

**rTES-30USM : PENGKLONAN MENERUSI PCR HIMPUNAN,  
EKSPRESI DAN PENILAIAN PENGGUNAANNYA DALAM  
UJIAN IgG4-ELISA BAGI MENGESAN JANGKITAN  
TOKSOKARA**

oleh

**NORHAIDA BINTI CHE AZMI**

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

Oktober 2008

## DEDIKASI

**Sekalung Budi dan Terima Kasih teristimewa buat**

Ayah dan Ibu

Abang, Kakak, adik-adik dan;

Suami Mohd Azuan dan

anak tercinta Nurnisa Saffiya Khadeeja

kerana memberi sokongan, peluang dan semangat dalam meneruskan pengajian dan melengkapkan penyelidikan Sarjana ini.

Semoga Allah S.W.T dapat membalas budi baik kalian semua.

Terima Kasih

## PENGHARGAAN

### *Dengan Nama Allah Yang Maha Pemurah Lagi Maha Penyayang*

**Alhamdulillah**, dengan limpah kurnia dan izinNya, kerja-kerja penyelidikan saya berjaya disiapkan. Kejayaan ini tidak akan dicapai tanpa bantuan dan sokongan daripada semua pihak yang berada di sekeliling saya.

Pertamanya, ingin saya merakamkan jutaan penghargaan yang tak terhingga kepada penyelia saya Profesor Rahmah Noordin yang telah banyak memberi sokongan moral samada dari segi fizikal dan mental, idea yang bernas, tunjuk ajar, panduan dan nasihat yang berguna bersama-sama saya di sepanjang tempoh pengajian penyelidikan dan penulisan tesis ini. Saya cukup berbangga menjadi pelajar beliau dan sebahagian daripada kumpulan penyelidikan di Institut Penyelidikan Perubatan Molekul (INFORMM) yang merupakan salah sebuah institusi penyelidikan yang terbaik di Universiti Sains Malaysia ini.

Saya juga ingin merangkapkan ucapan terima kasih kepada semua pensyarah INFORMM yang membantu secara langsung atau tidak langsung dalam menyiapkan penyelidikan ini. Terima kasih juga kepada semua staf dan kakitangan makmal penyelidikan INFORMM Kampus Kesihatan dan Pulau Pinang. Ucapan terima kasih juga kepada orang perseorangan di Jabatan Mikrobiologi dan Parasitologi serta Makmal Biologi Molekul, Pusat Pengajian Sains Kesihatan, USM.

Jutaan terima kasih kepada rakan-rakan yang turut membantu dalam projek penyelidikan ini sama ada yang masih berada di sini atau yang telah meninggalkan bidang penyelidikan ini terutamanya Dr. Mohd Sarhan, Kak Suharni, Kak Shikin, Kak Na, Kak Nurul, Kak Azni, Kak Suriati, Kak Nor, Hafiz, Yatie, Zia, Nana, Kak Ida dan staf makmal Prof. Madya Dr. M. Ravichandran.

Penghargaan juga diberikan kepada pihak yang membiayai pengajian saya selama dua tahun iaitu Kementerian Sains Teknologi dan Inovasi (MOSTI) di atas anugerah biasiswa "National Science Fellowship, NSF". Projek penyelidikan ini juga dibiayai oleh geran penyelidikan IRPA RM 8 No. 06-02-05-4261EA019 (Acc. No.305.CIPPM.612212).

# SENARAI KANDUNGAN

## MUKA SURAT

Tajuk	
Dedikasi	ii
Penghargaan	iii
Senarai kandungan	v
Senarai rajah	xiv
Senarai jadual	xvii
Senarai lampiran	xix
Senarai singkatan dan simbol	xx
Abstrak	xxiii
Abstract	xxv

## BAB 1 PENGENALAN

1.1 Penyakit toksokariasis	1
1.2 Sejarah dan perkembangan penyakit toksokariasis	2
1.3 Parasit <i>Toxocara canis</i>	2
1.3.1 Ciri morfologi umum	3
1.3.2 Kitar hidup	6
1.3.2.1 Transmisi secara langsung	6
1.3.2.2 Ingesi perumah paratenik	7
1.3.2.3 Pergerakan larva melalui uterus (transuterine)	7
1.3.2.4 Pergerakan larva daripada tisu mamari	7
1.4 Patogenesis dan penyebaran penyakit toksokariasis	8
1.5 Manifestasi klinikal toksokariasis	12

1.6	Seroprevalens global toksokariasis	13
1.7	Diagnosis toksokariasis	
1.7.1	Diagnosis penyakit VLM	16
1.7.2	Diagnosis penyakit OLM	23
1.8	Rawatan jangkitan toksokariasis	24
1.9	Pencegahan jangkitan toksokariasis	25
1.10	Antigen rekombinan kumuhan-rembesan <i>Toxocara</i> “ <i>Toxocara excretory-secretory</i> ”, TES	26
1.11	Pernyataan permasalahan toksokariasis di Malaysia	28
1.12	Matlamat dan perancangan kajian	30
1.13	Ringkasan carta alir keseluruhan projek	31

## **BAB 2 BAHAN DAN KAEDAH**

2.1	Strain <i>Escherichia coli</i> , <i>E. coli</i>	32
2.2	Penyediaan media	32
2.2.1	Kaldu Luria Bertani	32
2.2.2	Agar Luria Bertani	32
2.2.3	Kaldu Terrific	33
2.3	Penyediaan larutan dan penampan	
2.3.1	Stok antibiotik ampisilin (50 mg/ml)	33
2.3.2	5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktofiranosida (X-gal)	33
2.3.3	Larutan 1 M HCl	34
2.3.4	Larutan 3 M NaOH	34
2.3.5	Etanol 70%	34
2.3.6	Larutan bagi penyediaan sel kompeten <i>E. coli</i>	
2.3.6.1	Larutan 100 mM MgCl <sub>2</sub>	34

2.3.6.2	Larutan 100 mM CaCl <sub>2</sub>	35
2.3.7	Larutan dan penampakan bagi penyediaan gel dan elektroforesis agarosa	
2.3.7.1	Larutan 0.5 M EDTA	35
2.3.7.2	Larutan penanda DNA	35
2.3.7.3	Larutan penampakan muatan	35
2.3.7.4	Larutan etidium bromida	36
2.3.7.5	Penampakan Tris Borat EDTA (TBE), 5X	36
2.3.8	Larutan dan penampakan bagi penghasilan dan penulenan protein rekombinan	
2.3.8.1	Larutan isopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranosida, IPTG (800 mM)	36
2.3.8.2	Larutan garam "salt solution"	36
2.3.8.3	Larutan DNase I (stok 2500 $\mu$ g/ml)	37
2.3.8.4	Larutan perencat protease	37
2.3.8.5	Larutan lisozim (10 mg/ml)	37
2.3.8.6	Penampakan salin fosfat (PBS)	38
2.3.8.7	Larutan 1 M imidazol	38
2.3.8.8	Penampakan lisis	38
2.3.8.9	Penampakan basuhan	
2.3.8.9.1	Penampakan basuhan I (20 mM)	39
2.3.8.9.2	Penampakan basuhan II (30 mM)	39
2.3.8.9.3	Penampakan basuhan III (40 mM)	39
2.3.8.10	Penampakan elusi	40
2.3.8.11	Serum albumin bovin, BSA (1000 $\mu$ g/ml)	40
2.3.9	Larutan dan penampakan untuk elektroforesis natrium dodesil sulfat–gel poliakrilamida, "SDS-PAGE"	
2.3.9.1	Ammonium persulfat (20%)	40
2.3.9.2	Pewarna biru Coomasie Brilliant Blue <sup>TM</sup>	40

2.3.9.3	Larutan penyahwarnaan	41
2.3.9.4	Penampian sampel	41
2.3.9.5	Penampian pemisah	41
2.3.9.6	Penampian penyusun	42
2.3.9.7	Penampian larian	42
2.3.9.8	Penanda protein molekul rendah	42
2.3.10	Larutan dan penampian untuk pembloatan Western	
2.3.10.1	Pewarna Ponceau'S	42
2.3.10.2	Pewarna Amido hitam	43
2.3.10.3	Penampian Tris salin, pH 7.5 (TBS)	43
2.3.10.4	Penampian basuhan TBS-Tween (TBST)	43
2.3.10.5	Penampian pemindah Towbin	43
2.3.10.6	Penampian pemblokian	44
2.3.11	Larutan dan penampian untuk asai untaian enzim imunosorben (ELISA)	
2.3.11.1	Penampian jerapan bikarbonat (0.02 M)	44
2.3.11.2	Penampian basuhan PBS-Tween (PBST)	44
2.3.11.3	Penampian pemblokian	44
2.3.11.4	Substrat 2'2'-azino-di-[3-etilbentiazolina sulfonat], ABTS	45
2.4	Kaedah umum	
2.4.1	Penyediaan gel agarosa	46
2.4.2	Elektroforesis gel agarosa dan pemerhatian hasil akhir elektroforesis	46
2.4.3	Penyediaan sel bakteria kompeten <i>E. coli</i>	47
2.4.4	Transformasi DNA ke dalam sel bakteria kompeten <i>E. coli</i>	48
2.4.5	Penyediaan DNA plasmid skala kecil	49



2.4.6	Penulenan DNA	50
2.4.7	Penentuan kepekatan DNA	51
2.4.8	Penyaringan koloni positif menggunakan kaedah PCR	51
2.4.9	Penyimpanan stok gliserol <i>E. coli</i>	51
2.5	Penghasilan nukleotida sintetik TES-30	52
2.5.1	Penyediaan larutan stok kerja oligonucleotida untuk PCR himpunan	53
2.6	Teknik PCR himpunan ke atas gen TES-30	57
2.7	Pengklonan himpunan gen TES-30	57
2.7.1	Optimisasi PCR himpunan peringkat pertama	59
2.8	Amplifikasi gen terhimpun	59
2.8.1	Optimisasi amplifikasi gen terhimpun	60
2.9	Pengklonan fragmen DNA ke dalam vektor pengklonan PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	60
2.10	Penjujukan plasmid dan penganalisaan jujukan DNA	61
2.11	Pembetulan nukleotida melalui <i>in vitro</i> "site-directed mutagenesis"	64
2.11.1	Sintesis primer mutan	64
2.11.2	Mutagenesis "Site-directed" berasaskan PCR	64
2.12	Pengklonan selitan DNA ke dalam vektor ekspresi pPROEX <sup>™</sup> HTc	66
2.12.1	Pencernaan berganda DNA plasmid TES-30USM dan vektor ekspresi pPROEX <sup>™</sup> HTc	67
2.12.2	Penulenan DNA plasmid TES-30USM	68
2.12.3	Ligasi DNA	70
2.13	Ekspresi protein rekombinan TES-30USM (rTES-30USM)	
2.13.1	Prosedur ekspresi protein rTES-30USM	72

2.13.2	Optimisasi parameter dalam ekspresi protein rTES-30USM	72
2.14	Sonikasi pelet	73
2.15	Penulenan protein rTES-30USM melalui kaedah kromatografi afiniti	
2.15.1	Pembasuhan resin Ni-NTA 'superflow'	75
2.15.2	Proses penulenan rTES-30USM dan penyediaan kolum kromatografi afiniti	75
2.16	Pemekatan antigen rTES-30USM	76
2.17	Analisis rTES-30USM melalui kaedah elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamida (SDS-PAGE)	77
2.17.1	Penyediaan gel pemisah (15%) SDS-PAGE Mini Protean II	77
2.17.2	Penyediaan gel penyusun (4.5%) SDS-PAGE Mini Protean II	77
2.17.3	SDS-PAGE	78
2.18	Pemblotan Western	78
2.18.1	Pemindahan protein rTES-30USM daripada gel ke atas Membran NCP melalui kaedah separa-kering	79
2.18.2	Pengesanan kehadiran dan antigenisiti protein rTES-30USM	
2.18.2.1	Pengesanan kehadiran protein rTES-30USM menggunakan anti-histidin	80
2.18.2.2	Pengesanan antigenisiti protein rTES-30USM menggunakan serum	82
2.19	Ujian IgG4 asai immunosorben untaian enzim tak-langsung (IgG4-ELISA) menggunakan antigen rTES-30USM	83
2.19.1	Penjerapan antigen rTES-30USM pada plat mikrotiter ELISA	83
2.19.2	Prosedur am IgG4-ELISA menggunakan rTES-30USM	83
2.19.3	Optimisasi parameter IgG4-ELISA	
2.19.3.1	Optimisasi kepekatan antigen rTES-30USM	84
2.19.3.2	Optimisasi pencairan sampel	85

2.19.3.3	Optimisasi larutan pencair dan larutan pemblok	85
2.19.3.4	Optimisasi pencairan monoklon anti-manusia IgG4-HRP	85
2.20	Sampel serum	87
2.21	Penentuan nilai batasan titik ("cut-off value", COV), sensitiviti dan spesifisiti	88
2.22	Kit Toxocara IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium)	
2.22.1	Prinsip ujian	89
2.22.2	Penentuan nilai COV	90

### **BAB 3 KEPUTUSAN**

3.1	PCR himpunan gen TES-30	
3.1.1	Optimisasi PCR himpunan peringkat pertama	91
3.2	Amplifikasi gen terhimpun	95
3.3	Pengklonan gen TES-30 ke dalam vektor pengklonan PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	99
3.4	Persediaan plasmid rekombinan TES-30 PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	101
3.5	Hasil jujukan DNA gen TES-30 di dalam vektor PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	103
3.6	Proses pembetulan bes mutasi menggunakan kaedah mutagenesis "site directed" <i>in vitro</i>	
3.6.1	Pembetulan mutasi delesi bes pertama	104
3.6.1.1	Pencirian plasmid selepas mutasi peringkat pertama	106
3.6.2	Pembetulan mutasi delesi bes kedua	107
3.6.2.1	Pencirian plasmid selepas mutasi peringkat kedua	109
3.6.3	Pembetulan mutasi delesi bes ketiga	110
3.6.3.1	Pencirian plasmid selepas mutasi peringkat kedua	112
3.7	Hasil jujukan DNA selepas proses pembetulan nukleotida	114
3.8	Hasil proses pencernaan berganda selitan DNA TES-30 dan vector ekspresi pPROEX <sup>™</sup> HTc	115

3.9	Penyaringan rekombinan TES-30 di dalam vektor ekspresi pPROEX™HTc	116
3.10	Pencirian plasmid rekombinan TES-30(M9) di dalam vektor ekspresi pPROEX™HTc	117
3.11	Hasil jujukan plasmid DNA rekombinan TES-30(M9)/ pPROEX™HTc/ TOP10 #18	118
3.12	Analisis SDS-PAGE terhadap rTES-30USM	122
3.12.1	Gambar rajah SDS-PAGE optimisasi parameter ekspresi rekombinan	123
3.13	Penulenan antigen rekombinan TES-30(M9)/ pPROEX™HTc/TOP10 #18	130
3.14	Keputusan ujian pengesanan antigenisiti rTES-30USM menggunakan anti-histidin	132
3.15	Keputusan ujian pengesanan antigenisiti rTES-30USM menggunakan blot Western	133
3.16	Keputusan ujian rTES-30USM IgG4-ELISA	
3.16.1	Nilai COV positif rTES-30USM IgG4-ELISA	136
3.16.2	Keputusan ujian optimisasi kepekatan antigen rTES-30USM IgG4-ELISA	
3.16.2.1	Optimisasi kepekatan antigen rTES-30USM bagi asai IgG4-ELISA	136
3.16.2.2	Optimisasi pencairan monoklon anti-manusia IgG4-HRP	139
3.16.2.3	Optimisasi larutan pencairan dan pemblok	140
3.16.3	Analisis keputusan asai rTES-30USM IgG4-ELISA	143
3.16.4	Ringkasan keputusan keseluruhan ujian asai rTES-30USM IgG4-ELISA dan kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium)	159
3.16.5	Analisis spesifisiti menggunakan kaedah Pearson "Chi square"	159
<b>BAB 4</b>	<b>PERBINCANGAN DAN KESIMPULAN</b>	<b>160</b>
	<b>RUJUKAN</b>	<b>176</b>
	<b>LAMPIRAN</b>	
	<b>PEMBENTANGAN KERTAS KERJA DAN PENERBITAN</b>	

## Senarai Rajah

### Muka surat

1.3.1.1	Telur <i>T. canis</i> tidak infektif	4
1.3.1.2	Telur infektif <i>T. canis</i> mengandungi L2	4
1.3.1.3	Contoh larva jantan dan betina <i>T. canis</i>	5
1.3.1.4	Contoh larva L2 <i>T. canis</i> di bawah mikroskop	5
1.3.1.5	Gambar rajah alae <i>T. cati</i>	5
1.3.1.6	Gambar rajah alae <i>T. canis</i>	5
1.4.1	Kitar hidup <i>T. canis</i>	9
1.4.2	Ilustrasi laluan pergerakan larva L2 di dalam retina mata	11
1.5.1	Manifestasi klinikal VLM	14
1.5.2	Manifestasi klinikal OLM	14
1.6.1	Peta taburan jangkitan toksokariasis global	17
1.13.1	Carta alir keseluruhan kajian	31
2.7.1	Ringkasan kaedah PCR himpunan	58
2.9.1	Gambar Rajah vektor pengklonan PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> dan tapak pengklonan pelbagai (MCS)	63
2.11.1	Gambar rajah keseluruhan proses mutagenesis	65
2.12.1	Gambar rajah vektor ekspresi pPROEX <sup>™</sup> HTc dan tapak pengklonan pelbagai (MCS)	69
2.12.2	Ringkasan tatacara proses ligasi ke dalam vektor ekspresi pPROEX <sup>™</sup> HTc	71
2.18.1	Rajah penyusunan blot Western melalui kaedah separa-kering	81
2.19.1	Ringkasan prosedur ujian asai IgG4-ELISA	86
3.1.1a	Hasil analisis gel agarosa optimisasi pertama PCR gen himpunan	93

3.1.1b	Hasil analisis gel agarosa optimisasi kedua PCR gen himpunan	94
3.2a	Hasil analisis gel agarosa optimisasi PCR peringkat kedua	96
3.2b	Hasil gel agarosa produk PCR peringkat kedua	98
3.3a	Hasil analisis gel agarosa penyaringan koloni daripada pengklonan vektor PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	100
3.3b	Hasil analisis gel agarosa penentuan orientasi koloni pengklonan vektor PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	100
3.4	Pencirian plasmid DNA di dalam vektor pengklonan PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	102
3.5	Keputusan jujukan DNA 3 tempat bes mutasi delesi bagi plasmid DNA TES-30(#7)/TOPO/TOP10	103
3.6.1	Hasil analisis gel agarosa pembetulan bes delesi pertama proses mutagenesis	105
3.6.1.1	Pencirian plasmid hasil proses mutagenesis peringkat pertama	106
3.6.2	Hasil analisis gel agarosa pembetulan bes delesi kedua proses mutagenesis	108
3.6.2.1	Pencirian plasmid hasil proses mutagenesis peringkat kedua	109
3.6.3	Hasil analisis gel agarosa pembetulan bes delesi ketiga proses mutagenesis	111
3.6.3.1	Pencirian plasmid hasil proses mutagenesis peringkat ketiga	112
3.7	Keputusan penjajaran jujukan plasmid DNA TES-30(#7)/TOPO/TOP10(M9) yang telah dibaiki	114
3.8	Hasil analisis gel agarosa ujian pencernaan berganda plasmid menggunakan <i>Bam</i> HI dan <i>Xho</i> I	115

3.9	Hasil analisis gel agarosa penskrinan koloni rekombinan TES-30 menggunakan primer M13Rpuc dan NHR	116
3.10	Pencirian plasmid DNA rekombinan di dalam vektor ekspresi pPROEX™HTc/TOP10	117
3.12.1a	Profil SDS-PAGE pada kepekatan IPTG 10 mM (30°C)	123
3.12.1b	Profil SDS-PAGE pada kepekatan IPTG 10 mM (37°C)	124
3.12.1c	Profil SDS-PAGE pada kepekatan IPTG 1.0 mM (30°C)	125
3.12.1d	Profil SDS-PAGE pada kepekatan IPTG 1.0 mM (37°C)	126
3.12.1e	Profil SDS-PAGE pada kepekatan IPTG 0.5 mM (30°C)	127
3.12.1f	Profil SDS-PAGE pada kepekatan IPTG 0.5 mM (37°C)	128
3.13	Profil antigen rTES-30USM	130
3.14	Hasil analisis ujian pengesanan antigenisiti rTES-30USM dengan antibodi anti-histidin H3-HRP (Santa Cruz, Switzerland)	132
3.15	Hasil analisis ujian pengesanan antigenisiti rTES-30USM dengan blot Western	133
3.16	Taburan nilai ketumpatan optik (OD) terhadap 26 sampel serum toksokariasis	144

## Senarai Jadual

		Muka surat
1.7.1	Kit komersial yang terdapat dipasaran dengan nilai sensitiviti dan spesifisiti tertentu.	22
2.5.1	Jujukan DNA dan translasi asid amino yang mengkodkan TES-30	53
2.5.2	Senarai oligonukleotida yang mengkodkan TES-30	54
2.10.1	Senarai primer yang digunakan di dalam kajian ini dan kepentingannya	62
3.11	Keputusan analisa hasil jujukan plasmid DNA TES-30(M9)/pPROEXT c /TOP10 #18	119
3.16.2.1	Perbandingan di antara optimisasi kepekatan antigen dan pencairan sampel serum menggunakan rTES-30USM IgG4-ELISA	136
3.16.2.2	Optimisasi pencairan monoklon antibodi anti-manusia IgG4-HRP	139
3.16.2.3	Optimisasi pencairan "diluent" dan larutan penahan	141
3.16.3.1	Ringkasan keputusan asai IgG4-ELISA dan asai kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium) terhadap serum toksokariasis	143
3.16.3.2	Ringkasan keputusan asai IgG4-ELISA dan asai kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium) terhadap serum STH	145
3.16.3.3	Ringkasan keputusan asai IgG4-ELISA dan asai kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium) terhadap serum amebiasis	148
3.16.3.4	Ringkasan keputusan asai IgG4-ELISA dan asai kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium) terhadap serum toksoplasmosis	150
3.16.3.5	Ringkasan keputusan asai IgG4-ELISA dan asai kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium) terhadap serum filariasis	151



3.16.3.6	Ringkasan keputusan asai IgG4-ELISA dan asai kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium) terhadap serum individu normal	153
3.16.4	Ringkasan penilaian tahap spesifisiti asai rTES-30USM IgG4-ELISA dan asai kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium)	158
3.16.5	Analisis perbandingan spesifisiti menggunakan kaedah Pearson Chi square asai rTES-30USM IgG4-ELISA dan asai kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium)	159

## Senarai Lampiran

- Lampiran 1 Seroprevalens global toksokariasis pada manusia
- Lampiran 2 Contoh penggunaan pelbagai antigen di dalam ujian asai untuk diagnosis toksokariasis
- Lampiran 3 Contoh pengiraan penampan lisis dan perencat protease bagi penyediaan pelet.
- Lampiran 4 Contoh pengiraan DNase I
- Lampiran 5 Penentuan kepekatan protein dalam sediaan antigen
- Lampiran 6 Contoh pengiraan penyerapan antigen
- Lampiran 7 Kromatogram hasil jujukan TES-30(M9)/TOPO/TOP10 yang telah diujuki menggunakan primer M13F.
- Lampiran 8 Kromatogram hasil jujukan TES-30(M9)/TOPO/TOP10 yang telah diujuki menggunakan primer M13R.
- Lampiran 9 Kromatogram hasil jujukan TES-30(M9)/pPROEX™ HTc/TOP10 #18 yang diujuki menggunakan primer M13RPuc.
- Lampiran 10 Kromatogram hasil jujukan TES-30(M9)/pPROEX™ HTc/TOP10 #18 yang diujuki menggunakan primer NHR.

IgG4	imunoglobulin subkelas G4
IL-4	interleukin 4
IL-8	interleukin 8
IL-13	interleukin 13
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranosida
KCl	potasium klorida
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dipotassium mono hidrogen fosfat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	potasium dihidrogen fosfat
L2	larva peringkat kedua <i>T. canis</i>
L3	larva peringkat ketiga <i>T. canis</i>
LB	Luria Bertani
LMW	penanda berat molekul rendah
MCS	tapak pengklonan pelbagai
MgCl <sub>2</sub>	magnesium klorida
MRI	pengimejan resonan magnetik
NaCO <sub>3</sub>	natrium bikarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	natrium dihidrogen bikarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	natrium dihidrogen fosfat
NaCl	natrium klorida
NaOH	natrium hidroksida
NCP	nitroselulosa fosfat
Ni-NTA	nikel asid nitroloasetik

OD	ketumpatan optic
OLM	pergerakan larval ocular
ORF	Rangka bukaan bacaan
PBS	penampakan fosfat salin
PCR	tindakbalas rantaian polimerase
rpm	pusingan per minit
rTES	rekombinan kumuhan-rembesan <i>Toxocara</i> (“ <i>Toxocara excretory secretory</i> ”)
S.D	Sisihan piawai
SDS	Natrium dodesil fosfat
SPSS	Statistical Package Social Science
STH	Helmin tularan tanah (“soil transmitted helminth”)
TAE	tris asetat EDTA
TBE	tris borat EDTA
TBS	penampakan tris salin
TEE	ekstrak telur embrionasi <i>Toxocara</i>
TEMED	N,N, N' N'-tetrametilena diamina
TES	kumuhan rembesan <i>Toxocara</i>
TNF- $\alpha$	tumor nekrosis faktor alfa
Tris-Cl	tris klorida
TU	<i>Toxocara</i> unit
VLM	pergerakan larval viseral
WB	blot Western
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktofiranosida

%	Peratus
° C	darjah celcius
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μg/ml	mikrogram/mililiter
μl	mikroliter
μm	mikrometer
μM	mikromolar
μmol	mikromol
bp	baspair
cm	sentimeter
g	gram
Kb	kilo baspair
kDa	kilodalton
M	molar
mA	miliampere
mg	milligram
ml	mililiter
mM	milimolar
mm	millimeter
mm <sup>3</sup>	milimeter padu
ng	nanogram
nm	nanometer
V	voltan

# **rTES-30USM: Pengklonan menerusi PCR Himpunan, Ekspresi dan Penilaian Penggunaannya dalam ujian IgG4-ELISA bagi Mengesan Jangkitan Toksokara**

## **ABSTRAK**

Toksokariasis pada manusia adalah penyakit zoonotik yang disebabkan oleh jangkitan helmin *Toxocara canis* (*T. canis*) yang kebanyakannya berpunca daripada anjing dan *T. cati* daripada kucing. Sehingga kini, diagnosis makmal bagi jangkitan toksokara sangat bergantung kepada ujian serologi. Ini kerana ujian secara klinikal tidak cukup untuk membuktikan bahawa seseorang itu dijangkiti *Toksokara*. Walaupun terdapat banyak kit komersial di pasaran, namun kebanyakannya mempunyai tahap spesifisiti yang kurang memuaskan apabila digunakan di negara tropika seperti Malaysia. Ini kerana penduduk di negara tropika sering mengalami jangkitan bersama ("co-infection") daripada pelbagai helmin lain. Dalam usaha meningkatkan tahap spesifisiti bagi ujian diagnosis toksokariasis, satu pembangunan ujian asai untaian enzim immunosorben secara tak-langsung IgG4 (IgG4-ELISA) dilakukan melibatkan penggunaan antigen rekombinan TES-30USM (rTES-30USM).

Kajian dimulakan dengan gen TES-30 diklonkan menggunakan kaedah PCR himpunan dan ditransformasi ke dalam vektor pengklonan. Setelah itu, gen TES-30 disubklonkan ke dalam vektor ekspresi prokariot yang mengandungi tapak perlekatan 6xHis (his-tag). Seterusnya, proses penghasilan protein dilakukan dengan mengkultur bakteria rekombinan TES-30USM di bawah aruhan 1 mM isopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranosida (IPTG) pada suhu 30°C. Protein terhasil ditulen menggunakan resin nikel (Ni-NTA) melalui kaedah kromatografi afiniti. Antigenisiti rTES-30USM ini kemudiannya diuji menggunakan kaedah blot Western. Setelah itu, antigen rTES-30USM tulen yang diperolehi diaplikasi menggunakan teknik IgG4-ELISA dan nilai spesifisiti dan sensitiviti ujian dinilai dengan membandingkannya dengan ujian kit komersil *Toxocara* IgG-EIA (Cypress Diagnostic, Belgium). Asai IgG4 digunapakai

kerana kajian terdahulu telah menunjukkan ujian berasaskan subkelas antibodi IgG ini dapat meningkatkan spesifisiti ujian serologi bagi toksokariasis. Kajian penilaian terhadap rTES-30USM tersebut melibatkan sejumlah 338 sampel serum yang merangkumi 26 kes positif benar toksokariasis di mana pesakit menunjukkan tanda dan simptom toksokariasis. Serum ini juga memberikan bacaan titer antibodi anti-toksokara yang tinggi. Selain itu, ujian turut dilakukan terhadap 115 sampel serum daripada pelbagai jangkitan parasit lain iaitu 35 sampel pesakit helmin tularan tanah, 31 sampel pesakit amoebiasis, 20 serum pesakit toksoplasmosis, 28 serum filarasis brugia, satu serum gnathostomiasis dan 197 serum daripada penderma darah normal sebagai kawalan negatif.

Keputusan asai rTES-30USM IgG4-ELISA memberikan nilai sensitiviti iaitu 92.3% (24/26) dan nilai spesifisitinya ialah 94.2% (294/312). Sebaliknya keputusan kit komersil memberikan tahap sensitiviti 100% dan spesifisiti 85.3%. Kebanyakan kit yang terdapat di pasaran seperti kit IgG-ELISA Cypress yang dihasilkan di luar negara tidak mengambil kira tindak balas silang dengan serum helmin tularan tanah terutama trikuriasis dan askariasis. Secara keseluruhan, ujian rTES-30USM IgG4-ELISA yang dibangunkan ini mempamerkan nilai spesifisiti dan sensitiviti yang tinggi. Kesimpulannya, ujian ini sesuai digunapakai sebagai satu ujian diagnosis di negara tropika seperti Malaysia yang endemik bagi pelbagai jangkitan helmin tularan tanah.

# **rTES-30USM: Cloning *via* Assembly PCR, Expression and Evaluation of its Usefulness in an IgG4-ELISA for Detection of *Toxocara* infection**

## **ABSTRACT**

Human toxocariasis is a zoonotic disease caused by the helminths *Toxocara canis* (*T. canis*) from dogs and *T. cati* from cats. Currently, laboratory diagnosis of toxocariasis mainly relies on serological tests. However the specificities of the current commercially available tests are still not satisfactory especially for use in tropical countries where coinfections with other helminthes are common. In an effort to develop a serological assay with improved specificity for the detection of *Toxocara* infection, an IgG4-ELISA which employed TES-30USM recombinant antigen (rTES-30USM) was developed.

The TES-30 gene was cloned *via* assembly PCR and subsequently transformed into cloning vector. Thereafter, TES-30USM gene was subcloned into a his-tagged prokaryotic expression vector. In order to produce rTES-30USM antigen, the protein expression was performed using a culture of recombinant bacteria TES-30USM induced with of 1 mM IPTG and incubated post-induction at 30°C. The protein produced was then purified by affinity chromatography using Nickel-NTA resin. Then, the antigenicity of the purified recombinant antigen was determined using Western blotting. Subsequently, the rTES-30USM antigen was employed in an IgG4-ELISA and evaluated for its sensitivity and specificity in detecting *Toxocara* infection. The results were compared with those obtained using a commercially available serological kit for diagnosis of toxocariasis (*Toxocara* IgG-ELISA, Cypress Diagnostic, Belgium). IgG4-based assay was employed because previous studies showed that the use of this IgG subclass antibody could increase the specificity of serological assay for toxocariasis. In the evaluation of rTES-30USM, a total of 338



serum samples were employed namely 26 samples from patients diagnosed with toxocariasis, these patients not only showed clinical signs and symptoms of toxocariasis but were also found to have high titres of anti-toxocara antibodies. In addition, 115 serum samples were from patients infected with other parasitic infections including 35 samples from those infected with soil transmitted helminths, 31 samples from patients with amoebiasis, 20 samples from patients infected with toxoplasmosis, 28 samples from patients with brugia filariasis, one sample from patient with gnathostomiasis and 197 serum samples from healthy blood donors as negative controls.

The assay demonstrated a sensitivity of 92.3% (24/26), and a specificity of 94.2% (294/312). In comparison, the commercial kit exhibited a sensitivity of 100% and specificity of 85.3% (266/312). However, most of the kits available in the market have not been sufficiently tested for cross-reactivities with serum from people with soil-transmitted helminths infections especially trichuriasis and ascariasis. Overall, rTES-30USM IgG4-ELISA that was developed in this study showed high sensitivity and specificity. As a conclusion, this assay is very useful as a diagnostic test for use in tropical countries like Malaysia where cross-reactive soil-transmitted helminthic infections are common.

## BAB 1 PENGENALAN

### Pengenalan am

#### 1.1 Penyakit toksokariasis

Toksokariasis merupakan sejenis penyakit zoonotik yang menjangkiti manusia sedunia. Jangkitan ini berpunca daripada cacing nematoda dari genus Toksokara. Terdapat dua jenis spesis Toksokara yang utama yang membawa jangkitan kepada manusia iaitu *Toxocara canis* (*T. canis*) yang menjangkiti anjing dan *Toxocara cati* (*T. cati*) daripada kucing. Kedua-dua spesis ini adalah dalam order ascaridida, superfamili ascaridiodea dan famili toxocaridae. Kebanyakan kajian menunjukkan *T. canis* daripada anak anjing adalah penyebab utama penyakit toksokariasis terhadap populasi manusia sedunia (Beaver *et al.*, 1952). Kini, terdapat beberapa spesis lain yang dikenal pasti menjangkiti manusia iaitu *Toxocara vitulorum* yang lazimnya menjangkiti anak lembu dan kerbau, *Toxocara malayasiensis* yang menjangkiti kucing terutama di kawasan tropika dan *Toxocara lynxus* yang menjangkiti kucing liar (Despommier, 2003). Walau bagaimanapun, manifestasi jangkitannya terhadap manusia masih belum dikenal pasti dengan jelas.

Secara umumnya, kebanyakan penyakit toksokariasis pada manusia bermula pada peringkat kanak-kanak. Sumber penyebab utama penyakit toksokariasis pada manusia adalah dipengaruhi oleh perumah definitif yang membuang najis ke atas permukaan tanah dan persekitarannya seperti di kawasan kebun sayuran, taman rekreasi dan taman permainan kanak-kanak yang membolehkan telur cacing tersebut berkembang menjadi peringkat infektif. Seterusnya, faktor kurang penjagaan kebersihan peribadi dan sanitasi seseorang mendedahkan dirinya tercemar dengan telur yang infektif. Sekiranya tangan yang dicemari ova toksokara menyentuh makanan

atau sesuatu tempat lain, maka berlaku proses pemindahan kontaminasi tersebut yang boleh menyebabkan jangkitan toksokariasis (Despommier, 2003).

Selain itu, penyebab penyakit toksokariasis juga adalah dipengaruhi oleh mereka yang memelihara anjing dan kucing sebagai haiwan peliharaan. Terdapat kajian menunjukkan bahawa anjing dan kucing yang dijangkiti toksokara mengandungi telur yang infektif pada bulunya. Seterusnya, manusia juga mudah dijangkiti larva toksokara akibat pengambilan makanan seperti daging lembu atau ayam yang mentah atau separuh masak (Holland & Hamilton 2006).

## **1.2 Sejarah dan perkembangan jangkitan toksokariasis**

Jangkitan *T. cati* pada manusia mula dilaporkan pada tahun 1824. Walau bagaimanapun, hanya 24 kes dilaporkan. Oleh itu, fokus lebih diutamakan kepada jangkitan berkaitan spesies *T. canis*. Jangkitan *T. canis* mula dikenal pasti disebabkan anjing pada kurun ke 18 tetapi tidak dikaji secara mendalam sehingga tahun 1908. Pada tahun 1908, G.H.F Nutall dan C. Strickland melaporkan bahawa 17 daripada 24 ekor anjing membawa parasit ini (<http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2005/>). Seterusnya pada tahun 1950, buat pertama kalinya jangkitan *T. canis* pada manusia mula dijumpai oleh H.C Wilder. Beliau mula mengenal pasti *T. canis* sebagai larva cacing nematoda yang menyebabkan granuloma pada retina mata seorang kanak-kanak. Kemudian Mercer *et al.* (1950) menjumpai *T. canis* di dalam hati seorang pesakit (Despommier, 2003).

## **1.3 Parasit toksokara**

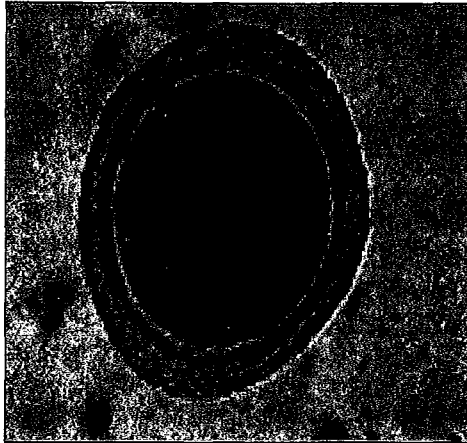
Seperti yang dinyatakan dalam bahagian terdahulu, kedua-dua spesies *T. canis* dan *T. cati* ini mempunyai kitar hidup yang serupa. Terdapat laporan menunjukkan bahawa kitar hidup kedua spesies toksokara ini mirip kepada nematoda '*Ascaris*

*lumbricoides*'. Oleh kerana *T. canis* merupakan spesies utama yang menyebabkan penyakit toksokariasis pada manusia, jadi morfologi dan kitar hidup yang akan dibincangkan selanjutnya difokuskan kepada kitar hidup *T. canis*.

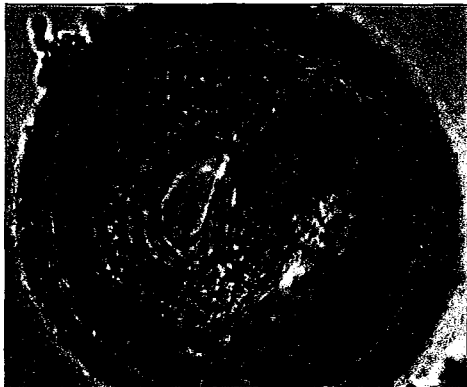
### 1.3.1 Ciri morfologi umum *T. canis*

Secara umumnya, telur toksokara boleh ditemui di dalam usus kecil perumah domestik dan daripada tanah yang tercemar dengan najis anjing. Terdapat dua jenis telur toksokara iaitu telur yang tidak infektif di dalam najis perumah dan telur infektif apabila tereram beberapa minggu di dalam tanah persekitaran. Di bawah pemerhatian mikroskop, telur spesies toksokara adalah berbentuk sfera, berwarna coklat terang dan disaluti dengan lapisan kulit tebal yang mengandungi protein (rajah 1.3.1.1 dan 1.3.1.2). Kebanyakan saiz telur *T. canis* adalah berukuran 90 µm x 75 µm sebaliknya saiz telur *T. cati* adalah lebih kecil iaitu 65 µm x 70 µm (Uga and Wiktor, 2006).

Secara umumnya, larva peringkat kedua (L2) mempunyai rupa bentuk seperti silinder. Kebanyakan larva L2 yang dibebaskan dalam usus kecil anak anjing terdiri daripada larva betina dan larva jantan. Perbezaan ketara bagi pengecaman jantan dan betina ialah larva betina mempunyai hujung ekor yang lurus manakala larva jantan mempunyai hujung ekor yang bengkok (rajah 1.3.1.3 dan 1.3.1.4). Secara kasar, kebanyakan saiz larva betina adalah ~12-20 cm manakala larva jantan pula bersaiz 10-12 cm (<http://www.vetsci.psu.edu/coursedes/vsc402/27ascarids.htm>). Cacing dewasa mengandungi alae servikal ("alae cervical") iaitu bahagian bukaan kecil pada hujung kepala yang tidak berwarna selari dengan kutikel larva. Ia berfungsi sebagai bahagian yang akan melekat pada usus kecil hos. (<http://www.cal.vet.upenn.edu/paralab/labs/lab4.htm>). Perbezaan alae servikal di antara *T. canis* dan *T. cati* ditunjukkan pada rajah 1.3.1.5 dan 1.3.1.6.

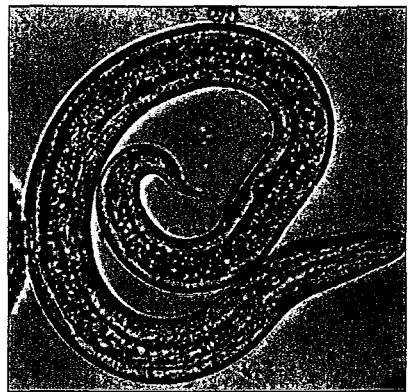
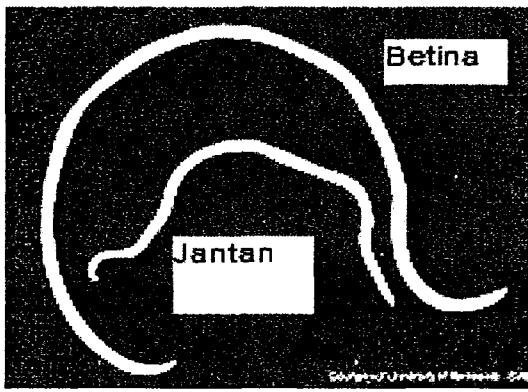


**Rajah 1.3.1.1:** Telur *T. canis* tidak infeksi



**Rajah 1.3.1.2:** Telur infeksi *T. canis* mengandungi larva L2

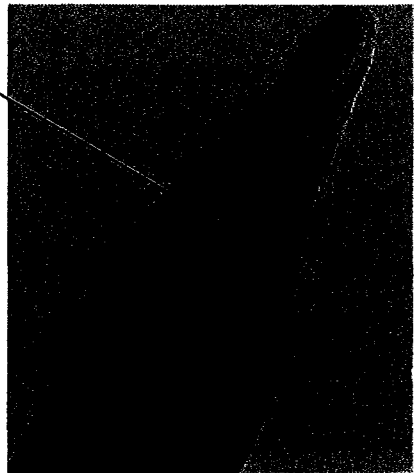
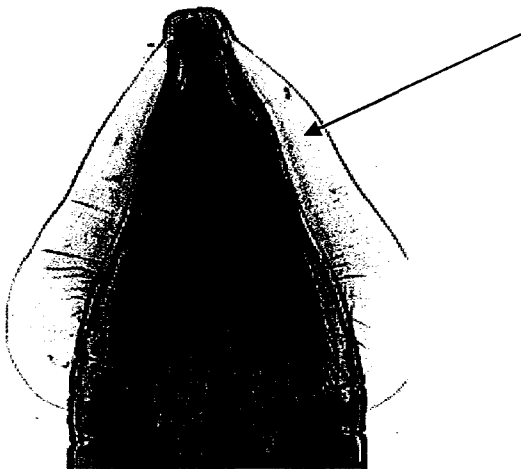
(Rujukan : [http://cal.vet.upenn.edu/dxendopar/parasitepages/ascarids/t\\_canis.html](http://cal.vet.upenn.edu/dxendopar/parasitepages/ascarids/t_canis.html))



**Rajah 1.3.1.3 :** Contoh larva jantan (10 cm) dan betina (18cm) daripada usus kecil seekor anjing

**Rajah 1.3.1.4:** Contoh larva L2 magnifikasi 100x di bawah mikroskop cahaya

Anak panah menunjukkan alae servikal pada cacing dewasa toksokara



**Rajah 1.3.1.5 :** Cacing dewasa *T. cati*

**Rajah 1.3.1.6:** Cacing dewasa *T. canis*

(Rujukan : <http://www.vetsci.psu.edu/coursedes/vsc402/27ascarids.htm>)

### 1.3.2 Kitar hidup *T. canis*

Kitar hidup *T. canis* adalah sangat kompleks (rajah 1.4.1). Seperti helmin nematoda yang lain, *T. canis* tidak menyebabkan jangkitan serta merta kepada perumah. Malah, nematod ini perlu melalui proses tumbesaran hingga ke peringkat larva infektif L2 aktif bagi menjangkiti sesuatu perumah. Bagi kitar hidup pada perumah anjing (perumah definitif), transmisi jangkitan boleh berpunca daripada empat laluan utama iaitu transmisi secara langsung melalui telur infektif, transmisi oleh perumah paratenik atau perumah perantara, transmisi melalui susu ibu kepada anak anjing (transmamari) dan juga jangkitan semasa kehamilan atau transmisi prenatal.

#### 1.3.2.1 Transmisi secara langsung

Kitar hidup secara langsung biasanya menjangkiti anak anjing yang berumur kurang daripada 3 bulan. Telur yang dibebaskan ke persekitaran bersama najis dari perumah definitif mengambil masa lebih kurang dua minggu untuk membesar hingga ke peringkat larva infektif. Telur infektif yang diingesi oleh anak anjing akan melekat pada dinding dalam usus kecil. Kemudian L2 ini akan menembusi sistem aliran limfatik dan seterusnya bergerak melalui salur darah ke jantung dan paru. Di dalam paru, L2 akan matang menjadi larva peringkat ketiga (L3). Kemudian L3 ini akan bergerak naik ke trakea dan esofagus dan proses ini akan berulang di dalam usus kecil sehingga ke peringkat dewasa. Melalui jangkitan secara langsung, hanya sebahagian kecil larva bergerak ke trakea manakala majoriti larva disebarkan ke tisu dan organ somatik menerusi aliran darah periferi ([http://www.cal.vet.upenn.edu/merial/Ascarids/asc\\_05a.html](http://www.cal.vet.upenn.edu/merial/Ascarids/asc_05a.html)).

### **1.3.2.2 Ingesi perumah paratenik**

Contoh perumah paratenik adalah tikus. Sekiranya anjing dewasa teringesi tikus ini, L2 yang ada di dalam otot tikus itu akan mula bergerak ke dalam perumah anjing dan akhirnya menjadi dorman. Sekiranya anjing itu hamil, larva dorman ini akan menjadi infektif semula semasa trimester ketiga. L3 yang berada di dalam tisu perumah paratenik akan membesar di dalam usus kecil anjing hingga ke peringkat dewasa (Dog roundworms: <http://www.peteducation.com/article> & Toxocariasis: <http://www.cfsph.iastate.edu>).

### **1.3.2.3 Pergerakan larva melalui uterus (transuterine)**

Perumah definitif anjing yang hamil boleh memindahkan larva dari dalam tisu kepada fetus anjing yang dikandungnya. Akibatnya anak anjing yang dilahirkan membawa L2. L2 ini bergerak masuk daripada tisu kandungan ibu anjing melalui uri terus ke vena umbilikal kemudian ke hati dan kekal di situ sehingga dilahirkan. Selepas itu, L2 mula bergerak ke bahagian peparu anak anjing tersebut melalui pepokok bronkus, trakea, farinks dan apabila teringesi L2 akan membesar dan matang di dalam usus kecil perumah tersebut. Kebanyakan anak anjing yang berumur kurang daripada lima minggu mendapat jangkitan langsung melalui cara ini (Dog roundworms: <http://www.peteducation.com/article> & Toxocariasis: <http://www.cfsph.iastate.edu>).

### **1.3.2.4 Pergerakan larva daripada tisu mamari (penyusuan)**

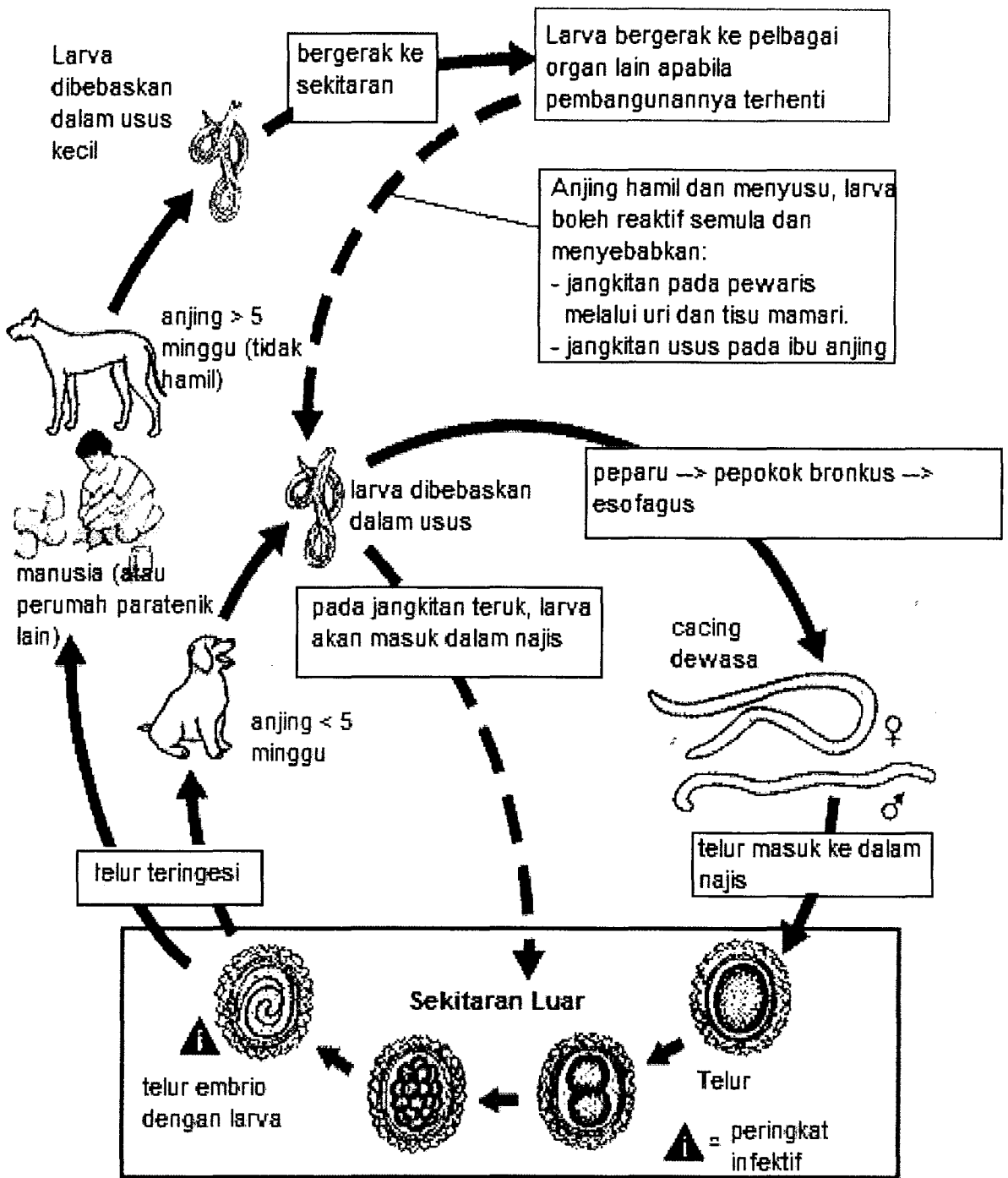
Anak anjing yang baru lahir boleh terjangkit oleh L3 apabila yang bergerak keluar daripada tisu mamari ibu anjing semasa proses penyusuan susu. Kitar hidup larva yang terjangkit pada peringkat ini tidak melibatkan peparu tetapi melalui farinks dan terus masuk ke dalam usus kecil hingga membentuk cacing dewasa (Dog roundworms: <http://www.peteducation.com/article> & Toxocariasis: <http://www.cfsph.iastate.edu>).



## 1.4 Patogenesis dan penyebaran penyakit toksokariasis

Secara umumnya, penyebaran penyakit toksokariasis pada manusia berlaku akibat sentuhan tangan di kawasan yang dicemari dengan telur yang infektif. Telur infektif masuk ke dalam sistem badan manusia secara tak disedari melalui "faecal-oral route" akibat daripada amalan kebersihan diri yang tidak sempurna semasa penyediaan dan pengambilan makanan atau minuman. Seterusnya, ingesti telur ini dibawa masuk ke dalam lumen pada usus kecil melalui saluran penghadaman. Oleh kerana manusia adalah perumah paratenik toksokara, proses perkembangan kitar hidup akan terhenti sehingga peringkat L2 sahaja. Di sini, telur tersebut mula bertindak balas dengan asid menyebabkan selaput kulit luar akan terhakis lalu membebaskan L2 (Kayes S.G. 2006). Larva ini akan menembusi dinding usus kecil dan dibawa bersama sistem saluran darah dan aliran limfatik ke bahagian tisu dan organ lain di dalam badan manusia seperti hati, jantung, ginjal, kulit, peparu dan larva L2 ini tidak dapat kembali semula ke dalam usus kecil. Manifestasi pergerakan L2 ke dalam organ badan manusia dan sistem otot ini dikenali sebagai pergerakan larva viseral (VLM) (Dog roundworms: <http://www.peteducation.com/article> & Toxocariasis: <http://www.cfsph.iastate.edu>).

Sesetengah L2 akan mati dan ada yang dapat beradaptasi berbulan hingga bertahun lamanya. Keadaan ini juga mungkin menyebabkan berlakunya tindak balas inflamasi terhadap organ yang didiami itu. Ini terjadi terutamanya apabila jangkitan semula berlaku pada sesebuah perumah itu. Secara umumnya, himpunan L2 di dalam tubuh akan menyebabkan manifestasi penyakit pada manusia.

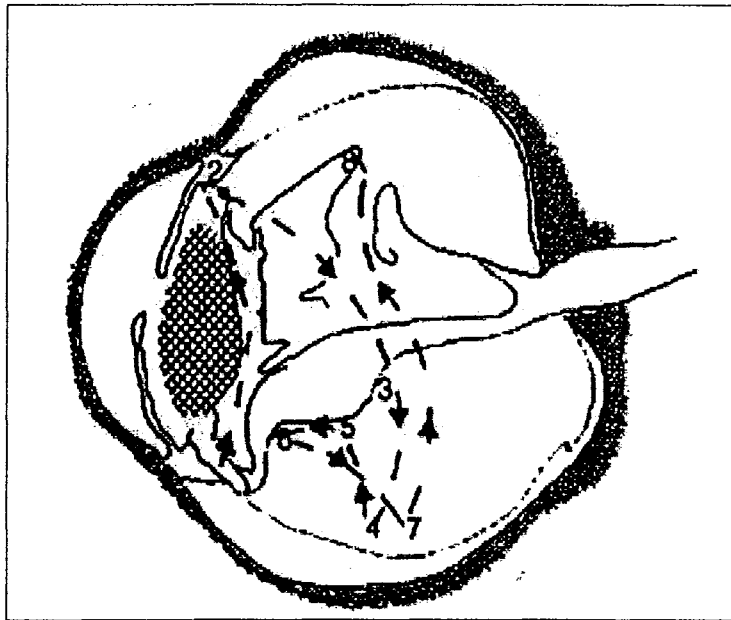


Rajah 1.4.1: Kitar hidup *Toxocara canis*

(Rujukan : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

Kehadiran L2 menyebabkan antigen kumuhan-rembesan *Toxocara* (TES) wujud di persekitaran dan merangsang sel imun bertindak. Sebagai contoh dalam jangkitan toksokariasis pada peparu. Selepas seminggu jangkitan, tindak balas awal yang berlaku pada matriks ekstraselular peparu ialah sel tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) dan interleukin 8 (IL-8) merangsang penghasilan sitokin Th2 oleh sel T CD4<sup>+</sup>. Kemudian, Th2 ini akan merangsang penghasilan IL-4 dan IL-13 yang menyebabkan sel B menghasilkan antibodi IgE yang tinggi dan seterusnya meningkat aras sel eosinofil di dalam darah (Kayes, 2006). Akhirnya pesakit mendapat asma yang kronik dan aktif. Walau bagaimanapun, tahap keterukan sesuatu simptom bergantung kepada tindak balas oleh sel sistem imun manusia.

Selain itu, manifestasi jangkitan toksokaria pada manusia yang penting adalah pergerakan L2 ke dalam mata. Antara laluan utama larva ini bergerak aktif masuk ke dalam mata adalah melalui sistem saluran darah kapilari dan retina, saraf optik, cecair serebrospinal (CSF) dan juga tisu lembut pada mata (Taylor, 2006). Ini dibuktikan melalui hasil kajian histologi terhadap sel mata seorang kanak-kanak berusia 12 tahun (Lyness *et al.* , 1987). Selain itu, kajian juga dapat mengesan laluan utama pergerakan L2 di dalam retina seperti ditunjukkan pada rajah 1.4.2 (Taylor M.R.H. 2006). Seterusnya, L2 ini akan masuk dan mendiami bahagian anterior mata menyebabkan berlaku inflamasi dan tindak balas oleh sel imun disekeliling seperti makrofaj, eosinofil, limfosit, sel epiteliod dan sel "giant" yang mengakibatkan manifestasi teruk kepada hampir keseluruhan organ mata. Manifestasi L2 ke dalam organ mata ini juga dikenali sebagai pergerakan okular larva (OLM).



**Rajah 1.4.2:** Ilustrasi laluan pergerakan L2 di dalam retina mata seorang kanak-kanak berusia 9 tahun (Lyness *et al.*, 1987).

## 1.5 Manifestasi klinikal toksokariasis

Manifestasi penyakit toksokariasis pada manusia boleh dibahagikan kepada tiga kategori yang utama iaitu VLM, OLM dan toksokariasis "covert". Terdapat satu lagi kategori iaitu toksokariasis saraf-otak, walau bagaimanapun, cara tindak balasnya belum dikenal pasti dengan jelas (Holland C.V. & Hamilton. H. 2006). Menurut Magnaval *et al.* (1997), hasil daripada pembacaan dan analisis data selama 47 tahun (1950-1997) menunjukkan hanya 12 kes yang dilaporkan melibatkan penyakit toksokariasis pada sistem saraf-otak. Ini sama ada melibatkan pengecaman larva di dalam CSF, di dalam otak dan/atau secara diagnosis imunologi ke atas CSF.

Pada amnya, VLM dilaporkan pada kanak-kanak berusia kurang daripada 9 tahun. Manifestasi ini boleh menyebabkan peningkatan paras eosinofil sehingga 2000 sel/mm<sup>3</sup> berbanding paras darah normal. Antara simptom lain termasuklah sakit di bahagian abdomen, pembesaran hati dan limpa (rajah 1.5.1a), hilang berat badan dan peningkatan paras kandungan antibodi IgE di dalam darah. Selain itu, jangkitan toksokara juga berlaku pada kulit dan mengakibatkan beberapa penyakit yang teruk terutama ruam merah dan gatal pada bahagian kulit (rajah 1.5.1b), urtikaria kronik, vaskulitis, pruritus dan sindrom Reiter's (Piarroux *et al.*, 2006). Seterusnya manifestasi jangkitan toksokara yang teruk juga berlaku apabila L2 bergerak aktif ke bahagian sistem pernafasan menerusi trakea, bronkiol dan akhirnya ke seluruh bahagian peparu. Ini mengakibatkan simptom klinikal teruk seperti asma. Kesemua manifestasi ini terjadi akibat tindak balas inflamasi setempat yang berlaku apabila terdapat jasad asing L2 mendiami organ sesebuah perumah. Ini telah diterangkan pada bahagian 1.4. Pada tahun 1952, VLM mula dikenal pasti pada seorang kanak-kanak yang mengalami pembesaran hati serta paras kandungan eosinofil yang tinggi (Beaver *et al.*, 1952).

Pergerakan L2 *T. canis* ke dalam mata menyebabkan tindak balas sel pada retina. Sebagai contoh sel eosinofil dan sel epiteliod akan bertindak dan menghasilkan

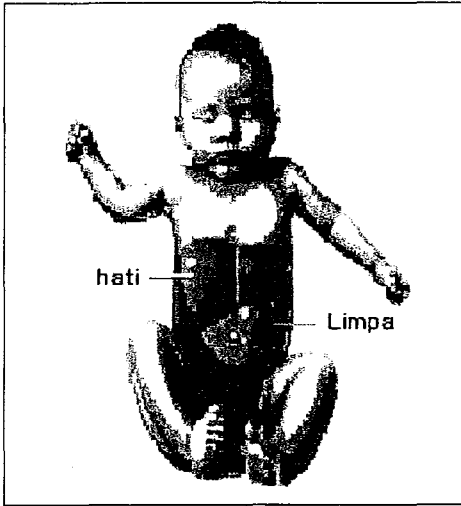
abses eosinofilia dan tisu gentian yang tumpat. Biasanya simptom OLM ini berlaku pada kanak-kanak berusia di antara 5 hingga 10 tahun. Antara simptom lain termasuklah glaukoma, granuloma pada retina (rajah 1.5.2a dan 1.5.2b), strabismus, endoftalmitis, koroidoretinitis, uveitis, penanggalan retina dan pada peringkat kritikal boleh menyebabkan kehilangan keseimbangan dan penglihatan pada mata manusia (Petithory J.C 1990, Yoshida *et al.*, 1999, Park *et al.*, 2000, Sabrosa, N.A. & E.C. de Souza. 2001; Mirdha, B.R. & S.K. Khokar 2002). Sindrom paras eosinofilia yang tinggi dalam darah mungkin tidak berlaku pada seseorang yang mendapat penyakit toksokariasis okular (Shields *et al.*, 1979).

Manifestasi toksokariasis "covert" (CT) terjadi apabila sindrom toksokariasis itu kurang spesifik dan tidak dapat dikenal pasti dengan jelas. Antara simptom ini seperti sakit pada bahagian abdomen, batuk, sakit kepala, dan berlaku gangguan tidur dan tingkahlaku seseorang (Taylor *et al.*, 1988). Selain itu, paras kandungan IgE dan bilangan eosinofil di dalam darah adalah stabil dan tidak berubah.

## **1.6 Seroprevalens global toksokariasis**

Toksokariasis adalah penyakit kosmopolitan yang menjangkiti manusia di kebanyakan negara dunia meliputi negara Barat, Timur, Asia Tenggara dan negara lain. Antara negara yang telah dilaporkan terlibat adalah Malaysia, Indonesia, Argentina, USA, Kanada, Brazil, Nepal, Perancis, Korea, Australia, Switzerland, Jepun, Itali dan Belanda (rajah 1.6.1). Kebanyakan kajian yang dilaporkan ini melibatkan toksokariasis peringkat VLM. Terdapat beberapa laporan seroprevalen membabitkan OLM tetapi tidak begitu dibincangkan secara jelas.

**Rajah 1.5.1 :** Contoh manifestasi VLM akibat toksokariasis

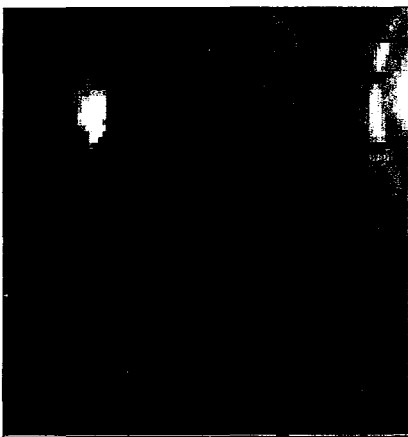


**Rajah 1.5.1.a :** Pembesaran hati dan limpa pada bayi

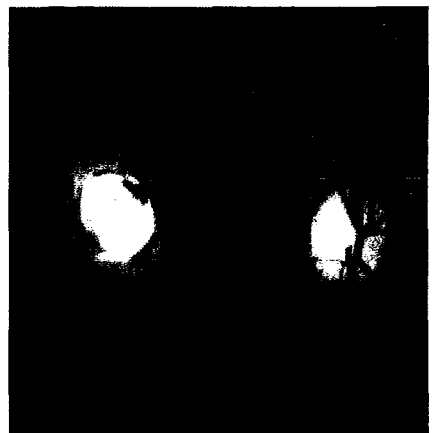


**Rajah 1.5.1b:** Ruam merah pada kulit

**Rajah 1.5.2:** Contoh manifestasi OLM pada mata seorang kanak-kanak yang menghidapi toksokariasis



**Rajah 1.5.2a:** Lesi granuloma eosinofilia pada cakera optik



**Rajah 1.5.2b:** Peningkatan granuloma dan lesi putih bahagian dalam retina

(Rujukan : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

Secara umumnya, kebanyakan kajian yang dilaporkan menunjukkan seroprevalens adalah tinggi di kawasan negara maju berbanding negara yang sedang membangun. Sebagai contoh di Perancis, hanya 2-5% penduduk di kawasan bandar adalah seropositif berbanding 14.2-37% di kalangan penduduk di kawasan pedalaman (Magnaval *et al.*, 1994) manakala 2.7% sahaja penduduk di Switzerland memberikan reaksi positif toksokariasis (Jacquier *et al.*, 1991). Selain itu, kajian oleh Chomel *et al.* (1997) melaporkan sebanyak 63% penduduk di Bali dan Sidoarjo Jawa Selatan Indonesia menunjukkan seroprevalens toksokariasis yang tinggi. Keseluruhan kadar seroprevalens ini dapat dilihat pada Lampiran 1 (rujuk bahagian lampiran).

Pada masa yang sama, satu kajian lain telah dijalankan di Malaysia melibatkan kaum Melayu, India dan Cina. Kajian ini menggunakan 331 serum daripada Januari 1989-Desember 1991; 183 adalah daripada kaum Melayu, 55 kaum Cina, 76 kaum India dan 17 daripada kaum lain. Hasil kajian menunjukkan prevalens keputusan positif terhadap jangkitan toksokara adalah seperti berikut; kaum India 35.5% (27/76), diikuti 29.4% (5/17) kaum Melayu, 14.8% (27/183) kaum lain dan Cina 10.9% (6/55). Ini menunjukkan adanya jangkitan toksokara di Malaysia (Hakim *et al.*, 1993). Umum diketahui, anjing adalah haiwan yang "diharamkan" bagi golongan beragama Islam, ini tidak memberi kesan terhadap parameter kajian. Mungkin juga terdapat kes di mana kaum Melayu dijangkiti oleh *T. cati*. Jadi kajian perbandingan selanjutnya perlu dijalankan. Selain itu, di Malaysia anjing bebas berkeliaran tanpa halangan dan mungkin sesetengah kanak-kanak ini memperolehi jangkitan semasa bermain di kawasan padang dan taman permainan.

Satu lagi kajian dijalankan pada tahun 1997 melibatkan pesakit di kalangan kanak-kanak yang menghidap asmatik bronkial di Hospital Klang, Selangor. Keputusan yang diperolehi menunjukkan kanak-kanak di bawah umur 10 tahun yang menghidap



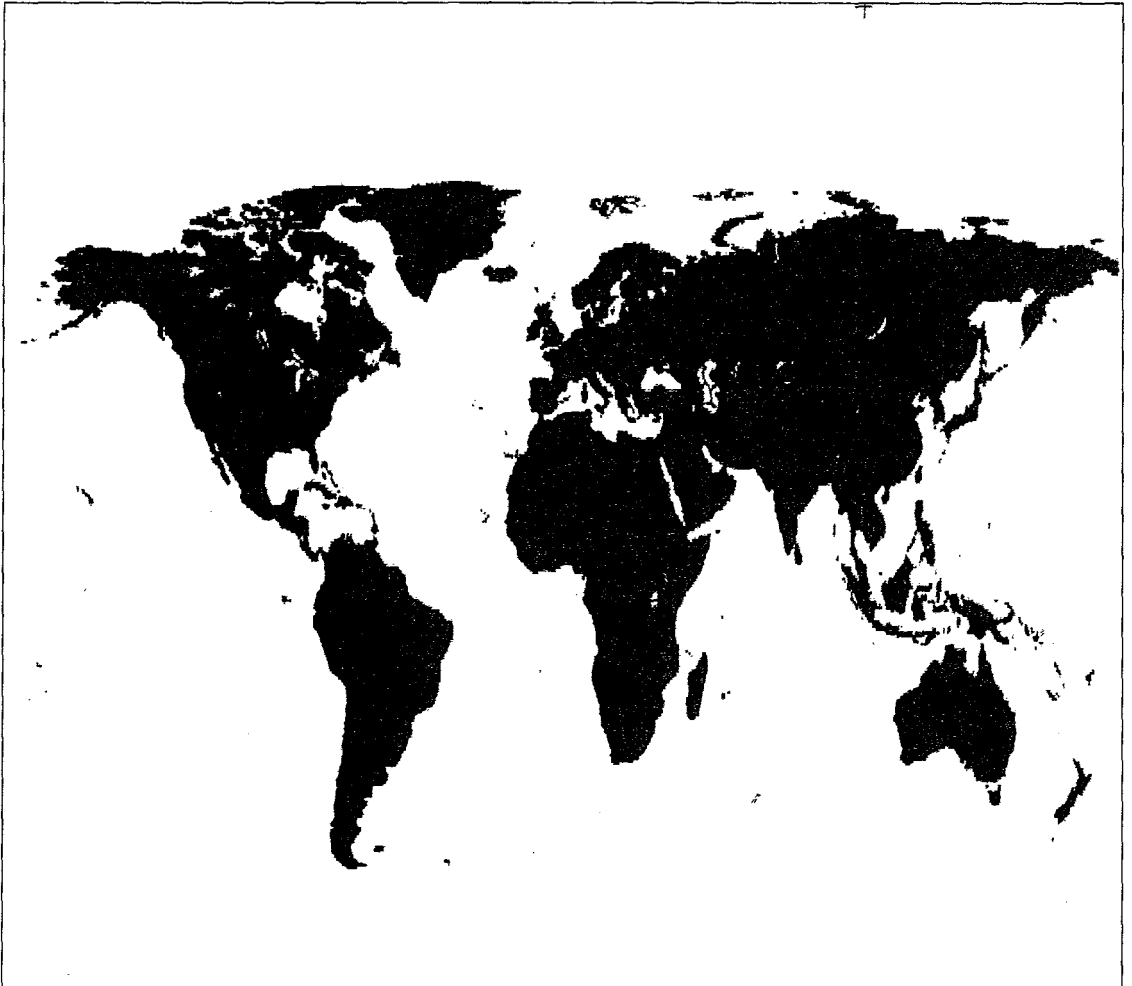
asma memberikan kadar seropositiviti yang tinggi (*anti-toxocara* IgG) sebanyak 57.8% berbanding kanak-kanak yang tidak mengidap asma, 15.4% (Hakim *et al.*, 1997).

Seterusnya satu kajian lain dilakukan pada tahun 2001 di klinik Pediatrik, Pusat Perubatan Universiti Malaya melibatkan 124 sampel kanak-kanak berumur lebih daripada 5 tahun. Seramai 66 orang daripada mereka menghidap asma dan memerlukan penggunaan alat bantuan pernafasan (inhaler), manakala 58 adalah kawalan normal. Keputusan yang diperolehi menunjukkan 21.2% kanak-kanak yang menghidap asma adalah seropositif berbanding 8.6% kanak-kanak normal. Kanak-kanak yang positif *toksokara* memberikan titer seropositiviti yang tinggi iaitu  $0.68 \pm 0.32$  berbanding kanak-kanak normal,  $0.49 \pm 0.07$  (Patrick *et al.*, 2001). Jadi, daripada kedua kajian di atas dapat disimpulkan bahawa terdapat hubung kait secara langsung di antara pesakit asma dengan jangkitan toksokara.

## **1.7 Diagnosis toksokariasis**

### **1.7.1 Diagnosis penyakit VLM**

Sehingga ke hari ini, diagnosis toksokariasis adalah sukar dan mencabar kepada para doktor di Malaysia. Ini kerana kebanyakan pesakit yang datang ke klinik atau hospital menunjukkan simptom yang terlalu umum dan tidak spesifik terhadap toksokariasis seperti alergi, demam panas, ruam kulit dan lelah. Kebiasaannya pesakit menunjukkan simptom yang lebih kurang sama dengan simptom jangkitan STH yang lain. Sebagai contoh terdapat laporan menyatakan bahawa *Baylisascaris procyonis*, *Fasciola hepatica* dan *A. lumbricoides* juga boleh menyebabkan manifestasi VLM. Oleh itu, diagnosis secara klinikal sahaja tidak dapat mengesahkan seseorang itu mendapat toksokariasis atau sebaliknya.



**Rajah 1.6.1:** Peta taburan penyakit toksokariasis secara global. Dot bertanda menunjukkan antara negara yang terlibat.

(Rujukan : <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2005/Toxocariasis/index2.htm>)

Sepertimana yang telah dijelaskan dalam bahagian sebelumnya, kitar hidup toksokara pada manusia menunjukkan larva ini tidak dapat berkembang sehingga peringkat dewasa. Oleh itu, diagnosis menggunakan najis pesakit yang terjangkit tidak dapat membantu dalam pengesanan jangkitan toksokara. Oleh itu, para doktor mengalami kesukaran untuk mendiagnosis dan menentukan samada seseorang itu mengidap toksokariasis atau sebaliknya.

Bagi meyakinkan diagnosis yang dibuat pada peringkat awal, para doktor akan melihat kepada sejarah kehidupan, latar belakang serta simptom utama yang ditunjukkan oleh pesakit. Pada peringkat ini pesakit akan ditanya tentang kehidupan sosial, pekerjaan, negara asal yang didiami, pengambilan ubatan dan sejarah pengembaraan ke negara luar yang prevalen dengan jangkitan ini. Seterusnya, kemungkinan pesakit terdedah secara langsung terhadap anak anjing atau kucing yang terjangkit dan hubungan terus pesakit dengan haiwan peliharaan seperti anjing turut disoal selidik. Selain itu, pengambilan makanan terutama makanan mentah atau separuh masak dan makanan yang terkontaminasi dengan telur yang infektif ("pica/geophagia") perlu diambil perhatian (Lewis, J.W. 2006).

Seterusnya, diagnosis toksokariasis definitif lain yang boleh diguna pakai adalah kaedah pengesanan histopatologi. Namun, kaedah ini adalah sukar dan jarang dipraktikkan. Ini kerana, masalah utama yang dihadapi adalah dalam mendapatkan sampel biopsi pesakit. Selain itu, kaedah ini juga mengambil masa yang panjang untuk mendapatkan sesuatu keputusan. Jadi adalah sukar bagi para doktor mendiagnosis pesakit sekiranya keputusan perlu diketahui dengan segera.

Selain itu, ujian pengimejan perubatan atau ultrasound dapat membantu dalam mengenal pasti lesi granuloma yang disebabkan oleh larva toksokara. Sebagai tambahan, penggunaan ujian imbasan tomografi berkomputer (CT) juga dapat

membantu dalam pengesanan lesi berdensiti rendah pada hati. Selain itu, penggunaan pengimejan magnetik resonan (MRI) adalah lebih sensitif dan dapat mengenalpasti kawasan lesi yang berkepadatan tinggi terutama pada kortikal sistem saraf pusat (Magnaval *et al.*, 2001).

Walau bagaimanapun, ujian yang lazim digunakan untuk mendiagnosis toksokariasis adalah melalui kaedah serologi. Antara antigen yang digunakan adalah antigen somatik terlarut yang terhasil daripada larva atau cacing dewasa. Namun begitu, antigen somatik ini menunjukkan tindak balas silang dengan jangkitan cacing *A. lumbricoides* (Girdwood *et al.*, 1978). Antigen lain yang turut digunakan adalah antigen somatik L2 terlarut, ekstrak telur embrio terlarut (TEE), antigen dewasa terlarut (AWA) dan antigen rekombinan. Berkenaan jenis asai pula, kebanyakan asai yang digunakan adalah ujian asai imunosorben untaian enzim secara tak-langsung (*indirect-ELISA*). Bentuk format asai lain yang boleh digunakan adalah radioiodinasi, blot Western, ELISA berlawanan antibodi secara tak-langsung (IACE), ujian aglutinasi lateks, ujian radio-allergosorbent, ujian antibodi fluorezen tak-langsung (IFAT), ujian antibodi fluorezen langsung (DFAT), ujian antibodi fluorezen tak-langsung-sianidbromida (CNBr-IFAT), ujian hemaglutinasi, ujian fluorezen *in-vitro*, ELISA “sandwich”, imunoelektroforesis kaunter (CIEP), ujian penembusan gel ganda dua (DGDT), ujian kertas imunosorben (PRIST) dan ujian pantas *Toxocara*CHEK (Akao *et al.*, 1997). Sebagai tambahan, terdapat beberapa lagi ujian yang dapat membantu bagi pengesanan diagnosis klinikal iaitu ujian sensitiviti intradermal, kelompok “bentonite”, fiksasi komplemen, presipitasi larva serta presipitasi tiub kapilari (Mirdha & Khokar, 2002). Keseluruhan maklumat ujian ini ditunjukkan pada Lampiran 2 (rujuk bahagian lampiran).

Antigen yang menjadi pilihan utama bagi pengesanan jangkitan toksokara ialah TES. Penggunaan TES mula dilaporkan oleh de Savigny *et al.* pada tahun 1975. TES

ini diperolehi melalui teknik pengkulturan larva (L2) *T. canis* secara *in vitro* dan digunakan dalam kebanyakan ujian asai terutama ELISA. Gabungan antigen TES dan asai ELISA ini dapat membantu dalam meningkatkan sensitiviti dan spesifisiti ujian serologi bagi diagnosis toksokariasis berbanding antigen lain yang telah dinyatakan terdahulu.

Secara umumnya, kebanyakan penyelidikan diagnosis toksokariasis dijalankan oleh para penyelidik menggunakan antigen TES. Kebanyakan ujian asai yang terdapat di pasaran kini menggunakan antigen TES seperti yang dilaporkan oleh de Savigny *et al.* (1975). Sebagai contoh kit IgG-EIA (Cypress Diagnostics, Belgium), IgG-ELISA (Pharmacia Diagnostics, German) (Jacquier *et al.*, 1997) dan lain-lain seperti ditunjukkan dalam jadual 1.7.1. Kesemua ujian ini memberi tahap sensitiviti dan spesifisiti yang berlainan. Nilai yang berbeza ini mungkin bergantung kepada setiap eksperimen yang dijalankan bagi penyediaan antigen ini iaitu samada terkontaminasi dengan antigen terlarut daripada larva yang mati atau telah mengalami degenerasi.

Dua jenis ujian diagnosis yang bukan berasaskan mikroplat ELISA ialah blot Western (WB) dan ujian pantas imunokromatografi yang berbentuk dipstik, contohnya iaitu ToxocaraCHEK. Kedua-dua ujian ini menggunakan antigen TES. Magnaval *et al.* (1991) melaporkan bahawa serum pesakit toksokariasis yang positif boleh dipastikan dengan membuat ujian susulan menggunakan kit WB dengan kehadiran jalur bermolekul rendah di antara 24 hingga 35 kDa. Tindak balas positif IgG TES WB disahkan dengan kehadiran antibodi IgG yang bertindak balas dengan protein bersaiz 24, 28, 30 dan 35 kDa serta jalur bermolekul tinggi seperti 132, 147 dan 200 kDa. Walau bagaimanapun, tindak balas yang tidak spesifik wujud kerana serum mudah bertindak balas dengan jalur protein bermolekul tinggi daripada individu yang mempunyai pelbagai jangkitan cacing (Park *et al.*, 2000).

Kit ujian pantas ToxocaraCHEK (EY Laboratories, Inc., Hong Kong) menggunakan antigen TES yang diimobilisasi di atas membran nitroselulosa dan antibodi daripada serum akan mengikat pada antigen ini. Perlekatan kompleks antigen-antibodi dikenal pasti dengan penambahan konjugat emas protein koloidal A. Sekiranya berlaku tindak balas positif, satu titik merah akan terbentuk di atas membran tersebut (Akao *et al.*, 1997; Dubinsky *et al.*, 2000). Melalui penggunaan kit ini, keputusan dapat diperolehi dalam masa 3 minit sahaja . Namun begitu, terdapat kekurangan apabila menggunakan kit ini iaitu sekiranya serum digunakan pada kepekatan yang tinggi (1:2), tindak balas jangkitan silang berlaku. Satu kajian perbandingan telah dijalankan di antara ELISA NOVUM, ELISA PU dan ToxocaraCHEK; keputusannya membuktikan kit ToxocaCHEK kurang spesifik dan hanya sesuai sebagai ujian saringan sahaja (Dubinsky *et al.*, 2000).

Terkini, pilihan terbaik untuk mendiagnosis toksokariasis adalah dengan menggunakan TES IgG-ELISA sebagai ujian saringan diikuti pengesahan dengan beberapa ujian lain termasuklah TES IgE-ELISA dan WB (Lynch *et al.*, 1988, Magnaval *et al.*, 1991, Magnaval *et al.*, 1992; Mirdha *et al.*, 2002). Daripada pengalaman dan kajian yang dilakukan oleh Rahmah *et.al* (2005), peningkatan spesifisiti juga boleh dicapai dengan menggunakan IgG4 TES-ELISA dan WB dalam pengesahan dan saringan hasil keputusan IgG ELISA.

**Jadual 1.7.1:** Kit komersial yang terdapat dipasaran dengan sensitiviti dan spesifisiti tertentu.

No.	Kit	Syarikat/Pengeluar	Spesifisiti (%)	Sensitiviti (%)
1.	ToxocaraCHEK (3mins rapid test)	E.Y. Laboratories, Inc., USA	96	100
2.	Novum <i>Toxocara canis</i> IgG/IgM ELISA	NOVUM Diagnostica, GMBH, Germany	80	96.7
3.	ELISA PU	Parasitological Institut SAS, Germany	82.8	96.7
4.	Toxocara Western Blot-G Kit (WB-IgG)	LDBIO Diagnostic, France	Tidak dinyatakan	Tidak dinyatakan
5.	<i>Toxocara canis</i> ELISA kit	Bordier Affinity Products SA, Switzerland	Tidak dinyatakan	>90
6.	<i>Toxocara</i> Microwell serum ELISA (Cat No. 8206-3)	Diagnostic Automation, Inc., USA	87.5	93.3
7.	ELISA <i>Toxocara</i> Ab Cypress Diagnostic IgG	Cypress Diagnostics, Belgium	98	86
8.	Nova Tec IgG ELISA	GMBH, Immunodiagnostica, Germany	97	93
9.	DRG <i>Toxocara canis</i> IgG (EIA-3865)	DRG International, Inc., USA	Tidak dinyatakan	Tidak dinyatakan
10.	EIA <i>Toxocara canis</i> IgG	TEST-LINE s.r.o., Clinical Diagnostics, Czech Republic	Tidak dinyatakan	Tidak dinyatakan
11.	<i>Toxocara</i> antibody IgG by ELISA	ARUP Laboratories, Inc., USA	Tidak dinyatakan	Tidak dinyatakan
12.	<i>Toxocara</i> CELISA Kit (Cat No. Z1KT2)	TCS Bioscience Ltd.,UK	Tidak dinyatakan	Tidak dinyatakan
13.	RIDASCREEN® <i>Toxocara</i> IgG test (Cat No. K7421)	R-Biopharm Clinical Diagnostic, Germany	Tidak dinyatakan	Tidak dinyatakan
14.	<i>Toxocara</i> IgG CELISA Kit (Cat No. KT3)	Cellabs Pt. Ltd., Australia	Tidak dinyatakan	Tidak dinyatakan
15.	Melotest <i>Toxocara</i> Antibody	Melotec Biotechnology, SA, Barcelona, Spain.	Tidak dinyatakan	Tidak dinyatakan

(Adaptasi daripada Bab 7: Smith, H. & Rahmah, N. (2006). CABI Publishing USA.

### 1.7.2 Diagnosis penyakit OLM

Sekiranya seseorang pesakit mengadu sakit di bahagian mata dan disyaki menghidap OLM, cecair okular akues dan vitreus adalah sampel rujukan yang terbaik. Satu kajian telah melaporkan penggunaan TEE untuk mengesan kehadiran antibodi anti-toksokara pada lima orang pesakit OLM. Hasil keputusannya menunjukkan satu daripada mereka mempunyai antibodi titer yang tinggi di dalam cecair vitreus berbanding serum yang diuji (Biglan *et al.*, 1979). Satu kajian lain telah membandingkan penggunaan TES-ELISA yang spesifik terhadap IgG dan TES-RAST yang spesifik terhadap IgE ke atas dua belas orang pesakit yang disyaki menghidap OLM. Hasil mendapati asai IgE memberikan tahap sensitiviti yang lebih baik dan mereka mengesyorkan kedua-dua ujian ini perlu dilakukan bersama dalam mendiagnosis OLM. IgG TES WB adalah lebih sensitif berbanding IgE TES ELISA terutama dengan kehadiran jalur protein molekul rendah (24-35 kDa) dan spesifik apabila wujudnya jalur protein molekul tinggi (Magnaval *et al.*, 1991; Magnaval *et al.*, 2002). Walau bagaimanapun, IgE TES-ELISA juga sensitif (63.2%) dan spesifik (76.2%) apabila nilai batasan titik (COV) melebihi 5 unit toksokara (TU). Terdapat kajian selanjutnya yang membuktikan bahawa IgG TES WB dan IgE TES-ELISA dapat mengesan lima pesakit OLM dan memberikan reaksi yang positif (Park *et al.*, 2000).

Selain itu, terdapat juga kajian perbandingan tahap sensitiviti dan spesifisiti di antara antigen TES dan TEE menggunakan kaedah ELISA terhadap pesakit OLM. Hasil keputusan menunjukkan TES-ELISA adalah lebih baik berbanding TEE-ELISA dalam pengenalpastian manifestasi OLM (Glickman *et al.*, 1995). Dengan itu, IgG TES WB bersama dengan IgE TES-ELISA adalah ujian yang saling melengkapi dalam membantu mendiagnosis cecair vitreus dan serum OLM (Magnaval *et al.*, 2002).



Sebagai tambahan kepada keputusan serologi positif OLM, ujian pengimejan radiologi juga boleh digunakan sebagai ujian pengesahan diagnosis OLM iaitu menggunakan kaedah media legap ultrasonografi, ultrasound, CT dan MRI (Schantz & Glickman, 1978; Sabrosa & de Souza, 2000).

Walau bagaimanapun secara keseluruhannya, didapati penggunaan TES adalah kurang sesuai di negara tropika yang prevalen dengan jangkitan cacing bawaan tanah (Maizels *et al.*, 1984, Lynch *et al.*, 1988, Jacquier *et al.*, 1991, Magnaval *et al.*, 1991, Camargo *et al.*, 1992, Nunes *et al.*, 1997; Rahmah *et al.*, 2005). Selain itu, hasil ujian menggunakan TES memberikan keputusan yang kurang spesifik akibat jangkitan silang oleh antibodi yang terhasil oleh kebanyakan STH. Terkini, terdapat beberapa jenis antigen rekombinan yang berpotensi untuk digunakan dalam pembangunan ujian diagnosis bagi toksokariasis, contohnya rTES-30 (Yamasaki *et al.*, 1998 & 2000) dan TES-120 (Page & Maizels, 1992, Maizels *et al.*, 1994; Fong *et al.*, 2003).

### **1.8 Rawatan penyakit toksokariasis**

Penyakit toksokariasis tidak mempunyai rawatan yang khusus. Amalan pencegahan adalah lebih baik daripada rawatan. Contoh ubat yang boleh digunakan dalam rawatan toksokariasis VLM adalah dietilkarbamazine (DEC) (2 mg/kg selama 1 hingga 2 minggu), mebendazol (100-200 mg untuk 5 hari) dan albendazol (400 mg untuk 3 hingga 5 hari). Bagi pesakit toksokariasis OLM pula, antihistamin boleh digunakan untuk kes yang sederhana, kortikosteroid, prednisolone, ivermektin, analgesik untuk mengurangkan inflamasi dan tindak balas alergik, antibiotik untuk mengurangkan infeksi dan pelbagai ubat antihelmin yang lain untuk membunuh larva di dalam retina mata. Selain itu, vitrektomi, penggunaan laser fotokoagulasi dan kriopeksi adalah antara alternatif rawatan toksokariasis OLM (Despommier 2003; Magnaval & Glickman, 2006).