

Diagnosis filariasis malayi dengan ELISA Sandwich menggunakan antibodi monoklonal

Soeyoko

Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Soeyoko – *Diagnosis of malayan filariasis using Sandwich ELISA assay with monoclonal antibody.*

Malayan filariasis is still the major public health problem in Indonesia. In endemic area, when microfilaremia and clinical manifestations are absent, the diagnosis of malayan filariasis is extremely important, particularly for filariasis control.

With the development of hybridoma technology, it is possible to produce monoclonal antibody against any stage of *Brugia malayi*, which is capable of detecting the circulating parasite antigen in malayan filariasis sera.

Sandwich ELISA assay using Fab 4 monoclonal antibody could identify circulating parasite antigen in human sera. With this assay it was found that: 100% of sera from symptomatic-microfilaremic, 50% of sera from symptomatic-amicrofilaremic, 82,1% of sera from asymptomatic-microfilaremic and 24,4% of sera from asymptomatic-amicrofilaremic residents of filariasis-endemic areas positively contained circulating antigen.

In comparison with the conventional method, the sensitivity and specificity of this new technique are 85,2% and 75,4% respectively.

From this study it is concluded that Sandwich ELISA is proved to be very sensitive as an immunological test to detect filarial infection without any clinical manifestation or microfilaria in the blood.

Key words : malayan filariasis – circulating antigen – monoclonal antibody – Sandwich ELISA – asymptomatic-amicrofilaremic.

(BIKed, Vol. 28, No.2:61-65, June 1996)

PENGANTAR

Filariasis limfatik di Indonesia dapat disebabkan oleh tiga macam spesies: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* dan *Brugia timori*. Dari ketiga macam spesies tersebut di atas *B. malayi* mempunyai daerah penyebaran yang paling luas, merupakan daerah kantong-kantong yang terisolasi dan jauh dari perkotaan¹.

Diagnosis filariasis malayi berdasarkan atas hasil pemeriksaan klinis, parasitologis dan serologis kurang memuaskan oleh karena banyak penderita filariasis tidak menunjukkan gejala-

gejala klinis sama sekali. Gejala klinis filariasis spesifik seperti elefantiasis baru muncul setelah mencapai stadium kronik dan anehnya tidak semua penderita menunjukkan gejala tersebut. Oleh karena itu hasil pemeriksaan parasitologis dengan menemukan mikrofilaria di dalam darah sangat penting untuk membantu menegakkan diagnosis. Namun demikian tidak pada semua penderita filariasis yang tinggal di daerah endemik dapat ditemukan mikrofilaria di dalam darahnya seperti pada stadium prepaten dan penderita yang kepadatan mikrofilaria dalam darah masih dibawah nilai ambang pemeriksaan mikroskopis. Sedangkan pada pemeriksaan serologis untuk mendeteksi adanya antibodi akan

Soeyoko, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta

selalu terjadi reaksi silang dengan nematoda lain. Dengan demikian penduduk yang tinggal di daerah endemik, walaupun sudah terpapar stadium infeksi filaria namun belum ditemukan mikrofilaria di dalam darahnya maupun menunjukkan gejala-gejala klinis spesifik, sehingga tidak mungkin dapat terdiagnosis². Deteksi kasus-kasus tersebut sangat penting dalam upaya pemberantasan filariasis

Pada penderita filariasis bancrofti akut, di dalam serumnya dapat ditemukan adanya antigen beredar³. Dengan cara *Elisa Sandwich* antigen beredar tersebut dapat dideteksi dalam serum maupun urin penderita dan dapat dipakai untuk membantu diagnosis filariasis. Untuk keperluan tersebut diperlukan antibodi monoklonal yang spesifik.

Dengan semakin cepat berkembangnya bioteknologi kesehatan termasuk teknologi hibridoma, telah berhasil didapatkan antibodi monoklonal spesifik terhadap antigen beredar Fab4 di Laboratorium Parasitologi FK-UGM⁴.

Pada makalah ini dibahas cara diagnosis filariasis malayi dengan *ELISA Sandwich* menggunakan antibodi monoklonal Fab4. Apakah *ELISA Sandwich* lebih baik daripada cara konvensional dan seberapa jauh dapat mendeteksi antigen beredar pada kelompok-kelompok penduduk di daerah endemik filariasis.

BAHAN DAN CARA

Antibodi monoklonal Fab4.

Pada penelitian ini digunakan antibodi monoklonal yang telah dihasilkan dari Laboratorium Parasitologi FK-UGM, yang diperoleh dengan cara memfusikan limfosit mencit Balb/c yang telah diimunisasi antigen sekretori/ekskretori (antigen beredar) dengan sel mieloma dan telah dikarakterisasi tidak bereaksi silang dengan nematoda intestinal⁴.

Serum penderita filariasis di daerah endemik.

Serum diproses dari darah yang diambil dari vena cubiti penduduk yang tinggal di daerah endemik filariasis pada waktu siang hari, di daerah Sampit (Kalimantan Tengah), Surian (Ka-

limantan Selatan) dan Krayan (Kalimantan Timur). Di samping itu sebagian dari darah tersebut difiltrasi untuk pemeriksaan parasitologis, melihat ada tidaknya mikrofilaria. Terkadang semua penduduk yang diambil darahnya juga dilakukan pemeriksaan klinis untuk dilihat gejala-gejala filariasis yang muncul.

Serum penderita dikelompokkan menjadi empat kelompok:

- A. Kelompok yang tidak menunjukkan gejala-gejala klinis sama sekali, maupun tidak ditemukan mikrofilaria di dalam darahnya (asintomatik-amikrofilaremik).
- B. Kelompok yang menunjukkan gejala-gejala klinis filariasis akut yang sifatnya sementara dan sembuh spontan seperti: demam, limfadenitis, limfangitis desendens, abses, limfedema dan telah ditemukan mikrofilaria di dalam darahnya (simtomatik-mikrofilaremik).
- C. Kelompok yang tidak menunjukkan gejala-gejala klinis seperti tersebut di atas, tetapi ditemukan mikrofilaria di dalam darahnya (asintomatik-mikrofilaremik).
- D. Kelompok yang menunjukkan gejala klinis kronis seperti sikatrik dan elefantiasis, namun tidak ditemukan mikrofilaria dalam darahnya (simtomatik-amikrofilaremik).

Serum penduduk dari daerah non endemik filariasis.

Darah diambil dari vena cubiti pada waktu siang hari, disentrifus kemudian diambil serumnya untuk dipergunakan sebagai kontrol negatif pada pemeriksaan *ELISA Sandwich*.

ELISA Sandwich

Semua serum baik yang berasal dari daerah endemik maupun non-endemik filariasis diperiksa dengan cara *ELISA Sandwich* seperti yang dilakukan oleh Huijun dengan sedikit modifikasi, untuk mendeteksi adanya antigen beredar⁵. *ELISA Sandwich* dilakukan sebagai berikut: Sumuran pada mikroplet *ELISA* dilapisi dengan serum kelinci anti antigen beredar filaria *B. malayi* dan diblok dengan larutan *bovine serum albumin* (BSA) 0,5%. Kemudian berturut-turut diinkubasikan dengan serum penderita, antibodi

monoklonal spesifik antigen beredar (Fab4), conjugate dan substrat. Optimasi pengenceran komponen *ELISA Sandwich* tersebut di atas ditetapkan dengan cara titrasi *checkerboard*. Hasil pemeriksaan ini dibaca dengan *ELISA reader* pada absorben 492 nm. Dikatakan positif jika *optical density* sampel > rerata *optical density* kontrol negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daerah Sampit, Surian dan Krayan merupakan daerah endemik filariasis malayi dengan tingkat endemisitas yang berbeda-beda. Dengan cara pemeriksaan mikrofilaria di dalam darah vena pada waktu siang hari, dapat ditetapkan bahwa dari ketiga daerah tersebut, Krayan merupakan daerah endemik filariasis malayi yang paling tinggi prevalensinya: 20,3% (11/54), baru kemudian berturut-turut Surian: 11,5% (14/121) dan Sampit: 4,6% (9/195). Jumlah mikrofilaria di dalam darah sangat bervariasi, di daerah Krayan: 1-945 mf, Surian: 1-230 mf sedangkan Sampit: 1-137 mf./2 ml darah vena. Sebagian besar penduduk, walaupun telah tinggal cukup lama di daerah endemik dan terpapar filariasis, tidak menunjukkan gejala klinis sama sekali dan tidak ditemukan mikrofilaria di dalam darahnya. Dengan pemeriksaan klinis dan parasitologis masing-masing daerah menunjukkan persentase cukup tinggi: Krayan 70,3%, Surian 84,2% dan Sampit 93,3% (TABEL 1).

TABEL 1. – Hasil pemeriksaan klinis dan parasitologis penduduk di daerah endemik filariasis di Sampit (Kalimantan Tengah), Surian (Kalimantan Selatan) dan Krayan (Kalimantan Timur).

Kelompok penduduk	Sampit		Surian		Krayan	
	positif	(%)	positif	(%)	positif	(%)
A. Klinis + mf. +	0	(0)	4	(3.3)	2	(3.7)
B. Klinis + mf. -	4	(2)	5	(4.1)	5	(9.2)
C. Klinis - mf. +	9	(4.6)	10	(8.2)	9	(16.6)
D. Klinis - mf. -	182	(93.3)	102	(84.2)	38	(70.3)
Total	195		121		54	

mf. : mikrofilaria

Namun setelah dilakukan pemeriksaan dengan cara *ELISA Sandwich* dapat ditunjukkan bahwa

24,4% serum penduduk mengandung antigen beredar, walaupun tidak ditemukan mikrofilaria di dalam darah maupun gejala-gejala klinis. Ini berarti bahwa kelompok penduduk tersebut walaupun telah terkena infeksi filaria masih berada dalam stadium pre-paten, kepadatan mikrofilaria dalam darah rendah dan kemungkinan hanya terinfeksi dengan satu macam jenis kelamin, sehingga dengan cara konvensional tidak dapat terdiagnosis dengan pasti (TABEL 2). Di samping itu juga dapat ditunjukkan bahwa serum kelompok penduduk simptomatik-mikrofilaremik semuanya mengandung antigen beredar (100%), sedangkan serum kelompok simptomatik-amikrofilaremik maupun asimtomatik-mikrofilaremik masing-masing mengandung antigen beredar 50% dan 82,1% (TABEL 2).

Dengan cara *ELISA Sandwich* dapat diperlihatkan bahwa antigen beredar dalam serum kelompok penduduk mikrofilaremik lebih tinggi kadarnya jika dibanding yang amikrofilaremik. Kelompok mikrofilaremik mempunyai rerata *optical density*: 0.975 ± 0.056 dan 0.898 ± 0.024 sedang kelompok amikrofilaremik mempunyai *optical density* 0.725 ± 0.021 dan 0.635 ± 0.013 (TABEL 2)

TABEL 2. – Deteksi antigen beredar dalam serum penduduk daerah endemik filariasis, dengan *ELISA Sandwich* menggunakan antibodi monoklonal Fab4.

Kelompok penduduk Asal: Sampit, Surian & Krayan,	Jml.pos./ Jml. diperiksa (%)	Rerata <i>Optical density</i>
A. Klinis + mf +	6/6 (100)	0,975 ± 0,056
B. Klinis + mf -	7/14 (50)	0,725 ± 0,021
C. Klinis - mf +	23/28 (82,1)	0,898 ± 0,024
D. Klinis - mf -	81/331 (24,4)	0,635 ± 0,013

Optical density dibaca pada panjang gelombang 492 nm

Optical density kontrol negatif: 0.340 ± 0.019

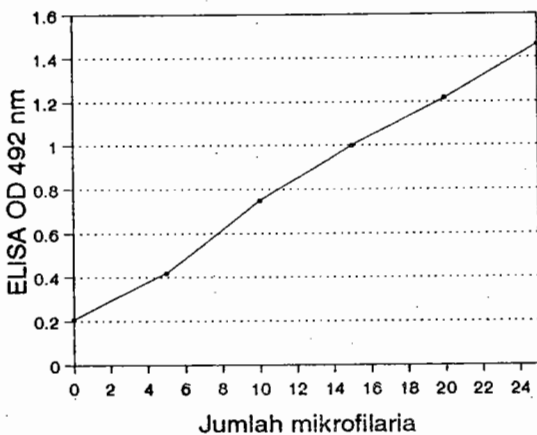
Fab4: filarial antigen beredar

A, B, C dan D: lihat TABEL 1.

Setelah dilakukan uji statistik dengan rumus korelasi dari Pearson ternyata ada korelasi positif antara kepadatan mikrofilaria dalam darah dengan kadar antigen beredar (GRAFIK 1, $r = 0.809$, $p < 0.01$).

Hasil diagnosis filariasis yang baru dengan *ELISA Sandwich* jika dibandingkan dengan cara konvensional mempunyai sensitivitas 85,2%, spesifisitas 75,4%, nilai duga positif 24,7% dan nilai duga negatif 98,1%. Dengan uji statistik Mc Nemar^{6,7} didapatkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$) antara *ELISA Sandwich* dan konvensional (TABEL 3).

Dari hasil penelitian ini dapat dibuktikan bahwa penduduk yang tinggal di daerah endemik, walaupun tidak menunjukkan gejala klinis (asimtomatik) maupun tidak ditemukan mikrofilaria di dalam darahnya (amikrofilaremik) tidak berarti bebas filariasis. Dengan cara diagnosis yang sedang dikembangkan yaitu dengan *ELISA Sandwich* menggunakan antibodi monoklonal yang spesifik (Fab4), kelompok penduduk tersebut dapat dinyatakan dengan pasti menderita filariasis. Cara diagnosis tersebut dapat dipakai untuk mendeteksi adanya antigen beredar dalam serum penderita, yang berarti infeksi sedang terjadi akut. Pada penelitian ini dengan cara deteksi antigen beredar: 24,4% penduduk asimtomatik-amikrofilaremik di daerah endemik dapat dinyatakan dengan pasti menderita filariasis (TABEL 2). Sedangkan menurut peneliti lain, dengan menggunakan antibodi monoklonal ES 34 hanya dapat terdeteksi 15-20% penderita asimtomatik-amikrofilaremik filariasis bancrofti⁵.



GAMBAR 1. – Hubungan antara jumlah mikrofilaria dalam darah dengan antigen beredar dalam serum penderita filariasis.

TABEL 3. – Hasil pemeriksaan antigen beredar (*ELISA Sandwich*) dibandingkan dengan pemeriksaan konvensional mikrofilaria dalam darah penduduk daerah endemik filariasis malayi.

Hasil pemeriksaan <i>ELISA Sandwich</i>	Hasil pemeriksaan konvensional mikrofilaria		Jumlah
	positif	negatif	
Positif	29	88	117
Negatif	5	271	276
Jumlah	34	359	393

Uji Mc Nemar: $Z = 8,609$
 $p < 0,01$

Sensitivitas *ELISA Sandwich* = $29/34 \times 100\% = 85,2\%$
 Spesifisitas *ELISA Sandwich* = $271/359 \times 100\% = 75,4\%$
 Nilai duga positif = $29/117 \times 100\% = 24,7\%$
 Nilai duga negatif = $271/276 \times 100\% = 98,1\%$

Cara lain (*dot-blot*) juga sedang dikembangkan untuk mendeteksi antigen beredar⁸. Namun cara ini sifatnya hanya kualitatif, sehingga tidak dapat untuk menilai korelasi antara mikrofilaria dengan antigen beredar. Sedangkan cara *ELISA Sandwich* sifatnya kuantitatif maupun kualitatif. Pada penelitian ini dapat dinilai adanya korelasi yang positif antara jumlah mikrofilaria dalam darah dengan antigen beredar (GRAFIK 1, $r = 0,809$, $p < 0,01$). Kelompok penduduk mikrofilaremik menunjukkan *optical density* lebih tinggi dibanding amikrofilaremik (TABEL 2). Adanya korelasi tersebut pernah dilaporkan oleh peneliti lain, yang dalam percobaannya menggunakan hewan coba dan antibodi monoklonal MabXC3 spesifik terhadap *B. pahangi*⁹. Tetapi sebetulnya ada yang mengemukakan pendapat bahwa korelasi ini sangat tergantung pada spesifisitas antibodi monoklonalnya. Antibodi monoklonal yang kurang baik spesifisitasnya selain bereaksi dengan antigen beredar juga akan bereaksi dengan protein lain sehingga dengan cara *ELISA Sandwich* kadar antigen beredar tidak dapat dinilai dengan tepat. Hal ini dapat ditunjukkan dengan antibodi monoklonal HC 11 yang masih bereaksi silang dengan nematoda lainnya, ternyata tidak ada korelasi antara jumlah mikrofilaria dalam darah dengan kadar antigen beredar⁵.

KESIMPULAN

Diagnosis filariasis malayi dengan cara *ELISA Sandwich* menggunakan antibodi monoklonal yang spesifik lebih baik daripada cara konven-

sional, karena dapat membantu untuk memastikan diagnosis filariasis pada kelompok asimtomatik-amikrofilaremik.

Cara diagnosis *ELISA Sandwich* dibandingkan cara konvensional mempunyai sensitivitas 85,2%, spesifisitas 75,4%, nilai duga positif 24,7% dan nilai duga negatif 98,1%.

Cara diagnosis *ELISA Sandwich* menggunakan antibodi monoklonal Fab4 dapat mendeteksi antigen beredar dalam serum penduduk sebagai berikut: 100% pada kelompok simtomatik-mikrofilaremik; 50% pada kelompok simtomatik-amikrofilaremik; 82,1% pada kelompok asimtomatik-mikrofilaremik dan 24,4% pada kelompok asimtomatik-amikrofilaremik.

Kadar antigen beredar dalam serum kelompok mikrofilaremik lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok amikrofilaremik.

KEPUSTAKAAN

1. Oemijati S. Current status of filariasis in Indonesia. SEA J Trop Med & Publ Hlth. 1993; 24 (2 Sppl): 2-4.
2. Mak JW. Filariasis. Institute for medical research. Kualalumpur Bulletin 1983; 19: 65-70
3. Au ACS, Dunham DA, Steward MW, Drapar DC, Ismail MM, Rao DK, & Mak JW. Detection of circulating antigen, an immune complex in feline and human lymphatic filariasis. SEA J Top Med & Publ Hlth. 1981; 12: 492-98.
4. Soeyoko. Purifikasi, karakterisasi dan deteksi circulating antigen pada hewan coba dengan antibodi monoklonal filaria *Brugia malayi*. Lap Pen HB I/2 Perguruan Tinggi. DP3M. Dir. Jen. Dikti.
5. Huijun Z, Zhenghou T, Reddy MVR, Bhasker C, Harinath and Piessen WF. Parasites antigens in sera and urine of patients with Bancroftian and Brugian filariasis detected by Sandwich ELISA with monoclonal antibodies. Am J Trop Med Hyg 1987; 3: 554-60.
6. Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research, 2nded. London: Blackwell Scientific Publication.
7. Hermann JE. Immunoassays for the diagnosis of infectious diseases. Manual of clinical microbiology, 6thed. Washington DC: ASM Press, 1995.
8. Soeyoko, Sri Sumarni. The use of monoclonal antibody in the detection of circulating antigen in malayan filariasis cases. BIKed 1993; 25(3): 115-19.
9. Abdullah WO, Oothuman P, Yunus H. Detection of circulating antigens and parasite spesific antibodies in filariasis. SEA J Trop Med & Publ Hlth 1993; 24(2 Suppl):31-6.

