

DETEKSI ANTIBODI PADA SERUM TERINFEKSI AVIAN INFLUENZA DENGAN MENGGUNAKAN ELISA NS - 1

Hidayanto, N.K., Gamo K, Emilia dan Saryati Y
Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunung Sindur Bogor 16340

ABSTRAK

Telah dilakukan evaluasi penggunaan ELISA NS-1 *Avian Influenza* di Indonesia pada tahun 2009. Pada studi ini digunakan 2 macam serum yaitu serum dari laboratorium dan serum dari lapangan. Pada studi ini dipergunakan serum sampel sebanyak 28 serum dari laboratorium dan 451 serum dari lapangan. Metode ELISA digunakan untuk mengetahui adanya antibodi NS-1 dari sampel serum. Hasil studi ini menunjukkan bahwa sampel serum yang tidak terinfeksi *Avian Influenza* tidak mengandung antibodi NS-1 dan sampel serum yang terinfeksi *Avian Influenza* terdeteksi adanya antibodi NS-1. ELISA NS-1 dapat digunakan sebagai alat untuk mendeteksi antibodi akibat infeksi alami *Avian Influenza*.

ABSTRACT

Evaluation of *Avian Influenza* NS-1 ELISA use was studied in Indonesia in 2009. In this study was used 2 kinds of sera are laboratory sera and field sera. Sera samples totally 28 laboratory sera samples and 451 field sera samples are used in this study. The ELISA method was implemented to detect NS-1 antibody from the serum samples. In this study showed that non *Avian Influenza* infected serum samples were negative NS-1 antibody and *Avian Influenza* infected serum samples were positive NS-1 antibody. The ELISA NS-1 might be used as a tool for detecting the antibody caused by natural infection of *Avian Influenza*.

PENDAHULUAN

Avian Influenza merupakan penyakit viral pada unggas yang menyebabkan gejala klinis yang bervariasi. Gejala klinis yang muncul antara lain pembengkakan fasial disertai edema gelatin, jengger dan pial teramati sianotik dan hemorhagi, perdarahan subcutan dapat terjadi pada kaki maupun telapak kaki disertai pembengkakan sendi yang pada umumnya juga terjadi edema gelatin. Infeksi virus HPAI yang disebabkan virus AI subtype H5 dan H7 biasanya menunjukkan penyakit sistemik pada multiorgan dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi (5,6). NS-1 merupakan satu dari delapan segmen protein pada virus *Avian influenza*. Protein NS-1 pada influenza A merupakan protein *nonstructural* yang diekskresikan dalam jumlah besar pada sel yang diinfeksi virus, tetapi belum dideteksi pada virion (3). Protein ini disintesis pada infeksi awal dan bekerja dengan menghambat pertahanan antiviral induk semang yang diperantarai oleh interferon α dan β (4).

Deteksi antibodi untuk pengendalian *Avian Influenza* pada unggas mempunyai keterbatasan untuk membedakan adanya antibodi yang berasal dari unggas yang divaksinasi dan infeksi alami. ELISA NS-1 dapat membedakan antibodi dari unggas terinfeksi dan antibodi dari unggas pasca vaksinasi serta mengetahui infeksi virus *High Pathogenic Avian Influenza* (5). Salah satu keterbatasan penggunaan metode DIVA NS-1 adalah kemurnian vaksin yang digunakan. Vaksin komersial umumnya hanya sebagian yang dimurnikan. Meskipun inaktif, vaksin ini

mungkin mengandung residu protein NS-1 yang berpengaruh terhadap interpretasi desain ELISA untuk mendeteksi antibodi NS-1 (2). Birch-Machin *et.al* (1997) juga melaporkan bahwa antibodi NS-1 dapat dideteksi pada sampel serum dari kuda poni yang diinfeksi dengan virus *equine influenza*, tapi tidak pada hewan yang divaksinasi dengan *whole virus* inaktif.

Tujuan studi ini adalah untuk menentukan bahwa ELISA NS-1 dapat diaplikasikan untuk membedakan antibodi pasca vaksinasi dan infeksi di Indonesia dengan cara melakukan pengujian serum dari daerah bebas *Avian Influenza* dan daerah tertular *Avian Influenza*.

MATERI DAN METODE

Sampel serum

Pada penelitian ini digunakan 2 macam sampel serum. Sampel pertama adalah serum pasca vaksinasi diambil dari uji laboratorium, sedangkan sampel kedua, sampel serum diperoleh dari lapangan yang diambil dari propinsi Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Bali, NTT dan NAD.

Penyiapan sampel serum

1. Serum dari laboratorium

Ayam SPF divaksinasi menggunakan vaksin AI H5N1 inaktif dengan 3 macam dosis secara bertingkat 1 dosis, 1/125 dosis dan 1/625 dosis. Tiga minggu pasca vaksinasi, ayam ditantang menggunakan virus

- A1. Sampel serum diambil 2 hari sebelum tantang, satu minggu pasca tantang dan dua minggu pasca tantang.
2. Serum dari lapangan

Empat ratus lima puluh satu sampel serum dari lapangan diambil dari propinsi Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Bali, NTT dan NAD.

ELISA NS-1

Prosedur ELISA NS-1 yang digunakan dalam penelitian ini dikembangkan dari prosedur yang digunakan oleh Tumpney *et. al* (2005) yang disesuaikan dengan prosedur dari produsen ELISA NS-1. Semua sampel serum diuji menggunakan ELISA NS-1. *Plate ELISA (C96 Maxisorp Nunc Immunoplate)* dilakukan *coating* menggunakan antigen NS-1 dalam PBS dan diinkubasikan pada suhu 4°C semalam, kemudian dilakukan *blocking* menggunakan 2,5% skim dalam PBS. Sampel serum diencerkan 100 kali menggunakan 0,1% Tween 20 dalam PBS. Ikatan antibodi dideteksi menggunakan *horse radish peroxidase (HRP) conjugated anti-chicken IgG (Bethyl)*. Selanjutnya ditambahkan *tetra methyl benzimide (TMB) substrate* dan diinkubasikan selama 15 menit pada suhu kamar, kemudian ditambahkan *stop solution* dan dibaca menggunakan *ELISA reader 405 nm*. Nilai *E (E value)* dihitung berdasarkan rumus berikut :

$$E \text{ value} = \frac{\text{Tested serum (Mean of antigen OD) - Mean of non antigen OD}}{\text{Ref serum (Mean of antigen OD) - Mean of non antigen OD}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1 menunjukkan bahwa ayam yang divaksinasi secara bertingkat 1 dosis, 1/125 dosis dan 1/625 dosis, persentase angka kematian pasca tantang berbanding lurus dengan pengenceran dosis yang diberikan, semakin besar pengenceran vaksin semakin besar angka kematiannya. Demikian juga dengan persentase ayam yang dinyatakan positif antibodi NS-1, semakin kecil dosis yang diberikan semakin besar persentase ayam yang positif antibodi NS-1.

Dibandingkan dengan hasil uji HI tampak bahwa persentase ayam yang positif antibodi dengan NS-1 berbanding terbalik dengan titer HI, semakin besar persentase ayam yang positif antibodi NS-1 semakin rendah titer HI antibodinya. Sedangkan setelah uji tantang, semakin kecil dosis vaksin yang diberikan semakin besar persentase konversi titer HI antibodinya. Pada ayam yang divaksinasi dengan 1/625 dosis, 3 dari 5 sampel serum (60%) titer antibodi pasca tantang menjadi lebih tinggi. Pada pemberian 1/125 dosis, 4 dari 14 sampel serum (29%) pasca tantang mengalami peningkatan titer antibodi dan pada pemberian 1 dosis tidak ada sampel serum pasca tantang yang mengalami peningkatan titer antibodi.

Table 1. Hasil evaluasi kit ELISA NS-1 menggunakan serum dari laboratorium

Dosis	Jumlah Kematian (%)	Titer ELISA positif* (%)	Titer HI pada saat tantang (1 log 2)	Konversi Titer HI positif** (%)
1	0/5 (0)	1/5 (0)	4,4	0/5 (0)
1/125	3/14 (21)	3/14 (21)	1,8	4/14 (29)
1/625	5/9 (56)	2/9 (22)	0,7	3/5 (60)

- * Jumlah ayam yang mempunyai titer value-nya berubah dari negative menjadi positif setelah ditantang
** Jumlah ayam yang mempunyai titer HI-nya berubah lebih besar atau sama dengan 4 kali sebelum dan setelah ditantang

Pada Tabel 2 terlihat bahwa pada ayam yang berasal dari daerah tanpa kasus *Avian Influenza*, semua sampel serum yang divaksinasi dan tidak divaksinasi menunjukkan hasil negatif menggunakan ELISA NS-1. Sampel serum dari propinsi Kalimantan Barat dari 50 sampel serum tidak ada yang menunjukkan hasil positif terhadap antibodi NS-1, sampel serum dari propinsi Kalimantan Tengah dari 50 sampel serum tidak ada yang menunjukkan hasil positif terhadap antibodi NS-1, sample serum dari propinsi Bali dari 25 sampel serum tidak ada yang menunjukkan hasil positif terhadap antibodi NS-1 dan sample serum dari propinsi NTT dari 25 sampel serum tidak ada yang menunjukkan hasil positif terhadap antibodi NS-1. Dari hasil ini menunjukkan bahwa ELISA NS-1 ini tidak mempunyai reaksi silang dengan antibodi pasca vaksinasi.

Tabel 2. Hasil ELISA NS-1 pada ayam di daerah tanpa kasus *Avian Influenza*

Propinsi	Status Vaksinasi	Titer ELISA Positif (%)
Kalimantan Barat	Vaksinasi	0/50 (0)
Kalimantan Tengah	Tidak vaksinasi	0/50 (0)
Bali	Vaksinasi	0/25 (0)
NTT	Tidak vaksinasi	0/25 (0)

Pada Tabel 3 memperlihatkan data hasil uji ELISA NS-1 serum ayam yang berasal dari daerah dengan kasus *Avian Influenza*, pada ayam yang berasal dari propinsi Bali ayam yang divaksinasi setelah diuji dengan ELISA NS-1 menunjukkan hasil 11,48% positif terhadap antibodi NS-1, sedangkan ayam yang divaksinasi menunjukkan hasil 5,40% positif terhadap antibodi NS-1. Di propinsi NAD dari 62 sampel hanya 1 sampel yang positif antibodi NS-1. Sampel yang berasal dari propinsi NTT dari 36 sampel tidak ada yang terdeteksi positif antibodi NS-1.

Tabel 3. Hasil ELISA NS-1 pada ayam di daerah yang memiliki kasus *Avian Influenza*

Propinsi	Status Vaksinasi	Titer ELISA Positif (%)
Bali	Tidak vaksinasi	17/148 (11,48)
Bali	Vaksinasi	3/55 (5,40)
NAD	Tidak vaksinasi	1/62 (1,60)
NTT	Tidak diketahui	0/36 (0)

Dari hasil pengkajian ini dapat disimpulkan bahwa semua serum ayam yang berasal dari daerah bebas *Avian Influenza* menunjukkan hasil negatif terhadap antibodi NS-1, sedangkan serum ayam yang berasal dari daerah tertular *Avian Influenza* menunjukkan hanya sebagian yang positif terhadap antibodi NS-1. Hal ini menunjukkan bahwa ELISA NS-1 dapat digunakan sebagai alat untuk membedakan antara antibodi serum ayam hasil dari vaksinasi atau dari infeksi alami *Avian Influenza*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada JICA, BBVet Denpasar, BPPV Medan, BPPV Banjar Baru dan PT. Medion atas kesediaannya memberikan sampel dan penyediaan sarana uji.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Birch-Machin, I., Rowan, A., Piek, J., Mumford, J., Binns, M.** 1997. Expression of the non structural protein NS-1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS-1 antibody in post infection equine sera. *J. Virol. Methods* 65: 255-263.
2. **Dundon, W. G., and Capua, H.** 2009. A closer look at the NS-1 of influenza virus. *Viruses* 1: 1057-1072.
3. **Garcia-sastre, A., A. Egorov, D. Matasov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese, and T. Muster.** 1998. Influenza A virus lacking the NS-1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252: 324-330.
4. **Krug, R. M., and P. R. Etkind.** 1973. Cytoplasmic and nuclear virus specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology* 56: 334-348.
5. **Tumpey, T. M., Alvarez, R., Swayne, D. E., Suarez D. L.** 2005. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS-1, the nonstructural protein of influenza A virus. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43 No. 2: 676-683.
6. **Wibowo, M. H., Asmara, W., dan Tabbu C. R.** 2006. Isolasi dan identifikasi serologis virus avian influenza dari sample unggas yang diperoleh di D. I. Yogyakarta dan Jawa Tengah. *J. Sain Vet.* Vol. 24 No. 1.