

Penggunaan Kompleks Antigen ESAT-6 dan CFP-10 untuk Diagnosis Tuberkulosis

Irandi Putra Pratomo*, Darmawan Budi Setyanto**

* Peserta PPDS-1 Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Rumah Sakit Persahabatan, Jakarta

** Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta

Abstrak

Penyakit tuberkulosis (TB) terutama pada usia anak masih dihadapkan pada keterbatasan cara mendiagnosis penyakit ini. Manifestasi klinis penyakit TB pada anak biasanya tidak khas dan tidak sama dengan TB pada usia dewasa karena patogenesis TB itu sendiri. Penyakit TB pada anak bersifat pausibasilair dan biasanya tanpa gejala klinis sehingga disebut infeksi laten tuberkulosis (latent tuberculosis infection, LTBI). Sekresi interferon (IFN)- γ terjadi pada fase ini dan menjadi prinsip dasar uji kulit tuberkulin (tuberculin skin test, TST). Uji kulit tuberkulin tidak spesifik terhadap *Mycobacterium tuberculosis* karena merupakan derivat protein *M. bovis*. Kompleks antigen early secretory antigenic target (ESAT)-6 dan culture filtrate protein (CFP)-10 merupakan protein sekretorik yang khas dihasilkan oleh lokus gen region of difference (RD)-1 *M. tuberculosis* dan berinteraksi dengan sel T di dalam darah yang akan menstimulasi sekresi IFN- γ . Sekresi IFN- γ dapat diamati pada pemeriksaan laboratorium, disebut sebagai pemeriksaan IFN- γ -release assay (IGRA), dan merupakan dasar pemeriksaan enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) atau TSPOT.TB dan QuantiFERON®-TB (QFT) sebagai upaya diagnosis LTBI dan TB aktif. (*J Respir Indo. 2013; 33:66-71*)

Kata kunci : TB laten, ESAT-6, CFP-10, IFN- γ -release assay, QuantiFERON®-TB.

Diagnosing Tuberculosis using ESAT-6 and CFP-10 Antigen Complex

Abstract

The challenge of tuberculosis (TB) remains in diagnosing the disease particularly in the young age group children. Clinical manifestations of TB in children are usually subtle and are not similar to the adult counterpart because of the pathogenesis of TB itself. The paucibacillary phase, which is common in children with TB and manifested as latent tuberculosis infection (LTBI), have several immunologic properties. The release of interferon (IFN)- γ by blood mononuclear cells in LTBI have been observed and have been clinically applied as main principle for tuberculin skin test (TST). The test, however, is not specific for *Mycobacterium tuberculosis* since it was derived from the proteins of *M. bovis*. Antigen complex of early secretory antigen target (ESAT)-6 and culture filtrate protein (CFP)-10 are secretory protein expressed from gene locus of region of difference (RD)-1 specifically from *M. tuberculosis* and are interacting with circulatory T-cells which in turn would stimulate the release of IFN- γ . The laboratory test of enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) or TSPOT.TB and QuantiFERON®-TB (QFT) are using the principle of IFN- γ release assay (IGRA) and are more specific and more sensitive than TST for diagnosing LTBI and active TB. (*J Respir Indo. 2013; 33:66-71*)

Keywords: latent tuberculosis infection, ESAT-6, CFP-10, IFN- γ -release assay, QuantiFERON®-TB

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) hingga saat ini masih merupakan beban bagi seluruh negara di dunia dengan sepertiga penduduk dunia telah terinfeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* penyebab TB. Jumlah terbesar kasus TB menurut Organisasi Kesehatan Dunia (World Health Organization, WHO) terdapat di Asia Tenggara yaitu 33% dari seluruh kasus TB di dunia. Indonesia pada tahun 2009 diperkirakan memiliki

prevalens kasus TB sebesar 660.000 kasus, atau sekitar 285 kasus tiap 100.000 penduduk, dan kasus baru sebesar 289.044 kasus dengan 30.662 kasus diderita oleh kelompok usia <15 tahun.¹ Kesulitan yang timbul dalam tatakelola TB tidak hanya dalam hal tatalaksana tetapi juga dalam hal diagnosis. Diagnosis TB khususnya pada kelompok usia anak-anak relatif sulit karena kuman TB secara patogenesis bersifat

pausibasilar sehingga sering tidak menunjukkan gejala klinik. Sifat ini, yang disebut infeksi laten tuberkulosis (*latent tuberculosis infection*, LTBI), pada akhirnya dapat berlangsung selama bertahun-tahun dan sekitar 10% kejadian berisiko menjadi penyakit TB aktif. Uji kulit tuberkulin (*tuberculin skin test*, TST) menggunakan derivat protein dimurnikan (*purified protein derivative*, PPD) selama ini digunakan untuk menegakkan diagnosis tersangka TB dan LTBI. Uji ini kurang spesifik karena terdapat reaksi silang antigen terhadap spesies *Mycobacterium* lain, seperti *M. bovis* yang digunakan sebagai vaksin *bacillus Calmette-Guerin* (BCG) serta bila terdapat riwayat pajanan terhadap *Mycobacterium* selain *M. tuberculosis* sehingga besar kemungkinan terjadi hasil positif palsu. Hal tersebut menjadi dasar perlu diambil alternatif penegakan diagnosis TB melalui uji yang diharapkan lebih spesifik.²

Kompleks antigen *early secretory antigenic target* (ESAT)-6 dan *culture filtrate protein* (CFP)-10 merupakan protein sekretorik yang khas dihasilkan oleh lokus gen *region of difference* (RD)-1 *M. tuberculosis* isolat virulen H37Rv yang dapat menginduksi respons imun selular sel T berupa sekresi interferon (IFN)- γ . Alternatif yang dapat dilakukan untuk menegakkan diagnosis TB adalah uji terhadap kadar IFN- γ tersebut berdasarkan IFN- γ release assays (IGRA) dengan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Teknologi diagnostik yang menggunakan prinsip ini antara lain *enzyme-linked immunosorbent spot* (ELISPOT) atau TSPOT.TB dan QuantiFERON®-TB (QFT).²

Profil dan peran kompleks antigen ESAT-6/CFP-10 dalam imunopatogenesis tuberkulosis

Kompleks antigen *early secretory antigenic target* (ESAT)-6 dan *culture filtrate protein* (CFP)-10 memiliki berat molekul 27 kDa dan disusun dari dua protein mikobakterial yaitu ESAT-6 (Rv3875 atau EsxA) dengan berat molekul 6 kDa dan CFP-10 (Rv3874 atau EsxB) dengan berat molekul 10 kDa (gambar 1).²⁻⁴ Kuman *M. tuberculosis* memiliki 22 pasang gen dari 11 lokus genom pada daerah *region of difference* (RD)-1 yang mengkode famili antigen ESAT-6/CFP-10.^{4,5}

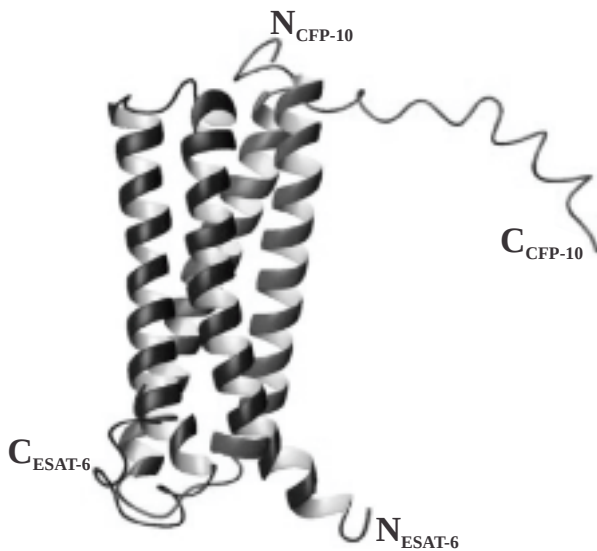
Kompleks ini tidak terdapat pada *M. bovis*, *M. avium* dan *mycobacterium* selain *M. tuberculosis*.⁵ Kompleks ini terikat sangat erat membentuk kompleks 1:1 mengadopsi bentuk tersier stabil yang berarti resisten terhadap denaturasi kimiawi seperti digesti protein dan reaksi asam oleh fagosom hingga pH $\leq 4,5$.^{4,6}

Sekresi kompleks ESAT-6/CFP-10 merupakan proses aktif menggunakan energi dari adenosin trifosfat (ATP) dengan bantuan kelompok gen seperti kompleks membran ATPase Rv3870 dan Rv3871 serta protein transmembran Rv3877.⁴ Bagian fungsional kompleks ini secara teoritis pada proses sekresi adalah lengan C_{CFP-10} yang akan berikatan dengan kompleks membran ATPase dan akan dibawa melewati membran sitoplasma oleh protein transmembran sehingga kompleks ESAT-6/CFP-10 akan disekresikan oleh *M. tuberculosis* (gambar 2).⁷

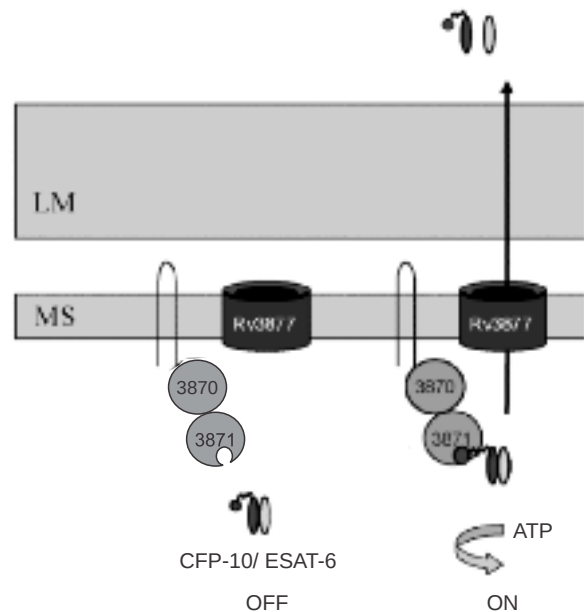
Kompleks antigen ESAT-6/CFP-10 berperan dalam imunopatogenesis TB sebagai komponen sinyal antar sel. Sifat permukaan kompleks ini tidak memungkinkan berperan dalam lisis sel karena bersifat seragam secara elektrostatis sehingga tidak mungkin membentuk mikropori pada membran sel. Kompleks ini juga tidak memiliki situs tempat terjadi aktivasi enzimatik sehingga tidak memiliki interaksi dengan asam nukleat. Ekspresi kedua protein ini secara signifikan menurun akibat internalisasi oleh makrofag sehingga diduga target protein dapat ditemukan pada permukaan makrofag.⁶

Kadar kompleks antigen ESAT-6/CFP-10, berdasarkan temuan antibodi tersebut, berubah seiring berjalan penyakit TB. Penelitian oleh Khan dkk.⁸ menggunakan hewan coba kera Macaque menunjukkan pada tahap awal infeksi, kedua kompleks antibodi tersebut mulai terdeteksi 4 hingga 12 minggu setelah pajanan. Antibodi ESAT-6 bertahan pada hewan coba tersebut setelah dilakukan pengamatan 1 tahun pasca inokulasi kuman.⁸

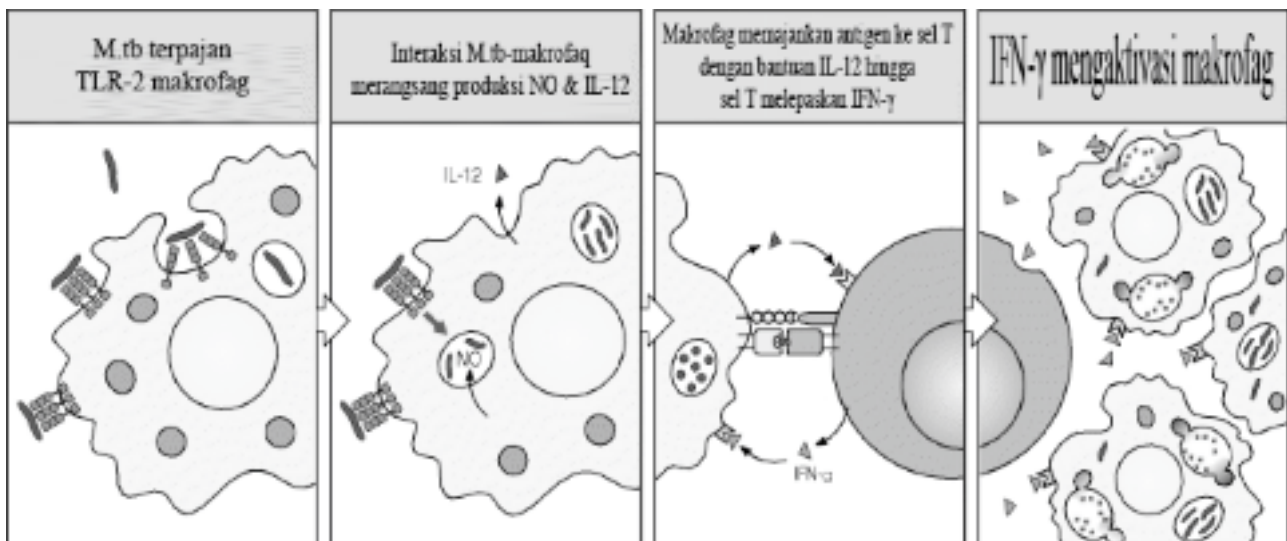
Kuman *M. tuberculosis* yang masuk ke dalam alveolus dalam bentuk droplet akan ditangkap oleh makrofag alveolus. Kompleks ESAT-6/CFP-10 secara teoritis akan disekresikan dan dipajankan oleh makrofag melalui *toll-like receptor* (TLR)-2 sehingga



Gambar 1. Struktur kompleks antigen ESAT-6/CFP-10
Dikutip dari (4)



Gambar 2. Mekanisme sekresi kompleks antigen ESAT-6/CFP-10
(MS: membran sitoplasma; LM: lapisan mikolat)
Dikutip dari (7)



Gambar 3. Mekanisme aktivasi sel T terhadap interaksi *M. tuberculosis* dengan makrofag. Senyawa IL-1 β tidak disertakan dalam gambar. (*M.tb*: *Mycobacterium tuberculosis*; TLR-2: toll-like receptor-2; IL-12: interleukin-12; NO: nitritoksida; IFN-g: interferon-g)

Dikutip dari (4)

merangsang makrofag memproduksi nitratoksida (NO), yang akan melisiskan kuman *M. tuberculosis*, dan interleukin (IL)-1 β serta IL-12 yang akan merangsang respons selular sel T CD $_4^+$ tipe 1 (sel T *helper* 1, Th1) berupa sekresi IFN-g.⁹⁻¹² Sekresi IFN-g selanjutnya akan mengaktifasi makrofag lebih lanjut sehingga terjadi serangkaian reaksi yang memungkinkan terjadi inhibisi

pertumbuhan serta eliminasi kuman *M. tuberculosis* (gambar 3). Fungsi IFN-g juga berkaitan dengan fungsi mempertahankan infeksi TB tetap berada dalam tahap LTBI bersama dengan *tumor necrosis factor* (TNF)- α .¹² Kompleks antigen ESAT-6/CFP-10 juga ditemukan terikat pada monosit tetapi belum diketahui interaksi molekul yang terjadi di sel tersebut.⁶ Variasi individual

Tabel 1. Interpretasi pemeriksaan QuantiFERON®-TB *Gold in tube*.

Nihil (IU/mL)	Antigen TB minus nihil (IU/mL)	Mitogen minus nihil (IU/mL)	Hasil	Interpretasi
≤ 0,8	≥ 0,35 (dan ≥ 25% nilai nihil)	Berapapun	Positif	Kemungkinan infeksi M.tb
≤ 0,8	< 0,35 ATAU ≥ 0,35 dan < 25% nilai nihil	≥ 0,5	Negatif	Kecil kemungkinan infeksi M.tb
≤ 0,8	< 0,35 ATAU > 0,35 dan < 25% nilai nihil	< 0,5	Meragukan	Hasil meragukan untuk respons antigen TB
> 8,0	Berapapun	Berapapun		

Dikutip dari 15

Penggunaan kompleks antigen ESAT-6 dan CFP-10 untuk diagnosis tuberkulosis

Teknologi diagnostik yang dapat digunakan untuk mengamati sekresi kompleks antigen ESAT-6/CFP-10 adalah *enzyme-linked immunosorbent spot* (ELISPOT) atau TSPOT.TB dan QuantiFERON®-TB (QTF). Prinsip ELISPOT atau TSPOT.TB untuk pemeriksaan kompleks antigen ESAT-6/CFP-10 serupa dengan prosedur *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yaitu mendeteksi aktivitas enzimatis dengan pemberian label terhadap antibodi yang telah ditentukan antigennya yang telah difiksasi pada plat mikrotiter sehingga hasil akhir adalah aktivitas antigen ESAT-6/CFP-10 akan terlihat sebagai titik (spot). Pemeriksaan QTF menggunakan prinsip IFN- γ release assays (IGRA) yang dikembangkan dari teknik ELISA yaitu mendeteksi jumlah IFN- γ terhadap antigen spesifik yang dihasilkan dari sel T subjek yang terpajan kuman *M. tuberculosis* dalam hal ini kompleks antigen ESAT-6/CFP-10.¹⁴

Penelitian oleh Feng dkk.², yang menggunakan antibodi monoklonal dan poliklonal dari hewan coba tikus BALB/c terhadap antigen ESAT-6/CFP-10 yang diinjeksikan dari sampel supernatan kultur sputum dan cairan efusi pleura, menunjukkan tingkat sensitivitas 95,4% dan spesifisitas 100% ESAT-6 terhadap *M. tuberculosis* dan tingkat sensitivitas 81,6% dan spesifisitas 92,2% CFP-10 terhadap *M. tuberculosis*. Tingkat deteksi positif ESAT-6 dan CFP-10 masing-masing 86,8% dan 76,3% dalam mendiagnosis efusi pleura TB pada subjek dengan hasil kultur sputum *M. tuberculosis* negatif.² Penelitian oleh Chee dkk.¹³ tahun 2007 menunjukkan bahwa ELISPOT dapat memantau perubahan kadar kompleks antigen ESAT-6/CFP-10

pada penderita LTBI yang diberikan terapi isoniazid selama 6 bulan. Sebanyak 37,6% penderita yang pada awal pengobatan positif menurut ELISPOT mengalami konversi, sebanyak 48,6% temuan antigen CFP-10 menurun tetapi temuan antigen ESAT-6 tidak menurun. Jumlah *median* sel mononuklear darah tepi (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) yang ditandai *spot* CFP-10 menurun dari 11 per $2,5 \times 10^5$ sel menjadi 4 per $2,5 \times 10^5$ sel tetapi PBMC yang ditandai *spot* ESAT-6 tidak berubah. Ketidakteraturan respons kedua antigen ini diduga karena respons sel T terhadap ESAT-6 lebih bertahan karena bersifat "protektif" terhadap proses infeksi *M. tuberculosis* sementara CFP-10 lebih akut walaupun pada penelitian tersebut respons yang timbul tidak menutup kemungkinan juga dipengaruhi oleh pengobatan LTBI.¹³

Pemeriksaan QTF mutakhir yang sudah diluncurkan di Amerika Serikat pada tahun 2007 adalah QTF *gold in tube* (QTF-GIT) dengan tingkat sensitivitas sebesar 99,2%.¹⁵ Kasambira dkk.¹⁴ menunjukkan dalam penelitiannya bahwa diagnosis TB menggunakan QTF-GIT setara TST dengan PPD (*inter-rater agreement* 81%) walaupun upaya diagnosis pada usia subjek di bawah 2 tahun akan mengalami kemungkinan hasil yang meragukan (*indeterminate*) sebesar 5,7 (*odds ratio*, 95% *confidence interval* 1,5-22, $P = 0,01$). Pemeriksaan dengan QTF-GIT adalah dengan mengambil sampel darah yang dimasukkan ke dalam tiga tabung yang berbeda yaitu tabung nihil, tabung antigen TB dalam hal ini ESAT-6/CFP-10 dan tabung mitogen. Tabung nihil berisi antigen nonspesifik yang akan menghasilkan IFN- γ nonspesifik sementara tabung mitogen merupakan kontrol positif terhadap antigen yang diperiksa. Ketiga tabung ini masing-

masing diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 hingga 24 jam kemudian dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan komponen antibodi dengan plasma dan akhirnya dilakukan pengukuran kadar IFN-g dalam IU/mL menggunakan metode ELISA. Hasil pemeriksaan dikatakan positif apabila kadar IFN-g tabung antigen TB lebih tinggi dibandingkan kadar IFN-g tabung nihil. Hasil pemeriksaan kadar IFN-g tabung mitogen yang rendah (kurang dari 0,5 IU/mL) menunjukkan hasil *indeterminate* bila ternyata sampel darah negatif terhadap tabung antigen TB, yang sering terjadi pada penanganan tidak tepat terhadap sampel atau gangguan sekresi IFN-g dari darah sampel.¹⁴ Interpretasi pemeriksaan QTF-GIT dirangkum pada tabel 1.¹⁵

KESIMPULAN

1. Kompleks ESAT/CFP-10 merupakan protein sekretorik khas dihasilkan oleh lokus gen RD-1 milik *M. tuberculosis* yang dapat menginduksi respons imun selular sel T yaitu berupa sekresi IFN-g
2. Teknologi diagnostik yang dapat digunakan untuk mengamati aktivitas kompleks gen tersebut antara lain ELISPOT atau TSPOT.TB dan QuantiFERON®-TB yang menggunakan prinsip pemeriksaan ELISA dan IGRA.
3. QuantiFERON®-TB *gold in tube* (QFT-GIT) memiliki tingkat sensitivitas sebesar 99,2% dan setara TST menggunakan PPD (*inter-rater agreement* 81%) sehingga diharapkan dapat membantu penegakan diagnosis TB secara lebih spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Tuberculosis country profile: Indonesia. [Online]. 2011 [Cited 2011 Jul 31]. Available from: URL: <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/index.html>
2. Feng TT, Shou CM, Shen L, Qian Y, Wu ZG, Fan J, et al. Novel monoclonal antibodies to ESAT-6 and CFP-10 antigens for ELISA-based diagnosis of pleural tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(6):804-10.
3. Sable SB, Verma I, Khuller GK. Human immune recognition-based multicomponent subunit vaccines against tuberculosis. *Eur Respir J*. 2005; 25: 902-10.
4. Lightbody KL, Ilghari D, Waters LC, Carey G, Bailey MA, Williamson RA, et al. Molecular features governing the stability and specificity of functional complex formation by mycobacterium tuberculosis CFP-10/ESAT-6 family proteins. *J Biol Chem*. 2008; 283 (25):17681-90.
5. Ravn P, Munk ME, Andersen ÅB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using mycobacterium tuberculosis-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(4): 491-6.
6. Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO Journal*. 2005;24:2491-8.
7. Champion PAD, Champion MM, Manzanillo P, Cox JS. ESX-1 secreted virulence factors are recognized by multiple cytosolic AAA ATPases in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol*. 2009; 73(5): 950-62.
8. Khan IH, Ravindran R, Yee JA, Ziman M, Lewinsohn DM, Gennaro ML, et al. Profiling antibodies to mycobacterium tuberculosis by multiplex microbead suspension arrays for serodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(3): 433-8.
9. Janeway CA. The normal pathways for host defense against intracellular bacteria are illustrated by genetic deficiencies of IFN- γ and IL-12 and their receptors. In: Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, editors. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5th eds. New York: Garland Science; 2001. [Online]. 2011 [Cited 2011 Jul 31]. Available from: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27109/>
10. Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacohen

- N, Griffiths G, Moita LF, et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol.* 2010; 12(8):1046-63.
11. Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Thacker TC, Estes DM, Larsen MH, et al. Signal regulatory protein a (SIRPa)+ cells in the adaptive response to ESAT-6/CFP-10 protein of tuberculous mycobacteria. *PLoS ONE.* 2009;4(7):6414-24.
 12. Schluger NW. The pathogenesis of tuberculosis the first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:251-6.
 13. Chee CBE, KhinMar KW, Gan SH, Barkham TMS, Pushparani M, Wang YT. Latent tuberculosis infection treatment and T-cell responses to mycobacterium tuberculosis-specific antigens. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;75:282-7.
 14. Kasambira TS, Shah M, Adrian PV, Holshouser M, Madhi SA, Chaisson RE, et al. QuantiFERON®-TB gold in-tube for the detection of mycobacterium tuberculosis infection in children with household tuberculosis contact. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011; 15(5):628–34.
 15. Qiagen. QuantiFERON®-TB gold in-tube. [Online]. 2011 [Cited 2011 July 31]. Available from: URL: http://www.cellestis.com/irm/content/aust/gtfproducts_tbgoldintube.html.