

Produksi Antibodi Anti-*Dirofilaria immitis* Untuk Pengembangan Diagnosis Dirofilariasis Pada Anjing

(*THE PRODUCTION OF ANTI-*Dirofilaria immitis* ANTIBODIES FOR THE DIAGNOSIS
DEVELOPMENT OF DIROFILARIASIS IN DOGS*)

I Gusti Made Krisna Erawan¹, Ida Tjahajati², Wisnu Nurcahyo³, Widya Asmara⁴

¹Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jln. Sudirman, Denpasar-Bali, Email: *krisnaerawan@yahoo.com*
²Bagian Penyakit Dalam, ³Bagian Parasitologi, ⁴Bagian Mikrobiologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Dirofilaria immitis (*D. immitis*) sebagai agen penyebab penyakit cacing jantung tidak hanya menimbulkan masalah pada hewan tetapi juga bersifat zoonosis. Untuk mendiagnosis dirofilariasis (penyakit yang disebabkan oleh *D. immitis*) secara serologis dibutuhkan antibodi anti-*D. immitis*. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi antibodi terhadap antigen ekskretori-sekretori cacing jantan dan cacing betina untuk pengembangan diagnosis berbasis deteksi antigen. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa antigen ekskretori-sekretori jantan (*male excretory-secretory antigens*/MES), antigen ekskretori-sekretori betina (*female excretory-secretory antigens* FES) dan antigen ekskretori-sekretori jantan dicampur dengan betina (MES+FES) *D. immitis* dapat merangsang pembentukan antibodi poliklonal pada mencit BALB/c dengan pola produksi yang sama. Antibodi telah terbentuk pada hari ke-21 dan titernya mencapai puncak pada hari ke-35 setelah imunisasi.

Kata kunci: *Dirofilaria immitis*, antibodi, antigen ekskretori-sekretori

ABSTRACT

Dirofilaria immitis (*D. immitis*) as a causative agent of heartworm disease is not only caused problems in animals but also zoonoses. For diagnosis of dirofilariasis (disease caused by *D. immitis*) serologically is needed anti-*D. immitis* antibodies. The objective of this study was to produce antibodies against excretory-secretory antigens produced by male and female worms for developing the diagnosis of dirofilariasis based on the antigens detection. Base on this study can be concluded that male excretory-secretory antigens (MES), female excretory-secretory antigens (FES), and MES+FES can stimulate BALB/c mouse to produce polyclonal antibodies in the same pattern. Antibodies have been produced at day 21 and the peak titter was at day 35 after first immunization.

Keywords: *Dirofilaria immitis*, antibodies, excretory-secretory antigens

PENDAHULUAN

Infeksi cacing jantung (dirofilariasis) yang disebabkan oleh *D. immitis* telah tersebar luas di daerah tropis dan subtropis (Aranda *et al.*, 1998; Bolio-Gonzalez *et al.*, 2007). Cacing *D. immitis* merupakan parasit filaria yang paling penting pada anjing (Reifur *et al.*,

2004). Sebagai agen penyebab penyakit cacing jantung *D. immitis* tidak hanya menimbulkan masalah pada hewan tetapi juga bersifat zoonosis (Cruz-Chan *et al.*, 2009; Genchi *et al.*, 2009; Alia *et al.*, 2013).

Pada survey epidemiologi dirofilariasis, berbagai metode telah

digunakan untuk menentukan status infeksi, termasuk pemeriksaan mikroskopik pada ulas darah, teknik konsentrasi sampel darah, *Knott's test* untuk mendeteksi mikrofilaria pada sirkulasi (Aranda et al., 1998; Meriem-Hind dan Mohamed, 2009), pemeriksaan cacing dewasa dengan nekropsi (Bolio-Gonzalez et al., 2007), radiografi dan elektrokardiografi (Akhtardanesh et al., 2010).

Masalah utama dalam penegakan diagnosis adalah adanya infeksi yang bersifat samar (*occult*) infeksi atau infeksi tanpa disertai adanya mikrofilaria pada darah perifer. Jumlah infeksi samar tersebut dapat mencapai 10-67% pada anjing yang terinfeksi secara alami (Song et al., 2002). Infeksi tanpa disertai mikrofilaria tersebut sangat sukar didiagnosis dengan pemeriksaan darah secara mikroskopik. Pemeriksaan dan identifikasi cacing dewasa secara nekropsis hanya dapat dilakukan pada hewan yang telah mati/dieutanasi.

Penggunaan metode radiografi dan elektrokardiografi hasilnya kurang akurat. Beberapa cara untuk mendeteksi antibodi terhadap *D. immitis* memiliki beberapa kelemahan. Menurut Goodwin (1998), masalah utama dalam tes antibodi adalah hasilnya kurang spesifik. Sementara itu, penegakan diagnosis dengan metode molekuler membutuhkan peralatan khusus dan peralatan tersebut tidak selalu tersedia atau tidak terjangkau.

Kesulitan dalam menegakkan diagnosis *Dirofilaria* menginspirasi upaya mendeteksi antigen parasit sebagai alternatif diagnosis yang dapat lebih diandalkan. Pada penelitian ini produksi antibodi poliklonal anti-*D. immitis* dengan menggunakan antigen ekskretori-sekretori jantan (MES), antigen ekskretori-sekretori betina (FES) dan antigen ekskretori-sekretori jantan dicampur dengan betina (MES+FES) untuk pengembangan diagnosis dirofilariasis berbasis deteksi antigen.

METODE PENELITIAN

Isolasi Protein Ekskretori-Sekretori *D.immitis*

Protein ekskretori-sekretori (ES) cacing *D. immitis* dewasa dipersiapkan sebagai-mana dilakukan oleh Weil (1987). Secara singkat dilakukan sebagai berikut: cacing dewasa diperoleh dari arteri pulmoner dan/atau ventrikel kanan anjing penderita. Cacing tersebut dicuci dengan *Phosfat Buffer Saline* (PBS) pH 7,2 steril. Cacing jantan dan betina dipisahkan, ditempatkan pada media Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) dengan suplemen glukosa, penicillin G, streptomycin dan fungizone, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C dalam 5% CO₂. Media diganti setiap hari. Selanjutnya media kultur cacing dikonsentrasikan sebagaimana dilakukan oleh Soeyoko (1998). Media cacing jantan dan betina dipresipitasi dengan amonium sulfat jenuh selama satu malam kemudian disentrifugasi sehingga diperoleh endapan protein. Endapan protein disuspensikan, kemudian didialisis dengan larutan 0,1M PBS untuk mengurangi konsentrasi garam di dalam larutan.

Untuk memastikan bahwa protein yang diisolasi mengandung antigen *D. immitis* dilakukan pemeriksaan dengan antibodi monoklonal anti-*D. immitis* menggunakan *The Anigen Rapid Canine Heartworm Ag Test Kit 2.0* (Bionote, Inc.).

Pembuatan antibodi poliklonal anti-*D.immitis*

Pada penelitian ini digunakan 17 ekor mencit BALB/c jantan berumur 2 bulan. Setiap mencit diimunisasi dengan menyuntikkan 5 µg antigen MES, FES dan MES+FES masing-masing pada lima ekor mencit dalam *Freund's complete adjuvant* secara subkutan. Dua ekor mencit digunakan sebagai kontrol. Satu,

dua dan tiga minggu setelah penyuntikan yang pertama mencit disuntik lagi dengan 5 µg antigen ES dalam *Freund's incomplete adjuvant* secara subkutan. Darah mencit diambil pada hari ke-0, 21, 28, 35, 49 dan 63.

Penentuan titer antibodi pada serum mencit dilakukan dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menurut Maizels *et al.* (1991) dengan sedikit modifikasi. Protein/antigen ES *D. immitis* dilarutkan dalam 0,06 M *carbonat buffer* sehingga konsentrasinya menjadi 5 µg/ml. Setiap sumuran plat mikro dilapisi dengan 100 µl antigen, diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Antigen dibuang, dicuci tiga kali dengan 200 µl 0,1% Tween 20 di dalam PBS (TPBS) selama 3 menit setiap pencucian, kemudian ditambah dengan 200 µl 1% *bovine serum albumin* (BSA) dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama satu jam.

Setiap sumuran plat mikro dicuci dengan TPBS. Sejumlah 100 µl serum yang telah dilarutkan di dalam PBS ditambahkan ke dalam setiap sumuran plat mikro, kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 1 jam. Serum dibuang dan setiap sumuran plat mikro dicuci dengan TPBS. Kemudian setiap sumuran plat mikro ditambah dengan 100 µl konjugat (*alkaline phosphatase-conjugated goat anti mouse IgG*) yang dilarutkan di dalam PBS dengan perbandingan 1:3000, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu dicuci tiga kali dengan TPBS (selama 3 menit setiap kali pencucian). Pada setiap sumuran plat mikro ditambah 150 µl substrat (4-Nitrophenyl phosphat), diinkubasi kembali pada suhu 37°C. Nilai *optical density* (OD) dibaca pada ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm.

Untuk mengetahui tingkat pengenceran serum yang mampu menghasilkan diagnosis yang optimal dilakukan dengan *chequerboard* ELISA.

Serum diencerkan 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 dan 3200 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan protein ES dengan *The Anigen Rapid Canine Heartworm Ag Test Kit 2.0* (Bionote, Inc.) tampak pada Gambar 1.

Untuk memastikan bahwa hasil kultur cacing mengandung antigen *D. immitis*, maka sebelum digunakan untuk mengimunitasi mencit diperiksa terlebih dahulu dengan antibodi monoklonal anti-*D.immitis* menggunakan *The Anigen Rapid Canine Heartworm Ag Test Kit 2.0* (Bionote, Inc.). Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya reaksi positif yang ditunjukkan oleh munculnya dua garis berwarna ungu (Gambar 1.), sehingga dapat dipastikan bahwa suspensi MES dan FES dalam penelitian ini adalah berasal dari cacing *D. immitis*.

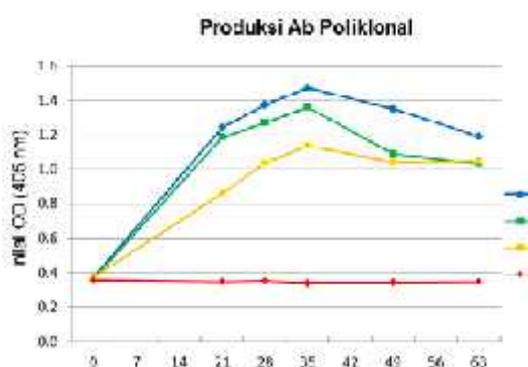


Gambar 1. Pemeriksaan Protein ES dengan antibodi monoklonal anti-*D. immitis* (FES = protein ES cacing betina, MES = protein ES cacing jantan). Dua garis ungu menandakan antigen tersebut adalah positif antigen *D. immitis*

Pada Gambar 2 terlihat produksi antibodi poliklonal anti-*D. immitis* pada mencit BALB/c. Pada hari ke-21 setelah imunitasi antibodi telah diproduksi oleh mencit BALB/c. Titer antibodi mencapai puncaknya pada hari ke-35 setelah imunitasi dan setelah itu terjadi penurunan titer. Pola yang serupa

ditunjukkan oleh mencit yang diimunisasi MES, FES maupun MES+FES. Hasil *chequerboard* ELISA menunjukkan bahwa antibodi pada pengenceran 1600 kali masih dapat mendeteksi antigen *D. immitis* pada konsentrasi 5 µg/ml pelarut.

Grieve *et al.* (1981) menyatakan bahwa induk semang yang menerima rangsangan yang cukup akan menjadi responsif terhadap antigen cacing. Penelitian ini menunjukkan bahwa mencit BALB/c yang diimmunisasi dengan antigen ES cacing *D. immitis* dapat menghasilkan antibodi, baik yang diimmunisasi dengan MES+FES secara bersana-sama maupun yang diimmunisasi dengan MES atau FES secara terpisah. Antibodi telah terbentuk pada hari ke-21 setelah imunisasi. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan penelitian yang dilakukan oleh Suyoko (1998) yang menggunakan antigen ES *B. malayi* untuk mengimmunisasi mencit.



Gambar 2. Produksi antibodi poliklonal anti-*D. immitis* pada mencit BALB/c

Pada penelitian ini titer antibodi terhadap antigen ES cacing *D. immitis* (MES, FES, MES+FES) mencapai puncaknya pada hari ke-35 setelah imunisasi, kemudian menurun sampai akhir penelitian. Penelitian oleh Marcos-Atxutegi *et al.* (2003) menemukan bahwa imunisasi pada mencit dengan antigen terlarut *D. immitis* menghasilkan IgG1 sebagai antibodi yang paling dominan. Titer IgG1 tertinggi dicapai pada hari ke-25 setelah imunisasi. Puncak titer IgE dicapai pada hari ke-60 sedangkan IgG2a

titernya terus meningkat sampai hari ke-90.

Weil dan Ottesen (1981) juga menemukan peningkatan titer IgG dan IgE secara signifikan pada anjing yang diinfeksi antigen *D. immitis* secara eksperimental. Menurut hasil penelitian Grieve *et al.* (1981), antibodi pada anjing terhadap *D. immitis* pertama kali terdeteksi 4 minggu setelah infeksi dan titer tertinggi diperoleh 2 minggu setelah ditemukan mikrofilaria. Hayasaki *et al.* (1981) menyatakan bahwa produksi antibodi waktunya berkaitan dengan penyilahan larva ke empat dan adanya mikrofilaria di dalam darah.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa antigen MES, FES maupun MES+FES *D. immitis* dapat merangsang pembentukan antibodi poliklonal pada mencit BALB/c dengan pola produksi yang sama. Antibodi telah terbentuk pada hari ke-21 dan titernya mencapai puncak pada hari ke-35 setelah imunisasi.

Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mengetahui kemampuan antibodi yang dihasilkan oleh mencit BALB/c untuk mendeteksi antigen *D. immitis* pada serum dan urin anjing.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana dengan baik berkat bantuan dari semua pihak, maka dari itu penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Akhtardanesh B, Radfar MH, Voosough D, Darijani N. 2010. Seroprevalence of

- canine heartworm disease in Kerman, Southeastern Iran. *Comp Clin Pathol*, DOI 10.1007/s00580-010-1035-0.
- Alia YY, May HK, Amall HA. 2013. Serological study of *Dirofilaria immitis* in human from some villages in Al-Hindya part of Karbala Governorate. *Int J of Sci and Nature*, 4: 185–188.
- Aranda C, Panyella O, Eritja R, Castella J. 1998. Canine filariasis importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). *Vet Parasitol*, 77: 267–275.
- Bolio-Gonzalez ME, Rodriguez-Vivas RI, Sauri-Arceo CH, Gutierrez-Blanco E, Ortega-Pacheco A, Colin-Flores RF. 2007. Prevalence of the *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Merida, Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol*, 148: 166–169.
- Cruz-Chan JV, Quijano-Hernandez I, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E. 2009. *Dirofilaria immitis* and *Trypanosoma cruzi* natural co-infection in dogs. *The Vet J* doi: 10.1016/j.tvjl.2009.09.012.
- Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G. 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet Parasitol*, 163: 286–292.
- Goodwin J-K. 1998. The serologis diagnosis of heartworm infection in dogs and cats. *Clinical Techniques in Small Animals Practice*, 13: 83–87.
- Grieve RB, Mika-Johnson M, Jacobson RH, Cypress RH. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Am J Vet Res*, 42: 66–69.
- Hayasaki M, Nakagaki K, Kobayashi S, Ahishi I. 1981. Immunological response of dogs to *Dirofilaria immitis* infection. *Jpn J Vet Sci*, 43: 909–914.
- Maizels RM, Blaxter ML, Robertson BD, Selkirk ME. 1991. *Parasite Antigens, Parasite Genes. A Laboratory Manual for Molecular Parasitology*. Cambridge University Press, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney.
- Marcos-Atzutege C, Kramer LH, Fernandez I, Simoncini L, Genchi M, Prieto G, Simon F. 2003. TH1 response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria immitis* soluble antigens: a possible role for Wolbachia? *Vet Parasitol*, 112: 117–130.
- Meriem-Hind BM, Mohamed M. 2009. Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria. *African J of Agri Res*, 4: 1097–1100.
- Reifur L, Thomaz-Socco V, Montiani-Ferreira F. 2004. Epidemiological aspects of filariasis in dogs on the coast of Parana state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol*, 122: 273–286.
- Song KH, Hayasaki M, Cholic C, Cho KW, Han HR, Jeong BH, Jeon MH, Park BK, Kom DH. 2002. Immunological responses of dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *J Vet Sci*, 3: 109–114.
- Suyoko. 1998. Pengembangan antibodi monoklonal spesifik terhadap antigen beredar *Brugia malayi* untuk diagnosis filariasis malayi. *Disertasi*. Universitas Gadjah Mada.
- Weil GJ, Ottesen EA. 1981. *Dirofilaria immitis*: parasiti-specific humoral and cellular immune responses in experimentally infected dogs. *Exp Parasitol*, 51: 80–86.
- Weil GJ. 1987. *Dirofilaria immitis*: Identification and Partial Characterization of Parasite Antigens in the Serum of Infected Dogs. *Exp Parasitol*, 64: 244–251.