



BULETIN VETERINER FARMA

MEDIA INFORMASI KEGIATAN
BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA

Pembuatan Antigen Rabies untuk Kit ELISA Rabies Tahun 2020 - 2022

Pengembangan Metode Inaktivasi Antigen Rabies Dengan
Cara Pemanasan untuk Optimasi Kit ELISA Rabies Pusvetma

Pengembangan Produksi Vaksin Avian Influenza Bivalen
HPAI H5N1 dan LPAI H9N2

Pengkajian Pembuatan Vaksin Afluvet Kombinasi Highly Pathogenic Avian
Influenza (HPAI) H5N1 Strain Tanggamus dan ND Lasota

Validasi Pengujian Kit Diagnostik Sebagai Tugas
BBVF Pusvetma Sebagai Laboratorium
Rujukan Penyakit Mulut dan Kuku Di Indonesia



Suscribe Now!
pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id

**VALIDASI PENGUJIAN KIT DIAGNOSTIK SEBAGAI TUGAS BBVF
PUSVETMA SEBAGAI LABORATORIUM RUJUKAN PENYAKIT MULUT
DAN KUKU DI INDONESIA**

Dewi Noor Hidayati¹²

¹Medik Veteriner Muda; ²Sub Koordinator Kelompok Pengembangan Produk BBVF
PUSVETMA

ABSTRAK

Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) merupakan salah satu penyakit strategis pada hewan yang paling merugikan karena daya infeksi yang tinggi. Penyakit ini menjadi salah satu fokus pemerintah dalam melakukan program pengendalian dan pencegahan penyakit. Strategi pengendalian dan pencegahan PMK di Indonesia salah satunya adalah deteksi dan diagnose penyakit dengan secara benar, tepat serta cepat. Masuknya kit diagnostik untuk pengujian PMK dari luar negeri membutuhkan validasi pengujian yang dapat dilakukan oleh laboratorium terakreditasi dan memiliki kapasitas yang sesuai standar dari World Organization of Animal Health (WOAH). Validasi pengujian dilakukan untuk melihat karakteristik dan parameter tertentu dari sebuah kit dapat menghasilkan pengukuran yang sesuai dengan standar. BBVF PUSVETMA sebagai laboratorium rujukan nasional untuk PMK telah melakukan validasi pengujian kit diagnostik ini sesuai standar dan panduan dari WOAH Terrestrial Manual Chapter 1.1.6 (2023).

Kata Kunci: *Uji validasi, ELISA, kit pcr, pmk*

I. PENDAHULUAN

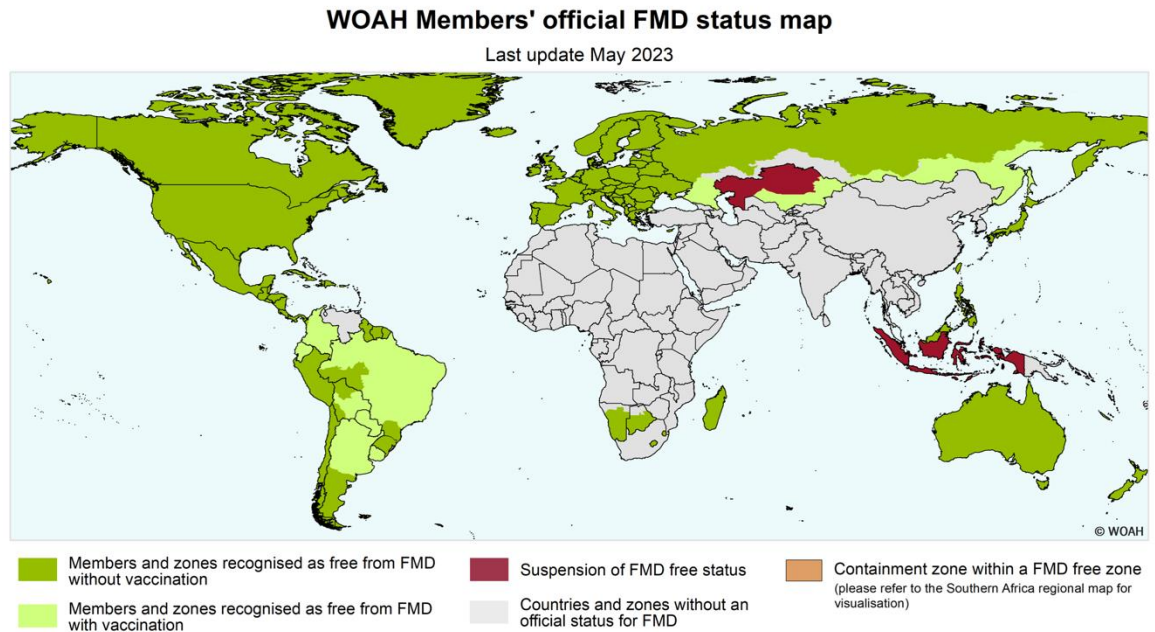
Balai Besar Veteriner Farma PUSVETMA (BBVF PUSVETMA) merupakan laboratorium nasional rujukan untuk Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) di Indonesia yang ditetapkan melalui Peraturan Menteri Pertanian No 12 Tahun 2023. Masuknya PMK ke Indonesia pada pertengahan tahun 2022 selain memberikan dampak negatif pada status kesehatan ternak Indonesia namun juga berdampak positif untuk industri perdagangan yaitu membuka kran importasi untuk masuknya kit-kit diagnostik pengujian PMK, baik untuk uji serologis, uji virologis, dan deteksi asam nukleotida menggunakan uji biomolekuler.

Fungsi Laboratorium rujukan nasional antara lain adalah sebagai *confirmatory assay laboratory*, dan *collaborative laboratory* untuk uji bersama, uji banding dan harmonisasi laboratorium (Donaldson, 1993). Laboratorium rujukan nasional harus memiliki kemampuan dan kapasitas untuk menyediakan standar uji seperti serum referensi untuk uji serologis, virus referensi sebagai virus kontrol untuk pengujian virologi yang dapat digunakan secara nasional. Laboratorium rujukan nasional juga harus memiliki kompetensi dan kapasitas infrastruktur yang terstandarisasi. *World Organization of Animal Health* (WOAH) sebagai organisasi induk untuk organisasi Kesehatan Hewan seluruh dunia mengatur dan menetapkan prinsip dan panduan serta standar yang harus dapat dipenuhi untuk pengujian penyakit PMK menggunakan alat uji atau kit diagnostik. Hal ini bertujuan supaya hasil uji yang didapatkan terpercaya dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) merupakan salah satu penyakit infeksius bagi ternak yang paling ditakuti di seluruh dunia, karena menyebabkan kerugian sangat besar di sektor peternakan. Penyakit ini dapat menyerang ternak seperti sapi, kambing, domba, babi dan ruminansia berkuku belah lainnya. Status Indonesia sebagai negara bebas PMK sejak tahun 1990 hingga di tahun 2021, berubah menjadi “suspension of an FMD free country where vaccination

is not practiced” atau negara yang ditangguhkan status bebasnya sejak pertengahan tahun 2022 (Bulletin WOAHA, 2022). Peta status PMK negara Indonesia saat ini tersaji pada Gambar 1 dibawah ini.



Gambar. 1 Peta dunia terkini untuk situasi penyakit PMK di dunia. Indonesia berstatus ditangguhkan.

Pengendalian PMK yang baik sangat erat kaitannya dengan proses pengujian yang tepat, akurat dan dapat dipertanggungjawabkan berdasarkan landasan teori uji yang benar. Pengujian PMK dapat meliputi uji serologik yaitu ELISA maupun uji untuk mendeteksi antigen seperti real-time PCR, PCR konvensional, hingga sekuensing. Pengujian PMK dengan alat uji tertentu dapat memiliki beberapa fungsi. Fungsi alat uji ini memiliki spesifikasi parameter tertentu yang harus divalidasi (Tabel.1)

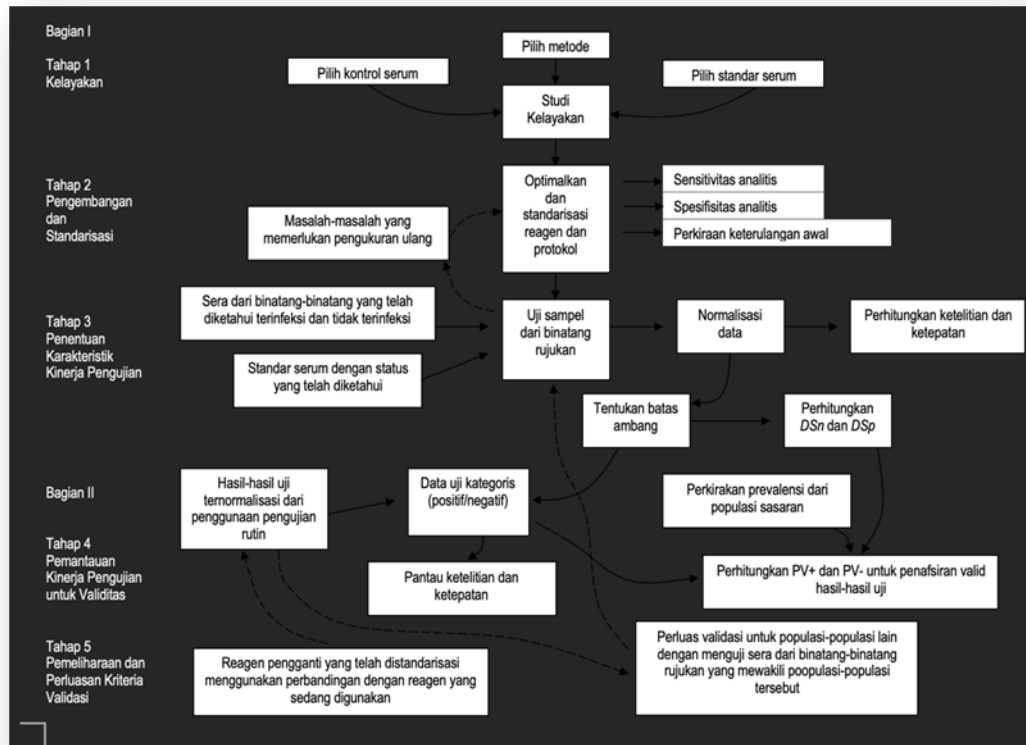
Tabel 1. Macam uji dan pengukuran parameter yang membutuhkan validasi

Tujuan uji	Parameter pengukuran yang dibutuhkan
1a) Untuk pembebasan secara historis (dengan atau tanpa vaksinasi)	Daerah yang bebas secara historis dianggap memiliki prevalensi = 0 atau mendekati 0. Uji untuk kasus ini membutuhkan nilai Diagnostic Specificity (DSp) yang tinggi, nilai (PV+) tinggi, dan (LR+) tinggi sehingga parameter uji yang harus diukur adalah nilai DSp secara berseri.

1b) Pengakuan kembali status bebas setelah <i>outbreak</i>	Selama program pengendalian, dianggap terjadi penurunan prevalensi penyakit secara bertahap, yaitu dari tinggi (pada saat <i>outbreak</i>) hingga rendah atau bebas (<i>outbreak</i> berakhir). Pada tahap awal pembuktian bebas, uji membutuhkan nilai DSe tinggi, (PV-) tinggi dan (LR-) tinggi, hal ini ditujukan untuk meminimalkan hasil yang “negatif palsu” dan memberi kepastian individu yang positif. Oleh karena itu parameter yang harus diukur adalah nilai DSe. Sedangkan pada saat tahap akhir program pengendalian (dimana dianggap hewan yang positif tidak ada, dan prevalensi penyakit sangat rendah), pembuktian status bebas membutuhkan parameter nilai DS _p yang tinggi, (PV+) tinggi dan (LR+) tinggi.
2) Menyatakan status bebas infeksi / bebas agen penyakit pada ternak (individual) atau produk untuk kepentingan perdagangan / lalu lintas	Untuk tujuan lalu lintas dan perdagangan, probabilitas “negatif palsu” harus diperkecil, dan sebaliknya dibutuhkan nilai DSe tinggi, (PV-) tinggi dan (LR-) tinggi, karena kemungkinan bahwa ternak yang dilalulintaskan (secara individu ini) dapat sakit dan menyebarkan penyakit ke populasi hewan sehat. Pengukuran parameter dapat dilakukan dengan menguji nilai DSe tinggi secara paralel.
3) Eradikasi / eliminasi penyakit pada populasi target	Sama dengan parameter untuk 1b, dimana prevalensi yang diharapkan menurun secara bertahap.
4) Konfirmasi diagnosis pada sampel suspek (termasuk konfirmasi hasil positif dari hasil <i>screening test</i>)	Tujuan uji konfirmasi adalah untuk meminimalkan kemungkinan “positif palsu”. -Untuk konfirmasi kasus klinis: uji harus memiliki nilai DS _p tinggi, (PV+) tinggi dan (LR+) tinggi. Karena sudah terlihat manifestasi klinis dan kemungkinan jumlah pathogen yang tinggi, sehingga nilai DSe tidak banyak mempengaruhi. -Untuk konfirmasi kasus positif (hasil uji screening): Uji screening biasanya diaplikasikan pada populasi sehat, sehingga biasanya memiliki nilai DSe tinggi, untuk memastikan individu ternak sakit terdeteksi. Oleh karena itu uji konfirmasi dengan nilai DS _p tinggi diperlukan untuk memastikan bahwa hewan tersebut benar-benar positif. Parameter yang dibutuhkan untuk uji konfirmasi ini adalah nilai DS _p tinggi, (PV+) tinggi dan nilai LR+ tinggi. Pendekatan ini membutuhkan uji secara seri.
5) Estimasi prevalensi penyakit / infeksi untuk kepentingan analisis resiko	Untuk kepentingan memperkirakan para epidemiolog membutuhkan nilai keakuratan uji untuk dapat menentukan desain sampling untuk tujuan survei, kajian prevalensi, dan pengukuran penyakit. Penggunaan <i>screening test</i> dengan nilai DSe tinggi dan dilanjutkan dengan uji konfirmasi yang memiliki nilai DS _p tinggi dapat digunakan untuk memperkirakan prevalensi penyakit.
6) Penentuan status imun: a) pada hewan secara individual pasca vaksinasi b) memperkirakan sero-prevalensi pasca vaksinasi suatu populasi (misalnya untuk penelitian dan monitoring efikasi vaksin)	Parameter yang dibutuhkan adalah nilai DS _p tinggi, (PV+) tinggi dan (LR+) tinggi. Uji yang memiliki nilai “positif palsu”, karena dapat menyebabkan konsekuensi fatal, yaitu menyatakan bahwa hewan / ternak tersebut tidak protektif. Keakuratan untuk uji ini harus tinggi sehingga mendapatkan perkiraan yang tepat pada hasil monitoring pasca vaksinasi. Contoh uji ini adalah uji Fluorescent Antibody Virus Neutralisation (FAVN) untuk menguji status imun pasca vaksinasi. Nilai uji >0.5 IU/ml dapat dianggap protektif.

Ket. DSe : Diagnostic Sensitivity PV : predictive value
 DSp : Diagnostic Specificity LR : likelihood ratio

WOAH telah memberikan panduan untuk melakukan validasi baik metode maupun validasi alat uji / kit diagnostik, yaitu tercantum pada Chapter 1.1.6 dalam panduan Manual Terrestrial Code 2023. Menurut panduan tersebut, validasi merupakan serangkaian proses untuk menentukan kesesuaian alat uji kit diagnostik yang telah dikembangkan, dioptimasi dan distandarisasi untuk memberikan hasil uji sesuai dengan kegunaannya / purpose (WOAH, 2023). Validasi tidak hanya dilakukan dan dibatasi pada saat optimalisasi awal faktor intrinsik secara eksperimental, namun validasi pengukuran pada saat pengujian berlangsung pada populasi juga harus dilakukan (Jacobson, 1998). Menurut Jacobson, untuk pengujian serologis, validasi pengujian memiliki dua bagian, bagian pertama adalah penentuan parameter dan karakteristik uji melalui pengembangan pengujian, optimasi dan standarisasi reagen dan protokol. Bagian kedua adalah validasi untuk memastikan validitas konstan hasil-hasil uji dan untuk evaluasi dalam rangka memperbaiki kriteria validasi pengujian. Lebih jelas, bagan pada Gambar 2 menggambarkan hal ini.



Gambar. 2 Bagian-bagian proses validasi pengujian

Validasi merupakan proses terus menerus untuk melihat bahwa hasil uji akurat (accurate), tepat (precise) dan lolos verifikasi (verified) secara statistik (Jacobson, 1998). Ketepatan uji (precision assay) dapat dihitung dari keterulangan (repeatability) dan reproduksibilitas (reproducibility) uji. Ketepatan uji (precises assay) menunjukkan sebaran hasil dari sampel yang dilakukan berulang kali. Semakin kecil sebaran, maka uji tersebut semakin tepat (precise). Sedangkan akurasi (accurate assay) adalah nilai yang menunjukkan kesesuaian pengukuran hasil uji dengan pengukuran nilai standar. Uji yang akurat akan memiliki bias dan random error yang kecil. Sebuah uji bisa jadi tepat (precise) tapi tidak akurat jika hasil uji tidak sesuai dengan nilai standar yang diperkirakan. Sebaliknya uji bisa akurat namun tidak tepat bila variasi / simpangan uji besar.

Dalam hal importasi kit ELISA PMK, BBFV PUSVETMA melakukan fungsi validasi khususnya untuk bagian kedua, yaitu tahap pemantauan ketelitian dan ketepatan hasil uji kit. Kapasitas PUSVETMA yang telah memiliki

kemampuan uji yang terstandarisasi oleh laboratorium rujukan dunia serta ketersediaan koleksi sampel yang mewakili sampel lapang di seluruh wilayah Indonesia membuat PUSVETMA layak dijadikan rujukan untuk melakukan validasi alat / kit diagnostik.

III. MATERI METODE

Penentuan jenis sampel

Sampel uji yang digunakan adalah serum yang diambil dari beberapa spesies hewan yang berbeda-beda baik jenis, ras, status vaksinasi dan lokasinya. Sampel mewakili hewan dengan ambang antibodi tinggi, sedang, lemah, dan negatif. Kontrol serum menggunakan serum positif kuat, positif lemah, dan serum kontrol negatif.

Penentuan jumlah sampel

Jumlah sampel untuk melakukan validasi pengukuran alat uji disesuaikan dengan rumus uji :

$$n = \frac{(DSn)(1 - DSn)(c)^2}{e^2}$$

n = jumlah sampel

DSn = asumsi nilai diagnostik sensitifitas / diagnostik spesifisitas

e = persentase kesalahan (ditulis dengan angka desimal)

c = interval kepercayaan

Penentuan parameter uji

Parameter uji validasi kit serologis meliputi penentuan nilai Sensitivitas diagnostik (DSe), Spesifisitas diagnostik (DSp), dan keterulangan (Repeatability), dan reproduksibilitas (Reproducibility).

HASIL

Berdasarkan metode uji validasi dalam panduan WOAHA, nilai DSe dan DS_p dapat dihitung dengan tabel 2X2 sebagaimana dapat terlihat pada Gambar 3. Nilai DSe dan DS_p tergantung pada karakterisasi sampel populasi yang dijadikan rujukan. Beberapa kit akan menunjukkan relevansi yang kecil dengan sampel populasi rujukan, karena bisa jadi adanya perbedaan karakterisasi pada populasi. Sehingga nilai DSe dan DS_p ini tidak menggambarkan baik atau buruknya kit, namun hanya menggambarkan seberapa relevan kit diagnostik tersebut dapat digunakan untuk mengukur sampel pada populasi yang ada.

		Target population		
		Infected	Uninfected	
Test result	Positive	True positive (TP) A	False positive (FP) B	$PV+ = \frac{A}{A+B}$
	Negative	False negative (FN) C	True negative (TN) D	$PV- = \frac{D}{C+D}$
		$DSn = \frac{A}{A+C}$	$DSp = \frac{D}{B+D}$	

Gambar 3. Perhitungan nilai DSe dan DS_p menggunakan Table 2X2 untuk menghubungkan status infeksi dengan hasil uji.

Beberapa validasi kit diagnostik yang pernah dilakukan oleh BBVF PUSVETMA tersaji pada tabel berikut:

NO	NAMA PRODUK	PRODUSEN	DISTRIBUTOR / AGEN
1	Kit ELISA IDEXX FMD 3 ABC	IDEXX	PT Elokarsa
2	FMDV Antigen Detection ELISA Kits	IZSLER	PT Elokarsa
3	FMD Serotype O Antibody Test	Ring Bio NBGEN	PT Genecraft Labs

4	FMD Serotype A Antibody Test	Ring Bio NBGEN	PT Genecraft Labs
5	FMD Serotype 3 ABC NSP Antibody Test	Ring Bio NBGEN	PT Genecraft Labs
6	VDPro®FMDV Type O ELISA	Median Diagnostic	PT Genecraft Labs
7	VDPro®FMDV Type A ELISA	Median Diagnostic	PT Genecraft Labs
8	VDPro®FMDV NSP AB ELISA	Median Diagnostic	PT Genecraft Labs
9	FMDV Multiplex RT-qPCR Kit	Nusantics	PT Nusantara Butuh Diagnostik

IV. PENUTUP

Pusvetma memiliki kemampuan untuk melakukan validasi kit diagnostik serologis seperti ELISA, kit diagnostik biomolekuler yaitu real-time PCR PMK karena Pusvetma memiliki kapasitas laboratorium dalam untuk melakukan pengujian validasi tersebut berdasarkan referensi WOAHA.

V. REFERENSI

WOAH (*World Organization Animal Health*), Bulletin 2022-2, *access link*: bulletin.woah.org.

WOAH, Terrestrial Manual Code Chapter 1.1.6. Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assay for Infectious Disease, 2023.

Donaldson, A.I. Role of Reference Laboratory In Diagnosis and Epidemiology of Foot and Mouth Disease in Southeast Asia, Proceeding of an International workshop held in Lampang, Thailand, September 6-9, 1993. P. 100.

Jacobson, R.H., Validation of Serological Assay for diagnosis of Infectious Disease. 1998. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz, 17 (2).