Diagnostik Sensitivitas dan Spesifisitas*Complement FixationTest* dalam Deteksi Antibodi terhadap *Brucella abortus* dalam Serum Sapi

Saiful Anis, Rosmiaty. Ferry Kurniawan
Balai Besar Veteriner Maros
saiful.anis@yahoo.co.id

Abstrak

Brucella merupakan bakteri Gramnegatif, berbentuk *cocccobacilli*, bersifat sebagai patogen intraseluler fakultatif baik terhadap manusia maupun hewan. Teknik serologis adalah andalan diagnosis dan program CFT merupakan uji yang direkomendasikan sebagai uji komplementer dan sekaligus sebagai uji konfirmasi pengujian massal.Uji tunggal dapat divalidasi untuk satu atau lebih tujuan yang dimaksudkan dengan mengoptimalkan karakteristik kinerjanya untuk setiap tujuan, misalnya menetapkan sensitivitas diagnostik (DSe) tinggi, dengan kekhususan diagnostik (DSp) yang lebih rendah terkait untuk uji skrining, atau sebaliknya, menetapkan DSp tinggi dengan DSe yang lebih rendah terkait untuk uji konfirmasi.

Pendahuluan

Brucella merupakan bakteri Gramnegatif, berbentuk *cocccobacilli*, bersifat sebagai patogen intraseluler fakultatif baik terhadap manusia maupun hewan. Bakteri ini dapat melakukan penetrasi terhadap mukosa nasal, oral atau rongga paringeal dan difagosit oleh makrofag hospes, di dalam makrofak *Brucella* akan bertahan dan melakukan replikasi. Brucellosis adalah penyakit zoonosis yang sulit didiagnosa dan diobati, sehingga menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup besar pada sektor peternakan dan dapat menyerang manusia, ditandai oleh *undulan fever* yang apabila tidak dilakukan pengobatan dapat berkembang menjadi infeksi kronis, dengan gejala persisten selama beberapa bulan. Infeksi kronis dapat menimbulkan infeksi pada jaringan sekunder, termasuk jantung dan otak (Cardoso *et al*., 2006). Gejala mungkin juga akan kambuh lagi setelah beberapa tahun setelah terjadinya infeksi awal. Manifestasi patologis brucellosis sangat beragam, termasuk arthritis, endokarditis dan meningitis pada manusia, sementara pada hewan brucellosis ditandai dengan abortus dan infertilitas (Lapaque *et al*., 2005; Cardoso *et al*., 2006).

Terdapat enam spesises teresterial genus Brucella yang sampai saat ini sudah diketahui, yaitu: *B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. ovis, B. canis,* dan *B. neotomae*. Klasifikasi ini terutama didasarkan pada perbedaan patogenisitas dan hospes utamanya (Corbel and Morgan. 1984). Spesies dan biovar dapat dibedakan melalui dengan pengujian diferensiasi berdasarkan karakteristik phenotip antigen lipopolysaccharida, phage typing, dye sensitivity, kebutuhan CO_2, produksi H_2S dan properti metabolik (Alton *et al*., 1998; OIE, 2009).

Infeksi Brucella pada sapi ditandai dengan respons inflamasi yang mempengaruhi sel-sel sistem reticuloendothelial dan plasenta selama kehamilan. Hal ini sering mengakibatkan kematian dan pengusiran janin antara bulan kelima dan kedelapan kehamilan. Selama aborsi, sejumlah besar brucellae dilepaskan yang mungkin, pada gilirannya, menyebabkan infeksi hewan lain dalam kawanan (Manthei dan Carter, 1950).

Diagnosis brucellosis pada sapi diperumit oleh waktu inkubasi bervariasi dan tidak adanya tanda-tanda klinis selain abortus. Isolasi mikrobiologis dari organisme penyebab menegaskan diagnosis (Morgan, 1977), dan hasil ini diambil sebagai 'gold standard' terhadap tes lain yang dibandingkan. Namun, memakan waktu dan membutuhkan fasilitas laboratorium yang mahal karena sifat organisme yang menular dan zoonosis. Polymerase chain reaction (PCR), berdasarkan primer brucella-spesifik, pada sampel darah adalah alat yang berpotensi kuat (Fekete et al., 1990), tetapi mungkin ada masalah sensitivitas karena bakteremia mungkin tidak konstan.

Teknik serologis adalah andalan diagnosis dan program pengujian massal. Yang paling sukses dari tes diagnostik serologis untuk B. abortus, B. melitensis, dan B. suis didasarkan pada deteksi antibodi terhadap antigen LPS dari strain Brucella halus. Epitop imunodominan LPS adalah O-chain yang merupakan homopolimer dari 1,2-linked Nacylated 4-amino-4, 6-dideoxy-a-D-mannopyranosyl residu (Caroff et al., 1984). Teknik tradisional dan terdokumentasi dengan baik untuk diagnosis serologis termasuk tes aglutinasi Rose Bengal Test (RBT), tes aglutinasi serum (SAT), tes fiksasi komplemen (CFT), dan ELISA tidak langsung (iELISA) dan ELISA kompetitif (cELISA). Uji polarisasi fluoresensi (FPA) (Nielsen et al., 1996) memiliki sejarah penggunaan yang lebih pendek dan belum ditetapkan dalam

prosedur pengujian rutin sebagian besar Laboratorium Referensi Brucellosis Nasional. CFT merupakan uji yang direkomendasikan sebagai uji komplementer dan sekaligus sebagai uji konfirmasi (OIE, 2009).

Pengujian yang diterapkan pada individu atau populasi memiliki banyak tujuan, seperti membantu dalam: mendokumentasikan kebebasan dari penyakit di suatu negara atau wilayah, mencegah penyebaran penyakit melalui perdagangan, berkontribusi terhadap pemberantasan infeksi dari suatu wilayah atau negara, mengkonfirmasikan diagnosis kasus klinis, memperkirakan prevalensi infeksi untuk memfasilitasi analisis risiko, mengidentifikasi hewan yang terinfeksi terhadap penerapan langkah-langkah pengendalian, dan mengklasifikasikan hewan untuk kesehatan kawanan atau status kekebalan pasca vaksinasi. Uji tunggal dapat divalidasi untuk satu atau lebih tujuan yang dimaksudkan dengan mengoptimalkan karakteristik kinerjanya untuk setiap tujuan, misalnya menetapkan sensitivitas diagnostik (DSe) tinggi, dengan kekhususan diagnostik (DSp) yang lebih rendah terkait untuk uji skrining, atau sebaliknya, menetapkan DSp tinggi dengan DSe yang lebih rendah terkait untuk uji konfirmasi (OIE, 2018).

Perkiraan DSe (proporsi sampel dari hewan referensi terinfeksi yang diketahui yang diuji positif dalam tes) dan DSp (proporsi sampel dari hewan referensi yang diketahui tidak terinfeksi yang diuji negatif dalam tes) adalah indikator kinerja utama yang ditetapkan selama validasi uji. Perkiraan ini adalah dasar untuk perhitungan parameter lain dari mana kesimpulan dibuat tentang hasil tes (misalnya nilai prediktif hasil tes positif dan negatif). Oleh karena itu, sangat penting bahwa perkiraan DSe dan DSp seakurat mungkin. Idealnya, mereka berasal dari pengujian panel sampel dari hewan referensi, riwayat yang diketahui dan status infeksi relatif terhadap penyakit / infeksi yang bersangkutan dan relevan dengan negara atau wilayah di mana tes akan digunakan. Perkiraan area di bawah kurva karakteristik operasi penerima (ROC) adalah tambahan yang berguna untuk perkiraan DSe dan DSp untuk tes diagnostik kuantitatif karena menilai tingkat persaingan globalnya (OIE, 2018; Greiner et al., 2000; Zweig & Campbell, 1993).

Materi dan Metode

Serum sampel

Jumlah sampel yang diperlukan untuk melakukan validasi CFT pada penelitian ini dengan asumsi sensitivitas dan spesifisitas uji CFT secara berurutan mencapai 95% dan 90% dengan tingkat kepercayaan 95% dan galat 5%, maka sampel yang dibutuhkan adalah 90 serum sampel referensi positif dan 140 serum sampel referensi negative (OIE, 2018).

Materi penelitian

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah: sodium chloride, veronal buffer, darah domba, hemolisin, complemen, serum control positif, antigen, serum control negative, komplemen. Peralatan yang digunakan: mikropipet multichanel 20-200µl, mikro shaker, mikroplate U bottom, gloves, water bath, incubator dan refrigerator.

Metode Uji CFT

Inaktivasi serum sapi pada suhu 58°C selama 30 menit. Pengujian dilakukan sesuai dengan protocol uji Balai Besar Veteriner maros (anonimus, 2016).

Kalkulasi diagnose sensitivitas dan spesifisitas

Metode untuk menentukan perkiraan DSe dan DSp adalah dengan menguji sampel referensi dalam pengujian, dan mentabulasi silang hasil tes kategoris dalam tabel 2 × 2. Selanjutnya nilai DSe dan DSp dinyatakan dalam persentasi, dimana DSe diperoleh dengan membagi nilai sampel positif sebenarnya (TP) dengan total sampel referensi positif yang diuji (TP ditambah sampel false negative (FN)) dikalikan dengan 100%. Demikian pula penghitungan DSp dilakukan dengan dengan membagi nilai sampel negatif sebenarnya (TN) dengan total sampel referensi negatif yang diuji (TN ditambah sampel false positif(FP)) dikalikan dengan 100% (OIE, 2018).

Hasil dan Pembahasan

Pembacaan hasil uji CFT positif dilakukan dengan membandingkan tingkat hemolisis pada sampel dengan dengan standar yang sesuai dengan 0, 25, 50, 75 dan 100% lisis, dan tidak adanya

aktivitas anti-komplementer diperiksa untuk setiap serum di baris pertama. Serum yang memberikan titer equivalent dengan 20 ICFTU/ml atau lebih dianggap sebagai positif.

Diagnostic sensitivitas ditentukan dengan pengujian sampel serum referensi positif. Dari total 90 sampel referensi positif 74 (TN) sampel memberikan hasil uji positif dan sisanya 16 (FN) sampel bereaksi negative, dengan demikian DSe uji CFT adalah 82,22% (CI 71,57% - 88,42%). Sedangkan hasil uji sampel untuk menentukan spesifisitas ditentukan dengan sampel referensi negative, dari 140 sampel serum negative didapatkan hasil uji positif palsu (FP) 2 sampel dan 138 sampel negative (TN), sehingga DSp adalah 98,57% (CI 96,58% - 100%).

Tes serologis sangat penting untuk diagnosis laboratorium brucellosis karena sebagian besar program pengendalian dan pemberantasan bergantung pada metode ini. Bakteri utuh yang tidak aktif atau fraksi yang dimurnikan (yaitu, lipopolisakarida atau protein membran) digunakan sebagai antigen untuk mendeteksi antibodi yang dihasilkan oleh inang selama infeksi. Antibodi terhadap spesies *smooth Brucella* (misalnya, *B. abortus* , *B. melitensis* , dan *B. suis*) bereaksi silang dengan antigen dari *B. abortus*, sedangkan antibodi terhadap spesies *rough Brucella* kasar (misalnya, *B. ovis* dan *B. canis*) bereaksi silang dengan persiapan antigen dari *B. ovis*(Nielsen, 2002).

Meskipun beberapa metode serologis saat ini tersedia, tes ini dapat diklasifikasikan sebagai tes skrining (misalnya, aglutinasi pelat antigen buffered-BPAT), pemantauan atau tes surveilans epidemiologis (misalnya, tes cincin susu), dan tes komplementer atau konfirmasi (misalnya, 2-mercaptoethanol, fiksasi komplemen, ELISA, dan uji polarisasi fluoresensi). Pemilihan tes yang diberikan harus mempertimbangkan spesies yang terkena dampak serta peraturan setempat (Poester et. al., 2010;Nielsen, 2002).

Karena akurasinya yang tinggi, fiksasi komplemen digunakan sebagai tes konfirmasi untuk *B. abortus, B. melitensis,* dan infeksi *B. ovis* dan ini adalah tes referensi yang direkomendasikan oleh OIE untuk persyaratan lalu-lintas hewan internasional(OIE, 2009; Gall et. al. 2001). Namun, metode ini memiliki beberapa kelemahan seperti biaya tinggi, kompleksitas untuk eksekusi, dan persyaratan untuk peralatan khusus dan personel laboratorium terlatih. Selain itu, tes ini menghadirkan keterbatasan dengan

sampel serum hemolisis atau serum dengan aktivitas anti-komplemen dari beberapa serum, dan terjadinya fenomena prozone (OIE, 2009). Berdasarkan data yang diperoleh dari pengujian sampel referensi untuk menentukan Dse dan Dsp uji ini dengan metode yang digunakan di Balai Besar Veteriner Maros, CFT memiliki tingkat sensitivitas sekitar 82% dan spesifisitas mencapai 98%. Hasil ini sesuai dengan penelitian serupa, dengan sensitivitas berkisar antara 77,1 hingga 100% dan spesifisitasnya dari 65 hingga 100% (Gall et. al. 2001; Perrett et. al. 2010).

CFT diakui sebagai tes yang sangat sensitif dan spesifik ketika dilakukan dengan benar, dan dikerjakan oleh tenaga terampil dan memahami prosedurnya, namun kinerja komparatifnya yang kurang baik. CFT juga memiliki banyak kelemahan praktis, paling tidak dari semuanya yaitu kompleksitas teknis relatifnya. Tes ini juga menghadapi masalah reaksi antikomplemen dan tidak akan bekerja pada sampel yang mengalami hemolisis. Selanjutnya, reaksi prozone yang disebabkan oleh persaingan antara isotipe C'activatingdan non-C'activating IgG (OIE,2018; McGuire et al., 1979), dan kemungkinan IgM (Nielsen dan Duncan, 1988), sehingga memerlukan pengenceran serum yang diuji pada beberapa pengenceran. Namun, harus diakui bahwa masalah ini tidak mencegah keberhasilan pemberantasan brucellosis di banyak negara yang menggunakan tes ini (misalnya Inggris dan Belanda).

Sensitivittas uji sangat dipengaruhi oleh adanya reaksi negative palsu. CFT juga dapat menghasilkan hasil uji negatif palsu, ketika antibodi jenis IgG2 menghambat fiksasi komplemen (Nielsen et al., 1988; MacMillan et al., 1990). Terlepas dari masalah yang melekat ini, CFT adalah uji yang banyak digunakan, dan telah dianggap sebagai tes serologis yang paling spesifik dan diterima untuk diagnosis brucellosis. Dengan demikian, ini adalah tes yang direkomendasikan untuk perdagangan internasional (OIE, 2009).

Kesimpulan

Diagnostik sensitivitas dan spesifisitas uji CFT menggunakan metode yang digunakan di Balai Besar Veteriner Maros secara berurutan adalah 82,22% dan 98,57%. Tingkat sensitivitas dan spesifisitas tersebut masih reliable dan selaras dengan hasil penelitian yang lain.

Daftar Pustaka

Alton, G.G., L.M Jones., R.D. Angus and J.M. Verger. 1998. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.

Cardoso, P. G., G. C. Macedo, V. Azevedo and S. C. Oliveira. 2006. *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. J. *Microbial Cell Factories.***5**:13.

Caroff, M., Bundle, D.R., Perry, M.B., Cherwonogrodzky, J.W., Duncan, J.R., 1984. Antigenic S-type lipopolysaccharide of Brucella abortus 1119-3. Infect. Immun. 46, 384.

Corbel, M. J. and W. J. Brinley-Morgan. 1984. Genus *Brucella*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1. Edited by: Krieg NR, Holt JG. The Williams & Wilkins, Baltimore. 377-388.

OIE. 2009. Bovine Brucellosis. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health Chapter 2.4.3.

OIE. 2018. Bovine Brucellosis. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health Chapter 3.1.4.

Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M., Sanborn, M.R., 1990. Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction. J. Appl. Bacteriol. 69, 216.

Gall D, Nielsen K, Forbes L, Cook W, Leclair D, et al. 2001. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. J Wildlife Dis 37: 110-118.

Greiner M., Pfeiffer D. & Smith R.D. 2000. Principles and practical application of the receiver operating

characteristic (ROC) analysis for diagnostic tests. *Vet. Prev. Med.*, **45**, 23–41.Lapaque, N., I. Moriyon, E. Moreno and J. P. Gorvel. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Current Opinion in Microbiology. 8:60–66.

McGuire, T.C., Musoke, A.J., Kurtti, T., 1979. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. Immunology 38, 249.Manthei, C., Carter, R., 1950. Persistence of Brucella abortus infection in cattle. Am. J. Vet. Res. 11, 173–180.

Morgan, W.J.B., 1977. The national brucellosis programme of Britain.In: Crawford, R.P., Hidalgo, R.J. (Eds.), Brucellosis: an International Symposium. A and M Univ. Press, Austin, TX, p. 378.

Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., Nicoletti, P., Thomas, F., 1996. A homogeneous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to Brucella abortus. J. Immunol. Methods 195, 161.

Nielsen K (2002) Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbiol 90: 447-459.

Perrett LL, McGiven JA, Brew SD, Stack JA. 2010 Evaluation of competitive ELISA for detection of antibodies to Brucella infection in domestic animals. Croat Med J 51: 314-319.

Poester P, Nielsen K, Samartino E. 2010. Diagnosis of brucellosis. Open Vet Sci J 4: 46-60.

Zweig M.H. and Campbell G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem*., **39**, 561–577.