ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP ANTIGEN PROTEIN 36 KD DARI *Mycobacterium leprae* DAN APLIKASINYA DALAM SERODIAGNOSIS LEPRA

Hardyanto Soebono
Jurusan Ilmu Kedokteran Medik
Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

Identification of *M. leprae* antigens and development of monoclonal antibodies to those antigens have brought about progress in the serodiagnosis of leprosy and have partly overcome the limitations of clinical, bacteriological dan histopathological diagnosis. Thirty six kD protein antigen of *M. leprae* contains a specific epitope of *M. leprae* which is recognized both by monoclonal antibody and by T-cells.

Elisa Inhibition is a serological test using the monoclonal antibody to the 36 kD protein of *M. leprae* antigen. In Indonesian populations, this test shows high sensitivity (98.1% for *multibacilary* and 81.8% for *paucibacilary* leprosy) with 92% specificity. Compared to the other serological tests, using monoclonal antibody in the test has resulted in higher sensitivity and specificity. Because of the high sensitivity for both *paucibacilary* and *multibacillary* leprosy, it is suggested that the epitop on 36 kD protein of *M. leprae* antigen is immunodominant.

This paper describes preparation of antigen and monoclonal antibody, and the Elisa Inhibition test, and application in serodiagnosis of leprosy and infection of *M. leprae*.

Key Words : leprosy, *M. leprae*, 36 kD protein antigen, monoclonal antibody, epitope, immunodominant, Elisa Inhibition assay.

Pendahuluan

Penyakit lepra merupakan penyakit infeksi kronik pada manusia yang disebabkan oleh *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Jumlah penderita lepra di dunia saat ini terdaftar sekitar 3,7 juta, namun jumlah yang sesungguhnya mungkin 2 sampai 3 kalinya (WHO, 1991). Walaupun penyakit ini tidak fatal, namun cacat dan stigma akibat penyakit ini merupakan masalah kesehatan yang serius. Sehingga WHO memasukkan penyakit lepra ke dalam penyakit tropis di dunia yang perlu mendapat perhatian dalam pemberantasannya.

Keterbatasan pemeriksaan klinis, bakteriologis dan histopatologis dalam diagnosis lepra telah diketahui, terutama pada kasus-kasus stadium dini (Ponnighaus & Fine, 1988). Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan lain sebagai penunjang tes diagnostik yang ada, dan tes serologi tampaknya merupakan alternatif sebagai tes diagnostik. Beberapa tes serologi telah dikembangkan sejak awal abad ini, namun sensitifitas dan spesifitasnya masih jauh dari memadai. Hal ini disebabkan karena komponen antigenik *M. leprae* yang memainkan peran dalam imunopatologi lepra serta respons imun terhadap kuman lepra waktu itu belum banyak diketahui. Hal ini disebabkan terutama karena *M. leprae* sampai saat ini belum dapat dibiakkan secara *in vitro*.

Keberhasilan inokulasi kuman lepra pada telapak kaki mencit (Shepard, 1960 *cit.* Rees, 1986) dan pada binatang armadillo (Kirchheimer & Storrs, 1971) merupakan

era baru dalam penelitian penyakit lepra. Beberapa antigen kuman lepra kemudian telah diketahui dan diteliti peranannya dalam respons imun terhadap *M. leprae* (Gaylord & Brennan, 1987). Antigen-antigen ini dapat dikelompokkan menjadi: antigen karbohidrat dan antigen protein. Contoh antigen karbohidrat adalah *phenolic glycolipid-I* (PGL-I) dan *lipoarabinomannan* (LAM). PGL-I merupakan antigen yang banyak dipergunakan dalam serodiagnosis, dan diduga berperan dalam mekanisme supresi spesifik dari imunitas seluler penderita lepra lepromatosa (Mehra *et al.*, 1984). Sedangkan LAM ternyata kurang spesifik untuk infeksi *M. leprae*, karena serum penderita infeksi mikobakterial lain juga reaktif terhadap antigen ini (Brennan, 1986).

Dengan antibodi monoklonal beberapa antigen protein dari *M. leprae* telah diidentifikasi dan diketahui imunogenisitasnya, yaitu protein: 12 kD, 18 kD, 35 kD, 36 kD, 65 kD dan 70 kD (Engers *et al.*, 1985). Dengan teknologi DNA rekombinan protein-protein tersebut telah dapat diekspresikan pada *E. coli* (Young *et al.*, 1985), dan saat ini gena untuk protein 18 kD, 28 kD, 36 kD, 65 kD dan 70 kD telah dapat diketahui (Mehra *et al.*, 1986; Lamb *et al.*, 1987; Thole *et al.*, 1990). Antigen protein 36 kD yang membawa epitop spesifik *M. leprae* telah dikenal oleh antibodi monoklonal F47-9 (Klatser *et al.*, 1984; 1986) dan dikembangkan dalam tes Elisa Inhibisi untuk serodiagnosis lepra (Klatser *et al.*, 1985). Selain dikenal oleh sistem imunitas humoral, ternyata protein 36 kD juga dikenal oleh sel limfosit T penderita lepra tuberkuloid dan tampaknya berperan dalam regulasi sistem imunitas seluler penderita lepra (Ottenhoff *et al.*, 1986).

Pada makalah ini akan disajikan hasil penelitian tes Elisa Inhibisi dengan menggunakan antibodi monoklonal (F47-9) dalam diagnosis lepra dan infeksi *M. leprae* di Indonesia.

Bahan dan Cara Kerja

Antigen

M. leprae diambil dari hepar binatang armadillo yang telah diinfeksi sebelumnya. Kemudian dilakukan ultrasonikasi menurut Klatser *et al.* (1984). Sediaan antigen dilakukan dengan mengekstraksi 10 mg pelet dari sonikat tersebut dengan 2% Nadioxycholat selama 10 menit pada suhu 100°C. Ekstrak ini kemudian disentrifugasi pada 10.000 g selama 5 menit dan diencerkan 1:1 dengan gliserol. Sebagai pengawet ditambahkan thimerosal dengan konsentrasi 0,02% dan selanjutnya disimpan pada suhu - 20°C. Antigen protein 36 kD terutama terdapat pada pelet sonikat tersebut dan akan larut pada waktu ekstraksi dengan Na-dioxycholat (Klatser *et al.*, 1984; 1986).

Pembuatan antibodi monoklonal

Mencit BALB/c diimunisasi secara intraperitoneal dengan 0,2 mg alum presipitat dari 100 mg supernatan sonikat *M. leprae*. Setelah 3 bulan dilakukan suntikan ulangan (*booster*) secara intravena dengan 0,25 mg sonikat dan 4 hari kemudian liennya diambil. Selanjutnya hibridisasi, kloning, kultur dari hibridoma terpilih dan penentuan kelas imunoglobulin dilakukan menurut Kolk *et al.* (1984). Seleksi antibodi mula-mula dilakukan dengan menguji supernatan hibridoma terhadap sonikat *M. leprae* dengan Elisa, dan kemudian dengan *SDS polyacrylamid gel electrophoresis immumnoperoxidase*

technique (SGIP). Spesifitas antibodi kemudian diuji dengan menggunakan beberapa macam spesies mikobakteria baik dengan Elisa dan SGIP.

Atas dasar spesifitas terhadap antigen protein 36 kD dari *M. leprae*, diambil satu klon F47-9 yang merupakan IgG1 untuk tes serologi (Klatser *et al.*, 1984). Antibodi monoklonal spesifik yang telah diseleksi kemudian di produksi dalam cairan ascites mencit BALB/c. Selanjutnya IgG dipisahkan dari cairan ascites yang telah dipresipitasi dengan 50% amonium sulfat dengan *diethylamino ethylcellulose* (DEAE-Affigel Biru-Biorad, USA). Kemudian dilakukan konjugasi antibodi monoklonal ini dengan peroksidase menurut Nakane & Kawaoi (1974).

Serum

Serum diambil dari 96 penderita lepra baru (yang belum pernah diobati) di RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta, yang terdiri atas 52 penderita lepra multibasiler (MB) dengan 10 penderita lepra lepromatosa (LL), 31 *borderline lepromatosa* (BL), 11 *borderline* (BB), dan 44 lepra pausibasiler (PB) yang terdiri atas 14 lepra tuberkuloid (TT) dan 30 *borderline tuberkuloid* (BT). Diagnosis dan klasifikasi lepra ditegakkan berdasar pemeriksaan klinis, bakteriologis dan histopatologis.

Sebagai pembanding diperiksa juga sebanyak 43 sera dari orang-orang kontak serumah dengan penderita lepra yang tidak menunjukkan tanda-tanda klinis lepra yang terdiri atas 23 kontak dengan lepra MB dan 20 kontak dengan lepra PB. Untuk menentukan nilai ambang seropositif diambil serum dari 50 donor darah sehat di PMI Cabang Kodya Yogyakarta.

Tes Elisa Inhibisi (Elisa-Inh)

Prosedur tes Elisa-Inh dilakukan sesuai Klatser *et al.* (1985), ringkasnya sebagai berikut: sumur-sumur (*wells*) pada lempeng mikrotiter dengan dasar rata (*Greiner*) dilapis dengan 100 μl/sumur larutan *M. leprae* (0,5 ug/ml) dalam 0,05 M larutan bufer sodium bikarbonat, pH 9,6, selama 18 jam pada suhu 37°C. Lempeng kemudian dibilas 3 kali dengan PBS yang mengandung Tween-20 0,05% (PBST). Selanjutnya masing-masing sumur ditambah 20 μl serum dan 80 μl larutan antibodi monoklonal terlabel peroksidase yang diencerkan 1:1.000 dalam PBST plus 1% BSA, dan lempeng diinkubasi selama 3 jam pada 37° C. Sesudah dicuci dengan PBST, sumur-sumur diberi 100 μl larutan substrat (12 mg 3,3, 5,5 *tetramethylbenzidine* (TMB) dalam 5 ml ethanol plus 15 ml 0,1 M larutan bufer fosfat-sitrat, pH 5,0 dan 0,015% hidrogen peroksida). Reaksi dihentikan setelah 15 menit dengan menambahkan 50 μl 2 M larutan asam sulfat.

Hasil diukur dengan spektrofotometer Elisa (Titertek MCC340/MKII, *Flow Lab.*), dinyatakan dengan densitas optik (DO). Tiap lempeng tes, selalu memakai serum kontrol negatif (DO = 1,500) dan 3 serum kontrol positif (75, 50 dan 15% inhibisi). Tiap serum dites secara duplo.

Titer antibodi dinyatakan secara relatif dengan persentase inhibisi terhadap DO serum negatif, yaitu :

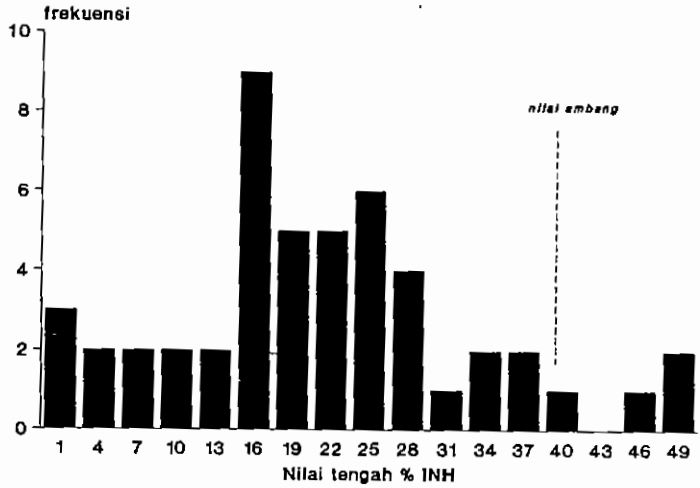
$$\% \text{ inhibisi} = \left(1 - \frac{\text{DO sampel}}{\text{DO neg.}}\right) \times 100\ \%$$

ISSN 0215-1936

Hasil Penelitian

Penetapan nilai ambang seropositif tes Elisa-Inh

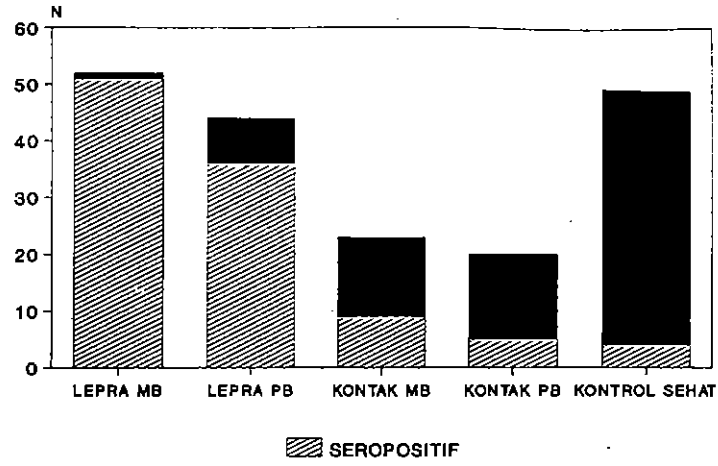
Dari 50 donor darah yang diambil sebagai kontrol negatif, satu serum rusak dan tidak diikutkan dalam analisis. Hasil tes Elisa-Inh pada 49 donor darah sehat di Yogyakarta menunjukkan bahwa nilai rerata %-inhibisi 29,71% ± 11,59. Gambar 1 menunjukkan grafik nilai tes Elisa-Inh pada donor darah sehat. Nilai ambang seropositif ditetapkan dengan mengambil persentil 99% dari %-inhibisi, yang terdapat pada nilai 39,05%. Dengan mengambil nilai 39,05%, maka sebanyak 4 dari 49 kontrol dianggap seropositif.



Gambar 1. Nilai tes Elisa-Inhibisi pada donor darah sehat

Seropositifitas pada penderita lepra dan orang kontak.

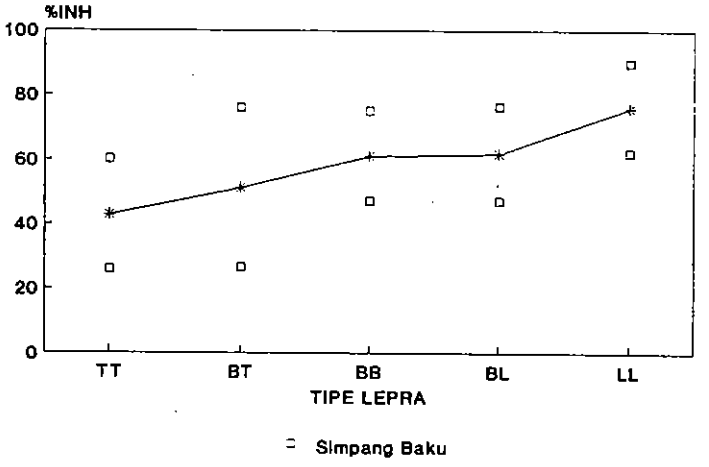
Gambar 2 menunjukkan jumlah seropositif pada penderita lepra dan kontak. Ternyata 98,1% (51/52) penderita lepra MB memberikan seropositif, sedang penderita lepra PB 81,8% (36/44) dan kontak dengan penderita MB 39,1% (9/23) dan kontak penderita PB 25% (5/20) ($p < 0,05$, uji chi-kuadrat).



Gambar 2. Seropositif pada penderita lepra dan kontak

Kadar antibodi pada spektrum lepra

Gambar 3 menunjukkan hubungan antara kadar antibodi yang dinyatakan dalam %-Inh dengan tipe-tipe lepra. Dapat dilihat pada grafik tersebut bahwa rerata kadar antibodi paling tinggi pada lepra LL dan menurun berturut-turut ke arah TT. Perbedaan ini sangat bermakna antara lepra LL dengan semua tipe yang lain, sedang antara TT dan BT, serta BB dan BL perbedaan ini tidak bermakna ($p<0,05$, ONEWAY-ANOVA, DUNCAN MRT).



Gambar 3. Titer antibodi penderita lepra menurut spektrumnya

Pembahasan

Tes Elisa Inhibisi merupakan suatu tes serologi yang memanfaatkan antibodi monoklonal terhadap epitop spesifik yang terdapat pada antigen protein 36 kD dari *M. leprae*. Protein ini pertama kali diidentifikasi oleh Klatser et al. (1984) dengan metode *sodium dodecylsulphat polyacrylamid gel electro-phoresis immunoperoxidase* (SGIP) dengan menggunakan serum penderita lepra. Protein 36 kD terutama terdapat pada fraksi pelet sonikat *M. leprae*, dan hanya dapat dilarutkan dengan ekstraksi dengan sodium *deoxycholat*. Hal ini membuktikan bahwa protein 36 kD merupakan bagian integral dari membran sel *M. leprae* (Klatser *et al.*, 1984).

Untuk menetapkan nilai ambang positif tes pada tes Elisa-Inhibisi dengan antibodi monoklonal terhadap antigen protein 36 kD *M. leprae* dipergunakan sejumlah serum dari donor darah sehat di Yogyakarta, dengan asumsi bahwa Yogyakarta merupakan daerah non endemik lepra, sehingga diharapkan nilai positif palsu yang diperoleh sekecil mungkin. Dengan mengambil persentil 99, diperoleh nilai ambang seropositif pada inhibisi 39,05%. Dengan patokan nilai ini, maka spesifitas tes diperoleh sebesar 91,8%, yang berarti 8,2% kontrol sehat dianggap positif. Hal ini sesuai jika dilihat dari histogram nilai Elisa-Inh (Gambar 1), yang menunjukkan adanya semacam 'batas' antara nilai normal dan abnormal yaitu pada 40-43% inhibisi. Bahwa dari kontrol sehat tersebut ada 8,2% positif, kemungkinan memang mereka telah terinfeksi sebelum datang ke Yogyakarta yang pada penelitian ini tidak dilakukan seleksi dari mana para donor darah berasal.

Pada penderita lepra yang belum diobati, 98,1% lepra multibasiler dan 81,8% lepra pausibasiler menunjukkan seropositif dengan tes ini. Atau dengan kata lain sensitifitas tes Elisa-Inh untuk lepra MB sebesar 98,1% dan untuk lepra PB sebesar 81,8%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa antigen protein 36 kD dari *M. leprae* ini kemungkinan mengandung epitop yang imunodominan, karena seropositifitas tidak hanya pada lepra MB seropositif tetapi juga sebagian besar lepra PB. Hal ini menunjukkan keunggulan tes Elisa-Inh dibanding dengan tes serologi sebelumnya, yang memberikan seropositifitas yang rendah pada lepra tuberkuloid atau pausibasiler (Abe *et al.*, 1980; Sinha *et al.*, 1985; Young & Buchanan, 1983; Cho *et al.*, 1983; Fujiwara *et al.*, 1984; Izumi *et al.*, 1990).

Adanya gradasi kadar antibodi pada spektrum penderita lepra menunjukkan bahwa tes Elisa-Inh mempunyai validitas yang tinggi dalam mengukur infeksi *M. leprae*. Pada lepra tipe LL dengan kepadatan kuman lepra yang tinggi mempunyai kadar antibodi yang tinggi, dan kemudian menurun sesuai dengan derajat kepadatan basil sepanjang spektrum lepra sampai paling rendah pada tipe TT (Gambar 3). Meskipun pada lepra TT kadar antibodi terendah dibanding tipe lain, seperti terlihat pada Gambar 2, tes ini masih memberikan kepositifan sebesar 81,8% pada lepra pausibasiler (TT/BT).

Kemungkinan penggunaan tes ini untuk deteksi infeksi sub-klinik *M. leprae* telah dicoba pada orang-orang kontak serumah dengan penderita lepra. Ternyata kontak serumah dengan penderita lepra MB memberikan persentase seropositif yang lebih tinggi daripada kontak dengan lepra PB (Gambar 2). Hal ini dapat dimengerti karena pada lepra MB lebih banyak mengandung kuman lepra daripada lepra PB, sehingga

risiko tertular infeksi *M. leprae* lebih besar jika kontak dengan penderita lepra MB dari pada kontak dengan lepra PB.

Dengan sensitifitas dan spesifitas yang tinggi dari tes Elisa-Inh baik untuk lepra MB maupun PB, maka diperlukan penelitian dengan skala yang lebih luas untuk melihat kegunaannya sebagai tes diagnostik infeksi *M. leprae*.

Kesimpulan

Aplikasi antibodi monoklonal terhadap antigen protein 36 kD dari *M. leprae* pada dalam serodiagnosis lepra telah memberikan spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi, khususnya pada lepra PB tes ini memberikan sensitifitas yang tinggi yang mengatasi kelemahan dari pada tes-tes serologi sebelumnya.

Oleh karena menggunakan antibodi monoklonal yang dikompetisikan dengan antibodi dalam serum, maka waktu yang diperlukan untuk mengerjakan tes Elisa-Inh lebih singkat daripada tes-tes sebelumnya. Di samping itu karena telah menggunakan antibodi monoklonal maka tidak lagi diperlukan pemurnian fraksi antigen secara terpisah.

Penggunaan Elisa-Inh dalam penelitian epidemiologik berskala luas diperlukan untuk memahami epidemiologi penyakit lepra.

Kepustakaan

Abe, M., Managawa, T., Yoshino, Y., Ozawa, T., Saikawa, K., & Saito, T. 1980 *Fluorescent Leprosy Antibody Absorption* (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* 48: 109-119.

Brennan, P.J. 1986 The carbohydrate-containing antigens of *Mycobacterium leprae*. *Lepr. Rev.* 57(2): 39-51.

Cho, S.N., Yanagihara, D.L., Hunter, S.W., Gelber, R.H., & Brennan, P.J. 1983 Serological specificity of phenolic glycolipid-I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.* 41: 1077-1083.

Engers, H.D., Abe, M., Bloom, B.R., Mehra, V., Britton, W., Buchanan, T.M., Khanolkar, S.K., Young, D.B., Closs, O., Gillis, T., Harboe, M., Ivanyi, J., Kolk, A.H.J., & Shepard, C.C. 1985 Results of World Health Organization sponsored Workshop on monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 48: 603-605.

Fujiwara, T., Hunter, S.W., Cho, S.N., Aspinall, G.O., & Brennan, P.J. 1984 Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharides protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.* 43 : 245-252.

Gaylord, H., & Brennan, P.J. 1987 Leprosy and the leprosy bacillus: Recent developments in characterization of antigens and immunology of the disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 645-657.

Izumi, S., Fujiwara, T., Ikeda, M., Nishimura, Y., Sugiyama, K., & Kawatsu, K. 1990 Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field. *J. Clin. Microbiol.* 28: 525-529.

Kirchheimer, W.F., & Storrs, E.E. 1971 Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcintus Linn*). as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr.* 39: 693-702.

Klatser, P.R., van Rens, M.M., & Eggelte, T.A. 1984 Immunochemical characterization of *Mycobacterium leprae* antigens of the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis immunoperoxidase technique (SGIP) using patients sera. *Clin. Exp. Immunol.* 56: 537-544.

Klatser, P.R., de Wit, M.Y.L., & Kolk, A.H.J. 1985 An Elisa-Inhibition test using monoclonal antibody for the serology of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 62: 468-473.

Klatser, P.R., Hartskeerl, R.A., van Schooten, W.C.A., Kolk, A.H., van Rens, M.M., & de Wit, M.Y.L. 1986 Characterization of the 36 K antigen of *Mycobacterium leprae*. *Lepr. Rev.* 57(2): 77-81.

Kolk, A.H.J., Ho, M.L., Klatser, P.R., Eggelte, T.A., Kuijper, S., De Jonge, S., & van Leeuwen, J. 1984 Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* (BCG) and *M. leprae*. *Clin. Exp. Immunol.* 5: 511-521.

Lamb, J.R., Ivanyi, J., Rees, A.D.M., Rothbard, J.B., Howland, K., Young, R.A., & Young, D.B. 1987 Mapping of T. cell epitopes using recombinant antigens and synthetic peptides. *EMBO J.* 6: 1245-1249.

Mehra, V., Brennan, P.J., Rada, E., Convit, J., & Bloom, B.R. 1984 Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. *Nature* 308: 194-196.

Mehra, V., Sweetser, D., & Young, R. 1986 Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 7013-7017.

Nakane, P.K. & Kawaoi, A. 1974 Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1084-1092.

Ottenhoff, T.H.M., Klatser, P.J., Ivanyi, J., Elferink, D.G., de Wit, M.Y.L., & de Vries, R.R.P. 1986 *Mycobacterium leprae*-specific protein antigens defined by cloned human helper T-cells. *Nature* 319: 66-68.

Ponnighaus, J.M., & Fine, P.E.M. 1988 Leprosy in Malawi. 1. Sensitivity and specificity of the diagnosis and the search for risk factors for leprosy. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 803-809.

Rees, R.J.W. 1986 The Contribution of Charles Shepard to leprosy research: from the mouse footpad model to new DNA technology. *Lepr. Rev.* 57(2): 1-14.

Sinha, S., Sengupta, U., Ramu, G., & Ivanyi, J. 1985 Serological survey of leprosy and control subjects by a monoclonal antibody-based immunoassay. *Int. J. Lepr.* 53: 33-38.

Thole, J.E.R., Stabel, L.F.E.M., Suykerbuyk, M.E.G., de Wit, M.Y.L., Klatser, P.R., Kolk, A.H.J., & Hartskeerl, R.A. 1990 A Major immunogenic 36,000-molecular weight antigen from *Mycobacterium leprae* contains an immunoreactive region of proline-rich repeats. *Infect. Immun.* 58: 80-87.

Young, D.B., & Buchanan, T.M. 1983 A serological test for leprosy with glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science* 221: 1057-1059.

Young, R.A., Mehra, V., Sweetser, D., Buchanan, T., Clark Curtiss, J., Davis, R.W., & Bloom, B.R. 1985 Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. *Nature* 316: 450-452.

WHO 1991 *Tropical Disease. Progress in research, 1989-1990. Tenth Programme Report of the UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)*. WHO, Geveva.