

PEMBANGUNAN ASAI AMPLIFIKASI ISOTERMA
BERPENGANTARA GELUNG (LAMP) UNTUK
PENGESANAN MIKROSPORIDIA
(*ENTEROCYTOZON BIENEUSI*)
DALAM SPESIMEN TINJA
MANUSIA

SITI NUR SU'AIDAH BINTI NASARUDIN

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

PEMBANGUNAN ASAI AMPLIFIKASI ISOTERMA BERPENGANTARA
GELUNG (LAMP) UNTUK PENGESANAN MIKROSPORIDIA
(*ENTEROCYTOZON BIENEUSI*) DALAM
SPESIMEN TINJA MANUSIA

SITI NUR SU' AIDAH BINTI NASARUDIN

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH SARJANA
SAINS PERUBATAN (PARASITOLOGI)

FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR

2017

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

Tarikh: 7 Februari 2017

SITI NUR SU'AIDAH BINTI NASARUDIN

P73038

PERAKUAN TESIS SARJANA /DOKTOR FALSAFAH
(CERTIFICATION OF MASTER'S / DOCTORAL THESIS)

Nama Penuh Pengarang
(Author's Full Name) : Siti Nur Su'aidah binti Nasarudin

No. Pendaftaran Pelajar
(Student's Registration No.) : P13038 Sesi Akademik
(Academic Session) : 2013/2014

Tajuk Tesis
(Thesis Title) : Pembangunan Asai Amplifikasi Isotermia
Berpengutara Gelung (LAMP) untuk Pengesanan
Mikrosporida (*Enterocytozoon bieneusi*) Dalam Specimen Tinja Manusia

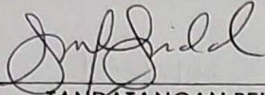
Merujuk kepada Klausula 4.2 Dasar Harta Intelek Pelajar UKM (Tambahan), tesis adalah hak milik pelajar. Saya mengaku tesis ini sebagai:
(With regard to Clause 4.2 of the UKM Student Intellectual Property Policy (Supplementary), the thesis is the student's property. I hereby declare this thesis as:)

- ☐ RAHSIA
(CONFIDENTIAL) Mengandungi maklumat rahsia di bawah AKTA RAHSIA RASMI 1972
(Consisting of classified information under the OFFICIAL SECRETS ACT 1972)
- ☐ TERHAD
(RESTRICTED) Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan
(Consisting of RESTRICTED information which has been determined by the organisation/body where the research was conducted)
- ☒ AKSES TERBUKA/TIDAK TERHAD Saya membenarkan tesis ini diterbitkan secara
(OPEN ACCESS/NON-RESTRICTED) akses terbuka, teks penuh atau dibuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
(I allow this thesis to be published through open access, full text or copied for study, learning and research purposes only.)

Bagi kategori Akses Terbuka/Tidak Terhad, saya membenarkan tesis (Sarjana/Doktor Falsafah) ini di simpan di Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM)* dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:
(For the Open Access/Non-Restricted category, I allow this (Master's/Doctoral) Thesis to be kept in the Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) Library with the following usage conditions:)

1. Perpustakaan UKM mempunyai hak untuk membuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
(UKM Library has the right to reproduce the thesis for study, learning and research purposes only.)
2. Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia dibenarkan membuat satu (1) salinan tesis ini untuk tujuan pertukaran antara institusi pengajian tinggi dan mana-mana badan/ agensi kerajaan, tertakluk kepada terma dan syarat.
(UKM Library is allowed to make one (1) copy of this thesis for exchange purpose among higher education institutions and any government body/agency, subject to terms and conditions.)

DISAHKAN OLEH:
(VERIFIED BY:)

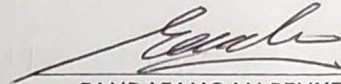


TANDATANGAN PELAJAR
(STUDENT'S SIGNATURE)

900827145288

KAD PENGENALAN /NO.PASPORT
(IDENTITY CARD/PASSPORT NO.)

Date: 15/2/2017



TANDATANGAN PENYELIA
(SUPERVISOR'S SIGNATURE)

DR. EMELIA OSMAN

NAMA PENYELIA
(SUPERVISOR'S NAME)

Date: 15/2/2017

PENGHARGAAN

Syukur Alhamdulillah kepada Allah S.W.T kerana memberikan saya kesihatan yang cukup, masa dan kematangan fikiran untuk menyiapkan kajian ini. Ungkapan ‘terima kasih’ yang tidak terhingga kepada penyelia utama saya iaitu Dr. Emelia Osman atas bantuan, semangat, nasihat dan kesabaran yang tinggi kepada saya sepanjang perjalanan kajian ini. Begitu juga kepada penyelia bersama saya, Dr. Alfizah Hanafiah yang banyak memberi tunjuk ajar, semangat dan dorongan kepada saya untuk menyiapkan kajian ini. Tidak dilupakan kepada Dr. Azmawati, semua kakitangan Jabatan Parasitologi & Entomologi Perubatan terutamanya, Cik Fatmah, Puan Mekadina, dan Puan Siti Nor Azreen, serta Mohd. Asif Sukri, pelajar Doktor Falsafah dari Jabatan Mikrobiologi Perubatan.

Kepada keluarga, ibu, ayah dan adik-adik sekalian yang merupakan pendorong utama saya, terima kasih yang tidak terhingga diucapkan. Rakan-rakan seperjuangan iaitu Shaza, Adilah, Hanim, Faizah, Adibah, Shazleen dan Azri, dari Jabatan Parasitologi & Entomologi Perubatan juga banyak meluangkan masa bersama memerah idea, tenaga bersama dalam menjayakan kajian masing-masing. Tidak dilupakan kepada rakan-rakan yang banyak membantu dari segi spiritual dan emosi. Tamatnya perjalanan Sarjana ini adalah titik permulaan kepada perjalanan saya dalam memberi sumbangan kepada bidang sains di dalam negara ini.

ABSTRAK

Mikrosporidia muncul sebagai patogen oportunistik dan kebanyakan jangkitannya menyebabkan diarea kronik pada pesakit terimunokompromi. Diagnosis rutin mikrosporidia bergantung kepada pemeriksaan mikroskopik menggunakan mikroskop cahaya. Namun, interpretasi slaid amat sukar kerana saiz sporanya yang terlalu kecil. Pengesanan molekular dengan kaedah tindak balas rantai polimerase (PCR) pula memakan masa dan memerlukan mesin kitaran terma yang membataskan penggunaannya terutama di makmal-makmal yang kekurangan peralatan. Amplifikasi isoterma berpengantara gelung (LAMP), adalah satu kaedah pengesanan molekular berprestasi tinggi yang merupakan satu alternatif praktikal yang agak mudah, pantas dan tidak memerlukan peralatan canggih. Oleh itu, tujuan kajian ini adalah untuk membangunkan asai LAMP bagi mengesan DNA *Enterocytozoon bieneusi* dalam spesimen tinja manusia. Empat primer khusus untuk *E. bieneusi* telah direkabentuk sepadan dengan jujukan gen SSU rRNA dan diuji ke atas 100 sampel tinja yang diperoleh daripada Orang Asli. Teknik LAMP dilakukan pada ketetapan suhu 60°C selama satu jam. Produk amplifikasi dianalisa menggunakan reagen pengesanan pendarfluor (FDR) dan elektroforesis gel. Sebanyak 39 daripada 100 sampel tinja (39%) adalah disahkan positif terhadap *E. bieneusi* menggunakan LAMP berbanding PCR (33/100; 33%) dan pemeriksaan mikroskopik (32/100; 32%). Sensitiviti, spesifisiti dan persetujuan diagnostik di antara pemeriksaan mikroskopik, PCR dan LAMP juga telah dinilai dan dibandingkan. LAMP memberikan nilai sensitiviti sebanyak 94% dan spesifisiti 88% berbanding pemeriksaan mikroskopik (sensitiviti = 48%, spesifisiti = 76%). Tiada perbezaan signifikan dalam pengesanan positif *E. bieneusi* didapati oleh ketiga-tiga kaedah ini (nilai- $p = 0.530$). Bagaimanapun, LAMP mempamerkan persetujuan diagnostik yang teguh dengan PCR ($\kappa = 0.78$) manakala persetujuan diagnostik yang wajar ditunjukkan di antara kaedah pemeriksaan mikroskopik dan PCR ($\kappa = 0.25$). Kesimpulannya, asai LAMP *E. bieneusi* telah berjaya dibangunkan dan aplikasinya di makmal-makmal diagnostik adalah disyorkan untuk pengesanan *E. bieneusi* yang lebih sensitif dan spesifik dalam spesimen tinja manusia.

**DEVELOPMENT OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION
ASSAY (LAMP) FOR DETECTION OF MICROSPORIDIA
(*ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI*) IN
HUMAN FAECAL SPECIMENS**

ABSTRACT

Microsporidia emerged as an opportunistic pathogen and mostly cause chronic diarrhoea in immunocompromised patients. Routine diagnosis of microsporidia relies on microscopic examination using light microscopy. However, the interpretation of the slides can be very difficult since the spores are too small. Molecular detection by polymerase chain reaction (PCR) method is time consuming and requires thermocycler, which limits its uses especially in resource poor laboratories. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), a high-performance molecular detection method is a practical alternative as it is relatively simple, rapid and does not require sophisticated equipment. Thus, this study aimed to develop LAMP assay for detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA from human faecal specimens. Four specific primers for *E. bieneusi* were designed corresponding to SSU rRNA gene sequences and tested on 100 faecal samples obtained from aborigines. LAMP technique was performed at a constant temperature of 60°C for one hour. The amplified products were analysed using fluorescent detection reagent (FDR) and gel electrophoresis. A total of 39 out of 100 faecal specimens (39%) were confirmed positive for *E. bieneusi* by LAMP as compared to PCR (33/100; 33%) and microscopic examination (32/100; 32%). Sensitivity, specificity and the diagnostic agreement among microscopic examination, PCR and LAMP were also evaluated and compared. LAMP yielded 94% sensitivity and 88% specificity compared to microscopic examination (sensitivity = 48%, specificity = 76%). No significant differences in positive detection of *E. bieneusi* were found among the three methods (p-value = 0.530). However, LAMP exhibited a substantial diagnostic agreement with PCR (κ = 0.78), whereas fair diagnostic agreement was shown between microscopic examination technique and PCR (κ = 0.25). In conclusion, *E. bieneusi* LAMP assay was successfully developed and its application in diagnostic laboratories is recommended for more sensitive and specific detection of *E. bieneusi* in human faecal specimens.

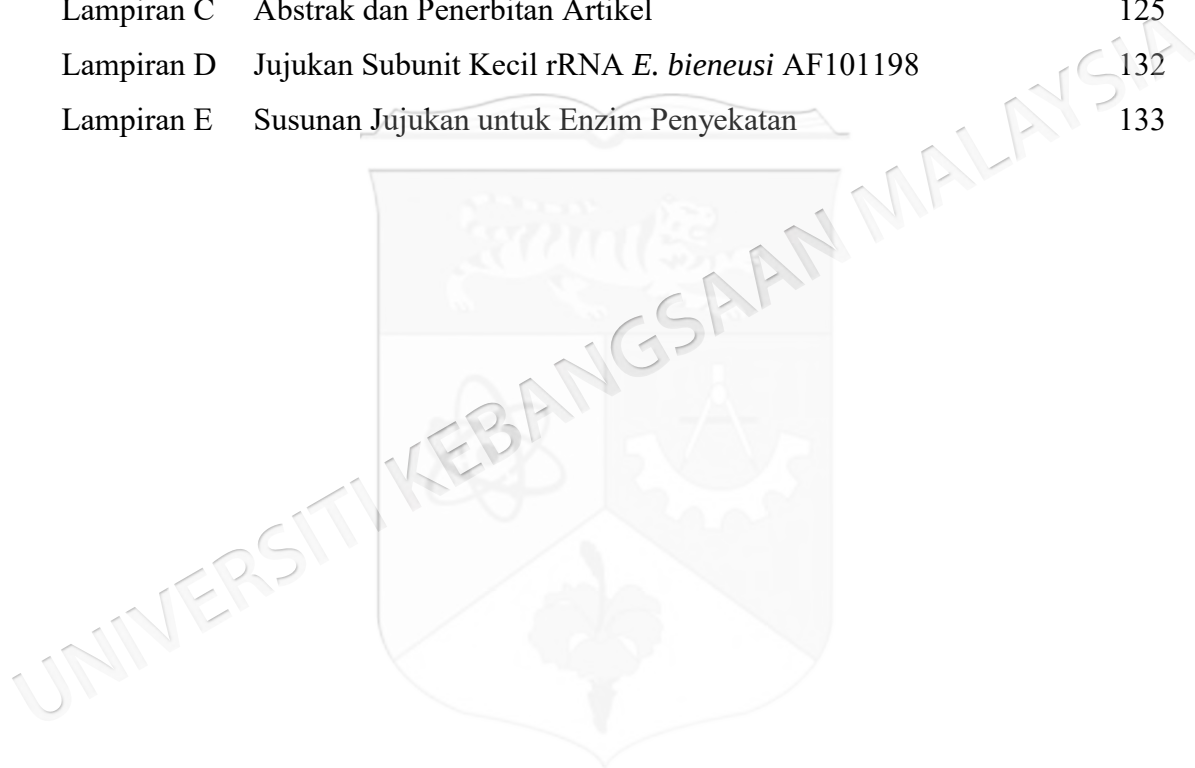
KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	x
SENARAI ILUSTRASI	xi
SENARAI SIMBOL	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv
SENARAI TATANAMA	xv
SENARAI ISTILAH	xvi
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Justifikasi Kajian	3
1.3 Objektif Kajian	5
1.3.1 Objektif umum	5
1.3.2 Objektif spesifik	5
 BAB II ULASAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Taksonomi dan Sejarah Penemuan Filum Mikrosporidia	6
2.2 Biologi Mikrosporidia	7
2.2.1 Morfologi microsporidia	7
2.2.2 Kemandirian spora di persekitaran	8
2.2.3 Kitaran hidup mikrosporidia	9
2.3 Genus dan Spesies-Spesifik Mikrosporidia	11
2.3.1 <i>Enterocytozoon</i>	12
2.3.2 <i>Encephalitozoon</i>	12
2.4 Epidemiologi Mikrosporidia	13
2.4.1 Prevalens dan taburan geografi	13
2.5 Sumber Infeksi dan Transmisi	15
2.5.1 Transmisi zoonosis	15

2.5.2	Transmisi antroponotik	16
2.5.3	Transmisi bawaan air	17
2.5.4	Transmisi bawaan makanan	18
2.6	Manifestasi Klinikal	19
2.6.1	Populasi imunokompeten	20
2.6.2	Populasi positif HIV	21
2.6.3	Penerima organ transplan	22
2.6.4	Pesakit barah	22
2.7	Patogenesis	22
2.8	Rawatan dan Pengurusan	23
2.9	Pencegahan	25
2.10	Diagnosis Makmal Mikrosporidia	26
2.10.1	Pengumpulan sampel	26
2.10.2	Mikroskop elektron pancaran (TEM)	26
2.10.3	Sitologi dan histologi	27
a.	Sitologi	28
b.	Histologi	28
2.10.4	Mikroskop cahaya	29
2.10.5	Kultur sel	31
2.10.6	Kaedah berasaskan antigen	32
2.10.7	Serologi	32
2.10.8	Kaedah berasaskan molekul	33
2.11	Amplifikasi Isoterma Berpengantara Gelung (LAMP)	35
2.11.1	Sejarah dan pembangunan LAMP	35
2.11.2	Prinsip LAMP	36
2.11.3	Reka bentuk primer LAMP	39
2.11.4	Visualisasi produk amplifikasi LAMP	40
2.11.5	Kelebihan dan kekurangan LAMP	43
2.11.6	Aplikasi LAMP untuk diagnosis parasit	44
BAB III	METODOLOGI	
3.1	Kaedah Kajian	46
3.1.1	Reka bentuk kajian	46
3.1.2	Tempoh masa kajian	46
3.1.3	Sumber sampel	46
3.2	Penyediaan Sampel Kawalan Positif	47
3.2.1	Sampel klinikal tinja <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	47
3.2.2	Sel kultur <i>Encephalitozoon hellem</i> dan <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	47
a.	Kultur sel Vero	48
b.	Penyediaan kultur genus <i>Encephalitozoon</i>	48
3.2.3	DNA sintetik <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	49

3.3	Pemeriksaan Mikroskopik	49
3.4	Pengekstrakan DNA Sampel Tinja	51
3.5	Pengekstrakan DNA Dari Kultur Sel	52
3.6	Amplifikasi Reaksi Rantai Polimerase (PCR)	53
3.6.1	Amplifikasi PCR untuk spesies <i>E. bieneusi</i> , <i>E. hellem</i> dan <i>E. intestinalis</i>	53
3.6.2	Amplifikasi PCR untuk spesies <i>E. cuniculi</i>	53
3.7	Elektroforesis Gel	55
3.8	Analisa Jujukan	56
3.9	Amplifikasi Isoterma Berpengantara Gelung (LAMP) <i>E. bieneusi</i>	56
3.9.1	Reka bentuk primer LAMP	56
3.9.2	Primer	62
3.9.3	Pengoptimuman dan pemilihan set primer LAMP	62
3.9.4	Amplifikasi LAMP	63
3.9.5	Pengesanan produk LAMP	63
3.9.6	Pencernaan produk LAMP	64
3.10	Sensitiviti dan Spesifisiti	66
3.10.1	Sensitiviti dan spesifisiti analitikal	66
3.10.2	Sensitiviti dan spesifisiti klinikal	67
3.11	Analisis Statistik	68
3.12	Carta Alir Metodologi Kajian	69
BAB IV	HASIL KAJIAN	
4.1	Hasil Penyediaan Kultur <i>Encephalitozoon</i>	70
4.2	Keputusan Pemeriksaan Mikroskop Cahaya	71
4.3	Keputusan Amplifikasi PCR	73
4.3.1	Amplifikasi PCR <i>E. bieneusi</i>	73
4.3.2	Amplifikasi PCR <i>Encephalitozoon</i> spp.	74
4.3.3	Keputusan penjujukan produk PCR	79
4.4	Keputusan Amplifikasi LAMP <i>E. bieneusi</i>	79
4.4.1	Pemilihan set primer LAMP	79
4.4.2	Analisa keputusan amplifikasi LAMP	84
4.4.3	Pengoptimuman dan pencernaan enzim <i>MaeII</i>	87
4.5	Analisa Spesifisiti dan Sensitiviti	88
4.5.1	Spesifisiti dan sensitiviti analitikal	88
4.5.2	Spesifisiti dan sensitiviti klinikal	92
4.6	Analisa Statistik	94

BAB V	PERBINCANGAN	95
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARANAN	102
RUJUKAN		104
LAMPIRAN		
Lampiran A	Pengesahan Kelulusan Etika Oleh Jawatankuasa Etika UKM	123
Lampiran B	Senarai Penerbitan dan Persidangan	124
Lampiran C	Abstrak dan Penerbitan Artikel	125
Lampiran D	Jujukan Subunit Kecil rRNA <i>E. bieneusi</i> AF101198	132
Lampiran E	Susunan Jujukan untuk Enzim Penyekatan	133



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
2.1	Kadar prevalens mikrosporidia manusia di Malaysia	15
2.2	Manifestasi klinikal umum mengikut spesies	19
3.1	Penyediaan bahan pewarna untuk teknik GCK	50
3.2	Primer-primer spesies-spesifik <i>E. bieneusi</i> dan <i>Encephalitozoon</i> spp.	54
3.3	Kondisi kitaran PCR	55
3.4	Jujukan bagi set primer I untuk teknik LAMP <i>E. bieneusi</i> (nombor induk Genbank AF101198)	57
3.5	Jujukan bagi set primer II untuk teknik LAMP <i>E. bieneusi</i> (nombor induk Genbank L16868 dan L07123)	57
4.1	Keputusan pemeriksaan 100 spesimen tinja Orang Asli dan bilangan spora mikrosporidia menggunakan teknik mikroskop	72
4.2	Keputusan amplifikasi PCR untuk spesies <i>E. bieneusi</i> dan <i>Encephalitozoon</i> spp. bagi 100 spesimen tinja Orang Asli	78
4.3	Keputusan analisa jujukan produk positif-PCR yang telah dihantar untuk pengesahan lanjut	79
4.4	Keputusan amplifikasi LAMP untuk spesies <i>E. bieneusi</i> bagi 100 spesimen tinja Orang Asli	86
4.5	Hasil analisa sensitiviti dan spesifisiti diagnostik asai LAMP dan mikroskop untuk mengesan <i>E. bieneusi</i> daripada spesimen tinja Orang Asli menggunakan PCR sebagai ujian rujukan	93
4.6	Analisa statistik antara teknik LAMP dan mikroskop menggunakan PCR sebagai ujian rujukan	94

SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
2.1	Gambaran struktur spora mikrosporidia secara umum	8
2.2	Tiga fasa utama kitaran hidup mikrosporidia	10
2.3	Perbezaan proses kitar hidup mikrosporidia menurut spesies	11
2.4	Hubungan makanan-air antara mikrosporidia dan jangkitan manusia	19
2.5	Spora mikrosporidia yang telah diwarna untuk pemeriksaan di bawah mikroskop	30
2.6	Gambaran skematik mekanisme LAMP	38
2.7	Lapan kawasan sasaran gen untuk mereka set primer LAMP	39
2.8	Visualisasi produk LAMP dengan mata kasar	42
3.1	Gambaran penggunaan aplikasi LAMP Designer	58
3.2	Cara penggunaan perisian untuk mengelak kawasan homologi semasa merekabentuk primer LAMP	59
3.3	Pemilihan set primer alternatif	59
3.4	Set primer I untuk LAMP <i>E. bieneusi</i> DNA	60
3.5	Set primer II untuk LAMP <i>E. bieneusi</i> DNA	61
3.6	Jujukan nukleotida AF101198 digunakan untuk merekabentuk primer-primer dalaman dan luaran	65
3.7	Ilustrasi skematik berbentuk linear struktur produk akhir DNA	66
4.1	Pemantauan strain <i>Encephalitozoon</i> spp. menggunakan sel Vero di bawah mikroskop	71
4.2	Spora mikrosporidia di dalam sampel tinja yang telah diwarnakan menggunakan pewarnaan GCK di bawah mikroskop cahaya	72
4.3	Elektroforesis produk amplifikasi PCR dari DNA <i>E. bieneusi</i>	74
4.4	Elektroforesis produk amplifikasi PCR dari DNA <i>E. intestinalis</i>	75
4.5	Elektroforesis optimasi suhu penyepuhlindapan PCR <i>E. intestinalis</i>	76
4.6	Elektroforesis produk PCR untuk pengesanan <i>E. intestinalis</i>	77
4.7	Elektroforesis produk PCR untuk pengesanan <i>E. hellem</i>	77
4.8	Elektroforesis produk PCR untuk pengesanan <i>E. cuniculi</i>	78
4.9	Elektroforesis gel produk LAMP menggunakan set primer I	81
4.10	Elektroforesis gel produk LAMP menggunakan set primer II	82

4.11	Amplifikasi LAMP <i>E. bieneusi</i> menggunakan kawalan positif <i>E. hellem</i> , <i>E. cuniculi</i> dan <i>E. intestinalis</i> untuk menguji spesifisiti dan kualiti set primer I	83
4.12	Amplifikasi LAMP <i>E. bieneusi</i> menggunakan kawalan positif <i>E. hellem</i> , <i>E. cuniculi</i> dan <i>E. intestinalis</i> untuk menguji spesifisiti dan kualiti set primer II	84
4.13	Produk amplifikasi LAMP yang diperhatikan di bawah cahaya normal	85
4.14	Produk amplifikasi LAMP yang diperhatikan di bawah cahaya UV	85
4.15	Elektroforesis produk LAMP yang telah diamplifikasi	86
4.16	Pencernaan produk amplifikasi LAMP <i>E. bieneusi</i> selama 8 jam menggunakan enzim pengekatan <i>MaeII</i>	87
4.17	Analisis pencernaan produk amplifikasi LAMP <i>E. bieneusi</i> dari spesimen tinja	88
4.18	Tahap pengesanan minimum DNA <i>E. bieneusi</i> diuji untuk asai PCR menggunakan kepekatan spora yang telah diketahui	89
4.19	Tahap pengesanan minimum DNA <i>E. bieneusi</i> diuji untuk asai LAMP menggunakan kepekatan spora yang telah diketahui	90
4.20	Elektroforesis asai LAMP <i>E. bieneusi</i> diuji ke atas spesies parasit bukan sasaran	91
4.21	Elektroforesis asai LAMP <i>E. bieneusi</i> diuji ke atas kawalan positif <i>Encephalitozoon</i> spp.	92

SENARAI SIMBOL

$^{\circ}\text{C}$	unit suhu, darjah Celcius
μm	unit jarak, mikrometer
μg	unit jisim, mikrogram
pg	unit jisim, pikogram
mg	unit jisim, miligram
g	unit jisim, gram / unit pengemparan, daya g
μl	unit isi padu, mikroliter
ml	unit isi padu, mililiter
mm^3	unit isi padu, milimeter padu
$\%$	peratus
rpm	unit pengemparan, revolusi per minit
bp	pasangan bes
spp.	spesies
n	nombor natural
χ^2	nilai khi kuasa dua
p	nilai p
κ	unit Kappa
pH	ukuran keasidan atau kealkalian sesuatu larutan
T_m	suhu lebur
U	unit enzim
μM	kepekatan molar, mikromolar
mM	kepekatan molar, milimolar

SENARAI SINGKATAN

et al.	dan pengarang-pengarang lain
no.	nombor
min	minit
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M



SENARAI TATANAMA

Tris-HCL	Tris-hidroklorida
KCl	Kalium klorida
MgSO ₄	Magnesium sulfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammonium sulfat
P ₂ O ₇ ⁴⁻	Ion pirofosfat
Mg ²⁺	Ion magnesium
Mg ₂ P ₂ O ₇	Magnesium pirofosfat



SENARAI ISTILAH

HIV	Virus kurang daya tahan manusia
AIDS	Sindrom kurang daya tahan penyakit
SSU RNA	Subunit kecil asid ribonukleik
LSU RNA	Subunit besar asid ribonukleik
DNA	Asid deoksibonukleik
CD4	Sel T penolong
USEPA	Agensi Perlindungan Alam Amerika Syarikat
CCL1	Senarai Calon Mikrobial Bahan Cemar I
NIH	Institut Kesihatan Kebangsaan
CDC	Kawalan Penyakit Berjangkit
SCT	Hematopoietik sel tunjang
TNF α	Faktor alpha nekrosis tumor
HAART	Terapi aktif antiretrovirus
BAL	Cecair lavaj bronkoalveolar
CSF	Cecair serebrospina
TEM	Mikroskop elektron pancaran
GCK	Gram kromotrop Kinyoun
UV	Ultraungu
ELISA	Asai imunoserap terangkai enzim
IFA	Asai imunopendafluor
CIA	Asai karbon imuno
PCR	Reaksi rantai polimerase
IGS	Kawasan penjarak intergen
FISH	Hibridisasi pendarfluor in situ
LAMP	Amplifikasi isoterma berpengantara gelung
F3	Primer luaran ke depan
B3	Primer luaran ke belakang
FIP	Primer dalaman ke depan
BIP	Primer dalaman ke belakang
LF	Primer gelung ke depan
LB	Primer gelung ke belakang/ Penimbal asid litium boric

dNTP	Deoksinukleotida trifosfat
HPLC	Kromatografi cecair prestasi tinggi
FDR	Reagen pengesanan pendarfluor
PAA	Poliakrilmida
UNG	Urasil-DNA Glycosylase
UKM	Universiti Kebangsaan Malaysia
PPUKM	Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia
EDTA	Tripsin-asid etilena dwiaminotetra esetik
MEM	‘Minimun Essential Media’
FBS	Serum fetal bovin
ASL	Penimbal lisis tinja
AL	Penimbal lisis
AW1	Penimbal cuci 1
AW2	Penimbal cuci 2
AE	Penimbal elusi
OD	Ketumpatan optikal
BLAST	Alatan asas pencarian penjajaran setempat
PPV	Nilai ramalan positif
NPV	Nilai ramalan negatif

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Mikrosporidia ialah parasit bersel tunggal dan merupakan intraselular obligat yang mana pertumbuhannya bergantung kepada sumber-sumber sel perumah. Mikrosporidia juga dikaitkan dengan kumpulan kulat kerana ciri-ciri seperti kitin dan trehalosa yang terdapat pada parasit ini (Müller 1997). Spora mikrosporidia berupaya untuk tahan lama di persekitaran tidak kondusif kerana dinding spora yang bersifat tegar dan terdiri daripada tiga lapisan iaitu eksospora luaran berprotein, endospora berkitin dan membran plasma (Franzen & Müller 1999).

Parasit ini mampu menginfeksi kebanyakan invertebrata dan vertebrata termasuklah manusia. Sehingga kini, 17 spesies mikrosporidia telah dikenalpasti dan mampu menjangkiti manusia (Fayer & Santin-Duran 2014). Kes infeksi mikrosporidia pada manusia telah direkodkan pertama kali pada tahun 1959 dan hanya 10 kes infeksi manusia dilaporkan sebelum bermulanya pandemik virus imunodefisiensi manusia / sindrom kurang daya tahan penyakit (HIV/AIDS) (Franzen & Müller 1999; Mathis et al. 2005).

Mikrosporidia kini dianggap sebagai patogen manusia oportunistik dan sering dikaitkan bersama gejala cirit-birit kronik, sindrom susut badan dan penyakit tersebar pada pesakit AIDS (Franzen & Müller 2001; Didier 2005). Selain itu, mikrosporidiosis tidak hanya tertumpu pada golongan HIV/AIDS, jangkitan

juga dilaporkan berlaku pada pesakit negatif HIV, kanak-kanak malnutrisi, penerima organ pemindahan dan pesakit barah (Mohindra et al. 2002; Lono et al. 2008; Didier & Weiss 2011). Individu imunokompeten juga berpotensi untuk dijangkiti dan kebiasaannya mereka akan mengalami simptom diarea ataupun asimptomatik (van Gool et al. 1997; Didier & Weiss 2011). Di Malaysia, selain golongan pesakit imunokompromi, komuniti Orang Asli merupakan golongan imunokompeten yang berpotensi dikaitkan dengan infeksi mikrosporidia. Hal ini adalah disebabkan kadar infeksi parasit usus adalah tinggi bagi komuniti ini (Anuar et al. 2013).

Terdapat beberapa spesies mikrosporidia terutamanya *Encephalitozoon* spp. berupaya untuk tersebar ke organ-organ yang lain dari sistem gastrousus dan menyebabkan pelbagai sindrom klinikal seperti mikrosporidiosis okular, keratokonjunktivitis, sinusitis dan nefritis (Cali et al. 2011; Didier & Weiss 2011; Weiss 2014). *Enterocytozoon bienersi* pula merupakan spesies mikrosporidia paling umum menjangkiti manusia dan juga paling prevalens dalam kalangan pesakit positif HIV (Matos et al. 2012). Namun, infeksi *E. bienersi* jarang menyebabkan penyakit tersebar dan seringkali dikaitkan dengan simptom diarea kronik bagi individu terimunokompromi (Didier et al. 2004). Mikrosporidia juga telah dijumpai menjangkiti hampir kesemua organ badan manusia dan simptom mikrosporidiosis tersebar berbeza-beza mengikut lokasi infeksi, sistem imun pesakit dan spesies yang menginfeksi (Didier et al. 2004; Didier 2005).

Umumnya, pemeriksaan mikroskop elektron pancaran (TEM) adalah teknik piawai yang masih kekal hingga kini bagi diagnosis infeksi mikrosporidia dan untuk identifikasi spesies (Thellier & Breton 2008). Walaupun penggunaan TEM sangat spesifik, teknik ini memerlukan masa yang lama, peralatan yang mahal dan kepakaran khusus untuk mengenal pasti spesies mikrosporidia tersebut (Franzen & Müller 2001; Thellier & Breton 2008). Selain itu, teknik pewarnaan bagi penggunaan mikroskop cahaya pula tidak membenarkan pengenalpastian spesies mikrosporidia kerana saiz spora yang terlalu kecil (Didier & Weiss 2006; Verweij et al. 2007). Walaupun mikroskop cahaya lebih mudah berbanding TEM dan sensitif, tenaga pakar masih diperlukan untuk interpretasi slaid yang tepat. Selain itu, teknik molekular berasaskan reaksi rantai polimerase (PCR) untuk diagnosis spesies-spesifik infeksi mikrosporidia

telah berjaya dibangunkan (Zhu et al. 1993; Fedorko & Hijazi 1996; Franzen & Müller 2001). Bagaimanapun, kaedah ini juga memakan masa dan memerlukan penggunaan peralatan sofistikated serta mahal. Oleh itu, penggunaan teknik PCR terbatas terutamanya di kebanyakan makmal klinikal di negara-negara bukan perindustrian (Thellier & Breton 2008).

Disebabkan *Enterocytozoon* sp. dan *Encephalitozoon* spp. merupakan genera mikrosporidia yang paling umum menjangkiti manusia, satu lagi teknik molekular iaitu amplifikasi isoterma berpengantara gelung (LAMP) akan dibangunkan untuk pengesanan pantas spesies *Enterocytozoon* dan *Encephalitozoon* dalam spesimen tinja manusia untuk pertama kali. Berdasarkan beberapa laporan kajian yang diterbitkan, teknik molekular ini dikatakan lebih sensitif dan spesifik berbanding asai PCR (Karanis et al. 2007; Lau et al. 2010; 2011). Selain itu, prosedur LAMP juga amat mudah dan tidak memerlukan kitaran terma untuk melengkapkan proses amplifikasi tersebut (Notomi et al. 2000; Parida et al. 2008). Spesifisiti dan sensitiviti asai ini juga akan dinilai dan dibandingkan dengan kaedah pemeriksaan mikroskopi serta PCR.

1.2 JUSTIFIKASI KAJIAN

Diagnosis mikrosporidiosis usus secara tradisinya bergantung kepada visualisasi spora secara langsung menggunakan sama ada mikroskop cahaya atau TEM atau kedua-duanya. Walaupun teknik TEM masih kekal sebagai piawai emas dan dapat mendiagnosis spesifik-spesies, teknik ini mengambil masa yang terlalu lama bagi penyediaan sampel (Franzen & Müller 2001; Thellier & Breton 2008). Selain itu, teknik TEM tidak sesuai dijadikan sebagai diagnosis rutin kerana keperluan peralatan yang sangat mahal dan kurang sensitif (Weber et al. 1992; Thellier & Breton 2008; Ghosh et al. 2014).

Mikroskop cahaya umumnya digunakan di kebanyakan makmal sebagai diagnosis rutin untuk mengesan spora mikrosporidia di dalam sampel tinja manusia. Namun, interpretasi slaid agak sukar disebabkan kepelbagaian kualiti pewarnaan dan saiz spora yang sangat kecil (Franzen & Müller 2001; Didier et al. 2004; Verweij et al. 2007). Selain itu, prosedur pewarnaan juga memakan masa dan pengesanan spora

mikrosporidia memerlukan tenaga pakar yang dapat mengenalpasti spora tersebut dengan lebih tepat. Identifikasi spesies mikrosporidia yang menginfeksi juga tidak dapat ditentukan apabila menggunakan teknik mikroskop cahaya.

Identifikasi spesies-spesifik amat penting dan diperlukan dalam menentukan rawatan tertentu kepada pesakit. Hal ini disebabkan rawatan albendazol kurang memberi kesan efektif kepada spesies *E. bienersi*. Sebaliknya, albendazol lebih berkesan merawat kebanyakan spesies mikrosporidia yang lain terutamanya infeksi dari *Encephalitozoon* spp. (Dionisio et al. 1998; Molina et al. 1998; Maggi et al. 2000; Groß 2003). Menurut beberapa kajian yang telah diterbitkan, beberapa percubaan ubat yang berbeza seperti fumagilin, metranidazol, talidomida dan nitazoxanida telah diuji keberkesanannya dalam merawat spesies *E. bienersi* (Molina et al. 1997; 2002; Sharpstone et al. 1997; Bicart- See et al. 2000). Namun, beberapa siri kajian masih diperlukan untuk menilai serta memastikan tahap keberkesanan sesuatu rawatan terhadap infeksi *E. bienersi* secara konsisten.

Pengenalan teknik berasaskan molekul seperti kaedah PCR telah berjaya dibangunkan untuk mengesan infeksi mikrosporidia secara efektif dan kebanyakannya digunakan sebagai pengesahan lanjutan tentang sesuatu kes infeksi (Notermans et al. 2005; Chabchoub et al. 2009). Walau bagaimanapun, kaedah berasaskan PCR ini juga memakan masa disebabkan kitaran terma yang lama, mudah terdedah kepada kontaminasi dan memerlukan peralatan yang sofistikated dan mahal (Parida et al. 2008). Oleh itu, penggunaan kaedah PCR ini terhad kepada makmal-makmal yang mempunyai akses mudah terhadap keperluan peralatan molekul (Verweij et al. 2007).

Notomi et al. (2000) telah memperkenalkan dan membangunkan satu lagi kaedah amplifikasi asid nukleik yang terbaru iaitu amplifikasi isoterma berpengantara gelung (LAMP). Reaksi LAMP merupakan satu kitaran auto yang menyelar bebenang DNA untuk sintesis DNA bagi melengkapkan amplifikasi. LAMP juga menggunakan 4 atau 6 primer untuk mengenal 6-8 kawasan pada gen sasaran. Selain itu, teknik LAMP ini amat sensitif dan spesifik berbanding PCR (Notomi et al. 2000), di mana LAMP dapat mengamplifikasi sehingga 10^9 DNA salinan dalam masa satu jam di

bawah keadaan isoterma menggunakan blok haba atau rendaman air (Parida et al. 2008; Fakruddin 2011). Berbeza dengan produk PCR, produk positif LAMP akan mempunyai struktur DNA seperti bentuk kubis bunga disebabkan pembentukan gegelung berganda semasa amplifikasi.

Penerbitan pembangunan teknik LAMP oleh Notomi et al. 2000 juga telah menarik minat beberapa penyelidik untuk membangunkan teknik pengesanan virus, bakteria, parasit dan fungus dengan lebih sensitif dan spesifik berbanding teknik berasaskan PCR (Endo et al. 2004; Han et al. 2007; Qiao et al. 2007; Lau et al. 2010; Khan et al. 2012). Oleh itu, dalam kajian ini, satu asai LAMP telah dibangunkan untuk pengesanan mikrosporidia di dalam sampel tinja manusia. Teknik LAMP mikrosporidia ini juga dibandingkan dengan teknik PCR dan mikroskop cahaya. Kajian ini merupakan laporan yang pertama mengenai pembangunan pengesanan mikrosporidia untuk spesies *E. bienersi* menggunakan asai LAMP di dalam spesimen tinja manusia.

1.3 OBJEKTIF KAJIAN

1.3.1 Umum

Objektif umum kajian ini ialah untuk membangunkan kaedah amplifikasi isoterma berpengantara gelung (LAMP) untuk mengesan mikrosporidia dalam spesimen tinja manusia.

1.3.2 Spesifik

- 1) Mengesan spora mikrosporidia melalui kaedah mikroskop cahaya dengan menggunakan pewarnaan Gram-kromotrop Kinyoun (GCK).
- 2) Mengesan DNA dan mengidentifikasi spesies mikrosporidia menggunakan kaedah molekul iaitu LAMP dan PCR.
- 3) Membandingkan sensitiviti dan spesifisiti di antara kaedah LAMP dan pemeriksaan mikroskopi dengan menggunakan PCR sebagai kaedah rujukan bagi pengesanan mikrosporidia.

BAB II

ULASAN KEPUSTAKAAN

2.1 TAKSONOMI DAN SEJARAH PENEMUAN FILUM MIKROSPORIDIA

Mikrosporidia merupakan kumpulan parasit intraselular oportunistik yang besar dan pelbagai. Setakat ini, filum mikrosporidia terdiri daripada lebih 140 genus dan 1200 spesies. Menurut sejarah, mikrosporidia bermula sebagai patogen ulat sutera pada tahun 1857 dan menjangkiti hampir setiap filum haiwan (Franzen & Müller 1999; Keeling & Slamovits 2004). Kini, 17 spesies mikrosporidia telah diketahui menjangkiti manusia. Kes infeksi manusia pertama direkodkan pada tahun 1959 dan hanya 10 kes infeksi manusia telah dilaporkan sehingga tahun 1985 (Fayer & Santin-Duran 2014). Infeksi pertama oleh spesies *Enterocytozoon bieneusi* telah dilaporkan menjangkiti pesakit positif HIV pada tahun 1985 (Desportes et al. 1985). Sejak itu, banyak kes infeksi mikrosporidia telah dilaporkan di seluruh dunia dan kini dikenali sebagai antara patogen yang biasa menjangkiti pesakit HIV (Thellier & Breton 2008).

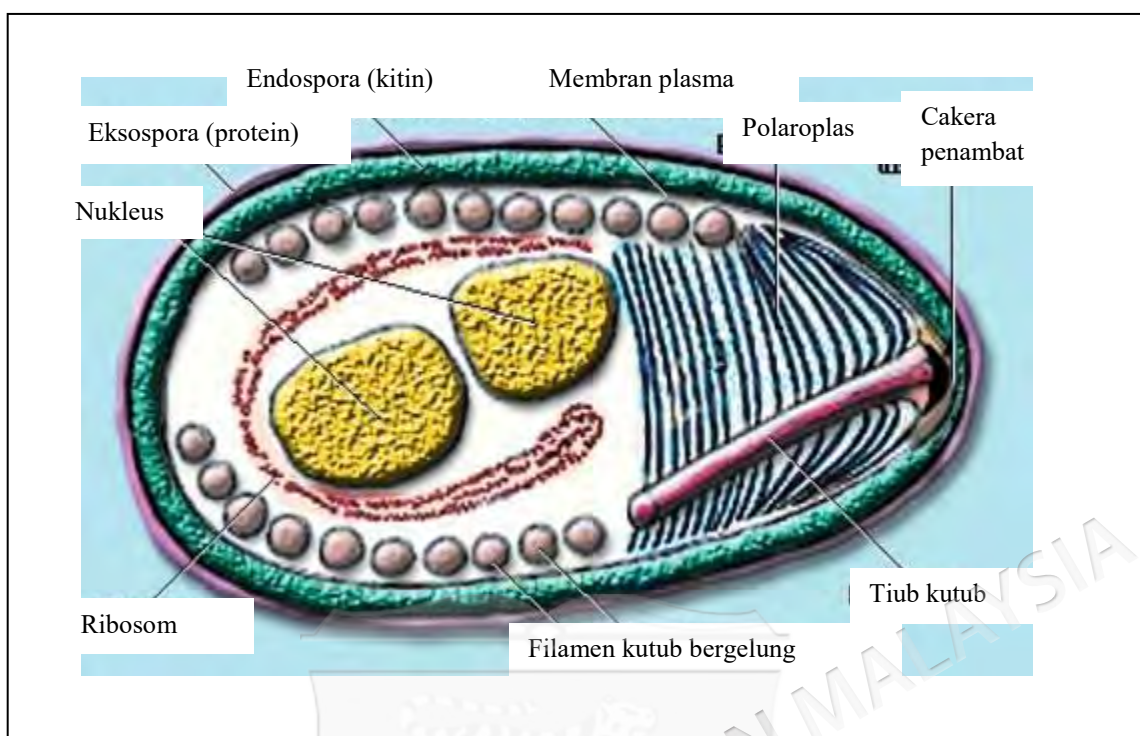
Vossbrinck et al. (1987) mencadangkan mikrosporidia sebagai organisma purba dan bersifat eukariot. Organisma ini mempunyai nukleus sebenar, sistem endomembran dan sitoskeleton. Bagaimanapun, parasit ini juga menunjukkan ciri-ciri prokariot termasuklah mempunyai alat-alat translasi seperti subunit kecil ribonukleik (RNA), saiz genom, kekurangan mitokondria, peroksisom dan radas Golgi (Thellier & Breton 2008; Contreas et al. 2000). Oleh yang demikian, mikrosporidia dikelaskan di dalam Alam Archezoa (Mathis 2000) yang kemudiannya dikelaskan di bawah Alam Fungi kerana mempunyai kitin, trehalosa dan analisa filogenik seperti kulat (Müller 1997). Namun, sehingga kini masih terdapat perdebatan mengenai pengkelasan filum mikrosporidia (Tham & Sanjay 2012).

2.2 BIOLOGI MIKROSPORIDIA

2.2.1 Morfologi Mikrosporidia

Spesies mikrosporidia yang menjangkiti mamalia sangat kecil, berukuran $1.0 - 3.0 \times 1.5 - 4.0 \mu\text{m}$ dan kebiasaannya berbentuk oval (Didier & Weiss 2008). Spora mikrosporidia mempunyai dinding tebal yang terdiri daripada tiga lapisan; eksospora, endospora dan membran plasma (Franzen & Müller 1999) (Rajah 2.1).

Nukleus mikrosporidia terdiri daripada monokarion (nukleus tunggal) atau diplokarion (dua nukleus yang bergabung dan berfungsi sebagai satu unit tunggal), bergantung kepada spesies. Spora matang mengandungi vakuol posterior dan di bahagian anterior terdapat radas penerobosan unik serta radas Golgi atipikal yang dikenali sebagai polaroplas (Franzen & Müller 1999; Didier et al. 2004). Radas penerobosan ini pula mempunyai filamen kutub bergelung serta cakera penambat. Bilangan dan susunan filamen kutub bergelung berbeza menurut genus dan spesies. Apabila persekitaran sel perumah sesuai, filamen kutub ini akan keluar melalui hujung anterior spora, lalu menembusi sel perumah baru bersama sporoplasma infektif (Franzen & Müller 1999; Didier et al. 2004). Spora mikrosporidia juga dikelilingi lapisan luar glikoprotein dan lapisan dalam berkitin. Beberapa protein di lapisan dinding spora dan endospora terlibat dengan perlekatan di dinding perumah. Protein-protein ini memainkan peranan penting dalam proses invasi sel perumah (Southern et al. 2007).



Rajah 2.1 Gambaran struktur spora mikrosporidia secara umum (Cheng 2006)

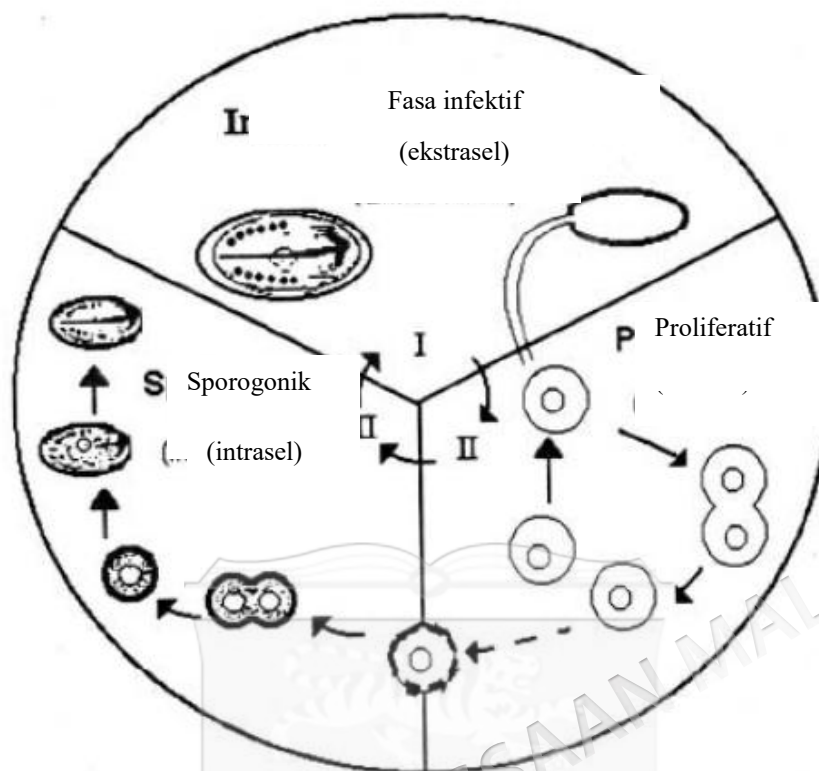
2.2.2 Kemandirian Spora di Persekitaran

Spora mikrosporidia dapat hidup untuk jangka masa yang lama di persekitaran luar perumah. Bagaimanapun, kemandirian spora parasit ini bergantung kepada spesies dan keadaan kawasan tersebut (Cali & Takvorian 2004). Kajian oleh Kramer (1970) menyatakan spora mikrosporidia yang infektif dapat bertahan sehingga 6 bulan dalam keadaan kering. Manakala, di persekitaran sejuk, spora masih kekal infektif dan bertahan selama 10 tahun (Cali & Takvorian 2004). Kajian oleh Li et al. (2003) pula mendapati spora *E. cuniculi*, *E. hellem* dan *E. intestinalis* masih kekal infektif selama beberapa minggu sehingga bertahun apabila disimpan di dalam air bersuhu 10, 15, 20 dan 25°C. Spora mikrosporidia juga menunjukkan tindak balas terhadap pH, kepekatan ion, keosmolaran, enzim pencernaan, potensi redoks dan produk yang terhasil dari proses pencernaan. Stimuli ini bertindak sebagai rangsangan utama dalam membantu percambahan spora mikrosporidia (Cali & Takvorian 2004).

2.2.3 Kitaran Hidup Mikrosporidia

Umumnya, terdapat tiga fasa kitaran hidup mikrosporidia iaitu fasa infeksi, proliferaatif dan seksual (sporogonik) (Cali et al. 2011). Rajah 2.2 menunjukkan ketiga-tiga fasa dalam kitaran hidup mikrosporidia. Fasa proliferaatif bertanggungjawab terhadap pertambahan bilangan spora di dalam sel perumah manakala fasa sporogonik bertanggungjawab terhadap penghasilan sporoblas yang akan bertukar kepada spora setelah mencapai tahap matang (Cali et al. 2011). Kedua-dua fasa ini berlaku di dalam sel perumah yang diinfeksi, namun perkembangan fasa-fasa tersebut berbeza mengikut spesies (Cali & Takvorian 2004). Bagaimanapun, fasa infeksi adalah hampir sama untuk kebanyakan spesies mikrosporidia dan hanya fasa ini sahaja berlaku di luar sel perumah serta melibatkan spora matang (Joseph et al. 2005).



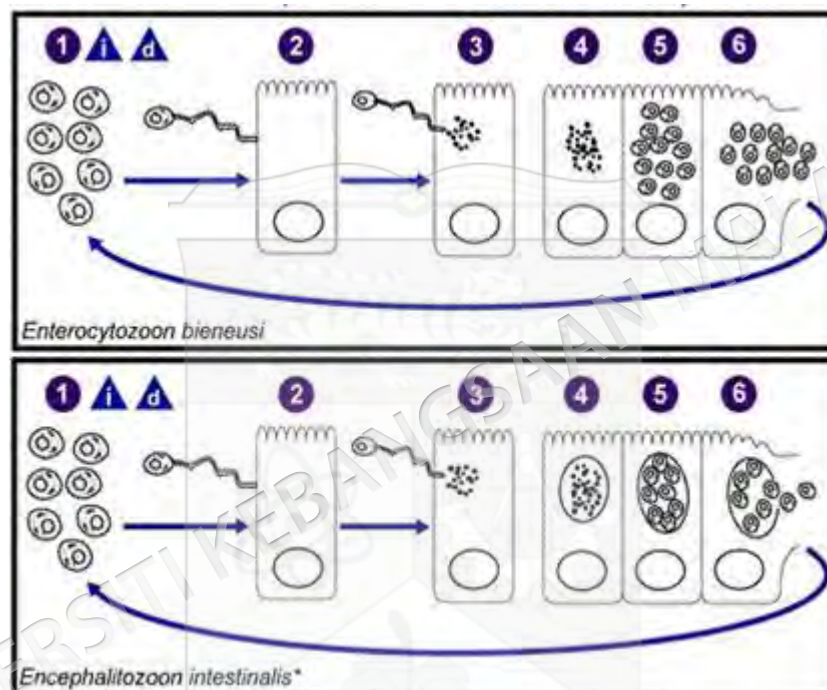


Rajah 2.2

Tiga fasa utama kitaran hidup mikrosporidia iaitu infektif, proliferaif dan sporogonik. Fasa I ialah fasa infektif; mengandungi spora matang yang bebas di persekitaran. Apabila aktif, spora tersebut akan menembusi sel perumah menggunakan filamen kutub dan memindahkan sporoplasma ke dalam sel perumah. Fasa II iaitu fasa proliferaif bertujuan untuk menambahkan bilangan sporoplasma. Semasa penukaran ke fasa III iaitu fasa sporogonik (seksual), pembentukan spora matang akan berlaku (Cali & Takvorian 1999)

Semasa percambahan, spora menggunakan tubul berkutub untuk menembusi membran sel perumah, diikuti dengan pemindahan sporoplasma ke dalam sel perumah untuk memulakan fasa proliferaif (Joseph et al. 2005; Cali & Takvorian 2004). Fasa proliferaif bermula apabila sporoplasma menjalani proses pembiakan secara merogoni (belahan dedua) atau skizogoni (belahan berbilang). Sel proliferaif ini dikenali sebagai meron atau skizon. Perkembangan parasit di dalam perumah adalah berbeza mengikut spesies (Rajah 2.3). Proses ini boleh berlaku sama ada secara langsung (dalam sitoplasma sel perumah) atau secara tidak langsung (dalam vakuol parasitoforus perumah) (Cali et al. 2011). Meron kemudiaannya akan bertukar kepada sporon semasa fasa seksual. Sporon akan menghasilkan sporoblas, di mana sporoblas

akan menjalani proses metamorfosis untuk bertukar kepada spora (Franzen & Müller 1999; Cali et al. 2011). Pada peringkat ini, dinding tebal akan terbentuk di sekeliling spora dan ia berfungsi memberi rintangan terhadap keadaan persekitaran yang tidak kondusif. Apabila bilangan spora meningkat dan memenuhi ruang sitoplasma sel perumah, sel membran perumah akan pecah lalu mengeluarkan spora tersebut ke persekitaran untuk menjangkiti sel baru dan kitar hidup mikrosporidia akan bermula semula (Joseph et al. 2005; Thellier & Breton 2008).



Rajah 2.3 Perbezaan proses kitar hidup mikrosporidia menurut spesies. Fasa proliferatif bagi *E. bieneusi* berlaku secara langsung dengan sitoplasma sel hos. Fasa proliferatif bagi *Encephalitozoon* spp. berlaku di dalam vakuol parasitoforus (CDC 2015)

2.3 GENUS DAN SPESIES-SPEKIFIK MIKROSPORIDIA

Beberapa genus mikrosporidia yang menyebabkan infeksi pada manusia telah dikenal pasti iaitu; *Enterocytozoon* (*E. bieneusi*), *Encephalitozoon* (*E. intestinalis*, *E. hellem* dan *E. cuniculi*), *Nosema* (*N. ocularum* dan *Nosema* sp.), *Brachiola*, *Anncaliia* (*A. algerae*, *A. vesicularum*, dan *A. connori*), *Vittaforma* (*V. corneae*), *Pleistophora* (*P. ronneafi*), *Trachipleistophora* (*T. hominis*, dan *T. anthropophthera*), *Tubulinosema* sp.

dan *Microsporidium* (*M. ceynolensis*, *M. africanum* dan *Microsporidium* sp.). Daripada kesemua genus dan spesies yang dinyatakan, *E. bieneusi* dan *Encephalitozoon* spp. merupakan mikrosporidia yang paling banyak menjangkiti manusia dan ditemui di seluruh dunia (Didier & Weiss 2006; Fayer & Santin-Duran 2014).

2.3.1 *Enterocytozoon*

Kewujudan genus ini diketahui setelah *E. bieneusi* ditemui di dalam seorang pesakit AIDS pada tahun 1985 (Desportes et al. 1985). Semenjak penemuan ini, *E. bieneusi* dikenali sebagai patogen oportunistik yang paling banyak menjangkiti manusia, terutamanya pesakit positif HIV (Didier & Weiss 2006; Matos et al. 2012). *E. bieneusi* seterusnya turut dilaporkan ditemui di dalam khinzir dan lembu (Cali et al. 2011).

Dengan anggaran ukuran saiz spora sebesar 1.0 x 1.5 μm , *E. bieneusi* merupakan spesies mikrosporidia paling kecil. Spora spesies ini dikelilingi endospora yang keras dan nipis, mempunyai nukleus tunggal serta filamen kutub yang menggelum sebanyak 6 kali dan kebiasaannya berada dalam kedudukan dua baris menjajar (Didier et al. 2004). Kesemua peringkat pembesaran berlaku secara langsung di dalam sel sitoplasma perumah. Organel kemudian membesar semasa sporogoni secara perbelahan berbilang dan filamen kutub terbentuk disekeliling nukleus (Desportes et al. 1985; Didier et al. 2004). Spora matang akhirnya ditempatkan secara langsung dalam sitoplasma sel perumah (Cali et al. 1993).

2.3.2 *Encephalitozoon*

Terdapat tiga spesies patogen daripada genus *Encephalitozoon* yang menjangkiti manusia iaitu *E. hellem*, *E. intestinalis* dan *E. cuniculi*. *E. cuniculi* merupakan mikrosporidia yang pertama dikenal pasti sebagai parasit mamalia yang kemudiannya dilaporkan dijumpai di dalam manusia pada tahun 1987 (Terada et al. 1987; Franzen & Müller 2001). *E. hellem* dilaporkan pertama kali menjangkiti manusia pada tahun 1991 dan mengakibatkan penyakit keratokonjunktivitis (Didier et al. 1991) manakala,

kes pertama jangkitan *E. intestinalis* pada manusia dilaporkan pada tahun 1993 yang menyebabkan diarea kronik serta penyakit tersebar (Cali et al. 1993).

Genus *Encephalitozoon* mempunyai ciri-ciri seperti vakuol parasitoforus yang mengelilingi dan mengasingkan parasit yang sedang membesar daripada sel sitoplasma perumah. Peringkat pembesaran *Encephalitozoon* spp. mempunyai satu atau lebih nukleus. Namun, di dalam susunan diplokariot, nukleus-nukleus tersebut tidak bercantum antara satu sama lain (Cali et al. 2011). Sel proliferaatif kebiasaannya berdampingan dengan membran vakuol dan membebaskan diri daripada vakuol semasa sporogoni. Di dalam vakuol ini juga, setiap sporon akan memanjang, membahagi dan menghasilkan spora. Spora *Encephalitozoon* berukuran $2.0 \times 4.0 \mu\text{m}$ dan mengandungi filamen kutub yang menggelum empat hingga lapan kali dan kebiasaannya dalam kedudukan sebaris menjajar (Didier et al. 2004).

Secara morfologi, *E. hellem* seakan sama seperti *E. cuniculi* kecuali vakuol parasitoforus tidak selalu ada lalu organisma ini dinamakan sebagai *Encephalitozoon hellem* (Didier et al. 1991). Sementara itu, spesies ketiga *Encephalitozoon*, *E. intestinalis* dikenal pasti sebagai *Septata intestinalis* disebabkan perbezaan ultrastruktur seperti pembentukan pengseptuman di antara spora (Cali et al. 1993; Cali et al. 2011). Namun, berdasarkan data jujukan rRNA, parasit ini diletakkan di bawah genus *Encephalitozoon* dan dinamakan sebagai *E. intestinalis* (Hartskeerl et al. 1995). Walaupun kes jangkitan *E. bieneusi* dan *E. intestinalis* banyak dilaporkan, kes infeksi *E. intestinalis* hanya didokumentasi 10 kali ganda lebih rendah berbanding *E. bieneusi* (Thellier & Breton 2008; Matos et al. 2012).

2.4 EPIDEMIOLOGI MIKROSPORIDIA

2.4.1 Prevalens dan Taburan Geografi

Mikrosporidia dikenal pasti sebagai agen oportunist berjangkit di seluruh dunia dengan kadar prevalens dianggarkan 1.5% hingga 50% bergantung kepada kawasan geografi, kaedah diagnosis dan ciri-ciri populasi demografi yang dikaji (Didier et al. 2004; Joseph et al. 2005). Pesakit positif HIV merupakan penyumbang terbesar kes

mikrosporidiosis, terutamanya di Asia Tenggara, Timur Tengah, Eropah, Afrika dan Amerika Latin (Didier et al. 2004; Anane & Attouchi 2010). Kadar prevalens mikrosporidiosis dilihat lebih tinggi dalam kalangan individu positif HIV beserta diarea dan kiraan sel CD4 kurang 100 sel/mm³ (Didier & Weiss 2008). Di kawasan sub-Sahara Afrika, Amerika Selatan dan Asia, mikrosporidiosis dikenal pasti menjangkiti pesakit HIV secara tetap dan menyebabkan morbiditi dan mortaliti yang tinggi (Mathis et al. 2005; Sarfati et al. 2006; Anane & Attouchi 2010).

Namun, kajian terkini oleh Mumcuoglu et al. (2016) di Turki mendapati kadar prevalens jangkitan mikrosporidia adalah tinggi dalam kalangan pesakit imunokompeten iaitu sebanyak 61.1% manakala golongan yang sihat yang didapati positif adalah sebanyak 51.4%. Selain itu, mikrosporidia juga dikenal pasti menjangkiti golongan orang tua, pelancong, kanak-kanak malnutrisi, penerima organ transplan dan pemakai kanta lekap (Desportes-Livage & Bylen 1998; Mohindra et al. 2002; Didier & Weiss 2011). Bagaimanapun, prevalens sebenar pada manusia mungkin dipandang ringan kerana infeksi asimptomatik pada individu imunokompeten dan menyebabkan pengamal perubatan tidak mengambil berat untuk melakukan diagnosis spesifik (Didier & Weiss 2011; Suankratay et al. 2012).

Di Malaysia, beberapa kajian telah diterbitkan berkenaan prevalens mikrosporidia yang menjangkiti pesakit kanser, Orang Asli, pesakit di hospital dan pesakit positif HIV. Satu kajian awal oleh Norhayati et al. (2007) berjaya mengenal pasti jangkitan mikrosporidia di dalam 56 daripada 271 sampel tinja orang Asli (20.7%). Kes mikrosporidia juga dikenal pasti sebanyak 13% dalam kelompok pesakit yang ditahan di hospital bersama atau tanpa simptom gastrousus (Norhayati et al. 2008). Mikrosporidia juga dilihat lebih prevalen dalam kalangan pesakit malignan hematologi atau kombinasi malignan dan kencing manis (Norhayati et al. 2008).

Dalam kalangan pesakit kanser, sebanyak 21.9% infeksi mikrosporidia telah dikenal pasti (Lono et al. 2008) manakala 15 – 21.2% dilaporkan dalam kalangan komuniti asimptomatik orang Asli (Lono et al. 2010; Anuar et al. 2013). Komuniti orang Asli dipercayai berpotensi untuk terdedah dengan infeksi mikrosporidia kerana mereka juga merupakan golongan prevalens yang tinggi menghadapi masalah

malnutrisi (Norhayati et al. 2007; Lono et al. 2010). Selain itu, secara umumnya kadar infeksi parasit usus juga adalah tinggi bagi komuniti Orang Asli (Anuar et al. 2013). Kajian pertama mengenai prevalen mikrosporidia dalam populasi pesakit HIV di Malaysia telah dilakukan oleh Lono et al. (2011), di mana 8.5% daripada 247 jumlah sampel tinja yang dikaji adalah positif mikrosporidia (rujuk Jadual 2.1).

Jadual 2.1 Kadar prevalens mikrosporidiosis manusia di Malaysia

Rujukan	Kadar prevalens (%)	Subjek kajian
Anuar et al. (2013)	15.0	Orang Asli (447 sampel)
Lono et al. (2011)	8.5	Pesakit AIDS (247 sampel)
Lono et al. (2010)	21.2	Orang Asli (151 sampel)
Lono et al. (2008)	21.9	Pesakit kanser (311 sampel)
Norhayati et al. (2008)	13.0	Pesakit yang dihospitalkan (893 sampel)
Norhayati et al. (2007)	20.7	Kanak-kanak orang Asli (271 sampel)

2.5 SUMBER INFEKSI DAN TRANSMISI

Sumber infeksi mikrosporidia dan persekitaran yang menjadi punca pendedahan manusia terhadap mikrosporidia masih tidak diketahui secara definitif. Namun, genotip yang menginfeksi manusia telah dikenal pasti berasal daripada haiwan liar dan ternakan. Penemuan ini menyokong dapatan bahawa mikrosporidiosis adalah dikategorikan sebagai penyakit zoonosis (Didier & Weiss 2006). Selain itu, beberapa cara penularan mikrosporidia juga telah dicadangkan seperti antroponotik, bawaan air dan bawaan makanan (Didier et al. 2004; Joseph et al. 2005; Anane & Attouchi 2010; Cali et al. 2011).

2.5.1 Transmisi Zoonosis

Setakat ini, tiada bukti sahih penularan mikrosporidia daripada haiwan kepada manusia, kecuali satu kes ‘seroconversion’ seorang kanak-kanak yang mendapat infeksi setelah terdedah kepada tinja anjing yang dijangkiti *E. cuniculi* (Didier et al. 2004). Kajian haiwan takungan telah dilakukan termasuklah identifikasi melalui kumuhan haiwan. Hasilnya, spora *E. bienersi* dan *E. cuniculi* telah dikenal pasti ditemui dalam kumpulan haiwan peliharaan, ternakan, liar dan avian (Matos et al.

2004; Anane & Attouchi 2010). Selain itu, jujukan gen untuk beberapa strain *E. bieneusi* yang sama di dalam manusia dan haiwan menguatkan lagi dapatan berkaitan mikrosporidia dan transmisi zoonosis (Didier 2005; Anane & Attouchi 2010).

Melalui beberapa kajian, beberapa orang pesakit mikrosporidiosis okular didapati terdedah kepada burung-burung peliharaan. Malahan, *E. hellem* juga telah dilaporkan berada di dalam sampel tinja burung (Orenstein et al. 1990; Yee et al. 1991; Mathis et al. 2005). Spekulasi ini berpadanan dengan hipotesis bahawa sentuhan fizikal dengan haiwan meningkatkan lagi risiko jangkitan mikrosporidia (Didier 2005). Satu kajian di Korea Selatan menunjukkan burung Psittacine asimptomatik yang dipelihara berpotensi menjadi sumber infeksi *E. hellem* kepada manusia (Lee et al. 2011). Selain itu, spora mikrosporidia juga dapat bertahan di dalam air, selepas pengeringan dan diikuti pengeraman pada pelbagai suhu, menunjukkan kemungkinan transmisi zoonosis secara tidak langsung melalui pendedahan terhadap air, makanan atau aerosol yang telah dicemari dengan spora (Mathis et al. 2005).

2.5.2 Transmisi Antroponotik

Transmisi antroponotik ataupun transmisi manusia kepada manusia boleh dibahagikan kepada dua bahagian, iaitu transmisi vertikal dan horizontal. Hal ini disebabkan kajian makmal haiwan yang diinfeksi menunjukkan potensi penularan antara manusia boleh berlaku (Didier & Weiss 2011).

Transmisi vertikal mikrosporidia (ibu kepada anak) telah dilaporkan di dalam arnab, tikus dan primat (Didier et al. 2004; Fayer & Santin-Duran 2014). Penemuan ini mencadangkan kemungkinan transmisi ini turut boleh berlaku di dalam manusia. Namun, hingga kini tiada laporan yang direkodkan (Didier et al. 2004) kecuali satu kes kajian yang melaporkan seorang bayi positif HIV yang disusui ibunya telah dijangkiti *E. bieneusi* dan *E. intestinalis* (Abdelmalek et al. 2011; Didier & Weiss 2011). Jangkitan ini disyaki berpunca daripada susu ibu, kontaminasi tinja atau melalui transplacentar. Namun begitu, laporan ini tidak dapat disahkan kerana ibu bayi tersebut menolak untuk menjalani pemeriksaan lanjut.

Faktor-faktor risiko infeksi mikrosporidia yang menyokong transmisi horizontal termasuklah homoseksual, kontaminasi tinja dan interaksi secara langsung dengan individu yang dijangkiti (Didier et al. 2004; Fayer & Santin-Duran 2014). Beberapa kajian menunjukkan transmisi manusia kepada manusia boleh berlaku apabila individu-individu yang tinggal bersama dengan pesakit yang telah diinfeksi atau mengamalkan hubungan homoseksual mendapat jangkitan mikrosporidia (Bergquist et al. 1984; Bryan & Schwartz 1999; Mungthin et al. 2001; Leelayoova et al. 2005). Transmisi ini dikukuhkan lagi dengan penemuan jangkitan genotip *E. bienersi* yang sama dalam kalangan individu yang tinggal serumah di Thailand (Leelayoova et al. 2005). Gatti et al. (1997) mencadangkan transmisi manusia kepada manusia boleh berlaku melalui laluan hematogenus menggunakan picagari tercemar namun masih tidak dapat dibuktikan.

2.5.3 Transmisi Bawaan Air

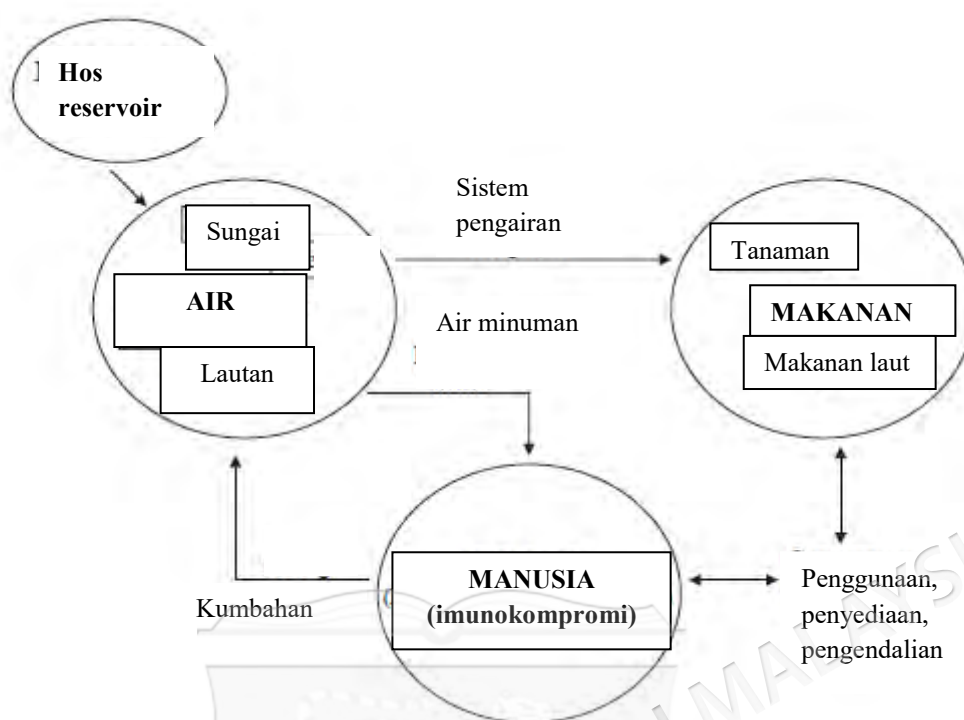
Air yang digunakan manusia sebagai sumber aktiviti harian merupakan medium transmisi bagi beberapa spesies mikrosporidia untuk hidup lebih lama kerana spora tidak sensitif terhadap disinfektan seperti klorida (Franzen & Müller 1999; Anane & Attouchi 2010). Tambahan pula, spora mikrosporidia mamalia sangat kecil menyebabkan proses penapisan untuk memerangkap spora ini kurang berkesan (Didier et al. 2004). Dos berjangkit juga mungkin rendah, oleh itu kebarangkalian mendapat mikrosporidiosis daripada air adalah tinggi (Franzen & Müller 1999).

Spesies mikrosporidia manusia tidak mempunyai hos spesifik dan telah dikenal pasti dalam pelbagai sumber air termasuklah sistem pengairan, kumbahan, air bawah tanah dan air paip (Franzen & Müller 1999; Cali & Takvorian 2004; Didier et al. 2004). Spora juga mudah dibebaskan melalui urin dan tinja haiwan dijangkiti lalu mencemarkan bekalan air (Franzen & Muller 1999; Didier et al. 2004). Dua puluh lapan hingga 50% sampel dari pelbagai sumber air di Amerika Syarikat adalah positif *E. bienersi* dan *E. intestinalis* (Dowd et al. 1998; Thurston-Enriquez et al. 2002). Pada tahun 1995, wabak mikrosporidia bawaan air telah berlaku dalam kalangan individu terimunokompromi di Lyon, Perancis, dipercayai disebabkan pencemaran bekalan air minuman dari sebuah tasik berdekatan (Cotte et al. 1999). Insiden ini mendorong

Agensi Perlindungan Alam Amerika Syarikat (USEPA) menyenaraikan *E. bieneusi* dan *E. intestinalis* di dalam Senarai Calon Mikrobial Bahan Cemar 1 (CCL1) sebagai respon kepada Akta Air Minuman Selamat (USEPA 2016). Selain itu, Institut Kesihatan Kebangsaan (NIH) dan Kawalan Penyakit Berjangkit (CDC) memberi prioriti mikrosporidia sebagai patogen Kategori B untuk transmisi bawaan air (NIAID 2016). Patogen kategori B merupakan organisma kedua tertinggi yang berisiko memberi jangkitan kepada komuniti kerana mudah untuk tersebar, menyebabkan kadar morbiditi sederhana dan kadar kematian rendah serta memerlukan penambahbaikan spesifik untuk kapasiti diagnostik dan peningkatan pengawasan penyakit (NIAID 2016).

2.5.4 Transmisi Bawaan Makanan

Sistem pengairan juga berkait rapat dengan pencemaran makanan melalui pertanian apabila makanan seperti sayuran dan buah-buahan dicuci dengan air yang dicemari spora mikrosporidia (Rajah 2.4). Oleh itu, mikrosporidia juga berpotensi disebarkan melalui transmisi bawaan makanan. Beberapa kes kajian mengukuhkan lagi hujah ini (Jedrzejewski et al. 2007; Lee 2008; Decreane et al. 2012). Satu wabak mikrosporidiosis telah dikaitkan dengan timun yang dipercayai telah tercemar dan digunakan sebagai hidangan untuk satu persidangan (Decraene et al. 2012). *E. bieneusi* telah dikenal pasti di dalam 7 dari 11 sampel tinja pesakit. Namun, kesahihan transmisi ini tidak dapat dibuktikan kerana tiada baki makanan yang tinggal untuk diperiksa.



Rajah 2.4 Hubungan makanan-air antara mikrosporidia dan jangkitan manusia
(Cali & Takvorian 2004)

2.6 MANIFESTASI KLINIKAL

Keunikan mikrosporidiosis ialah spektrum manifestasi klinikalnya yang meluas. Manifestasi klinikal bergantung kepada spesies yang menginfeksi, tempat jangkitan dan status imun pesakit (Didier et al. 2004; Didier 2005). Jadual 2.2 menunjukkan manifestasi klinikal umum mengikut spesies.

Jadual 2.2 Manifestasi klinikal umum mengikut spesies

Spesies	Manifestasi klinikal
<i>E. bienersi</i>	Enteritis, kolangitis, kolesistitis, pneumonitis, bronkitis, sinusitis, rinitis
<i>E. intestinalis</i>	Enteritis, kolangitis, kolesistitis, peritonitis, bronchitis, rinitis, nefritis, keratokonjunktivitis, infeksi tersebar
<i>E. hellem</i>	Keratokonjunktivitis, sinusitis, bronkitis, rinitis, pneumonia, nefritis, ureteritis, prostatitis, uretritis, sistitis, infeksi tersebar infeksi saluran kencing
<i>E. cuniculi</i>	Hepatitis, kolesistitis, nefritis, sinusitis, peritonitis, ensefalitis, keratokonjunktivitis, rinitis, infeksi tersebar

2.6.1 Populasi Imunokompeten

Bagi golongan imunokompeten, simptom infeksi gastrousus umumnya terhad kepada diarea selama 3-6 minggu dan dialami kebanyakan pelancong yang baru pulang dari negara zon tropika (Didier & Weiss 2006). Mereka merupakan golongan tanpa jangkitan HIV yang pertama dikenal pasti mendapat mikrosporidiosis disebabkan oleh *E. bienersi* atau *Encephalitozoon* spp. Walaupun individu tersebut sudah tidak menunjukkan simptom diarea, spora *E. bienersi* masih dibebaskan secara berkala. Hal ini menunjukkan hubung kait antara spora dan simptom diarea yang kebiasaannya berlaku ketika infeksi sudah mencapai peringkat akut (Wichro et al. 2005).

Mikrosporidiosis serebrum juga dilaporkan dialami oleh pesakit imunokompeten. Infeksi *E. cuniculi* menyebabkan sakit kepala, spastik konvulsi, sawan berserta hepatomegali, dan abses otak (Bergquist et al. 1984; Ditrich et al. 2011). Selain itu, terdapat dua manifestasi infeksi okular mikrosporidiosis: keratitis stromal kornea dan epitelium keratopati beserta konjunktivitis telah dilaporkan dialami oleh pesakit imunokompeten dari serata dunia, terutamanya dalam kalangan pemakai kanta lekap (Pinnolis et al. 1981; Joseph et al. 2005; Sharma et al. 2011; Fan et al. 2012; Weiss 2014).

Berdasarkan kajian-kajian yang telah dijalankan di Malaysia, golongan imunokompeten yang sering dikaitkan dengan jangkitan mikrosporidia adalah komuniti Orang Asli (Norhayati et al. 2007; Lono et al. 2010; Anuar et al. 2013). Kebanyakan mereka mendapat jangkitan mikrosporidia tanpa menunjukkan simptom-simptom klinikal. Menurut Norhayati et al. (2007), kesemua subjek kajian positif mikrosporidia didapati tidak mengalami simptom gastrousus. Namun, melalui kajian prevalens mikrosporidia dalam kalangan Orang Asli yang dijalankan oleh Lono et al. (2010), 26 daripada 32 subjek positif mikrosporidia didapati mengalami simptom gastrousus. Bagaimanapun, simptom diarea tersebut tidak dapat dikaitkan dengan mikrosporidia secara langsung disebabkan jangkitan bersama patogen enterik seperti helmin, *Blastocystis hominis*, *Trichuris trichuria* dan *Ascaris lumbricoides* (Lono et al. 2010). Oleh itu, jangkitan mikrosporidia berkemungkinan merupakan jangkitan pendam kepada golongan imunokompeten (Didier et al. 2004; Lono et al. 2010).

2.6.2 Populasi Positif HIV

Berdasarkan laporan terdahulu, mikrosporidiosis di dalam pesakit HIV kebiasaannya dikaitkan dengan diarea kronik (Didier & Weiss 2011). Sindrom diarea yang dialami menyumbang kepada malserapan dan kemudian menyebabkan sindrom susut badan. Mortaliti pesakit HIV yang mengalami diarea kronik beserta sindrom susut badan dilaporkan telah melebihi 50% (Weiss 2014). Selain itu, pesakit HIV terutamanya yang mempunyai kiraan CD4 kurang 100 sel/mm^3 selalunya akan mendapat mikrosporidiosis gastrousus (Anane & Attouchi 2010). Sekurang-kurangnya 90% kes yang dilaporkan adalah disebabkan oleh *E. bienewsi* dan *E. intestinalis* (Franzen & Müller 2001).

Selain gastrousus, infeksi *Encephalitozoon* spp. juga menyebabkan infeksi tersebar dan menyumbang kepada pelbagai sindrom klinikal seperti yang ditunjukkan pada JADUAL 2.2 (Cali et al. 1993; Didier & Weiss 2011). *E. hellem* umumnya menjangkiti bahagian konjunktiva, saluran kencing, sinus nasal dan sistem pernafasan. Infeksi *E. intestinalis* pula tertumpu di saluran usus serta tersebar ke buah pinggang dan saluran pernafasan. *E. cuniculi* menyebabkan infeksi tersebar hampir ke semua sistem organ namun berbeza manifestasi klinikal seperti tiada simptom atau menyebabkan penyakit yang teruk (Franzen & Müller 2001).

Mikrosporidiosis okular juga merupakan manifestasi yang paling biasa dialami pesakit HIV terutamanya apabila terdapat infeksi tersebar disebabkan oleh *Encephalitozoon* spp. (Weiss 2014). Di samping itu, terdapat kes mikrosporidiosis biliari dan peritonis akibat infeksi *E. bienewsi* dan *E. intestinalis* tetapi jarang dilaporkan (Weber et al. 1994; Franzen & Müller 1999; Anane & Attouchi 2010). Sinusitis juga dianggap sebagai manifestasi biasa dan telah dilaporkan dialami oleh pesakit HIV disebabkan infeksi *E. bienewsi* (Hartskeerl et al. 1993). Namun begitu, kes ini dipercayai berpunca daripada kontaminasi dan kolonisasi di bahagian saluran pernafasan akibat muntah berbanding penyebaran organisma ini dari saluran gastrousus (Weiss 2014).

Selain itu, antara manifestasi klinikal yang pernah dilaporkan berlaku pada individu HIV yang dijangkiti termasuklah pengulseran lidah (*E. cuniculi*), abses prostatik (*E. hellem*), mikrosporidiosis kutaneus nodular dan mikrosporidiosis serebrum (*E. cuniculi*) (Schwartz et al. 1994; de Groote et al. 1995; Yachnis et al. 1996; Belcher et al. 1997; Kester et al. 1998).

2.6.3 Penerima Organ Transplan

Terapi immunosupresif yang diterima penerima organ dan sumsum tulang menyumbang kepada kekurangan imuniti selular, seterusnya menjadikan mereka sebagai kumpulan berisiko mendapat mikrosporidiosis (Didier & Weiss 2011). Terdapat beberapa laporan yang diterbitkan mengenai infeksi tersebar disebabkan *E. cuniculi* pada penerima buah pinggang dan hematopoietik sel tunjang (SCT) (Ambrosioni et al. 2010; Talabani et al. 2010). Infeksi *E. bienersi* pada penerima buah pinggang juga turut dilaporkan (Didier & Weiss 2011; Galvan et al. 2011).

2.6.4 Pesakit Barah

Pesakit kanser yang menerima rawatan kemoterapi juga dianggap sebagai golongan immunosupresif. Beberapa kes pesakit yang mempunyai penyakit leukemia kronik dilaporkan mendapat jangkitan mikrosporidia yang menyebabkan peritonitis, hepatitis, infeksi pulmonari dan infeksi pita suara (Yazar et al. 2003; Lono et al. 2008; Cali et al. 2010; Meissner et al. 2012).

2.7 PATOGENESIS

Kepatogenan mikrosporidia masih tidak jelas dan mekanisme yang mencetuskan simptom diareja juga masih tidak dapat ditentukan (Matos et al. 2012). Pada tahun 1997, Sharpstone et al. mencadangkan bahawa $TNF\alpha$ yang tinggi dalam usus pesakit AIDS-*E. bienersi* menyumbang kepada diareja (Canning 2001). Walaupun punca dan kesan di antara mikrosporidiosis dan diareja adalah munasabah untuk diterima, simptom ini dirumitkan dengan kemungkinan kesan langsung daripada HIV sendiri,

status imun pesakit dan kehadiran patogen usus lain pada mukosa usus (Didier & Weiss 2011).

Melalui beberapa kajian, pesakit HIV-*E.bieneusi* didapati mengalami diarea yang lebih banyak, namun kurang inflamasi, berbanding pesakit HIV yang tidak dijangkiti (Bern et al. 2005; Matos et al. 2012). Mikrosporidiosis juga mengurangkan luas permukaan mukosa dan menyumbang kepada malserapan selain diarea (Didier & Weiss 2011). Namun, menurut beberapa kajian yang lain, kehadiran mikrosporidia di dalam spesimen tinja dengan diarea tidak signifikan secara statistik (Chacin-Bonilla et al. 2006; Sarfati et al. 2006; Lobo et al. 2012). Malah, terdapat kajian lain yang mencadangkan individu imunokompeten yang asimptomatik terhadap infeksi *E. bieneusi* berkemungkinan menjadi pembawa kepada mereka yang berisiko (Mungthin et al. 2001; Didier & Weiss 2006). Selain itu, terdapat persoalan timbul iaitu sama ada jangkitan mikrosporidia akan aktif jika di bawah kondisi imunokompromi bagi pembawa infeksi yang asimptomatik (Didier & Weiss 2006).

Bagi *Encephalitozoon* spp. pula, organisma ini mungkin menjalani proses pembiakan untuk menghasilkan spora matang dengan cara menginfeksi makrofaj seperti di dalam sel epitelium. Hal ini menunjukkan bahawa induksi kemokinesis yang mendorong inflamasi imun semula jadi akan menggalakkan infeksi pada sel perumah untuk jangkitan secara berterusan pada masa yang sama (Dore et al. 1995; Tosoni et al. 2002; Didier & Khan 2014). Cara makrofaj diinfeksi mikrosporidia telah dilaporkan berlaku melalui fagositosis spora mikrosporidia. Proses ini berkemungkinan bertindak sebagai saluran untuk jangkitan tersebar pada hos imunokompromi (Fishcer et al. 2008). Secara kesimpulannya, banyak kajian mengenai patogenesis perlu dilakukan bagi memahami sindrom klinikal mikrosporidiosis di dalam manusia.

2.8 RAWATAN DAN PENGURUSAN

Dengan meningkatkan fungsi imun, manifestasi gastrousus mikrosporidiosis akan berkurang dan seterusnya dapat menyingkirkan mikrosporidia ini (Weiss 2014).

Implementasi terapi sangat aktif antiretrovirus (HAART) bagi pesakit HIV berkesan dalam megurangkan infeksi oportunistik mikrosporidia (Sriaroon et al. 2008).

Beberapa rawatan telah digunakan dalam menguruskan infeksi mikrosporidia namun keberkesanan rawatan adalah bergantung kepada spesies. Albendazol mempunyai sifat antihelminik dan antifungus, berupaya menghalang sintesis tubulin mikrosporidia dan menyekat proses kematangan spora (Canning 2001). Kajian klinikal menunjukkan albendazol berkesan terhadap infeksi *Encephalitozoon* (Conteas et al. 2000; Groß 2003) tetapi tidak berupaya menyingkirkan spora *E. bieneusi*. Relaps merupakan perkara biasa dialami pesakit (Sharpstone et al. 1997; Botterel et al. 2002). Gabungan rawatan furazolidon dan albendazol berupaya menghalang penggandaan *E. bieneusi*. Namun, terapi ini akan menyebabkan remisi berpanjangan pada pesakit terimunokompromi (Dionisio et al. 1998). Selain itu, spora *E. bieneusi* masih tidak juga dapat disingkirkan sepenuhnya.

Fumagilin, antibiotik yang dihasilkan dari fungus *Aspergillus fumigatus*, memberi kesan efektif apabila digunakan secara topikal untuk merawat keratokonjunktivitis disebabkan infeksi *Encephalitozoon* spp. (Conteas et al. 2000; Chan et al. 2003). Walau bagaimanapun, fumagilin memberi kesan sampingan seperti neutropenia dan trombositopenia selepas 2 hingga 3 minggu rawatan untuk infeksi *E. bieneusi* (Molina et al. 2002; Champion et al. 2010; CDC 2013). Analog fumagilin iaitu TNP-470 (AGM-1470) menunjukkan potensi sebagai antimikrosporidia (Didier 1998). Namun begitu, keberkesanan TNF-470 secara klinikal ke atas mikrosporidiosis manusia tidak dilaporkan (Anane & Attouchi 2010). Selain itu, beberapa kajian menyatakan bahawa metranidazol juga tidak berkesan terhadap *E. bieneusi* (Molina et al. 1997; Pol et al. 1993; Gunnarsson et al. 1995).

Disebabkan tiada ubat yang efektif untuk merawat infeksi *E. bieneusi*, banyak kajian telah melaporkan percubaan ubat yang berbeza seperti talidomida dan nitazoxanida yang dianalisa keberkesananannya dalam merawat spesies ini. Kajian kes oleh Sharpstone et al. (1997) membuktikan potensi talidomida untuk menghalang perkembangan *E. bieneusi* pada peringkat spora. Nitazoxanida pula menunjukkan kesan positif apabila spora didapati berkurang dan pesakit memperlihatkan pergerakan

usus yang normal secara berterusan (Bicárt-See et al. 2000). Namun, kedua-dua ubat ini perlu dinilai secara terperinci setelah mempamerkan peranan yang mungkin berkesan dalam merawat mikrosporidiosis.

2.9 PENCEGAHAN

Langkah-langkah kebersihan perlu dilakukan untuk mengelak pencemaran makanan dan bekalan air dengan najis haiwan yang terinfeksi. Mencuci tangan dan tabiat kebersihan seumpamanya mampu mengurangkan pencemaran konjunktiva dan kornea dengan spora mikrosporidia. Selain itu, mencuci sayur-sayuran, minum dari air botol (atau dijerang), makan daging yang dimasak dan mengehadkan sentuhan fizikal dengan haiwan yang disyaki terdedah dengan mikrosporidia adalah antara langkah-langkah pencegahan untuk mengelakkan infeksi mikrosporidia (Didier & Weiss 2006; Anane & Attouchi 2010).

Dengan wujudnya infeksi spora mikrosporidia tersebar di dalam sistem pernafasan, pesakit yang diinfeksi perlu dikuarantinkan atau dipisahkan daripada berinteraksi secara langsung dengan pesakit immunosupresif lain sehingga jangkitan tersebut dirawat (Weiss 2014). Selain itu, untuk pesakit HIV, pembentukan semula imun pertahanan melalui HAART adalah kunci kepada pencegahan infeksi.

Pendedahan kepada 70% etanol, 1% formaldehid atau 2% lisol selama 30 minit atau melalui pengautoklafan pada suhu 120°C selama 10 minit dapat mematikan spora mikrosporidia (Li & Fayer 2006). Kematian spora juga dapat dikurangkan apabila didedahkan bahan disinfektan selama 30 minit. Selain itu, pensterilan seperti rawatan air minuman dengan klorida atau ozon dapat mengurangkan viabiliti dan kapasiti infeksi spora (Didier et al. 2004; Didier & Weiss 2006). Walaupun begitu, kajian rapi masih diperlukan untuk memahami epidemiologi mikrosporidiosis dengan jelas seterusnya dapat melaksanakan langkah-langkah pencegahan yang efisien kepada manusia sejagat.

2.10 DIAGNOSIS MAKMAL MIKROSPORIDIA

2.10.1 Pengumpulan Sampel

Spora mikrosporidia akan kekal stabil sebagai agen infeksi selama beberapa tahun jika ia tidak dibiarkan kering. Spora juga boleh disimpan pada suhu 4°C selama bertahun-tahun. Untuk diagnosis, spesimen tinja, aspirat duodenum atau biopsi boleh digunakan sama ada baru atau diawet di dalam 10% formalin atau natrium asetat-asetik asid-formalin (SAF) (Garcia 2002; Ghosh et al. 2014). Bagi kes infeksi tersebar, mikrosporidia kebiasaannya dikesan dengan menggunakan sedimen urin dan cecair badan yang lain (sputum, cecair lavaj bronkoalveolar (BAL), rembesan hidung, cecair serebrospina (CSF), calitan konjunktiva, kikisan kornea dan tisu sama ada baru atau telah ditetap. Pengesanan mikrosporidia menggunakan spesimen tisu juga boleh dilakukan melalui rutin histologi (disyorkan penetapan formalin) atau mikroskop elektron (disyorkan penetapan glutaraldehid) (Garcia 2002). Sampel yang baru diterima (tanpa bahan penetap) boleh disimpan pada suhu 4°C di dalam salin fisiologi atau medium kultur yang dibekalkan dengan antibiotik. Sampel baru atau yang telah ditetap boleh digunakan untuk kajian molekular. Walau bagaimanapun, sampel baru kebiasaannya menyumbang kepada kualiti asid nukleik yang terbaik (Ghosh et al. 2014).

Disebabkan infeksi mikrosporidia menyebabkan pelbagai simptom klinikal, parasit ini perlu dipertimbangkan untuk diagnosis apabila etiologi tidak dapat ditentukan. Oleh itu, beberapa spesimen tinja atau sekurang-kurangnya tiga spesimen perlu diperiksa untuk menentukan infeksi mikrosporidia kerana spora parasit ini dibebaskan secara sporadik (Sak et al. 2011; Sokolova et al. 2011).

2.10.2 Mikroskop Elektron Pancaran (TEM)

Teknik mikroskop elektron pancaran (TEM) sehingga kini masih kekal sebagai piawai emas untuk pengesanan dan juga teknik pertama yang membenarkan identifikasi spesies mikrosporidia terutamanya untuk makmal yang tidak mempunyai akses terhadap teknik molekular. Pemeriksaan bentuk intraselular proliferaatif, ciri-ciri

struktur spora, pembahagian kitar hidup dan sifat perantaraan hos-parasit ialah antara kriteria utama yang digunakan untuk membezakan spesies melalui TEM (Franzen & Müller 2001; Thellier & Breton 2008). TEM telah berjaya digunakan untuk diagnosis mikrosporidiosis menggunakan cecair badan tetapi pembezaan spesies agak sukar dilakukan untuk tisu biopsi kerana peringkat proliferaatif kebanyakannya tidak dapat diperhatikan (Franzen & Müller 2001).

TEM sangat spesifik, namun, bagi spesies yang berkait rapat dari segi morfologi, kriteria yang membezakan mungkin hanya di peringkat perkembangan tertentu sahaja, yang mana kriteria ini mungkin tidak dapat dikesan di dalam sampel klinikal tertentu (Ghosh et al. 2014). Meron, sporon, konfigurasi nukleus dan lokasi pereplikasian di dalam sel hos mestilah dikaji dengan teliti untuk mengelak kesilapan semasa proses identifikasi (Fedorko & Hijazi 1996). Oleh itu, analisis antigenik atau molekular diperlukan dalam membantu mengenal pasti kepelbagaian subspesies. Selain itu, TEM memerlukan tenaga kerja, memerlukan masa yang lama, peralatan yang mahal, kepakaran khusus dan staf histologi yang berdedikasi (Franzen & Müller 2001; Thellier & Breton 2008). Teknik ini juga kurang sensitif kerana jumlah tisu yang diperiksa amat sedikit lalu menyumbang kepada ralat pensampelan (Weber et al. 1994; Thellier & Breton 2008; Ghosh et al. 2014).

2.10.3 Sitologi dan Histologi

Walaupun berbeza tujuan, penyediaan sitologi dan histologi amat berguna dan membantu dalam mendiagnos infeksi mikrosporidia. Sitologi ialah pemeriksaan struktur dan fungsi sel dari badan di bawah mikroskop. Histologi lebih dikenali dalam mengkaji sel dan tisu sesuatu organisma di bawah mikroskop. Teknik sitologi hanya dapat membantu sehingga tahap selular sahaja manakala teknik histologi mengkaji sesuatu struktur tisu tertentu dengan lebih mendalam serta memakan masa. Oleh disebabkan itu, teknik histologi menelan kos yang lebih tinggi berbanding sitologi (de Andrade Lima et al. 2014).

a. Sitologi

Teknik sitologi digunakan untuk diagnosis jangkitan mikrosporidia terutamanya untuk sampel mukosa atau epitelium (Ghosh et al. 2014) dan pemeriksaan mikroskop perlu dilaksanakan dengan menggunakan kanta objek rendaman minyak (100x magnifikasi). Bagi infeksi tersebar, pengesanan mikrosporidia bagi sampel tisu atau cecair perlu diikuti dengan pemeriksaan spesimen yang lain seperti urin (Garcia 2002). Pengempuran dengan kelajuan tinggi (1500 g x 10 minit) urin atau cecair badan diperlukan untuk memusatkan spora, terutamanya apabila spesimen tersebut mengandungi debris atau mukus diikuti dengan pewarnaan pewarna Gram, Giemsa, kromotrop 2R atau agen 'chemifluorescent' (Garcia 2002; Ghosh et al. 2014).

Bagi sampel urin, spora mikrosporidia kebiasaannya dibebaskan secara sporadik. Oleh itu, beberapa spesimen urin diperlukan untuk mencapai sensitiviti pengesanan yang tinggi (Garcia 2002; Ghosh et al. 2014). Hal ini kerana spesimen tunggal yang negatif tidak menolak kemungkinan jangkitan mikrosporidia. Selain itu, teknik sitologi adalah sangat sensitif untuk diagnosis mikrosporidiosis usus disebabkan oleh *E. bienersi* atau *E. intestinalis* (Weber & Bryan 1994).

Spesimen cecair badan yang lain, contohnya, rembesan nasal, sputum, cecair BAL dan CSF disediakan menggunakan teknik piawai sitologi seperti pewarna Gram, Giemsa, kromotrop dan agen 'chemifluorescent' atau imunopendarfluor jika ada (Schwartz et al. 1994; Weber & Bryan 1994). Bagi mikrosporidiosis okular, spesimen urin dan respirasi perlu diperiksa untuk mengesan kehadiran spora mikrosporidia untuk memastikan sama ada berlakunya jangkitan tersebar bagi menentukan rawatan jangkitan (Weber et al. 1994; Garcia 2002).

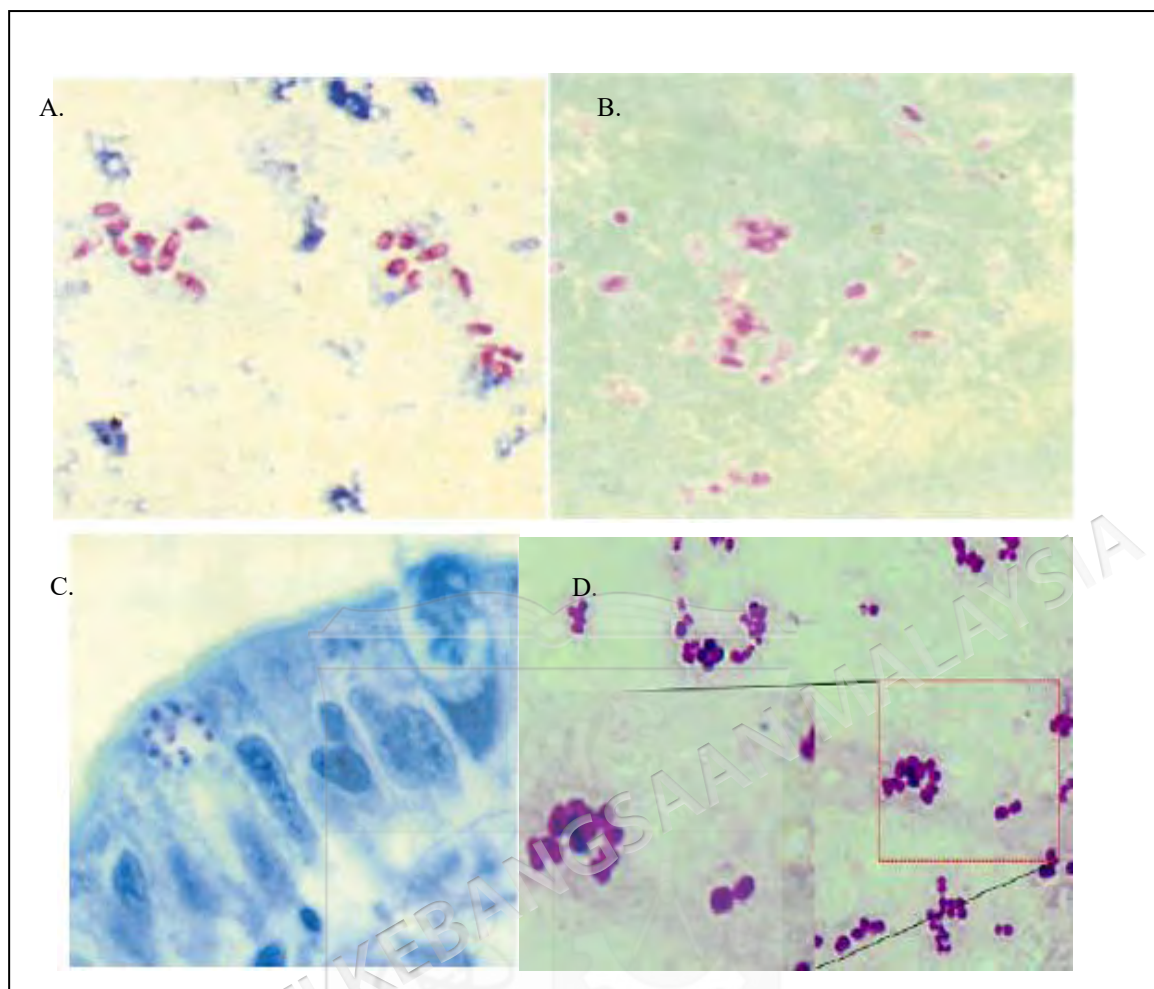
b. Histologi

Walaupun mikrosporidia telah dapat dikenal pasti melalui rutin tisu histologi, teknik ini kadang-kala tidak dapat memberi keputusan pengesanan yang memuaskan. Spora sesekali akan muncul sebagai jasad refraktil keemasan di dalam penetapan-formalin dan pewarnaan hematoksilin-eosin. Selain itu, hanya ahli patologi yang pakar dan

berpengalaman dapat mengesan spora mikrosporidia jika menggunakan rutin pewarnaan hematoksilin dan eosin bagi keratan tisu kerana kesukaran untuk diperiksa (Garcia 2002). Bagaimanapun, dengan pelbagai teknik pewarnaan, seperti pewarna Warthin-Starry terubah suai, Gram tisu dan Steiner kelabu, spora kini lebih mudah untuk dikesan (Ghosh et al. 2014). Pewarnaan Wartin-Starry terubah suai membuatkan spora kelihatan lebih besar daripada saiz sebenar, manakala Gram tisu (Brown-Brenn/Brown Hopps) memudahkan pengesanan spora dengan intensiti warna yang lebih terang (Field et al. 1993; Garcia 2002).

2.10.4 Mikroskop Cahaya

Penggunaan mikroskop cahaya bersama beberapa teknik pewarnaan baru atau terubah suai dapat membezakan spora mikrosporidia dan elemen lain yang turut terdapat di dalam spesimen klinikal, terutamanya sampel tinja (Garcia 2002; Thellier & Breton 2008). Pewarna trikrom terubah suai (menggunakan kromotrop 2R) merupakan yang pertama dibangunkan (Weber et al. 1992) untuk pemeriksaan mikroskop cahaya bagi spesimen tinja, aspirat duodenum, dan cecair badan lain. Spora kelihatan ovoid, bewarna merah jambu dengan latar belakang bewarna hijau (pewarna trikrom Weber-Green terubah suai) atau biru (pewarna trikrom Ryan-Blue terubah suai) (Weber et al. 1992; Ryan et al 1993) (rujuk Rajah 2.5).



Rajah 2.5 Spora mikrosporidia yang telah diwarnakan untuk pemeriksaan di bawah mikroskop.

- (A) Spora diwarnakan trikrom Ryan-Blue terubah suai (B) Spora diwarnakan trikrom Weber-Green terubah suai (C) Spora diwarnakan pewarna Giemsa (D) Spora diwarnakan Gram-kromotrop Kinyoun (Garcia 2002; Salleh et al. 2011)

Beberapa penambahbaikan telah dilakukan untuk teknik Weber supaya dapat memendekkan proses pewarnaan dan meningkatkan kesan beza antara spora berbanding latar belakang slaid. Teknik pewarna kromotrop terubahsuai menunjukkan pewarnaan yang lebih baik dengan menaikkan suhu pada 50°C (10 minit) (Kokoskin et al. 1994) atau 37°C (30 minit) (Didier et al. 1995). Kombinasi kedua-dua teknik pewarnaan kromotrop Weber dan Gram tradisional (dikenali sebagai Gram kromotrop) telah dibangunkan dan dinilai oleh Moura et al. (1997). Kombinasi ini didapati dapat mempercepatkan masa pewarnaan. Kemudian, Gram kromotrop telah diubah suai oleh Salleh et al. (2011) dan dikenali sebagai Gram kromotrop Kinyoun (GCK) (rujuk Rajah 2.5). Teknik ini memendekkan lagi proses pewarnaan serta

menghasilkan warna biru-merah jambu untuk spora mikrosporidia bertentangan latar belakang yang cerah. Pewarnaan Giemsa pula menyebabkan spora kelihatan bewarna biru muda dan mudah dikesan dibawah mikroskop cahaya terutamanya spesimen cecair badan (Garcia 2002; Ghosh et al. 2014).

Spora mikrosporidia juga dapat diperhatikan melalui mikroskop ultraungu (UV) meggunakan agen 'chemifluorescent' seperti Calcofluor White 2R atau Uvitex 2B, yang mana kitin pada dinding spora akan diwarnakan (van Gool et al. 1993). Bagaimanapun, pewarnaan ini tidak spesifik kerana fungi dan beberapa organisma lain di dalam tinja juga mungkin berkilau (Garcia 2002).

Mikroskop cahaya lebih pantas dan sensitif berbanding TEM namun teknik ini memerlukan pakar untuk melakukan interpretasi diagnosis yang tepat. Penyediaan tisu dan pewarnaan yang terbaik untuk mikroskop cahaya juga masih tidak membenarkan diagnosis spesies-spesifik dan sangat berpotensi berlaku ketindakbalasan silang dengan organisma lain di dalam spesimen tinja (Franzen & Müller 1999). Identifikasi spesies adalah sangat penting kerana rawatan yang berbeza diberikan mengikut spesies infeksi (Didier & Weiss 2006).

2.10.5 Kultur Sel

Walaupun teknik kultur sel tidak relevan untuk makmal diagnostik rutin, penggunaan teknik ini menjadi kritikal dalam membangunkan reagen imunologi untuk tujuan diagnosis dan pengesahan spesies (Garcia 2002). Kultur 'in vitro' digunakan untuk menentukan keberkesanan agen antimikrob ke atas beberapa spesies mikrosporidia. *Encephalitozoon* spp. telah dikulturkan di dalam titisan sel mamalia yang berbeza, seperti arnab, sel buah pinggang monyet dan fibrolas paru-paru janin manusia (Franzen & Müller 2001). Walau bagaimanapun, hanya kultur 'in vitro' jangka pendek berjaya dibangunkan untuk *E. bienewisi* menggunakan fibrolas jantung manusia dan sel Vero (Visvesvara et al. 1995). Walaupun kultur 'in vitro' dianggap sebagai satu medium yang dapat membantu diagnosis spesies mikrosporidia, teknik kultur ini memakan masa, cenderung kepada kontaminasi, dan hanya terdapat di beberapa makmal penyelidikan khusus yang tidak praktikal (Ghosh et al. 2014).

2.10.6 Kaedah Berasaskan Antigen

Kaedah pengesanan berasaskan antigen seperti asai imunopendarfluor (IFA), asai imunoserap terangkai enzim (ELISA) dan pemendapan Western menggunakan antibodi daripada haiwan makmal yang telah diimmunisasi membantu mengenal karakter antigen patogen-spesifik. IFA digunakan 'in situ' pada spesimen tetap tetapi perlu diperiksa melalui mikroskop pendarfluor (Ghosh et al. 2014). Ujian pemendapan Western atau ELISA pula digunakan untuk memeriksa spesimen homogenat. Antibodi sama ada poliklon atau monoklon boleh digunakan untuk diagnosis tersebut.

Antibodi poliklon dan monoklon untuk mengesan *Encephalitozoon* spp. telah digunakan untuk diagnosis dalam membezakan spesies di dalam sampel klinikal manusia (Franzen & Müller 2001). Umumnya, antibodi tersebut ditujukan ke arah dinding spora atau tiub kutub mikrosporidia. Namun, antibodi poliklon digunakan secara terhad kerana terdapat laporan ketindakbalasan silang antara *Encephalitozoon* spp. dan spesies mikrosporidia yang lain. Kajian perbandingan juga menunjukkan prosedur pengesanan imunopendarfluor adalah rendah sensitiviti berbanding kaedah rutin pewarnaan (Didier et al. 1995). Spesifisiti dan sensitiviti bergantung pada antibodi itu sendiri dan perlaksanaan bagi setiap prosedur. Pengesanan berasaskan antibodi sangat berguna digunakan sebagai teknik pengesanan kepada kaedah histologi konvensional.

2.10.7 Serologi

Pelbagai asai serologi (asai karbon imuno [CIA], ujian IFA tidak langsung, ELISA, dan pemendapan Western) digunakan untuk mengesan antibodi IgG dan IgM mikrosporidia, terutamanya *E. cuniculi* dan *E. intestinalis* pada beberapa spesies haiwan (Franzen & Müller 2001; Garcia 2002). Namun, ujian seperti ELISA, blot imuno, dan pengaglutinatan (Jordan et al. 2006; Abou et al. 2008), tidak disyorkan digunakan untuk tujuan diagnosis disebabkan beberapa faktor seperti ekspresi tidak tetap pada pesakit imunokompromi, ketidakupayaan membezakan antara jangkitan terdahulu atau akut, prevalens tinggi antibodi antimikrosporidia pada populasi imunokompeten, dan ketindakbalasan silang antibodi antara spesies berbeza

(Bergquist et al. 1984; van Gool et al. 1997; Kucerova-Pospisilova & Ditrich 1998; Franzen & Müller 2001).

Bagaimanapun, analisis serologi mungkin berfaedah untuk diagnosis infeksi subklinikal di dalam penderma organ transplan atau pesakit yang berisiko untuk pengaktifan infeksi akibat imunokompromi (Didier & Weiss 2006). Setakat ini, hanya satu sahaja kes kajian dilaporkan berjaya mengesan antibodi *E. cuniculi* di dalam serum selepas mengenal pasti organisma ini di dalam spesimen urin (Bergquist et al. 1984). Namun, ujian serologi yang boleh digunakan untuk diagnosis ke atas mikrosporidiosis manusia masih tiada. Selain itu, oleh disebabkan kultur jangka panjang dan antigen tidak dapat dibangunkan, tiada ujian serologi untuk *E. bieneusi* dihasilkan.

2.10.8 Kaedah Berasaskan Molekular

Asai reaksi rantai polimerase (PCR) telah dibangunkan untuk diagnosis dan pembezaan spesies mikrosporidia manusia. Beberapa pasang primer tunggal dan tersarang telah direka dan dinilai untuk mengamplifikasi jujukan gen sasaran *E. bieneusi* dan *Encephalitozoon* spp. (Franzen & Müller 2001). Gen sasaran yang digunakan adalah subunit kecil rRNA (SSU rRNA), subunit besar rRNA (LSU rRNA) dan kawasan penjarak intergen (IGS) (Franzen & Müller 2001; Thellier & Breton 2008). Target untuk diagnosis PCR yang boleh diamplifikasi dengan efisien adalah dalam lingkungan 100-400 pasangan bes untuk tisu formalin-tetap atau 700-1000 pasangan bes bagi spesimen baru (Fedorko & Hijazi 1996).

Diagnosis PCR untuk *E. bieneusi* pertama kali dilaporkan oleh Zhu et al. (1993). Pasangan primer V1 dan EB450 berjaya mengamplifikasi jujukan klon SSU rRNA *E. bieneusi* dan DNA tisu diinfeksi *E. bieneusi*. Beberapa pasangan primer telah direka untuk mengamplifikasi kawasan pendek (250-607 pasangan bes) gen SSU rRNA dan aplikasi PCR ini telah diterbitkan untuk diagnosis infeksi mikrosporidia (Visvesvara et al. 1994, 1995; da Silva et al. 1996; Velasquez et al. 1996; Müller et al. 1999; Subrungruang et al. 2004; Chabchoub et al. 2009).

Bagaimanapun, kaedah PCR terbatas kerana kehadiran perencat PCR seperti garam hempedu dan polisakarida kompleks yang kebiasaannya akan terdorong untuk melakukan interaksi langsung dengan DNA atau mengganggu polimerase DNA termostabil. Polimerase DNA mempunyai keperluan kofaktor, seperti magnesium, yang menjadi sasaran perencatan (Bessetti 2007). Selain itu, kaedah PCR memakan masa yang lama kerana kitarannya yang mempunyai tiga langkah utama iaitu denaturasi, penyepulihindapan dan pemanjangan dengan suhu yang berbeza. Kaedah ini juga terbatas disebabkan keperluan mesin kitaran terma yang mahal (Fakruddin, 2011).

Beberapa kajian juga menggunakan prosedur diagnostik mikrosporidia melibatkan PCR masa sebenar (Menotti et al. 2003; Verweij et al. 2007; Polley et al. 2011). PCR masa sebenar, yang mengesan ampikon dalam masa sebenar melalui interaksi pewarna atau prob pendarfluor, mempunyai kelebihan dari segi kuantitatif, menyingkirkan pos-amplifikasi, meningkatkan daya pemprosesan dan mengurangkan risiko kontaminasi yang wujud dalam PCR (Ghosh & Weiss 2009). Selain itu, PCR multipleks masa sebenar, telah dibangunkan untuk pengesanan serentak spesies *E. bieneusi* dan *Encephalitozoon* spp. di dalam sampel tinja (Verweij et al. 2007). Namun, meskipun banyak penambahbaikan telah dilakukan, teknik-teknik ini masih kekal mahal, memakan masa yang lama dan memerlukan tenaga pakar. Akibatnya, kaedah sebegini masih tidak digunakan secara meluas di kebanyakan makmal klinikal, terutamanya di negara-negara bukan perindustrian (Thellier & Breton 2008).

‘Microarray’ oligonukleotida untuk mengesan *E. bieneusi* dan *Encephalitozoon* spp. secara serentak dari sampel klinikal telah dibangunkan oleh Wang et al. (2005). Teknologi ‘microarray’ menjanjikan daya pemprosesan tinggi secara kuantitatif (Ghosh et al. 2014). Sementara itu, beberapa kajian telah menggunakan kaedah hibridisasi pendarfluor in situ (FISH) untuk mengesan mikrosporidia (Franzen & Müller 2001) dengan menggunakan prob pendarfluor untuk melekat pada nukleik asid pelengkap (DNA/RNA) di dalam spesimen (Procop 2007). Namun, FISH memakan masa, mencabar secara teknikal seperti memerlukan ‘deparaffinization’, dehidrasi dan rehidrasi serta kurang sensitif berbanding PCR.

2.11 AMPLIFIKASI ISOTERMA BERPENGANTARA GELUNG (LAMP)

2.11.1 Sejarah dan Pembangunan LAMP

Disebabkan beberapa kelemahan kaedah molekular diagnostik yang dipamerkan PCR, PCR masa sebenar dan FISH, Notomi et al (2000) telah memperkenalkan amplifikasi nukleik asid baru iaitu amplifikasi isoterma berpengantara gelung (LAMP) sebagai kaedah yang spesifik dan mudah untuk dilaksanakan. LAMP ialah amplifikasi satu-langkah yang mengamplifikasi jujukan DNA sasaran di bawah keadaan isoterma.

Mekanisme reaksi LAMP dibahagikan kepada tiga iaitu langkah permulaan, langkah amplifikasi kitaran dan langkah pemanjangan (Notomi et al. 2000; Mori & Notomi 2009). Pelaksanaan LAMP umumnya bergantung kepada rekaan primer yang sangat spesifik. Tidak seperti PCR, LAMP memerlukan 4-6 primer untuk mengenal 6-8 kawasan pada gen sasaran. Primer-primer ini dinamakan sebagai F3 (primer luaran ke depan), B3 (primer luaran ke belakang), FIP (primer dalaman ke depan) dan BIP (primer dalaman ke belakang). Kemudian, dua primer gegelung diperkenalkan oleh Nagamine et al. (2002) iaitu LF (gelung ke depan) dan LB (gelung ke belakang) membantu mempercepatkan tindak balas LAMP dalam masa yang singkat.

Di samping itu, enzim yang mempunyai kapasiti pempolimeran DNA dan keupayaan untuk menyesar beban akan dipilih untuk LAMP. Antara enzim yang mempunyai kebolehan ini ialah polimerase *Bst* (diasingkan daripada *Bacillus stearothermophilus*), polimerase *Bsm* (diasingkan daripada *Bacillus smithii*) dan polimerase OmniAmp (dikomersialkan oleh Lucigen Corporation, USA). Enzim-enzim ini berupaya memangkinkan 5'-3' pempolimeran DNA tetapi tidak mempunyai aktiviti eksonukleus 5'-3' (Chander et al. 2014; Dhama et al. 2014). Aktiviti enzim polimerase *Bst* adalah dari 60 - 65°C, polimerase *Bsm* dari 60 - 63°C, manakala polimerase OmniAmp optimum pada 70°C (Notomi et al. 2000; Chander et al. 2014; Dhama et al. 2014).

Setakat ini, kaedah LAMP telah berjaya dibangunkan sebagai kit komersial dan sebahagian kajian LAMP telah digunakan secara rasmi sebagai rutin identifikasi

dan pemantauan patogen di negara Jepun (Mori & Notomi 2009). Penambahan transkriptase berbalik membenarkan LAMP mengamplifikasi DNA daripada jujukan RNA (RT-LAMP) (Arita et al. 2009; Mori & Notomi 2009; Qin et al. 2009). Selain itu, LAMP telah disepadukan pada cip cecair-mikro atau dikenali sebagai mikroLAMP (μ LAMP) untuk memudahkan visualisasi mendakan atau diukur dengan sensor optik (Fang et al. 2010). LAMP juga telah digabungkan dengan asai aliran sisi untuk memudahkan diagnosis dan penapisan (Soliman & el-Marbouli 2010; Surasilp et al. 2011). Sementara itu, campuran LAMP terliofil telah dibangunkan dan kit untuk LAMP terliofil telah dikomersialkan untuk diagnosis tuberkulosis (Eiken Chemical Co. Ltd.) (Dhama et al. 2014). Terdapat juga kombinasi antara hibridisasi in situ dan LAMP (teknik LAMP in situ) dibangunkan oleh Meng et al. (2013) untuk penyetempatan kromosom jujukan DNA, manakala LAMP multipleks (mLAMP) dan RT-LAMP multipleks mampu mengesan beberapa sasaran DNA secara serentak (Iseki et al. 2007; He & Xu 2010; Yamazaki et al. 2013). Pelbagai versi LAMP yang telah diperkenalkan menunjukkan potensi teknik ini sebagai satu alternatif kepada teknik konvensional untuk analisis dan diagnosis di makmal klinikal.

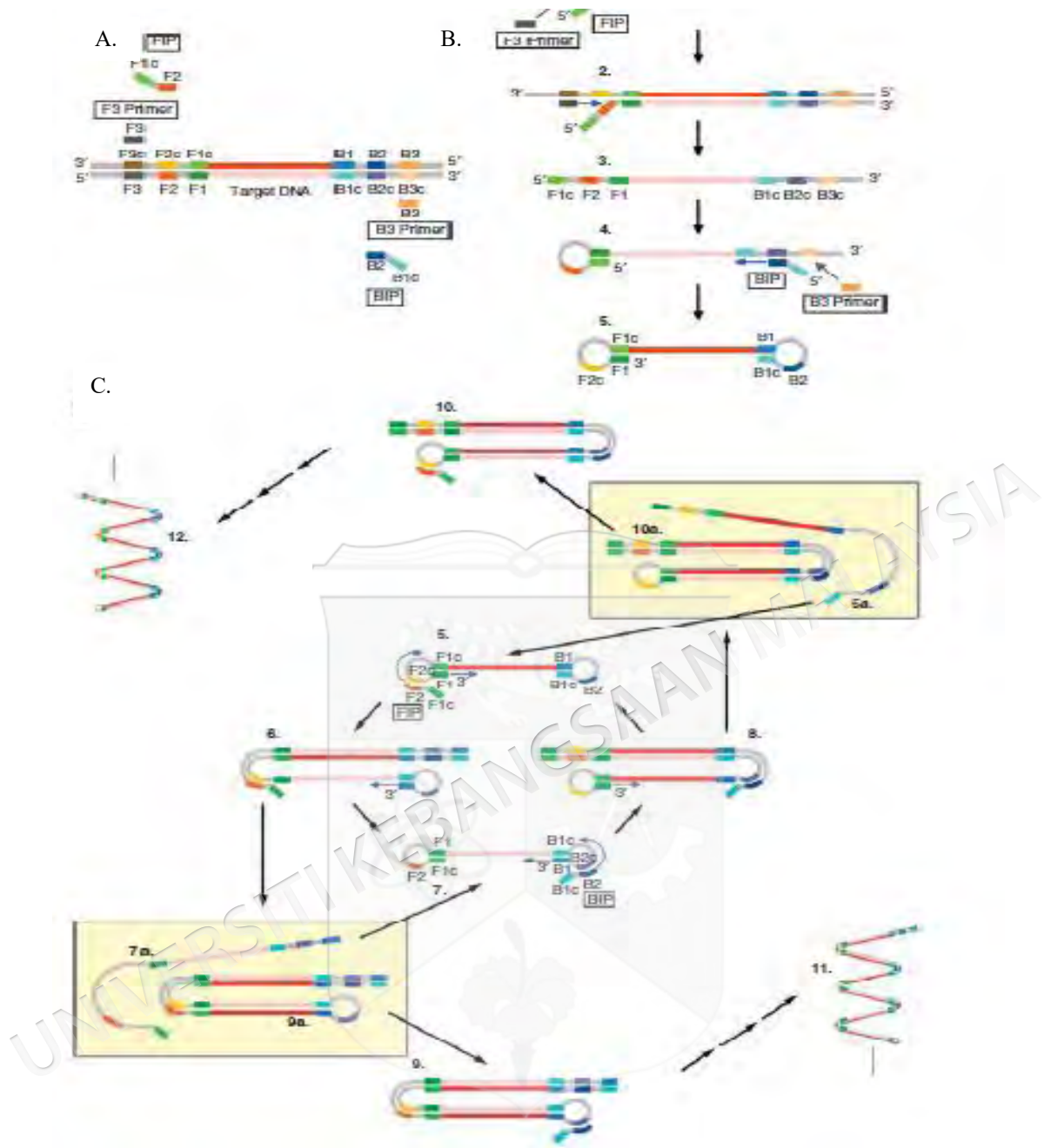
2.11.2 Prinsip LAMP

Primer F3 dan B3 memainkan peranan penting semasa sesaran bebenang. Oleh itu primer ini dikenali sebagai primer bebenang sesaran manakala primer FIP dan BIP berfungsi dalam pembentukan gegelung (Parida et al. 2008). Primer FIP dan BIP mengandungi dua jujukan berbeza yang sepadan dengan jujukan 'sense' dan 'antisense' sasaran DNA (Fakruddin 2011). Terdapat dua langkah utama amplifikasi LAMP iaitu kitaran dan bukan-kitaran (Parida et al. 2008).

Selepas primer dalaman memulakan proses, sepasang primer luaran bersama polimerase *Bst/Bsm/OmniAmp* akan menyasar bebenang yang telah diamplifikasi untuk membebaskan bebenang DNA tunggal. Bebenang ini akan membentuk gelung pin rambut untuk memulakan pembentukan gegelung bagi amplifikasi kitaran (Notomi et al. 2000; Parida et al. 2008) (RAJAH 2.6b). Pembentukan ini bertujuan sebagai templat untuk sintesis DNA yang telah dirangsang sedia oleh primer dalaman kedua dan primer-primer luaran yang akan menghibridkan batang-gelung pada

struktur DNA. Selepas itu, dalam kitaran LAMP, satu primer dalaman akan menghibridkan gelung pada produk tersebut dan memulakan semula sesaran sintesis DNA, menghasilkan batang-gelung DNA original dan batang-gelung DNA baru yang dua kali lebih panjang (RAJAH 2.6c). Amplifikasi diteruskan mengikut turutan kitaran yang mana setiap bebenang akan disesar semasa pemanjangan dengan penambahan gegelung baru untuk setiap kitaran. Reaksi kitaran ini akan menghasilkan 10^9 salinan DNA sasaran dalam masa satu jam. Produk LAMP merupakan DNA batang bergelung dengan beberapa sasaran DNA terbalik yang berulang serta berbentuk seperti kubis bunga (Notomi et al. 2000). Penggunaan dua primer gelung dapat mempercepatkan lagi reaksi amplifikasi (Nagamine et al. 2002).



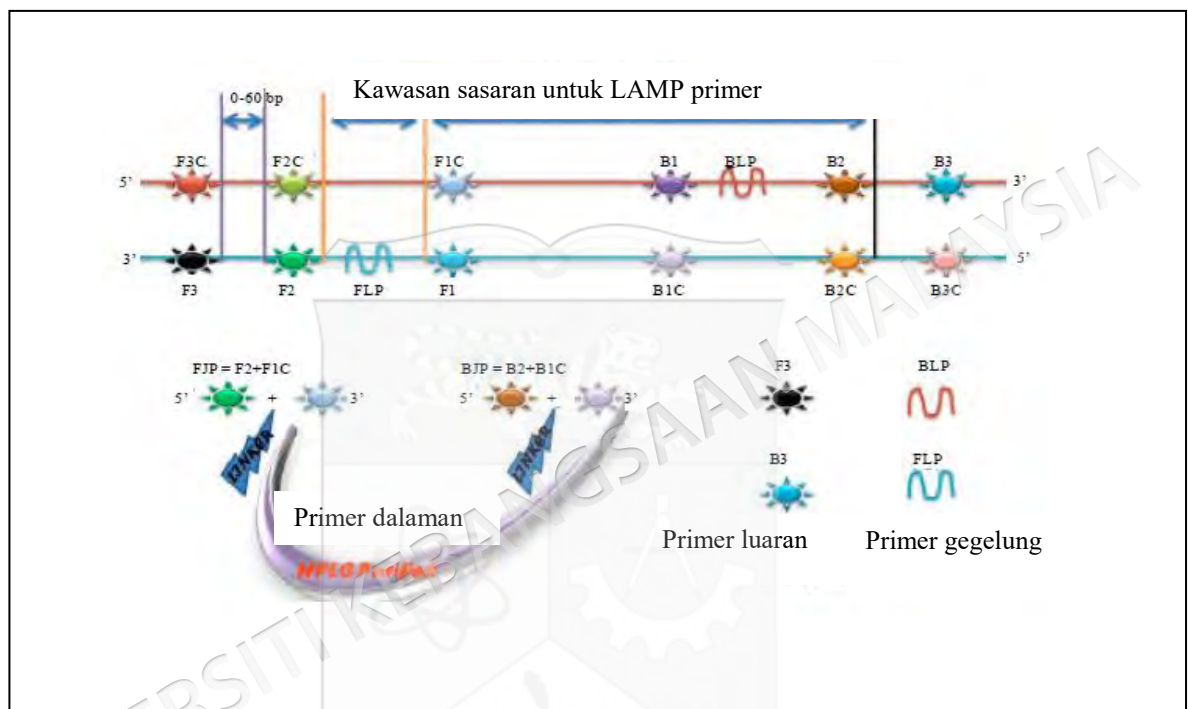


Rajah 2.6

Gambaran skematik mekanisme LAMP. (A) Rekaan primer (B) Langkah menghasilkan produk permulaan, diikuti langkah amplifikasi kitaran dan pemanjangan (C) (Tomita et al. 2008)

2.11.3 Reka Bentuk Primer LAMP

Rekaan set primer yang sangat sensitif dan spesifik sangat penting dalam pelaksanaan amplifikasi LAMP. Primer (F3, B3, FIP, BIP, LB dan LP) direka berdasarkan lapan kawasan sasaran pada gen iaitu: F3c, F2c, F1c dan FLP pada bahagian 3' dan B1, B2, B3 dan BLP pada bahagian 5' (Rajah 2.7).



Rajah 2.7

Lapan kawasan sasaran gen untuk mereka set primer LAMP (Dhama et al. 2014)

FIP mengandungi kawasan F2c (pada akhir 3') yang sama kedudukan dengan F1c pada akhir 5'. Sementara itu, F3 mengandungi kawasan F3, BIP pada kawasan B2 dan B1c, manakala B3 mengandungi kawasan B3. Primer FIP dan BIP juga disyorkan disintesis daripada kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC). Selain itu, terdapat beberapa kriteria yang perlu dititikberatkan semasa mereka primer LAMP (Parida et al. 2008). Kandungan kaya GC haruslah dalam lingkungan 50-60% dan 40-50% untuk kandungan kaya AT. Suhu lebur (T_m) untuk primer juga perlulah dalam lingkungan 60-65°C untuk kaya GC dan 55-60°C untuk kandungan kaya AT. Primer yang direka mestilah tidak membentuk sebarang struktur gelung. Selain itu, jarak antara akhir 5'

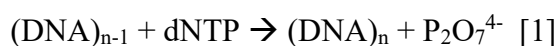
untuk F2 dan B2 ialah 120-180 bp manakala F2 dan F3 ialah 0-20 bp. Jarak untuk kawasan pembentukan gelung pula sepatutnya dari 40-60 bp (rujuk Rajah 2.6).

Set primer LAMP boleh direka menggunakan pelbagai perisian seperti PrimerExplorer (PrimerExplorer 2014), LAMP Designer (OptiGene 2014) dan LAMP Designer Software (PREMIER Biosoft 2014) (Notomi et al. 2000; Parida et al. 2008). LAMP Assay Versatile Analysis (LAVA) (LAVA-DNA 2015) telah direka oleh Torres et al. (2011) sebagai sumber terbuka akibat pembatasan program perisian sedia ada. eLAMP pula ialah skrip PERL yang merangsang LAMP dan telah diperkenalkan pada 2012 oleh Salinas dan Little. eLAMP dapat memadankan dengan hampir tepat antara primer dan templat serta dapat menguji rekaan primer LAMP ke atas sasaran. Skrip PERL boleh dimuat turun dari laman web New York Botanical Garden (Salinas & Little 2012).

2.11.4 Visualisasi Produk Amplifikasi LAMP

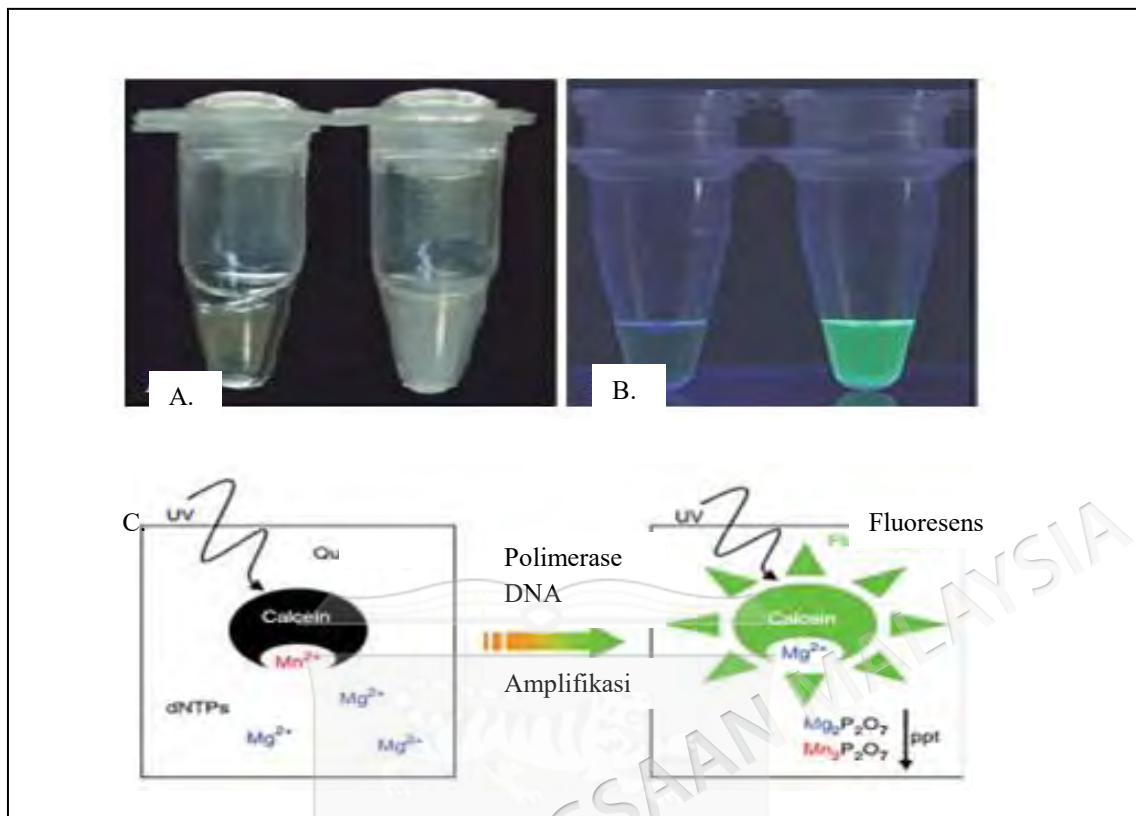
Produk DNA yang telah diamplifikasi boleh dianalisa melalui elektroforesis gel. Berbeza dengan produk PCR, produk positif LAMP akan menunjukkan jalur corak tangga. Hal ini adalah disebabkan gegelung berganda yang terbentuk sewaktu amplifikasi berlaku. Namun, produk LAMP boleh dicerna menggunakan enzim penyekatan untuk pengesanan lanjut saiz struktur dan seterusnya dianalisa melalui elektroforesis (Notomi et al. 2000; Parida et al. 2008).

Kaedah lain untuk mengesan reaksi LAMP positif ialah dengan memantau kekeruhan produk disebabkan tindak balas campuran LAMP menggunakan turbidimeter (Mori & Notomi 2009). Kekeruhan ini adalah daripada mendakan magnesium pirofosfat yang dihasilkan sebagai produk sampingan (Fakruddin 2011). Kekeruhan juga boleh dikesan melalui mata kasar dengan memerhatikan mendapan putih di bawah tiub seperti pada RAJAH 2.8 (Parida et al. 2008). Pengeluaran mendapan ini berdasarkan reaksi tindak balas berikut:



Ion pirofosfat dibebaskan daripada dNTP sebagai produk sampingan [1] dan apabila jumlah ion semakin banyak, ion ini akan bertindak balas dengan ion magnesium di dalam penimbal reaksi LAMP menghasilkan mendakan [2]. Reaksi LAMP akan mensintesis $\geq 10 \mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ DNA yang mendorong kepada penghasilan mendakan. Sementara itu, DNA yang dihasilkan PCR adalah $\geq 0.2 \mu\text{g}/25 \mu\text{l}$, di mana sangat rendah untuk menghasilkan mendakan magnesium pirofosfat (Mori et al. 2001).

Tiub yang mengandungi produk LAMP juga boleh diperhatikan melalui pencahayaan ultraungu (UV) dengan kehadiran reagen pengesanan pendarfluor (FDR) di dalam campuran reaksi LAMP sebelum amplifikasi bermula (Parida et al. 2008; Fakruddin 2011). Calcein di dalam FDR akan bergabung dengan ion mangan. Setelah ion pirofosfat terhasil di dalam reaksi LAMP, calcein dan ion pirofosfat bergabung untuk menyingkirkan ion mangan. Penyingkiran ion mangan menyebabkan penukaran warna daripada oren-kemerahan kepada hijau terang. Jika produk LAMP adalah negatif, warna asal akan dikekalkan (Parida et al. 2008). Perubahan warna juga boleh diperhatikan melalui mata kasar (rujuk Rajah 2.8).



Rajah 2.8 Visualisasi produk LAMP dengan mata kasar. Mendapan putih menandakan positif LAMP dapat diperhatikan (A) dan apabila diperhatikan di bawah cahaya UV (B). Penyingkiran ion mangan menyebabkan penukaran warna hijau pendarfluor (C) (Tomita et al. 2008; Mori & Notomi 2009)

Selain FDR, pewarna SYBR Green I juga boleh digunakan untuk melihat perubahan warna pada tindak balas LAMP (Parida et al. 2008). Asai berwarna menggunakan hidroksil naftol biru juga telah dibangunkan (Goto et al. 2009). Selain itu, pewarna DNA pengikat seperti etidium bromida, picogreen, GeneFinderTM atau propidium iodida juga boleh digunakan (Hill et al. 2008; Parida et al. 2008; Almasi et al. 2013; Suebsing et al. 2013). Dalam pada itu, Lam et al. (2008) membangunkan teknik pengimejan pendarfluor untuk LAMP di peringkat molekul tunggal yang mana dilakukan pada gel poliakrilamida (PAA) kepek mikro. Teknik ini menunjukkan keringkas pendekatan satu-langkah membolehkan amplifikasi dan pengesanan dilaksanakan bersama dalam tempoh satu jam.

2.11.5 Kelebihan dan Kekurangan LAMP

LAMP mempunyai banyak kelebihan sebagai alternatif amplifikasi asid nukleik. Penggunaan 4-6 primer memastikan spesifisiti yang tinggi semasa amplifikasi berbanding PCR (Notomi et al. 2000; Fakruddin 2011). Sensitiviti LAMP sangat tinggi dan menghasilkan sehingga 10^9 salinan dalam tempoh satu jam (Mori et al. 2001). Selain itu, tindak balas LAMP sangat cepat kerana tidak memerlukan penyahasian haba dan kitaran terma seperti PCR. LAMP hanya menggunakan satu suhu malar, oleh itu, teknik ini sangat efisien dan tinggi kerana tidak melibatkan perubahan terma (Fakruddin 2011).

Selain itu, toleransi LAMP terhadap komponen perencat dan bahan biologi lain adalah tinggi berbanding kaedah PCR (Kaneko et al. 2007; Mori & Notomi 2009). Disebabkan itu, pengekstrakan DNA juga boleh disingkirkan (Dugan et al. 2012; Ebbinghaus et al. 2012). Amplifikasi dan analisis produk juga boleh dilaksanakan serentak, yang mana pendekatan ini lebih murah, menjimatkan masa dan tidak memerlukan pos-amplifikasi. Reaksi LAMP boleh dilakukan di dalam blok haba atau rendaman air. Selain itu, reagen LAMP termasuklah polimerase *Bst* sangat stabil untuk digunakan walaupun disimpan pada suhu 25°C dan 37°C (Thekisoe et al. 2009). Kesimpulannya, asai ini sangat sesuai digunakan bagi makmal lapangan (Notomi et al. 2000) dan mengurangkan kesan kontaminasi.

Bagaimanapun, kebergunaan LAMP diterhadkan oleh beberapa perencat walaupun LAMP mempunyai toleransi tinggi terhadap perencat berbanding PCR (Kaneko et al. 2007; Dugan et al. 2012). Saiz sasaran DNA juga perlu ditetapkan ≤ 300 bp dan primer LAMP perlu direka secara kritikal (Parida et al. 2008; Fakruddin 2011). Contohnya, primer (FIP dan BIP) perlu disintesis daripada kaedah HPLC. Selain itu, tahap sensitiviti LAMP menyumbang kepada masalah kontaminasi kerana produk LAMP sangat stabil dan tidak mudah terdegradasi (Bai et al. 2011). Namun, masalah ini dapat diatasi dengan mengeramkan campuran reaksi LAMP bersama Urasil-DNA Glycosylase (UNG) (He & Xu 2010). Selain itu, kontaminasi juga dapat dielakkan dengan tidak melakukan elektroforesis gel, sebaliknya menggunakan indikator pewarna atau ion metal (Dhama et al. 2014).

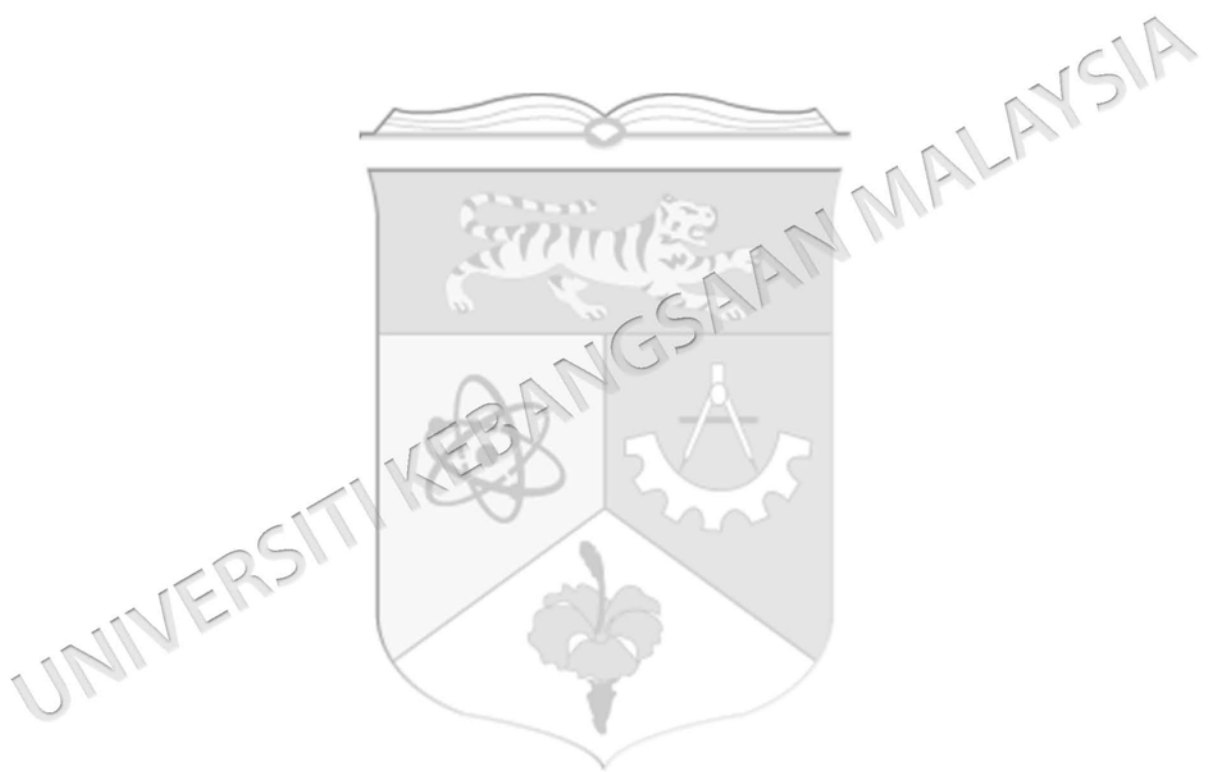
2.11.6 Aplikasi LAMP untuk Diagnosis Parasit

LAMP telah dibangun dan diaplikasikan untuk mengesan pelbagai patogen parasit yang menyebabkan penyakit kepada manusia. Antara spesies parasit yang telah berjaya dikesan menggunakan teknik LAMP adalah seperti *Trypanosoma* (Njiru et al. 2008; Thekisoe et al. 2009), *Plasmodium* (Han et al. 2007; Polley et al. 2010; Lau et al. 2011), *Cryptosporidium* (Karanis et al. 2007), *Leishmania* (Khan et al. 2012), *Toxoplasma gondii* (Lau et al. 2010; Koloren 2013), *Schistosoma mansoni* (Fernández-Soto et al. 2014), *Babesia* spp. (Iseki et al. 2007; Liu et al. 2012), *Taenia* spp. (Nkouawa et al. 2009), *Giardia duodenalis* (Plutzer & Karanis 2009), *Entamoeba histolytica* (Liang et al. 2009), brugian filariasis (Poole et al. 2012) dan *Pneumocystis* spp. (Uemura et al. 2008). Setakat ini, kit LAMP malaria telah dibangun dan dikomersialkan sebagai ujian diagnostik sekitar tahun 2012 (Polley et al. 2013).

Pengesanan sensitiviti dan spesifisiti LAMP yang tinggi telah ditunjukkan dalam beberapa kajian berbanding kaedah berasaskan PCR. Hal ini membuktikan bahawa LAMP dapat bertindak sebagai teknik alternatif yang cepat untuk pengesanan dan identifikasi awal bagi penyakit berjangkit. Kajian oleh Lau et al. (2010) dan Khan et al. (2012) menunjukkan LAMP untuk *T. gondii* dan *Leishmania* mencapai sensitiviti tinggi (87.5%; 90.7%) dan spesifisiti 100%. Sementara itu, sensitiviti untuk LAMP *Babesia* dan *Trypanosoma* adalah 0.1 dan 1.0 pg DNA berbanding PCR konvensional iaitu 100 pg (Njiru et al. 2008; Liu et al. 2012). Disebabkan toleransi tinggi terhadap beberapa bahan biologi, asai LAMP telah dibangun menggunakan sampel klinikal dan persekitaran yang berbeza seperti darah, sputum, tinja, air liur, urin dan sumber air. Selain itu, satu kajian telah berjaya membangunkan asai LAMP untuk infeksi parasit tanpa melakukan pengekstrakan DNA dan hanya memanaskan sampel darah pada 99°C selama 10 minit sebelum amplifikasi LAMP bermula (Poon et al. 2006).

Pelaksanaan operasi LAMP yang mudah beserta karakter asai yang unik menunjukkan potensi LAMP untuk diaplikasi di makmal diagnostik klinikal, pemantauan persekitaran, keselamatan makanan dan bidang kesihatan secara meluas dengan prospek pembangunan yang lebih baik pada masa akan datang. Selain itu,

ujian genetik akan menjadi lebih mudah bukan sahaja dalam bidang perubatan malahan untuk pelbagai bidang kritikal tanpa keperluan alatan sofistikated atau kepakaran yang tinggi terutamanya untuk negara-negara yang sedang membangun.



BAB III

METODOLOGI

3.1 KAEDAH KAJIAN

3.1.1 Reka Bentuk Kajian

Kajian ini merupakan satu kajian keratan rentas yang dilakukan dalam kalangan komuniti Orang Asli di sekitar Pos Tohoi, Kelantan, Malaysia menggunakan sampel-sampel tinja yang sudah tersedia ada di Jabatan Parasitologi & Entomologi Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM).

3.1.2 Tempoh Masa Kajian

Tempoh kajian ini dilakukan selama 24 bulan bermula dari bulan Februari 2014 sehingga Januari 2016.

3.1.3 Sumber Sampel

Seratus sampel tinja Orang Asli yang sihat dan asimptomatik dari kawasan Pos Tohoi, Kelantan, Malaysia yang telah tersedia ada di Jabatan Parasitologi & Entomologi Perubatan, UKM telah digunakan untuk kajian ini. Sampel-sampel ini sebelumnya telah digunakan untuk kajian mengenai infeksi parasit usus, dan telah mendapat kelulusan etika daripada pihak Jawatankuasa Etika Penyelidikan UKM beserta persetujuan bertulis daripada setiap Orang Asli yang terlibat.

3.2 PENYEDIAAN SAMPEL KAWALAN POSITIF

3.2.1 Sampel Klinikal Tinja *Enterocytozoon bieneusi*

Sampel klinikal tinja yang digunakan sebagai kawalan positif dalam kajian ini telah diperoleh daripada Unit Parasitologi, Jabatan Perkhidmatan Makmal Diagnostik, PPUKM. Sampel ini didapati positif mikrosporidia setelah diperiksa menggunakan mikroskop cahaya melalui teknik pewarnaan Gram kromotrop Kinyoun (GCK) (rujuk 3.3). DNA daripada sampel ini seterusnya diekstrak menggunakan kit komersial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Jerman) (rujuk 3.4). Ketulenan DNA yang telah diekstrak diperiksa menggunakan mesin Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Amerika Syarikat). Nisbah ketulenan DNA ialah 1.88 (A_{260}/A_{280}). DNA tersebut kemudiannya telah diuji dengan PCR (da Silva et al. 1996) (rujuk 3.5) untuk mengamplifikasi gen sasaran 607 bp SSU rRNA *E. bieneusi* dan dianalisa menggunakan kaedah elektroforesis gel (rujuk 3.6). Melalui elektroforesis gel, jalur produk DNA yang telah diamplifikasi berada pada 607 bp menunjukkan spesies *E. bieneusi*. Produk PCR disahkan lebih lanjut melalui penjujukan (MyTACG Bioscience Enterprise) (rujuk 3.7). Berdasarkan keputusan penjujukan, gen tersebut sepadan dengan jujukan piawai daripada pangkalan data GenBank iaitu KF271515.1 dan dijadikan sebagai kawalan positif di dalam kajian ini.

3.2.2 Sel Kultur *Encephalitozoon hellem* dan *Encephalitozoon cuniculi*

Kawalan DNA positif bagi genus *Encephalitozoon* telah disediakan daripada sel kultur *E. cuniculi* (ATCC 50602) dan *E. hellem* (ATCC 50450) yang dibeli daripada American Type Culture Collection, Amerika Syarikat. Metodologi lengkap pengkulturan diterangkan pada bahagian 3.2.2.1 hingga 3.2.2.2. Kawalan DNA positif untuk spesies *E. intestinalis* pula dibeli secara terus daripada Microbiologics, Amerika Syarikat dan tatacara penggunaannya diterangkan pada bahagian 3.2.3.

a. Kultur Sel Vero

Sel Vero merupakan jalur sel yang berasal dari ginjal monyet hijau Afrika dan berfungsi sebagai sel perumah untuk penumbuhan virus atau parasit (Govorkova et al. 1996; Joseph & Sharma 2009). Oleh itu, sel Vero digunakan dalam kajian ini sebagai sel perumah untuk penumbuhan spora *E. hellem* dan *E. cuniculi*. T25 sel Vero (ATCC CCL-81) telah diperoleh dari Unit Kultur Tisu, Jabatan Mikrobiologi Perubatan, UKM.

Pentripsinan untuk subkultur telah dilakukan seperti dilaporkan oleh Ammerman et al. (2008). Medium sel kultur dibuang manakala sel dirawat dengan 2.0 ml tripsin-asid etilena dwiaminotetra esetik (EDTA) (Gibco, Amerika Syarikat) bertujuan untuk membebaskan lekapan sel. Setelah sel tertanggal, 1.0 ml sel kultur dipipet ke dalam kelalang T25 yang mengandungi 10 ml 'Minimum Essential Media' (MEM) (Gibco, Amerika Syarikat), 1000 unit penisillin dan streptomisin (Gibco, Amerika Syarikat) dan 10% haba-tidak aktif serum fetal bovin (FBS) (Gibco, Amerika Syarikat). Kelalang dieram di dalam inkubator (37°C dengan 5% karbon dioksida). Sel diperiksa setiap hari. Media ditukar dalam setiap 3-4 minggu sehingga sel-sel mencapai 90% konfluen monolapisan.

b. Penyediaan Kultur Genus *Encephalitozoon*

Prosedur kultur dilakukan seperti dilaporkan oleh Joseph dan Sharma (2009). Untuk memulakan kultur, strain rujukan (*E. cuniculi* dan *E. hellem*) dinyah sejuk segera di dalam rendaman air bersuhu 37°C selama 2-3 minit. Strain yang telah dinyah sejuk diinokulat di dalam kultur sel Vero dan diinkubasi selama satu hari.

Medium kultur dari setiap kelalang dibuang dan digantikan setiap hari untuk minggu pertama dan dua kali seminggu selepas itu. Medium yang digunakan adalah 10 ml MEM, 1000 unit penisillin dan streptomisin dan 10% FBS. Selepas pengemparan (2500 rpm) selama 10 minit, medium dibuang daripada pelet spora dan pelet tersebut dicampurkan ke dalam kelalang kultur Vero sel baru dan diinkubasi lagi sekali. Kultur-kultur ini diselua selama tiga minggu sebelum dituai. Pentripsinan

dilakukan untuk membebaskan lekapan sel untuk mendapatkan spora. Spora kemudiannya disimpan pada suhu 4°C sebelum proses pengekstrakan bermula.

3.2.3 DNA Sintetik *Encephalitozoon intestinalis*

DNA sintetik *E. intestinalis* (Helix Elite) telah dibeli dari Microbiologics, Amerika Syarikat untuk digunakan sebagai kawalan positif *E. intestinalis* dalam kajian ini. Protokol penggunaan adalah mengikut arahan pengeluar. Tiub DNA sintetik diempar seketika untuk mengelakkan kehilangan material kering di dalam tiub tersebut. Sebanyak 55 µl air suling telah ditambah dan dieram selama 15 minit pada 2-8°C untuk melengkapkan proses penghidratan. DNA sintetik yang telah dihidrat dicampur dan dilarutkan perlahan-lahan dengan menggunakan pipet. Vorteks akan menyebabkan kerosakan kepada asid nukleik. Tiub diempar sekali lagi untuk memastikan semua cecair berada di bawah tiub.

Sebanyak 10 µl DNA sintetik yang dihidrat dialikuot ke dalam lima tiub pengemparmikro baru dan disimpan pada suhu -20°C. Stok pekat ini kemudian dicairkan untuk kegunaan asai molekul. Satu tiub alikuot dinyah sejuk pada suhu 2-8°C selama 15 minit dan diempar. Seterusnya, 90 µl air suling ditambah ke dalam alikuot dan dicampur perlahan-lahan menggunakan pipet. DNA sintetik yang telah dicairkan disimpan pada suhu -20°C untuk penggunaan selanjutnya.

3.3 PEMERIKSAAN MIKROSKOPIK

Mikroskop cahaya digunakan dalam kajian ini sebagai pemeriksaan awal spora mikrosporidia terhadap 100 sampel tinja yang diperolehi. Teknik pewarnaan GCK telah digunakan untuk mewarna calitan sampel di atas slaid mikroskop (Salleh et al. 2011). Senarai bahan kimia yang digunakan adalah seperti pada Jadual 3.1.

Jadual 3.1 Penyediaan bahan pewarna untuk teknik GCK

Material	Jumlah isipadu/ berat bahan campuran
Pewarna Gram	1% kristal violet atau gentian violet
Gram iodin	1.0 g iodin 2.0 g potasium iodida 300 ml air suling
Penyahwarna	50 ml etil eter 50 ml aseton
Pewarna kromotrop	6.0 g kromotrop 2R 0.15 g 'fast green' 0.7 g asid fosfotungstik 3 ml asid asetik glasial 100 ml air suling
90% asid alkohol	4.5 ml asid asetik 995.5 ml 90% etil alkohol
Pewarna Kinyoun karbol fuksin	10 ml 95% alkohol tepu dari fuksin asas 90 ml 50% larutan fenol akueus

Secara ringkasnya, apusan tinja nipis dicalitkan pada slaid dan dibiarkan kering sebelum ditetapkan dengan metanol selama 5 minit. Slaid dibiarkan kering sebelum memulakan proses pewarnaan. Prosedur dimulakan dengan mencelupkan slaid apusan ke dalam kristal ungu selama 1 minit dan lebihan warna dibilas dengan Gram iodin. Slaid kemudian diwarnakan dengan Gram iodin selama 2 minit. Gram iodin dibersihkan menggunakan penyahwarna sehingga slaid kelihatan tidak berwarna. Slaid kemudian dibilas menggunakan air paip selama 10-15 saat. Slaid diwarnakan dengan pewarna kromotrop selama 8 minit. Setelah itu, slaid dibilas dengan 90% asid-alkohol dan diwarnakan dengan Kinyoun karbol fuksin selama 3 minit. Slaid dibilas sekali lagi dengan 90% asid-alkohol, dibersihkan dengan 95% alkohol selama 5 minit dan 100% etil alkohol selama 2 minit sebelum dibiarkan kering. Sejumlah 100 slaid diperiksa di bawah 100X kanta rendaman minyak mikroskop cahaya. Spora yang dikesan di dalam spesimen bewarna digred seperti berikut: 1+ jika purata bilangan spora yang dikesan ialah 5-10; 2+ jika purata bilangan spora dikesan ialah 11-20; dan 3+ jika purata bilangan spora melebihi 20 spora (Norhayati et al. 2008).

3.4 PENGEKSTRAKAN DNA SAMPEL TINJA

DNA daripada 100 sampel tinja diekstrak menggunakan kit komersial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Jerman). Prosedur pengekstrakan dilakukan dengan mengikuti arahan pengeluar dan mengandungi tiga langkah utama iaitu lisis sel, penyingkiran debris selular dan elusi DNA.

Protokol dimulakan dengan menimbang spesimen tinja sebanyak 180-220 mg di dalam tiub 1.5 ml. Sebanyak 1.4 ml penimbal lisis tinja (ASL) ditambah ke dalam tiub mengandungi sampel tinja. Tiub kemudian divorteks berterusan selama 1 minit sehingga keseluruhan tinja dihomogen. Penimbal akan memecah sel dan membran nuklear yang menghalang proses pengekstrakan. Tiub kemudian dipanaskan pada suhu 70°C selama 5 minit untuk mematikan bakteria dan parasit lain. Sampel kemudian divorteks selama 15 saat dan diempar (13 000 rpm) selama 1 minit untuk mendapat mendakan pelet tinja.

Sebanyak 1.2 ml supernatan dipipet ke dalam tiub 1.5 ml baru manakala tiub yang mengandungi pelet tinja itu dibuang. Satu tablet InhibitEX ditambah kepada setiap tiub supernatan dan divorteks berterusan selama 1 minit sehingga keseluruhan tablet dilarutkan. Tiub kemudian dieram pada suhu bilik selama 1 minit supaya perencat yang terdapat di dalam supernatan menjerap kepada matriks InhibitEX. Tiub diempar sekali lagi pada kelajuan 13 000 rpm selama 3 minit untuk mendapat mendakan perencat yang melekap kepada matriks InhibitEX. Keseluruhan supernatan dipipet ke dalam 1.5 ml tiub baru manakala tiub yang mengandungi pelet dibuang. Pada masa yang sama, 15 µL proteinase K dipipet ke dalam 1.5 ml tiub yang lain. Proteinase K membantu menyahsli protein yang tidak diperlukan di dalam sampel. Selepas pengemparan selesai, 200 µl supernatan dipipet ke dalam tiub 1.5 ml yang mengandungi proteinase K. Seterusnya, 200 µl penimbal lisis (AL) ditambah dan tiub divorteks 15 saat. Tiub dipanaskan pada 70°C selama 10 minit. Selepas itu, 200 µl 100% etanol ditambah ke dalam lisat dan divorteks.

Penulenan DNA dimulakan dengan menggunakan kolum spin QIAamp yang disediakan di dalam kit. Kolum spin dilabel dan diletakkan di dalam 2.0 ml tiub

pengumpul. Keseluruhan lisat dari 1.5 ml tiub dipipet ke dalam kolum spin. Kolum spin diempar (13 000 rpm) selama 1 minit. Kolum spin QIAamp diletakkan di dalam tiub pengumpul baru sementara tiub yang mengandungi turasan dibuang. Selepas itu, 500 µl penimbal cuci 1 (AW1) ditambah ke dalam kolum spin dan diempar (13 000 rpm) diempar selama 1 minit. Langkah ini diulang dengan menggunakan 500 µl penimbal cuci 2 (AW2). Kolum spin diempar (13 000 rpm) selama 3 minit. Tiub pengumpul dibuang dan digantikan dengan tiub baru. Kolum spin diempar sekali lagi selama 1 minit untuk menyingkirkan lebihan penimbal AW2.

Kolum spin diletakkan di dalam 1.5 ml tiub baru dan dilabel. Sebanyak 200 µl penimbal elusi (AE) ditambah ke dalam spin kolum untuk memulakan proses elusi DNA. Selepas pengekstrakan, ketulenan DNA dinilai dan nisbah ketumpatan optikal (OD) (A_{260}/A_{280}) berada di dalam lingkungan 1.7 – 2.0 bagi semua sampel DNA.

3.5 PENGEKSTRAKAN DNA DARI KULTUR SEL

DNA diekstrak dari kultur *E. hellem* (ATCC 50451) dan kultur *E. cuniculi* (ATCC 50602) untuk dijadikan sebagai kawalan positif bagi kajian ini. Prosedur pengekstrakan dilakukan dengan mengikuti arahan pengeluar reagen DNAzol iaitu Invitrogen, Life Technologies dari Amerika Syarikat. Secara ringkasnya, sebanyak 200 µl media kultur diasingkan ke dalam tiub 1.5 ml. Sel-sel tersebut dituai melalui pengemparan (13 000 rpm selama 2 minit pada suhu 10°C) dan supernatan dibuang. Sebanyak 100 µl DNAzol ditambah ke dalam tiub tersebut, dicampurkan bersama dengan pelet dan kemudian dibiarkan di dalam suhu bilik selama 15 minit. Setelah itu, tiub tersebut diempar selama 15 min (4°C) pada 10 000 rpm. Supernatan dipipet ke dalam tiub 1.5 ml yang baru dan dicampur bersama 50 µl etanol 100% etanol. Tiub tersebut diempar sekali lagi selama 15 min (4°C) pada 13,000 rpm. Selepas pengemparan, supernatan dibuang dan dibasuh dengan alkohol 75% sebanyak dua kali. Tiub tersebut dibiarkan kering di udara sebelum terampai di dalam 100 µl air suling.

3.6 AMPLIFIKASI REAKSI RANTAI POLIMERASE (PCR)

Kaedah PCR dijalankan untuk menentukan spesies mikrosporidia menggunakan empat set primer spesies-spesifik. Terdapat beberapa modifikasi amplifikasi PCR dilakukan untuk memastikan kondisi kitaran yang digunakan adalah optimum.

3.6.1 Amplifikasi PCR untuk Spesies *E. bienersi*, *E. hellem* dan *E. intestinalis*

Amplifikasi PCR untuk spesifik-spesies dilakukan dengan menggunakan HelixAmp Taq Polymerase (NanoHelix Co., Ltd., Korea Selatan). Tindak balas PCR ini dijalankan di dalam 25 µl campuran reaksi mengandungi 10 µM setiap primer, 10 mM dNTPs, 10X penampan PCR, 1.25 U polimerase Taq, 5 µl DNA, dan air suling. Untuk *E. intestinalis*, kawalan positif yang digunakan ialah DNA sintetik *E. intestinalis* HE 0004S dari gen 18S rRNA (Helix Elite, Microbiologics, Amerika Syarikat). Jujukan primer-primer ditunjukkan pada Jadual 3.2.

Amplifikasi PCR bagi spesies *E. bienersi* dijalankan mengikut kaedah yang diterbitkan oleh da Silva et al. (1996). Manakala, kaedah PCR untuk amplifikasi spesies *E. hellem* adalah seperti dinyatakan oleh Visvesvara et al. (1994) tanpa modifikasi. Untuk amplifikasi spesies *E. intestinalis*, kondisi kitaran PCR yang dilakukan adalah seperti diterbitkan oleh Chabchoub et al. (2009). Namun, memandangkan kondisi yang digunakan menunjukkan jalur yang tidak spesifik, suhu penyepuhlindapan untuk pasangan primer ini juga telah dioptimumkan dari 55°C hingga 57°C. Jadual 3.3 menunjukkan kondisi kitaran bagi setiap amplifikasi.

3.6.2 Amplifikasi PCR untuk Spesies *E. cuniculi*

Amplifikasi PCR untuk spesies *E. cuniculi* dilakukan dengan menggunakan HelixAmp Taq Polymerase (NanoHelix Co., Ltd., South Korea). Tindak balas PCR ini dijalankan mengikut kaedah yang telah diterbitkan oleh Wang et al. (2005) tanpa sebarang modifikasi. Tindak balas dilakukan di dalam 25 µl campuran reaksi mengandungi 10 µM setiap primer, 10 mM dNTPs, 10X penampan PCR, 2mM MgCl₂, 2.5 U polimerase Taq, 5 µl DNA, dan air suling. Jujukan primer-primer untuk

amplifikasi PCR *E. cuniculi* ditunjukkan pada Jadual 3.2 manakala Jadual 3.3 menunjukkan kondisi kitaran PCR *E. cuniculi*.

Jadual 3.2

Primer-primer spesifik-spesies *E. bieneusi* dan *Encephalitozoon* spp.

Spesies	Primer	Jujukan (5'-3')	Saiz anggaran (~bp)	Rujukan
<i>E. bieneusi</i>	EBIEF1	GAAACTTGTCCACTCCTTACG	607	da Silva et al. (1996)
	EBIER1	CCATGCACCACTCCTGCCATT		
<i>E. hellem</i>	EHELF	TGAGAAGTAAGATGTTTAGCA	547	Visvesvara et al. (1994)
	EHELRL	GTAAAAACACTCTCACACTCA		
<i>E. intestinalis</i>	V1	CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC	375	Chabchoub et al. (2009)
	SI500	CTCGCTCCTTTACACTCG		
<i>E. cuniculi</i>	ECUNF	ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG	549	Wang et al. (2005)
	ECUNR	TGCCATGCACTCACAGGCATC		

Jadual 3.3 Kondisi kitaran PCR mengikut spesies

Spesies	Primer	Kitaran PCR		Rujukan
<i>E. bieneusi</i>	EBIEF1	94°C	5 min	da Silva et al. (1996)
	EBIER1	94°C	30 saat	
		55°C	30 saat	
		72°C	90 saat	
		72°C	10 min	
<i>E. hellem</i>	EHELF	94°C	5 min	Visvesvara et al. (1994)
	EHELRL	94°C	45 saat	
		55°C	30 saat	
		72°C	45 saat	
		72°C	10 min	
<i>E. intestinalis</i>	V1	94°C	5 min	Chabchoub et al. (2009)
	SI500	94°C	45 saat	
		55°C	30 saat	
		72°C	45 saat	
		72°C	10 min	
<i>E. cuniculi</i>	ECUNF	94°C	30 saat	Wang et al. (2005)
	ECUNR	52°C	30 saat	
		72°C	1 min	
		72°C	7 min	

3.7 ELEKTROFORESIS GEL

Teknik elektroforesis gel digunakan untuk menganalisa dan mengesahkan hasil produk PCR. Secara umum, elektroforesis dilakukan menggunakan 1% gel mengandungi 3 µl pewarna gel DNA SYBR Safe (Invitrogen, Amerika Syarikat) dan 1X penimbal LB (asid litium borik) (Faster Better Media LLC, Amerika Syarikat). Gel dibuat dengan meleburkan campuran 0.5 g gel agarosa (Norgen, Kanada) dan 50 ml 1X penimbal LB di dalam ketuhar gelombang mikro selama 2 minit. Larutan gel dibiarkan sejuk seketika. Sebelum dituang ke atas bekas gel (Major Science, Amerika Syarikat), 3 µl pewarna gel DNA SYBR Safe ditambah ke dalam larutan gel. Sikat gel dengan saiz lubang yang bersesuaian diletakkan di dalam bekas gel dan gel dibiarkan keras selama 30-60 minit. Gel kemudiannya diletakkan di dalam tangki elektroforesis berisi penimbal 1X LB. Sebanyak 1µl 6X pewarna pemberat DNA (Nanohelix, Korea

Selatan) dicampur bersama 5µl sampel dan dipipet ke dalam lubang gel. Untuk menentukan saiz DNA, 100 bp penanda pemberat molekul (Norgen Biotek Corporation, Kanada) juga dipipet ke dalam lubang gel. Elektroforesis dijalankan pada 90 voltan selama 90 minit. Jalur DNA diperiksa di bawah cahaya UV dan direkodkan menggunakan sistem dokumentasi gel (Bio-Rad, Amerika Syarikat).

3.8 ANALISA JUJUKAN

Analisa jujukan digunakan sebagai pengesahan lanjut produk amplifikasi PCR. Beberapa sampel positif-PCR dihantar kepada MyTACG Bioscience Enterprise untuk penjujukan. Hasil keputusan penjujukan dibandingkan dengan jujukan *E. bieneusi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* dan *E. cuniculi* di pangkalan data GenBank menggunakan program Nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.9 AMPLIFIKASI ISOTERMA BERPENGANTARA GELUNG (LAMP) *E. bieneusi*

3.9.1 Reka Bentuk Primer LAMP

Tiga set primer LAMP *E. bieneusi* telah direka menggunakan perisian LAMP Designer versi 1.10 (PREMIER Biosoft, Amerika Syarikat). Ketiga-tiga set primer ini mensasarkan jujukan subunit kecil rRNA *E. bieneusi* (nombor induk GenBank AF101198, L16868 dan L07123) (da Silva et al. 1996; Verweij et al. 2007). Namun, berdasarkan perisian LAMP, jujukan-jujukan set primer bagi L16868 dan L07123 adalah sama. Oleh itu, hanya dua set primer LAMP sahaja diuji, dioptimasi dan dinilai. Jujukan kedua-dua set primer (F3, B3, FIP dan BIP) ditunjukkan pada Jadual 3.4 dan Jadual 3.5.

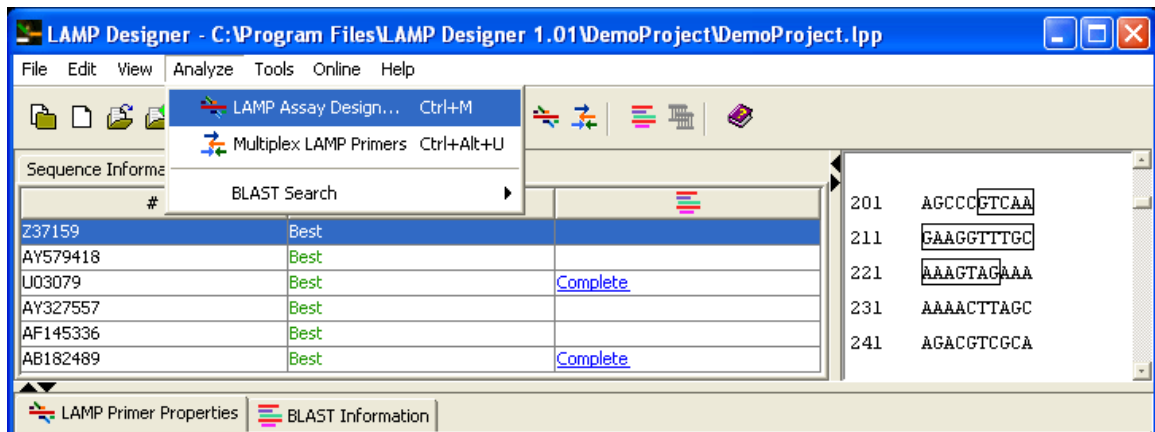
Jadual 3.4 Jujukan bagi set primer I untuk teknik LAMP *E. bieneusi* (nombor induk GenBank AF101198)

Primer	Jujukan (5' – 3')
F3	TCGGAATGTATGGTAGGTGA
B3	CGACGGATCCAAGTGATC
BIP	TTGGTACGTGATGGTTGGATGGGCAACCTCCGATTTTCCT
FIP	GGAACCACCTCTAACTCACTGCTGTAGGCGTGAGAGTGTAT

Jadual 3.5 Jujukan bagi set primer II untuk teknik LAMP *E. bieneusi* (nombor induk GenBank L16868 dan L07123)

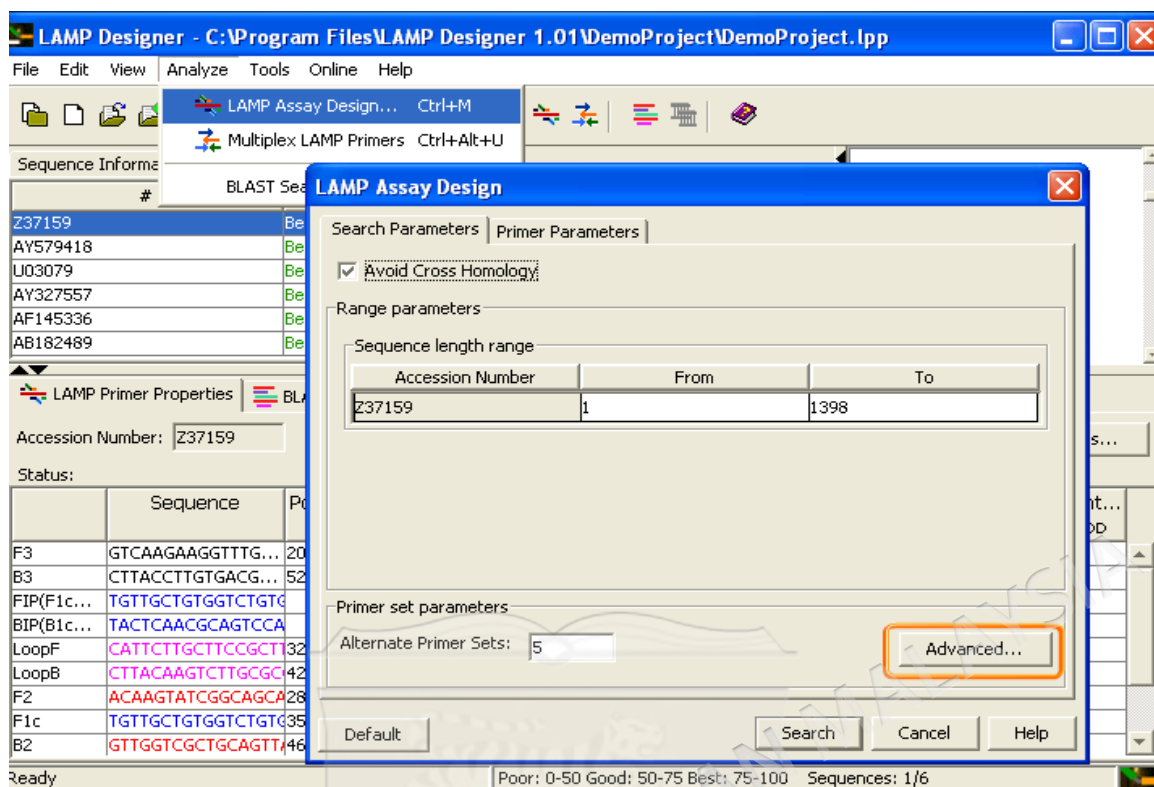
Primer	Jujukan (5' – 3')
F3	GTATAGACTGGCGAAGAATGAA
B3	AAGCAGCACAATCCACTC
BIP	AATCTTAGTGTTCTGGGCTCTGGGTAGTGTCTTCCGTCAATT
FIP	CACAGGCTGTCTGGCATAGTTGATCAAGGACGAAGGCAG

Terdapat beberapa perisian untuk merekabentuk primer bagi asai LAMP (rujuk 2.11.3). Perisian LAMP Designer Software dipilih kerana perisian ini akan menafsirkan keputusan carian BLAST secara automatik dan mengelakkan kawasan homologi silang yang signifikan dalam merekabentuk primer. Perisian LAMP Designer oleh PREMIER Biosoft juga mudah kerana tidak memerlukan pemasangan perisian 'Java Runtime Environment' (JRE) untuk memastikan kelancaran rekabentuk primer. Selepas memuat turun perisian ini, fail program dibuka dan 'LAMP Assay Designer' dipilih (Rajah 3.1).

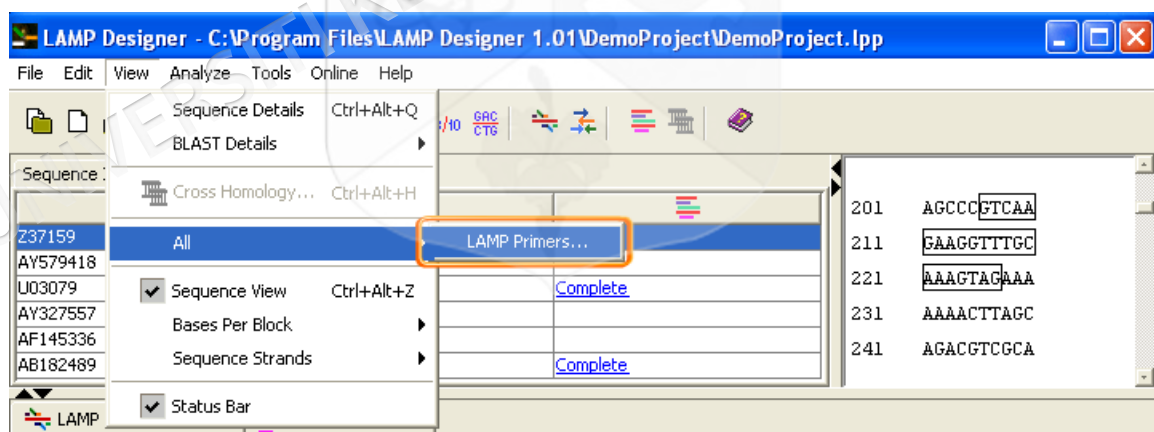


Rajah 3.1 Gambaran penggunaan aplikasi LAMP Designer. Program LAMP Designer dibuka dan LAMP Assay Design diklik untuk proses seterusnya

Pencarian parameter untuk merekabentuk set primer LAMP dispesifikasikan dengan menklik “Avoid Cross Homology” (Analyze > LAMP Assay Design > Search Parameter > klik pada Avoid Cross Homology) (rujuk Rajah 3.2). Secara automatik, program BLAST mencari jujukan templat sesuai dan mengelak kawasan homologi semasa proses rekaan. Program perisian akan memaparkan set primer terbaik untuk digunakan sebagai primer LAMP. Selain itu, program perisian ini juga turut memaparkan set primer alternatif dengan memilih View > All > LAMP Primers (Rajah 3.3). Primer gegelung juga dinyatakan di dalam perisian sebagai pilihan tambahan jika mahu melakukan amplifikasi LAMP menggunakan enam primer. Rajah 3.4 dan Rajah 3.5 menunjukkan rekaan primer akhir untuk LAMP *E. bieneusi* menggunakan nombor induk AF101198, L16868 dan L07123.



Rajah 3.2 Cara penggunaan perisian untuk mengelak homologi silang semasa merekabentuk primer LAMP



Rajah 3.3 Pemilihan set primer alternatif. Untuk memilih set primer alternatif, pengguna perlu menklik View > All > LAMP Primers

LAMP Primer Properties | BLAST Information

Accession Number: AF101198

Status:

	Sequence	Position	Length bp	Tm °C	GC %	Rating	Hairpin ΔG kcal/mol	Self Dimer ΔG kcal/mol	Run Length bp	GC Clamp
F3	TCGGAATGTATGGTAGGTGA	128	20	60	45	93.3	0	0	2	2
B3	CGACGGATCCAAGTGATC	414	18	59.6	55.6	88.4	0	-1.8	2	1
F1P(F1c+F2)	GGAACCACTCTAACTCACTGCTGTA		41							
B1P(B1c+B2)	TTGGTACGTGATGGTTGGATGGGCAA		40							
LoopF	CCACATCCCTCACCCCTTG	236	18	61.8	61.1	86.3	0	0	3	2
LoopB	GGAATGATGTGTATGGGT	299	21	62.2	47.6	86.3	0	0	3	3
F2	TGTAGGCGTGAGAGTGTAT	197	19	59.8	47.4	92.8	0	0	2	1
F1c	GGAACCACTCTAACTCACTGC	260	22	64.9	54.5	93.2	0	0	2	2
B2	GCAACCTCCGATTTTCCT	338	18	59.7	50	79.4	0	0	4	2
B1c	TTGGTACGTGATGGTTGGATGG	277	22	65	50	92.1	0	-1	2	2
Product			142	72.5	51.4	88.3				
Set						88.8				

Rajah 3.4

Set primer I untuk LAMP *E. bieneusi* DNA yang terbaik diberikan melalui perisian.

Ciri-ciri primer seperti kandungan GC-AT, suhu lebur dan panjang bes juga dinyatakan terperinci menggunakan perisian ini

A LAMP Primer Properties | BLAST Information

Accession Number: L16868

Status:

	Sequence	Position	Length bp	Tm °C	GC %	Rating	Hairpin ΔG kcal/mol	Self Dimer ΔG kcal/mol	Run Length bp	GC Clamp
F3	GTATAGACTGGCGAAGAATGAA	538	22	60	40.9	93.3	0	0	2	1
B3	AAGCAGCACAATCCACTC	819	18	60	50	93.3	0	0	2	1
FIP(F1c+F2)	CACAGGCTGTCGGCATAGTTGATCAA		38							
BIP(B1c+B2)	AATCTTAGTGTTCGGGCTCTGGGTAG		42							
LoopF	GGAACTACAGCGGTGTCTAAT	671	21	61.9	47.6	93	0	0	2	1
LoopB	GGATAGTACGCTCGCAAGG	744	19	62.4	57.9	90.9	0	0	2	2
F2	GATCAAGGACGAAGGCAG	619	18	59.9	55.6	93	0	0	2	3
F1c	CACAGGCTGTCGGCATAGTT	698	20	64.9	55	93.2	0	-0.2	2	1
B2	GTAGTGTCTCTCGTCAATT	798	20	59.6	45	90.7	0	0	2	1
B1c	AATCTTAGTGTTCGGGCTCTGG	722	22	64.4	50	83.7	0	0	3	2
Product			180	73	50	90.8				
Set						91.3				

B LAMP Primer Properties | BLAST Information

Accession Number: L07123

Status:

	Sequence	Position	Length bp	Tm °C	GC %	Rating	Hairpin ΔG kcal/mol	Self Dimer ΔG kcal/mol	Run Length bp	GC Clamp
F3	GTATAGACTGGCGAAGAATGAA	528	22	60	40.9	93.3	0	0	2	1
B3	AAGCAGCACAATCCACTC	807	18	60	50	93.3	0	0	2	1
FIP(F1c+F2)	CACAGGCTGTCGGCATAGTTGATCAA		38							
BIP(B1c+B2)	AATCTTAGTGTTCGGGCTCTGGGTAG		42							
LoopF	GGAACTACAGCGGTGTCTAAT	659	21	61.9	47.6	93	0	0	2	1
LoopB	GGATAGTACGCTCGCAAGG	732	19	62.4	57.9	90.9	0	0	2	2
F2	GATCAAGGACGAAGGCAG	607	18	59.9	55.6	93	0	0	2	3
F1c	CACAGGCTGTCGGCATAGTT	686	20	64.9	55	93.2	0	-0.2	2	1
B2	GTAGTGTCTCTCGTCAATT	786	20	59.6	45	90.7	0	0	2	1
B1c	AATCTTAGTGTTCGGGCTCTGG	710	22	64.4	50	83.7	0	0	3	2
Product			180	73.2	50.6	90.8				
Set						91.3				

Rajah 3.5

Set primer II untuk LAMP *E. bienersi* berdasarkan jujukan subunit kecil rRNA L16868 (A) dan L07123 (B). Ciri-ciri primer seperti kandungan GC-AT, suhu lebur dan panjang bes bagi kedua-dua rekaan primer adalah sama

3.9.2 Primer

Set primer yang digunakan dalam kajian ini disintesis oleh Bioneer Corporation, Korea Selatan melalui NHK Bioscience, Malaysia. Setiap primer merupakan gred Bio-RP. Penulenan Bio-RP memberi kualiti set primer yang hampir sama seperti penulenan HPLC (<http://us.bioneer.com/products/oligonucleotides/OligoPurificationoverview.aspx>).

Setelah set primer diterima, setiap primer dilarutkan di dalam air suling steril hingga mencapai kepekatan akhir 100 μM . Stok primer disimpan pada suhu -20°C di dalam kotak “cryobox” berlainan untuk meminimumkan kontaminasi reagen. Stok primer kemudian dicairkan kepada kepekatan 5 μM (F3 dan B3) dan 40 μM (FIP dan BIP) dengan air suling.

3.9.3 Pengoptimuman dan Pemilihan Set Primer LAMP

Pemilihan set primer LAMP yang terbaik untuk pengesanan DNA *E. bieneusi* di dalam sampel tinja manusia telah dilaksanakan. Pemilihan set primer tersebut dilakukan dengan membandingkan kebolehan primer-primer ini untuk mengamplifikasi DNA *E. bieneusi* dari suhu 60°C sehingga 65°C menggunakan blok haba. Pada masa yang sama, suhu optimum untuk pengesanan DNA *E. bieneusi* menggunakan teknik LAMP juga dinilai. Selain itu, spesifisiti kedua-dua set primer LAMP ini juga dilakukan untuk menilai kualiti kedua-dua set primer yang telah direkabentuk. Spesifisiti primer diuji dengan menggunakan sampel kawalan positif *E. hellem*, *E. cuniculi* dan *E. intestinalis*. Amplifikasi LAMP dijalankan menggunakan blok haba (rujuk 3.9.4). Elektroforesis gel digunakan untuk menganalisa dan membandingkan produk amplifikasi LAMP bagi setiap set primer.

Berdasarkan analisa elektroforesis gel (rujuk 4.4.1), pengesanan DNA *E. bieneusi* di dalam sampel tinja manusia menggunakan teknik LAMP diteruskan dengan menggunakan set primer I (nombor induk GenBank AF101198) dan suhu amplifikasi yang optimum adalah 60°C .

3.9.4 Amplifikasi LAMP

Reaksi LAMP dilakukan menggunakan amplifikasi kit Loopamp DNA (Eiken Chemical Co., Ltd, Jepun) yang mengandungi polimerase *Bst* dan campuran penimbal. Campuran 2X penimbal LAMP mengandungi 40 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 16 mM MgSO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween20, 1.6M betaina dan 2.8 mM setiap dNTP. Set primer I dipilih untuk pengesanan DNA *E. bieneusi* menggunakan LAMP.

Reaksi dilakukan dalam isipadu 25 µl yang mengandungi 5µM setiap primer F3 dan B3, 40 µM setiap primer FIP dan BIP, 12.5 µl 2X campuran penimbal, 8U polimerase *Bst*, 1 µl reagen pengesanan pendarfluor (FDR) dan air suling (dicampur untuk mencukupi isipadu 25 µl). Campuran diletakkan di dalam 0.2 ml tiub PCR, diikuti dengan penambahan 2 µl DNA. Sampel kawalan negatif LAMP mengandungi campuran reaksi di atas kecuali templat DNA. Reaksi LAMP divorteks perlahan, diikuti dengan pengemparan seketika. Tiub reaksi dieram pada suhu 60°C menggunakan blok haba (Bioshake iQ, Jerman) selama satu jam.

3.9.5 Pengesanan Produk LAMP

Dua kaedah pengesanan telah digunakan untuk menganalisa produk LAMP iaitu pemeriksaan visual menggunakan FDR dan elektroforesis gel. Melalui visualisasi mata kasar, pertukaran warna dari oren kemerahan kepada hijau pendarfluor telah direkodkan. Pengesanan pendarfluor juga dilakukan di bawah cahaya UV untuk pengesanan lanjut.

Untuk analisa elektroforesis gel, 1% elektroforesis gel agarosa digunakan (Rujuk 3.6). Pencernaan enzim penyekatan *MaeII* dilakukan untuk menjana jalur DNA yang diramalkan pada ~200 bp dan ~67 bp (rujuk 3.9.6).

3.9.6 Pencernaan Produk LAMP

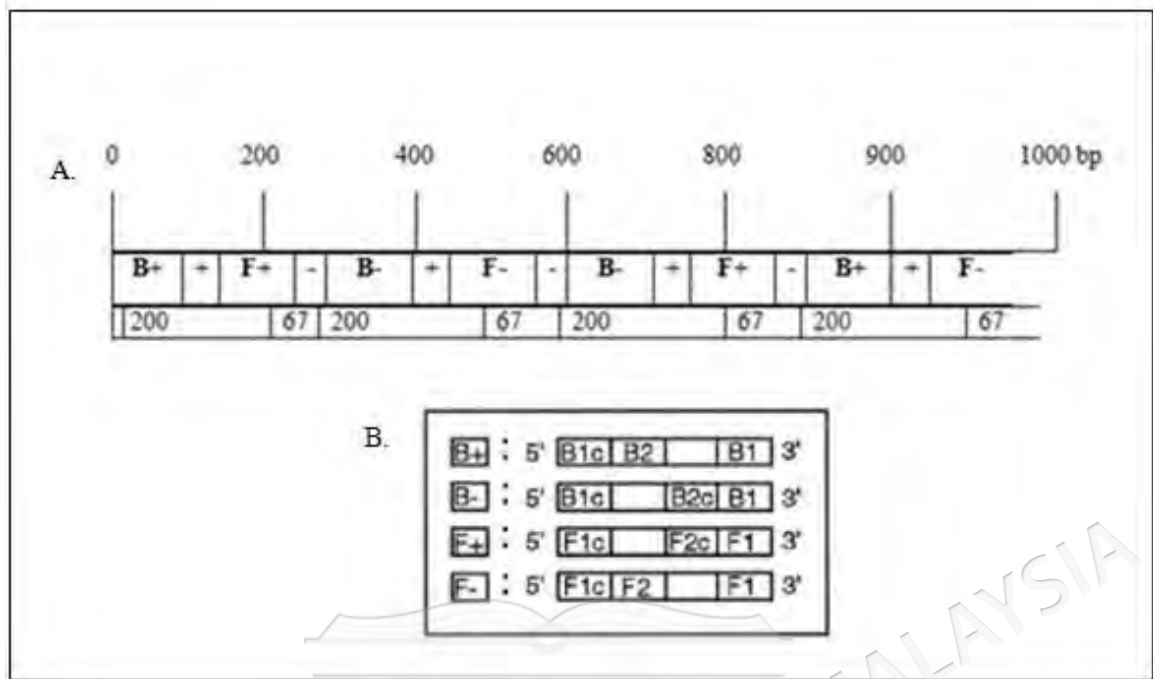
Proses pencernaan produk yang telah diampifikasi dilakukan menggunakan enzim penyekatan *MaeII* (Thermo Scientific, Amerika Syarikat) untuk pengesahan lanjut amplifikasi positif. Hasil DNA difraksi dan dianalisa menggunakan gel elektroforesis. Ramalan saiz DNA yang dipotong oleh enzim pencernaan dilakukan seperti diterangkan oleh Notomi et al. (2000). B+, B-, F+ dan F- merupakan struktur DNA yang ditunjukkan seperti di sebelah kiri Rajah 3.6. Simbol '+' merupakan jujukan sasaran yang terdiri daripada B1 dan F1c manakala symbol '-' adalah jujukan pelengkap.

Pengoptimuman pencernaan produk LAMP *E. bieneusi* telah dilakukan untuk menentukan jangka masa yang optimum bagi enzim *MaeII* untuk mencerna produk LAMP tersebut. Sampel kawalan positif *E. bieneusi* disubjek untuk amplifikasi LAMP sebelum prosedur pencernaan enzim diteruskan. Protokol pencernaan produk LAMP dilakukan mengikut arahan pengilang, Thermo Scientific, Amerika Syarikat. Prosedur dimulakan dengan menambah sebanyak 10 µl produk LAMP, 18 µl air suling, 2 µl penimbal 10X R dan 2 µl enzim *MaeII* ke dalam setiap lapan tiub pengempar mikro. Setiap tiub dilabel mengikut jangka masa pencernaan bermula 1 jam sehingga 8 jam. Tiub-tiub tersebut kemudiannya dicampur secara perlahan dan diempar untuk beberapa saat. Pengeraman dilakukan pada suhu 65°C dan dibiarkan selama 1 hingga 8 jam. Kesemua produk pencernaan dianalisa menggunakan kaedah elektroforesis gel. Berdasarkan analisa gel, pengeraman selama 8 jam merupakan jangka masa optimum bagi pencernaan produk LAMP *E. bieneusi*. Prosedur pencernaan enzim *MaeII* diulangi sekali lagi selama 8 jam untuk memotong fragmen DNA pada saiz ~200 bp dan ~67 bp.

1	TTCAGATGGT CATAGGATG AAGAGCTTCG GCTCTGAATA TCTATGGCTA GATAAAGTAC
61	AAGTCGTAAC AAGGTTTCAG TTGGAGAACC AGCTGAAGGA TCATTTTCAG TTTTTGGGGT F3
121	GTGGGTATCG <u>GAATGTATGG TAGGTGATGT</u> GTGTGTGTAT GGGGGATGCC GAGGGGACCA F2
181	GCAGTGCGGT GGTGTGTGTA <u>GCGTGAGAG TGTATCTGCA</u> AGGGTGAGGG ATGTGGGTGC F1c MaeII B1c
241	<u>AGTGAGTTAG AGGTGGTTCC</u> ATGTGGAATA GTGGGATTGG <u>TACGTGATGG</u> <u>TTGGATGGGG</u> B2
301	GAATGATGTG TGTATGGGTG <u>AGGAAAATCG GAGGTTGCGG</u> TCGAGCGGC AGTAGGGTGC B3
361	CATCAAGAGG TGTATTTGGA AATATCCCTA <u>ATACAGGATC ACTTGGATCC</u> <u>GTCGGCGATG</u>
421	ACGAGCGCGA AAGAATGCGA AAAGTCCTCA CGGAATGCTC TAATTATGAG ATAATCTCAT
481	GGAT

Rajah 3.6

Jujukan nukleotida AF101198 digunakan untuk merekabentuk primer-primer dalaman dan luaran. Jujukan DNA yang digunakan bagi primer adalah seperti yang digariskan manakala jujukan sekatan enzim *MaeII* adalah seperti yang ditebalkan



Rajah 3.7

(A) Ilustrasi skematik berbentuk linear struktur produk akhir DNA yang difraksi diwakili +, -, F+, F-, B+ dan B-. Enzim *MaeII* diramalkan memotong produk LAMP pada saiz 200 bp dan 67 bp. (B) Rujukan susunan jujukan daripada Notomi et al. (2000)

3.10 SENSITIVITI DAN SPESIFISITI

Sensitiviti dan spesifisiti dilakukan dan dinilai untuk menentukan karakter operasi asai LAMP. Sensitiviti dan spesifisiti terbahagi kepada dua iaitu secara analitikal dan klinikal.

3.10.1 Sensitiviti dan Spesifisiti Analitikal

Sensitiviti analitikal bertujuan untuk menentukan kebolehan sesuatu asai untuk mengesan organisma sasaran dalam sampel biologi pada kepekatan rendah. Spesifisiti analitikal dilakukan untuk menguji keupayaan mengenal pasti organisma sasaran yang berbeza di dalam sampel (Saah & Hoover 1997).

DNA genomik *Acanthamoeba* spp., *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba* complex cacing kait, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* dan *Giardia intestinalis*

digunakan untuk menentukan spesifisiti asai LAMP. Kesemua DNA genomik diekstrak daripada sampel tinja yang diperoleh daripada Jabatan Parasitologi & Entomologi Perubatan, UKM kecuali DNA *Acanthamoeba* spp. (sampel persekitaran tanah) dan *Toxoplasma gondii* (DNA sintetik ATCC 50147D). Sampel kawalan positif ketiga-tiga spesies *Encephalitozoon* spp. juga turut digunakan untuk ujian spesifisiti.

Untuk menentukan sensitiviti analitikal bagi asai LAMP, sampel tinja positif telah dipekatkan menggunakan protokol sedimentasi air-eter terubah suai seperti yang diterangkan oleh Müller et al. (1999). Sebanyak 1.0 g sampel tinja dihomogen di dalam 8 ml air suling dan ditapis melalui 300 µm jejaring ayak. Sebanyak 3 µl eter ditambah sebelum campuran air-eter divorteks selama 1 minit dan diempar pada kelajuan 13 000 rpm selama 2 minit. Supernatan dibuang manakala pelet sampel dicairkan di dalam 200 µl air suling dan dcairkan dengan gandaan 10 secara bersiri.

Sebanyak 20 µl untuk setiap siri pencairan digunakan bagi pewarnaan GCK, diikuti dengan pengiraan kuantitatif spora (Goodgame et al. 1999). Sebanyak 10 medan dipilih secara rawak untuk mengira spora pada magnifikasi 100 X. Langkah ini diulang sebanyak tiga kali untuk 10 medan yang lain bagi setiap pengiraan. Purata bagi tiga kiraan ditukarkan kepada spora/ 20 µl. Pencairan sampel tinja yang telah dihomogen memberi jumlah kepekatan spora pada 10, 7, 5 dan 0 spora/20 µl. DNA genomik kemudian diekstrak daripada larutan 200 µl (rujuk 3.4). Asai PCR dan LAMP dilakukan untuk menentukan dan membandingkan sensitiviti pengesanan DNA mikrosporidia bagi kedua-dua kaedah tersebut (rujuk 3.6.1 dan 3.8.3).

3.10.2 Sensitiviti dan Spesifisiti Klinikal

Sensitiviti klinikal merujuk kepada keupayaan sesuatu ujian untuk mengenal pasti dengan betul pesakit yang mempunyai penyakit yang dikaji. Spesifisiti klinikal pula merujuk kepada keupayaan ujian tersebut mengenal pasti dengan betul pesakit yang tidak mempunyai penyakit yang dikaji (Lalkhen & McCluskey 2008). Nilai ramalan positif (PPV) dan nilai ramalan negatif (NPV) digunakan untuk mempertimbangkan nilai ujian dan bergantung kepada prevalens penyakit dalam populasi yang dikaji (Lalkhen & McCluskey 2008).

Sensitiviti, spesifisiti, PPV dan NPV telah dinilai seperti yang diterangkan oleh Nagdev et al. (2011) menggunakan PCR sebagai ujian rujukan. Pengiraan sensitiviti dilakukan seperti berikut:

$$\frac{\text{Bilangan positif benar}}{\text{Bilangan positif benar} + \text{Bilangan negatif palsu}}$$

Formula pengiraan bagi spesifisiti pula adalah seperti berikut:

$$\frac{\text{Bilangan negatif benar}}{\text{Bilangan positif benar} + \text{Bilangan negatif palsu}}$$

Manakala formula pengiraan nilai ramalan positif (PPV) adalah:

$$\frac{\text{Bilangan positif benar}}{\text{Bilangan positif benar} + \text{Bilangan positif palsu}}$$

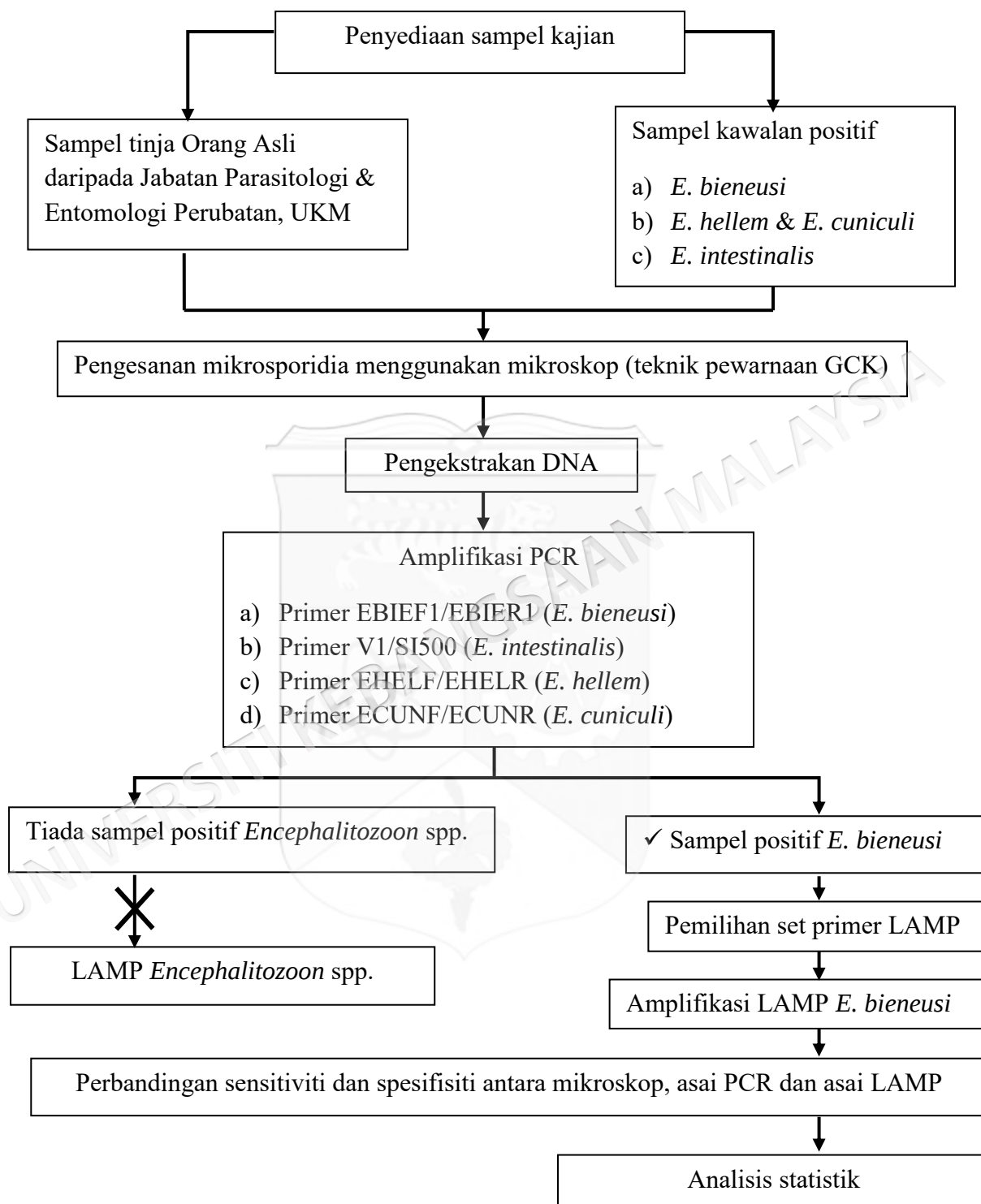
Untuk formula nilai ramalan negatif (NPV) pula adalah seperti berikut:

$$\frac{\text{Bilangan negatif benar}}{\text{Bilangan negatif benar} + \text{Bilangan negatif palsu}}$$

3.11 ANALISIS STATISTIK

Persetujuan diagnostik antara teknik mikroskop cahaya, asai PCR dan asai LAMP telah dinilai menggunakan statistik Kappa. Hasil keputusan dinyatakan sebagai nilai κ . Manakala, ujian khi-kuasa dua digunakan untuk menentukan perbezaan signifikan antara kaedah-kaedah tersebut.

3.12 CARTA ALIR METODOLOGI KAJIAN

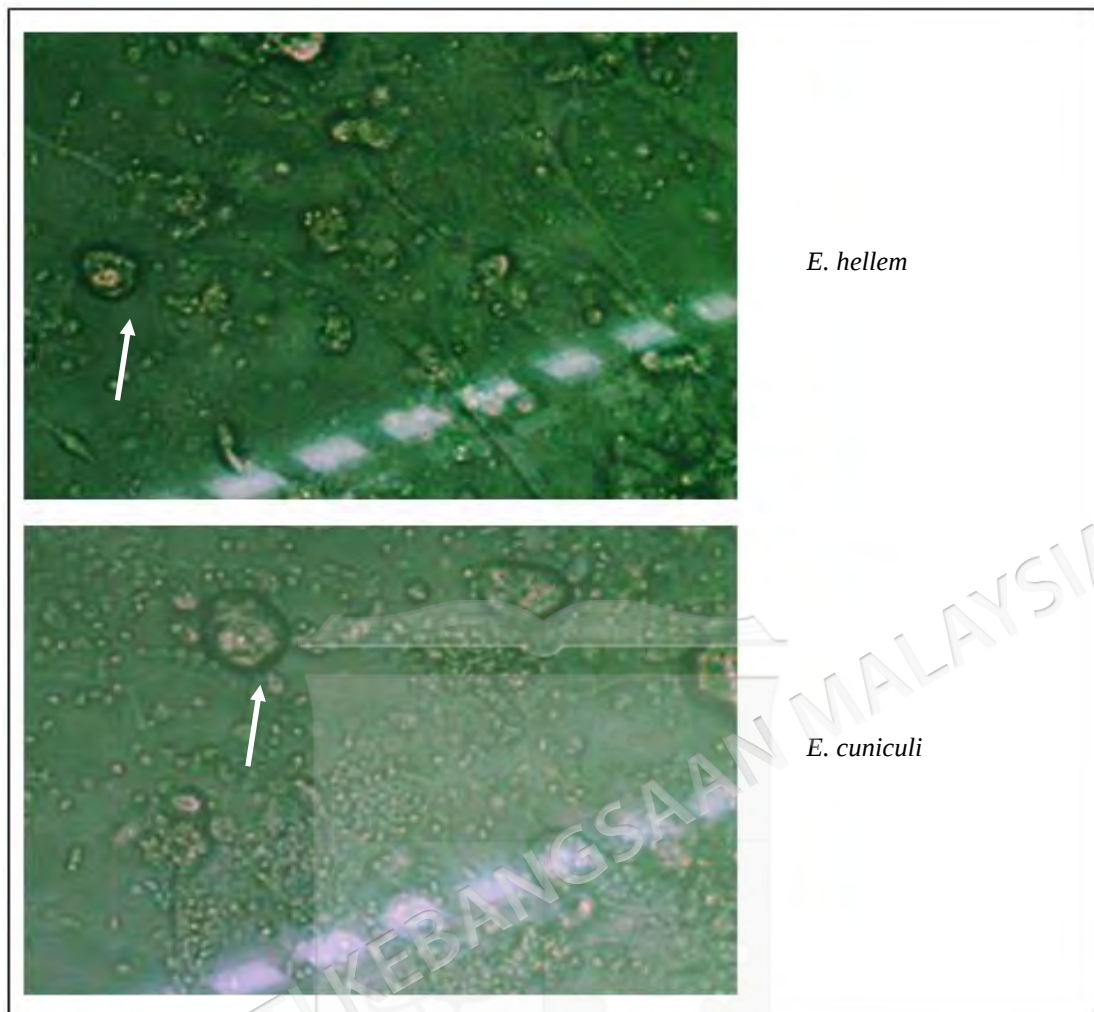


BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1 HASIL PENYEDIAAN KULTUR *Encephalitozoon*

Selepas tiga minggu penyediaan, bilangan spora *E. cuniculi* dan *E. hellem* didapati bertambah di dalam supernatan kultur. Kebanyakan sel Vero juga dilihat bertambah besar dan dipenuhi dengan spora matang atau masih pada peringkat pembesaran (Rajah 4.1). Kultur sel tersebut kemudian dituai untuk mendapatkan spora dan disimpan pada suhu 4°C sebelum proses pengekstrakan DNA. Hasil pengekstrakan DNA daripada kedua-dua kultur *E. cuniculi* dan *E. hellem* ini digunakan sebagai kawalan positif dalam amplifikasi PCR untuk saringan mikrosporidiosis dalam sampel tinja subjek kajian.



Rajah 4.1

Pemantauan kultur *Encephalitozoon* spp. menggunakan sel Vero di bawah mikroskop. Merujuk anak panah di dalam rajah, beberapa sel Vero menjadi lebih besar dan dipenuhi dengan spora spesies mikrosporidia sama ada matang atau masih di peringkat pertumbuhan selepas tiga minggu inokulasi awal. Dinding sel Vero akan pecah lalu mengeluarkan spora *Encephalitozoon* yang kemudiannya akan menginfeksi sel Vero lain

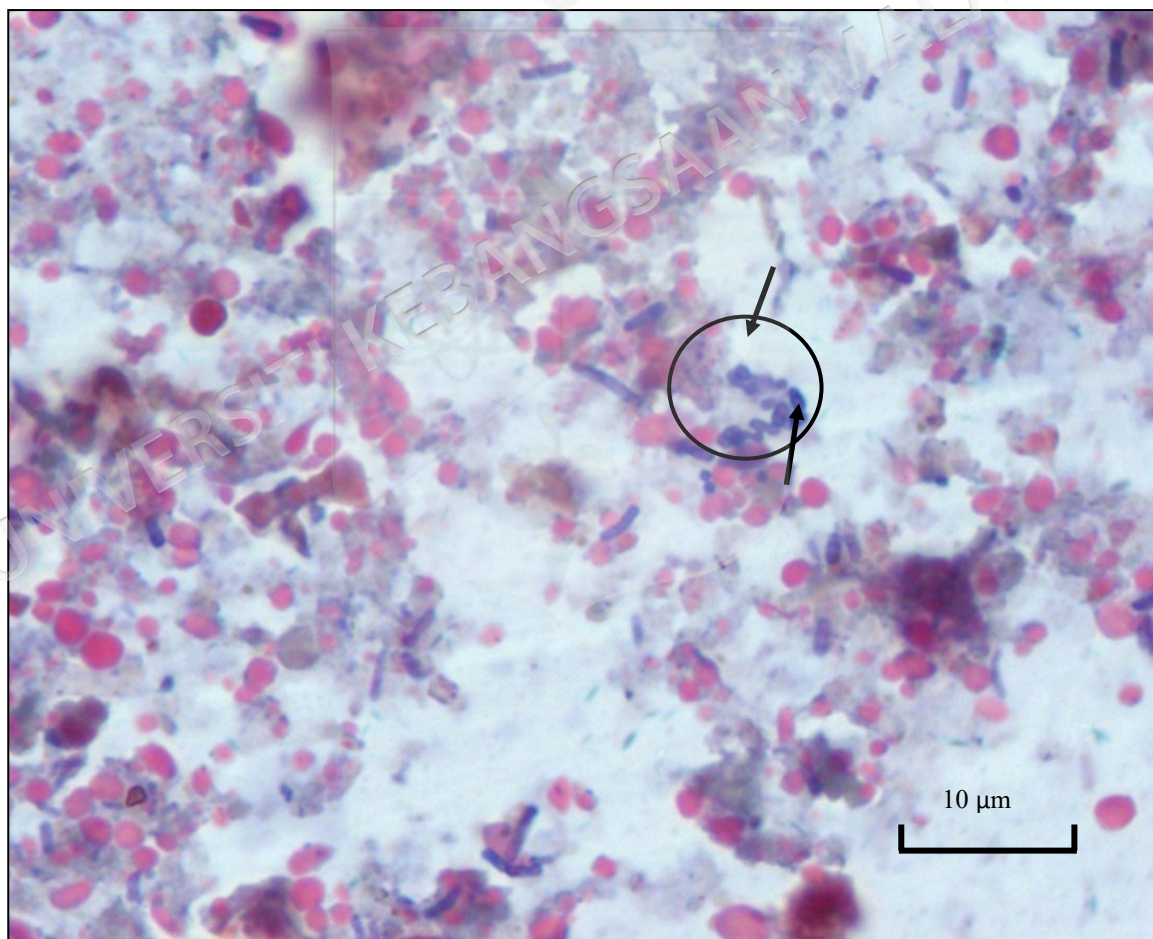
4.2 KEPUTUSAN PEMERIKSAAN MIKROSKOP CAHAYA

Dengan menggunakan pewarnaan GCK, spora mikrosporidia dilihat ovoid dan refraktil di bawah mikroskop cahaya. Dinding spora juga didapati bewarna ungu kebiruan. Spora mikrosporidia dapat diperhatikan mempunyai jalur seperti tali pinggang bewarna kebiruan berada di tengah-tengah spora (Rajah 4.2). Daripada 100 slaid sampel tinja Orang Asli, 32 adalah positif mikrosporidia dengan purata gred 1+

(Jadual 4.1). Sejumlah 27 slaid sampel yang positif dikesan mempunyai 5 spora, 4 slaid sampel mempunyai 6 bilangan spora manakala hanya satu slaid sahaja dikesan sebanyak 7 spora.

Jadual 4.1 Keputusan pemeriksaan 100 spesimen tinja Orang Asli dan bilangan spora mikrosporidia menggunakan teknik mikroskop

Keputusan pemeriksaan slaid spesimen	Bilangan sampel
Positif	32
Negatif	68



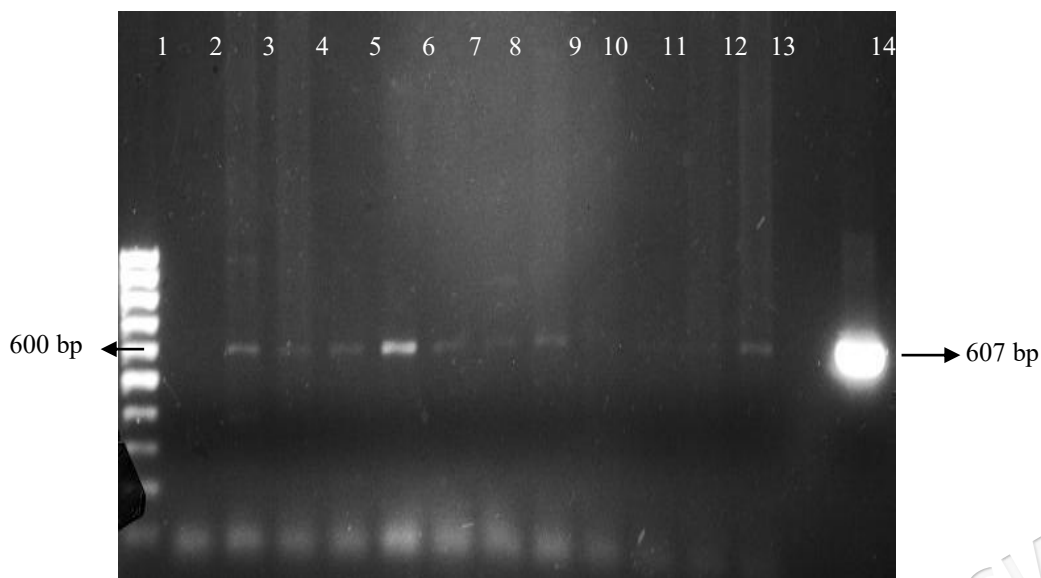
Rajah 4.2 Spora mikrosporidia di dalam sampel tinja yang telah diwarnakan menggunakan pewarnaan GCK di bawah mikroskop cahaya (magnifikasi x100). Jalur yang kelihatan seperti tali pinggang dapat dilihat di dalam kantung spora mikrosporidia

4.3 KEPUTUSAN AMPLIFIKASI PCR

Teknik PCR telah dijalankan untuk mengesan spesies spesifik mikrosporidia di dalam sampel tinja manusia. Bagi amplifikasi spesies *E. bieneusi*, kaedah yang digunakan adalah daripada da Silva et al. (1996) manakala amplifikasi untuk spesies *E. hellem* adalah daripada kaedah oleh Visvesvara et al. (1994). Untuk amplifikasi spesies *E. intestinalis*, kondisi kitaran PCR yang dilakukan adalah seperti dinyatakan oleh Chabchoub et al. (2009) manakala untuk spesies *E. cuniculi* dijalankan mengikut kaedah yang telah diterbitkan oleh Wang et al. (2005).

4.3.1 Amplifikasi PCR *E. bieneusi*

Amplifikasi PCR untuk *E. bieneusi* telah dijalankan tanpa sebarang modifikasi daripada kaedah da Silva et al. (1996). Menerusi analisis gel elektroforesis, sampel kawalan positif dan sampel positif *E. bieneusi* menghasilkan jalur yang spesifik pada saiz anggaran 607 bp (Rajah 4.3). Daripada 100 sampel tinja yang diamplifikasi, 33 (33%) daripadanya adalah positif *E. bieneusi* (Jadual 4.2). Namun begitu, hanya 16 daripada 33 sampel didapati positif mikrosporidia melalui pemeriksaan mikroskopi (rujuk Jadual 4.5).

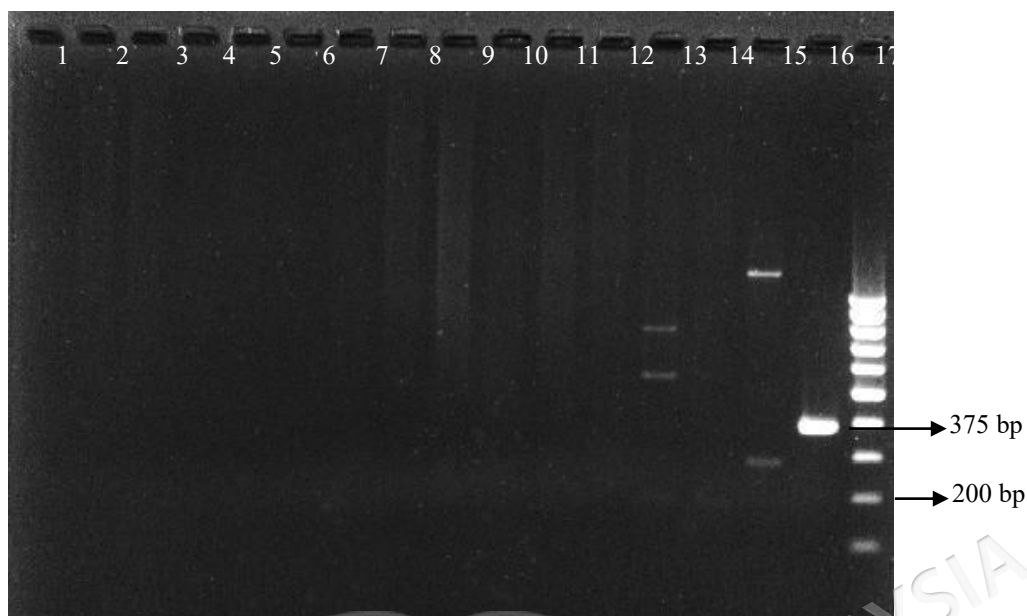


Rajah 4.3 Elektroforesis produk amplifikasi PCR DNA *E. bieneusi*. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3 – 13: Sampel DNA. Lajur 14: Kawalan positif *E. bieneusi*. Sampel DNA pada lajur 3-9, 12, dan 13 menunjukkan positif *E. bieneusi*

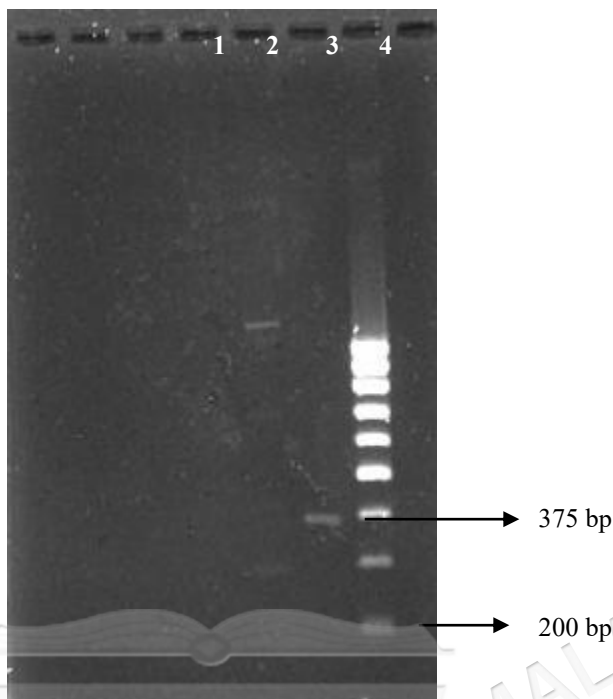
4.3.2 Amplifikasi PCR *Encephalitozoon* spp.

Amplifikasi PCR dijalankan untuk mengesan tiga spesies dari genus *Encephalitozoon* iaitu *E. hellem*, *E. cuniculi* dan *E. intestinalis*, mengikut kaedah yang telah diterbitkan. Namun begitu, hanya amplifikasi untuk spesies *E. intestinalis* sahaja yang memerlukan modifikasi.

Berdasarkan analisis gel elektroforesis untuk amplifikasi PCR *E. intestinalis*, dua sampel DNA (#43 dan #45) menghasilkan saiz jalur yang berbeza dan tidak spesifik apabila menggunakan kondisi kitaran seperti dinyatakan oleh Chabchoub et al. (2009) (RAJAH 4.4). Oleh itu, suhu penyepulihlindapan telah dioptimasi daripada 55°C kepada 57°C menggunakan kedua-dua sampel DNA tersebut. Berdasarkan Rajah 4.5, produk amplifikasi didapati masih menghasilkan dua saiz jalur dan bukan pada saiz yang dikehendaki. Sampel-sampel DNA kemudian dikategorikan sebagai negatif *E. intestinalis*.



Rajah 4.4 Elektroforesis produk amplifikasi PCR dari DNA *E. intestinalis*. Lajur 1: Kawalan negatif (air suling). Lajur 2 - 15: Sampel DNA. Lajur 16: Kawalan positif *E. intestinalis*. Lajur 17: Penanda DNA 100 bp. Sampel DNA #43 pada lajur 13 dan sampel DNA #45 pada lajur 15 menunjukkan dua jalur yang tidak spesifik dan tidak berada pada saiz yang sepatutnya



Rajah 4.5 Elektroforesis optimasi suhu penyepuhlindapan PCR *E. intestinalis* pada 57°C menggunakan sampel DNA #43, #45 dan kawalan positif. Lajur 1: Sampel DNA #43. Lajur 2: Sampel DNA #45. Lajur 3: Kawalan positif *E. intestinalis*. Lajur 4: Penanda DNA 100 bp. Sampel DNA #45 dilihat mempunyai dua saiz jalur yang berlainan daripada saiz yang sebenar (375 bp)

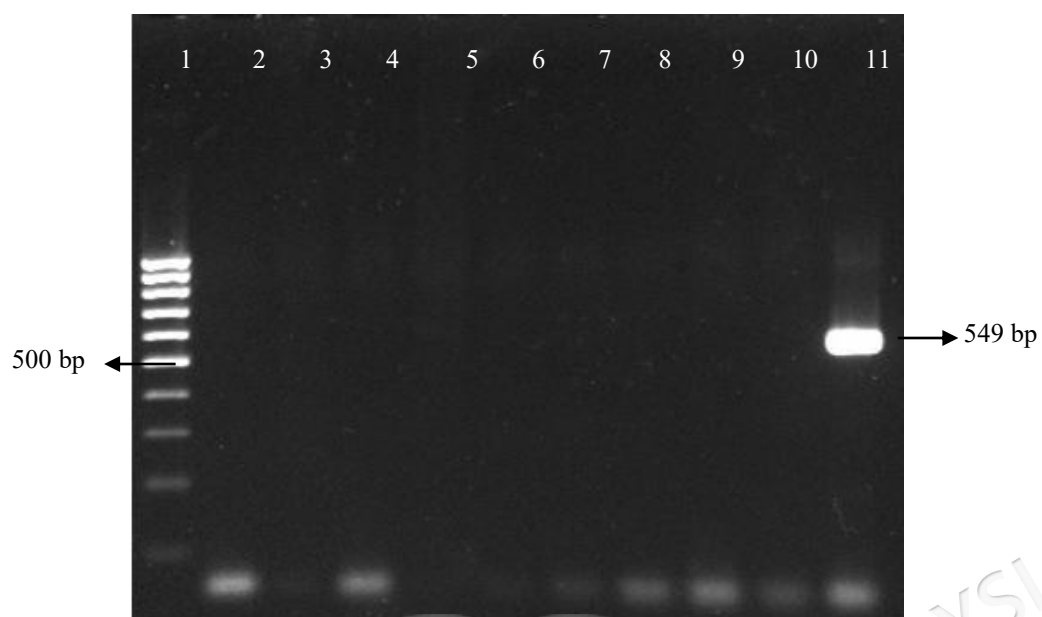
Seterusnya, kesemua 100 spesimen DNA diuji menerusi teknik PCR untuk mengesan kehadiran setiap spesies *Encephalitozoon* spp. Bagaimanapun, tiada amplifikasi positif PCR untuk spesies *E. intestinalis*, *E. hellem* dan *E. cuniculi* yang direkodkan (Jadual 4.2). Rajah 4.6, Rajah 4.7 dan Rajah 4.8 menunjukkan analisa elektroforesis gel bagi setiap amplifikasi untuk spesies *E. intestinalis*, *E. hellem* dan *E. cuniculi*. Lantaran itu, asai LAMP untuk *Encephalitozoon* spp. tidak dilakukan kerana ketiadaan sampel positif untuk menentukan sensitiviti dan spesifisiti antara asai LAMP dan PCR bagi pengesanan *Encephalitozoon* spp.



Rajah 4.6 Elektroforesis produk PCR untuk pengesanan *E. intestinalis*. Sampel kawalan positif *E. intestinalis* berada pada saiz yang dikehendaki iaitu beranggaran 375 bp. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3 – 16: Sampel DNA. Lajur 17: Kawalan positif *E. intestinalis*



Rajah 4.7 Elektroforesis gel produk PCR untuk pengesanan *E. hellem*. Produk amplifikasi disubjek positif jika berada pada saiz beranggaran 547 bp. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3 – 16: Sampel DNA. Lajur 17: Kawalan positif *E. hellem*



Rajah 4.8 Elektroforesis produk PCR untuk pengesanan *E. cuniculi*. Produk amplifikasi disubjek positif *E. cuniculi* jika berada pada saiz 549 bp. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3 – 10: Sampel DNA. Lajur 11: Kawalan positif *E. cuniculi*

Jadual 4.2 Keputusan amplifikasi PCR untuk spesies *E. bieneusi* dan *Encephalitozoon* spp. bagi 100 spesimen tinja Orang Asli

Kaedah dan keputusan	Positif	Negatif
PCR <i>E. bieneusi</i>	33	67
PCR <i>E. intestinalis</i>	0	100
PCR <i>E. cuniculi</i>	0	100
PCR <i>E. hellem</i>	0	100

4.3.3 Keputusan Penjujukan Produk PCR

Beberapa sampel positif-PCR telah dihantar kepada MyTACG Bioscience Enterprise untuk pengesahan lanjut melalui analisa jujukan. Produk amplifikasi sampel DNA #78, #79 dan #81 digunakan untuk proses penjujukan. Ketiga-tiga sampel tersebut adalah positif-PCR namun negatif melalui asai LAMP. Jadual 4.3 menunjukkan keputusan analisa jujukan setelah dibandingkan dengan jujukan dalam pangkalan data GenBank menggunakan program Nucleotide BLAST.

Jadual 4.3 Keputusan analisa jujukan produk positif-PCR yang telah dihantar untuk pengesahan lanjut

No. sampel	Butiran			Peratusan identik (%)	No. induk
78	SSU rRNA	asingan	<i>E. bieneusi</i>	99	KF271513.1
	PDEn-28				
79	SSU rRNA	asingan	<i>E. bieneusi</i>	97	KF271510.1
	PDEn-25				
81	SSU rRNA	asingan	<i>E. bieneusi</i>	99	KF271501.1
	PDEn-16				

4.4 KEPUTUSAN AMPLIFIKASI LAMP *E. bieneusi*

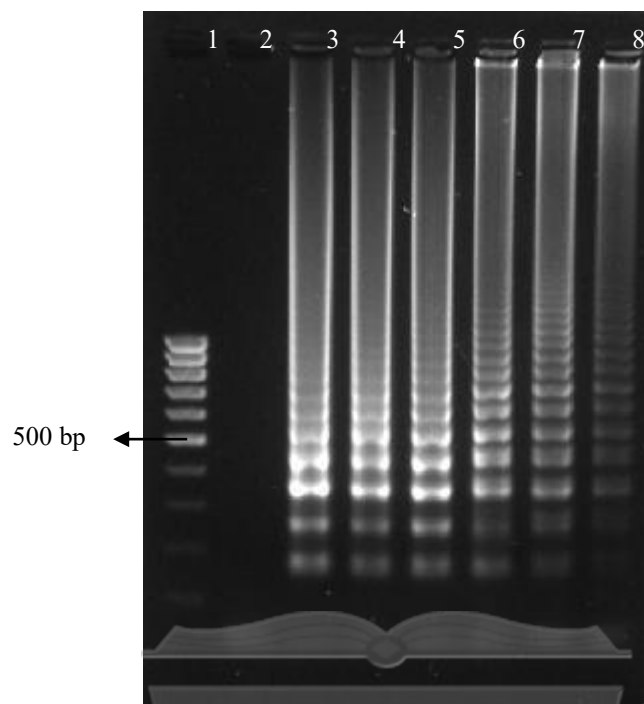
Sebelum kesemua 100 sampel DNA diamplifikasi menggunakan teknik LAMP, dua set primer LAMP (set primer I dan set primer II) yang telah direkabentuk dioptimasi terlebih dahulu. Pengoptimuman dijalankan untuk menentukan set primer LAMP yang lebih sensitif dan spesifik bagi pembangunan amplifikasi LAMP *E. bieneusi*. Seterusnya, 100 sampel DNA diuji menggunakan set primer yang terbaik untuk mengesan kehadiran DNA *E. bieneusi*.

4.4.1 Pemilihan Set Primer LAMP

Set primer I dan set primer II telah diuji keberkesanannya dalam mengamplifikasi kawalan positif *E. bieneusi* daripada suhu 60°C sehingga 65°C menggunakan blok haba selama satu jam. Berdasarkan Rajah 4.9, set primer I berjaya mengamplifikasi

sampel kawalan positif bagi setiap parameter suhu yang diuji. Namun begitu, jalur berganda untuk amplifikasi pada suhu 60°C lebih terang dan jelas berbanding parameter suhu yang lain. Hal ini menunjukkan, suhu 60°C lebih optimum untuk amplifikasi LAMP *E. bienersi* bagi set primer I. Bagi set primer II, analisis elektroforesis gel menunjukkan set primer ini tidak berjaya mengamplifikasi sampel kawalan positif bagi setiap parameter suhu yang diuji (Rajah 4.10). Jalur berganda produk amplifikasi hanya kelihatan pada suhu 60°C dan 65°C.

Spesifisiti untuk kedua-dua set primer I dan II juga telah diuji menggunakan tiga sampel kawalan positif *Encephalitozoon* spp. (*E. hellem*, *E. cuniculi* dan *E. intestinalis*). Rajah 4.11 dan 4.12 menunjukkan kedua-dua set primer adalah spesifik. Namun, berdasarkan optimasi dan perbandingan antara parameter suhu dan spesifisiti, set primer I dipilih kerana dilihat mempunyai kualiti serta kriteria yang terbaik berbanding set primer II untuk mengesan *E. bienersi* di dalam 100 sampel tinja manusia.



Rajah 4.9

Elektroforesis gel produk LAMP menggunakan set primer I. Penggunaan set primer I berjaya mengamplifikasi sampel pada setiap suhu bermula dari 60°C sehingga 65°C. Berdasarkan elektroforesis gel ini juga, suhu optimum dan sesuai untuk amplifikasi LAMP *E. bieneusi* bagi set primer I ialah 60°C

Lajur 1: Penanda DNA 100 bp

Lajur 2: Kawalan negatif (air suling)

Lajur 3: Kawalan positif *E. bieneusi* (60°C)

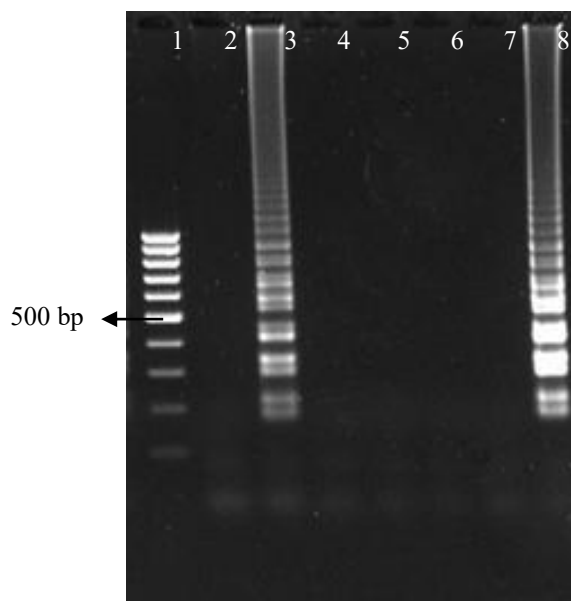
Lajur 4: Kawalan positif *E. bieneusi* (61°C)

Lajur 5: Kawalan positif *E. bieneusi* (62°C)

Lajur 6: Kawalan positif *E. bieneusi* (63°C)

Lajur 7: Kawalan positif *E. bieneusi* (64°C)

Lajur 8: Kawalan positif *E. bieneusi* (65°C)



Rajah 4.10

Elektroforesis gel produk LAMP menggunakan set primer II. Penggunaan set primer II hanya berjaya mengamplifikasi sampel pada suhu 60°C dan 65°C. Berdasarkan elektroforesis gel ini juga, suhu optimum dan sesuai untuk amplifikasi LAMP *E. bieneusi* bagi set primer II ialah 65°C

Lajur 1: Penanda DNA 100 bp

Lajur 2: Kawalan negatif (air suling)

Lajur 3: Kawalan positif *E. bieneusi* (60°C)

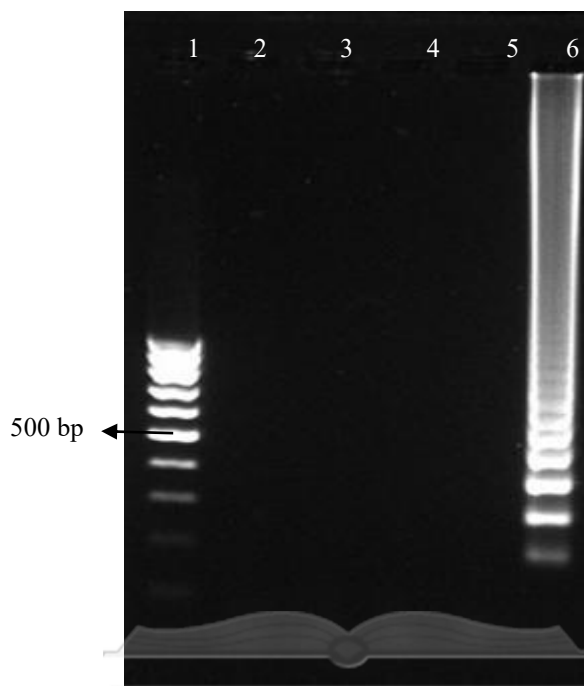
Lajur 4: Kawalan positif *E. bieneusi* (61°C)

Lajur 5: Kawalan positif *E. bieneusi* (62°C)

Lajur 6: Kawalan positif *E. bieneusi* (63°C)

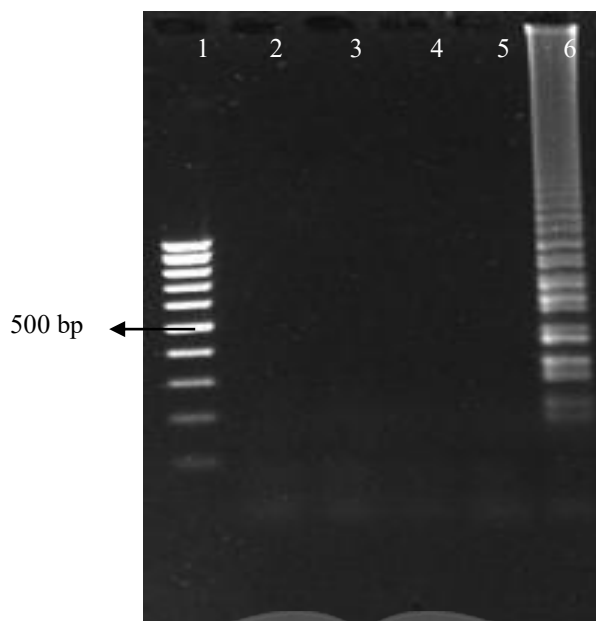
Lajur 7: Kawalan positif *E. bieneusi* (64°C)

Lajur 8: Kawalan positif *E. bieneusi* (65°C)



Rajah 4.11

Amplifikasi LAMP *E. bieneusi* menggunakan kawalan positif *E. hellem*, *E. cuniculi* dan *E. intestinalis* dilakukan untuk menguji spesifisiti dan kualiti set primer I. Elektroforesis gel menunjukkan amplifikasi negatif bagi ketiga-tiga kawalan positif *Encephalitizoon* spp. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3: Kawalan positif *E. intestinalis*. Lajur 4: Kawalan positif *E. hellem*. Lajur 5: Kawalan positif *E. cuniculi*. Lajur 6: Kawalan positif *E. bieneusi*

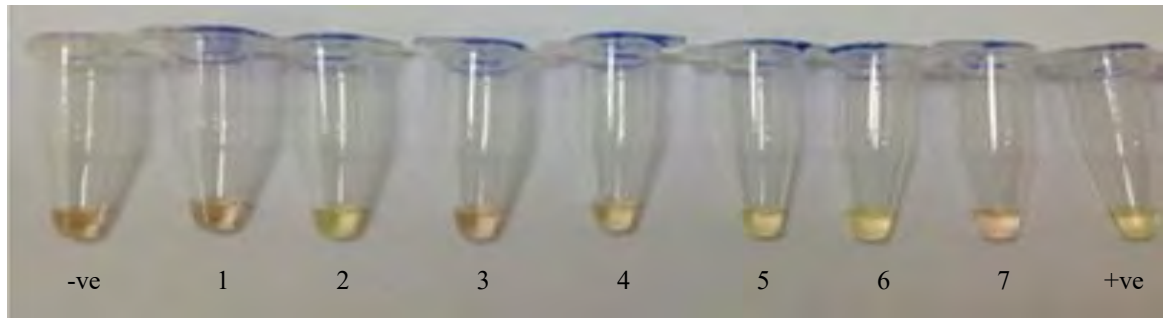


Rajah 4.12 Amplifikasi LAMP *E. bieneusi* menggunakan kawalan positif *E. hellem*, *E. cuniculi* dan *E. intestinalis* dilakukan untuk menguji spesifisiti dan kualiti set primer II. Elektroforesis gel menunjukkan negatif amplifikasi bagi ketiga-tiga kawalan positif *Encephalitizoon* spp. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3: Kawalan positif *E. intestinalis*. Lajur 4: Kawalan positif *E. hellem*. Lajur 5: Kawalan positif *E. cuniculi*. Lajur 6: Kawalan positif *E. bieneusi*

4.4.2 Analisa Keputusan Amplifikasi LAMP

LAMP *E. bieneusi* menggunakan set primer I berjaya mengesan 39 sampel sebagai positif (39%) (Jadual 4.4). Keseluruhan produk reaksi LAMP diperhatikan menggunakan dua kaedah visualisasi iaitu cahaya normal dan UV sebelum diteruskan untuk analisis elektroforesis.

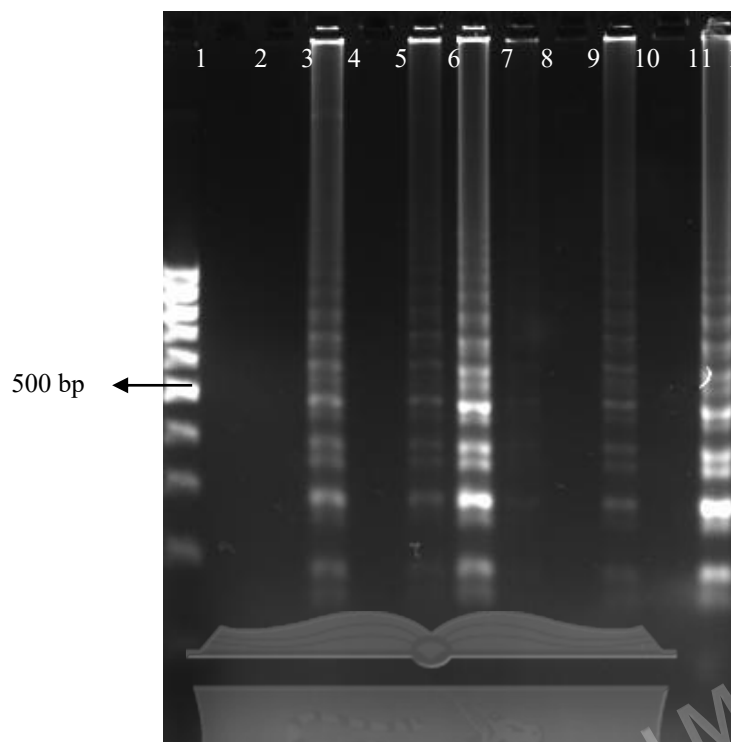
Di bawah cahaya normal, produk LAMP yang positif bertukar warna daripada oren kemerahan kepada hijau, manakala produk LAMP negatif kekal dengan warna yang asal (Rajah 4.13). Selain itu, produk LAMP yang berwarna kehijauan ini akan kelihatan seperti hijau fluoresens di bawah cahaya UV (Rajah 4.14). Elektroforesis gel juga dilakukan untuk menganalisa produk amplifikasi LAMP. Reaksi positif LAMP menunjukkan jalur berganda seperti corak tetangga (Rajah 4.15).



Rajah 4.13 Produk amplifikasi LAMP yang diperhatikan di bawah cahaya normal. Warna sampel 2,4,5,6 dan kawalan positif bertukar daripada oren kepada hijau terang menandakan reaksi positif



Rajah 4.14 Produk amplifikasi LAMP yang diperhatikan di bawah cahaya UV. Warna sampel 2,4,5,6 dan kawalan positif bertukar kepada hijau fluoresens menandakan reaksi positif



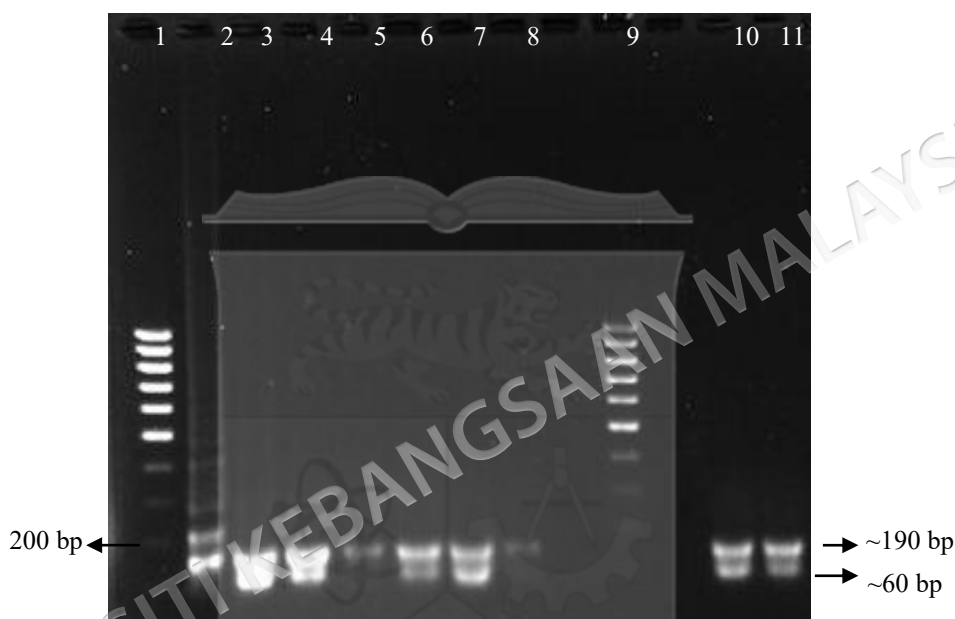
Rajah 4.15 Elektroforesis produk LAMP yang telah diampifikasi. Sampel DNA pada lajur 4, 6, 7, 8, dan 10 adalah positif *E. bieneusi* apabila jalur berganda yang dihasilkan sama seperti kawalan positif. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3 - 11: Sampel DNA. Lajur 12: Kawalan positif *E. bieneusi*

Jadual 4.4 Keputusan amplifikasi LAMP untuk spesies *E. bieneusi* bagi 100 spesimen tinja Orang Asli

Keputusan amplifikasi LAMP <i>E. bieneusi</i>	Bilangan sampel
Positif	39
Negatif	61

4.4.3 Pengoptimuman dan Pencernaan Enzim *MaeII*

Pencernaan enzim penyekatan *MaeII* produk LAMP turut dilakukan sebagai pengesahan lanjut untuk sampel positif amplifikasi. Namun, pengoptimuman masa inkubasi proses pencernaan enzim dilakukan untuk menentukan masa inkubasi yang optimum bagi enzim *MaeII* untuk memotong fragmen pada saiz beranggaran ~200 bp dan ~67 bp.



Rajah 4.16

Pencernaan produk amplifikasi LAMP *E. bieneusi* selama 8 jam menggunakan enzim penyekatan *MaeII* menunjukkan dua fragmen yang jelas pada saiz beranggaran ~190 bp dan ~60 bp

Lajur 1 dan 9: Penanda DNA 100 bp

Lajur 2: Produk amplifikasi dicerna selepas 1 jam

Lajur 3: Produk amplifikasi dicerna selepas 2 jam

Lajur 4: Produk amplifikasi dicerna selepas 3 jam

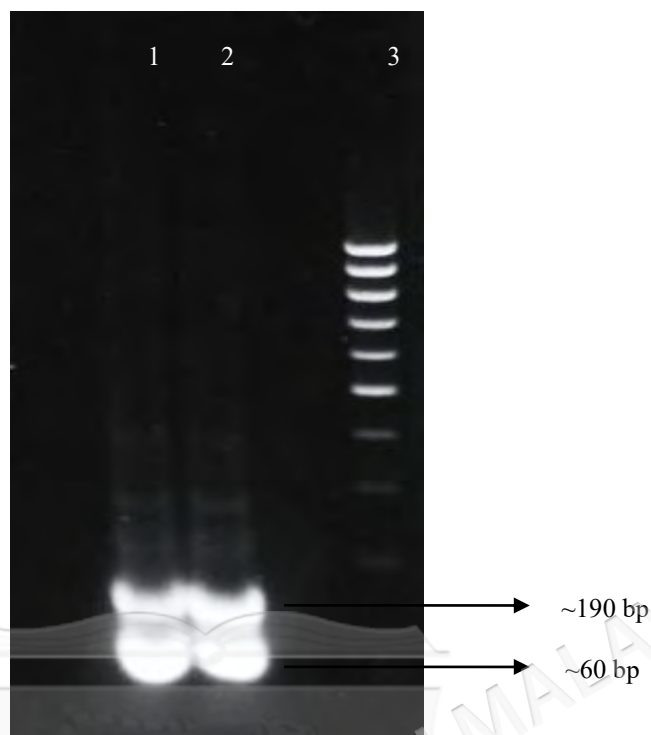
Lajur 5: Produk amplifikasi dicerna selepas 4 jam

Lajur 6: Produk amplifikasi dicerna selepas 5 jam

Lajur 7: Produk amplifikasi dicerna selepas 6 jam

Lajur 8: Produk amplifikasi dicerna selepas 7 jam

Lajur 10 dan 11: Produk amplifikasi dicerna selepas 8 jam

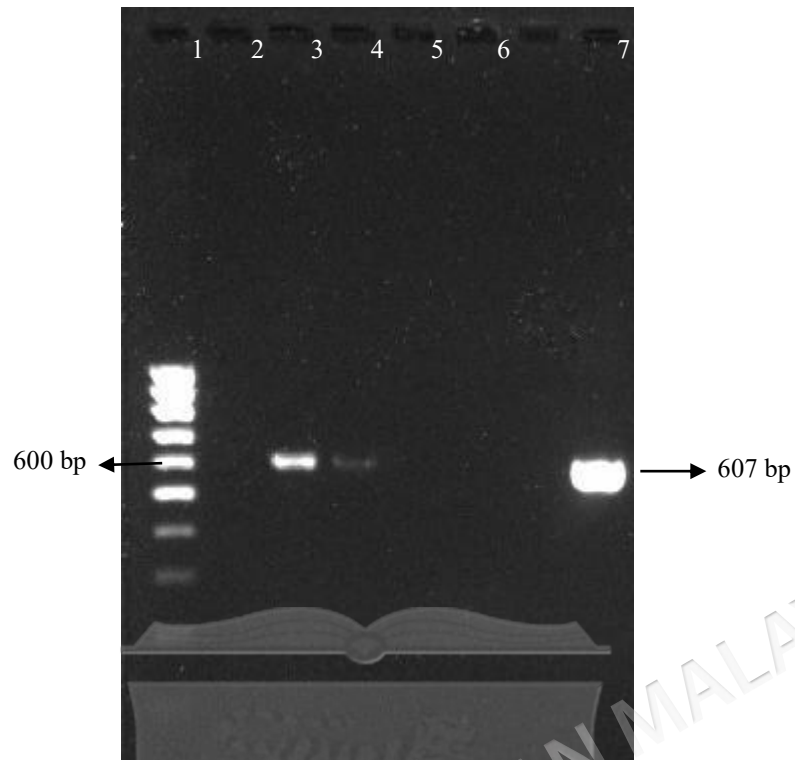


Rajah 4.17 Analisis pencernaan produk amplifikasi LAMP *E. bieneusi* daripada spesimen tinja. Pencernaan *MaeII* untuk produk *E. bieneusi* dijangka berada pada anggaran saiz ~190 bp dan ~60 bp. Lajur 1: Kawalan positif *E. bieneusi*. Lajur 2: Sampel positif LAMP *E. bieneusi*. Lajur 3: Penanda DNA 100 bp

4.5 ANALISA SPESIFISITI DAN SENSITIVITI

4.5.1 Spesifisiti dan Sensitiviti Analitikal

Untuk menilai sensitiviti kaedah PCR dan LAMP, sampel dengan kepekatan spora yang telah diketahui digunakan. Hasilnya, LAMP mampu mengesan *E. bieneusi* pada kepekatan serendah 7 spora/ 20 μ l manakala sensitiviti PCR juga bersamaan dengan 7 spora/ 20 μ l (Rajah 4.18 dan Rajah 4.19).



Rajah 4.18 Tahap pengesanan minimum DNA *E. bieneusi* diuji untuk asai PCR menggunakan kepekatan spora yang telah diketahui iaitu 10, 7, 5, 0 spora/ 20 µl. Asai PCR menunjukkan sensitiviti pada kepekatan serendah 7 spora/ 20 µl

Lajur 1: Penanda DNA 100 bp

Lajur 2: Kawalan negatif (air suling).

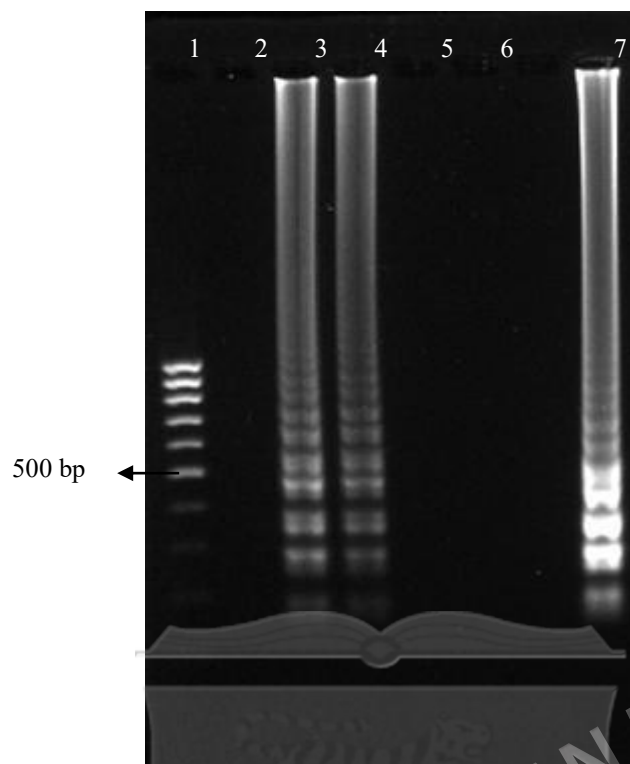
Lajur 3: Sampel DNA *E. bieneusi* dengan kepekatan 10 spora/ 20 µl

Lajur 4: Sampel DNA *E. bieneusi* dengan kepekatan 7 spora/ 20 µl

Lajur 5: Sampel DNA *E. bieneusi* dengan kepekatan 5 spora/ 20 µl

Lajur 6: Sampel DNA *E. bieneusi* dengan kepekatan 0 spora/ 20 µl

Lajur 7: Kawalan positif *E. bieneusi*



Rajah 4.19 Tahap pengesanan minimum DNA *E. bieneusi* diuji untuk asai LAMP menggunakan kepekatan spora yang telah diketahui iaitu 10, 7, 5, 0 spora/ 20 μ l. Asai LAMP juga menunjukkan sensitiviti pada kepekatan serendah 7 spora/ 20 μ l

Lajur 1: Penanda DNA 100 bp

Lajur 2: Kawalan negatif (air suling).

Lajur 3: Sampel DNA *E. bieneusi* dengan kepekatan 10 spora/ 20 μ l

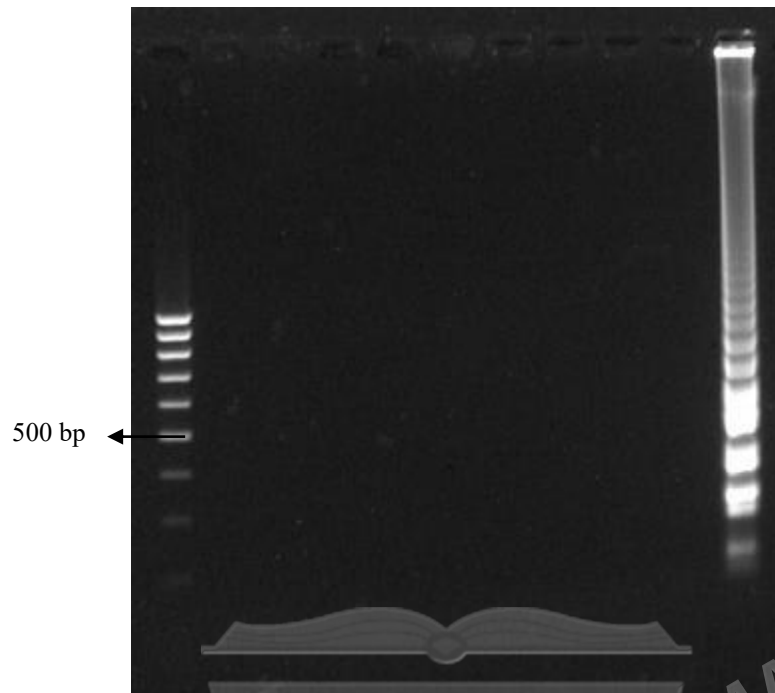
Lajur 4: Sampel DNA *E. bieneusi* dengan kepekatan 7 spora/ 20 μ l

Lajur 5: Sampel DNA *E. bieneusi* dengan kepekatan 5 spora/ 20 μ l

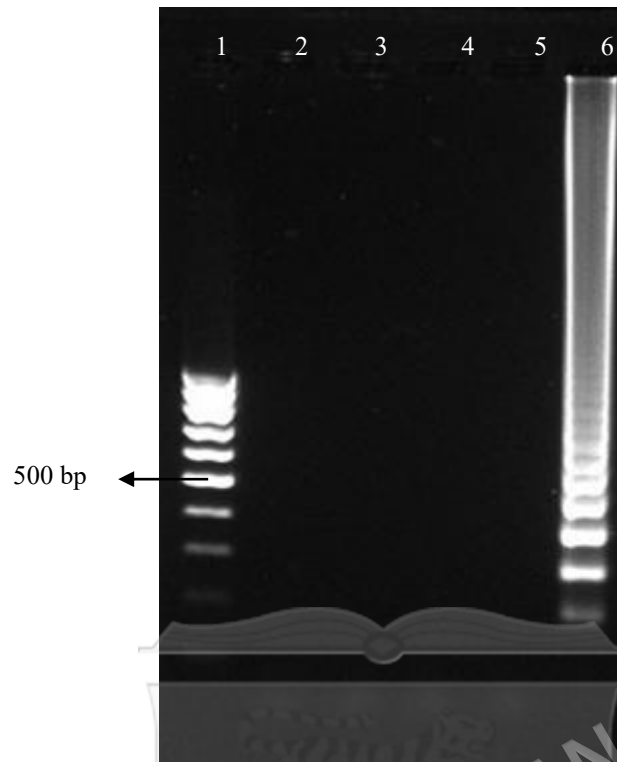
Lajur 6: Sampel DNA *E. bieneusi* dengan kepekatan 0 spora/ 20 μ l

Lajur 7: Kawalan positif *E. bieneusi*

Asai LAMP ini juga diuji dengan beberapa DNA genomik lain yang sedia ada di Jabatan Parasitologi & Entomologi Perubatan, PPUKM untuk menentukan spesifisiti LAMP. Namun, tiada amplifikasi positif yang direkodkan untuk sampel DNA daripada *Acanthamoeba* spp., *Toxoplasma gondii*, *E. hellem*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, cacing kait, *Entamoeba* complex dan *Giardia intestinalis* (Rajah 4.20 dan Rajah 4.21).



Rajah 4.20 Elektroforesis asai LAMP *E. bienersi* diuji ke atas spesies parasit bukan sasaran. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3: Sampel *A. lumbricoides*. Lajur 4: Sampel *T. trichiura*. Lajur 5: Sampel cacing kait. Lajur 6: Sampel *G. intestinalis*. Lajur 7: Sampel *T. gondii*. Lajur 8: Sampel *E. complex*. Lajur 9: Sampel *Acanthamoeba* spp. Lajur 10: Kawalan positif *E. bienersi*



Rajah 4.21 Elektroforesis asai LAMP *E. bienersi* yang diuji ke atas kawalan positif *Encephalitozoon* spp. Lajur 1: Penanda DNA 100 bp. Lajur 2: Kawalan negatif (air suling). Lajur 3: Sampel DNA *E. cuniculi*. Lajur 4: Sampel DNA *E. hellem*. Lajur 5: Sampel DNA *E. intestinalis*. Lajur 6: Kawalan positif *E. bienersi*

4.5.2 Spesifisiti dan Sensitiviti Klinikal

Perbandingan keputusan pengesanan infeksi mikrosporidia daripada 100 sampel tinja Orang Asli menggunakan tiga kaedah berbeza iaitu melalui pemeriksaan mikroskopi, teknik PCR dan teknik LAMP telah direkodkan pada Jadual 4.5. Spesifisiti dan sensitiviti LAMP dan mikroskop cahaya juga telah dinilai menggunakan PCR sebagai ujian rujukan (Jadual 4.5). Berbanding keputusan LAMP dan PCR, daripada 33 sampel positif *E. bienersi* melalui PCR, 31 sampel tersebut adalah positif melalui LAMP (sensitiviti 94%). Manakala, daripada 67 sampel PCR negatif, 8 sampel adalah positif LAMP (spesifisiti 88%). Dua sampel PCR-positif tetapi LAMP-negatif dihantar untuk penjujukan sebagai identifikasi lanjut. Berdasarkan keputusan jujukan, kedua-dua sampel tersebut berpadanan dengan jujukan *E. bienersi* yang terdapat di pangkalan data (99% identikel dengan nombor induk GenBank KF271513.1 dan

KF271501.1) (rujuk Jadual 4.3). Melalui mikroskop, hanya 16 daripada 33 sampel positif PCR *E. bieneusi* adalah positif spora mikrosporidia menjadikan sensitiviti penggunaan mikroskop cahaya 48%. Selain itu, 16 daripada 67 sampel PCR negatif dikesan positif melalui mikroskop (spesifisiti 76%).

Jadual 4.5 Hasil analisa sensitiviti dan spesifisiti diagnostik asai LAMP dan mikroskop untuk mengesan *E. bieneusi* daripada spesimen tinja Orang Asli menggunakan PCR sebagai ujian rujukan

Kaedah dan keputusan	PCR (positif) n = 33	PCR (negatif) n = 67	Sensitiviti (%)	Spesifisiti (%)	PPV (%)	NPV (%)
Mikroskop (positif)	16	16	48	76	50	75
Mikroskop (negatif)	17	51				
LAMP (positif)	31	8	94	88	79	97
LAMP (negatif)	2	59				

4.6 ANALISA STATISTIK

Ujian khi-kuasa dua dan statistik Kappa telah digunakan untuk menentukan persetujuan diagnostik antara PCR, LAMP dan mikroskop cahaya. Berdasarkan Jadual 4.6, ketiga-tiga kaedah ini menunjukkan tiada perbezaan signifikan (nilai $p > 0.05$). Bagaimanapun, teknik LAMP dan PCR menunjukkan kesepakatan yang sangat signifikan manakala teknik mikroskop cahaya dan PCR menunjukkan kesepakatan sederhana.

Jadual 4.6 Analisa statistik antara teknik LAMP dan mikroskop menggunakan PCR sebagai ujian rujukan

Kaedah dan keputusan	Analisis statistik ujian χ^2	Nilai Kappa (95% selang keyakinan)
Mikroskopi	$p = 0.530$	Mikroskopi dan PCR 0.25 κ (0.049, 0.447)
LAMP		LAMP dan PCR 0.78 κ (0.658, 0.910)

BAB V

PERBINCANGAN

Mikrosporidiosis telah muncul sebagai infeksi parasit oportunistik yang menjangkiti manusia, sama ada individu terimunokompromi atau imunokompeten di seluruh dunia. Kebanyakan kajian antarabangsa menunjukkan prevalens jangkitan mikrosporidia berlaku dalam kalangan pesakit terimunokompromi terutamanya pesakit positif HIV (Matos et al. 2012). Daripada 17 spesies mikrosporidia yang menjangkiti manusia, kebanyakan kes kajian yang dilaporkan di serata dunia adalah disebabkan oleh *E. bienersi* dan *Encephalitozoon* spp. (Didier & Weiss 2006; Fayer & Santin-Duran 2014).

Walaupun begitu, di Malaysia, hanya beberapa kajian mengenai infeksi mikrosporidia telah diterbitkan. Kajian-kajian yang telah diterbitkan adalah untuk mengkaji prevalens mikrosporidia dalam kalangan pesakit positif HIV, pesakit di hospital, pesakit kanser dan komuniti Orang Asli asimptomatik (Norhayati et al. 2007, 2008; Lono et al. 2008, 2010, 2011; Anuar et al. 2013). Berbeza dengan dapatan kajian luar negara, prevalens mikrosporidia dalam kalangan komuniti Orang Asli asimptomatik didapati lebih tinggi berbanding populasi kumpulan lain di Malaysia (Lono et al. 2011). Fakta ini disokong dengan laporan daripada Lono et al. (2011) dan Anuar et al. (2013) yang mendapati jangkitan parasit usus secara umumnya adalah lebih tinggi bagi komuniti ini berbanding kumpulan populasi lain yang sihat di Malaysia.

Status imun rendah bagi kebanyakan Orang Asli yang disebabkan oleh kadar malnutrisi yang tinggi, dipercayai menyebabkan mereka lebih mudah terdedah dengan jangkitan mikrosporidia (Lono et al. 2011). Berdasarkan laporan-laporan terdahulu yang menunjukkan prevalens mikrosporidiosis yang tinggi di kalangan komuniti Orang Asli, justeru kajian ini memfokuskan populasi Orang Asli sebagai sumber subjek bagi membangunkan teknik molekular LAMP untuk mengesan infeksi mikrosporidia dalam sampel tinja.

Secara amnya, sumber infeksi mikrosporidia masih belum diketahui secara definitif. Namun, transmisi zoonotik, bawaan air dan bawaan makanan dipercayai boleh menyebabkan jangkitan kepada manusia (Cali & Takvorian 2004; Didier & Weiss 2011). Ubi kayu merupakan makanan utama bagi komuniti orang asli (Anuar et al. 2013) yang mana jika tidak dibersihkan terlebih dahulu boleh menyumbang kepada penyebab jangkitan mikrosporidia. Pekerjaan Orang Asli yang perlu meneroka hutan untuk mencari makanan juga terdedah kepada risiko jangkitan. Selain itu, faktor pemilikan haiwan peliharaan seperti anjing dan kucing di samping haiwan ternakan seperti ayam dan itik turut mendedahkan Orang Asli kepada jangkitan mikrosporidia (Anuar et al. 2013). Ini adalah kerana, spora mikrosporidia berkemungkinan dilepaskan bersama tinja haiwan di atas tanah atau di dalam air, menyebabkan berlakunya transmisi zoonotik secara tidak langsung. Jangkitan mikrosporidia pada kebiasaannya menyebabkan simptom diareka kronik, malahan mampu menyebabkan penyakit tersebar lalu menyumbang kepada pelbagai sindrom klinikal (Didier & Weiss 2011). Oleh itu, diagnosis yang tepat amat diperlukan kerana ubat-ubatan yang spesifik-spesies diperlukan bagi memastikan keberkesanan rawatan kepada pesakit. Rawatan menggunakan albendazol kurang efektif dalam merawat infeksi *E. bienersi* berbanding spesies mikrosporidia yang lain. Terapi nitazoxanida telah terbukti berkesan secara klinikal dalam merawat infeksi *E. bienersi* (Bicart-Sée et al. 2000). Oleh itu, ubat ini telah dicadangkan untuk digunakan sebagai rawatan alternatif bagi infeksi *E. bienersi*.

Diagnosis mikrosporidiosis secara tradisinya bergantung kepada pemeriksaan mikroskop elektron pancaran (TEM) untuk identifikasi spesifik-spesies mikrosporidia (Ghosh et al. 2014; Verweij & Stensvold 2014). Walaupun teknik ini kekal sebagai

piawai emas, pemeriksaan menggunakan TEM memerlukan peralatan mahal, kepakaran dan memakan masa yang terlalu lama. Teknik ini juga kurang sensitif kerana hanya sejumlah tisu yang kecil sahaja dapat diperiksa (Ghosh et al. 2014). Oleh itu, pemeriksaan mikroskop cahaya merupakan rutin diagnosis piawai yang digunakan secara meluas untuk mengesan spora mikrosporidia (Müller et al. 1999; Al-Mekhlafi et al. 2011; Verweij & Stensvold 2014). Di Malaysia, pemeriksaan sampel untuk spora mikrosporidia tidak dilakukan secara rutin di kebanyakan hospital dan hanya beberapa makmal diagnostik klinikal menawarkan kaedah pewarnaan trikrom terubah suai atau Gram-kromotrop untuk pengesanan spora mikrosporidia (Norhayati et al. 2008; Ithnin et al. 2013).

Pelbagai teknik pewarnaan seperti teknik Weber dan Gram kromotrop telah diperkenalkan untuk mengesan spora mikrosporidia melalui pemeriksaan mikroskopi (Weber et al. 1992; Moura et al. 1997). Namun, untuk kajian ini teknik pewarnaan Gram kromotrop Kinyoun (GCK) yang diterbitkan oleh Salleh et al. (2011) digunakan kerana teknik pewarnaan ini memudahkan pengesanan spora mikrosporidia di bawah mikroskop cahaya berbanding teknik trikrom Weber terubah suai (WMT). Selain proses pewarnaan yang singkat, tiub kutub spora yang berbentuk seperti jalur tali pinggang juga mudah dilihat. Walau bagaimanapun, melalui mikroskop cahaya, para penyelidik hanya dapat mengesan kehadiran spora mikrosporidia tanpa mengetahui spesiesnya. Identifikasi spesies mikrosporidia amat penting untuk memastikan rawatan yang sesuai dapat diberikan kepada pesakit (Didier & Weiss 2006). Melalui pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya, kehadiran organisma kecil yang lain seperti bakteria atau spora fungi serta kantung spora kosong akan mempengaruhi pemerhatian slaid dan menyebabkan keputusan positif-palsu dilaporkan (Lono et al. 2008; Salleh et al. 2011; Rayan et al. 2013). Oleh itu, teknik molekular amat diperlukan untuk pengesanan lanjut infeksi mikrosporidia. Asai PCR merupakan teknik pilihan yang telah dibangunkan untuk diagnosis infeksi mikrosporidia yang lebih sensitif dan spesifik serta dapat menentukan spesifik spesies (da Silva et al. 1996; Fedorko & Hijazi 1996). Namun, teknik ini tidak digunakan secara rutin kerana PCR memakan masa serta memerlukan peralatan yang mahal (Fakruddin 2011).

Dalam kajian ini, tiga kaedah pengesanan yang berbeza iaitu PCR, LAMP dan mikroskop cahaya telah dinilai untuk menentukan dan membandingkan sensitiviti dan spesifisiti pengesanan mikrosporida dalam sampel tinja manusia. Bagaimanapun, dalam kajian ini, hanya spesies *E. bienersi* sahaja dapat dikesan melalui amplifikasi PCR. Manakala, tiga spesies daripada genus *Encephalitozoon* tidak dapat dikesan melalui PCR walaupun pasangan primer spesifik-spesies telah digunakan. Lantaran itu, asai LAMP untuk diagnosis *Encephalitozoon* spp. tidak dilakukan kerana ketiadaan sampel tinja positif yang dapat digunakan untuk membandingkan sensitiviti dan spesifisiti asai LAMP, PCR dan mikroskop. Ketidadaan sampel positif *Encephalitozoon* spp. berkemungkinan disebabkan *E. bienersi* merupakan spesies mikrosporidia usus yang paling banyak menjangkiti manusia. Kajian oleh Al-Mekhlafi et al. (2011) juga mendapati *E. bienersi* merupakan spesies yang terbanyak dikesan iaitu sebanyak 75% daripada sampel klinikal tinja positif mikrosporidia.

Oleh itu, hanya asai LAMP untuk diagnosis spesies *E. bienersi* telah berjaya dibangunkan menggunakan set primer I. Berdasarkan analisa keputusan, set primer I dilihat lebih stabil dan sensitif berbanding set primer II. Set primer I juga berjaya mengamplifikasi DNA *E. bienersi* sehingga suhu 65°C dengan suhu optimum 60°C. Dalam kajian ini, asai LAMP dapat mengamplifikasi DNA *E. bienersi* dengan kadar positif 39% dalam masa satu jam pada suhu 60°C menggunakan blok haba konvensional. Berdasarkan hasil keputusan, tahap minima asai LAMP dan PCR dalam mengesan *E. bienersi* ialah serendah 7 spora/ 20 µl. Walaupun had minimum pengesanan bagi kedua-dua asai adalah sama, asai LAMP lebih sesuai digunakan serta praktikal untuk dilaksanakan berbanding PCR. Asai LAMP hanya memerlukan satu jam amplifikasi pada suhu yang tetap, manakala asai PCR memakan masa hampir dua jam untuk melengkapkan keseluruhan kitaran terma.

Selain itu, asai LAMP ini juga menunjukkan amplifikasi negatif dan tiada tindakbalas silang berlaku dengan sampel DNA daripada parasit yang berlainan termasuklah *Encephalitozoon* spp. Peningkatan sensitiviti dan spesifisiti oleh LAMP berbanding asai PCR adalah disebabkan penggunaan empat primer LAMP dan juga aktiviti sesaran bebenang DNA oleh enzim *Bst*, yang menyumbang kepada penghasilan jumlah DNA yang tinggi di bawah kondisi isothermal (Nagamine et al.

2002). Asai LAMP *E. bieneusi* menghasilkan sensitiviti dan spesifisiti sebanyak 94% dan 88%, manakala pemeriksaan spesimen melalui mikroskop cahaya menghasilkan keputusan sensitiviti dan spesifisiti yang lebih rendah iaitu 48% dan 76%. Selain itu, LAMP mempamerkan persetujuan diagnostik yang teguh dengan PCR ($\kappa = 0.78$). Hal ini menunjukkan LAMP berpotensi digunakan sebagai teknik alternatif di dalam makmal diagnostik rutin untuk meningkatkan sensitiviti dan spesifisiti diagnosis mikrosporidia berbanding teknik mikroskop cahaya.

Walapun begitu, terdapat beberapa sampel memberi keputusan positif palsu dan negatif palsu melalui asai LAMP. Oleh itu, analisis menggunakan penjujukan dan enzim penyekatan dapat membantu membezakan hasil keputusan dan kontaminasi (Nagdev et al. 2011). Analisis lanjut seperti penjujukan antara sampel negatif-LAMP tetapi positif-PCR telah dilakukan. Dengan melakukan BLAST, sampel-sampel tersebut didapati sepadan dengan jujukan *E. bieneusi* yang terdapat di dalam pangkalan data. Berdasarkan keputusan analisis penjujukan tersebut, berkemungkinan amplifikasi negatif palsu telah berlaku. Sementara itu, sampel positif-LAMP tetapi negatif-PCR berkemungkinan adalah disebabkan oleh kehadiran perencat di dalam sampel tinja yang memberi kesan rencatan yang lebih kuat terhadap polimerase *Taq* semasa amplifikasi PCR berbanding polimerase *Bst* semasa amplifikasi LAMP. Namun, kajian yang lebih mendalam perlu dilakukan dengan menggunakan kawalan amplifikasi dalaman. Hal ini adalah untuk menentukan perencatan spesifik yang berlaku di dalam kedua-dua reaksi PCR dan LAMP sehingga menghasilkan keputusan amplifikasi sedemikian (Nagdev et al. 2011).

Sementara itu, terdapat beberapa laporan kajian pembangunan asai LAMP bagi pengesanan protozoa lain yang turut menunjukkan sensitiviti dan spesifisiti yang tinggi. Contohnya, amplifikasi LAMP bagi *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* dan *Plasmodium falciparum* masing-masing menunjukkan 87.5%, 90.7% dan 95.8% sensitiviti dan 100% spesifisiti (Lau et al. 2010; Khan et al. 2012; Najafabadi et al. 2014). Selain daripada pengesanan agen etiologi menggunakan tinja, asai LAMP juga telah berjaya dibangunkan untuk mengesan jangkitan parasit lain menggunakan pelbagai jenis sampel klinikal seperti air liur manusia, lapisan buf, air kencing dan darah (Lau et al. 2011; Khan et al. 2012; Najafabadi et al. 2014). Hal ini menunjukkan

reaksi LAMP berupaya mengamplifikasi variasi sampel klinikal. Malahan, terdapat laporan kajian yang membangunkan teknik LAMP tanpa melakukan proses pengekstrakan DNA (Poon et al. 2006).

Selain kelebihan teknik LAMP yang sensitif, spesifik dan praktikal seperti yang dilaporkan oleh kebanyakan kajian, kondisi isothermal, polimerase *Bst* serta reagen LAMP turut memainkan peranan penting dan mempunyai keistimewaan tersendiri berbanding asai PCR. Gabungan kedua-dua kondisi isothermal dan polimerase *Bst* di dalam asai LAMP menunjukkan rintangan terhadap perencat yang kebiasaannya mengganggu proses amplifikasi PCR konvensional (Mori et al. 2001; Khan et al. 2012). Kestabilan reagen LAMP dan polimerase *Bst* juga adalah tinggi walaupun bahan-bahan ini disimpan pada suhu 25°C dan 37°C (Thekisoe et al. 2009). Selain itu, hanya blok haba konvensional diperlukan untuk melakukan asai ini. Keperluan sumber elektrik untuk blok ini boleh ditukar kepada penggunaan kuasa alternatif seperti bateri untuk memastikan kesesuaian aplikasi asai LAMP (Khan et al. 2012). Rendaman air juga boleh digunakan, namun, teknik melilit tiub menggunakan parafilm adalah disyorkan. Hal ini adalah untuk mengelakkan sebarang kontaminasi (Khan et al. 2012) serta kemungkinan terhasilnya amplifikasi positif palsu disebabkan sensitiviti dan spesifisiti LAMP yang sangat tinggi (Zhou et al. 2014). Kemudahan peralatan yang murah dan mudah untuk digunakan meunjukkan potensi asai LAMP ini boleh diaplikasi di lapangan dan makmal yang tidak mempunyai peralatan canggih.

Penambahan dua primer gelung dalam reaksi campuran untuk asai LAMP juga mampu untuk mempercepatkan masa reaksi amplifikasi. Kajian oleh Nagamine et al. (2002) menunjukkan penggunaan dua primer gelung bersama empat primer utama bagi asai LAMP dapat mengurangkan masa sebanyak 30 minit berbanding masa reaksi yang diambil untuk asai LAMP biasa. Namun, aplikasi dua primer gelung tidak disertakan kerana fokus kajian ini adalah membangunkan teknik LAMP bagi pengesanan mikrosporidia untuk pertama kali serta membandingkan penggunaannya dengan pemeriksaan mikroskopi dan PCR. Selain itu, penggunaan primer gelung bukanlah satu kemestian untuk teknik LAMP (Zhou et al. 2014).

Selain itu, LAMP juga mempunyai kelebihan daripada segi interpretasi keputusan ujian yang lebih cepat dan mudah. Secara tradisinya, analisis elektroforesis gel perlu dilakukan selepas amplifikasi PCR. Namun, untuk asai LAMP, analisis keputusan produk amplifikasi dapat dilakukan hanya melalui pemerhatian mata kasar (Parida et al. 2008; Fakruddin 2011) tanpa melakukan analisa elektroforesis gel. Pemeriksaan visual dilakukan dengan memerhatikan perubahan warna selepas amplifikasi menggunakan reagen pendarfluor seperti SYBR Green I, etidium bromida, dan calcein di bawah pencahayaan UV (Parida et al. 2008; Mori & Notomi 2009). Hal ini memudahkan lagi penggunaan teknik LAMP untuk diaplikasi di pelbagai lokasi. Selain itu, terdapat teknik penggabungan di antara asai LAMP dan asai aliran lateral (LFA) yang telah diterbitkan oleh beberapa kajian (Soliman & El-Matbouli 2010; Surasilp et al. 2011; Murray et al. 2013). Penggunaan primer yang telah dilabel dengan antibodi spesifik bersama produk amplifikasi memudahkan lagi interpretasi dan analisa keputusan (Murray et al. 2013). Pemeriksaan visual seperti ini juga mengurangkan risiko kontaminasi silang di antara sampel (Dhama et al. 2014).

Namun begitu, terdapat juga beberapa kekurangan untuk teknik LAMP ini. Pemilihan dan rekaan primer adalah kritikal dan perlu direka dengan sebaiknya supaya tidak menghasilkan tindakbalas homologi silang semasa amplifikasi. Selain itu, saiz DNA sasaran sewajarnya dipilih kurang daripada 300 bp (Notomi et al. 2000; Sotiriadou & Karanis 2008) kerana keberkesanan amplifikasi LAMP bergantung kepada saiz sasaran DNA. Hal ini disebabkan oleh sintesis DNA sesaran bebenang merupakan langkah pengekstrakan kadar bagi asai LAMP. Oleh itu, melalui kajian Notomi et al. (2000), sekiranya saiz sasaran melebihi 500 bp, amplifikasi tersebut akan menghasilkan keputusan yang kurang memuaskan. Keputusan amplifikasi yang terbaik hanya akan dihasilkan apabila saiz DNA sasaran berada dalam lingkungan 130 ke 200 bp (Notomi et al. 2000). Selain itu, seperti dinyatakan di atas, asai LAMP dianggap terlalu sensitif sehingga menyumbang kepada masalah kontaminasi. Hal ini disebabkan oleh produk LAMP yang terlalu stabil dan tidak mudah didegradasi (Bai et al. 2011). Namun, masalah ini dapat diatasi jika campuran reaksi LAMP dieram seketika bersama Urasil-DNA Glycosylase (UNG) sebelum dimulakan amplifikasi (He & Xu 2010).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARANAN

Kesimpulannya, asai LAMP yang dibangun melalui kajian ini dilihat sebagai teknik molekular yang dapat diaplikasi pada masa hadapan di makmal-makmal diagnostik untuk pengesanan mikrosporidia bagi spesimen klinikal. Tambahan pula, identifikasi spesies mikrosporidia melalui asai LAMP ini amat penting untuk menentukan terapi farmakologi yang pantas dan sesuai untuk mengelakkan risiko berlakunya jangkitan tersebar lalu menyebabkan maut terutamanya bagi pesakit terimunokompromi (Al-Mekhlafi et al. 2011). Kepantasan, keringkasan serta fleksibiliti reagen dan peralatannya memudahkan teknik ini untuk digunakan sebagai kaedah alternatif di negara-negara membangun yang mempunyai akses terhadap teknologi canggih dan tenaga kepakaran. Sensitiviti dan spesifisiti asai LAMP yang tinggi seperti yang ditunjukkan dalam kajian ini amat sesuai untuk digunakan sebagai pemeriksaan yang pantas untuk diagnosis *E. bienewusi*, sekaligus bertindak sebagai alternatif kepada teknik rutin pemeriksaan mikroskopi di makmal-makmal diagnostik.

Namun begitu, beberapa siri kajian perlu dijalankan untuk menentukan perencatan spesifik yang berkemungkinan berlaku semasa amplifikasi LAMP *E. bienewusi* sehingga menyebabkan keputusan positif palsu berlaku. Setelah perencat tersebut dikenal pasti, kajian lain perlu dijalankan untuk mengatasi kelemahan teknik LAMP dalam usaha memastikan kualiti asai molekular yang terbaik dapat dihasilkan. Walaupun dua primer gelung LAMP tidak disertakan dalam kajian ini, penambahan primer-primer tersebut untuk kajian seterusnya dapat mengukuhkan lagi kelebihan asai ini.

Selain itu, kajian mendalam juga disyorkan untuk memudahkan lagi aplikasi teknik LAMP ini serta menjadikan asai ini mesra pengguna kepada kakitangan makmal klinikal yang tidak mahir menggunakan teknik molekular berteknologi tinggi seperti PCR. Antaranya, teknik LAMP *E. bienusi* ini boleh digabungkan dengan asai lain seperti asai aliran lateral (LFA). Penggabungan bersama teknik LFA meringkaskan lagi analisa keputusan produk amplifikasi selain mengurangkan kos diagnosis. Penggabungan kedua-dua asai ini juga berpotensi untuk merealisasikan penghasilan kit pada masa hadapan dalam mendiagnosis jangkitan mikrosporidia pada pesakit terimunokompromi dan imunokompeten. Oleh itu, teknik LAMP sewajarnya perlu diberi perhatian dan dikaji dengan lebih menyeluruh. Kelebihan-kelebihan yang terdapat pada teknik LAMP ini perlu dimanfaatkan oleh para penyelidik dalam usaha menghasilkan kaedah pengesanan infeksi penyakit yang lebih berkesan dan efektif.



RUJUKAN

- Abdelmalek, R., Anane, S., Chabchoub, N., Essid, R., Aoun, K., Chaabéne, T. B. & Bouratbine, A. 2011. Microsporidia and cryptosporidia coinfection in an HIV-infected newborn. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 18(5): 562-564.
- Abou, E. N. I., Gaafar, M. R., El-Zawawy, L. A., El-Said, D. & Mossallam, S. F. 2008. The utility of direct agglutination (DAT) and fast agglutination screening (FAST) tests in serodiagnosis of experimental microsporidiosis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 38(3): 903-918.
- Almasi, M. A., Dehabadi, S. M. H., Moradi, A., Eftekhari, Z., Ojaghkandi, M. A. & Aghaei, S. 2013. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium Oxysporum* f. *Sp. lycopersici*. *Plant Pathology & Microbiology* 4(5): 1 – 7.
- Al-Mekhlafi, M. A., Fatmah, M. S., Anisah, N., „Azlin, M., Al-Mekhlafi, H. M. & Norhayati, M. 2011. Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 42(1): 19.
- Ambrosioni, J., van Delden, C., Krause, K. H., Bouchuiguir-Wafa, C., Nagy, M., Passweg, J. & Chalandon, Y. 2010. Invasive microsporidiosis in allogeneic haematopoietic SCT recipient. *Bone Marrow Transplantation* 45: 1249 – 1251.
- Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M. & Azad, A. F. 2008. Growth and maintenance of vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology* A-4E.
- Anane, S. & Attouchi, H. 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 34: 450-464.
- Anuar, T. S., Al-Mekhlafi, H. M., Salleh, F. M. & Moktar, N. 2013. New insights of microsporidial infection among asymptomatic aboriginal population in Malaysia. *PLoS One* 8(8), e71870.
- Arita, M., Ling, H., Yan, D., Nishimura, Y., Yoshida, H., Wakita, T. & Shimizu, H. 2009. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis cases. *BMC Infectious Diseases* 9: 208.
- Bai, Z., Shi, L., Hu, C., Chen, X., Qi, J., Ba, X., Peng, Q., Chen, Y., Chen, H. & Guo, A. 2011. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Mycoplasma bovis*. *African Journal of Biotechnology* 10(57): 12333 - 12338.

- Belcher, J. W., Guttenberg, S. A. & Schmookler, B. M. 1997. Microsporidiosis of the mandible in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 55: 424-426.
- Bergquist, R., Morfeldt-Månsson, L., Pehrson, P. O., Petrini, B. & Wasserman, J. 1984. Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 16(4): 389-391.
- Bern, C., Kawai, V., Vargas, D., Rabke-Verani, J., Williamson, J., Chavez-Valdez, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Cama, V., Moura, H., Secor, W. E., Visvesvara, G. & Gilman, R. H. 2005. The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases* 191: 1658 – 1664.
- Bessetti, J. 2007. An introduction to PCR inhibitors. *Journal of Microbiology Methods* 28: 159 - 167.
- Bicart-See, A. Massip, P., Linas, M. D. & Datry, A. 2000. Successful treatment with nitazoxanide of *Enterocytozoon bienersi* microsporidiosis in a patient with AIDS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(1): 167 – 168.
- Botterel, F., Minozzi, C., Vittecoq, D. & Bouree, P. 2002. Pulmonary localization of *Enterocytozoon bienersi* in an AIDS patient: case report and review. *Journal of Clinical Microbiology* 40(12): 4800 – 4801.
- Bryan, R. T. & Schwartz, D. A. 1999. Epidemiology of microsporidiosis. *The Microsporidia and Microsporidiosis* 502-516.
- Cali, A., Donald, P. K. & Orenstein, J. M. 1993. *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40(1): 101-112.
- Cali, A., Neafie, R. C. & Takvorian, P. M. 2011. Microsporidiosis. Dlm. Meyers, W. M., Firpo, A. & Wear, D. J. (pnyt.). *Topics on the pathology of protozoan and invasive arthropod diseases*, hlm. 1-24. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology.
- Cali, A., Neafie, R., Weiss, L. M., Ghosh, K., Vergara, R. B., Gupta, R. & Takvorian, P. M. 2010. Human vocal cord infection with the microsporidium *Anncaliia algerae*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 57(6): 562 – 567.
- Cali, A. & Takvorian, P. M. 1999. Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. Dlm. Wittner, M. & Weiss, L. M. (pnyt.). *The Microsporidia and Microsporidiosis*, hlm. 85-128. Washington, DC: ASM Press.
- Cali, A. & Takvorian, P. M. 2004. The microsporidia: pathology in man and occurrence in nature. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 35(Suppl 1): 58-64.

- Canning, E. U. 2001. Microsporidia. Dlm. Gillespie, S. & Pearson, R. D. (pnyt.). *Principles and Practice of Clinical Parasitology*, hlm. 171 – 195. John Wiley & Sons Ltd.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2015. Microsporidiosis – parasite biology. <http://www.cdc.gov/dpdx/index.html> [28 Jun 2015].
- Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Microsporidiosis – treatment information. <https://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis/tx.html> [12 Desember 2016].
- Chabchoub, N., Abdelmalek, R., Mellouli, F., Kanoun, F., Thellier, M., Bouratbine, A. & Aoun, K. 2009. Genetic identification of intestinal microsporidia species in immunocompromised patients in Tunisia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80(1): 24-27.
- Chacin-Bonilla, L., Panunzio, A. P., Monsalve-Castillo, M. Parra-Cepeda, I. & Martinez, R. 2006. Microsporidiosis in Venezuela: prevalence of intestinal microsporidiosis and its contribution to diarrhea in a group of human immunodeficiency virus-infected patients from Zulia State. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74(3): 482 – 486.
- Champion, L., Durrbach, A., Lang, P., Delahousse, M., Chauvet, C., Sarfati, C., Glotz, D. & Molina, J. M., 2010. Fumagillin for treatment of intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 10(8): 1925-1930.
- Chan, C. M. L., Theng, J. T. S., Li, L. & Tan, D. T. H. 2003. Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals. *Ophthalmology* 110(7): 1420 – 1425.
- Chander, Y., Koelbl, J., Puckett, J., Moser, M. J., Klingele, A. J., Liles, M. R., Carrias, A., Mead, D. A. & Schoenfeld, T. W. 2014. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Original Research Article* 5(395): 1 – 11.
- Cheng, L. 2006. Parasites and pestilence: microsporidiosis. <http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Microsporidiosis/microsporida1.html> [28 Jun 2015].
- Conteas, C. N., Berlin, O. G. W., Ash, L. R., Pruthi, J. S., California, S., Medical, P. & Angeles, L. 2000. Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63:121–127.
- Cotte, L., Rabodonirim, M., Chapuis, F., Bailly, F., Bissuel, F., Raynal, C., Gelas, P., Persat, F., Piens, M.-A. & Trepo, C. 1999. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *The Journal of Infectious Diseases* 180: 2003-2008.

- da Silva, A. J., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., De Moura, H., Slemenda, S. B. & Pieniazek, N. J. 1996. Sensitive PCR diagnosis of infections by *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *Journal of Clinical Microbiology* 34(4): 986-987.
- de Andrade Lima, P. M., Oliveira, M. P., Ferreira, G. R., de Medeiros Lima, T. P., de Andrade Lima, J. & de Mello, R. J. V. 2014. Effectiveness of histology and cytology on musculoskeletal tumor diagnosis. *Acta Ortopedica Brasileira* 22(3): 132 - 135.
- de Groote, M. A., Visvesvara, G., Wilson, M. L. Pieniazek, N. J., Slemenda, S. B. da Silva, A., Leitch, G. J., Bryan, R. T. & Reves, R. 1995. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *The Journal of Infectious Diseases* 171(5): 1375-1378.
- Decraene, V., Lebbad, M., Botero-Kleiven, S., Gustavsson, A.-M. & Lofdahl, M. 2012. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiology & Infection* 140: 519-527.
- Desportes-Livage, I. & Bylen, E. 1998. Microsporidia infection HIV – negative subjects. *Acta Protozoologica* 37: 63-70.
- Desportes, I., Charpentier, Y. L., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. & Modigliani, R. 1985. Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *The Journal of Protozoology* 32(2): 250-254.
- Dhama, K., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A. & Thomas, P. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17(2): 151 – 166.
- Didier, E. S. 1998. Microsporidiosis. *Clinical Infectious Diseases* 27: 1 – 8.
- Didier, E. S. 2005. An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica* 94: 61-76.
- Didier, E. S., Didier, P. J., Friedberg, D. N., Stenson, S. M., Orenstein, J. M., Tio, O., Davis, R. M., Vossbrinck, C., Millichamp, N. & Shadduck, J. A. 1991. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *The Journal of Infectious Diseases* 163(3): 617-621.
- Didier, E. S. & Khan, I. A. 2014. The immunology of microsporidiosis in mammals. Dlm. Weiss, L. M. & Becnel, J. J. (pnyt.). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, hlm. 135-164. John Wiley & Sons, Inc.

- Didier, E. S., Orenstein, J. M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L. B. & Janney, F. A. 1995. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *Journal of Clinical Microbiology* 33(12): 3138 – 3145.
- Didier, E. S., Stovall, M. E., Green, L. C., Brindley, P. J., Sestak, K. & Didier, P. J. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology* 126: 145–66.
- Didier, E. S. & Weiss, L. M. 2006. Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19(50): 485-492.
- Didier, E. S. & Weiss, L. M. 2008. Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protistology* 5(4): 243–255.
- Didier, E. S. & Weiss, L. M. 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Current Opinion in Infectious Diseases* 24(5): 490-495.
- Dionisio, D., Manneschi, L. I., di Lollo, S., Orsi, A., Sterrantino, G., Leoncini, F., Pozzi, M., Vinattieri, M. A., Tani, A. & Papucci, A. 1998. Persistent damage to *Enterocytozoon bieneusi*, with persistent symptomatic relief, after combined furazolidone and albendazole in AIDS patients. *Journal of Clinical Pathology* 51; 731 – 736.
- Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chmelík, V., Kubále, J., Dyková, I. & Kváč, M. 2011. *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology* 49(7): 2769-2771.
- Dore, G. J., Marriott, D. J., Hing, M. C., Harkness, J. L. & Field, A. S. 1995. Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus: response to therapy with albendazole. *Clinical Infectious Diseases* 21(1): 70 -76.
- Dowd, S. E., Gerba, C. P. & Pepper, I. L. 1998. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9): 3332-3335.
- Dugan, L., Bearinger, J., Hinckley, A., Strout, C. & Souza, B. 2012. Detection of *Bacillus anthracis* from spores and cells by loop-mediated isothermal amplification without sample preparation. *Journal of Microbiological Methods* 90(3): 280 – 284.
- Ebbinghaus, P., von Samson-Himmelstjerna, G. & Krucken, J. 2012. Direct loop-mediated isothermal amplification from *Plasmodium chabaudi* infected blood samples: inability to discriminate genomic and cDNA sequence. *Experimental Parasitology* 131: 40 - 44.

- Endo, S., Komori, T., Ricci, G., Sano, A., Yokoyama, K., Ohori, A., Kamei, K., Franco, M., Miyaji, M. & Nishimura, K. 2004. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiology Letters* 234(1): 93-97.
- Fakruddin, M. 2011. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) – an alternative to polymerase chain reaction (PCR). *Bangladesh Research Publications Journal* 5(4): 425 – 439.
- Fan, N. W., Wu, C. C., Chen, T. L., Yu, W. K., Chen, C. P., Lee, S. M. & Lin, P. Y. 2012. Microsporidial keratitis in patients with hot springs exposure. *Journal of Clinical Microbiology* 50(2): 414-418.
- Fang, X., Liu, Y., Kong, J. & Jiang, X. 2010. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens. *Analytical Chemistry* 82; 3002 – 3006.
- Fayer, R. & Santin-Duran, M. 2014. Epidemiology of microsporidia in human infections. Dlm. Weiss, L. M. & Becnel, J. J. (pnyt.). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, hlm. 135-164. John Wiley & Sons, Inc.
- Fedorko, D. P. & Hijazi, Y. M. 1996. Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidial infection. *Emerging Infectious Diseases* 2(3): 183 – 191.
- Fernández-Soto, P., Arahuetes, J. G., Hernández, A. S., Abán, J. L., Santiago, B. V. & Muro, A. 2014. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(9): e3126.
- Field, A. S., Marriott, D. J. & Hing, M. C. 1993. The Warthin-Starry stain in the diagnosis of small intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients. *Folia Parasitologica* 40: 261 -266.
- Fischer, J., Tran, D., Juneau, R. & Hale-Donze, H. (2008). Kinetics of *Encephalitozoon* spp. infection of human macrophages. *Journal of Parasitology* 94(1): 169-175.
- Franzen, C. & Müller, A. 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* 12(2): 243–285.
- Franzen, C. & Müller, A. 2001. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection* 3: 389-400.
- Galvan, A. L., Sanchez, A. M. M., Valentin, M. A. P., Henriques-Gil, N., Izquierdo, F., Fenoy, S. & del Aguila, C. 2011. First case of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology* 49(4): 1301 - 1306.

- Garcia, L. S. 2002. Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology* 40(6): 1892 - 1901.
- Gatti, S., Sacchi, L., Novati, S., Cornona, S., Bernuzzi, A., Moura, H., Pieniazek, N. J., Visvesvara, G. S. & Scaglia, M. 1997. Extraintestinal microsporidiosis in AIDS patients: clinical features and advanced protocols for diagnosis and characterization of the isolates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44(s6).
- Ghosh, K. Schwartz, D. & Weiss, L. M. 2014. Laboratory diagnosis of microsporidia. Dlm. Weiss, L. M. & Becnel, J. J. (pnyt.). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, hlm. 421 - 456. John Wiley & Sons, Inc.
- Ghosh, K. & Weiss, L. M. 2009. Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2009.
- Goodgame, R., Stager, C., Marcantel, B., Alcocer, E. & Segura, A. M. 1999. Intensity of infection in AIDS-related intestinal microsporidiosis. *Journal of Infectious Diseases* 180(3): 929 - 932.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A. & Hanaki, K.-I. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Bio Techniques* 46: 167 - 172.
- Govorkova, E. A., Murti, G., Meignier, B., de Taisne, C. & Webster, R. G. 1996. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *Journal of Virology* 70(8): 5519 - 5524.
- Groß, U. 2003. Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitology Research* 90(1), S14-S18.
- Gunnarsson, G., Hurlburt, D., DeGirolami, P. C., Federman, M. & Wanke, C. 1995. Multiorgan microsporidiosis: report of five cases and review. *Clinical Infectious Diseases* 21(1): 37 - 44.
- Han, E.-T., Watanabe, R., Sattabongkot, J., Khuntirat, B., Sirichaisinthop, J., Iriko, H., Jin, L., Takeo, S. & Tsuboi, T. 2007. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 45(8): 2521 - 2528.
- Hartskeel, R. A., Schuitema, A. R. J., van Gool, T. & Terpstra, W. J. 1993. Genetic evidence for the occurrence of extra-intestinal *Enterocytozoon bieneusi* infections. *Nucleic Acid Research* 21(17): 4150.
- Hartskeerl, R. A., van Gool, T., Schuitema, A. R. J., Didier, E. S. & Terpstra, W. J. 1995. Genetic and immunological characterization of microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110: 277-285.

- He, L. & Xu, H.-S. 2010. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Aquaculture* 311: 94 -99.
- Hill, J., Beriwal, S., Chandra, I., Paul, V. K., Kapil, A., Singh, T., Wadowsky, R. M., Singh, V., Goyal, A., Jahnukainen, T. & Johnson, J. R. 2008. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 46(8): 2800 - 2804.
- Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekisoe, O. M. M., Yokoyama, N., Inoue, N., Nambota, A., Yasuda, J. & Igarashi, I. 2007. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites. *Journal of Microbiological Methods* 71: 281 - 287.
- Ithnin, N. R., Osman, M., Rahman, A., Juraida, E. & Hamat, R. A. 2013. Comparison of Calcofluor White M2R fluorescence and modified Gram chromotrope Kinyoun staining methods for the detection of microsporidial spores from stool samples. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences* 9(2): 63-68.
- Jedrzejewski, S., Graczyk, T. K., Slodkiewicz-Kowalska, A., Tamang, L. & Majewska, A. C. 2007. Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Applied and Environmental Microbiology* 73(12): 4071-4073.
- Jordan, C.N., Zajac, A. M., Snowden, K. S. & Lindsay, D. S. 2006. Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Parasitology* 135: 235 - 240.
- Joseph, J. & Sharma, S. 2009. In vitro culture of various species of microsporidia causing keratitis: evaluation of three immortalized cell lines. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27(1): 35 - 39.
- Joseph, J., Vemuganti, G. K. & Sharma, S. 2005. Microsporidia: emerging ocular pathogens. *Indian Journal of Medical Microbiology* 23(2): 80-91.
- Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E. & Suzutani, T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70: 499 - 501.
- Karanis, P., Thekisoe, O., Kiouptsi, K., Ongerth, J., Igarashi, I. & Inoue N. 2007. Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 73(17): 5660 - 5662.
- Keeling, P. J. & Slamovits, C. H. 2004. Simplicity and complexity of microsporidian genomes. *Eukaryotic Cell* 3(6):1363-1369.

- Kester, K. E., Turiansky, G. W. & McEvoy, P. L. 1998. Nodular cutaneous microsporidiosis in a patient with AIDS and succesful treatment with long-term oral clindamycin therapy. *Annals of Internal Medicine* 128: 911-914.
- Khan, M. G. M., Bhaskar, K. R. H., Salam, M. A., Akther, T., Pluschke, G. & Mondal, D. 2012. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in a buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasites & Vectors* 5(1): 1.
- Kokoskin, E., Gyorkos, T. W., Camus, A., Cedilotte, L., Purtill, T. & Ward, B. 1994. Modified technique for efficient detection of microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology* 3(4): 1074 - 1075.
- Koloren, Z. 2013. Sensitive and cost-effective detection of *Toxoplasma gondii* in water supplies of the Black Sea in Turkey by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 27(1): 3543 - 3546.
- Kramer, J. P. 1970. Longevity of microsporidian spores with special reference to *Octospora muscaedomesticae* flu. *Acta Protozoologica* 8(17): 217-224.
- Kucerova-Pospisilova, Z. & Ditrich, O. 1998. The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. *Folia Parasitologica* 45: 108 - 112.
- Lalkhen, A.G. & McCluskey, A. 2008. Clinical tests: sensitivity and specificity. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 8(6): 221-223.
- Lam, L., Sakakihara, S., Ishizuka, K., Takeuchi, S., Arata, H. F., Fujita, H. & Noji, H. 2008. Loop-mediated isothermal amplification of a single DNA molecule in polyacrylamide gel-based microchamber. *Biomedical Microdevices* 10(4): 539-546.
- LAMP Designer. 2014. Version 1.10. California: PREMIER Biosoft.
- Lau, Y.-L., Fong, M.-Y., Mahmud, R., Chang, P.-Y., Palaeya, V., Cheong, F.-W., Chin, L.-C., Anthony, C. N., Al-Mekhlafi, A. M. & Chen, Y. 2011. Specific, sensitive and rapid detection of human *Plasmodium knowlesi* infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in blood samples. *Malaria Journal* 10(1): 1.
- Lau, Y. L., Meganathan, P., Sonaimuthu, P., Thiruvengadam, G., Nissapatorn, V. & Chen, Y. 2010. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. *Journal of Clinical Microbiology* 48(10): 3698 - 3702.
- LAVA-DNA. 2015. <https://code.google.com/archive/p/lava-dna/> [2 May 2015].

- Lee, J. H. 2008. Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 74(5): 1664-1666.
- Lee, S.-Y., Lee, S.-S., Lyoo, Y. S. & Park, H.-M. 2011. DNA detection and genotypic identification of potentially human-pathogenic microsporidia from asymptomatic pet parrots in South Korea as a risk factor for zoonotic emergence. *Applied and Environmental Microbiology* 77(23): 8442-8444.
- Leelayoova, S., Subrungruang, I., Rangsin, R., Chavalitsheewinkoon-Petmitr, P., Worapong, J., Naaglor, T. & Mungthin, M. 2005. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotype a in a Thai orphanage. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73(1): 104-107.
- Li, X., & Fayer, R. 2006. Infectivity of microsporidian spores exposed to temperature extremes and chemical disinfectants. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53: S77.
- Li, X., Palmer, R., Trout, J. M. & Fayer, R. 2003. Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology* 89(1): 185-188.
- Liang, S.-Y., Chan, Y.-H., Hsia, K.-T., Lee, J.-L., Kuo, M.-C., Hwa, K.-Y., Chan, C.-W., Chiang, T.-Y., Chen, J.-S., Wu, F.-T. & Ji, D.-D. 2009. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* 47(6): 1892 - 1895.
- Liu, A., Guan, G., Du, P., Gou, H., Liu, Z., Liu, J., Ma, M., Yang, J., Li, Y., Niu, Q. & Ren, Q. 2012. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology International* 61(4): 658-663.
- Lobo, M. L., Xiao, L., Antunes, F. & Matos, O. 2012. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for the public health: a 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *International Journal for Parasitology* 42: 197 - 205.
- Lono, A. R., Kumar, S. & Chye, T. T. 2008. Incidence of microsporidia in cancer patients. *Journal of Gastrointestinal Cancer* 39(1-4): 124-129.
- Lono, A. R., Kumar, S. & Chye, T. T. 2010. Prevalence of microsporidia in an indigenous Orang Asli community in Pahang, Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104: 214-218.
- Lono, A. R., Kumar, S. & Chye, T. T. 2011. Detection of microsporidia in local HIV-positive population in Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 409-413.

- Maggi, P., Larocca, A. M. V., Quarto, M., Serio, G., Brandonisio, O., Angarano, G. & Pastore, G. 2000. Effect of antiretroviral therapy on cyrptosporidiosis and microsporidiosis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19(3): 213 - 217.
- Mathis, A. 2000. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *International Journal for Parasitology* 30: 795-804.
- Mathis, A., Weber, R. & Deplazes, P. 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* 18(3):423-445.
- Matos, O., Lobo, M. L., Teles, A. & Antunes, F. 2004. Is microsporidial infection in animals a potential source for human microsporidiosis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 35: 48-53.
- Matos, O., Lobo, M. L. & Xiao, L. 2012. Epidemiology of *Enterocytozoon bienersi* infection in humans. *Journal of Parasitology Research* 2012: 1-19.
- Meissner, E. G., Bennett, J. E., Qvarnstrom, Y., da Silva, A., Chu, E. Y., Tsokos, M. & Gea-Banacloche, J. 2012. Disseminated microsporidiosis in an immunosuppressed patient. *Emerging Infectious Diseases* 18(7): 1155 - 1158.
- Meng, Q., Wang, S., Zhang, L., Huang, X. & Bao, Z. 2013. Development of an in situ loop-mediated isothermal amplification technique for chromosomal localization of DNA sequences. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 31:128-133.
- Menotti, J., Cassinat, B., Porcher, R., Sarfati, C., Derouin, F. & Molina, J. M. 2003. Development of a real-time polymerase-chain-reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bienersi* DNA in stool specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. *Journal of Infectious Diseases* 187(9): 1469-1474.
- Mohindra, A. R., Lee, M. W., Visvesvara, G., Moura, H., Parasuraman, R., Leitch, G. J., Xiao, L., Yee, J. & del Busto, R. 2002. Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Transplant Infectious Disease* 4(2): 102-107.
- Molina, J. M., Chastang, C., Goguel, J., Michiels, J. F., Sarfati, C., Desportes-Livage, I., Horton, J., Derouin, F. & Modai, J. 1998. Albendazole for treatment and prophylaxis of microsporidiosis due to *Encephalitozoon intestinalis* in patients with AIDS: a randomized double-blind controlled trial. *The Journal of Infectious Diseases* 177: 1373 - 1377.
- Molina, J. M., Goguel, J., Sarfati, C., Chastang, C., Desportes-Livage, I., Michiels, J. F., Maslo, C., Katlama, C., Cotte, L., Leport, C., Raffi, F., Derouin, F. & Modai, J. 1997. Potential efficacy of fumagillin in intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* in patients with HIV infection: results of a drug screening study. *AIDS* 11: 1603 - 1610.

- Molina, J. M., Tourneur, M., Sarfati, C., Chevret, S., de Gouvello, A., Gobert, J. G., Balkan, S. & Derouin, F. 2002. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *New England Journal of Medicine* 346(25): 1963-1969.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. & Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 289: 150 - 154.
- Mori, Y. & Notomi, T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy* 15: 62 - 69.
- Moura, H., Schwartz, D. A., Bornay-Llinares, F., Sodre, F. C., Wallace, S. & Visvesvara, G. S. 1997. A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 121: 888 - 893.
- Müller, M. 1997. What are the microsporidia. *Parasitology Today* 13(12): 455-456.
- Müller, A., Stellermann, K., Hartmann, P.I.A., Schrappe, M., Fätkenheuer, G., Salzberger, B., Diehl, V. & Franzen, C. 1999. A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6(2): 243 - 246.
- Mungthin, M., Suwannasaeng, R., Naaglor, T., Areekul, W. & Leelayoova, S. 2001. Asymptomatic intestinal in Thai orphans and child-care workers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 304-306.
- Mumcuoglu, I., Cetin, F., Dogruman Al, F., Oguz, I. & Aksu, N. 2016. Prevalence of microsporidia in healthy individuals and immunocompetent patients with acute and chronic diarrhea. *Infectious Diseases* 48(2): 133 - 137.
- Murray, L., Edwards, L., Tuppurainen, E. S., Bachanek-Bankowska, K., Oura, C. A., Mioulet, V. & King, D. P. 2013. Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Veterinary Research* 9(1):1.
- Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16: 223 - 229.
- Nagdev, K. J., Kashyap, R. S., Parida, M. M., Kapgate, R. C., Purohit, H. J., Taori, G. M. & Daginawala, H. F. 2011. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and reliable diagnosis of tuberculous meningitis. *Journal of Clinical Microbiology* 49(5): 1861 - 1865.

- Najafabadi, Z. G., Oormazdi, H., Akhlaghi, L., Meamar, A. R., Nateghpour, M., Farivar, L. & Razmjou, E. 2014. Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in human saliva and urine: loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis. *Acta Tropica* 136: 44 - 49.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. 2016. NIAID emerging infectious diseases/pathogens. <http://www.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/Pages/CatA.aspx> [2 January 2016].
- Njiru, Z. K., Mikosza, A. S. J., Armstrong, T., Enyaru, J. C., Ndung'u, J. M. & Thompson, A. R. C. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(2): e147.
- Nkouawa, A., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K. & Ito, A. 2009. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 47(1): 168 - 174.
- Norhayati, M., Al-Mekhlafi, H. M., Azlin, M., Nor Aini, U., Shaik, A., Sa'iah, A., Fatmah, M. S., Ismail, M. G., Ahmad Firdaus, M. S., Aisah, M. Y. & Rozlida, A. R. 2007. Intestinal microsporidial infections among Orang Asli (aborigine) children from Malaysia. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 101(6): 547-550.
- Norhayati, M., Azlin, M., Al-Mekhlafi, H. M., Anisah, N., Nor Aini, U., Fatmah, M. S. & Rozlida, A. R. 2008. A preliminary study on the prevalence of intestinal microsporidiosis in patients with and without gastrointestinal symptoms in Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102: 1274-1278.
- Notermans, D. W. Peek, R., de Jong, M. D., Wentink-Bonnema, E. M., Boom, R. & van Gool, T. 2005. Detection and Identification of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* species in stool and urine specimens by PCR and differential hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 43(2): 610-614.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28(12): e63.
- Optigene. 2014. Lamp designer. <http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/> [12 Mac 2014].
- Orenstein, J. M., Friedberg, Seedor, J., Friedberg, D. N., Stenson, S. M., Tierno, P. M., Charles, N. C., Meisler, D. M., Lowder, C. Y., McMahon, J. T., Longworth, D. L., Rutherford, I., Yee, R. W., Martinez, A., Tio, F., Held, K. & CDC. 1990. Epidemiologic notes and reports microsporidian keratoconjunctivitis in patients with AIDS. *MMWR*, 23 Mac: 188-189.

- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L. & Morita, K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* 18(6): 407 - 421.
- Pinnolis, M., Egbert, P. R., Font, R. L. & Winter, F. C. 1981. Nosematosis of the cornea: case report, including electron microscopic studies. *Archives of Ophthalmology* 99(6): 1044-1047.
- Plutzer, J. & Karanis, P. 2009. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitology Research* 104: 1527 - 1533.
- Pol, S., Romana, C. A., Richard, S., Amouyal, P., Desportes-Livage, I., Carnot, F., Pays, J. F. & Berthelot, P. 1993. Microsporidia infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. *The New England Journal of Medicine* 328(2):95 - 99.
- Polley, S. D., Boadi, S., Watson, J., Curry, A. & Chiodini, P. L. 2011. Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology* 60(4): 459-466.
- Polley, S. D., González, I. J., Mohamed, D., Daly, R., Bowers, K., Watson, J., Mewse, E., Armstrong, M., Gray, C., Perkins, M. D. & Bell, D. 2013. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. *Journal of Infectious Diseases* 208(4): 637 - 644.
- Polley, S. D., Mori, Y., Watson, J., Perkins, M. D., Gonzalez, I. J., Notomi, T., Chiodini, P. L. & Sutherland, C. J. 2010. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 48(8): 2866 - 2871.
- Poole, C. B., Tanner, N. A., Zhang, Y., Evans Jr., T. C. & Carlow, C. K. 2012. Diagnosis of brugian filariasis by loop-mediated isothermal amplification. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(12): e1948.
- Poon, L. L., Wong, B. W., Ma, E. H., Chan, K. H., Chow, L. M., Abeyewickreme, W., Tangpukdee, N., Yuen, K. Y., Guan, Y., Looareesuwan, S. & Peiris, J. M. 2006. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clinical Chemistry* 52(2): 303 - 306.
- PremierBiosoft. 2014. Lamp designer. <http://www.premierbiosoft.com/isothermal/lamp.html> [12 Mac 2014].
- PrimerExplorer. 2014. LAMP primer designing software. <https://primerexplorer.jp/e/> [12 Mac 2014].

- Procop, G. W. 2007. Molecular diagnosis for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clinical Infectious Diseases* 45: S99 - 111.
- Qin, C., Jian, L., Xue-En, F. & Wei, X. 2009. Rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Intervirology* 52(2): 86-91.
- Qiao, Y. M., Guo, Y. C., Zhang, X. E., Zhou, Y. F., Zhang, Z. P., Wei, H. P., Yang, R. F. & Wang, D. B. 2007. Loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores. *Biotechnol Lett* 29: 1939-1946.
- Rayan, H. Z., Ismail, O. A., El-Hamshary, E. M., Ibrahim, G. H. & Omar, S. M. 2013. Contribution of multiplex real time PCR for detection and differentiation of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal samples of immunocompromised patients. *Parasitologists United Journal* 6(1): 51 - 58.
- Ryan, N. J., Sutherland, G., Coughlan, K., Globan, M., Doultree, J., Marshall, J., Baird, R. W., Pedersen, J. & Dwyer, B. 1993. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 31(12): 3264 - 3269.
- Saah, A. J. & Hoover, D. R. 1997. "Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Annals of Internal Medicine* 126(1): 91-94.
- Sak, B., Brady, D., Pelikanova, M., Kvetonova, D., Rost, M., Kostka, M., Tolarova, V., Huzova, Z. & Kvac, M. 2011. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3): 1064 - 1070.
- Salinas, N. R. & Little, D. P. 2012. Electric LAMP: virtual loop-mediated isothermal amplification. *ISRN Bioinformatics* 2012.
- Salleh, F. M., Al-Mekhlafi, A. M., Nordin, A., Yasin, A. M., Al-Mekhlafi, H. M. & Moktar, N. 2011. Evaluation of gram-chromotrope kinyoun staining technique: effectiveness in detecting microsporidial spores in fecal specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 69: 82 - 85.
- Sarfati, C., Bourgeois, A., Menotti, J., Liegeois, F., Moyou-Somo, R., Delaporte, E., Derouin, F., Ngole, E. M. & Molina, J.-M. 2006. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74(1): 162-164.
- Schwartz, D. A., Bryan, R. T., Weber, R. & Visvesvara, G. S. 1994. Microsporidiosis in HIV positive patients: current methods for diagnosis using biopsy, cytologic, ultrastructural, immunological, and tissue culture techniques. *Folia Parasitologica* 41: 101-109.

- Sharma, S., Das, S., Joseph, J., Vemuganti, G. K. & Murthy, S. 2011. Microsporidial keratitis: need for increased awareness. *Survey of Ophthalmology* 56(1): 1-22.
- Sharpstone, D., Rowbottom, A., Francis, N., Tovey, G., Ellis, D., Barrett, M. & Gazzard, B. 1997. Thalidomide: a novel therapy for microsporidiosis. *Gastroenterology* 112: 1823 - 1829.
- Sokolova, O. I., Demyanov, A. V., Bowers, L. C., Didier, E. S., Yakovlev, A. V., Skarlato, S. O. & Sokolova, Y. Y. 2011. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology* 49(6): 2102 - 2108.
- Soliman, H. & El-Matbouli, M. 2010. Loop mediated isothermal amplification combined with nucleic acid lateral flow strip for diagnosis of cyprinid herpes virus-3. *Molecular and Cellular Probes* 24: 38 - 43.
- Sotiriadou, I. & Karanis, P. 2008. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 62: 357 - 365.
- Southern, T. R., Jolly, C. E., Lester, M. E. & Hayman, J. R. 2007. EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro. *Eukaryotic Cell* 6(8): 1354-1362.
- Sriaroon, C., Mayer, C. A., Chen, L., Accurso, C., Greene, J. N. & Vincent, A. L. 2008. Diffuse intra-abdominal granulomatous seeding as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome associated with microsporidiosis in a patient with HIV. *AIDS Patient Care and STDs* 22(8): 611 - 612.
- Suankratay, C., Thiasukhon, E., Nilaratanakul, V., Putaporntip, C. & Jongwutiwes, S. 2012. Disseminated infection caused by novel species of *Microsporidium*, Thailand. *Emerging Infectious Diseases* 18(2): 302-304.
- Subrungruang, I., Mungthin, M., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., Rangsin, R., Naaglor, T. & Leelayoova, S. 2004. Evaluation of DNA extraction and PCR methods for detection of *Enterocytozoon bienuesi* in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 42(8): 3490-3494.
- Suebsing, R., Kampeera, J., Tookdee, B., Withyachumnarnkul, B., Turner, W. & Kiatpathomchai, W. 2013. Evaluation of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* in tilapia. *Applied Microbiology* 57(4): 317 - 324.
- Surasilp, T., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Sridulyakul, P., Sithigorngul, P. & Chaivisuthangkura, P. 2011. Rapid and sensitive of *Vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to rpoS gene. *Molecular and Cellular Probes* 25: 158 - 163.

- Talabani, H. Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T. Derouin, F. & Menotti, J. 2010. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology* 48(7): 2651- 2653.
- Terada, S., Reddy, K. R., Jeffers, L. J., Cali, A., Schiff, E. R. 1987. Microsporidian and hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine* 107(1): 61-62.
- Tham, A. C. & Sanjay, S. 2012. Clinical spectrum of microsporidial keratoconjunctivitis. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 40(5): 512–518.
- Thekisoe, O. M. M., Bazie, R. S. B., Coronel-Servian, A. M., Sugimoto, C., Kawazu, S. & Inoue, N. 2009. Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. *The Journal of Veterinary Medical Science* 71(4): 471 - 475.
- Thellier, M. & Breton, J. 2008. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15: 349–358.
- Thurston-Enriquez, J. A., Watt, P., Dowd, S. E., Enriquez, R., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *Journal of Food Protection* 65(2): 378-382.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H. & Notomi, T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3(5): 877 - 883.
- Torres, C., Vitalis, E. A., Baker, B. R., Gardner, S. N., Torres, M. W. & Dzenitits, J. M. 2011. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. *BMC Bioinformatics* 12: 240 - 246.
- Tosoni, A., Nebuloni, M., Ferri, A., Bonetto, S., Antinori, S., Scaglia, M., Xiao, L., Moura, H., Visvesvara, G. S., Vago, L. & Costanzi, G. 2002. Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Modern Pathology* 15(5): 577 - 583.
- Uemura, N., Makimura, K., Onozaki, M., Otsuka, Y., Shibuya, Y., Yazaki, H., Kikuchi, Y., Abe, S. & Kudoh, S. 2008. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. *Journal of Medical Microbiology* 57: 50 - 57.
- US Environmental Protection Agency. 2016. Contaminant candidate list (CCL) and regulatory determination. <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-1-ccl-1> [10 Jun 2016].

- van Gool, T., Snijders, F., Reiss, P., Schattenkerk, J. K. M. E., van den Bergh Weerman, M. A., Bartelsman, J. F. W. M., Bruins, J. J. M., Canning, E. U. & Dankert, J. 1993. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *Journal of Clinical Pathology* 44: 694 - 699.
- van Gool, T., Vetter, J. C. M., Weinmayr, B., Dam, A. V., Derouin, F. & Dankert, J. 1997. High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *The Journal of Infectious Diseases* 175: 1020 - 1024.
- Velasquez, J. N., Carnevale, S., Guarnera, E. A., Labbe, J. H., Chertcoff, A., Cabrera, M. G. & Rodríguez, M. I. 1996. Detection of the microsporidian parasite *Enterocytozoon bienersi* in specimens from patients with AIDS by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34(12): 3230-3232.
- Verweij, J. J., & Stensvold, C. R. 2014. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews* 27(2): 371-418.
- Verweij, J. J., ten Hove, R., Brienens, E. A. & van Lieshout, L. 2007. Multiplex detection of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57(2): 163-167.
- Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., da Silva, A. J., Croppo, G. P., Moura, H., Wallace, S., Slemenda, S. B., Schwartz, D. A., Moss, D. & Bryan, R. T. 1994. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *Journal of Clinical Microbiology* 32(11): 2760 - 2768.
- Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., Pieniazek, N. J., da Silva, A. J., Wallace, S., Slemenda, S. B., Weber, R., Schwartz, D. A., Gorelkin, L., Wilcox, C. M. & Bryan, R. T. 1995. Short-term in vitro culture and molecular analysis of the microsporidian, *Enterocytozoon bienersi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42(5): 506 - 510.
- Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B. A. & Woese, C. R. 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326: 411-414.
- Wang, Z., Orlandi, P. A. & Stenger, D. A. 2005. Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology* 43(8): 4121 - 4128.
- Weber, R. & Bryan, R. T. 1994. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases* 19(3): 517 - 521.

- Weber, R., Bryan, R. T., Owen, R. I., Wilcox, C. M., Gorelekin, L. & Visvesvara, G. S. 1992. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *New England Journal of Medicine* 326(3): 161-166.
- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A. & Owen, R. L. 1994. Human microsporidial infection. *Clinical Microbiology Reviews* 7(4): 426-461.
- Weiss, L. M. 2014. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Dlm. Weiss, L. M. & Becnel, J. J. (pnyt.). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, hlm. 371-401. John Wiley & Sons, Inc.
- Wichro, E., Hoelzi, D., Krause, R., Bertha, G., Reinthaler, F. & Wenisch, C. 2005. Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73(2): 285-287.
- Yachnis, A.T., Berg, J., Martinez-Salazar, A., Bender, B.S., Diaz, L., Rojiani, A.M., Eskin, T.A. & Orenstein, J.M. 1996. Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys. Report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. *American Journal of Clinical Pathology* 106(4): 535-543.
- Yamazaki, W., Mioulet, V., Murray, L., Madi, M., Haga, T., Misawa, N., Horii, Y. & King, D. P. 2013. Development and evaluation of multiplex RT-LAMP assays for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods* 192(1):18-24.
- Yazar, S., Eser, B., Yalcin, S., Sahin, I. & Koc, A. N. 2003. A case of pulmonary microsporidiosis in an acute myeloblastic leukemia (AML) - M3 patient. *Yonsei Medical Journal* 44(1): 146 - 149.
- Yee, R. W., Tio, F. O., Martinez, J. A., Held, K. S., Shadduck, J. A. & Didier, E. S. 1991. Resolution of microsporidial epithelial keratopathy in a patient with AIDS. *Ophthalmology* 98(2): 196-201.
- Zhou, D., Guo, J., Xu, L., Gao, S., Lin, Q., Wu, Q., Wu, L. & Que, Y. 2014. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of *cry1Ac* transgenic sugarcane. *Scientific Reports* 4.
- Zhu, X., Wittner, M., Tanowitz, H. B., Kotler, D., Cali, A. & Weiss, L. M. 1993. Small subunit rRNA sequence of "*Enterocytozoon bienewsi*" and its potential diagnostic role with use of the polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases* 168(6): 1570 - 1575.

LAMPIRAN A

**PENGESAHAN KELULUSAN ETIKA OLEH JAWATANKUASA ETIKA
UKM**

**CERTIFICATE OF APPROVAL****UKM RESEARCH ETHICS COMMITTEE**

Medical Research & Innovation Secretariat, 9th Floor, Clinical Block, UKM Medical Centre
Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia
Telephone No.: +603-91455845/50473554/51187164; Fax No.: +603-91455634; Email: sppi@ppukm.ukm.edu.my

DATE OF APPROVAL : 08 April 2014

UKMREC APPROVAL NUMBER:	UKM 1.5.3.5/244/ FF-2014-211/Dr.EmeliaOsman
RESEARCH CODE:	FF-2014-211
RESEARCH TITLE:	Development Of A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay For Detection Of Microsporidia In Fecal Samples
PRINCIPAL INVESTIGATOR:	Dr. Emelia Osman
ADDRESS OF PRINCIPAL INVESTIGATOR:	Department of Parasitology & Medical Entomology Faculty of Medicine Universiti Kebangsaan Malaysia
AMOUNT OF GRANT:	Nil
SOURCE OF GRANT:	Nil
DURATION OF RESEARCH:	08 April 2014 – 07 April 2016
CO-INVESTIGATOR(S):	Dr. Alifzah Hanafiah
STUDENT(S):	Siti Nur Su'aidah Nasarudin (P73038)
LOCATION OF RESEARCH:	Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre



 Professor Dr. Mohd Rizal Abdul Manaf
 Acting Chairman
 UKM Research Ethics Committee
 The National University of Malaysia

LAMPIRAN B

SENARAI PENERBITAN DAN PERSIDANGAN

A. PENERBITAN

1. **Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Molecular Detection of *Enterocytozoon bieneusi* in Faecal Specimens**

Journal of Medical Microbiology (ISI Indeks: IF 2.269), diterbitkan pada November 2015

2. **Review: Microsporidiosis in Malaysia**

Malaysian Journal of Public Health Medicine (SCOPUS Indeks), diterima pada Disember 2016 dan dalam proses penerbitan

3. **Diagnosis of Disseminated Microsporidiosis: Detection of Circulating *Enterocytozoon bieneusi* DNA in Blood of HIV/AIDS Patients**

Tropical Biomedicine (ISI Indeks: IF 0.921), diterbitkan pada November 2016

B. PERSIDANGAN

1. **3-Minutes Oral Presentation**

51st Annual Scientific Conference of the Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine

Kuala Lumpur, 3 – 4 Mac 2015

2. **Pembentangan Poster**

52nd Annual Scientific Conference of the Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine

Kuala Lumpur, 2 – 3 Mac 2016

LAMPIRAN C

ABSTRAK DAN PENERBITAN ARTIKEL

Journal of Medical Microbiology (2015), 64, 1329–1334

DOI 10.1099/jmm.0.000156

Loop-mediated isothermal amplification for rapid molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal specimens

Siti Nur Su'aidah Nasarudin,¹ Nurul Shazalina Zainudin,¹
Mekadina Bernadus,¹ Azmawati Mohd Naw, ² Alfizah Hanafiah³
and Emelia Osman¹

Correspondence
Emelia Osman
emeliaosman79@gmail.com

¹Department of Parasitology & Medical Entomology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

²Department of Public Health, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

³Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was developed to detect *Enterocytozoon bieneusi* DNA for the first time from human faecal specimens. Four primers specific for *Enterocytozoon bieneusi* were designed corresponding to small subunit rRNA gene sequences and tested on 100 human faecal specimens. Thirty-nine of the faecal specimens (39%) were confirmed positive for *Enterocytozoon bieneusi* by LAMP compared with 33% by PCR and 32% by light microscopy. LAMP yielded 94% sensitivity and 88% specificity compared with microscopy (sensitivity 48%, specificity 76%). No significant differences in positive detection of *Enterocytozoon bieneusi* were found among the three methods ($P > 0.05$). However, LAMP has shown a substantial agreement with PCR ($\kappa = 0.78$) and fair agreement was demonstrated between microscopy and PCR ($\kappa = 0.25$). In conclusion, the LAMP assay proved to be useful as a simplified, rapid, sensitive and specific alternative molecular screening tool in the diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal specimens.

Received 13 May 2015
Accepted 11 August 2015

Loop-mediated isothermal amplification for rapid molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal specimens

Siti Nur Su'aidah Nasarudin,¹ Nurul Shazalina Zainudin,¹
Mekadina Bernadus,¹ Azmawati Mohd Nawi,² Alfizah Hanafiah³
and Emelia Osman¹

Correspondence

Emelia Osman
emeliaosman79@gmail.com

¹Department of Parasitology & Medical Entomology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

²Department of Public Health, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

³Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was developed to detect *Enterocytozoon bieneusi* DNA for the first time from human faecal specimens. Four primers specific for *Enterocytozoon bieneusi* were designed corresponding to small subunit rRNA gene sequences and tested on 100 human faecal specimens. Thirty-nine of the faecal specimens (39 %) were confirmed positive for *Enterocytozoon bieneusi* by LAMP compared with 33 % by PCR and 32 % by light microscopy. LAMP yielded 94 % sensitivity and 88 % specificity compared with microscopy (sensitivity 48 %, specificity 76 %). No significant differences in positive detection of *Enterocytozoon bieneusi* were found among the three methods ($P>0.05$). However, LAMP has shown a substantial agreement with PCR ($\kappa=0.78$) and fair agreement was demonstrated between microscopy and PCR ($\kappa=0.25$). In conclusion, the LAMP assay proved to be useful as a simplified, rapid, sensitive and specific alternative molecular screening tool in the diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal specimens.

Received 13 May 2015

Accepted 11 August 2015

INTRODUCTION

With a unique mechanism of host-cell infection, microsporidia have emerged as a group of human opportunistic pathogens most commonly infecting immunocompromised patients. The first human case of microsporidial infection was reported in 1959, and these parasites gained attention after 1985 when *Enterocytozoon bieneusi* was found in a human immunodeficiency virus-infected patient (Franzen & Müller, 2001). Since then, about 14 species of microsporidia have been reported infecting humans, of which *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* are responsible for most infections, with *Enterocytozoon bieneusi* being the most prevalent species detected in most studies performed (Matos *et al.*, 2012).

Abbreviations: GCK, Gram-chromotrope Kinyoun; LAMP, loop-mediated isothermal amplification.

The GenBank accession numbers for the SSU rRNA gene sequences of *Enterocytozoon bieneusi* reported in this paper are AF101198, KF271515.1, KF271513.1 and KF271512.1.

Light microscopy is widely used for routine diagnosis to detect microsporidia in stool samples. Nonetheless, interpretation of the slides can be difficult due to varying staining quality and the small size of these pathogen spores (Didier *et al.*, 2004). Moreover, the detection of microsporidium requires experienced microscopists and does not allow specific species identification, which is essential to determine suitable treatment. Albendazole is effective against most microsporidium species, particularly *Encephalitozoon* spp., infection, but has minimal efficacy against *Enterocytozoon bieneusi* (Botterel *et al.*, 2002). Transmission electron microscopy, which can provide species-specific diagnosis in faecal specimens (Kumar *et al.*, 2005), is expensive, time-consuming and insensitive for use in routine diagnosis. PCR methods have been successfully developed to detect microsporidial infections and are used mainly for further confirmation (Chabchoub *et al.*, 2009). Even so, PCR assays are time-consuming, can be prone to contamination and in particular they require expensive equipment; thus, their routine implementation is not practicable for laboratories in developing countries (Parida *et al.*, 2008; Verweij *et al.*, 2007).

Recently, a novel nucleic acid amplification method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), has been introduced, which was originally developed by Notomi *et al.* (2000). This method is highly sensitive and specific compared with PCR, and can amplify up to 10^9 copies of DNA in less than 1 h under isothermal conditions (Parida *et al.*, 2008). Since its publication, many LAMP methods have been developed for identification of viruses, bacteria, parasites and fungi (Endo *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2009). In this study, a LAMP assay was developed for detection of microsporidia in faecal samples. To the best of our knowledge, this is the first report on detection of *Enterocytozoon bienersi* in stools by the LAMP method.

METHODS

Sample source. One hundred faecal samples from healthy, asymptomatic aborigines from various parts of Peninsular Malaysia, which were readily available in the Parasitology & Medical Entomology Department, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre (UKMMC), were used in this study. These samples were collected previously for research on intestinal parasitic infection, which was approved by the Ethics Committee of UKMMC, with written consent obtained from each participant.

Microscopic examination. All faecal samples were screened for the presence of microsporidium spores by microscopy by using the Gram-chromatrope Kinyoun (GCK) staining method as described by Salleh *et al.* (2011) and observed under $\times 100$ magnification by light microscopy.

DNA extraction. A positive *Enterocytozoon bienersi* clinical faecal sample was extracted using a commercial kit (QIAamp DNA Stool Mini kit; Qiagen), following the manufacturer's instructions. The purity of extracted DNA was measured using a Nanodrop 2000c (Thermo Scientific), in which the absorbance ratio was 1.88 (A_{260}/A_{280}). The DNA was amplified by PCR (da Silva *et al.*, 1996) using primers EBIEF1 (5'-GAACTTGTCCTCCTTACG-3') and EBIER1 (5'-CCATGCACCACTCCTGCCATT-3') to produce a 607 bp DNA fragment of the small subunit rRNA gene of *Enterocytozoon bienersi*. The amplified product was confirmed by sequencing. The gene matched the sequence of GenBank accession no. KF271515.1. Thus, this sample was used as the positive control in this study.

DNA from 100 faecal samples was also prepared using the same commercial kit in accordance with the manufacturer's instructions. The purity of DNA was measured and was found to be satisfactory with an A_{260}/A_{280} ratio within the range of 1.7–2.0 in all DNA samples.

Conventional PCR. PCR amplification was performed using primer pair EBIEF1/EBIER1 and HelixAmp *Taq* Polymerase (NanoHelix). The reaction was carried out in 25 μ l reaction mixtures under the following conditions: 10 μ M each primer, 10 mM dNTP mix, $10 \times$ PCR buffer, 1.25 U *Taq* DNA polymerase, 5 μ l DNA and distilled water. After initial denaturation of the DNA at 94 °C for 5 min, 35 cycles were run of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 90 s, with a 10 min 72 °C extension (da Silva *et al.*, 1996). The amplified product was analysed on a 2 % agarose gel together with a DNA ladder (Norgen Biotek). PCR-positive samples were sent for sequencing for further confirmation. The sequences were compared with *Enterocytozoon bienersi* sequences available in GenBank using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

LAMP. LAMP primers were designed using LAMP Designer software version 1.10 (PREMIER Biosoft) on the small subunit rRNA sequence of *Enterocytozoon bienersi* (GenBank accession no. AF101198). The four primers are shown in Table 1. The LAMP reaction was performed with a Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical Co.). The reaction was carried out in a 25 μ l volume containing 40 μ M each FIP and BIP primer, 20 μ M each F3 and B3 primer, 12.5 μ l $2 \times$ reaction mixture, 8 U *Bst* DNA polymerase, 2 μ l DNA, distilled water and 1 μ l fluorescent detection reagent for visual fluorescence detection. The mixture was incubated at 60 °C using a conventional heating block for 1 h.

Detection of LAMP products. Two detection methods were used to analyse the LAMP products: visual observation with fluorescent detection reagent and gel electrophoresis. By naked eye visualization, a change of colour from reddish orange to green was recorded and the fluorescence detection was carried out under UV light. The LAMP products were run on a 2 % agarose gel following restriction enzyme digestion with *Mae*II to generate the predicted fragments of 200 and 55 bp.

Analytical sensitivity and specificity of LAMP. To determine the analytical sensitivity of the LAMP assay, the positive faecal sample was concentrated by a modified water/ether sedimentation protocol as described by Müller *et al.* (1999). The pellet was diluted in 200 μ l distilled water and serially diluted 10-fold. A part of each dilution was used for GCK staining, followed by modified quantitative spore counts (Goodgame *et al.*, 1999). Ten fields were randomly selected to count the spores at $\times 100$ magnification. The step was repeated three times with another 10 different fields for each counting. The mean of the three counts was converted to spores per 20 μ l. Dilutions of the homogenized faeces were produced to give different spore counts of 10, 7, 5 and 0 spores per 20 μ l.

The genomic DNA was extracted from the 200 μ l solution of each dilution using a QIAamp DNA Stool Mini kit following the manufacturer's instructions. All extraction products were subjected to PCR and LAMP assays to determine and compare the sensitivity.

Genomic DNA extracted from *Acanthamoeba* spp., *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica*, hookworm, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* and *Giardia intestinalis* was used to determine the specificity of the LAMP assay.

Clinical sensitivity and specificity of LAMP. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were evaluated as described by Nagdev *et al.* (2011) using PCR as the reference test.

Statistical analysis. The diagnostic agreement between microscopy, PCR and LAMP assays was calculated using the κ statistic and expressed as a κ value. A χ^2 test was used to determine the significance of the difference between these methods.

Table 1. Sequence of four LAMP primers (based on GenBank accession no. AF101198)

Primer	Sequence (5'→3')
F3	TCGGAATGTATGGTAGGTGA
B3	CGACGGATCCAAGTGATC
BIP	TTGGTACGTGATGGTTGGATGGGCAACCTCCGATTTCCT
FIP	GGAACCACTCTAACTCACTGCTGTAGGCGTGAGAGTGTAT

RESULTS

Screening of the faecal samples by light microscopy showed microsporidian spores in 32 samples (32 %). The microsporidian spores appeared as pinkish blue with a belt-like stripe, known as the polar tube, in the middle of the spores (Salleh *et al.*, 2011). All samples were then subjected to PCR and LAMP assays. Out of 100 stool samples, 33 were positive for *Enterocytozoon bieneusi* by PCR (33 %), whereas LAMP detected 39 samples as positive (39 %).

Positive *Enterocytozoon bieneusi* amplification through PCR showed bands at approximately 607 bp (data not shown). All LAMP reactions were visualized under normal and UV light before being subjected to gel electrophoresis. Under normal light, the positive amplified LAMP products changed from reddish orange to a green colour, whereas negative LAMP results remained the same. Under UV light, all positive reactions turned bright green (Fig. 1). Moreover, when positive reactions were subjected to gel electrophoresis, a ladder-like pattern of multiple bands was observed (Fig. 2). The specificity of the amplification was further confirmed by restriction enzyme digestion of the LAMP products. As shown in Fig. 3, the results of digestion products were in good agreement as the sizes of the fragments generated were ~190 and 60 bp.

To evaluate the sensitivities of the PCR and LAMP methods, samples with known spore concentrations were used. The results showed that LAMP could detect *Enterocytozoon bieneusi* at concentrations as low as seven spores per 20 µl, while the sensitivity of the PCR was also equivalent to seven spores per 20 µl. This LAMP assay was also tested using several other genomic DNAs. No amplification was observed with DNA samples from *Acanthamoeba* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, hookworm, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *G. intestinalis* (Fig. 4).

The sensitivity and specificity of the LAMP assay and light microscopy in this study are shown in Table 2. Comparing the results for LAMP and PCR, 33 samples were positive for *Enterocytozoon bieneusi* by PCR and 31 samples were positive by the LAMP assay (94 % sensitivity). Out of 67 PCR-negative samples, eight were positive by LAMP (88 % specificity). In contrast, microsporidian spores were detected by microscopy in 16 out of the 33 PCR-positive samples (48 % sensitivity), while 16 of the 67 specimens that were negative by PCR were detected as positive by

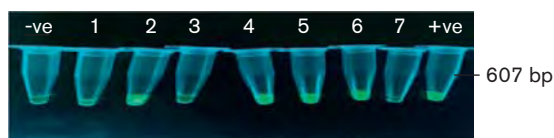


Fig. 1. Amplified LAMP products visualized under UV light. Samples 2, 4–6 and the positive control (+ve) turned bright green, indicating a positive reaction. –ve, Negative control.

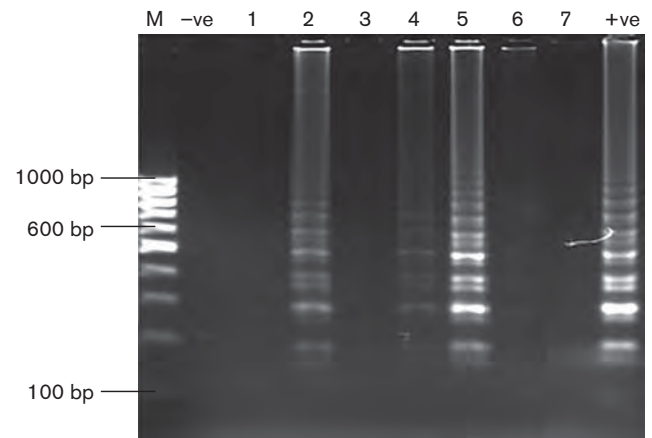


Fig. 2. Electrophoresis of LAMP products amplified from *Enterocytozoon bieneusi* DNA. Lanes: M, 100 bp DNA ladder; –ve, negative control (distilled water); 1–7, DNA samples; +ve, positive control.

microscopy (76 % specificity). Based on the sequencing results, the two samples that were PCR-positive but LAMP-negative were matched to the published *Enterocytozoon bieneusi* sequences in the database (99 % identical to GenBank accession nos KF271513.1 and KF271512.1).

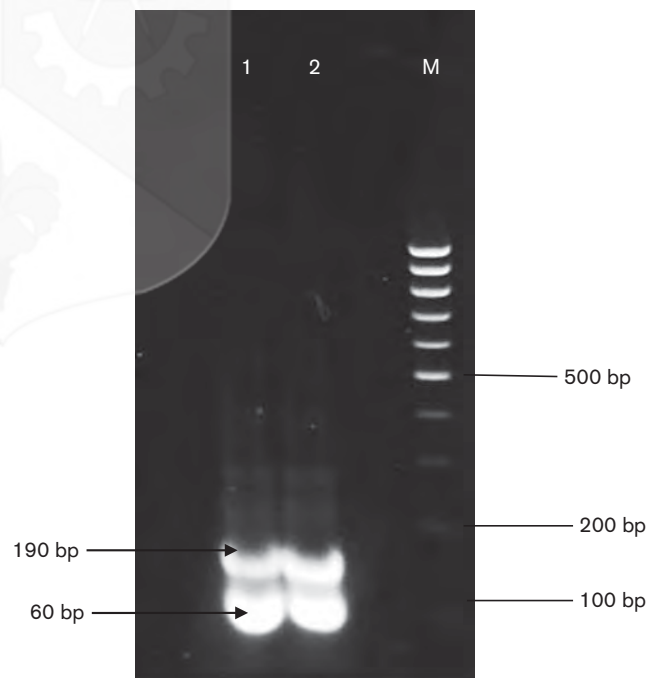


Fig. 3. Restriction analysis of *Enterocytozoon bieneusi* LAMP products amplified from faecal specimens. Lanes: 1, positive control; 2, one sample positive for *Enterocytozoon bieneusi* from the previous LAMP. *Maell* digestions of *Enterocytozoon bieneusi* products were at the expected sizes of approximately 190 and 60 bp.

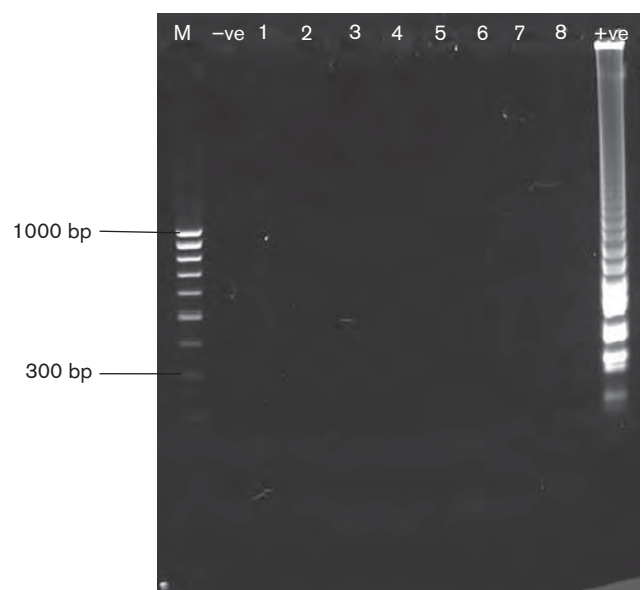


Fig. 4. Electrophoresis of LAMP test on the non-target parasites. Lanes: M, 100 bp DNA ladder; -ve, negative control (distilled water); 1, *Ascaris lumbricoides*; 2, *Trichuris trichiura*; 3, hookworm; 4, *G. intestinalis*; 5, *Toxoplasma gondii*; 6, *Entamoeba histolytica*; 7, *Entamoeba dispar*; 8, *Acanthamoeba* spp.; +ve, positive control.

Additionally, a χ^2 test and κ statistics were computed to determine the diagnostic agreement between PCR, LAMP and light microscopy. As shown in Table 2, these three methods were considered not to be significantly different ($P>0.05$). However, there was substantial agreement between LAMP and PCR, while some agreement was demonstrated between light microscopy and PCR.

DISCUSSION

Three different detection methods (PCR, LAMP and microscopy) were evaluated to determine and compare their sensitivity and specificity in detecting *Enterocytozoon bieneusi* in stool samples. LAMP was successfully developed and exhibited amplification of *Enterocytozoon bieneusi* DNA within 1 h at 60 °C, resulting in a 39 % positivity rate.

Based on the results, the lowest detection limit shown by both assays was seven spores per 20 μ l. Although the minimum detection limit was equivalent, the LAMP assay was much more feasible to perform compared with the PCR assay. This LAMP assay required only 1 h of amplification at one constant temperature, whereas PCR required approximately 2 h to complete all the cycles. The LAMP assay also showed no amplification and no cross-reactivity with different DNA samples from parasites. The increase in sensitivity and specificity shown by LAMP compared with the PCR assay was due to the four primers used in this amplification and also to the DNA strand-displacement activity of the *Bst* enzyme, which can produce large amounts of DNA in isothermal conditions (Nagamine *et al.*, 2002). The amplification efficiency of LAMP is extremely large because the assay requires less time to complete compared with a PCR protocol (Fakruddin, 2011).

The LAMP assay yielded a sensitivity and specificity of 94 % and 88 %, respectively, while microscopy yielded a lower sensitivity and specificity (48 % and 76 %). Moreover, a substantial agreement was found between the PCR and LAMP assays, suggesting LAMP as a potential alternative technique to microscopy that may be applied in routine diagnostic laboratories to improve the sensitivity and specificity of diagnosis. Even though the sensitivity and specificity of the microsporidial LAMP were high, several false-positive and false-negative results were also obtained using this assay. Thus, analysis using sequencing and restriction enzymes would provide a great help in distinguishing between these results and contamination (Nagdev *et al.*, 2011). Therefore, further analysis between these LAMP-negative but PCR-positive samples was done by sequencing. By performing BLAST, identification of these samples was matched with the closest *Enterocytozoon bieneusi* sequences in the database, thus indicating false-negative amplification. The samples that were LAMP-positive but negative by PCR may be due to the presence of inhibitors in the samples, which are known to have a stronger inhibitory effect on the polymerases used in PCR than on the *Bst* enzyme used in LAMP. Nonetheless, further study needs to be undertaken by incorporating internal amplification controls to determine whether there is any inhibition occurring in the PCR and LAMP assays that may be responsible for these results (Nagdev *et al.*, 2011).

Table 2. Diagnostic performance of the LAMP assay and microscopy for the detection of *Enterocytozoon bieneusi* from human faecal specimens using PCR as the reference test

Method and result	PCR (+ve) (n=33)	PCR (-ve) (n=67)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Statistical analysis (χ^2 test)	κ value (95% confidence interval)
Microscopy (+ve)	16	16	48	76	50	75	$P=0.530$	Microscopy and PCR: 0.25 κ (0.049–0.447)
Microscopy (-ve)	17	51						
LAMP (+ve)	31	8	94	88	79	97		LAMP and PCR: 0.78 κ (0.658–0.910)
LAMP (-ve)	2	59						

Using microscopy, researchers can detect the spores but not the species. The presence of other small organisms, for example, bacterial and fungal spores, can lead to false-positive results (Rayan *et al.*, 2013; Salleh *et al.*, 2011). Therefore, a molecular technique is needed to further confirm the infections. In contrast, LAMP also demonstrated high sensitivity and specificity in several protozoan studies. Successful amplification of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* and *Plasmodium falciparum* showed a sensitivity of 87.5, 90.7 and 95.8 %, respectively, and a specificity of 100 for all (Lau *et al.*, 2010; Ghayour Najafabadi *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2012). The LAMP assay has also been successfully developed to detect other parasites in different types of clinical samples, such as human saliva, buffy coats, urine and blood (Ghayour Najafabadi *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012).

The combination of isothermal conditions and the *Bst* polymerase in the LAMP assay showed resistance to inhibitors that usually hinder the later stages of conventional PCR (Khan *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2001). LAMP reagents and *Bst* polymerase are also relatively stable even if kept at 25 and 37 °C (Thekisoe *et al.*, 2009), and only a conventional heating block is required to perform this assay. The requirement for an electrical supply for the heating block can be changed to an alternative power source such as a battery to suit its application (Khan *et al.*, 2012). A water bath could also be used; however, it is recommended that the tubes be wrapped in parafilm to avoid contamination (Khan *et al.*, 2012) as LAMP assays can sometimes lead to false-positive amplification due to the very high specificity and sensitivity (Zhou *et al.*, 2014). These results indicate the possibility of the application of LAMP assays in field conditions and resource-poor laboratories. There are also a few limitations for LAMP, by which the selected primers should be designed appropriately and the target DNA should be less than 300 bp (Notomi *et al.*, 2000; Sotiropoulos & Karanis, 2008) because the amplification will yield poor results if the target size is greater than 500 bp (Lau *et al.*, 2011).

In conclusion, the developed LAMP assay is a promising technique for application in diagnostic laboratories for the detection of microsporidia in clinical specimens. Species identification using the LAMP assay is important for suitable treatment, given that albendazole is less effective in treating *Enterocytozoon bienewsi* infection compared with other microsporidial species. Nitazoxanide therapy was proven to be clinically effective against *Enterocytozoon bienewsi* infection by Bicart-Sée *et al.* (2000). Therefore, this drug has been suggested for use as an alternative treatment for *Enterocytozoon bienewsi* infection. The simplicity, rapidity and flexibility of the reagents and application make this technique favourable to be performed as an alternative in developing countries with limited access to advanced technology and expertise. The high sensitivity and specificity of the LAMP assay shown in this study are suitable for the rapid screening of *Enterocytozoon bienewsi* diagnosis as an alternative to PCR.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Universiti Kebangsaan Malaysia, UKM Fundamental Grant, FF-2014-2011. We thank the staff from the Department of Biochemistry, Universiti Kebangsaan Malaysia, and Mohd Asif Sukri for providing assistance in this study.

REFERENCES

- Bicart-Sée, A., Massip, P., Linas, M.-D. & Datry, A. (2000). Successful treatment with nitazoxanide of *Enterocytozoon bienewsi* microsporidiosis in a patient with AIDS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 167–168.
- Botterel, F., Minozzi, C., Vittecoq, D. & Bourée, P. (2002). Pulmonary localization of *Enterocytozoon bienewsi* in an AIDS patient: case report and review. *J Clin Microbiol* **40**, 4800–4801.
- Chabchoub, N., Abdelmalek, R., Mellouli, F., Kanoun, F., Thellier, M., Bouratbine, A. & Aoun, K. (2009). Genetic identification of intestinal microsporidia species in immunocompromised patients in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* **80**, 24–27.
- da Silva, A. J., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., de Moura, H., Siemenda, S. B., Pieniazek, N. J. & Sensitive, P. C. R. (1996). Diagnosis of infections by *Enterocytozoon bienewsi* (Microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *J Clin Microbiol* **34**, 986–987.
- Didier, E. S., Stovall, M. E., Green, L. C., Brindley, P. J., Sestak, K. & Didier, P. J. (2004). Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* **126**, 145–166.
- Endo, S., Komori, T., Ricci, G., Sano, A., Yokoyama, K., Ohori, A., Kamei, K., Franco, M., Miyaji, M. & Nishimura, K. (2004). Detection of *gp43* of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiol Lett* **234**, 93–97.
- Fakruddin, M. (2011). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) – an alternative to polymerase chain reaction (PCR). *Bangladesh Res Publ J* **5**, 1998–2003.
- Franzen, C. & Müller, A. (2001). Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect* **3**, 389–400.
- Ghayour Najafabadi, Z., Oormazdi, H., Akhlaghi, L., Meamar, A. R., Nateghpour, M., Farivar, L. & Razmjou, E. (2014). Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in human saliva and urine: loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis. *Acta Trop* **136**, 44–49.
- Goodgame, R., Stager, C., Marcantel, B., Alcocer, E. & Segura, A. M. (1999). Intensity of infection in AIDS-related intestinal microsporidiosis. *J Infect Dis* **180**, 929–932.
- Khan, M. G. M., Bhaskar, K. R. H., Salam, M. A., Akther, T., Pluschke, G. & Mondal, D. (2012). Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasit Vectors* **5**, 280.
- Kumar, S. S., Ananthan, S. & Joyee, A. G. (2005). Detection of *Enterocytozoon bienewsi* (Microsporidia) by polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primer in stool samples of HIV patients. *Indian J Med Res* **121**, 215–219.
- Lau, Y. L., Meganathan, P., Sonaimuthu, P., Thiruvengadam, G., Nissapatorn, V. & Chen, Y. (2010). Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. *J Clin Microbiol* **48**, 3698–3702.
- Lau, Y. L., Fong, M. Y., Mahmud, R., Chang, P. Y., Palaeya, V., Cheong, F. W., Chin, L. C., Anthony, C. N., Al-Mekhlafi, A. M. & Chen, Y. (2011). Specific, sensitive and rapid detection of human

Plasmodium knowlesi infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in blood samples. *Malar J* **10**, 197.

Matos, O., Lobo, M. L. & Xiao, L. (2012). Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* infection in humans. *J Parasitol Res* **2012**, 981424.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 150–154.

Müller, A., Stellermann, K., Hartmann, P., Schrappe, M., Fätkenheuer, G., Salzberger, B., Diehl, V. & Franzen, C. (1999). A powerful DNA extraction method and PCR for detection of microsporidia in clinical stool specimens. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**, 243–246.

Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* **16**, 223–229.

Nagdev, K. J., Kashyap, R. S., Parida, M. M., Kapgate, R. C., Purohit, H. J., Taori, G. M. & Dagainwala, H. F. (2011). Loop-mediated isothermal amplification for rapid and reliable diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* **49**, 1861–1865.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **28**, E63.

Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L. & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol* **18**, 407–421.

Qiao, Y.-M., Guo, Y.-C., Zhang, X.-E., Zhou, Y.-F., Zhang, Z.-P., Wei, H. P., Yang, R.-F. & Wang, D. B. (2007). Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores. *Biotechnol Lett* **29**, 1939–1946.

Qin, C., Jian, L., Xue-En, F. & Wei, X. (2009). Rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Intervirology* **52**, 86–91.

Rayan, H. Z., Ismail, O. A., El-Hamshary, E. M., Ibrahim, G. H. & Omar, S. M. (2013). Contribution of multiplex real time PCR for detection and differentiation of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal samples of immunocompromised patients. *Parasitol United J* **6**, 51–58.

Salleh, F. M., Al-Mekhlafi, A. M., Nordin, A., Yasin, M., Al-Mekhlafi, H. M. & Moktar, N. (2011). Evaluation of Gram-chromotrope Kinyoun staining technique: its effectiveness in detecting microsporidial spores in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **69**, 82–85.

Sotiriadou, I. & Karanis, P. (2008). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis* **62**, 357–365.

Thekisoe, O. M. M., Bazie, R. S. B., Coronel-Servian, A. M., Sugimoto, C., Kawazu, S. & Inoue, N. (2009). Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude *Trypanosome* DNA templates. *J Vet Med Sci* **71**, 471–475.

Verweij, J. J., Ten Hove, R., Brienens, E. A. T. & van Lieshout, L. (2007). Multiplex detection of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**, 163–167.

Zhou, D., Guo, J., Xu, L., Gao, S., Lin, Q., Wu, Q. & Wu, L. Y. (2014). Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of *cryIAc* transgenic sugarcane. *Sci Rep*, **4**, 4912.

LAMPIRAN D

JUJUKAN SUBUNIT KECIL rRNA *E. bienersi* AF101198

Enterocytozoon bienersi genotype B small subunit ribosomal RNA, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AF101198.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to...](#)

LOCUS AF101198 484 bp DNA linear PLN 09-DEC-1998
DEFINITION Enterocytozoon bienersi genotype B small subunit ribosomal RNA, partial sequence; internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AF101198

VERSION AF101198.1 GI:3983268

KEYWORDS

SOURCE

ORGANISM

Enterocytozoon bienersi
Enterocytozoon bienersi
Eukaryota; Fungi; Microsporidia; Enterocytozoonidae;
Enterocytozoon.

REFERENCE 1 (bases 1 to 484)

AUTHORS Rinder, H., Katwinkel-Wladarsch, S. and Loscher, I.

TITLE Evidence for the existence of genetically distinct strains of

Enterocytozoon bienersi

JOURNAL Parasitol. Res. 83 (7), 676-672 (1997)

FORMED 9/27/2006

REFERENCE 2 (bases 1 to 484)

AUTHORS Rinder, H., Katwinkel-Wladarsch, S. and Loscher, I.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (26-OCT-1998) Dept. of Infectious Diseases and Tropical Medicine, University of Munich, Leopoldstrasse 5, Munich D-80802, Germany

FEATURES

source
1..484
/organism="Enterocytozoon bienersi"
/mol_type="genomic DNA"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:31281"
/note="genotype: B"
<1..106
/product="small subunit ribosomal RNA"
107..349
/product="internal transcribed spacer"
350..>484
/product="large subunit ribosomal RNA"

rRNA
.....

misc DNA
.....

rDNA
.....

ORIGIN

1 ttcagatggt catagggatg aagagcttcg gctcgaata tctatggcta gataaagtac
61 aagtcgtaac aaggtctcag ttggagaaac agtgaagga tcaattctcg ttctggggtc
121 gtgggtatcg gaatgatgg taggtgatgt gtgtgtgat gggggatgac gaagggaaca
181 gcatgtgggt ggtcgtgcta ggtctgagcg tgcattctga aggttgaggg atgtgggtgc
241 agtgaagtac agtggttccc atgggaata gtgggatggg taccgtatgg ttggatgggg
301 gaatacagcg tgcattggcg aggaatacgg gaggttgagg tgcagacggc agtaggggga
361 catcaagagg tgcattggga ataccctca ataccagatc acttgagatc gtccggcatg
421 acgagcgcga aagatgcga aaagtcttcg cggatgcgc taattatgag atattctcat

LAMPIRAN E

SUSUNAN JUJUKAN UNTUK ENZIM PENYEKATAN

JUJUKAN AF101198 (5'-3')

TTCAGATGGT CATAGGATG AAGAGCTTCG GCTCTGAATA TCTATGGCTA
GATAAAGTAC

AAGTCGTAAC AAGGTTTCAG TTGGAGAACC AGCTGAAGGA
TCATTTTCAG TTTTGGGGT

GTGGGTATCG ^{F3} GAATGTATGG TAGGTGATGT GTGTGTGTAT
GGGGGATGCC GAGGGGACCA

GCAGTGCGGT ^{F2} GGTGTGTGTA GCGTGAGAG TGTATCTGCA
AGGGTGAGGG ATGTGGGTGC

^{F1c} AGTGAGTTAG ^{MaeII B1c} AGGTGGTTCC ATGTGGAATA GTGGGATTGG
TACGTGATGG TTGGATGGGG

GAATGATGTG ^{B2} TGTATGGGTG AGGAAAATCG GAGGTTGCGG
TGCGAGCGGC AGTAGGGTGC

CATCAAGAGG ^{B3} TGTATTTGGA AATATCCCTA ATACAGGATC
ACTTGGATCC GTCGGCGATG

ACGAGCGCGA AAGAATGCGA AAAGTCCTCA CGGAATGCTC
TAATTATGAG ATAATCTCAT GGAT

JUJUKAN SONGSANG PELENGKAP AF101198 (5' – 3')

ATCC ATGAGATTAT CTCATAATTA GAGCATTCCG TGAGGACTTT
TCGCATTCTT TCGCGCTCGT

B3

CATCGCCGAC GGATCCAAGT GATCCTGTAT TAGGGATATT
TCCAAATACA CCTCTTGATG

B2

GCACCCTACT GCCGCTCGCA CCGCAACCTC CGATTTTCCT CACCCATACA
CACATCATTC

B1c

F1c

CCCCATCCAA CCATCACGTA CCAATCCCAC TATTCCACAT
GGAACCACCT CTAACCTCACT

F2

GCACCCACAT CCCTCACCTT TGCAGATACA CTCTCACGCC
TACACACACC ACCGCACTGC

F3

TGGTCCCCTC GGCATCCCCC ATACACACAC ACATCACCTA
CCATACATTC CGATACCCAC

ACCCCAAAAA CTGAAAATGA TCCTTCAGCT GGTTCCTCAA
CTGAAACCTT GTTACGACTT

GTACTTTATC TAGCCATAGA TATTCAGAGC CGAAGCTCTT CATCCTATG
ACCATCTGAA

B+: B1c, B2, gap, B1

TTGG TACGTGATGG TTGGATGG GCAACCTC CGATTTTCCT
CACCCATACA CACATCATTC CC AACCATGCACTACCAACCTACC

+: B1, F1c

AACCATGCACTACCAACCTACC GGAACCACCT CTAACTCACTGC

F+: F1c, Gap, F2c, F1

GGAACCACCT CTAACTCACTGC GACGTTCCCACTCCC TACACCCA AC
ATCCGCACTC TCACATA CCT TGGTGGAGAT TGAGTGACG

- : complementary sequence

TTGGTTACGTGATGGTTGGATGGCCTTGGTGGAGATTGAGTGACG

B-: B1c, gap, B2c, B1

TTGG TACGTGATGG TTGGATGG CCCTTACTACACACATACCCAC
CGTTGGAGGCTAAAAGGA AACCATGCACTACCAACCTACC

+:

AACCATGCACTACCAACCTACC GGAACCACCT CTAACTCACTGC