

Karakterisasi antibodi monoklonal spesifik selubung larva stadium infeksiif *Brugia malayi*

Soeyoko dan Sri Sumarni

Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

ABSTRACT

Soeyoko and Sri Sumarni – *Characterization of a monoclonal antibody against surface coat of infective larvae of *Brugia malayi*.*

Malayan filariasis is an important public health problem in Indonesia. A diagnosis of filariasis is normally based on clinical, parasitological and immunological examinations but the methods have limitations. There is an urgent need to improve immunodiagnostic techniques for malayan filariasis using monoclonal antibodies to detect circulating antigen. Recently, many types of monoclonal antibodies have been produced following immunization of mice with various stages of filarial antigens. Those monoclonal antibodies have different characteristics.

The objective of this study was to explore the characteristic of specific monoclonal antibodies against the surface coat of infective stages of *Brugia malayi* larvae.

This monoclonal antibody recognized antigen of 40.000 MW protein which is present among the antigens of surface coat of *Brugia malayi* larvae, as detected by an immunoblotting technique. Classification using ELISA techniques indicates that those antibodies are IgG₁, IgG_{2b} and IgG₃ subclasses. In addition, these antibodies also demonstrate a low level reactivity with surface antigen of *Brugia pahangi*, *Ascaris lumbricoides* and hookworm.

Key words: surface coat – infective larvae – monoclonal antibody – circulating antigen – *Brugia malayi*

(Berita Ilmu Kedokteran Vol. 27, No. 3:159-64, September 1995)

PENGANTAR

Filariasis malayi merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting di Indonesia. Diagnosis filariasis malayi berdasarkan hasil pemeriksaan klinis, parasitologis dan serologis banyak kelemahannya¹.

Dalam era bioteknologi ada peluang untuk mengembangkan diagnosis filariasis, dengan pendekatan imunodiagnosis modern (baru), menggunakan teknik ELISA dan dot-blot yang dapat mendeteksi antigen yang beredar dalam serum penderita. Teknik tersebut memerlukan antibodi monoklonal yang spesifik terhadap *B. malayi*.

Pengembangan antibodi monoklonal untuk diagnosis filariasis malayi telah banyak dilakukan oleh peneliti-peneliti sebelumnya. Masing-masing peneliti menggunakan antigen yang berbeda-beda (*crude antigen* stadium larva, antigen stadium mikrofilaria) untuk menginduksi sel limfosit menciit sebelum difusikan dengan sel mieloma. Antibodi monoklonal tersebut mempunyai karakter yang berbeda tergantung dari antigen yang dipergunakan. Antibodi monoklonal dari *crude antigen* stadium larva mengenal berbagai fraksi protein (epitop) dengan berat molekul: 36, 52, 67 dan 80 kD dan masih bereaksi silang dengan nematoda lainnya².

Penelitian ini bertujuan mengetahui karakter antibodi monoklonal dari selubung larva infeksiif *B. malayi* tentang: klasifikasi, titer, epitop, spe-

Soeyoko & Sri Sumarni, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia.

sifikasi dan mengetahui kemampuannya untuk mendeteksi antigen beredar dalam serum hewan coba.

BAHAN DAN CARA

Antibodi monoklonal

Penelitian ini menggunakan antibodi monoklonal yang belum murni (dalam cairan asites mencit). Antibodi monoklonal tersebut diperoleh dengan cara memfusikan limfosit mencit Balb/c yang telah diimunisasi selubung larva *B. malayi*, dengan sel mieloma.

Pemurnian antibodi monoklonal

Antibodi monoklonal dalam cairan asites sebelum dikarakterisasi perlu dimurnikan lebih dahulu oleh karena masih tercampur dengan protein lain seperti albumin, transferin dan feritin. Untuk memisahkan imunoglobulin dari berbagai macam protein tersebut di atas dapat dilakukan dengan kromatografi kolom hidrosilapetit³.

Klasifikasi antibodi monoklonal

Sub-kelas antibodi monoklonal ditetapkan dengan cara *ELISA*, menggunakan *mouse typer sub iso typing kit*.

Penetapan titer antibodi monoklonal

Titer antibodi monoklonal dapat diperiksa dengan cara *ELISA*. Protein selubung filaria diabsorpsikan pada *ELISA plate* kemudian diinkubasikan dengan antibodi monoklonal dengan pengenceran bertingkat ($10x$, 10^2x , 10^3x , 10^4x). Tingginya titer antibodi dapat diketahui sesuai dengan tingkat pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan reaksi positif.

Analisis epitop protein selubung filaria

Untuk mengetahui epitop yang dikenal antibodi monoklonal, dilakukan dengan:

- Imunoblotting*. Penguraian protein selubung filaria dilakukan dengan SDS-PAGE. Fraksi-fraksi protein tersebut kemudian dipindahkan ke membran nitroselulose, selanjutnya diinkubasikan dengan antibodi monoklonal spesifik^{4,5}.
- Immunogold labelling*. Untuk melihat bagian dari cacing filaria yang dikenal antibodi monoklonal, cacing filaria dipotong ultra tipis

dengan Reichert FC₄ cryokammer. Kemudian diinkubasikan berturut-turut dengan antibodi monoklonal selama satu jam dan *anti mouse IgG-gold*, preparat divisualisasikan dengan mikroskop elektron⁶.

Spesifikasi antibodi monoklonal

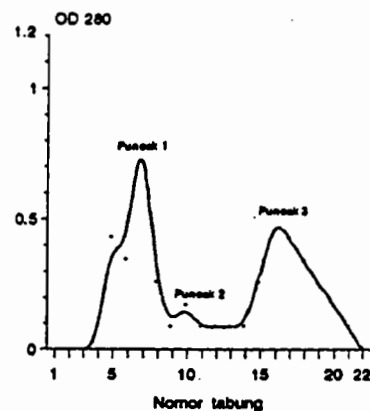
Untuk mengetahui spesifikasi antibodi monoklonal dilakukan dengan cara *ELISA*. Beberapa macam antigen nematoda (*B. malayi*, *B. pahangi*, *A. lumbricoides*, Hookworm) diabsorpsikan pada *ELISA plate*, kemudian diinkubasikan dengan antibodi monoklonal. Jika spesifik maka hanya sumuran yang dilapisi antigen *B. malayi* yang timbul warna.

Uji kemampuan antibodi monoklonal mengikat antigen beredar dalam serum hewan coba gerbil yang diinfeksi filaria dilakukan dengan teknik dot-blot⁷.

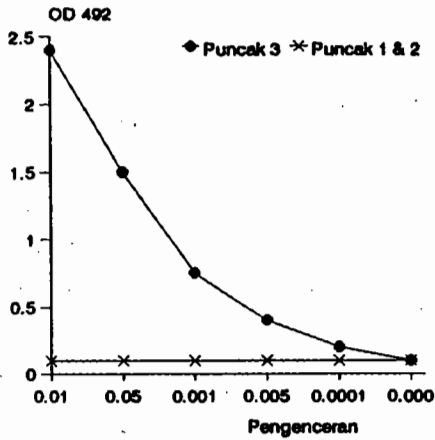
HASIL PENELITIAN

Pemurnian antibodi monoklonal

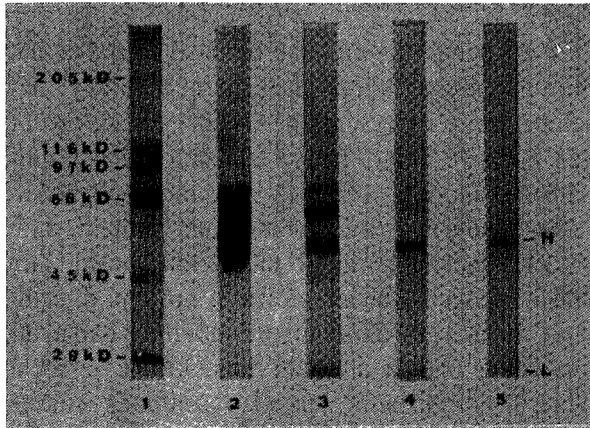
Cairan asites mencit yang mengandung imunoglobulin, albumin dan transferin setelah dimurnikan dengan kromatografi kolom hidrosilapetit terdiri dari beberapa fraksi protein asites. Setelah dilihat dengan spektrofotometer dapat digambarkan sebagai grafik dengan tiga puncak. Dengan cara elektroforesis dan *ELISA* dapat ditunjukkan bahwa puncak 1 & 2 merupakan fraksi protein asites yang mengandung albumin (tabung no. 3 s/d no. 9), sedang puncak 3 mengandung imunoglobulin yang telah murni (tabung no. 14 s/d no. 22) (GAMBAR. 1, 2 dan 3).



GAMBAR 1. – Grafik hasil kromatografi dari asites setelah dimurnikan dan dilihat dengan spektrofotometer mempunyai tiga puncak.



GAMBAR 2. – Grafik hasil pemeriksaan imunoglobulin fraksi protein dengan cara ELISA Puncak 1&2: tidak mengandung imunoglobulin Puncak 3 : mengandung imunoglobulin.



GAMBAR 3. – Hasil elektroforesis fraksi protein asites

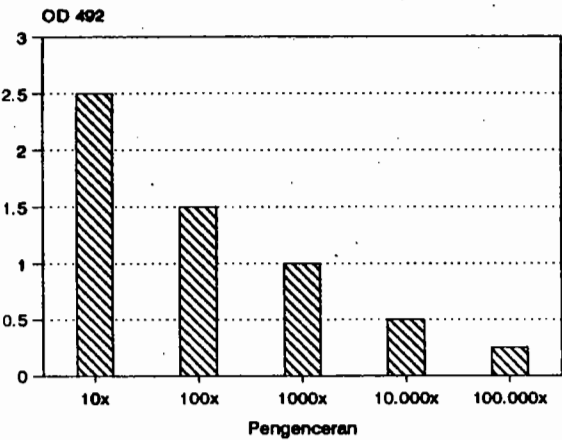
1. Protein baku
2. Albumin
3. Albumin + imunoglobulin
4. Albumin (sedikit) + imunoglobulin
5. Imunoglobulin: H - heavy chain
L - light chain

Klasifikasi dan titer antibodi monoklonal

Pada penelitian ini diperoleh 15 klon hibrid tetapi yang menghasilkan antibodi hanya 4 klon (Fsc 4, Fsc 6, Fsc 11 dan Fsc 15). Antibodi monoklonal yang dihasilkan termasuk sub-kelas IgG₁ rantai kappa (dua klon), IgG_{2b} rantai kappa (satu klon) dan IgG₃ rantai kappa (satu klon). Dari ketiga macam sub-kelas imunoglobulin tersebut yang paling tinggi titernya IgG₁ karena dengan pengenceran 10⁴x masih menunjukkan reaksi positif dengan protein selubung filaria B. malayi (TABEL 1 dan GAMBAR 4).

TABEL 1. – Klasifikasi antibodi monoklonal

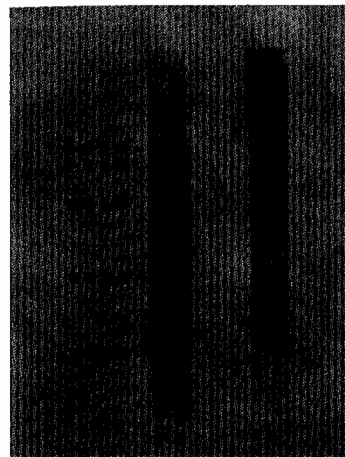
Anti - Ig	Antibodi monoklonal			
	Fsc 4	Fsc 6	Fsc 11	Fsc 15
Anti IgG ₁	+	+	-	-
Anti IgG _{2a}	-	-	-	-
Anti IgG _{2b}	-	-	-	+
Anti IgG ₃	-	-	+	-
Anti IgM	-	-	-	-
Anti IgA	-	-	-	-
Anti kappa	+	+	+	+
Anti lamda	-	-	-	-



GAMBAR 4. – Grafik hasil penetapan titer antibodi monoklonal dengan cara ELISA.

Epitop protein selubung B. malayi yang dikenal antibodi monoklonal

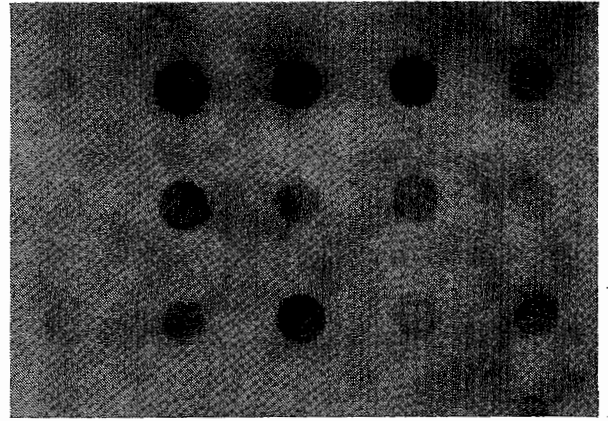
Antibodi monoklonal yang dihasilkan mengenal fraksi protein dengan berat molekul 40 kD (GAMBAR 5). Dengan immunogold labelling dan dilihat dengan mikroskop elektron antibodi monoklonal tersebut dapat bereaksi spesifik dengan selubung filaria B. malayi (GAMBAR 6).



GAMBAR 5. – Fraksi protein selubung filaria yang dikenal antibodi monoklonal: 40 kD.



GAMBAR 6. – Antibodi monoklonal bereaksi spesifik dengan selubung filaria B. malayi. (Perbesaran 1400x)



GAMBAR 7. – Hasil pemeriksaan antigen beredar dalam serum hewan coba yang diinfeksi filaria dengan teknik dot-blot.

Spesifikasi antibodi monoklonal

Antibodi monoklonal yang dihasilkan bereaksi dengan antigen B. malayi dengan cara ELISA menunjukkan *optical density* lebih tinggi jika dibanding dengan antigen nematoda lain seperti: antigen B. pahangi, A. lumbricoides dan Hookworm (TABEL 2).

TABEL 2. – Reaksi imunologis antibodi monoklonal dengan berbagai macam antigen nematoda yang diperiksa dengan cara ELISA

Antibodi monoklonal	<i>optical density</i> antigen			
	Bm	Bp	Al	Hw
Fsc 4	1.538	0.867	0.432	0.456
Fsc 6	1.768	0.765	0.358	0.412
Fsc 11	1.563	0.378	0.325	0.368
Fsc 16	1.658	0.752	0.463	0.431

Optical density dibaca pada panjang gelombang: 492 nm

Optical density kontrol negatif: 0.365 ± 0.076

Fsc: filarial surface coat

Bm : B. malayi Al : A. lumbricoides

Bp : B. pahangi Hw : Hookworm

Uji kemampuan antibodi monoklonal untuk deteksi antigen beredar dalam serum hewan coba gerbil yang diinfeksi filaria B. malayi

Dengan teknik dot-blot dapat ditunjukkan bahwa antibodi monoklonal mampu mengikat antigen beredar dalam serum gerbil yang diinfeksi filaria dan tidak menunjukkan reaksi dengan serum gerbil normal (GAMBAR 7).

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah berhasil dibuat empat macam antibodi monoklonal filaria B. malayi dari selubungnya sebagai antigen (Fsc 4, Fsc 6, Fsc 11 dan Fsc 16). Tetapi hanya ada satu macam antibodi monoklonal (Fsc 11) yang mempunyai karakter mengenal satu macam fraksi protein yaitu 40 kD, sedang antibodi monoklonal yang lain masih mengenal beberapa fraksi protein, di samping itu dengan *immunogold-labelling* dapat ditunjukkan bahwa antibodi monoklonal tersebut benar-benar spesifik terhadap selubung filaria. Karakter yang lain dari antibodi monoklonal tersebut adalah termasuk sub-kelas IgG₁, IgG_{2b}, IgG₃ dan terbukti dapat mengikat antigen beredar dalam serum hewan coba yang diinfeksi filaria malayi dan masih bereaksi lemah dengan protein B. pahangi, A. lumbricoides dan Hookworm. Dengan cara ELISA dapat ditunjukkan bahwa dengan antigen B. malayi bereaksi lebih kuat (*optical density* antara 1.538 - 1.768) jika dibandingkan dengan antigen nematoda yang lain. Dengan antigen nematoda yang lain, *optical density* rendah antara 0.325 - 0.867. B. pahangi bereaksi lebih kuat dari pada nematoda intestinal. Karena B. pahangi dengan B. malayi termasuk nematoda jaringan dan satu genus, kemungkinan besar mempunyai pola protein yang sangat mirip satu sama lainnya. Dari keempat macam antibodi monoklonal yang dihasilkan, Fsc 11 mempunyai spesifitas terhadap B. malayi lebih unggul jika dibandingkan dengan antibodi monoklonal

lainnya. Antibodi monoklonal Fsc 11 hanya bereaksi positif dengan antigen B. malayi sedang dengan antigen nematoda lainnya bereaksi negatif. Hal ini dapat dijelaskan dengan cara ELISA bahwa Fsc 11 mengikat antigen B. malayi dengan OD: 1.563, antigen B. pahangi OD: 0.378, antigen A. lumbricoides OD: 0.325 dan dengan antigen *Hookworm* OD: 0.368, sedang OD kontrol negatif 0.365 ± 0.076 .

Pembuatan antibodi monoklonal filaria B. malayi sebenarnya telah banyak dilakukan oleh peneliti-peneliti sebelumnya. Masing-masing peneliti menggunakan antigen yang berbeda-beda untuk menginduksi sel limfosit mencit sebelum difusikan dengan sel mieloma, sehingga diperoleh antibodi monoklonal yang berbeda-beda karakternya. Antibodi monoklonal dari *crude antigen* stadium larva infeksi (L₃) filaria B. malayi yang diperoleh dengan cara sonikasi, mempunyai sifat mengenal beberapa fraksi protein dengan berat molekul: 36, 52, 67 dan 80 kD². Antibodi monoklonal yang lain diperoleh dari antigen stadium mikrofilaria B. malayi^{8,9}. Antibodi monoklonal yang dihasilkan mempunyai sifat-sifat: protektif terhadap mikrofilaria dan mengenal beberapa fraksi protein dengan berat molekul: 70, 75 dan 110 kD. Peneliti lain membuat antibodi monoklonal dari protein selubung larva infeksi B. pahangi sebagai antigen untuk menginduksi sel limfosit mencit¹⁰. Antibodi monoklonal yang dihasilkan sifatnya belum spesifik karena masih adanya reaksi silang dan masih mengenal protein stadium larva B. pahangi maupun B. malayi. Akhir-akhir ini juga ada peneliti yang telah berhasil membuat antibodi monoklonal dari selubung mikrofilaria filaria non-limfatik (*Onchocerca*). Ternyata antibodi monoklonal tersebut mengenal fraksi protein 14, 92 kD dan masih bereaksi silang dengan protein filaria limfatik lainnya¹¹.

KESIMPULAN

Antibodi monoklonal spesifik selubung larva stadium infeksi B. malayi mempunyai ciri sebagai berikut:

1. termasuk sub-kelas IgG₁, IgG_{2b} dan IgG₃
2. antibodi monoklonal Fsc 11 mengenal satu macam fraksi protein dengan berat molekul 40 kD

3. antibodi monoklonal Fsc 11 hanya bereaksi spesifik dengan protein B. malayi, sedang lainnya bereaksi dengan protein B. pahangi, A. lumbricoides dan *Hookworm* dengan OD rendah.
4. Dapat diaplikasikan untuk mendeteksi antigen beredar dalam serum hewan coba yang diinfeksi filaria B. malayi, dengan pengenceran 1: 1000 dengan cara dot-blot.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr Noerhayati Soeripto yang telah membimbing dalam penulisan makalah ini.

KEPUSTAKAAN

1. WHO. Control of lymphatic filariasis. A manual for health personnel. Geneva: WHO, 1987
2. Parab PB, Rajasekariah GR, Chandrashekar R, Alkan SS, Braun DG, and Subrahmanyam D. Characterization of monoclonal antibody against infective larvae of *Brugia malayi*. Immunology, 1988; 64:169-74.
3. Stanker LH, Vanderlaan M, Salinas JH. One step purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid by hydroxylapatite chromatography. J Immunol Methods, 1985, 76:157-69.
4. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci. USA, 1979; 76(9):4350-54.
5. Tsang VCW, Jose Paralta M, Simaon RA. Enzyme linked immuno-electrotransblot technique (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Meth Enz, 1983; 92:377-91.
6. Frevert U, Reinwald E, Dietrich C, Risse HJ. Isolation and immunoelectronmicroscopical characterization of *Theileria annulata* macroschizont. Z. Parasitenkd 1986; 72:617-630.
7. Liddel JE, Cryer A. A Practical guide to monoclonal antibodies. John Willey & Sons., 1993.
8. Canlas M, Wade A, Lamontagne L and Piessens WF. A monoclonal antibody to surface antigens on microfilariae of *Brugia malayi* reduces microfilaremia in infected jird. Am J Trop Med Hyg. 1984;33:420.
9. Aggarwal A, Cona W, Haque DC, Capron A. Resistance against *Brugia malayi* microfilariae induced by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognize surface antigens. Immunology, 1985; 54:655.

10. Oikawa Y, Ikeda T, Horii Y, Fujita K and Tsukidate S. *Brugia pahangi*: Production of a monoclonal antibody reactive with the surface of infective larvae. *Exp. Parasitol*, 1992; 75: 146-54.
11. Conraths FJ, Hammett HW, Worms MJ, Parkhouse RME Immunological cross reaction between an *Onchocerca* paramyosin-like molecule and a microfilaria surface antigen. *Trop Med Parasitol*, 1992; 43:135-8.