISA diaplikasikan.	107
4.1 Keputusan penuh analisis mikroskopi, PCR-gel agarosa, PCR-penghibridan Southern dan PCR-ELISA pada sampel kumpulan I.	125
4.2 Ringkasan perbandingan antara keputusan ujian PCR-ELISA, PCR-penghibridan Southern dan PCR-gel agarosa kepada kes-kes positif benar dan negatif benar.	128

4.3	Ringkasan keputusan analisis sensitiviti dan spesifisiti, bagi kaedah PCR-ELISA, PCR-penghibridan Southern dan PCR-gel agarosa menggunakan sampel kumpulan I.	129
4.4	Keputusan penuh ujian mikroskopi, PCR-ELISA, PCR-penghibridan Southern dan PCR-gel agarosa ke atas sampel kumpulan II.	132
4.5	Ringkasan keputusan pengesanan kes jangkitan <i>B. malayi</i> dengan menggunakan kaedah mikroskopi, PCR-gel agarosa, PCR-penghibridan Southern dan PCR-ELISA ke atas sampel kumpulan II.	140
4.6	Ringkasan jumlah sampel yang dikesan positif dengan empat jenis analisis pengesanan yang berbeza ke atas 194 sampel kumpulan II.	142
5.1	Ringkasan keputusan analisis statistik terhadap ujian Brugia-ELISA	155
5.2	Ringkasan perbandingan keputusan penuh ujian PCR-ELISA dan Brugia-ELISA bagi sampel kumpulan I.	159
5.3	Ringkasan perbandingan keputusan penuh ujian PCR-ELISA dan Brugia-ELISA bagi sampel kumpulan II.	162

Penyakit filariasis limfatik yang juga dikenali sebagai "penyakit orang miskin" merupakan penyakit yang boleh menyebabkan kerosakan dan kecacatan fizikal yang teruk serta masalah ketidakupayaan serius atau ketidakupayaan dalam jangkamasa yang panjang. Di Malaysia, filariasis limfatik yang disebabkan oleh *Brugia malayi* masih endemik di kawasan pedalaman di sesetengah negeri. Diagnosis makmal yang rutin bagi penyakit filariasis brugia iaitu ujian mikroskopi adalah tidak sensitif, merumitkan dan mengambil masa yang lama. Oleh itu satu kaedah pengesanan yang lebih tepat dan cekap amat diperlukan. Laporan tesis ini membincangkan pembangunan asai tindakbalas rantaian polimerase (PCR) berasaskan kepada asai imunosorben untaian enzim (ELISA) untuk mengesan jangkitan *B. malayi*. Kajian ini juga bertujuan untuk menilai kesesuaian primer dan prob yang telah dilaporkan bagi pengesanan jangkitan di kawasan endemik rendah. Kajian lanjutan telah dijalankan untuk menilai kaedah PCR-ELISA yang telah dibangunkan dengan membandingkannya dengan kaedah mikroskopi, PCR-penghibridan Southern dan PCR-gel agarosa dan kaedah yang berasaskan pengesanan antibodi spesifik (Brugia-ELISA).

Dalam kaedah PCR-ELISA, produk PCR yang telah dilabel secara langsung dengan DIG semasa proses PCR, telah dihibridisasikan dengan prob yang berlabel biotin. Ini diikuti dengan pengeraman hibrid tersebut di dalam telaga plat mikrotiter yang dilapisi streptavidin dan seterusnya pengesanan menggunakan anti-digoksinen-peroksidase dan ABTSTM [2,2'-azinobis (3-ethylbenthiazoline-6-sulphonic acid)]. Dalam ujian penilaian, sampel darah daripada 252 subjek telah diuji: 58 sampel kumpulan I dan 194 sampel Kumpulan II (sampel daripada kawasan endemik rendah iaitu Gua Musang,

Kelantan). Kesemua sampel telah diuji dengan kaedah mikroskopi (ujian piawaian emas), PCR-ELISA, penghibridan Southern dan PCR-gel agarosa. Bagi sampel kumpulan I, kaedah PCR-ELISA, penghibridan Southern dan PCR-gel agarosa telah menunjukkan kadar 100% dalam penentuan kedua-dua parameter iaitu sensitiviti dan spesifisiti. Bagi sampel kumpulan II pula, kedua-dua sampel mikrofilaremik dan 17 sampel amikrofilaremik adalah positif dengan ketiga-tiga kaedah pengesanan produk PCR tersebut. Disamping itu, 5 sampel lagi yang amikrofilaremik hanya dikesan positif dengan PCR-ELISA sahaja. Kadar prevalen kes jangkitan *B. malayi* yang dikesan oleh PCR-ELISA ialah 12.37%, PCR-penghibridan Southern ialah 9.79%, PCR-gel agarosa ialah 9.79% dan kaedah mikroskopi ialah 1.03%. Kajian perbandingan antara kaedah PCR-ELISA dengan ujian Brugia-ELISA menunjukkan korelasi 100% bagi kesemua sampel kumpulan I dan sampel kumpulan II. Ini menunjukkan tahap sensitiviti dan spesifisiti yang sama dikesan antara kaedah PCR-ELISA dan Brugia-ELISA. Kesimpulannya, PCR-ELISA yang dibangunkan adalah satu kaedah yang amat spesifik, sensitif, pantas, cekap dan sangat sesuai diaplikasikan sebagai kaedah diagnosis yang baik bagi pengesanan jangkitan *B. malayi*.

infection

Abstract

Lymphatic filariasis, a disease of the poor can lead to serious physical damage and permanent or long-term disability. In Malaysia, lymphatic filariasis caused by *Brugia malayi* is still endemic in several parts of the country. Routine laboratory diagnosis of brugian filariasis based on microscopy examination of stained thick blood smears lacks sensitivity and time consuming, thus the development of a more sensitive and rapid diagnosis is highly desirable. In this report, a polymerase chain reaction assay based on the enzym-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) has been developed to detect *B. malayi* infection. In addition, this study was also aimed at testing the suitability of the published primers and probe for the detection of the infection in an area of low endemicity for brugian filariasis. The evaluation of the developed PCR-ELISA techniques was performed by comparing the test with other diagnostic techniques i.e. microscopy, PCR-Southern hybridization and PCR-agarose gel) and specific antibody detection test (Brugia-ELISA).

In the PCR-ELISA, digoxigenin-labelled PCR product was hybridized to a biotin-labelled probe. This was followed by incubation in streptavidin-coated microtitre wells and detection using anti-digoxigenin-peroxidase and ABTSTM [2,2'-azinobis (3-ethylbenthiiazoline-6-sulphonic acid). In the evaluation studies, blood samples from 252 subjects were tested: 58 group I samples and 194 group II samples (from low endemic area Gua Musang, Kelantan). Samples were examined by microscopy (as a gold

standard), PCR-ELISA, PCR-Southern hybridization and PCR-agarose gel. For group I samples, PCR-ELISA, PCR-Southern hybridization and PCR-agarose gel showed 100% rates for the two parameters i.e. sensitivity and specificity. For group II samples, the 2 microfilaraemic and 17 amicrofilaraemic samples were positive by all the three PCR product detection tests. An additional 5 samples were positive by PCR-ELISA only. The prevalence rate of *B. malayi* infection in the low endemic area detected by PCR-ELISA was 12.37%, PCR-Southern hybridization 9.79%, PCR-agarose gel 9.79% and microscopy examination 1.03%. Comparison with Brugia-ELISA showed 100% correlation for both Group I and group II samples. The PCR-ELISA test developed was thus found to be highly specific, sensitive, rapid and very suitable to be used as a good diagnostic tool for diagnosis of *B. malayi* infection.

PENGENALAN

1.1 Pengenalan kepada penyakit filariasis

Penyakit filariasis merupakan penyakit tropika yang tersebar luas dan disebabkan oleh sekumpulan parasit filaria. Lapan jenis spesis yang menjangkiti manusia secara semulajadi telah dikenalpasti iaitu *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *Mansonella ozzardi* dan *Mansonella perstans*. Jangkitan parasit tersebut menyebabkan lesi terutama pada sistem limfatik, mata dan kulit pada manusia (Ottesen, 1987).

W. bancrofti, *B. malayi* dan *B. timori* adalah tiga spesis yang menyebabkan penyakit filariasis limfatik pada manusia (Striebel, 1986). Penyakit ini sering diabaikan dan oleh kerana ianya lebih predominan di kalangan komuniti yang mundur, ia dikenali juga sebagai "penyakit orang miskin".

Filariasis limfatik menular di kawasan tropika dan subtropika iaitu di negara-negara Asia, Afrika, Pasifik Barat dan di sebahagian negara Amerika. Taburan dan transmisi penyakit ini berkait rapat dengan status sosioekonomi populasi di kawasan endemik. Dianggarkan seramai lebih daripada 1.1 ribu juta populasi penduduk yang juga merupakan 20% daripada jumlah penduduk dunia tinggal di kawasan yang berisiko tinggi untuk dijangkiti oleh filariasis limfatik. Seramai 119.1 juta individu telah mengalami jangkitan filariasis limfatik. Daripada jumlah tersebut, seramai 106.2 juta

mencatatkan angka seramai 12.9 juta (WHO, 1994).

Walaupun penyakit filariasis limfatik bukan sejenis penyakit yang membawa maut atau yang menyebabkan epidemik yang membahayakan tetapi ia boleh menyebabkan kerosakan dan kecacatan fizikal yang teruk serta kehilangan upaya yang serius (Busvine, 1993).

Filariasis limfatik dianggap sebagai penghalang utama kepada perkembangan dan pembangunan sosioekonomi kerana penyakit ini lebih prevalen di kalangan kaum muda dan populasi yang aktif bekerja dibandingkan dengan kanak-kanak dan orang tua. Dalam tahun 1995, filariasis limfatik telah dikenalpasti sebagai punca penyebab kedua utama kepada ketidakupayaan serius yang kekal atau ketidakupayaan dalam jangka masa yang panjang serta menyebabkan kehilangan peluang pekerjaan, stigmatisasi dan pengasingan diri pada pesakit (WHO, 1997). Di Ghana Utara, tempoh masa kerja yang digunakan oleh pesakit yang menghidapi jangkitan filariasis limfatik kronik dilaporkan berkurangan sebanyak 10-60%. Dianggarkan lebih kurang 1.5% daripada tenaga buruh wanita dan lebih daripada 7% tenaga buruh lelaki tidak dapat digunakan akibat daripada jangkitan kronik ini (WHO, 1997).

Di Malaysia, filariasis limfatik yang disebabkan oleh *B. malayi* masih endemik di beberapa buah negeri terutama di kawasan pedalaman negeri Sabah, Sarawak, Terengganu, Kelantan, Pahang, Selangor dan Perak. Kemasukan pekerja asing daripada negara jiran yang semakin bertambah sejak kebelakangan ini boleh mengakibatkan peningkatan dalam insiden penyakit ini (Rahmah *et al.*, 1997).

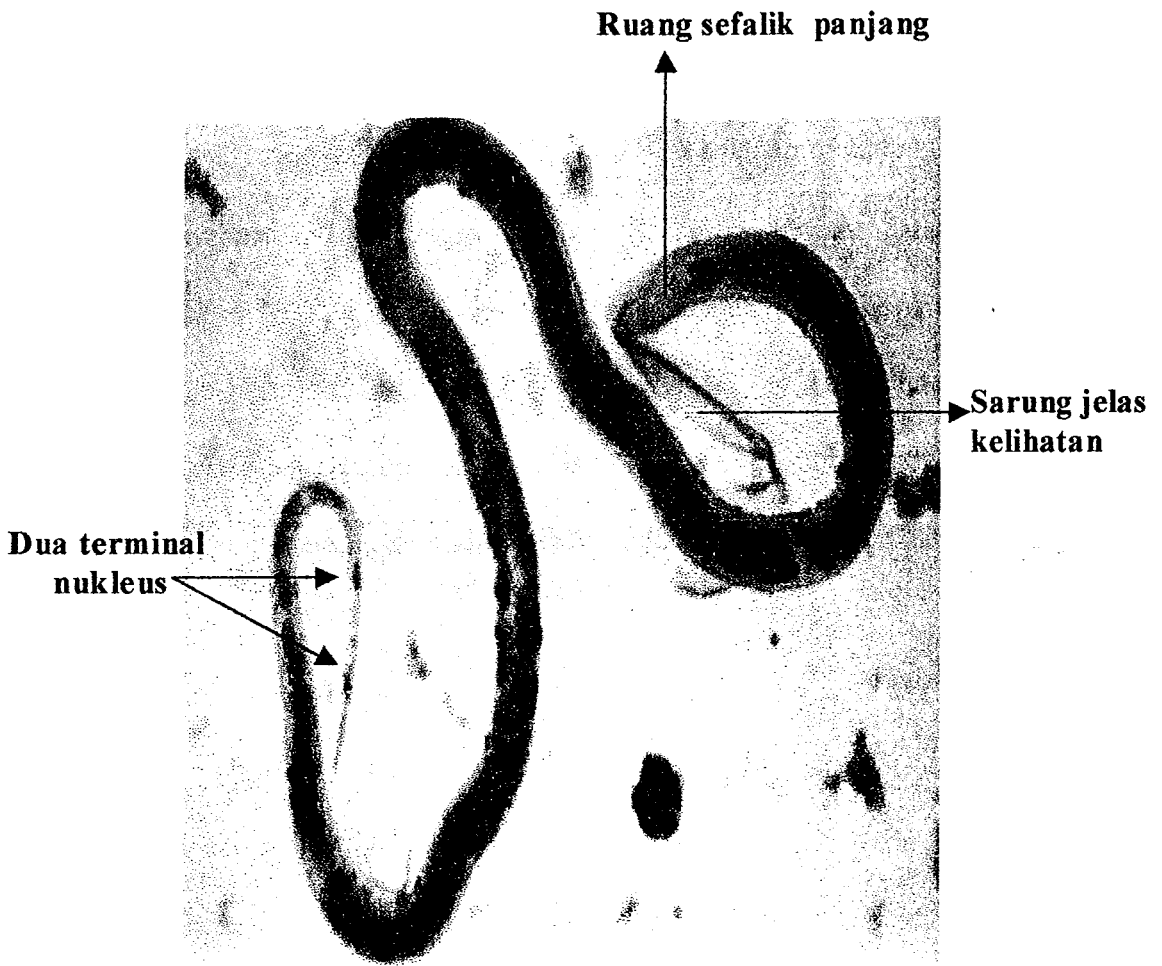
Walaupun bagaimanapun, kemajuan telah dicapai dalam kaedah diagnosis, keberkesanan rawatan dan kawalan serta kejayaan dalam beberapa strategi program kawalan yang telah dijalankan terhadap penyakit filariasis limfatik. Dengan itu penyakit ini telah dikenal pasti oleh Badan Antarabangsa bagi Pembasmian Penyakit ("International Task Force for Disease Eradication") sebagai salah satu daripada enam penyakit berjangkit yang boleh atau berpotensi untuk dibasmikan (CDC, 1993).

1.2 Sejarah penemuan dan penamaan *B. malayi*

Mikrofilaria *B. malayi* telah pertama kali dijumpai oleh S.L. Brug di dalam filem darah orang asli di Indonesia pada tahun 1927. Brug menganggap ianya sebagai spesis baru dan menamakannya sebagai *Filaria malayi*, kemudian ditukarkan kepada genus *Brugia* sempena nama beliau (Busvine, 1993). Ini menyusul pula dengan penemuan cacing dewasa daripada lengan seorang pesakit di India dalam tahun 1940 oleh Rao dan Mapplestone (Roberts & Janovy, 1996). Penemuan tersebut telah memberikan maklumat dan gambaran awal tentang cacing dewasa *B. malayi*.

1.3 Toksonomi dan struktur morfologi *B. malayi*

B. malayi tergolong dalam kelas Nematoda, daripada famili Filariidae dan genus *Brugia*. Rajah 1.1 menunjukkan struktur morfologi mikrofilaria *B. malayi*. Mikrofilarianya berukuran 170-260 μm panjang dan lebarnya ialah 5-6 μm . Ia berupa lingkaran berbelit dan kelihatan kusut dan mempunyai sarung luar yang lebih panjang daripada badan. Hujung anteriornya bulat, tanpa nukleus dan mempunyai dua



Rajah 1.1 : Struktur morfologi mikrofilaria *B. malayi* (L₀)

proses stilet. Ekornya menajam dengan dua nukleus terminal di ekstrimiti posteriornya (Rahman, 1993). Nukleus badan pada ekornya berlanjutan hingga ke penghujung dan dua segmen terakhirnya membengkak (Thomas, 1983).

Cacing dewasa betina berukuran 5 sm panjang x 160 μm belahan melintang, manakala cacing jantan berukuran 2.2 sm hingga 2.5 sm panjang x 90 μm dalam belahan melintang (Thomas, 1983). Cacing betina filaria adalah "ovoviviparous" iaitu pembesaran embrio berlaku di dalam badannya (Robert & Janovy, 1996). Parasit filaria ini tidak mengeluarkan telur tetapi mikrofilaria membesar di dalam membran telur uterus cacing betina yang matang, kemudian dibebaskan ke dalam saluran darah.

1.4 Kitar hidup *B. malayi*

Rajah 1.2 menunjukkan kitar hidup parasit *B. malayi*. Apabila mikrofilaria (L_0) disedut oleh vektor nyamuk, sarung mikrofilaria akan tergugur di dalam perut vektor dan larva akan menembusi dinding perut, seterusnya berpindah ke otot toraks. Ia membesar dan berubah ke peringkat larva pertama L_1 , kedua L_2 dan hinggalah ke peringkat larva ketiga L_3 . Larva infektif (L_3) bergerak keluar dari otot toraks ke labium dan muncul melalui hujung labelum semasa nyamuk menghisap darah. Selepas memasuki kulit manusia melalui luka gigitan nyamuk, L_3 berpindah ke nodus dan salur limfa dan membesar menjadi L_4 dan seterusnya cacing dewasa (L_5) (Thomas, 1983).

Mikrofilaria (L_0) boleh didapati dalam aliran darah periferi dan dalam peredaran darah atau kapilari darah pada tisu dalaman terutama di dalam paru-paru. Pada

Perkembangan daripada peringkat L_3 kepada peringkat L_4 dan L_5 , seterusnya kepada cacing dewasa jantan dan betina matang di dalam salur dan nodus limfa (3-9 bulan).

Cacing dewasa (jantan dan betina) dalam salur limfa akan mengawan

Larva infektif (L_3), memasuki salur limfa manusia menerusi luka di kulit akibat gigitan nyamuk

Cacing betina menghasilkan mikrofilaria (L_0) ke dalam aliran darah periferi

Pembesaran di dalam nyamuk daripada mikrofilaria kepada larva preinfektif L_1 , L_2 dan akhirnya kepada larva infektif L_3 dalam masa lebih kurang dua minggu

Mikrofilaria disedut oleh nyamuk betina semasa menghisap darah

(WHO,1987)

Rajah 1.2 : Kitar hidup *B. malayi*

peringkat dewasa, parasit ini akan menduduki nodus dan salur limfa, terutama di bahagian lipatan paha dan perut serta anggota bahagian bawah. Purata jangka hayat cacing dewasa adalah di antara enam hingga lapan tahun tetapi ia boleh hidup sehingga 17 tahun (Muller, 1975) dan jangka hayat selama 40 tahun juga telah dilaporkan (Murthy, 1993). Manakala jangka hayat bagi mikrofilaria adalah lebih kurang 12 bulan (WHO, 1987) dan dihasilkan oleh cacing betina dewasa yang matang dalam jangka masa/tempoh tiga hingga lima tahun.

1.5 Transmisi *B. malayi*

Jangkitan oleh *B. malayi* tersebar secara meluas di Asia Pasifik terutama di kawasan selatan China, India, Indonesia, Malaysia, Filipina, Selatan Korea, Thailand dan Vietnam. Peringkat mikrofilaria parasit ini menunjukkan periodisiti atau kekalaan dalam peredarannya di dalam darah periferi. Sebab sebenar periodisiti parasit filaria ini terjadi tidak diketahui (Rahman, 1998). Walau bagaimanapun, terdapat hipotesis yang menyatakan bahawa periodisiti yang dimanifestasikan oleh varian tertentu adalah berkait rapat dengan waktu berlakunya gigitan vektor nyamuk. Hipotesis lain pula menyatakan ia berkait dengan kepekatan oksigen (" O_2 tension") dalam darah periferi.

Bagi varian periodik nokturnal, mikrofilaria di dalam darah periferi hanya dikesan pada waktu malam. Pada waktu siang pula, mikrofilarianya bertumpu di dalam saluran darah pada bahagian tisu dalaman tubuh perumah terutama di dalam kapilari pulmonari. Varian ini biasanya membiak di kawasan paya terbuka dan di kawasan penanaman padi berhampiran pantai. *B. malayi* varian periodik nokturnal ini ditransmisikan terutamanya

oleh nyamuk daripada genus *Anopheles* dan *Mansonia*. Ia merupakan parasit dalam manusia dimana tiada jangkitan semulajadi pada haiwan dikesan.

Manakala bagi varian subperiodik nokturnal, mikrofilarianya boleh didapati dalam aliran darah periferi sepanjang masa tetapi densitinya meningkat pada waktu malam. Varian ini lazimnya boleh ditemui di kawasan paya air jernih di dalam hutan di sepanjang sungai utama. Ianya dipindahkan oleh nyamuk daripada genus *Mansonia*. Kajian terdahulu telah mendapati beberapa jenis haiwan liar dan haiwan peliharaan seperti monyet, kucing dan anjing menunjukkan jangkitan secara semulajadi bagi *B. malayi* subperiodik nokturnal (Laing *et al.*, 1960; Mak *et al.*, 1982; Mak, 1984).

Antara spesis *Brugia* yang mempunyai hubungan genetik yang rapat dengan *B. malayi* ialah *B. pahangi*. *B. pahangi* merupakan parasit filaria yang lazimnya menjangkiti haiwan liar dan haiwan peliharaan di Asia Tenggara termasuk di Malaysia (Laing *et al.*, 1960; Lim *et al.*, 1984; Palmieri *et al.*, 1985) dan spesis ini telah ditransmisikan kepada manusia secara eksperimen (Edeson *et al.*, 1960). Jangkitan secara semulajadi terhadap manusia telah dilaporkan di Kalimantan Selatan, Indonesia (Palmieri *et al.*, 1985). Walau bagaimanapun, masih tiada laporan berkenaan jangkitan *B. pahangi* pada manusia di Malaysia.

1.6 Manifestasi klinikal dan patologi penyakit filariasis limfatik

Filariasis ialah sejenis penyakit yang mempunyai pelbagai manifestasi klinikal. Pengelasan jenis jangkitan filariasis terbahagi kepada lima iaitu amikrofilaremik

asimtomatik (infeksi kriptik), mikrofilaremik asimtomatik, manifestasi akut, manifestasi kronik dan manifestasi okult.

1.6.1 Amikrofilaremik asimtomatik (Infeksi kriptik)

Tidak semua pesakit yang mendapat jangkitan filaria akan menunjukkan manifestasi klinikal dan menunjukkan kehadiran mikrofilaria di dalam peredaran darahnya. Pesakit tersebut dikatakan sedang mengalami manifestasi amikrofilaremik asimtomatik. Walau bagaimanapun, teknik limfosintigrafi berupaya mengesan struktur dan fungsi sistem limfa yang abnormal pada pesakit.

1.6.2 Mikrofilaremik asimtomatik

Mikrofilaremik asimtomatik pula dicirikan oleh kehadiran mikrofilaria di dalam darah periferi pesakit tetapi tiada manifestasi klinikal dikesan. Keadaan asimtomatik boleh berlaku selama beberapa tahun atau sepanjang hayat (Muller,1975) dan sesetengah pesakit akan menunjukkan perkembangan ke arah peringkat manifestasi akut dan peringkat kronik dengan lebih cepat (WHO, 1987). Kajian terbaru telah menunjukkan individu di dalam kategori mikrofilaremik asimtomatik ini mengalami kerosakan pada sistem limfa (Langhammer *et al.*, 1997). Selain daripada itu, kajian yang telah dilakukan di pelbagai peringkat jangkitan termasuk mikrofilaremik asimtomatik mendapati bahawa keabnormalan renal seperti proteinuria lazim dikesan pada pesakit-pesakit ini (Langhammer *et al.*,1997).

1.6.3 Manifestasi akut

Sejarah klinikal filariasis menunjukkan bahawa manifestasi akut dicirikan oleh serangan adenolimfangitis yang juga dikenali sebagai demam filaria, iaitu kesakitan dan inflamasi pada nodus dan duktus limfa yang menyerang secara berulang beriringan dengan demam, loya dan muntah. Biasanya situasi ini terjadi selepas beberapa minggu kemasukan larva ke dalam badan manusia (Thomas,1983).

1.6.4 Manifestasi kronik

Peringkat kronik biasanya bermula selepas 10 hingga 15 tahun seseorang pesakit itu dijangkiti oleh parasit filaria (Routh, 1992; Routh & Bhowmik, 1994). Pada peringkat ini, mikrofilaria tidak lagi wujud di dalam aliran darah (Routh & Bhowmik, 1994). Secara patofisiologi, penyakit filariasis di peringkat ini terbahagi kepada dua sindrom klinikal yang berbeza iaitu peringkat kronik awal dan peringkat kronik akhir.

Kewujudan cacing dewasa atau pembesaran cacing dewasa di dalam salur limfa akan menyebabkan kerosakan pada salur itu dan menghalang pengaliran cecair limfa. Ini mengakibatkan pertambahan bendalir tisu, seterusnya berlaku limfadema iaitu pembengkakan tisu subkutin yang merupakan peringkat kronik awal jangkitan ini.

Manakala manifestasi genital seperti hidrosel, iaitu pembengkakan lapisan peritoneal yang mengelilingi setiap testis merupakan salah satu daripada tanda jangkitan kronik akhir yang biasa bagi infeksi oleh *W. bancrofti* tetapi ianya amat jarang berlaku dalam jangkitan oleh *B. malayi* (WHO, 1997). Jangkitan kronik akhir oleh *B. malayi*

menyebabkan eierantiasis atau untut dan selalunya melibatkan bahagian kaki daripada lutut ke bawah (Routh & Bhowmik, 1994). Dalam elefantiasis, berlaku hiperplasia dan fibrosis pada tisu yang diserang, edemanya menjadi keras dan tidak berliang, kulit akan menjadi tebal dan berkedut-kedut serta mempunyai tumbesaran seperti kutil (Thomas, 1983). Infeksi sekunder pada kulit oleh bakteria dan fungus seringkali berlaku terutama pada pesakit yang tidak memakai alas kaki (WHO, 1997). Walau bagaimanapun, tidak semua jangkitan oleh parasit filaria akan berakhir dengan elefantiasis. Kes yang melibatkan elefantiasis berlaku dalam purata 10% daripada populasi yang dijangkiti (Brown & Neva, 1983).

1.6.5 Manifestasi okult

Tindakbalas hiperimun oleh perumah manusia terhadap mikrofilaria menyebabkan berlakunya filariasis okult. Filariasis okult terjadi apabila mikrofilaria yang dihasilkan dalam badan manusia dimusnahkan oleh tindakbalas hiperimun perumah (Neva & Ottesen, 1978). Kemusnahan mikrofilaria diramalkan sebagai penyebab kepada sindrom klinikal ini. Antara kesan yang boleh dilihat pada pesakit yang mengalaminya ialah pembesaran nodus limfa dan kerosakan sistem pernafasan. Ini berlaku kerana mikrofilaria berkumpul di dalam paru-paru menyebabkan kerosakan pada organ tersebut, hipereosinofilia dan peningkatan ketara immunoglobulin E yang spesifik dan tak-spesifik. Manifestasi ini juga dikenali sebagai sindrom Eosinofilia Pulmonari Tropika (TPE).

Pada masa kini, diagnosis yang digunakan dalam pengesanan jangkitan filariasis adalah berasaskan kepada pendekatan parasitologi, histopatologi, klinikal dan imunologi.

1.7.1 Kaedah parasitologi (Mikroskopi)

Kaedah pengesanan mikrofilaria secara mikroskopi merupakan diagnosis definitif yang mengesan kehadiran mikrofilaria dalam darah periferi. Kaedah ini adalah spesifik dan merupakan ujian piawai dalam diagnosis jangkitan filariasis limfatik, tetapi sensitivitinya yang terhad boleh memberikan anggaran prevalens jangkitan yang jauh lebih rendah daripada yang sebenar (Turner *et al.*, 1992). Selain daripada itu, kelemahan kaedah ini ialah keperluan kepada pengumpulan sampel darah pada waktu malam, ketidakupayaan mengesan pesakit yang mengalami manifestasi amikrofilaremik, pesakit yang mengalami jangkitan ringan, jangkitan satu jantina cacing sahaja dan tidak sesuai bagi diagnosis susulan terhadap pesakit yang telah di rawat. Malah, kaedah ini juga boleh menimbulkan kesukaran kepada pekerja yang kurang mahir untuk membezakan spesis mikrofilaria apabila jangkitan lebih daripada satu spesis berlaku pada masa yang sama (McCarthy *et al.*, 1996).

1.7.1.1 Filem darah tebal

Kaedah mikroskopi yang menggunakan filem darah tebal telah digunakan secara meluas bagi tinjauan lapangan. Waktu pengutipan sampel darah perlu dilakukan pada waktu yang terdekat dengan kemuncak periodisiti spesis mikrofilaria. Darah perlu diambil

antara jam 10 malam hingga 2 pagi (Munir, 1975). 00 ml darah yang diambil secara cucukan jari adalah disyorkan bagi setiap slaid. Filem darah ini diwarnakan dengan pewarna Giemsa atau hematoksilin. Pewarnaan mikrofilaria ini membolehkan kuantifikasi dan identifikasi spesifik terhadap mikrofilaria dilakukan (Mak, 1989). Jika teknik ini dijalankan dengan betul, keputusan yang didapati akan memudahkan kajian dan pemerhatian tentang ciri-ciri morfologi mikrofilaria.

1.7.1.2 Teknik pemekatan

Teknik pemekatan sampel darah juga telah digunakan untuk kaedah mikroskopi. Pendekatan ini membolehkan pengesanan terhadap jangkitan yang mempunyai mikrofilaria dalam densiti yang rendah. Ianya lebih sensitif daripada kaedah smir darah tebal tetapi masih tidak begitu sensitif untuk mendiagnosis jangkitan filariasis limfatik. Terdapat dua kaedah pemekatan sampel darah iaitu pemekatan Knott dan kaedah filtrasi/penurasan membran.

1.7.1.2a Pemekatan Knott

Pemekatan Knott merupakan teknik pemekatan yang digunakan secara meluas untuk mengesan mikrofilaria di dalam darah periferi. Dalam kaedah ini, sekurang-kurangnya satu mililiter darah vena pesakit dicampurkan dengan sepuluh kali isipadu larutan 2% formalin (dalam air). Campuran tersebut diadukkan dan dibiarkan diatas penggoncang selama lima minit untuk melisiskan sel darah merah. Supernatan dibuang selepas sampel diemparkan dan enapan yang diperolehi diperiksa secara langsung dengan

mikroskop atau enapan dikeringkan di atas slaid kaca dan diwarnakan dengan kaedah Giemsa atau hematoksilin sebelum diperiksa di bawah mikroskop.

1.7.1.2b Filtrasi/Penurasan membran

Dalam kaedah filtrasi atau penurasan membran, satu mililiter sampel darah dituras dengan membran polikarbonat yang mempunyai saiz liang 3-5 mikron. Dengan menggunakan picagari 50 ml, 10-15 ml air dilalukan menerusi membran tersebut dan diikuti dengan tekanan aliran udara untuk mengeringkan membran. Kemudian membran tersebut boleh diperiksa secara langsung di bawah mikroskop atau diwarnakan. Teknik ini lebih sensitif daripada kaedah pemekatan Knott bagi pengesanan mikrofilaria. Walau bagaimanapun, ianya memerlukan kos yang agak mahal. Oleh itu, selalunya ia hanya dijalankan ke atas kes tertentu seperti langkah penilaian ke atas rawatan yang telah dilakukan ke atas pesakit dan untuk tujuan penyelidikan.

1.7.1.3 Kuantitatif lapisan Bui (QBC)

Kaedah QBC pada asalnya dibangunkan untuk mendiagnosis penyakit malaria, tetapi ianya boleh juga digunakan untuk mendiagnosis jangkitan filariasis. Dalam kaedah ini, sampel darah dimasukkan ke dalam tiub mikrohematokrit yang mengandungi heparin, EDTA dan oren akridina yang kemudiannya diemparkan (Lim, 1993). Mikrofilaria yang terkumpul dalam lapisan bufi dilihat menggunakan mikroskopi fluoresen kerana oren akridina mewarnai DNA parasit ini. Dengan menggunakan teknik ini, dua nukleus terminal dan ruang sefalus yang panjang pada mikrofilaria *B. malayi* lebih mudah dibezakan daripada nukleus kaudal dan ruang sefalus yang pendek bagi mikrofilaria *W.*

bancrofti. Long et al. (1990) telah melaporkan tahap sensitiviti kaedah ini adalah 100% dalam mendiagnosis jangkitan *W. bancrofti* berbanding dengan kaedah smir darah tebal. Walau bagaimanapun, pendekatan ini tidak sesuai digunakan bagi mengesan pesakit elefantiasis dan pesakit yang mengalami sindrom TPE (Lim, 1993).

1.7.1.4 Ujian Mazotti

Ujian ini merupakan ujian provokatif yang dijalankan terhadap individu yang disyaki dijangkiti filariasis limfatik iaitu individu yang menunjukkan simptom jangkitan tetapi tiada mikrofilaria dikesan dalam aliran darahnya. Dalam pendekatan ini, satu dos 100 mg dietilkarbamazin sitrat (DEC) diberikan secara oral kepada pesakit tersebut dan pengambilan sampel darah dilakukan 45 minit kemudian (Russel et al., 1975). Sampel kemudiannya diuji menggunakan teknik pemekatan seperti yang telah diterangkan sebelum ini.

1.7.2 Kaedah histopatologi

Larva atau keratan cacing dewasa juga kadang-kadang boleh dijumpai di dalam spesimen patologi semasa pemeriksaan histologi dilakukan. Hirisan bersiri pada spesimen penting dilakukan untuk membantu identifikasi parasit yang betul. Parasit filaria boleh dikenalpasti dan dikelaskan kepada generiknya dan kemungkinan juga kepada spesis berdasarkan kepada saiz, kutikel dan morfologi internal dan kehadiran mikrofilaria di dalam uterus (Mak, 1989).

1.7.3 Kaedah klinikal

1.7.3.1 Ultrasound

Teknik ini melibatkan pengesanan cacing dewasa *W. bancrofti* yang hidup yang sentiasa bergerak-gerak. Dengan menggunakan prob 3.5 MHz pada salur limfatik dibahagian skrotum, sensitiviti pengesanan imej cacing tersebut menerusi kaedah ultrasound ialah 80% pada pesakit lelaki yang mikrofilariaemik (Dreyer *et al.*, 1998; Noroes, 1996). Walau bagaimanapun, teknik ini masih belum berjaya untuk diaplikasikan dalam pengesanan jangkitan *B. malayi*.

1.7.3.2 Limfosintigrafi

Limfosintigrafi menggunakan albumin atau dekstran yang dilabel dengan bahan radioaktif telah dibangunkan dan ia selamat dilakukan secara berulang ke atas pesakit. Teknik ini akan mengesan kerosakan dan keabnormalan fungsi pada sistem limfa. Kajian awal telah menunjukkan bahawa kaedah ini berjaya mengesan keabnormalan pada sistem limfa pada pesakit yang mengalami manifestasi mikrofilaria asimptomatik tetapi tidak menunjukkan sebarang tanda edema (WHO, 1992). Oleh itu, ianya berupaya untuk bertindak sebagai kaedah yang penting terutama dalam kajian epidemiologi untuk mengkaji secara terperinci morbiditi yang disebabkan oleh penyakit filariasis limfatik.

1.7.4.1. Ujian serologi (Pengesanan antibodi dan antigen)

Pelbagai ujian serologi yang menggunakan prinsip pengesanan antibodi dalam serum yang bertindakbalas dengan antigen parasit lengkap (tak-hancur) atau antigen hancur telah dibangunkan (Holliman, 1990). Namun begitu, kini masih tiada ujian serologi komersil yang boleh mengesan jangkitan filariasis brugia dalam pesakit. Ini adalah kerana masalah spesifisiti disebabkan tindakbalas silang dengan antibodi yang terhasil oleh jangkitan parasit nematod yang lain dan ketidakupayaan untuk membezakan jangkitan yang lampau dan aktif (Kagan, 1963; Hedge & Ridley, 1977).

Beberapa asai serologi telah dibangunkan untuk diagnosis imunologi penyakit filariasis limfatik termasuk ujian antibodi berpendaflour tidak langsung (IFAT), ujian hemaglutinin tidak langsung (IHAT), teknik precipitin dan asai imunosorben untai enzim (ELISA) (Lim, 1993). Ujian IHAT dan teknik precipitin amnya tidak lagi digunakan untuk mengesan jangkitan filaria kerana beberapa kajian terdahulu telah membuktikan sensitivitinya yang rendah (Kaeuffer *et al.*, 1974; Dasgupta *et al.*, 1980).

1.7.4.1a IFAT

Pelbagai peringkat antigen telah digunakan dalam teknik yang menggunakan prinsip antibodi berpendaflour ini termasuk hirisan beku cacing dewasa dan larva (Au *et al.*, 1982; Grove & Davis, 1978) serta fragmen mikrofilaria yang disonikasikan (Singh *et al.*, 1979; Sethumadhavan *et al.*, 1988). Titer pada 1:40 dan ke atas menggunakan

antigen mikrofilaria dan titer 1:8 dan ke atas dengan menggunakan antigen cacing dewasa telah dilihat pada 75% dan 60% daripada pesakit yang mempunyai ciri-ciri filariasis klinikal jangkitan *B. malayi* (Mak, 1983) dan 81.8% pada pesakit yang mengalami lesi klinikal akibat filariasis bankrofti (Sethumadhavan *et al.*, 1988). Walau bagaimanapun, teknik ini sudah tidak digunakan secara meluas pada masa kini.

1.7.4.1b ELISA

Ini merupakan satu kaedah yang telah diubah suai daripada teknik IFAT (Thomas, 1983). Dalam pengesanan kehadiran antibodi melalui teknik ELISA tak-langsung, antigen larut *B. malayi* dijerap pada matriks dan diikuti oleh pengeraman secara berturutan dengan serum pesakit (sebagai antibodi pertama), konjugat anti-immunoglobulin manusia terlabel enzim (sebagai antibodi kedua) dan diakhiri dengan pengeraman dengan substrat. Bacaan densiti optik dengan menggunakan spektrofotometer memberikan suatu penilaian yang objektif.

Kehadiran antibodi anti-filaria IgG4 telah dilaporkan sebagai penanda yang baik bagi jangkitan aktif filariasis brugia dan bankrofti (Kwan *Lim et al.*, 1990; Haarbink *et al.*, 1995; Rahmah *et al.*, 1998a). Dengan asai IgG4-ELISA, kadar kes jangkitan filariasis limfatik dilaporkan 7-17 kali lebih tinggi berbanding kaedah pengesanan mikrofilaria (Haarbink *et al.*, 1995). Manakala Rahmah *et al.* (1998a) telah melaporkan prevalen jangkitan ini adalah 4.6 kali lebih tinggi apabila kaedah IgG4-ELISA antifilaria diaplikasikan berbanding dengan kaedah smir darah tebal dan kaedah pemekatan Knott.

Ujian diagnosis serologi adalah sensitif tetapi amnya tidak spesifik kerana kecenderungan untuk berlakunya tindakbalas silang bagi pesakit yang dijangkiti oleh parasit helmin yang lain (Weil *et al.*, 1987; Rahmah *et al.*, 1997; Ottesen & Nutman, 1992). Antibodi yang bertindakbalas terhadap fosforikolin yang dihasilkan semasa jangkitan oleh pelbagai parasit lain memberikan masalah tindakbalas silang yang serius dalam asai pengesanan antibodi (Maizels *et al.*, 1987). Walau bagaimanapun, Rahmah *et al.* (1998a) telah melaporkan bahawa ujian ELISA-IgG4 anti-filaria menggunakan antigen filaria tak-tulin larut amat berguna dalam mengesan jangkitan aktif *B. malayi* jika nilai batasan positif densiti optik ("cut-off O.D") yang sesuai digunakan. Nilai ini mestilah berdasarkan O.D populasi normal dari kawasan endemik dan daripada populasi yang dijangkiti helmin tularan tanah.

Dalam kajian terbaru, antigen rekombinan *B. malayi* yang dinamakan **BmR 1** telah dihasilkan dan ujian serologi berasaskan kepada pengukuran antibodi isotip IgG4 terhadap antigen rekombinan ini telah dibangunkan (Rahmah *et al.*, 2001). Asai yang berasaskan kaedah ELISA ini dinamakan ujian *Brugia*-ELISA dan ujian ini telah menunjukkan sensitiviti dan spesifisiti yang tinggi terhadap serum pesakit yang dijangkiti *B. malayi* (Rahmah *et al.*, 2001).

1.7.4.1c Ujian pengesanan antigen

Asai pengesanan antigen merupakan teknik imunodiagnosis yang berasaskan pengesanan antigen filaria yang beredar dalam darah pesakit. Pada awalnya, Franks (1946) telah mengesan kehadiran antigen filaria yang beredar dalam serum pesakit yang dijangkiti *W. bancrofti* dan telah mencadangkan akan potensi penemuan ini dalam

pula telah membawa dimensi baru dalam usaha untuk membangunkan kaedah ujian imunologi yang sensitif dan spesifik dalam diagnosis jangkitan oleh parasit filaria pada pelbagai peringkat (Haque *et al.*, 1982; Dissanayake & Ismail, 1982).

Asai pengesanan antigen yang telah dibangunkan untuk pengesanan infeksi oleh *W. bancrofti* adalah spesifik (Weil *et al.* 1987; More & Copeman, 1990) dan berjaya mengesan protein antigen yang mempunyai epitop yang bertindakbalas dengan antibodi monoklonal Og4C3 (Chanteau *et al.*, 1994) dan AD12.1 (Ramzy *et al.*, 1994). Kit pengesanan antigen *W. bancrofti* yang menggunakan format ELISA berasaskan kepada antibodi monoklonal Og4C3 juga telah dipasarkan. Ujian ini telah digunakan secara meluas oleh komuniti para penyelidik dalam bidang ini (Chanteau *et al.*, 1994; Lammie *et al.*, 1994). Teknik ini juga berupaya mendiagnosis pesakit yang mengalami jangkitan *W. bancrofti* periodik nokturnal dalam spesimen yang dikumpul pada waktu siang dan pesakit yang mengalami jangkitan filariasis okult (Weil *et al.*, 1987; Turner *et al.*, 1992).

Kit pantas untuk pengesanan antigen *W. bancrofti* iaitu ujian kad Filariasis ICT telah dihasilkan oleh ICT Diagnostics (Balgowlah, New South Wales, Australia) berasaskan kepada antibodi monoklonal AD12.1 (Weil *et al.*, 1987 & 1997). Ujian ini mengesan antigen *W. bancrofti* larut yang beredaran di dalam darah individu yang dijangkiti dan telah terbukti sebagai ujian yang sensitif dan spesifik (Weil & Liffis, 1987). Walau bagaimana pun, ujian pengesanan antigen yang spesifik dan sensitif masih belum dilaporkan bagi jangkitan oleh *B. malayi*.

1.7.4.2 Ujian kulit alergi (AST)

Ini merupakan ujian berasaskan tindakbalas hipersensitiviti segera. Ujian ini menggunakan antigen yang disediakan daripada *Dirofilaria immitis* iaitu parasit filaria yang diperolehi daripada anjing (Manson-Bahr & Apted, 1982). Larutan antigen disuntik pada permukaan volar lengan pesakit. Larutan salin dengan jumlah isipadu sama dengan antigen tersebut disuntik ke bawah daripada suntikan antigen sebagai tindakbalas kawalan. Keputusan diambil selepas 15 minit dengan melihat indurasi atau pengerasan yang berlaku di kawasan suntikan. Saiz indurasi yang mempunyai nisbah pembesaran dua atau lebih berbanding dengan kawalan dikira sebagai positif (Agarwal *et al.*, 1987).

Grove *et al.* (1977) telah menjalankan ujian penilaian perbandingan ke atas penggunaan antigen *D. immitis* dan *B. malayi* varian subperiodik bagi kaedah ujian intradermal. Keputusan yang diperolehi menunjukkan penggunaan antigen *B. malayi* subperiodik adalah lebih sensitif dan keputusan positif palsu yang diperolehi adalah lebih rendah.

1.7.5 Kaedah pengesanan biologi molekul

Perkembangan yang semakin maju di dalam bidang biologi molekul telah membolehkannya diaplikasikan dalam penghasilan beberapa kaedah pengesanan penyakit bawaan parasit termasuklah penyakit filariasis limfatik. Kaedah ini termasuklah asai penghibridan prob DNA dan tindakbalas rantai polimerase (PCR).

1.7.5.1 Asai penghibridan prob DNA

Asid deoksiribonukleik (DNA) merupakan pengkalan molekul kepada maklumat genetik bagi setiap organisma hidup. Oleh itu, kehadiran sesuatu organisma boleh dikenalpasti dengan mengesan jujukan DNA yang spesifik terhadapnya.

Satu daripada kaedah pengesanan jujukan DNA ialah analisis penghibridan DNA.

Prinsip bagi analisis penghibridan DNA adalah bebenang tunggal molekul DNA yang diketahui jujukannya (dikenali sebagai prob) dihibridkan dengan bebenang kedua (DNA sasaran) yang mempunyai jujukan yang berkomplementari dengannya. Kaedah penghibridan adalah sensitif yang mana ia berupaya mengesan gen salinan tunggal pada genom yang kompleks. Dalam pendekatan ini, DNA yang disekatgerakkan pada membran dinyahaslikan dan penghibridan spesifik antara prob DNA iaitu fragmen DNA yang mempunyai jujukan berpelengkap dengan DNA sasaran dilakukan. Prob DNA tersebut dilabel sama ada dengan bahan radio aktif/radioisotop seperti tritium (^3H) dan isotop fosforus-32 (^{32}P) atau bahan bukan radioaktif (seperti biotin) untuk membolehkan langkah pengesanan dijalankan.

Langkah penghibridan dijalankan susulan kepada teknik pemblotan Southern atau pemblotan dot atau slot. E.M Southern (1975) telah memperkenalkan kaedah analisis DNA yang dikenali sebagai teknik pemblotan Southern. Ianya melibatkan elektroforesis DNA pada gel untuk memisahkan DNA kepada pelbagai fragmen mengikut saiz molekul, diikuti dengan pemindahan DNA tersebut ke atas membran secara kaedah tarikan kapilari atau menggunakan pam vakum. Penghibridan yang dijalankan membolehkan pengecaman ke atas jalur DNA yang berhomologi dengan prob. Pada

masa ini, teknik pemblotan Southern dan penghibridan asid nukleik, atau juga dipanggil penghibridan Southern telah digunakan dalam makmal dengan meluas bagi mendiagnosis sesuatu penyakit. Kaedah ini bertujuan untuk mengenalpasti atau mengesan kehadiran fragmen DNA yang spesifik dalam sesuatu spesimen.

Manakala kaedah pemblotan titik (dot blot) atau pemblotan slot telah dibangunkan oleh Kafatos *et al.* (1979). Dalam prosedur ini, alikuot sampel dalam jumlah yang kecil dititikkan ke atas membran dan dikeringkan sebelum langkah penghibridan DNA seperti di atas dijalankan.

Prob DNA biasanya ialah oligonukleotida pendek yang disintesis secara kimia tetapi kebanyakannya adalah fragmen DNA yang diklon daripada genom asal. Prob DNA yang diklonkan telah digunakan untuk pengecaman pelbagai patogen pada manusia termasuk virus (Flores *et al.*, 1983), bakteria (Hill *et al.*, 1985; Moseley *et al.*, 1982; Totten *et al.*, 1983) dan parasit eukariot (McReynolds *et al.*, 1986). Prob DNA yang spesifik telah dibina bagi parasit filaria *B. malayi* (Sim *et al.*, 1986; McReynolds *et al.*, 1986).

1.7.5.2 Tindakbalas rantai Polimerase (PCR)

Kary Mullis telah membangunkan PCR, teknik biologi molekul yang berupaya untuk menggandakan gen yang dikehendaki daripada genom DNA (Mullis & Faloona, 1987; Mullis *et al.*, 1986). Teknik *in vitro* ini mempunyai spesifisiti dan sensitiviti yang amat tinggi untuk menggandakan atau mengamplifikasikan jujukan DNA atau RNA yang spesifik. Ia berupaya mengamplifikasikan jujukan sasaran sehingga 10^5 - 10^6 kali ganda

dari pada templat DNA dan pada jujukan tidak relevan yang besar (contohnya daripada keseluruhan genom DNA).

Rajah 1.3 menunjukkan carta aliran asas PCR. Kaedah ini melibatkan bebenang ganda dua DNA tertentu atau genom DNA sebagai templat, dua primer oligonukleotida, campuran deoksinukleotida fosfat (dNTP) dan enzim polimerase *Taq*. Proses di dalam PCR melibatkan beberapa siri ulangan kitaran bagi langkah pemanasan untuk menyahaslikan bebenang ganda dua DNA, diikuti dengan penyepuhlindapan primer dengan jujukan yang berkomplimentari dengannya disisi DNA sasaran. Kemudian enzim *Taq* akan memangkinkan pemanjangan pada primer tersebut. Mekanisme ini akan menghasilkan akumulasi eksponen fragmen DNA yang spesifik.

Produk PCR yang diperolehi pada akhir tindakbalas boleh dianalisis dengan menjalankan elektroforesis dan pewarnaan gel agarosa dengan etidium bromida atau pemblotan Southern yang diikuti dengan teknik penghibridan atau dengan format hibridisasi PCR-ELISA. PCR-ELISA merupakan prosedur immunoasai plat mikrotiter yang berasaskan kepada pengesanan produk amplifikasi PCR yang dilabel. Prinsip kaedah PCR-ELISA ini akan diterangkan selanjutnya di dalam Bab 3.