

UJI VALIDITAS RFFIT (*RAPID FLUORESCENT FOCI INHIBITION TEST*) DI BALAI VETERINER BUKITTINGGI

Yul Fitria, Rahmi Eka Putri, Niko Febrianto, Roza Arianti, Rio Nurwan,
Desmira V Mudaris, Didik Tulus Subekti
yulfitria@yahoo.com

Balai Veteriner Bukittinggi

ABSTRAK

RFFIT (Rapid Fluorescent Foci Inhibition Test) merupakan uji netralisasi serum rabies untuk mengukur kemampuan antibodi spesifik dan nonspesifik rabies menghambat infeksi virus dan perkembangan virus. Penelitian terbatas ini dimaksudkan untuk melihat kemampuan uji RFFIT yang dilakukan di Balai Veteriner Bukittinggi. Uji validitas dilakukan dengan menggunakan serum anjing yang sudah jelas status vaksinasi. Kegiatan ini menggunakan 51 serum yang telah diketahui riwayat vaksinasi dan dilakukan pemeliharaan di kandang Hewan Coba Balai Veteriner Bukittinggi. Hasil uji validitas RFFIT di Balai Veteriner Bukittinggi adalah sensitifitas 97,56% (87,15-99,94%), Spesifisitas 90,00% (55,49%-99,75%), Nilai Prediktif Positif 90,00% (56,23%-98,44%) dan Nilai Prediktif Negatif 90,00% (56,23%-98,44%), Nilai Akurasi 96% dan AUC 0,94 (0,833-0,986). Nilai Validitas yang dihasilkan sangat baik diatas 90,00%.

Kata Kunci: RFFIT, Uji Validitas

PENDAHULUAN

Rabies adalah penyakit zoonosis berbahaya dan menimbulkan kematian, baik pada hewan maupun pada manusia. Sifatnya langsung karena hanya memerlukan satu jenis vertebrata untuk bertahan hidup dan agen penyakit tidak mengalami perubahan selama penularan. Selain itu, penyakit ini bersifat antropozoonosis sehingga dapat ditularkan oleh satwa liar, hewan peliharaan maupun oleh hewan yang hidup di sekitar pemukiman manusia. Rabies dikenal sejak tahun 425 SM dan pada tahun 340 SM, Aristoteles memperingatkan kemungkinan penularan dari anjing ke manusia.

Kerjasama pihak veteriner dan kesehatan untuk mengendalikan rabies dimulai secara formal pada tanggal 15 Agustus 1978 dengan penerbitan Surat Keputusan Bersama Menteri Kesehatan, Menteri Pertanian, dan Menteri Dalam Negeri tentang kerjasama meningkatkan pemberantasan dan penanggulangan rabies di Indonesia. Sebelumnya pemerintah telah menetapkan berbagai kebijakan, yaitu Staatsblad 1912 No.432 hingga Staatsblad 1928 No.180, UU Pokok Kehewan No. 6 tahun 1967 pasal 21, PP tahun 1983 No 22 tentang Kesmavet dan program kerjasama Departemen Pertanian dan Departemen Dalam Negeri tahun 1967, serta ditunjang dengan keputusan-keputusan lain di tingkat Propinsi. Jika kasus rabies hewan menurun, dipastikan kasus gigitan dan kematian manusia akibat rabies pun menurun. Kasus rabies pada hewan selalu diikuti oleh dengan kemunculan rabies pada manusia, jumlah sebanding dengan jumlah kasus yang terjadi di daerah.

Tindakan ini dilanjutkan dengan evaluasi cakupan wilayah vaksinasi dan evaluasi titer antibody sehingga dapat melidungi hewan dari rabies. Cakupan vaksinasi merupakan salah satu hal yang sangat penting dalam pengendalian suatu penyakit, disamping kualitas vaksin, teknik aplikasi, dan waktu pelaksanaan vaksinasi (Rahman dan Maharis, 2008; Touihri et al., 2011)

Evaluasi keberhasilan vaksinasi dapat dilakukan dengan surveilan serologis untuk deteksi antibody pasca vaksinasi. Jenis vaksin memberikan hasil yang berbeda pada titer antibody yang ditimbulkan. Titer antibody tertinggi dicapai antara 3 sampai 6 bulan pasca vaksinasi. Dan terendah antara 9 sampai 12 bulan pasca vaksinasi (Ohore et al 2007). Imunisasi pada anjing atau hewan liar lainnya akan mempertahankan imunitas pada kelompok anjing pada populasi tersebut sehingga akan menghambat penularan virus lebih lanjut. Titer antibody minimal 0,5 IU yang dikorelasikan dengan level angka imunitas pada manusia yang melindungi terhadap serangan virus rabies (WHO Expert Committee on Biological Standards, 1985).

Untuk mendeteksi antibody rabies dilakukan dengan Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) dan Fluorescent Antibody Virus Neutralisation (FAVN) (OIE,2011) sebagai gold standard pengujian untuk serologis rabies (Hooper et al, 1998). RFFIT merupakan pengujian *in vitro* untuk netralisasi antibody pada virus rabies. Pengujian dilakukan pada 8 sumuran kamar slide dengan pembacaan menggunakan pewarnaan immunofluorescent pada sel dengan indicator pertumbuhan virus, dengan masa uji 24 jam. Metode ini digunakan sebagai uji pada investigasi infeksi rabies akut dengan menguji serum, dan sebagai monitoring pasca vaksinasi respon imun pada manusia dan sebagai dasar mengeluarkan sertifikat vaksinasi pada anjing dan kucing pada saat bepergian. RFFIT juga bisa mendeteksi adanya reaksi silang dengan family Lyssavirus yang lain, seperti Australian Bat Lyssavirus. Staf yang melakukan pengujian harus sudah melakukan vaksinasi dan tetap dimonitoring titer antibody pasca vaksinasi selama setiap 6 bulan. Hasil uji akan ditampilkan berupa *equivalen relative level* dengan OIE serum standard.

TUJUAN

Studi ini bertujuan untuk mengukur nilai spesifisitas, nilai sensitifitas, nilai akurasi pengujian RFFIT yang dilakukan di Balai Veteriner Bukittinggi.

MATERI DAN METODA

51 (lima puluh satu) sampel serum anjing yang telah diketahui oleh riwayat vaksinasi dan kelahiran dari induk, dipelihara sendiri di kandang hewan coba Balai Veteriner Bukittinggi. Disimpan pada suhu -80°C . Pengambilan darah anjing pada hewan coba dilakukan secara periodik dan diambil serumnya sesuai prosedur dan menjadi serum kontrol untuk pengujian di Laboratorium Virologi,

Balai Veteriner Bukittinggi. Pengujian dilakukan dengan metode RFFIT yang telah dilakukan di Laboratorium Pengembangan Metoda Balai Veteriner Bukittinggi. Uji ini pertama kali diperkenalkan di Balai Veteriner Bukittinggi dalam rangka kerjasama AIP-EID, AAHL Australia dengan Kementerian Pertanian pada tahun 2012. Pengujian ini dilakukan dengan prosedur sebagai berikut,

1. PERSIAPAN

1.1. Persiapan Sampel

Sampel untuk pemeriksaan RFFIT adalah serum. Sampel darah hewan dan manusia, tidak dalam keadaan hemolysis, Serum dipisah dari klot darah setelah disentrifus dengan kecepatan 2.500 rpm selama 15 menit. Serum ditampung dalam tabung effendorf dan disimpan pada suhu - 20°C atau -70°C. Semua sampel serum harus diinaktivasi dengan panas pada suhu 56°C selama 30 menit sebelum dilakukan pengujian.

1.2. Persiapan Pengujian

Rabies merupakan penyakit zoonosis untuk menjamin keamanan penguji maka diwajibkan Staf yang bekerja dengan virus hidup harus sudah mendapatkan vaksin rabies dengan titer antibodi minimal 1,0 IU/ml, cek kondisi titernya secara berkala setiap enam bulan. pemakaian masker dan sarung tangan dan dalam BSC level 2

2. PROSEDUR UJI RFFIT

Prosedur uji RFFIT terdiri dari beberapa tahapan antara lain :

2.1 Tahap Netralisasi Virus

- Mulai dengan uji lembar awal VNT . Satu *slide* akan memerlukan titrasi pada standar internasional dan satu slide untuk *back titration*.
- Serum di inaktivasi dengan cara memanaskan sampel pada suhu 56°C selama 30 di dalam mesin penghangat air / *waterbath*.
- Identifikasi ruang-ruang pada slide yang diperlukan dengan memberikan nomer dengan pinsil menurut lembar pencatatan sampel dan hasil.
- Setiap uji serum biasanya *discreen* pada pengenceran 1:20 dan 1:200. Untuk titik akhir titrasi serangkaian dua-kali lipat pengenceran bisa digunakan (cth. dari 1:20 hingga 1:2560). Serum *control internasional unit* OIE 0.5 IU/ml diuji pada pengenceran 1:8 hingga 1:64. Pengenceran serum dikalkulasi pada konsentrasi serum akhir setelah penambahan virus dan dapat disiapkan di dalam chamber slide atau, jika sejumlah besar sera diperlukan untuk diuji, di dalam plat microtitre dan ditransfer ke dalam chamber slide.
- Untuk screening sera pada pengenceran 1:20 dan 1:200, tambahkan 100µl BME dengan 5% TPB untuk setiap dua sumur. Tambahkan 11µl serum dari sumur pertama dan berikan pengenceran 1:10. Campur dengan baik

sebelum mentransfer 11µl dari sumur pertama kedalam sumur kedua. Campur dan buang 11µl pada akhir.

- Untuk pengenceran standar internasional OIE, tambahkan 300µl BME dengan 5% TPB ke dalam sumur paling atas kiri dan 100µl ke dalam enam sumur dasar chamber *slide*.
- Untuk slide *back titration* virus, tambahkan 100µl BME dengan 5% TPB kedalam 6 sumur pertama dari *chamber slide*, dan 200µl kepada 2 sumur terakhir untuk kontrol sel.

PADA TAHAP KERJA INI, PEKERJAAN DITRANSFER KE LABORATORIUM RABIES.

Ambil slide dan BME +5% TPB untuk mengencerkan virus dan lakukan back-titration (1ml per slide + ~ 2ml).

- Di dalam laboratorium rabies, lepaskan satu ampul Standar Internasional dan satu ampul bervolume 50µl untuk virus rabies CVS dari -80° C freezer dan biarkan mencair dalam *cabinet*. Semua pekerjaan dilaksanakan di dalam BSC 2
- Lengkapi rangkaian pengenceran standard internasional dengan menambahkan 100µl dari 0.5 IU/ml serum standar internasional OIE kepada 300µl medium di sumur pertama untuk memberikan pengenceran 1:4. Pindahkan 100µl kepada sumur atas kanan dan 100µl ke pada masing-masing sumur yang persis dibawahnya. Lanjutkan untuk melipat pengenceran dari slide-ke *slide* untuk memberikan duplikasi dari empat pengenceran. Pengenceran terakhir, diikuti dengan tambahan virus 100µl, dengan 1:8, 1:16, 1:32, 1:64.
- Virus rabies CVS 11 (0112-03-1701) diencerkan dalam BME dengan 5% TPB agar mengandung 50 ? 50% Dosis Fokus Fluoresens (y.i. 50FFD₅₀/0.1ml). Tambahkan 100µl virus yang telah diencerkan kepada semua sumur yang berisi serum dan kepada 2 sumur dari *slide back titration*. Gunakan pipet *multi-stepper* dengan dua ujung. Hati-hati agar tidak terkena percikan virus dari sumur.
- Buatlah 2, pengenceran berlipat 10 virus dengan keenceran kerja (cth. 25µL pengencer kerja + 225µL BME/5% TPB, untuk 5 FFD₅₀/0.1mL, kemudian 25µL dari pengencer ini + 225µL BME/5% TPB, untuk 0.5 FFD₅₀/0.1mL) dan tambahkan 100µl dari setiap enceran kepada 2 sumur dari *slide back titration*.
- Lakukan inkubasi terhadap *slide-slide* pada ruang tersebut pada suhu 35 °C dalam 5% CO₂ selama 90 (± 15) menit.
- Selama masa inkubasi, lakukan persiapan suspensi sel BHK.
- Gunakan untuk sel BHK yang sehat yang diperiksa dua hari sebelumnya, siapkan suspensi sel BHK (vaksin) yang mengandung 0.5 X10⁶ sel/ml dalam media pertumbuhan BHK, dan isikan 2 ml untuk setiap ruang *slide*. Simpan suspensi sel pada suhu +4°C hingga diperlukan.
- Setelah virus/serum selesai inkubasi, berikan suspensi sel dengan cara menambahkan setiap ml sel masing-masing, 1µl of 1% DEAE dextran

(konsentrasi final 10 μ g/ml). Campurkan dengan rata sebelum menambahkan 200 μ l sel yang telah diberikan *treatment* kepada setiap sumur (gunakan pipet *multi-stepper* dengan dua ujung). Perhatikan agar tidak membuat virus terpercik ke luar dari sumur.

- Inkubasi pada suhu 35°C dalam 5 % CO₂ untuk 22 sampai maksimal 24 jam.

Tahap Fiksasi Sel

- Di dalam laboratorium rabies, bekerja dalam *class 2 cabinet*.
- Lepaskan semua penutup dari *chamber slide* ruang dan buang.
- Perlahan tuang medium dari kultur *slide* ruang ke dalam tempat pembuangan dengan larutan Pyroneg.
- Pipet 200 hingga 400 μ l PBS ABC ke dalam setiap sumur.
- Perlahan tuang PBS dari *chamber slide* ke dalam tempat pembuangan dengan larutan Pyroneg.
- Pipet 200 hingga 400 μ l 80 % aseton ke dalam setiap sumur dan biarkan *slide* selama 2 menit.
- Tuangkan 80 % aseton ke dalam pipet yang dibuang dengan sekitar 200 – 300 ml Virkon, tutup.
- Lepaskan plastik dengan *forcep* dan buang ke dalam larutan Pyroneg atau kedalam tempat sampah *burn bin*. Biasanya *gasket* akan lepas tanpa housing. Jika ini tidak terjadi, lepaskan dengan *forcep* dan buang. Taruh *slides* pada tempat rak *slide*.
- Transfer tempat rak *slide* ke dalam aseton pada suhu – 20 °C dengan memindahkan stoples Coplin berisi aseton dari kabinet bersuhu – 20 °C, meletakkan rak stoples, dan memasukkan rak ke dalam stoples, dan mengembalikan suhu ke– 20 °C.
- Sel difiksasi pada – 20 °C selama setidaknya 30 menit.
- Ambil Stoples Coplin yang berisi *slide* ke kabinet dan keluarkan rak slide. Kembalikan stoples pada suhu– 20 °C dan biarkan *slides* kering udara di dalam cabinet.

Pewarnaan Sel.

- Di dalam lab rabies, keluarkan 0.5ml *aliquot* dari bentuk *conjugate* – 80°C dan biarkan mencair.
- Encerkan *conjugate* 1:20 dengan cara 10 ml *conjugate* *diluent* untuk memberikan *conjugate dilution* final 1:100. Filter menggunakan filter 0.45 μ m sebelum penggunaan.
- Letakkan slide di baki untuk *slide*. Tambahkan *conjugate* di atas setiap kotak dengan sel tetap, kemudian sebar di atas area pewarnaan dengan ujung kuning terbalik. Tambahkan warna bila diperlukan, tetapi jaga agar tidak melebihi kapasitas *slide*, karena pewarna akan terbuang. (diperlukan 1 ml pewarna untuk setiap *slide*).
- Inkubasi baki slide pada suhu 35 C dalam 5% CO₂ selama 30 menit.

- Ambil *conjugate* dari *slide* dan buang, kemudian bilas *slides* dengan mencelupkan 5 kali di dalam larutan PBS.
- Keringkan *slide* di udara, tambahkan 2 tetes cairan *mounting* pada *slide* and tutup dengan *cover glass*
- Tambahkan 2 tetes cairan *glycerol immersion* di atas setiap penutup/*cover slip* sebelum pembacaan.

HASIL

Pembacaan

- Nyalakan mikroskop fluorescent.
- Periksa semua slide dibawah 20x *glycerol immersion lens* oleh epifluoresens
- Amati 20 bidang pandang pada setiap ruang dan hitung bidang yang mengandung sel fluoresens.
- Catat hasil di dalam lembar pencatatan .
- Catat bilamana ada sumur yang menunjukkan sel yang jelek, yakni karena efek toksik serum.

Syarat Hasil Pengujian diterima

- Baca *slide* kontrol.
- Sel kontrol harusnya tidak ada yang dengan berfluoresens.
- Sumur dengan 50 FFD₅₀/0.1ml harusnya memiliki 18 - 20 bidang positif, sumur 5 FFD₅₀/0.1ml harusnya memiliki 10 - 20 bidang positif dan pada 0.5 FFD₅₀/0.1ml seharusnya cukup karena dibawah 10 bidang positif. (Estimasi *back titration* terhadap FFD₅₀ harusnya menunjukkan angka antara 30 sampai 90 FFD₅₀).
- Hasil titer netralisasi dari serum Standar Internasional diestimasikan melalui perhitungan jumlah *foci* fluoresens pada setiap pengenceran dan kemudian menggunakan angka-angka tersebut dalam rumus REED dan MEUNCH (1938) untuk mengkalkulasi suatu titik akhir 50%, dengan prediksi pengenceran standar ini yang akan menghasilkan 10 bidang fluoresens. Untuk standar OIE, 50% *end point* pengenceran harus berada di antara 6.5 unit internasional.
- Jika kondisi ini tidak terpenuhi, laporkan masalah penerimaan kepada penanggung jawab laboratorium yang akan menentukan jika semua atau sebagian dari uji tersebut harus diulang.
- Kegagalan terus menerus uji tersebut dalam melewati standar pengendali, atau indikasi bahwa hasil akan tertunda oleh cara lain harus dengan segera dilaporkan kepada penanggung jawab laboratorium yang berwenang.

Interpretasi Hasil

Hasil uji serum diekspresikan dalam unit internasional per ml oleh rasio uji tes serum dengan Serum Standar Internasional dikalikan dengan 0.5 untuk mengkonversi hasil menjadi IU/ml, maka,

$$\text{Test Serum (U / ml)} = \left[\frac{\text{test serum } \theta \% \text{ titre}}{\text{Int.std serum } \theta \% \text{ titre}} \right] \times 0.5$$

Tingkat netralisasi lebih dari 0.5 IU/ml dianggap signifikan.

Sampel-sampel dimana pengujian mengindikasikan tingkat antibody yang rendah dari 0.5 IU/ml harus dinilai ulang untuk memastikan validitas hasil awal.

Pada tabel 1 dapat dilihat hasil yang diharapkan seharusnya dengan hasil RFFIT.

Tabel 1. Hasil Pengujian RFFIT pada serum anjing

No	Kode Sampel	Jenis Hewan	Hasil RFFIT	Interpretasi Hasil	Hasil seharusnya dari riwayat hewan
1	C2 15/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
2	A1 15/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
3	A2 15/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
4	C2 21/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
5	A1 4/10	Anjing	23,5 IU/ml	Positif	Positif
6	A2 4/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
7	A2 28/9	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
8	C2 28/9	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
9	C1 28/9	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
10	C1 28/9	Anjing	4,96 IU/ml	Positif	Positif
11	C2 19/10	Anjing	25,11 IU/ml	Positif	Positif
12	C1 19/10	Anjing	10,4 IU/ml	Positif	Positif
13	C2 19/10	Anjing	16,8 IU/ml	Positif	Positif
14	A1 19/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
15	C1 19/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
16	A1 21/9	Anjing	25,11 IU/ml	Positif	Positif
17	C1 29/4	Anjing	13,8 IU/ml	Positif	Positif
18	A2 21/9	Anjing	25 IU/ml	Positif	Positif
19	A2 19/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
20	C1 3/5	Anjing	2,3 IU/ml	Positif	Positif
21	A1 3/5	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
22	C2 11/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
23	A1 14/10	Anjing	23,5 IU/ml	Positif	Positif
24	A2 11/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
25	C1 11/10	Anjing	2,7 IU/ml	Positif	Positif
26	A2 1/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
27	C1 1/11	Anjing	10,4 IU/ml	Positif	Positif
28	A1 1/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
29	C2 1/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
30	C1 23/8	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Positif
31	A1 23/8	Anjing	25,1 IU/ml	Positif	Positif
32	C2 23/8	Anjing	2,3 IU/ml	Positif	Positif
33	A2 23/8	Anjing	21,7 IU/ml	Positif	Positif
34	A2 3/5	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
35	A1 25/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif

No	Kode Sampel	Jenis Hewan	Hasil RFFIT	Interpretasi Hasil	Hasil seharusnya dari riwayat hewan
36	A2 25/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
37	C2 25/10	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
38	C1 25/10	Anjing	2,67 IU/ml	Positif	Positif
39	C2 8/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
40	A1 8/11	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif
41	E 4/10	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
42	E 11/10	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
43	E2 19/10	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
44	E 25/10	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
45	E5 8/11	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
46	E2 1/11	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
47	K.A 3/5	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
48	E 3/5	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
49	E 23/8	Anjing	< 0,5 IU/ml	Negatif	Negatif
50	C/K 15/11	Anjing	0,8 IU/ml	Positif	Negatif
51	Bojan	Anjing	26 IU/ml	Positif	Positif

Hasil RFFIT dilakukan validasi dengan membandingkan hasil RFFIT dengan hasil seharusnya sesuai dengan anamnesa di kandang hewan coba. Hasil lengkap dapat dilihat pada tabel 2. Pada tabel 2x2 dapat dilihat sensitifitas dan spesifisitas pengujian RFFIT di Balai Veteriner Bukittinggi.

Tabel 2. Hasil uji Validitas RFFIT di Balai Veteriner Bukittinggi

Hasil seharusnya	RFFIT		Jumlah	Sensitifitas	Spesifisitas	NPV	PPV	Akurasi	AUC
	Positif	Negatif							
Positif	40	1	41	97,56%	90,00%	90,00%	97,56%	96,00%	0,94
Negatif	1	9	10	(87,15%-99,94%)	(55,49%-99,75%)	(56,23%-98,44%)	(86,16%-99,61)		(0,833-0,986)
Total	41	10	51						

PEMBAHASAN

Pada tabel 2 diketahui hasil studi ini nilai sensitifitas 97,56%, spesifisitas 90,00%, dengan nilai akurasi 96,00%,serta AUC 0,96. Nilai AUC 0,96 dinilai excellent oleh Simundic AM, tahun 2018. Nilai spesifisitas terbilang agak rendah dibanding dengan nilai sensitifitas karena sampel negatif yang ada hanya 10, sehingga hanya satu ketidaksesuaian membuat nilainya turun. Hal ini dibandingkan dengan serum positif. Balai Veteriner Bukittinggi sudah melakukan uji RFFIT dengan baik dari segi nilai akurasi yang dihasilkan.

KESIMPULAN

Dari hasil studi yang dilakukan di Balai Veteriner Bukittinggi sudah bisa melakukan uji dengan sangat baik.

SARAN

Uji RFFIT harus dilakukan uji Profisiensi dengan laboratorium OIE untuk Rabies , ANSES, Perancis, sehingga bisa digunakan secara legal untuk ijin perpindahan hewan ke negara lain.

DAFTAR PUSTAKA

- [OIE] Office International des Epizootics. 2011. Terrestrial manual. Rabies. [diakses pada 31Mei 2019]. http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/healthstandards/tahm/2.01.13_rabies.pdf.
- CSIRO. 2008. Rabies Rapid Fluorescent Foci Inhibition Test for Measurement of serum neutralising antibody for rabies. Roos lunt April 2008
- Simundic AM. 2008. Measures of Diagnostic accuracy : basic definitions. eJIFCC. 19(4):203-211
- WHO. 2013. Rabies. Updated July 2013