

## **Pengembangan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* Paratuberkulosis dengan Antigen Protoplasmik *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Isolat Lapang**

**(DEVELOPMENT OF PARATUBERCULOSIS ENZYME-LINKED IMMUNO-SORBENT  
ASSAY WITH PROTOPLASMIC ANTIGEN OF MYCOBACTERIUM AVIUM  
SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS FIELD ISOLATES)**

**Rahmat Setya Adji<sup>1</sup>, I Wayan Teguh Wawan<sup>2</sup>,  
Denny Widaya Lukman<sup>3</sup>, Surachmi Setiyaningsih<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Tuberkulosis, Bagian Bakteriologi,  
Balai Besar Penelitian Veteriner,  
Jl. R.E. Martadinata 30 Bogor 16114,

Telepon: 02518331048, E-mail: rs.adji@yahoo.com

<sup>2</sup>Bagian Mikrobiologi Medik, <sup>3</sup>Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner,  
Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,  
Jl. Agatis Kampus FKH IPB Wing 5, Dramaga, Bogor 16680

### **ABSTRAK**

*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) merupakan metode uji serologi yang paling banyak digunakan untuk diagnosis paratuberkulosis, karena mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan uji serologi lain. Antigen protoplasmik (PPA) atau antigen ekstrak seluler sampai saat ini masih menjadi pilihan utama untuk pengembangan diagnosis paratuberkulosis. Penelitian ini bertujuan menggunakan PPA *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) isolat lapang untuk pengembangan ELISA paratuberkulosis (ELISA PPA-L). Serum sapi sebanyak 322 (300 negatif dan 22 positif) diuji menggunakan metode ini dan dibandingkan dengan kit komersial IDEXX. Sensitivitas dan spesifitas hasil uji ELISA PPA-L masing-masing 68,18% dan 97,0%, sedangkan untuk kit IDEXX 63,64% dan 97,33%. ELISA PPA-L mempunyai sensitivitas lebih tinggi dan spesifitas yang lebih rendah dibandingkan kit komersial. Metode ELISA dengan menggunakan antigen protoplasmik MAP isolat lapang mempunyai kemampuan yang baik untuk uji serologi paratuberkulosis dan dapat digunakan untuk uji tapis penyakit tersebut di Indonesia.

Kata-kata kunci : ELISA, PPA, paratuberkulosis, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

### **ABSTRACT**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a serological test method most widely used for the diagnosis of paratuberculosis, because it has a better sensitivity compared to other serological test. Protoplasmic antigen (PPA) or cellular extract is still the main choice for the diagnosis of paratuberculosis development. The aim of research was to use the PPA *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) field isolates for the development of paratuberculosis ELISA (ELISA PPA-L). As many as 322 cattle sera (300 negative and 22 positive) were tested using this method and compared with IDEXX commercial kit. The sensitivity and specificity of ELISA PPA-L test results were 68.18% and 97.0%, whereas for the IDEXX kit were 63.64% and 97.33% respectively. ELISA PPA-L had higher sensitivity and lower specificity compared to the IDEXX commercial kit. ELISA test using protoplasmic antigen of MAP field isolates has good ability for paratuberculosis serological test and can be used for screening test of the disease in Indonesia.

Keywords : ELISA, PPA, paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

## PENDAHULUAN

Paratuberkulosis atau *Johne's disease* (JD) adalah penyakit enteritis granulomatosa kronik pada ruminansia yang disebabkan oleh *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) (Harris dan Barletta, 2001; Manning dan Collins, 2001). Selain ruminansia, MAP juga dapat menginfeksi hewan non-ruminansia seperti tikus, kelinci, musang, rubah, dan babi liar (Beard *et al.*, 2001; Florou *et al.*, 2008). Pada peternakan sapi, penyakit ini menyebabkan kerugian ekonomi yang besar, karena terjadi penurunan produksi susu, gangguan reproduksi, peningkatan *calving interval*, dan pengafkiran dini (Greig *et al.*, 1999; Hasanova dan Pavlik, 2006). Menurut studi Ott *et al.*, (1999), kerugian ekonomi pada peternakan sapi perah akibat paratuberkulosis di Amerika Serikat mencapai 200-250 juta USD/tahun.

Penularan penyakit umumnya bersifat horizontal (*fecal-oral route*), melalui kolostrum, susu, atau air minum yang terkontaminasi MAP (Sweeney *et al.*, 1992). Selain itu, penularan juga dilaporkan bersifat vertikal melalui *intrauterine* dan semen (Lambeth *et al.*, 2004). Di Indonesia, kasus paratuberkulosis dilaporkan pada tahun 2008, bakteri MAP berhasil diisolasi dari sapi perah dengan estimasi prevalensi 2% (Adji, 2008). Paratuberkulosis bersifat zoonotik potensial, karena MAP dilaporkan berhubungan erat dengan kejadian *Crohn's disease* pada manusia, walaupun penyebab pastinya masih menjadi perdebatan (Scawah, 2000; Singh *et al.*, 2010).

Diagnosis paratuberkulosis didasarkan pada identifikasi agen penyebab, uji serologi, dan pengujian yang berbasis respons imun seluler. Isolasi dan identifikasi MAP dari sampel feses atau jaringan merupakan metode yang paling spesifik dan sebagai uji *gold standard* untuk deteksi paratuberkulosis (Clark Jr *et al.*, 2007; Stabel, 1997). Walaupun sebagai *gold standard*, metode kultur memerlukan waktu yang cukup lama (8-16 minggu) dan media khusus untuk memperoleh hasilnya. Uji serologi yang umum digunakan adalah *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *complement fixation test* (CFT), dan *agar gel immunodiffusion* (AGID).

Antigen protoplasmik (PPA) atau antigen ekstrak seluler dan lipoarabinomannan (LAM) sampai saat ini merupakan antigen utama yang digunakan untuk uji serologi paratuberkulosis, terutama ELISA. Senyawa PPA yang digunakan

berasal dari *Mycobacterium* strain 18 (*Mycobacterium avium* serovar 2) atau MAP strain 316. Perbedaan isolat atau strain dan metode ekstraksi, menyebabkan perbedaan sensitifitas dan spesifitasnya (Nielsen *et al.*, 2001). Senyawa PPAMAP isolat lapang kemungkinan juga mempunyai komponen protein antigenik yang berbeda dengan *Mycobacterium* strain 18 atau MAP strain lain. Pemanfaatan antigen dari isolat lapang untuk pengembangan ELISA kemungkinan dapat menghasilkan sensitifitas dan spesifitas yang lebih tinggi.

Kit ELISA yang digunakan di Indonesia merupakan produk impor dengan harga yang cukup mahal, sehingga menjadi kendala tersendiri dalam pemantauan paratuberkulosis pada peternakan sapi. Selain itu, penelitian dan pengembangan metode ini belum dilakukan di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah melakukan pengembangan uji ELISA untuk deteksi paratuberkulosis dengan menggunakan PPA MAP isolat lapang.

## METODE PENELITIAN

### Isolat Bakteri

Bakteri *M. avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) isolat lapang Indonesia didapatkan dari *Balivet Culture Collection* (BCC) nomor B2788. Bakteri *M. phlei* yang digunakan untuk preparasi antigen absorben juga dari BCC nomor B0666.

### Antigen Protoplasmik MAP Isolat Lapang (PPA-L)

Bakteri MAP B2788 dinokulasikan pada media Watson Reid's dimodifikasi (mWR), selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 16 minggu. Setelah bakteri tumbuh baik pada permukaan media, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Pelet dicuci tiga kali dengan 10 mM *phosphat buffer saline* (PBS) pH 7,2. Pelet dilarutkan kembali dengan PBS yang ditambahkan 0,05% *protease inhibitor cocktail* (Sigma, USA) dan dihomogenisasi. Suspensi disonikasi tiga kali dalam keadaan dingin selama 30 menit. Untuk memisahkan dinding sel dan sel-sel sisa, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 30.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dikoleksi, kemudian difiltrasi dengan membran filter ukuran 0,22 µm. Konsentrasinya diukur dengan menggunakan

metode Bradford dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan.

#### Antigen Absorben

Bakteri *M. phlei* B0666 ditumbuhkan pada media Sauton Medium (SM), kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama delapan minggu. Setelah bakteri tumbuh baik pada permukaan media, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Pelet dicuci tiga kali dengan 10 mM PBS pH 7,2. Pelet dilarutkan kembali dengan PBS dan dihomogenisasi. Suspensi disonikasi tiga kali dalam keadaan dingin selama 30 menit. Untuk memisahkan sel-sel sisa, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dikoleksi, selanjutnya difiltrasi dengan membran filter ukuran  $0,22\ \mu\text{m}$ , kemudian diukur konsentrasinya dengan menggunakan metode Bradford dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan. Antigen ini yang digunakan sebagai adsorben.

#### Serum

Serum sapi positif paratuberkulosis yang digunakan dalam penelitian ini ada sebanyak 22 sampel, yang berasal dari Balai Besar Penelitian Veteriner (BB Litvet): 11, *Laboratorium Service International* (LSI), Perancis : 5, dan *Allied Paratuberculosis Laboratorium*, USA : 6, sedangkan serum negatif yang digunakan merupakan koleksi BB Litvet sebanyak 300 sampel.

#### Agar Gel Immunodiffusion (AGID)

Teknik ini digunakan untuk menguji serum kontrol dengan antigen protoplasmik yang bertujuan untuk mengetahui reaktivitas kedua komponen tersebut. *Agarose* sebanyak 0,75 g dilarutkan kedalam 100 mL larutan yang terdiri dari 0,9 g borate ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0,2 g NaOH, 0,01 *sodium azide* (pH 8,5-9,0). Campuran dipanaskan dalam *microwave* dan dituangkan pada *petri dish* ukuran 90 mm sebanyak 15 mL, selanjutnya didinginkan dan dibuat lubang berbentuk hexagonal dengan diameter 4 mm, kedalaman 3-4 mm dan jarak antar lubang 2 mm. Antigen sebanyak 30  $\mu\text{L}$  dimasukan kedalam lubang bagian tengah, kemudian lubang lain diisi dengan serum kontrol positif dan negatif dengan volume yang sama, diinkubasikan pada suhu ruang ( $25-27^{\circ}\text{C}$ ) dengan keadaan lembab selama 24-48 jam.

#### Prosedur ELISA dengan Menggunakan PPA-L (ELISA PPA-L)

Antigen PPA ( $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) dilarutkan dalam *carbonat bicarbonat buffer* pH 9,6 dan dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  ke dalam setiap lubang mikroplat (Maxisorp, Nunc, Denmark), selanjutnya ditutup plastik adesif dan diinkubasikan semalam pada  $4^{\circ}\text{C}$ . Mikroplat dicuci tiga kali dengan *phosphat buffer saline tween* 0,05% (PBST) pH 7,4. Kemudian mikroplat diblocking dengan 200  $\mu\text{L}$  PBST-bovine serum albumin (BSA) 2% (PBST-BSA 2%) untuk setiap lubang, selanjutnya diinkubasikan pada suhu ruang selama dua jam. Mikroplat dicuci kembali, dan serum dilarutkan 1:100 dalam PBST-BSA 1% yang mengandung antigen *M. phlei* ( $250\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), dan diinkubasikan 30 menit pada suhu ruang. Serum dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  ke dalam setiap lubang mikroplat, dan diinkubasikan satu jam pada suhu ruang. Mikroplat dicuci dan konjugat *rabbit anti-bovine IgG HRP* (Jackson Immunoresearch, USA) dilarutkan 1:3000 dalam PBST-BSA 1%, kemudian dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  ke dalam setiap lubang, dan diinkubasikan satu jam pada suhu ruang. Setelah mikroplat dicuci, substrat *tetramethyl benzidine* (TMB) (Sigma, USA) dalam *phosphat citrate buffer* pH 5,0 dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  ke dalam setiap lubang mikroplat, dan diinkubasikan 30 menit pada suhu ruang dan di tempat gelap. Setelah itu, *stop solution* ( $0,5\ \text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$ ) dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  ke dalam setiap lubang mikroplat. Pembacaan dilakukan dengan *microplate reader* (Multiscan EX, ThermoScientific) pada panjang gelombang 450 nm. Nilai *optical density* (OD) dikonversi ke S/P rasio dengan menggunakan rumus,  $\text{S/P} = (\text{OD sampel} - \text{OD negatif}) / (\text{OD positif} - \text{OD negatif})$ . Pengujian dikatakan valid jika P/N ratio lebih atau sama dengan 5,0 dan nilai OD negatif di bawah 0,2.

#### Prosedur Kit ELISA IDEXX Paratuberculosis Screening Ab Test

Prosedur ELISA dikerjakan sesuai dengan petunjuk pembuatnya. Serum sampel dan kontrol dilarutkan dalam *sample buffer* (N.12) dengan perbandingan 1:20, selanjutnya dihomogenisasi dan diinkubasikan selama 15 menit pada suhu ruang. Kemudian dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  ke dalam tiap lubang mikroplat, untuk kontrol positif pada A1-B1, kontrol negatif C1, dan sampel pada lubang yang lain. Mikroplat ditutup dengan plastik adesif,

dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 45 menit. Setelah itu, mikroplat dicuci tiga kali dengan *wash solution*. Konjugat dilarutkan dalam *conjugate buffer* (N.1) 1:100 dan dimasukkan 100  $\mu$ L ke dalam tiap lubang mikroplat, selanjutnya ditutup dengan plastik adesif dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian dicuci kembali, selanjutnya *substrate* TMB (N.9) dimasukkan 100  $\mu$ L ke dalam tiap lubang mikroplat, dan diinkubasikan selama 10 menit pada suhu ruang dan di tempat gelap. *Stop solution* (N.3) dimasukkan 100  $\mu$ L ke dalam tiap lubang mikroplat, dan diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* (Multiscan EX, ThermoScientific) pada panjang gelombang 450 nm. Hasil uji dikatakan valid jika OD positif kontrol sama dengan atau di atas 0,35 dengan P/N ratio sama dengan atau di atas 3,0. Kalkulasi hasil dihitung dengan mengkonversi OD ke S/P % dengan rumus  $S/P \times 100$ . Hasil dinyatakan negatif jika S/P % sama dengan atau di bawah 45, meragukan jika S/P% antara 45-55 dan positif jika S/P% sama dengan atau di atas 55.

#### Evaluasi ELISA

Sensitivitas dan spesifitas ditentukan dengan menguji serum positif paratuberculosis

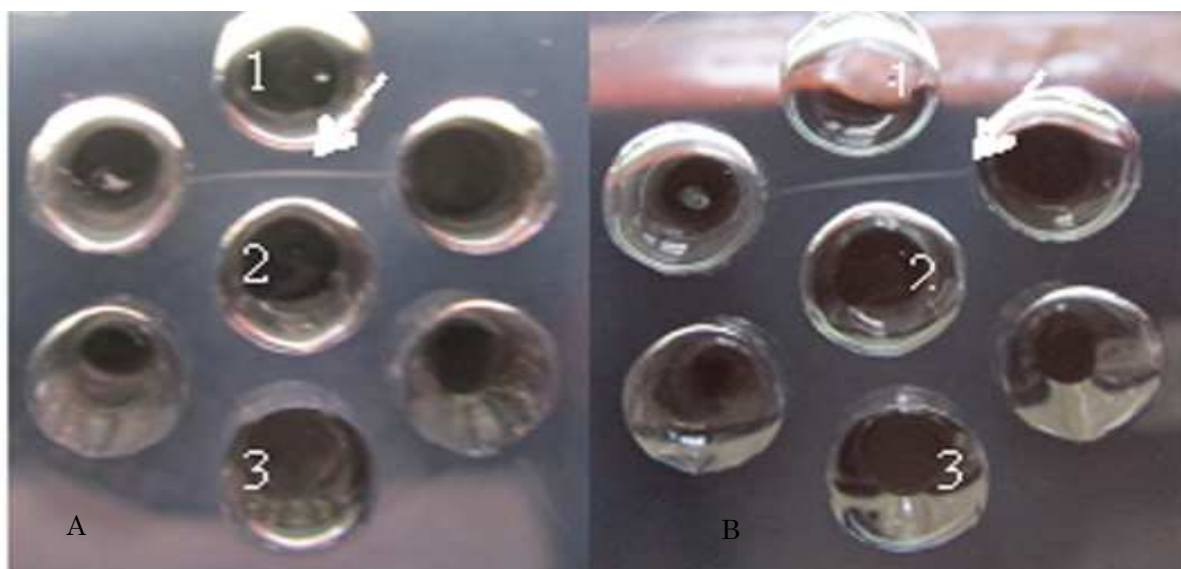
(kultur feses positif) dan serum negatif paratuberculosis.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Antigen protoplasmik (PPA) merupakan campuran *crude* antigen yang didapatkan melalui penghancuran sel *Mycobacterium* secara fisik, diikuti dengan penghilangan komponen dinding sel dan sisa-sisa sel. Preparasi antigen ini umumnya melalui sonikasi atau tekanan, ultrasentrifugasi, filtrasi dan penghilangan lemak, sehingga disebut juga antigen sonikasi (Bannantie *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2003) atau ekstrak seluler (Cho dan Collins, 2006).

Untuk mengetahui reaktivitas serum kontrol paratuberculosis dengan PPA-L, sampel diuji dengan AGID. Hasil uji positif ditunjukkan adanya garis putih (presipitin) antara antigen dan antibodi (Gambar 1).

Pada Gambar 1 teramati bahwa ada reaksi yang spesifik antara PPA-L dengan serum kontrol positif, baik yang berasal dari BBLitvet maupun *Allied Laboratories*, USA. Teknik ini dilaporkan cukup spesifik, dan digunakan untuk uji konfirmasi sampel serum sapi, domba, atau kambing yang secara klinis terindikasi



Gambar 1. Hasil AGID serum kontrol BB Litvet (A) dan Allied Laboratories (B). Keterangan: lubang nomor 1 diisi dengan serum positif paratuberculosis, lubang nomor 2 dengan antigen protoplasmik MAP isolat lapang (PPA-L) dan lubang nomor 3 dengan serum negatif. Garis putih (presipitin) menunjukkan hasil positif, yaitu adanya reaksi antara antigen dengan antibodi paratuberculosis.

paratuberkulosis (Ferreira *et al.*, 2002; Kalis *et al.*, 2002; OIE, 2012). Dinyatakan oleh OIE, (2012), bahwa pada sapi yang secara histologi terindikasi paratuberkulosis, sensitivitasnya 38-56% dengan spesifitas 99-100%, sedangkan menurut Ferreira *et al.*, (2002), bahwa untuk menguji kasus paratuberkulosis subklinis metode ini kurang memuaskan.

Penentuan nilai *cut off* ELISA PPA-L paratuberkulosis dalam penelitian ini dilakukan dengan menguji 400 serum negatif paratuberkulosis, dan dihitung dengan rumus rata-rata *optical density* (OD) negatif + 2SD. Hasil OD dikonversi ke dalam S/P rasio, hasil dinyatakan positif jika nilai S/P lebih besar atau sama dengan 0,6 meragukan jika S/P nilainya antara 0,5-0,6 dan negatif jika nilai S/P di bawah atau sama dengan 0,5.

Serum sapi yang diuji berjumlah 322 sampel, yaitu 300 negatif paratuberkulosis dan 22 positif paratuberkulosis. Hasil uji ELISA PPA-L untuk serum tersebut menunjukkan sensitivitas dan spesifitas masing-masing 68,18% dan 97,33% (Tabel 1). Koefisien variasi untuk kontrol positif 6,4% dan kontrol negatif 7,8% .

Untuk pemantauan dan pengendalian paratuberkulosis pada peternakan sapi, ELISA merupakan metode yang paling banyak digunakan, karena murah, cepat, dan mempunyai spesifitas yang tinggi. Walaupun variatif, metode ELISA mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan uji serologi lain (Reichel *et al.*, 1999; Stabel *et al.*, 2002). Sensitivitas metode ELISA akan meningkat seiring dengan perjalanan penyakit dan tingginya jumlah bakteri yang dikeluarkan melalui feses (Roussel *et al.*, 2007).

Penggunaan PPA dari isolat atau *strain* yang berbeda akan menyebabkan terjadinya

Tabel 1. Hasil ELISA PPA-L paratuberkulosis untuk 322 serum sapi

| ELISA   | Serum   |         | Total |
|---------|---------|---------|-------|
|         | Positif | Negatif |       |
| Positif | 15      | 9       | 24    |
| Negatif | 7       | 291     | 298   |
| Total   | 22      | 300     | 322   |

Keterangan . ELISA: *enzym-linked immunosorbent assay*; PPA-L: antigen protoplasmik MAP isolat lapang

variasi hasil dalam deteksi antibodi paratuberkulosis, terutama sensitivitas dan spesifitasnya. Menurut Nielsen *et al.*, (2001) antigen PPA dari *Mycobacterium* strain 18 mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dari MAP 316, yaitu masing-masing 58,4% dan 47,3%, namun memiliki nilai spesifitas yang lebih rendah, yaitu 94,5% dan 99,0%. Marrasi *et al.*, (2005), menyatakan bahwa sensitivitas dan spesifitas uji ELISA dengan PPA dari strain *M. avium* masing-masing 76,9% dan 70,0%. Adji (2008), melaporkan bahwa ELISA paratuberkulosis dengan kit LSIVet *confirmation test* yang menggunakan antigen PPA *M. avium* serovar 2, sensitivitasnya 25,0% dengan spesifitas 96,8%. Untuk menurunkan reaksi silang dengan *Mycobacterium* lain, serum diabsorpsi terlebih dahulu dengan antigen *M. phlei* (Shin *et al.*, 2008; Yokomizo *et al.*,1985). Menurut McKenna *et al.*, (2005), bahwa ELISA dengan mengabsorpsi serum terlebih dahulu dengan antigen *M. phlei* (*absorbed* ELISA) akan meningkatkan spesifitasnya, yaitu 98,4%, sedangkan yang tidak diabsorpsi hanya 87,9%.

Untuk mengevaluasi hasil uji ELISA PPA-L, sampel serum yang sama juga diuji dengan kit ELISA komersial IDEXX *paratuberculosis screening Ab-test* yang menggunakan PPA dari MAP strain 316 (IDEXX, USA). Hasil uji menunjukkan bahwa sensitivitas dan spesifitas dengan kit tersebut masing-masing 63,64% dan 97,33% (Tabel 2). Sensitivitas dan spesifitas uji ELISA PPA-L dan kit komersial dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan antigen PPA-L untuk uji ELISA memberikan sensitivitas yang lebih tinggi dengan spesifitas yang sedikit lebih rendah dibandingkan dengan kit komersial. Sensitivitas

Tabel 2. Hasil ELISA dengan kit komersial (IDEXX) untuk 322 sampel

| ELISA   | Serum   |         | Total |
|---------|---------|---------|-------|
|         | Positif | Negatif |       |
| Positif | 14      | 8       | 22    |
| Negatif | 8       | 292     | 300   |
| Total   | 22      | 300     | 322   |

Keterangan. ELISA: *enzym-linked immunosorbent assay*; IDEXX: produsen kit ELISA komersial *paratuberculosis screening Ab test*

Tabel 3. Sensitivitas dan spesifitas uji ELISA PPA-L dan kit komersial (IDEXX)

| ELISA | Hasil        |            |
|-------|--------------|------------|
|       | Sensitifitas | Spesifitas |
| PPA-L | 68,18%       | 97,0%      |
| IDEXX | 63,64%       | 97,33%     |

Keterangan. ELISA: *enzym-linked immunosorbent assay*; PPA-L: antigen protoplasmik MAP isolat lapang; IDEXX: produsen kit ELISA komersial *paratuberculosis screening Ab test*

yang lebih tinggi ini kemungkinan juga disebabkan adanya perbedaan komponen protein yang ada dalam PPA-L dengan MAP *strain* lain. Walaupun studi tentang antigen lain telah dilakukan, seperti penggunaan *secreted antigen* untuk uji ELISA yang mempunyai sensitivitas 74,0% dan spesifitas 99,0%, maupun antigen ekstrak etanol yang mempunyai sensitifitas 97,1% dan spesifitas 100,0% (Scott *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2008). Namun, sampai saat ini PPA tetap menjadi pilihan utama untuk uji serologi paratuberculosis, karena didalamnya terdapat protein 34 kDa yang bersifat imunodominan dan mempunyai *B-cell epitopes* yang spesifik terhadap antibodi MAP (Malamo *et al.*, 2006; Ostrowski *et al.*, 2003; Vannuffel *et al.*, 1994). Selain itu, PPA lebih mudah diproduksi dalam jumlah yang lebih banyak. Uji ELISA paratuberculosis dengan komponen PPA-L dapat digunakan untuk pengujian serologi paratuberculosis dengan sensitivitas dan spesifitas yang setara dengan kit komersial.

### SIMPULAN

Antigen protoplasmik *M. avium* subspecies *paratuberculosis* isolat lapang (PPA-L) dapat digunakan untuk pengembangan uji paratuberculosis. *Enzyme-linked immunosorbent assay* dengan menggunakan PPA-L mempunyai kemampuan yang baik untuk uji serologi paratuberculosis dan dapat digunakan untuk uji tapis penyakit tersebut di Indonesia. Metode ELISA ini dapat digunakan untuk diagnosis dan pengendalian paratuberculosis di Indonesia.

### SARAN

Spesifitas uji ELISA dengan menggunakan antigen protoplasmik *M. avium* subspecies *paratuberculosis* sudah cukup tinggi, tetapi untuk sensitivitasnya masih perlu ditingkatkan, sehingga diperlukan penelitian lanjutan dengan menggunakan antigen koktail, yaitu menggabungkan *secreted antigen* dengan antigen protoplasmik (PPA).

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor yang telah menyediakan fasilitas dan memberikan isolat *M. avium* subspecies *paratuberculosis* dan seluruh staf Laboratorium Tuberculosis yang telah membantu dalam penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adji RS. 2008. Deteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada sapi perah di Kabupaten Bandung dan Banyumas. (Tesis). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Beard PM, Daniles MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Grieg A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol* 39(4): 1517-1521.
- Bannantine JP, Bayles DO, Waters WR, Palmer MV, Stabel JR, Paustian ML. 2008. Early antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigens in subclinical cattle. *Prot Sci* 6 (5): 1-12.
- Cho D, Collins MT. 2006. Comparison of the proteosomes and antigenicities of secreted and cellular proteins produced by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clin Vacc Immun* 10: 1155-1161
- Clark Jr DL, Koziczowski JJ, Radcliff RP, Carlson RA, Ellingson JLE. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 91: 2620-2627

- Ferreira R, Fonseca LS, Lilenbaum W. 2002. Agar Gel Immunodiffusion Test (AGID) Evaluation for Detection of Bovine Paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol* 35: 173-175.
- Florou M, Leontides L, Kostoulas P, Billinis C, Sofia M, Kyriazakis I, Lykotrafitis. 2008. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol Infect* 136: 644-652.
- Greig A, Stevenso K, Henderson D, Perez V, Hughes V, Pavlik I, Hinesil M, McKendrick I, Sharp JM. 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol* 37(6): 1746-1751.
- Harris NB, Barletta RLG. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 14: 489-512.
- Hasanova L, Pavlik I. 2006. Economic impact of partuberculosis in dairy cattle herd: a review. *Vet Med* 51(5): 193-211.
- Kalis CH, Barkema HW, Hesselink JW, Van Maanen C, Collins MT. 2002. Evaluation of two adsorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cow shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 14: 219-224.
- Lambeth C, Reddacliff LA, Windsor P, Abbott KA, McGregor H, Whittington RJ. 2004. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Aust Vet J* 82: 504-508.
- Malamo M, Sakoda Y, Ozaki H, Kida H. 2006. Development of ELISA to detect antibodies specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with truncated 34 kDa proteins. *Jpn J Vet Res* 54(2-3): 99-107
- Manning EJB, Collins MT. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 20(1): 133-150.
- Marassi CD, Fonseca LS, Ristow P, Ferreira R, Lilenbaum W, Oelemann WMR. 2005. Improvement of an in-house ELISA for bovine paratuberculosis serology in Brazil. *Braz J Microbiol* 36:118-122
- McKenna SLB, Sockett DC, Keefe GP, McClure J, VanLeeuwen JA, Barkem HW. 2005. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 17: 463-466.
- Nielsen SS, Houe H, Thamsborg SM, Bitsch V. 2001. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assay for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strain of *Mycobacterium avium*. *J Vet Diagn Invest* 13: 164-166
- [OIE] Office Internationale des Epizooties. 2012. Paratuberculosis. In : Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris: *World Organization for Animal Health* 347-349.
- Ostrowski M, Mundo SL, Harris NB, Barlettay RG, Lopez OJ. 2003. B-cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* recognized by antibodies from infected cattle. *Scand J Immunol* 58: 511-521
- Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med* 40:179-192
- Reichel MP, Kittelberger R, Penrose ME, Meynell RM, Cousins D, Ellis T, Mutharia LM, Sugden EA, Johns AH, De Lisle GW. 1999. Comparison of serological tests and fecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Vet Microbiol* 66: 135-150
- Roussel JA, Fosgate TG, Manning JB, Collins MT. 2007. Association of fecal shedding of *Mycobacteria* with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. *JAVMA* 230:890-895.
- [SCAHAW] Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. 2000. Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis. Paris: European Commission, Directorate-General Health & Consumer Protection.
- Scott MC, Bannantine JP, Kaneko Y, Branscum AJ, Whitlock RH, Mori Y, Speer CA, Eda S. 2010. Adsorbed EVELISA: a diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle. *Foodborne Pathogens and Disease* 7 (11): 1291-1296.

- Shin SJ, Cho D, Collins MT. 2008. Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vacc Immunol* 15:1277-1281.
- Singh AV, Singh SV, Singh PK, Sohal JS. 2010. Is *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the cause of Johne's disease in animals, a good candidate for Crohn's disease in man. *Indian J Gastroenterol* 29(2): 53-58.
- Stabel J. 1997. An improved method for cultivation *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J Vet Diagn Invest* 9: 375-380.
- Stabel JR, Well SJ, Wagner BA. 2002. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *J Dairy Sci* 85:525-531.
- Sweeney RW, Whitlock H, Rosenberger AE. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph node of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol* 30(1): 166-171.
- Vannuffel P, Gilot P, Limbourg B, Naerhuyzen B, Dieterich C, Coene M, Machtelinckx L, Cocito C. 1994. Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J Clin Microbiol* 32(5):1211-1216.
- Waters WR, Miller JM, Palmer MV, Stabel JR, Jones DE, Koistinen KA, Steadham EM, Hamilton MJ, Davis WC, Bannantine JP. 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *J Infect Immunol* 71: 5130-5138.
- Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. 1985. A method for avoiding false-positive reaction in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn J Vet Sci* 47: 111-119