

# User Manual for ELISA

Antibody Detection for Surra



## SURELISA Kit – Te

Kit Elisa untuk Surra

IgG antibody againts *Trypanosoma evansi*



**KEMENTERIAN PERTANIAN**  
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian  
**Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor**

**&**

**Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan**  
Direktorat Kesehatan Hewan  
**Balai Veteriner Banjarbaru**

# User Manual for ELISA

## IgG Antibody Againsts *Trypanosoma evansi*



### Pengantar

SURELISA Kit – Te merupakan produk diagnostik yang dikembangkan dari hasil kerjasama antara Balai Veteriner Banjarbaru (Laboratorium Referensi Penyakit Surra di Indonesia) dengan Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor (Pusat Unggulan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Veteriner di Indonesia). SURELISA terutama dikembangkan untuk deteksi antibodi pada ternak yang terinfeksi *Trypanosoma evansi*. SURELISA Kit - Te memiliki tiga varian yaitu SURELISA Kit - Te [Equine], SURELISA Kit - Te [Bovine] dan SURELISA Kit - Te [Multispecies]. Kit ini dikembangkan untuk deteksi antibodi IgG maupun IgM pada hewan yang terinfeksi *Trypanosoma evansi* dalam serum hewan atau plasma. Kemampuan uji SURELISA Kit – Te adalah 94,65% (Akurasi) dengan Sensitivitas 93,13% dan Spesifisitas 98,21%.

*Trypanosoma evansi* (*T.evansi*) menyebabkan trypanosomosis pada ternak yang dikenal sebagai surra. Ini mempengaruhi sejumlah besar hewan liar, ternak dan hewan kesayangan di seluruh dunia. Spesies inang utama bervariasi secara geografis, tetapi kuda, kerbau dan unta sangat peka terhadap Surra. Namun demikian, hewan lain seperti ruminansia kecil, anjing, babi, ayam dan satwa liar, juga rentan. Penularan dari satu hewan ke hewan lainnya melalui perantara vektor alat penghisap darah. Dengan demikian, bercampurnya hewan terinfeksi dengan hewan sehat dalam lingkup yang berdekatan sangat beresiko tersebarnya penyakit.

Metoda uji untuk diagnosa Surra sangat beragam diantaranya adalah MHCT (*microhaematocrite centrifugation technique*), MAECT (*miniature anion exchange chromatography technique*), preparat ulas darah, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), uji aglutinasi dan PCR (*polymerase chain reaction*). Namun OIE telah merekomendasikan aplikasi teknik ELISA untuk pernyataan bebas Surra pada hewan yang akan diekspor maupun deklarasi status bebas Surra pada suatu daerah dan diharuskan melakukan pengujian selama 40 hari.

### Prinsip Uji

Penentuan antibodi IgG/IgM spesifik terhadap infeksi *T. evansi* pada SURELISA Kit – Te berdasarkan teknik ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). sumuran mikrotiter yang telah dilapisi protein dari *T.evansi* akan berikatan dengan antibodi anti-*T.evansi* dari serum (terbentuk ikatan antibodi-antigen). Setelah sumuran mikrotiter dicuci, ditambahkan konjugat dan akan berikatan dengan antibodi-antigen (komplek imun) dalam sumur mikrotiter.

Komplek imun yang telah terbentuk akan terlihat berwarna biru apabila ditambahkan substrat TMB (*Tetramethylbenzidine*). Perubahan warna biru dapat dihentikan dengan penambahan asam sulfat sehingga membentuk warna kuning. Intensitas warna kuning yang terbentuk tersebut sebanding dengan jumlah antibodi IgG/IgM spesifik terhadap *T. evansi* dalam spesimen. Intensitas warna kuning dibaca menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm.

# User Manual for ELISA

IgG Antibody Againsts *Trypanosoma evansi*



Hasil yang telah pembacaan dengan ELISA Reader dianalisis dengan Spectra-ELISA® untuk menetapkan seropositif (terinfeksi *T. evansi*) atau seronegatif (normal / tidak terinfeksi *T. evansi*).

## Bahan di dalam Kit

1. Mikrotiter plat (96 well flat bottomed Nunc Maxisorb) .....	2 pc
2. Kontrol Positif (ready to use) .....	1 tube
3. Kontrol Negatif [N1] (ready to use) .....	1 tube
4. Kontrol Negatif [N2] (ready to use) .....	1 tube
5. Kontrol Negatif [N3] (ready to use) .....	1 tube
6. Konjugat (ready to use) .....	1 tube
7. Substrat TMB .....	2 tab.
8. Larutan Pengencer Substrat .....	1 tube
9. Larutan Pengencer Sampel .....	1 tube
10. Larutan Pencuci (Konsentrat – 10X) .....	1 tube
11. Larutan Penghentii Reaksi .....	1 tube
12. Spectra-ELISA® .....	1 fdd
13. Buku Panduan (User Manual) .....	1 buah

## Bahan Penting Lain yang tidak disertakan dalam Kit

- Pipet *Multichannel* (300  $\mu$ L) dan pipet 100 serta 0,2 – 2  $\mu$ L.
- *Microplate Reader* with filter at ( $\lambda$ ) 450 nm.
- *Vortex Mixer*.
- Timer.
- Air Suling Deionisasi (Steril)-(ddH<sub>2</sub>O).

## Storage and Stability

1. Store the kit at 2°C through 8°C. Store the positive and negative control at –20°C for longterm storage.
2. Sera samples should be aliquot and store at –20°C. Plasma samples only one time use and do not repeated freeze thawing.

## Prosedur Kerja

1. Larutan dapar pencuci (*washing buffer*) diencerkan dengan ddH<sub>2</sub>O (100 mL + 900 mL ddH<sub>2</sub>O).
2. Sampel serum / plasma diencerkan 1:800 (1  $\mu$ L serum dalam larutan dapar pengencer (*dilution buffer*) 800  $\mu$ L).
3. Kontrol negatif (N1) dimasukkan pada A1 dan B1.



4. Kontrol negatif (N2) dimasukkan pada C1 dan D1.
5. Kontrol negatif (N3) dimasukkan pada E1 dan F1.
6. Kontrol positif (P) dimasukkan pada G1 dan H1.
7. 100  $\mu$ L sampel serum / plasma yang telah diencerkan (#1) dimasukkan pada kolom #2 sampai #12.
8. Larutan pengencer sampel dimasukkan pada G12 dan H12.
9. Setelah sampel dan semua kontrol dimasukkan pada setiap sumuran, lempeng mikrotiter di inkubasi pada suhu kamar ( $25^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C}$ ) selama 1 (satu) jam.
10. Setelah inkubasi, dicuci dengan 300  $\mu$ L larutan dapar pencuci sebanyak 5 x (lima kali).
11. 100  $\mu$ L konjugat dimasukkan pada semua sumuran dan di inkubasi pada suhu kamar ( $25^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C}$ ) selama 1 (satu) jam.
12. Setelah inkubasi, dicuci dengan 300  $\mu$ L larutan dapar pencuci sebanyak 7 x (tujuh kali).
13. 100  $\mu$ L substrat dimasukkan pada semua sumuran dan di inkubasi pada suhu kamar ( $25^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 – 30 menit.
14. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu$ L larutan penghenti reaksi (*Stop Reaction*).
15. Lempeng mikrotiter selanjutnya dibaca pada ELISA reader / Microplate reader dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 450 nm.
16. Hasil yang diperoleh kemudian dianalisis dengan Spectra ELISA untuk menetapkan hasil uji serologi.

### **Kontrol Kualitas Pengujian (Quality Control = QC)**

Hasil uji dapat diterima apabila terpenuhi beberapa persyaratan sebagai berikut :

#### **A. QC Utama**

1. QC standard harus dinyatakan "PASSED".
2. QC pipetting dinyatakan "EXCELLENT atau GOOD".
3. Apabila QC Standard dinyatakan "FAILED" maka **pengujian tidak valid**.
4. Apabila QC pipetting (baik sebagian atau semuanya) dinyatakan "ACCEPTABLE atau REPEAT" tetapi QC Standard dinyatakan "PASSED" maka pengujian dapat diterima tetapi operator harus meningkatkan kemampuan.

#### **B. QC Internal**

1. QC Intra-assay setiap sampel yang diuji harus "GOOD atau EXCELLENT".
2. Apabila QC Intra-assay sampel dinyatakan "ACCEPTABLE" maka hasil uji terhadap sampel tersebut dapat diterima tetapi operator harus meningkatkan kemampuan.
3. Apabila QC Intra-assay sampel yang diuji dinyatakan "REPEAT" maka **sampel tersebut harus diuji ulang**.