

Efektivitas Antigen Lokal LPS *Salmonella* Typhi untuk Serodiagnosis Demam Tifoid dengan Metode *ELISA* dan *Passive Bacterial Agglutination* (PBA)

Helmy Widyastuti

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

Universitas Hasanuddin, Makassar 90245

email: helmywidyastuti@gmail.com

Abstrak

Demam tifoid sebagai penyakit sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella* Typhi yang hingga saat ini masih merupakan problem kesehatan masyarakat umum, utamanya di negara-negara yang sedang berkembang dimana tifoid masih endemik, termasuk Indonesia. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya yakni karena terbatasnya sarana diagnosis yang menyebabkan terlambatnya pasien untuk mendapatkan pengobatan yang cepat sehingga meningkatkan resiko yang disebabkan oleh penyakit ini. Pada umumnya terdapat kendala pada serodiagnosis yakni sulitnya memperoleh antigen standar sehingga dilakukan upaya mencari antigen alternatif berupa antigen lokal yang dapat dijadikan sebagai antigen standar. Dalam studi ini kami menggunakan antigen lokal *S. Typhi* dari penderita demam tifoid yang berada di Makassar. Kami mengumpulkan sampel serum dari 50 suspek demam tifoid yang diperoleh dari Rumah Sakit Umum DR. Wahidin Sudiro Husodo, Rumah Sakit Umum Daya, Rumah Sakit Umum Gowa, dan PUSKESMAS Kassi-Kassi di Makassar, Sulawesi Selatan. Penderita dikelompokkan berdasarkan jenis kelamin, lamanya demam, dan umur. Studi ini bertujuan untuk melihat efektivitas antigen lokal *S. Typhi* untuk bereaksi dengan antibodi spesifik demam tifoid (IgM) melalui metode *ELISA* dan *Passive Bacterial Agglutination* (PBA) dari sampel serum suspek demam tifoid yang sebelumnya telah diuji dengan kultur darah sebagai uji standar baku (*gold standard*). Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan *cross tabulation and chi-square* (CI = 95%). Hasil studi ini menunjukkan bahwa antigen yang diperoleh dari isolat *S. Typhi* di Makassar dapat dijadikan sebagai standar antigen untuk mendeteksi adanya produksi antibodi spesifik IgM dari penderita demam tifoid.

Kata kunci : antigen LPS, *ELISA*, *Passive Bacterial Agglutination* (PBA), *Salmonella* Typhi

Abstract

Typhoid fever, as a systemic disease caused by *Salmonella* Typhi, is still a global health public problem until now, especially in endemic area of developing countries, including Indonesia. This is caused by several factors. One of those factors is limited means of diagnosis that led patient got treatment lately thereby increasing the risk of this disease. Generally, there is obstacle of serodiagnosis, i.e difficult to obtain the standard antigen. in this study we used local antigen as an alternative of standard antigen. The local antigen we used came from *Lipopolysaccharide* (LPS) local isolate *Salmonella* Typhi from Makassar. We collected serum sample of 50 suspected typhoid fever from DR. Wahidin Sudirohusodo General Hospital, Daya General Hospital, Gowa General Hospital and Kassi-Kassi Public Health Center in Makassar, South of Sulawesi. They were grouped based on sex, duration of fever, and age. The aim of this study

was to know the effectiveness of local antigen in detecting the production of specific antibody IgM by using ELISA and PBA method. The samples was confirmed by blood culture (gold standard). The data were analyzed statistically using cross tabulation and chi-square = (CI 95%).The results of this study indicate that the antigens obtained from isolates of S.Typhi in Makassar can serve as the standard antigens to detect any specific IgM antibody production from typhoid fever patients.

Key words : LPS antigen, ELISA, Passive Bacterial Agglutination (PBA), Salmonella Typhi

Pendahuluan

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi bakteri yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella Typhi*, dimana penyebarannya terjadi melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi (Sharma and Mridul, 2013). Studi terbaru memperkirakan bahwa terdapat sekitar 10-20 juta kasus tifoid setiap tahun, menyebabkan 100.000-200.000 kematian (Antillón et al., 2017; Mogasale et al., 2014). Penyakit ini terjadi di beberapa negara yang sedang berkembang diantaranya negara dengan sistem kesehatan yang rendah (Lozano et al., 2012) dan area endemik dengan resiko penyebaran strain *multiantibiotic-resistant* yang meningkat karena adanya urbanisasi, migrasi, travelling dan perdagangan (Jensenius et al., 2013; Leder et al., 2013; Rahman, et al., 2013).

Diagnosis laboratorium terhadap demam tifoid bergantung pada isolasi *Salmonella Typhi* dari sampel klinis (kultur darah maupun kuktur tinja) atau deteksi peningkatan titer antibodi serum dengan menggunakan uji berbasis agglutinasi, seperti uji Widal atau *passive hemagglutination assay* (PHA). Metode kultur darah yang telah digunakan selama satu abad merupakan *gold standard* untuk diagnosis demam tifoid. Namun dilaporkan bahwa metode ini tidak mengalami perkembangan dalam hal tingkat deteksinya. Hal ini dapat disebabkan karena keterbatasan metode itu sendiri, seperti adanya negatif palsu karena pemberian antibiotik sebelumnya, terlambatnya pengumpulan sampel (sampel tidak diambil pada fase akut infeksi), kurangnya tenaga ahli dan sumber daya untuk fasilitas kultur, dan dan diperlukan waktu untuk konfirmasi bakteri (Keddy, et al., 2011; Sharma and Mridul, 2013).

Kebutuhan akan uji alternatif maupun uji konfirmasi lainnya untuk menegakkan diagnosis demam tifoid secara akurat mendorong pengembangan uji serologi diantaranya counterimmunoelectrophoresis, ELISA, RIA dan uji haemagglutinas (Ismail, 2000). *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) dianggap sebagai pendekatan alternatif untuk diagnosis demam tifoid (Sattar, et al., 2014). Selain ELISA, uji koagglutinas juga digunakan untuk deteksi antigen dalam urine dan serum. Dalam penginterpretasian uji ini, IgM yang terdeteksi akan menunjukkan tifoid akut (fase awal infeksi), sementara adanya IgM maupun IgG yang terdeteksi akan menunjukkan tifoid akut (fase pertengahan infeksi) Uji ini dianggap sederhana dan cepat untuk diagnosis demam tifoid. Uji Koagglutinas didasarkan aglutinasi pada *antibody-coated staphylococci* oleh antigen somatik *Salmonella Typhi* dalam serum pasien. Istilah "koagglutinas" telah digunakan untuk prosedur uji diagnosis jika antigen berada dalam bentuk partikulat, dan istilah "*Passive Bacterial Agglutination*" (PBA) digunakan jika antigen yang digunakan berupa antigen solubel (John, et al., 1984). Uji *Passive haemagglutination* telah digunakan dan terbukti memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi, terutama jika digunakan di area endemik (Ismail, 2000). Beberapa penelitian telah menggunakan antigen

LPS *Salmonella* Typhi sebagai dasar diagnostik untuk tifoid, diantaranya penelitian oleh Zaka-ur-Rab, *et al* (2012) yang mengevaluasi kegunaan IgA dari saliva terhadap LPS *S. Typhi* untuk deteksi demam tifoid. Selain itu, terbentuknya antibodi terhadap antigen LPS *Salmonella* Typhi maupun antibodi yang meningkat selama infeksi alami menjadi dasar diagnostik uji Widal untuk tifoid (Kałużewski, 2015).

Pada umumnya uji serologi memerlukan antigen standar untuk direaksikan dengan antibodi penderita, namun seringkali ditemui kendala sulitnya menemukan antigen standar dan diperlukan waktu yang cukup lama untuk memperoleh antigen tersebut sehingga dilakukan upaya untuk mencari antigen lokal yang dapat dijadikan sebagai antigen standar.

Studi ini bertujuan untuk melihat efektivitas antigen lokal *S. Typhi* untuk bereaksi dengan antibodi spesifik demam tifoid (IgM) melalui metode ELISA dan *Passive Bacterial Agglutination* (PBA) dari sampel serum suspek demam tifoid yang sebelumnya telah diuji dengan kultur darah sebagai uji standar baku (*gold standard*). Melalui studi ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai antigen lokal yang dapat dijadikan sebagai antigen standar dalam mendiagnosis demam tifoid.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah spoit 1 ml, sentrifuge, Eppendorf 1.5 ml, mikropipet multichannel 400 µl, mikropipet 200 µl, ELISA reader, water bath, Round bottom microtiter plate, Tip Pipet, rak tabung, pipet 5 ml, Tabung falcon 50 ml, Vortex, Neraca elektrik, alat *reading mirror*, *Micromixer*, tabung reaksi kecil, incubator, otoklaf, ose, Bunsen, gelas ukur, kamera digital.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah 50 sampel serum suspek penderita demam tifoid, antigen LPS dari isolat *S. Typhi* di Makassar, *Bile Broth*, medium *Salmonella-Shigella Agar* (SSA), TSIA agar, Medium SIM, Medium MR-VP, Medium uji urea, medium Uji Citrate (SCA), Medium uji gula-gula, Buffer pencuci (PBST 0,1 %), Larutan Pemblok (PBS 1% BSA), Larutan H₂SO₄, larutan Substrat (TMB), Buffer fosfat sitrat pH 5,0, Buffer karbonat, Conjugate (Capple), Phosphate-Buffered Salin (PBS) pH 7,4, alcohol 96%, aseton, formalin, PBS 0,03 M. Bromfenol Blue (BFB) 0,01%, Biakan *Eschericia coli*, Biakan *Staphylococcus aureus*.

Prosedur Kerja

Kultur Bakteri

Sampel dimasukkan ke dalam medium *Ox Bile Broth* 1:10 kemudian diinkubasi pada suhu 35-37 °C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diinokulasi ke dalam medium *Salmonella shigella* pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan uji biokimiawi yakni uji *Triple Sugar iron Agar* (TSIA), *Sulfit Indol Motility* (SIM), *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP), urea, citrate (uji SCA) dan uji gula-gula. Masing-masing diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Teknik ELISA

Tahap pertama : Antigen LPS 1/1000 dilarutkan dalam *coating buffer* dan dimasukkan sebanyak 50 µl dalam tiap *well*, sementara *well* pada A dibiarkan kosong. Plate ditutup dan diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 4 °C (dalam lemari es).

Tahap kedua : dilakukan raksi antigen-antibodi. Plate dicuci dengan *washing buffer* (0,85% NaCl + 0.05 tween 20) sebanyak 3 kali selama 1x1 menit dan 2x2 menit. Kemudian *blocking buffer* (PBS + 1% BSA) sebanyak 100 µl ditambahkan pada setiap *well* dimasukkan sebanyak 50 µl sampel serum yang telah didilusi 100x dengan PBST + 10% NGS. Plate ditutup dan diinkubasi selama 4 jam pada suhu ruangan. Kemudian, plate dicuci sebanyak 5 kali, selanjutnya pada tiap *well* dimasukkan sebanyak 50 µl larutan conjugate yang telah didilusi 20.000x dengan PBST + 10% NGS, lalu diinkubasi pada suhu 4 oC selama satu malam.

Tahap ketiga: plate dicuci dengan *washing buffer* (0,85% NaCl + 0.05 tween 20) sebanyak 4x, kemudian pada tiap *well* ditambahkan TMB sebanyak 50 µl. Plate ditutup dan disimpan pada suhu ruangan selama 15 menit dalam tempat gelap (sampai warna berubah menjadi biru). Reaksi dihentikan dengan penambahan H₂SO₄ 0,5 M pada tiap *well* sebanyak 50 µl dan substrat akan berwarna kuning. Hasil reaksi dibaca dengan *ELISA reader* pada filter 450 nm. Reaksi positif apabila hasilnya = 0,350.

Teknik *Passive Bacterial Agglutination (PBA)*

Untuk kontrol positif, sebanyak 5 µl reagent PBA (1 koloni *Staphylococcus aureus* distabilkan dengan formalin, disensitisasi dengan campuran 10% (vol/vol) suspensi PBS 0,03 M dengan antiserum *S. Typhi* dengan perbandingan 10:1 (vol/vol). kemudian diinkubasi pada suhu 37 °c selama 2 jam dalam waterbath. Disentrifus pada 12.000 rpm, lalu dicampur dengan 1000 µl PBS, divortex, disentrifus lagi hingga diperoleh sedimen. Sedimen diambil dan ditambahkan dengan 1000 µl PBS 1%, kemudian divortex. Disimpan pada suhu -4 °C) , 5 µl antigen LPS, 80 µl PBS dan 10 µl BFB 0.01% dimasukkan dalam setiap *well*, dihomogenkan dengan mikromixer, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Diamati dengan alat *reading mirror*.

Untuk kontrol negatif, sebanyak 5 µl reagen kontrol (1 koloni *Staphylococcus* dicampur dengan 500 µl antiserum, kemudian divortex selama 5 menit, disimpan pada suhu -4 °C), 5 µl antigen LPS, 80 µl PBS dan 10 µl BFB 0.01% dimasukkan dalam setiap *well*, dihomogenkan dengan mikromixer, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Diamati dengan alat *reading mirror*.

Untuk skrining serum penderita, sebanyak 5 µl serum penderita, 5 µl antigen LPS, 80 µl PBS dan 10 µl BFB 0.01% dimasukkan dalam setiap *well*, dihomogenkan dengan mikromixer, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang, diamati dengan alat *reading mirror*. Reaksi positif jika terjadi penggumpalan.

Untuk pembacaan hasil uji PBA didasarkan pada gumpalan yang terbentuk, dimana:

- Jika gumpalan yang terjadi besar, dan jelas di seluruh permukaan *microplate*, disebut positif 4 (++++)
- Jika gumpalan kecil-kecil dan memenuhi *microplate*, disebut positif 3 (+++)
- Jika gumpalan kecil-kecil, setengah dari *microplate*, disebut positif 2 (++)
- Jika gumpalan kecil dan sedikit, kurang dari setengah *microplate*, disebut positif 1 (+)
- Jika tidak ada gumpalan, disebut negatif (-)

Hasil dan Pembahasan

Studi ini menggunakan 50 sampel serum suspek penderita demam tifoid yang dikelompokkan berdasarkan umur (4-85 tahun), lama demam (2-13 hari) dan jenis kelamin (Laki-laki dan perempuan). Berdasarkan umur, pasien dikelompokkan menjadi 0 – 10 tahun sebanyak 7 orang (14%), 11-20 tahun sebanyak 11 orang (22%), 21-30 tahun sebanyak 3 orang (6%), 31-40 tahun sebanyak 13 orang (26%), 41-50 tahun sebanyak 9 orang (18%) dan > 50 tahun sebanyak 7 orang (14%). Berdasarkan lama demam, dapat dikelompokkan menjadi 1-6 hari sebanyak 15 orang (30%), 7-14 hari sebanyak 26 orang (52 %) dan > 14 hari sebanyak 9 orang (18 %). Berdasarkan jenis kelamin, terdapat pasien laki-laki sebanyak 29 (58 %) dan perempuan sebanyak 21 orang (42%).

Dalam studi ini, kami menguji kemampuan antigen lokal yang diperoleh dari isolat *Salmonella* Typhi di Makassar. Antigen lokal merupakan suatu antigen yang diisolasi dari bakteri dimana tempat pengisolasian berasal dari daerah lokal tersebut. Dalam hal ini, antigen lokal adalah antigen berupa kuman *S. Typhi* yang diisolasi dari penderita demam tifoid yang belum diberi pengobatan antibiotik. Apabila antigen ini direaksikan dengan antibodi penderita demam tifoid dan terjadi penggumpalan maka antigen lokal ini dapat digunakan sebagai antigen standar. Kemampuan antigen ini untuk dapat dijadikan antigen standar ditunjukkan melalui metode ELISA dan PBA yang terlihat hasil positivitas maupun negativitasnya. Sampel diuji sebelumnya dengan uji kultur sebagai uji standar baku (*gold standard*).

Berikut hasil uji kultur berdasarkan kelompok umur, lama demam dan jenis kelamin
Tabel 1. Frekuensi penderita demam tifoid dari hasil uji kultur berdasarkan kelompok umur, lama demam dan jenis kelamin

	Uji Kultur (%)		Total (%)
	Positif	Negatif	
Kelompok umur			
0-10 tahun		11 (22%)	11 (22%)
11-20 tahun	2 (4%)	9 (18%)	11 (22%)
21-30 tahun	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)
31-40 tahun	10(20%)	2 (4%)	12 (24%)
41-50 tahun	7 (14%)	1 (2%)	8 (16%)
>50 tahun	4 (8%)	1 (2%)	5 (10%)
Total	25(50%)	25 (50%)	50 (100%)
Lama Demam :			
1-6 hari	9 (18%)	22 (44%)	31 (62%)
7-14 hari	16 (32%)	3 (6%)	19 (38%)
>14 hari			
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)
Jenis Kelamin			
Laki-laki	20 (40%)	9 (18%)	29 (58%)
Perempuan	5 (10%)	16 (32%)	21 (42%)
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)

Isolasi *S. Typhi* dari darah memberikan bukti pasti akan adanya penyakit. Dalam hal ini, positifnya kultur darah untuk *Salmonella* menunjukkan diagnosis pasti dari demam enterik atau septisemia (banyak ditemukan basil *Salmonella* di dalam darah). Namun, uji kultur darah memiliki kelemahan karena sensitivitasnya berkurang dengan adanya pemberian antibiotik sehingga dapat memberikan hasil positif palsu (Keddy, *et al.*, 2011). Lama demam mempengaruhi hasil uji kultur. Seperti yang terlihat pada Tabel 1, penderita dengan lama demam antara 7-14 hari paling banyak ditemukan hasil positif. Hal ini dapat disebabkan oleh meningkatnya jumlah *S. Typhi* dalam darah penderita (fase bakterimia/septisemi yang berat) karena belum mendapatkan pengobatan antibiotik.

Berdasarkan kelompok umur, kelompok umur 11-20 tahun paling banyak positif dengan ELISA sedangkan kelompok umur 41- >50 tahun paling banyak negatif ELISA. Sedangkan berdasarkan lama demam, pasien dengan lama demam 1-6 hari paling banyak menunjukkan hasil positif ELISA, yakni sebanyak 24 orang (48%). Selain itu, hasil metode ELISA juga menunjukkan bahwa laki-laki paling banyak memberikan hasil positif, yakni sebanyak 23 orang (46%) (Tabel 2)

Tabel 2. Hasil pengujian Teknik ELISA berdasarkan kelompok umur, lama demam, dan jenis kelamin

	Teknik ELISA (%)		Total (%)
	Positif	Negatif	
Kelompok umur			
0-10 tahun	8 (16%)	3 (6%)	11 (22%)
11-20 tahun	9 (18%)	2 (4%)	11 (22%)
21-30 tahun	3 (6%)		3 (6%)
31-40 tahun	8 (16%)	4 (8%)	12 (24%)
41-50 tahun	7 (14%)	1 (2%)	8 (16%)
>50 tahun	4 (8%)	1 (2%)	5 (10%)
Total	39 (78%)	11 (22%)	50 (100%)
Lama Demam :			
1-6 hari	9 (18%)	22 (44%)	31 (62%)
7-14 hari	16 (32%)	3 (6%)	19 (38%)
>14 hari			
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)
Jenis Kelamin			
Laki-laki	20 (40%)	9 (18%)	29 (58%)
Perempuan	5 (10%)	16 (32%)	21 (42%)
Total	25 (50%)	25 (50%)	50 (100%)

Hasil pengujian dengan metode ELISA menunjukkan hasil positif yang lebih banyak daripada hasil uji kultur, bahkan ditemui adanya penderita dengan kultur negatif menunjukkan reaksi positif dengan metode ELISA. Begitupun pada beberapa sampel penderita kultur positif menunjukkan reaksi negatif dengan ELISA. Hal ini dapat disebabkan karena antigen LPS yang banyak terkandung dalam antigen O *Salmonella* merupakan antigen umum yang terdiri dari

banyak *determinant factor* yang dapat bereaksi silang dan kuat dengan antigen yang memiliki hubungan kekerabatan yang erat atau antigen serogrup *Salmonella* lainnya. Penyebab lainnya juga disebabkan karena adanya persistensi IgM, dimana IgM khususnya muncul pada awal respon imun dan dapat bertahan lama sebagai respon terhadap beberapa antigen bakteri dan adanya faktor Rheumatoid (RF) yang membentuk kompleks dengan antigen komplemennya sehingga dapat dikenali oleh konjugat spesifik untuk IgM menghasilkan reaksi positif palsu (Burgess, 1995).

Hasil pengujian dengan Teknik *Passive bacterial Agglutination* (PBA) adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Hasil Pengujian Teknik PBA Berdasarkan Kelompok Umur, Lama Demam, dan Jenis Kelamin

	Teknik PBA (%)		Total (%)
	Positif	Negatif	
Kelompok umur			
0-10 tahun		11 (22%)	11 (22%)
11-20 tahun	3 (9%)	8 (16%)	11 (12%)
21-30 tahun	2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)
31-40 tahun	11 (22%)	1 (2%)	12 (24%)
41-50 tahun	7 (14%)	1 (2%)	8 (16%)
>50 tahun	4 (8%)	1 (2%)	5 (10%)
Total	28 (56%)	11 (22%)	50 (100%)
Lama Demam :			
1-6 hari	11 (22%)	20 (40%)	31 (62%)
7-14 hari	16 (32%)	3 (6%)	19 (38%)
>14 hari			
Total	28 (56%)	25 (50%)	50 (100%)
Jenis Kelamin			
Laki-laki	21 (42%)	8 (16%)	29 (58%)
Perempuan	6 (12%)	15 (30%)	21 (42%)
Total	27 (54%)	23 (46%)	50 (100%)

Berdasarkan hasil yang diperoleh dengan metode PBA. Menunjukkan adanya perbedaan reaksi aglutinasi dari setiap serum yang ditunjukkan oleh adanya perbedaan tingkatan reaksi positif, sedangkan untuk reaksi negatif menunjukkan bahwa tidak terjadi aglutinasi yang berarti bahwa tidak terjadi pengikatan antigen dan antibodi.

Hasil pengujian dengan metode PBA menunjukkan perbedaan dengan hasil uji metode ELISA. Hal ini dapat disebabkan adanya respon anamnestik yang terjadi pada pasien karena pada uji aglutinasi pasien tidak selalu memberikan respon terhadap antigen serogrup *Salmonella* sp. yang diisolasi dari tubuh penderita. Respon anamnestik terjadi jika antibodi pasien terstimulasi oleh infeksi yang tidak nampak sebelum demam. Dalam hal ini, pasien masuk rumah sakit setelah mengalami demam beberapa hari sehingga titer antibodinya telah mencapai puncak pada saat spesimen darah diambil.

KESIMPULAN

Antigen LPS yang diperoleh dari isolat *S. Typhi* di Makassar dapat dijadikan sebagai standar antigen untuk mendeteksi adanya produksi antibodi spesifik IgM dari penderita demam tifoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Antillón, M., Warren, J. L., Crawford, F. W., Weinberger, D. M., Kürüm, E., Pak, G. D. Pitzer, V. E. 2017. The burden of typhoid fever in low-and middle-income countries: A meta-regression approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11(2), e0005376. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005376>
- Burgess, W. Graham. 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. *Textbook*. Universitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta.
- Ismail, A. 2000. New Advances Diagnosis of Typhoid and Detection of Typhoid Carriers. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 7(2): (3-8).
- Jensenius, M., P.V. Han, P. Schlagenhauf, E. Schwartz, P. Parola, F. Castelli, *et al.* 2013. Acute and Potentially Life-Threatening Tropical Diseases in Western Travelers--a GeoSentinel Multicenter Study,1996-2011. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*88:397–404.
- John, T. J., K. Sivadasan and Betty, K. 1984. Evaluation of Passive Bacterial Agglutination for the Diagnosis of Typhoid Fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 20(4): 751-753.
- Keddy KH, Sooka A, Ismail H, Smith AM, Weber I, Letsoalo ME, *et al.* , 2011. Molecular Epidemiological Investigation of A Typhoid Fever Outbreak in South Africa, 2005: The Relationship to a Previous Epidemic in 1993. *Epidemiol Infect.* 139(8):1239-45.
- Leder, K., J. Torresi, J.S. Brownstein, M.E. Wilson, J.S. Keystone, E. Barnett, *et al.* 2013. GeoSentinel Surveillance Network. Travel-associated illness trends and clusters, 2000-2010. *Emerg. Infect. Dis.*19:1049–1073.
- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, *et al.* 2012. Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: a Systematic Analysis for The Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380:2095–2128.
- Mogasale, V., Maskery, B., Ochiai, R. L., Lee, J. S., Mogasale, V. V., Ramani, E., Wierzbza, T. F. 2014. Burden of typhoid fever in low-income and middle-income countries: A systematic, literature-based update with risk-factor adjustment. *The Lancet Global Health*, 2(10), e570–e580. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70301-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70301-8)
- Rahman,T.,Hoden,I., Chakraborty, S., 2013. A Rapid Glimpse on Typhoid Fever: An Updated Mini Review. *Journal of Life Medicine JLM* Volume 1, Issue 3 October , PP. 71-82.
- Sattar, A.A, M Abdullah Yusuf, M Bodrul Islam. 2014. Different Diagnostic Procedure of Typhoid Fever: A Review Update *J Curr Adv Med Res* 1(2):35-41.
- Sharma, J and Mridul Malakar. 2013. Distribution of Typhoid Fever in Different Rural and Urban Areas of Lakhimpur District of Assam. *Int J Res Dev Health*. Vol 1(3): 109 - 14
- Zaka-ur-Rab Z, Abqari S, Shahab T, Islam N, Shukla I. 2012. Evaluation of salivary anti-Salmonella typhi lipopolysaccharide IgA ELISA for Serodiagnosis of Typhoid Fever in Children. *Arch Dis Child*. 97(3):236-38.