

Validasi *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* Untuk Deteksi Antibodi Terhadap *Trypanosoma evansi*

(VALIDATION OF AN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
FOR DETECTION OF ANTIBODY ANTI-TRYPANOSOMA EVANSI)

Didik Tulus Subekti¹, Ichwan Yuniarto²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner
Jln RE Martadinata No 30
Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16114

²Balai Veteriner Regional V
Jln. Ambulung 24, Loktabat Selatan, Guntungmanggis,
Landasan Ulin, Banjarbaru, Kalimantan Selatan Indonesia 70712
Email: subekti@litbang.pertanian.go.id; subektididik96@yahoo.com

ABSTRAK

Surra adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*). Indonesia dikenal sebagai negara endemik Surra. Pengembangan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sangat bermanfaat untuk diagnosis dini dan survei rutin terhadap hewan yang terinfeksi *T. evansi*. Di Indonesia pengembangan kit ELISA untuk deteksi antibodi terhadap *T. evansi* pernah dilaporkan tahun 1999 dan 2003. Namun, performa ujinya masih belum memuaskan karena memiliki sensitivitas yang rendah (81-89%). Oleh sebab itu pengembangan kit ELISA Surra yang tervalidasi untuk diaplikasikan secara nasional di Indonesia perlu dilakukan. Validasi dilakukan untuk menentukan performa kit ELISA terutama sensitivitas, spesifisitas dan akurasi diagnostiknya sekaligus melakukan evaluasi metode dan kriteria penetapan nilai *cut off* yang universal. Hasil validasi kit ELISA menghasilkan sensitivitas dan spesifisitas sebesar 95,8% dan 98,2% pada analisis dengan *receiver operating curve* (ROC). Akurasi, sensitivitas dan spesifisitas diagnostik pada validasi lebih lanjut menggunakan nilai *cut off* universal adalah 96,15% ; 93,75% dan 98,21%. Kriteria terbaik untuk penentuan nilai *cut off* universal adalah $MSD \geq 2SD$, $S/P \geq 40$, $SNP \geq 25$. Adapun nilai *cut off* yang dapat diaplikasikan untuk menghasilkan performa pengujian terbaik berdasarkan evaluasi oleh dua penguji yang berbeda adalah $MSD \geq 2SD$.

Kata-kata kunci: ELISA; *Trypanosoma evansi*; validasi; sensitivitas; spesifisitas; akurasi

ABSTRACT

Surra is a disease caused by *Trypanosoma evansi* (*T.evansi*) infection. Indonesia was known as an endemic country for Surra. Development of *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) is very useful for early detection of Surra and for routine surveillance of animals infected by *T.evansi*. In Indonesia the development of ELISA kit for the detection of antibodies to *T.evansi* was reported in 1999 and 2003. Unfortunately, the assay performance was still unsatisfactory because it had a low sensitivity (81-89%). Therefore, the development of the validated ELISA kit which is applied nationally in Indonesia is very important. Validation was performed to evaluate the performance of ELISA kit, especially their diagnostic sensitivity, specificity and accuracy. Validation was also carried out to evaluate the method and criteria for determining definitive and universal cut-off values. The results of the validation showed a high sensitivity and specificity that are 95.8% and 98.2% using receiver operating curve (ROC) analysis. Diagnostic accuracy, sensitivity and specificity for advanced validation using universal cut-off values are 96.15%; 93.75% and 98.21% respectively. The best criteria for determining the universal cut-off value is $MSD \geq 2SD$, $S / P \geq 40$, $SNP \geq 25$. The cut-off value that can be applied to produce better assay performance based on evaluation by two different operators is $MSD \geq 2SD$.

Keywords: ELISA; *Trypanosoma evansi*; validation; sensitivity; specificity; accuracy

PENDAHULUAN

Penyakit Surra disebabkan oleh *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*). Pada tahun 2010 – 2012, Wabah Surra di Sumba menyebabkan kematian sebanyak 1159 ekor kuda, 600 ekor kerbau dan seekor sapi (Dirkeswan, 2012). Pada tahun 2013, Kementerian Pertanian menetapkan penyakit Surra sebagai Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) sesuai SK Kementan No 4026/Kpts./OT.140/3/2013 (Kementan, 2013) serta diperkuat dengan PP No 47 tahun 2014 tentang pengendalian penyakit hewan. Oleh karena itu, sebagai bagian dari tindak lanjut peraturan tersebut secara teknis, maka pengembangan diagnosis dini untuk pengendalian penyakit tersebut wajib dilakukan. Hal demikian tidak terlepas dari kondisi Indonesia yang endemis untuk Surra, sehingga pengembangan ELISA untuk deteksi dini Surra terhadap hewan yang terinfeksi *T. evansi* sangat bermanfaat pada survei rutin.

Namun sayangnya, kit ELISA untuk Surra secara komersial belum tersedia. Beberapa peneliti umumnya mengembangkan masing-masing metode ELISA untuk keperluan internal. Di antaranya adalah Verloo *et al.* (2000) menggunakan protein rekombinan VSG RoTat 1.2, Ouma *et al.* (2014) menggunakan protein VSG 4, Camargo *et al.* (2015) menggunakan protein natif VSG dan Rudramurthy *et al.* (2015) menggunakan protein rekombinan ISG75. Adapun Reyna-Bello *et al.* (1998), Marquest *et al.* (2001), Desquesnes *et al.* (2009), Zayed *et al.* (2010), Kumar *et al.* (2013), Kundu *et al.* (2013) serta Kocher *et al.* (2015) dan Sudan *et al.* (2015), masing-masing menggunakan protein terlarut dari *T. evansi* yang berbeda-beda galurnya.

Di Indonesia pengembangan ELISA Surra pernah dilaporkan oleh Davison *et al.* (1999); Reid dan Copeman (2003). Namun, performanya masih belum memuaskan yaitu sensitivitas dan spesifisitas diagnostiknya hanya sebesar 89% dan 92% (Davison *et al.*, 1999) serta 81% dan 97,5% (Reid dan Copeman, 2003). Berdasar latar belakang tersebut, maka pengembangan ELISA Surra di Indonesia mendesak untuk dilakukan. Pengembangan metode ELISA Surra yang tervalidasi untuk diaplikasikan secara nasional merupakan kebutuhan yang mendasar untuk mendukung beberapa Balai Veteriner (BVet), Balai Besar Veteriner (BBVet) dan Laboratorium Kesehatan Hewan yang tersebar di berbagai wilayah Indonesia. Oleh karena itu, pengembangan dan

validasi metode ELISA Surra yang lebih baik performanya sangat penting untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Preparasi Antigen *T. evansi*

Isolat *T. evansi* dengan kode N372 yang digunakan pada pengembangan ELISA Surra merupakan hasil seleksi yang telah dilakukan sebelumnya (Subekti dan Yuniarto, 2018). Isolat *T. evansi* N372 selanjutnya dipurifikasi dengan teknik kromatografi tukar ion yang menggunakan *diethylaminoethyl-methacrylic polymer* (Macroprep, BioRad-Prancis). Selanjutnya *T. evansi* yang telah terpisah dari sel darah disentrifus pada 3500 rpm, 4°C selama 15 menit. Pelet kemudian diresuspensi menggunakan PBS-Aprotinin 0,11 TIU/mL (setara 140,4 KIU/mL) dan kembali disentrifus pada 3500 rpm, 4°C selama 15 menit. Pelet kemudian diresuspensi kembali dengan 1 mL PBS-Aprotinin 0,11 TIU/mL.

Suspensi *T. evansi* dibekukan selama satu menit dalam nitrogen cair kemudian dipanaskan dengan air 50°C sampai mencair (*freeze thawing*) dan dilakukan dengan frekuensi lima kali. Suspensi disentrifus pada 3500 rpm, 4°C selama 15 menit. Supernatan selanjutnya dipisahkan dan selanjutnya disebut protein *trypanosome soluble antigen* (TSA). Kadar protein TSA diukur dengan metode Bradford menggunakan *BioRad Protein Assay* (BioRad, Perancis). Konsentrasi proteinnya diestimasi menggunakan ProQuant Soft. Larutan protein TSA kemudian dialikot dan disimpan pada suhu -20°C untuk penyimpanan jangka pendek dan -80°C untuk penyimpanan jangka panjang.

Penetapan Sampel Uji Terstandar

Sampel uji yang digunakan sebanyak 104 serum standar *bovis* yang telah diketahui statusnya. Sampel serum tersebut terdiri atas 76 serum kerbau dan 28 serum sapi. Serum standar positif (*known positive/true positive*) sebanyak 48 serum. Adapun serum standar negatif (*known negative/true negative*) sebanyak 56 serum. Sampel serum standar diperoleh dari Balai Veteriner Banjarbaru, Kalimantan Selatan yang berasal dari survei lapang dan telah dinyatakan seropositif dengan *microhaematocrite technique* (MHCT), (preparat ulas darah(PUD), *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), *card agglutination test for trypanosomiasis* (CATT),

polymerase chain reaction (PCR) dan *mouse inoculation test* (MIT). Adapun serum standar negatif untuk sapi diperoleh dari sapi impor dari Australia dan dari koleksi sampel standar negatif Bbalitvet Bogor maupun BVet Banjarbaru yang dinyatakan seronegatif menggunakan MHCT, PUD, CATT, PCR dan MIT. Sampel serum sapi impor dari Australia dinyatakan sebagai sampel negatif karena Australia diketahui merupakan negara bebas dari infeksi *T. evansi* (Reid 2002; Desquesnes *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2014).

Prosedur Kit ELISA pendeteksi antibodi *T. evansi*

Protein *trypanosome soluble antigen* (TSA) dilapiskan (*coating*) pada mikroplat *Nunc (Maxisorp, flat bottomed 96 well*, Nunc, Denmark) dengan konsentrasi 5 ug/mL. Selanjutnya mikroplat diinkubasi pada suhu 4°C selama 18-24 jam. Mikroplat dicuci dengan PBS-Twen 20 (0,05%) sebanyak empat kali dan dilakukan *blocking* menggunakan PBS-0,05% Tween 20-0,5% *bovine serum albumin* (BSA). Selanjutnya mikroplat diinkubasi pada suhu 4°C selama 18-24 jam. Mikroplat dicuci dengan PBS-Tween 20 sebanyak empat kali dan siap digunakan.

Prosedur secara ringkas dari kit ELISA Surra yang telah dikembangkan diawali dengan pengenceran serum menggunakan larutan dapar pengencer (1:800) dan dimasukkan kedalam sumuran mikroplat (100 uL/sumuran) secara duplo. Mikroplat kemudian diinkubasi pada suhu ruang (25-27°C) selama satu jam.

Selanjutnya mikroplat dicuci dengan PBS-Tween 20 (0,05%) sebanyak empat kali dan kemudian dilanjutkan dengan penambahan konjugat. Konjugat *antibovine IgG-HRP* (Sigma Chem., USA) diencerkan 1:20.000 dengan PBS-Tween 20 dan sebanyak 100 uL ditambahkan pada setiap sumuran serta diinkubasi selama satu jam pada suhu 25-27°C. Pencucian dengan PBS-Tween 20 kembali dilakukan sebanyak enam kali. Selanjutnya ditambahkan 100 uL substrat *tetramethyl benzidine* (TMB) dan diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 10-30 menit. Setelah terjadi perubahan warna, reaksi dihentikan dengan 100 uL 2N H₂SO₄. Mikroplat dibaca dengan ELISA reader (*Multiskan EX Colorimeter Reader*, Thermo Scientific, Finlandia) pada panjang gelombang 450 nm.

Penentuan Nilai Ambang Batas Kit ELISA Surra

Nilai ambang batas (*Cut Off*) pada kit ELISA Surra untuk deteksi infeksi *T.evansi* ditetapkan dengan menggunakan beberapa metode. Masing-masing metode tersebut adalah MSD, S/N, S/P dan SNP (Paré *et al.*, 1995). Penentuan nilai ambang batas dari masing-masing metode tersebut ditetapkan berdasar rumus persamaan matematika sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Serum standar negatif dipilih berdasarkan hasil penetapan nilai ambang batas yang ditetapkan dengan *Receiver Operating Curve* (ROC). Adapun serum standar positif dipilih setelah dilakukan pengelompokan menjadi positif rendah,

Tabel 1. Metode konversi nilai absorbansi (OD) untuk penetapan nilai *cut off* (CO)

No	Metode	Persamaan Matematika
1	MSD	$\frac{\text{rerata OD serum standar negatif} + (n \times SD \text{ serum standar negatif})}{SD = \text{Standar Deviasi } (\sigma); n = \text{konstanta (nilai 1 atau 2 atau 3)}}$
2	S/N	$\frac{\text{rerata OD serum sampel}}{\text{rerata serum standar negatif}}$
3	S/P	$\frac{\text{rerata OD serum sampel}}{\text{rerata OD serum standar positif}}$
4	SNP	$\frac{\text{rerata OD serum sampel} - \text{rerata OD serum standar negatif}}{\text{rerata OD serum standar positif} - \text{rerata OD serum standar negatif}}$

Catatan : OD (*optical density*) = nilai absorbansi hasil pengukuran ELISA

sedang (moderat) dan tinggi. Serum standar positif dikategorikan rendah apabila nilai absorbansinya (OD, *optical density*) $< 0,3$ sedangkan moderat apabila berkisar antara $0,3$ sampai $0,6$ dan dinyatakan tinggi apabila $> 0,6$.

Validasi Kit ELISA Surra

Validasi dilakukan dalam tiga tahapan secara berkesinambungan. Tahap pertama (pra validasi) pengujian untuk menetapkan pengenceran serum positif dan negatif serta konjugat yang optimal. Tahap kedua merupakan tahap validasi untuk penentuan performa kit ELISA Surra yang meliputi sensitivitas, spesifisitas, akurasi, presisi dan uji kesesuaian. Tahap ketiga (pascavalidasi) untuk penentuan kemampuan aplikasi dengan operator yang berbeda serta evaluasi metode penetapan nilai ambang yang baku dan universal.

Pada tahap pertama, sampel standar negatif yaitu serum sapi impor asal Australia dan *foetal bovine serum* (FBS) komersial (Sigma Chem., USA) maupun serum standar positif diencerkan secara serial mulai 1:50 sampai 1:6400. Masing-masing serum dimasukkan ke lubang mikrotlat yang telah dilapisi antigen. Selanjutnya penambahan konjugat menggunakan dua pengenceran yaitu 1:10.000 dan 1:20.000. Hasil ELISA pengenceran serum dan konjugat yang optimal ditetapkan dengan kriteria empiris bahwa nilai absorbansi (OD) serum negatif kurang dari 0,2; nilai OD serum dari FBS kurang dari 0,1; nilai OD serum positif harus lebih dari 0,4 dan rasio antara nilai OD serum positif dengan negatif harus ≥ 3 . Selanjutnya hasil penetapan pengenceran serum dan konjugat yang optimal dikonfirmasi dengan melakukan *immunoblotting*.

Pengujian tahap kedua dilakukan untuk penentuan performa kit ELISA Surra yang meliputi sensitivitas, spesifisitas, akurasi, presisi dan uji kesesuaian. Serum yang digunakan untuk validasi berjumlah 104 serum terstandar yang telah diketahui statusnya (*known positive* maupun *known negative*). Serum yang telah diketahui statusnya diuji dengan protokol ELISA yang telah dibakukan. Selanjutnya hasil pengujian kit ELISA Surra dibandingkan dan dianalisis kesesuaiannya dengan status serum uji. Penetapan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik, akurasi dan presisi uji dilakukan dengan analisis statistika dengan ROC maupun tabel kontingensi 2x2 menggunakan MedCalc versi 18.9.

Tahap ketiga (pascavalidasi) untuk evaluasi

kemampuan uji pada operator yang berbeda serta evaluasi metode penetapan nilai ambang yang universal. Sebanyak 94 serum *bovis* digunakan untuk perbandingan uji antara dua operator yang berbeda kemampuan pengujiannya. Serum diuji dengan menggunakan prosedur kit ELISA Surra dengan bahan dan peralatan yang sama. Perbedaan hanya terdapat pada ketrampilan dan kemampuan operator, satu operator mahir dan berpengalaman dengan ELISA, sedangkan operator lainnya masih pemula dan belum berpengalaman dengan ELISA. Hasil uji dari ke-94 serum tersebut kemudian dibandingkan dan dianalisis kesesuaian ujinya, spesifisitas dan sensitivitas uji serta akurasi dan presisi ujinya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengenceran Sampel Serum dan Konjugat yang Optimal

Pada pengenceran konjugat 1:10.000 maupun 1:20.000 diperoleh pengenceran serum yang optimal antara 1:800 sampai 1:1600 dengan rasio OD serum positif dengan negatif (P/N) > 3 (Gambar 1). Pengenceran konjugat yang optimal adalah 1:20.000 dan pengenceran serum yang optimal adalah 1:800 (Gambar 1) sehingga dihasilkan nilai OD serum negatif sebesar 0,2. Penetapan nilai OD serum negatif sebesar 0,2 didasarkan pada pertimbangan bahwa umumnya serum standar negatif atau serum normal memiliki OD maksimum antara 0,2-0,4. Pemilihan nilai batas sebesar 0,2 dilakukan sebagai antisipasi kemungkinan terjadinya reaksi latar (*background*) pada ELISA sehingga masih memungkinkan memperoleh nilai OD serum negatif pada rentang yang rendah.

Meskipun umumnya pengenceran serum berkisar 1:100 sampai 1:400 namun pengenceran 1:800 merupakan hal yang dapat diterima pada uji serologi penyakit parasitik. Cabán-Hernández *et al.* (2014) telah menggunakan pengenceran serum 1:800 pada pengembangan ELISA untuk deteksi serologis terhadap *fasciolosis* pada manusia. Sensitivitas dan spesifisitas uji serologis *fasciolosis* tersebut adalah 96,6% dan 95,7% (Cabán-Hernández *et al.*, 2014). Tingginya pengenceran serum tersebut dalam rangka menurunkan reaksi nonspesifik yang mungkin terjadi pada penyakit parasitik.

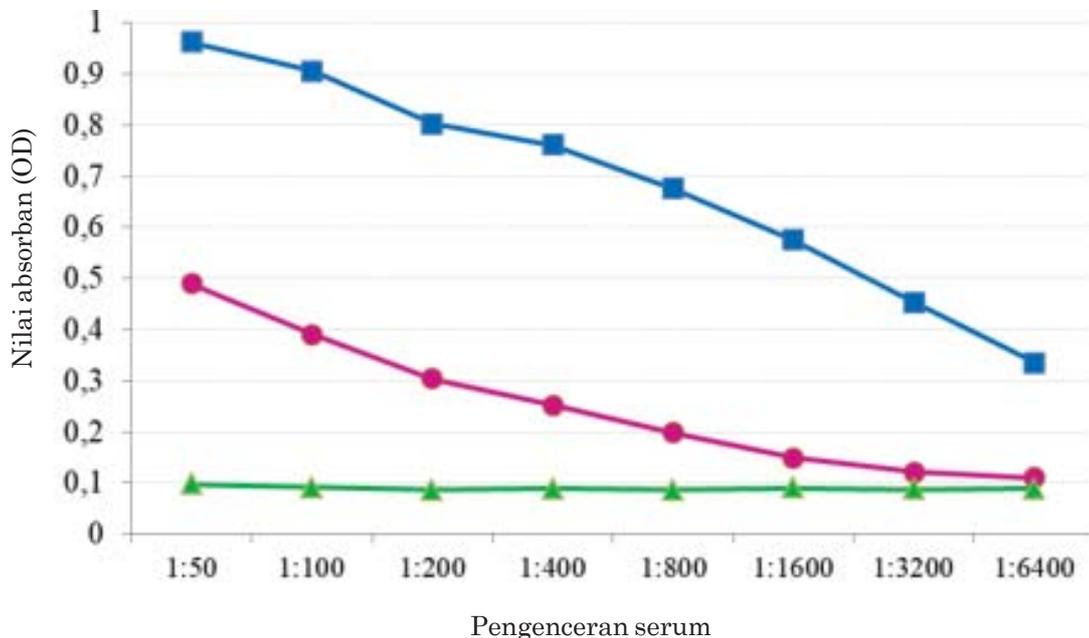
Di sisi lain rasio P/N pada pengenceran

1:800 cukup tinggi yaitu 3,41. Rasio tersebut akan lebih mudah menetapkan diskriminasi antara serum negatif dengan positif. Penelitian Yadav *et al.* (2014) memperlihatkan bahwa nilai rasio P/N pada ELISA *T. evansi* adalah 2,33 pada pengenceran serum 1:100 dengan nilai OD negatif sebesar 0,3. Adapun pada pengenceran 1:800, nilai rasio P/N adalah 1,67 dengan OD sera negatif 0,15 dan sera positif 0,25. Pada penelitian ini justru menunjukkan pola sebaliknya yaitu rasio P/N sebesar 2,32 pada pengenceran serum 1:100 (OD negatif 0,4) dan terus meningkat sampai 3,41 pada pengenceran serum 1:800 (OD negatif 0,2).

Penyebab perbedaan tersebut kemungkinan terkait dengan asal isolat yang digunakan sebagai sumber antigen. Hal demikian tercermin dari laju penurunan sera positif yang demikian tajam pada penelitian Yadav *et al.* (2014). Laju penurunan serum positif pada penelitian Yadav *et al.* (2014) sebesar 64,29% pada pengenceran serum 1:100 (nilai OD 0,7) ke pengenceran serum 1:800 (nilai OD 0,25). Adapun laju penurunan serum positif pada penelitian ini hanya 25,50% yaitu dari pengenceran serum 1:100 (nilai OD 0,906) ke pengenceran serum 1:800 (nilai OD 0,675). Sebaliknya, laju penurunan serum negatif pada

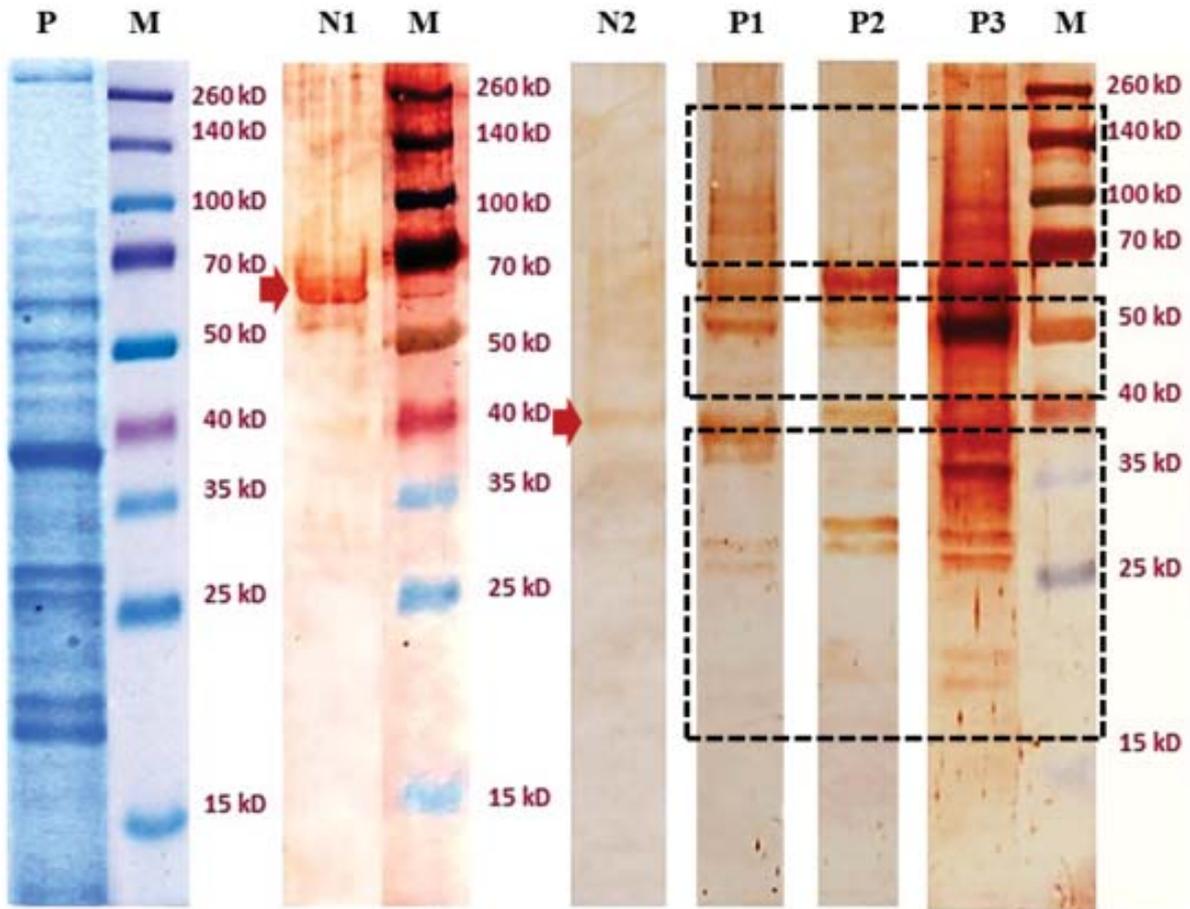
penelitian Yadav *et al.* (2014) dengan penelitian ini hampir serupa. Pada penelitian Yadav *et al.* (2014) laju penurunan serum negatif sebesar 50% dari pengenceran serum 1:100 ke pengenceran serum 1:800 sedangkan pada penelitian ini laju penurunannya sebesar 49,23% pada pengenceran serum yang sama. Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa antigen yang digunakan pada penelitian Yadav *et al.* (2014) kurang mampu untuk digunakan dalam deskriminasi serum positif dengan serum negatif dibandingkan antigen yang digunakan pada penelitian ini.

Pengenceran serum 1:800 juga terbukti mampu memberikan perbedaan visual yang kontras antara serum positif dengan serum negatif pada *imunoblotting* (Gambar 2). Pada serum positif menunjukkan reaksi yang konsisten pada berbagai pita protein sedangkan pada serum negatif hanya bereaksi dengan pita protein 40 kDa atau 60 kDa. Pita yang bereaksi dengan serum negatif kemungkinan merupakan reaksi non spesifik yang umum terjadi pada setiap individu (Subekti dan Yuniarto, 2018). Semakin sedikit pita protein yang bereaksi pada *imunoblotting* akan menyebabkan nilai absorbansi yang rendah saat diuji dengan ELISA.

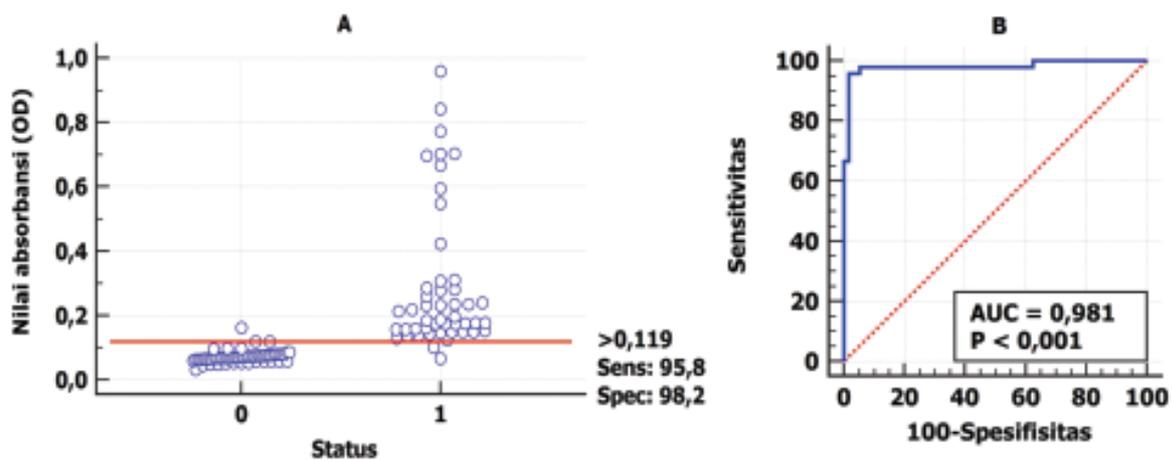


Gambar 1. Pengenceran serum dan konjugat secara serial pada *Checkerboard* ELISA Surra.

Keterangan: Pengenceran konjugat 1:20.000 ; Biru = serum positif ; Merah = serum negatif dari sapi Australia ; Hijau = serum negatif dari *Foetal Bovine Serum* (FBS)



Gambar 2. Immunoblotting pada membran nitroselulosa pada pengenceran serum 1:800 (dimodifikasi dari Subekti dan Yuniarto, 2018). P = profil protein *T. evansi* isolat N37; M = marka protein; N1-N2 = serum standar Negatif; P1-P3 = serum standar positif. Panah warna merah: reaksi non spesifik oleh serum standar negatif. Kotak hitam : reaksi spesifik di berbagai pita protein oleh serum standar positif



Gambar 3. Diagram sebaran data nilai OD hasil ELISA dan hasil analisis dengan *retrieve operating curve* (ROC) (A). Interactive Dot Diagram ; (B) Kurva analisis dengan ROC Status “0” = serum standar seronegatif ; Status “1” = serum standar seropositif , AUC = area under curve. Nilai AUC = 0,981 menunjukkan akurasi diagnostik tergolong *excellent* Cut off: > 0,119 ; Sens = sensitivitas ; Spec = Spesifisitas

Validasi Kit ELISA Surra dengan Sampel Serum Terstandar

Pada uji validasi awal dengan analisis menggunakan ROC diperkirakan bahwa sensitivitas dan spesifisitas diagnostik adalah 95,8% dan 98,2% dengan nilai $CO > 0,119$ (Gambar 3). Berdasarkan nilai tersebut, selanjutnya dipilih tiga serum standar negatif yang akan menghasilkan nilai *cut off* (CO) sebesar 0,12 dengan metode MSD (rerata OD dari tiga serum negatif yang terpilih + 2 x SD dari ketiga serum negatif terpilih). Ketiga serum standar negatif tersebut selanjutnya digunakan sebagai standar kontrol negatif untuk evaluasi lebih lanjut terhadap kit uji ELISA *T. evansi*. Pemilihan serum kontrol negatif berdasarkan hasil analisis dengan ROC lebih terarah dan objektif dibanding metode yang dilakukan Desquesnes *et al.* (2009).

Desquesnes *et al.* (2009) dan Kocher *et al.* (2015) menetapkan serum kontrol negatif secara *arbitrer* berdasarkan konsensus nilai $OD < 0,25$ dan dihitung rata-rata nilai OD semua serum yang dinyatakan negatif. Selanjutnya serum standar negatif yang memiliki nilai OD mendekati rata-rata OD negatif dipilih sebagai serum kontrol negatif untuk uji ELISA. Tatacara demikian tidak dapat menjamin bahwa serum kontrol negatif tersebut akan menghasilkan performa uji terbaik. Hal ini disebabkan serum tersebut dipilih dan ditetapkan secara *arbitrer* sebelum evaluasi performa uji ELISA dilakukan. Sebaliknya, pada penelitian ini dilakukan pemilihan dan penetapan serum kontrol negatif setelah dilakukan pengujian dengan ROC yang menginformasikan performa uji terbaik dengan nilai CO yang ditentukan. Dengan demikian, metode penetapan serum kontrol negatif yang dipilih dari serum standar negatif yang diuji lebih terarah dan terjamin performa ujinya.

Penetapan sensitivitas dan spesifisitas uji suatu perangkat diagnostik menggunakan ROC bersifat prediktif dan temporer. Hal ini disebabkan karena nilai *cut off* (CO) ditetapkan berdasarkan nilai pengujian menggunakan ROC tanpa adanya serum kontrol negatif dan positif. Hal demikian menyebabkan analisis dengan ROC akan senantiasa mengkalkulasi nilai OD atau turunannya agar diperoleh sensitivitas dan spesifisitas diagnostik yang optimal sehingga nilai ambang/nilai CO akan ikut berubah meskipun sampel yang diuji tetap sama. Konsekuensi dari kondisi tersebut adalah tidak adanya nilai CO yang tetap (*fixed*) untuk dapat diaplikasikan secara universal dan dianalisis

dengan ROC. Kondisi demikian dapat diakibatkan oleh adanya perbedaan pengujian ataupun perbedaan operator. Pada keadaan tersebut akan terjadi kekacauan pengujian sehingga mustahil diterapkan pada pengujian sampel lapang yang statusnya tidak diketahui. Oleh sebab itu, validasi lanjutan untuk evaluasi performa uji yang meliputi akurasi, sensitivitas dan spesifisitas diagnostik harus dilakukan kembali setelah diseleksi dan ditetapkannya serum kontrol negatif.

Pembuatan kit diagnosis mengharuskan adanya nilai CO yang definitif atau tetap (*fixed*) namun memiliki sifat yang dinamik dari pengujian satu ke pengujian lainnya ataupun antar laboratorium. Nilai CO yang definitif dan universal diperlukan pada kondisi riil untuk pengujian sampel lapang yang statusnya tidak diketahui sehingga dapat ditetapkan statusnya. Nilai CO yang definitif dan universal secara aplikatif hanya dapat dicapai apabila prosedur uji ELISA tersebut memiliki serum kontrol negatif maupun positif untuk digunakan pada rumus persamaan matematis yang tetap dan ajeg dalam menetapkan nilai CO dari serum standar yang digunakan pada uji validasi.

Validasi Berdasarkan Serum Kontrol Negatif.

Secara umum, persamaan matematis yang digunakan untuk penetapan nilai CO yang definitif dapat dilakukan dengan empat metode sebagaimana dideskripsikan pada Tabel 1. Di antara keempat metode tersebut, metode MSD dan S/N merupakan metode yang hanya melibatkan serum kontrol negatif. Kriteria dari kedua metode tersebut diseleksi secara gradual untuk memperoleh performa uji yang terbaik (Tabel 2). Performa uji suatu kit ELISA tidak hanya didasarkan pada nilai sensitivitas maupun spesifisitas diagnostik semata, tetapi juga didasarkan pada nilai akurasi diagnostik, *area under curve* (AUC), *youden's index* (YI), *positive predicted value* (PPV) dan *negative predicted value* (NPV) secara menyeluruh.

Nilai sensitivitas dan spesifisitas diagnostik yang sesungguhnya dari kit uji ELISA Surra sangat dipengaruhi metode penentuan nilai CO yang akan digunakan. Pada metode MSD untuk menentukan nilai CO definitif, maka kriteria terbaik yang menghasilkan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik tertinggi adalah $MSD \geq 2SD$ (Tabel 2). Pada kriteria $MSD \geq 2SD$ menyatakan seropositif apabila $CO \geq \bar{x} + (2 \times SD)$, yaitu rata-rata OD serum kontrol

Tabel 2. Performa uji kit ELISA Surra dengan metode penetapan nilai *cut off* (CO) menggunakan serum kontrol negatif

Nilai CO		Akurasi (%)	Sensitivitas (%)	Spesifisitas (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC	Cohen's Kappa
Metode	Kriteria		rerata(95% CI)	rerata(95% CI)	rerata(95% CI)	rerata(95% CI)	rerata (95% CI)	rerata(95% CI)
MSD	1SD	93,27	97,92 (88,93-99,95)	89,29 (78,12-95,97)	88,68 (87,77-99,71)	98,04 (78,60-94,35)	0,936 (0,870-0,975)	0,866 (0,770-0,961)
	2SD	96,15	93,75 (82,80-98,69)	98,21 (90,45-99,95)	97,83 (86,56-99,68)	94,83 (85,97-98,21)	0,960 (0,902-0,989)	0,922 (0,848-0,997)
	3SD	87,50	75,00 (60,40-86,36)	98,21 (90,45-99,95)	97,30 (83,68-99,61)	82,09 (73,71-88,22)	0,866 (0,785-0,925)	0,744 (0,617-0,871)
S/N	0,5	47,12	100 (92,60-100)	1,79 (0,05-9,55)	46,60 (45,72-47,48)	100(-) (0,409-0,608)	0,509	0,017 (-0,016-0,049)
	1	64,42	100 (92,60-100)	33,93 (21,81-47,81)	56,47 (51,81-61,02)	100 (-)	0,670 (0,571-0,759)	0,322 (0,193-0,450)
	1,5	95,19	97,92 (88,93-99,95)	92,86 (82,71-98,02)	92,16 (82,03-96,80)	98,11 (88,19-99,72)	0,954 (0,894-0,985)	0,904 (0,821-0,986)
	2	95,19	91,67 (80,02-97,68)	98,21 (90,45-99,95)	97,78 (86,29-99,68)	93,22 (84,32-97,23)	0,949 (0,888-0,983)	0,903 (0,820-0,986)
	2,5	84,62	66,67 (51,59-79,60)	100 (93,62-100)	100 (-)	77,78 (70,11-83,93)	0,833 (0,748-0,899)	0,683 (0,547-0,818)
	3	76,92	50,00 (35,23-64,77)	100 (93,62-100)	100 (-)	70,00 (63,75-75,59)	0,750 (0,656-0,830)	0,519 (0,370-0,667)
	3,5	74,04	43,75 (29,48-58,82)	100 (93,62-100)	100 (-)	67,47 (61,78-72,69)	0,719 (0,622-0,803)	0,456 (0,308-0,604)

Keterangan : PPV (*positive predictive value*) ; NPV (*negative predictive value*) ; AUC (*area under curve*)

Table 3. Performa uji kit ELISA Surra dengan metode penetapan nilai *cut off* (CO) menggunakan serum kontrol negatif dan positif moderat

Nilai CO		Akurasi (%)	Sensitivitas (%)	Spesifisitas (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC	Cohen's Kapparerata	
Metode	Kriteria		rerata(95% CI)	(95% CI)					
S/P	25	87,50	97,92 (88,93-99,95)	78,57 (65,56-88,41)	79,66 (70,31-86,63)	97,78 (86,29-99,68)	0,882 (0,805-0,937)	0,753 (0,630-0,876)	
	30	93,27	97,92 (88,93-99,95)	89,29 (78,12-95,97)	88,68 (78,60-94,35)	98,04 (87,77-99,71)	0,936 (0,870-0,975)	0,866 (0,770-0,961)	
	35	95,19	95,83 (85,75-99,49)	94,64 (85,13-98,88)	93,88 (83,58-97,88)	96,36 (87,20-99,04)	0,952 (0,892-0,984)	0,903 (0,821-0,986)	
	40	96,15	93,75 (82,80-98,69)	98,21 (90,45-99,95)	97,83 (86,56-99,68)	94,83 (85,97-98,21)	0,960 (0,902-0,989)	0,922 (0,848-0,997)	
	45	93,27	87,50 (74,75-95,27)	98,21 (90,45-99,95)	97,67 (85,72-99,66)	90,16 (81,25-95,10)	0,929 (0,861-0,970)	0,864 (0,766-0,961)	
	50	87,50	75,00 (60,40-86,36)	98,21 (90,45-99,95)	97,30 (83,68-99,61)	82,09 (73,71-88,22)	0,866 (0,785-0,925)	0,744 (0,617-0,871)	
	SNP	10	93,27	97,92 (88,93-99,95)	89,29 (78,12-95,97)	88,68 (78,60-94,35)	98,04 (87,77-99,71)	0,936 (0,870-0,975)	0,866 (0,770-0,961)
		15	95,19	95,83 (85,75-99,49)	94,64 (85,13-98,88)	93,88 (83,58-97,88)	96,36 (87,20-99,04)	0,952 (0,892-0,984)	0,903 (0,821-0,986)
20		95,19	95,83 (85,75-99,49)	94,64 (85,13-98,88)	93,88 (83,58-97,88)	96,36 (87,20-99,04)	0,952 (0,892-0,984)	0,903 (0,821-0,986)	
25		96,15	93,75 (82,80-98,69)	98,21 (90,45-99,95)	97,83 (86,56-99,68)	94,83 (85,97-98,21)	0,960 (0,902-0,989)	0,922 (0,848-0,997)	
30		93,27	87,50 (74,75-95,27)	98,21 (90,45-99,95)	97,67 (85,72-99,66)	90,16 (81,25-95,10)	0,929 (0,861-0,970)	0,864 (0,766-0,961)	
35		87,50	75,00 (60,40-86,36)	98,21 (90,45-99,95)	97,30 (83,68-99,61)	82,09 (73,71-88,22)	0,866 (0,785-0,925)	0,744 (0,617-0,871)	

Keterangan: PPV (*positive predictive value*) ; NPV (*negative predictive value*) ; AUC (*area under curve*)

negatif + (dua kali standar deviasi serum kontrol negatif). Semua serum sampel standar yang memiliki OD di atas kriteria tersebut dinyatakan seropositif dan di bawah nilai CO tersebut dinyatakan seronegatif. Berdasarkan kriteria tersebut, nilai sensitivitas dan spesifisitas diagnostik tertinggi dari kit ELISA Surra yang telah dikembangkan adalah 93,75% dan 98,21%. Akurasi diagnostiknya 96,15% dengan AUC sebesar 0,960 yang bermakna memiliki akurasi diagnostik *excellent*.

Adapun sensitivitas dan spesifisitas diagnostik kit ELISA Surra yang tinggi juga diperoleh pada metode penetapan nilai CO definitif menggunakan metode S/N dengan kriteria $S/N \geq 1,5$ dan $S/N \geq 2$ (Tabel 2). Kedua kriteria tersebut menghasilkan akurasi diagnostik 95,19% dengan AUC sebesar 0,95 yang bermakna memiliki akurasi diagnostik *excellent*. Pada kriteria $S/N \geq 1,5$, nilai sensitivitas dan spesifisitas diagnostiknya adalah 97,92% dan 92,86%. Sebaliknya pada kriteria $S/N \geq 2$ nilai sensitivitas dan spesifisitasnya 91,67% dan 98,21%. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kriteria penetapan nilai CO dalam metode yang sama juga akan menyebabkan perbedaan kemampuan dalam menetapkan seropositifitas maupun seronegatifitas suatu serum yang diuji meskipun secara keseluruhan akurasi ujinya setara.

Kedua metode tersebut (MSD dan S/N) hanya menggunakan serum kontrol negatif dalam menetapkan nilai *cut off* definitif dan universal. Metode MSD merupakan metode paling awal dan banyak digunakan pada

berbagai pengujian internal di berbagai laboratorium. Namun, metode tersebut memiliki kelemahan yang cukup penting yaitu beragamnya nilai absorbansi (OD) pengujian terhadap sampel yang sama oleh operator yang berbeda. Metode tersebut sangat dipengaruhi oleh kompetensi dan keahlian dari operator sehingga masing-masing harus memiliki kemampuan yang setara.

Metode lain sebagai alternatif metode MSD adalah metode S/N. Pada metode S/N, nilai CO universal yang diperoleh akan dikoreksi dengan adanya serum kontrol negatif yang digunakan. Nilai OD sampel yang telah diuji dibandingkan dengan rata-rata nilai OD kontrol negatif. Perbandingan nilai inilah yang selanjutnya dijadikan acuan penetapan seropositivitas atau seronegativitas suatu sampel serum. Perbedaan kemampuan operator / penguji akan terkoreksi dengan keberadaan serum kontrol negatif yang disertakan pada kit uji ELISA. Perbedaan nilai absorbansi yang meningkat atau menurun pada operator akan tercermin pada nilai OD serum kontrol negatifnya. Hal tersebut akan menyeimbangkan hasil pengujian antar operator yang berbeda kemampuan pada hasil uji yang sama.

Validasi berdasarkan Serum Kontrol Negatif dan Positif. Metode lainnya adalah S/P dan SNP yang melibatkan serum kontrol negatif dan positif. Serum kontrol positif yang digunakan tidak dapat diprediksi dari analisis dengan ROC sehingga ditetapkan secara *arbitrer*. Penetapan secara *arbitrer* tersebut akan menimbulkan kesulitan dalam pemilihan

Tabel 4. Performa uji kit ELISA Surra dengan metode penetapan nilai *cut off* (CO) menggunakan serum kontrol negatif dan positif tinggi

Metode	Nilai CO Kriteria	Akurasi (%)	Sensitivitas (%)	Spesifisitas (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC	Cohen's Kappa
			rerata95% CI	rerata95% CI	rerata95% CI	rerata95% CI	rerata (95% CI)	rerata (95% CI)
SP	5	49,04	100 (92,60-100)	5,36 (1,12-14,87)	47,52 (45,97-49,08)	100 (-)	0,527 (0,426-0,626)	0,05 (-0,006-0,105)
	10	94,23	97,92 (88,93-99,95)	91,07 (80,38-97,04)	90,38 (80,27-95,60)	98,08 (87,98-99,72)	0,945 (0,882-0,980)	0,885 (0,795-0,974)
	15	92,31	85,42 (72,24-93,93)	98,21 (90,45-99,95)	97,62 (85,42-99,65)	88,71 (79,83-93,97)	0,918 (0,848-0,963)	0,844 (0,741-0,947)
	20	76,92	50,00 (35,23-64,77)	100 (93,62-100)	100 (-)	70,00 (63,75-75,59)	0,750 (0,656-0,830)	0,519 (0,370-0,667)
SNP	5	95,19	95,83 (85,75-99,49)	94,64 (85,13-98,88)	93,88 (83,58-97,88)	96,36 (87,20-99,04)	0,952 (0,892-0,984)	0,903 (0,821-0,986)
	10	87,50	75,00 (60,40-86,36)	98,21 (90,45-99,95)	97,30 (83,68-99,61)	82,09 (73,71-88,22)	0,866 (0,785-0,925)	0,744 (0,617-0,871)
	15	75,96	47,92 (33,29-62,81)	100 (93,62-100)	100 (-)	69,14 (63,07-74,61)	0,740 (0,644-0,821)	0,498 (0,349-0,646)

Keterangan: PPV (*positive predictive value*) ; NPV (*negative predictive value*) ; AUC (*area under curve*)

dan penetapannya karena harus menguji semua serum standar positif yang dimiliki dan diuji. Di sisi lain penggunaan serum kontrol positif akan menimbulkan atau menambah ketidakpastian (*uncertainty*) baru dalam suatu kit uji. Secara konsep dan aplikasi, serum kontrol positif dengan nilai seropositivitas tinggi dan moderat akan menghasilkan standarisasi nilai CO yang berbeda. Konsekuensinya, akurasi uji dari kit yang dikembangkan juga akan terpengaruh.

Serum kontrol positif moderat (pada penelitian ini adalah serum terstandar positif dengan nilai OD = 0,310) menghasilkan lebih banyak ragam kriteria dalam penetapan nilai CO untuk akurasi dianostik di atas 95% (Tabel 3). Pada metode tersebut terdapat lima kriteria penetapan nilai CO definitif yang menghasilkan akurasi diagnostik yang tinggi ($\geq 95\%$) yaitu S/P ≥ 35 , S/P ≥ 40 , SNP ≥ 15 , SNP ≥ 20 dan SNP ≥ 25 . Sebaliknya, jika menggunakan serum kontrol positif tinggi (pada penelitian ini adalah serum terstandar positif dengan nilai OD = 0,958) hanya menghasilkan satu kriteria penetapan nilai CO definitif dengan akurasi diagnostik yang baik ($\geq 95\%$) yaitu SNP ≥ 5 (Tabel 4). Perbedaan akurasi uji tersebut terkait dengan kemampuan

diskriminasi seropositivitas dan seronegativitas serum standar yang diuji berdasarkan pada tinggi rendahnya serum kontrol positif yang digunakan.

Apabila serum kontrol positif yang digunakan memiliki titer antibodi yang tinggi sehingga nilai OD yang dimiliki juga tinggi, cenderung lebih mudah menyatakan seronegatif pada sampel serum yang diuji. Sebaliknya, penggunaan serum kontrol positif yang memiliki titer antibodi moderat maupun rendah akan cenderung lebih mudah menyatakan seropositif pada sampel yang diuji. Penggunaan serum kontrol positif yang moderat juga menghasilkan kriteria penetapan nilai CO definitif dan universal yang bervariasi sehingga memberikan banyak pilihan dan penyesuaian aplikasi uji pada berbagai kondisi atau situasi.

Di antara kedua metode penetapan nilai CO definitif menggunakan serum kontrol positif dan negatif yang sering digunakan adalah metode SNP. Beberapa peneliti ataupun kit komersial umumnya menggunakan penyebutan yang berbeda untuk SNP, yaitu *percent positivity* (PP) atau *relative percent positivity* (RPP). Kit ELISA komersial pada umumnya menggunakan

Tabel 5. Metode dan kriteria penetapan nilai *cut off* (CO) terbaik yang menghasilkan performa pengujian tertinggi Kit ELISA Surra

Nilai CO		Akurasi (%)	Sensitivitas (%)	Spesifitas (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC		Youden's Index		Cohen's Kappa	
Metode	Kriteria						Nilai	Kategori ¹	Nilai	Kategori ²	Nilai	Kategori ³
MSD	2SD	96,15	93,75	98,21	97,83	94,83	0,960	Excellent	0,919	Excellent	0,922	Very good agreement
S/P	40	96,15	93,75	98,21	97,83	94,83	0,960	Excellent	0,919	Excellent	0,922	Very good agreement
SNP	25	96,15	93,75	98,21	97,83	94,83	0,960	Excellent	0,919	Excellent	0,922	Very good agreement
S/N	1,5	95,19	97,92	92,86	92,16	98,11	0,954	Excellent	0,908	Excellent	0,904	Very good agreement
S/P	35	95,19	95,83	94,64	93,88	96,36	0,952	Excellent	0,905	Excellent	0,903	Very good agreement
SNP	15	95,19	95,83	94,64	93,88	96,36	0,952	Excellent	0,905	Excellent	0,903	Very good agreement
SNP II	5	95,19	95,83	94,64	93,88	96,36	0,952	Excellent	0,905	Excellent	0,903	Very good agreement
SNP	20	95,19	95,83	94,64	93,88	96,36	0,952	Excellent	0,905	Excellent	0,903	Very good agreement
S/N	2	95,19	91,67	98,21	97,78	93,22	0,949	Excellent	0,899	Very Good	0,903	Very good agreement

Keterangan:

¹ Kriteria akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk AUC menurut Šimundić (2008).

² Kriteria akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk Youden's index menurut Okeh and Okoro (2012).

³ Kriteria derajat kesesuaian (*agreement benchmarking*) untuk *inter reliability agreement* menurut Altman (1991).

PPV (*positive predictive value*) ; NPV (*negative predictive value*) ; AUC (*area under curve*)

metode SNP dengan kriteria penetapan nilai CO yang beragam. Hal yang perlu diperhatikan pada penggunaan kit uji komersial adalah jenis antigen yang dilapiskan (*coating*) dan serum kontrol positif yang digunakan. Kedua hal tersebut akan sangat besar pengaruhnya pada kesesuaian hasil uji yang akan diperoleh meskipun masing-masing menyatakan akurasi, sensitivitas dan spesifisitas diagnostik yang sama-sama tinggi.

Penetapan Nilai Cut Off Terbaik untuk Performa Uji Maksimal. Beberapa metode penetapan nilai CO telah terpilih dan menghasilkan performa uji tertinggi yang meliputi akurasi, sensitivitas, spesifisitas, dan prediksi akurasi diagnostik berdasarkan AUC dan Youden's Indeks (Tabel 5). Sembilan kriteria terbaik dari keempat metode penetapan CO tersebut adalah $MSD \geq 2SD$, $S/P \geq 40$, $SNP \geq 25$, $S/N \geq 1,5$, $S/P \geq 35$, $SNP \geq 15$, $SNP \geq 20$, $SNP II \geq 5$ dan $S/N \geq 2$. Kesembilan kriteria penetapan nilai CO yang definitif untuk kit ELISA Surra tersebut menghasilkan akurasi uji yang sangat baik yaitu 95,19% sampai 96,15% (Tabel 5).

Pilihan terbaik dari sembilan metode pada Tabel 5 adalah kelompok pertama (96,15%) yaitu

$MSD \geq 2SD$, $S/P \geq 40$ dan $SNP \geq 25$. Pilihan kedua adalah $S/N \geq 1,5$ yang memiliki nilai akurasi uji 95,19% dengan nilai AUC dan Youden's Indeks adalah 0,954 dan 0,908 yang bermakna bahwa akurasi diagnostiknya adalah *excellent*. Adapun pilihan ketiga, yaitu $S/P \geq 35$, $SNP \geq 15$, $SNP \geq 20$ dan $SNP II \geq 5$ yang memiliki nilai akurasi diagnostik sama dengan pilihan kedua yaitu sebesar 95,19% dan memiliki prediksi akurasi yang *excellent* berdasarkan AUC dan Youden's Indeks sebesar 0,952 dan 0,905. Pilihan keempat adalah kriteria $S/N \geq 2$ yang memiliki akurasi diagnostik sebesar 95,19% sebagaimana pilihan kedua dan ketiga, tetapi memiliki prediksi akurasi berdasarkan AUC dan Youden's Indeks sebesar 0,949 (*excellent*) dan 0,899 (*very good*).

Validasi antar Operator yang Berbeda.

Terpilihnya sembilan kriteria metode penetapan CO definitif yang dikelompokkan menjadi empat kategori tersebut perlu dilanjutkan pada seleksi tahap kedua. Seleksi tahap kedua dilakukan dengan membandingkan dua penguji (operator) yang melakukan pengujian terhadap sejumlah serum standar

Table 6. Performa pengujian Kit ELISA Surra oleh Operator 1 pada berbagai metode dan kriteria penetapan nilai CO (*cut off*)

Metode	Nilai CO Kriteria	Akura- si (%)	Sensi- tivi- tas (%)	Spesifi- sitas (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC		Youden's Index		Inter Reliability Agreement		
							Nilai	Kategori ¹	Nilai	Kategori ²	Cohen's Kappa	Gwet's AC ₁	Kategori ³
MSD	2SD	94,68	90,91	98,00	97,56	92,45	0,95	Excellent	0,89	Very good	0,89	0,89	Very good agreement
	S/N	1,5	89,36	95,45	84,00	84,00	95,45	0,90	Very good	0,80	Very good	0,79	0,79
S/P	2	92,55	90,91	94,00	93,02	92,16	0,92	Excellent	0,85	Very good	0,85	0,85	Very good agreement
	35	89,36	90,91	88,00	86,96	91,67	0,89	Very good	0,79	Good	0,79	0,79	Good agreement
SNP	40	92,55	90,91	94,00	93,02	92,16	0,92	Excellent	0,85	Very good	0,85	0,85	Very good agreement
	15	88,30	93,18	84,00	83,67	93,33	0,89	Very good	0,77	Good	0,77	0,77	Good agreement
SNP II	20	90,43	90,91	90,00	88,89	91,84	0,90	Very good	0,81	Very good	0,81	0,81	Very good agreement
	25	92,55	90,91	94,00	93,02	92,16	0,92	Excellent	0,85	Very good	0,85	0,85	Very good agreement
	5	85,11	97,73	74,00	76,79	97,37	0,86	Very good	0,71	Good	0,71	0,70	Good agreement

Keterangan:

- ¹ Kategori akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk AUC menurut Šimundic (2008).
 - ² Kategori akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk Youden's index menurut Okoh and Okoro (2012).
 - ³ Kategori derajat kesesuaian (*agreement benchmarking*) untuk *inter reliability agreement* menurut Altman (1991).
- PPV (*positive predictive value*) ; NPV (*negative predictive value*) ; AUC (*area under curve*) ; CO (*cut off*)

positif dan negatif yang telah digunakan pada validasi sebelumnya. Kedua penguji memiliki kualifikasi dan kompetensi yang berbeda, penguji pertama dipilih operator pemula yang belum memiliki pengalaman pengujian ELISA dan selanjutnya disebut Operator 1. Adapun penguji kedua adalah penguji yang memiliki keahlian dan pengalaman dalam pengembangan kit uji ELISA dan selanjutnya disebut Operator 2. Penguji kedua merupakan peneliti yang telah mengembangkan dan melakukan validasi terhadap kit ELISA Surra yang telah dikembangkan ini.

Evaluasi Perbandingan Menggunakan Kriteria CO Definitif dan Universal. Berdasarkan hasil validasi kit ELISA Surra, telah diketahui terdapat sembilan kriteria penetapan nilai CO definitif dan universal dengan performa uji terbaik (Tabel 5). Pada validasi tersebut juga telah ditetapkan serum kontrol negatif dan positif untuk kit ELISA Surra. Namun demikian, meskipun kedua serum kontrol tersebut telah digunakan, penerapan persamaan matematika S/N, S/P dan

SNP antara operator 1 dan 2 akan menghasilkan nilai yang berbeda karena perbedaan nilai OD yang diperoleh masing-masing penguji. Oleh sebab itu, penetapan nilai CO menggunakan empat metode tersebut harus mengacu pada nilai yang sama agar dapat diaplikasikan secara universal di lapangan.

Pada operator 1, diketahui bahwa penetapan nilai CO definitif yang memberikan performa terbaik adalah $MSD \geq 2SD$. Adapun penetapan nilai CO definitif dengan $S/N \geq 2$; $S/P \geq 40$ dan $SNP \geq 25$ merupakan pilihan kedua (Tabel 6). Sebaliknya, pada operator 2 diketahui bahwa nilai CO definitif yang memberikan performa pengujian terbaik adalah $MSD \geq 2SD$; $S/N \geq 2$; $S/P \geq 40$ dan $SNP \geq 25$. Sebaliknya, pilihan kedua yang dapat diaplikasikan berdasarkan hasil yang diperoleh operator 2 adalah $S/N \geq 1,5$; $S/P \geq 35$; $SNP \geq 15$; $SNP \geq 20$ dan $SNP II \geq 5$ (Tabel 7). Dengan demikian, di antara sembilan kriteria tersebut hanya penetapan nilai CO definitif dengan kriteria $MSD \geq 2SD$ yang universal dan memberikan performa pengujian terbaik oleh operator 1 maupun operator 2.

Tabel 7. Performa pengujian Kit ELISA Surra oleh Operator 2 pada berbagai metode dan kriteria penetapan nilai CO (*cut off*)

Metode	Nilai CO Kriteria	Akurasi (%)	Sensitivitas (%)	Spesifitas (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC		Youden's Index		Inter Reliability Agreement		
							Nilai	Kategori ¹	Nilai	Kategori ²	Cohen's Kappa	Gwet's AC1	Kategori ³
MSD	2SD	96,81	95,45	98,00	97,67	96,08	0,97	Excellent	0,94	Very good	0,94	0,94	Very good agreement
S/N	1,5	95,74	97,73	94,00	93,48	97,92	0,96	Excellent	0,92	Very good	0,92	0,92	Very good agreement
	2	96,81	95,45	98,00	97,67	96,08	0,97	Excellent	0,94	Very good	0,94	0,94	Very good agreement
S/P	35	95,74	97,73	94,00	93,48	97,92	0,96	Excellent	0,92	Very good	0,92	0,92	Very good agreement
	40	96,81	95,45	98,00	97,67	96,08	0,97	Excellent	0,94	Very good	0,94	0,94	Very good agreement
SNP	15	95,74	97,73	94,00	93,48	97,92	0,96	Excellent	0,92	Very good	0,92	0,92	Very good agreement
	20	95,74	97,73	94,00	93,48	97,92	0,96	Excellent	0,92	Very good	0,92	0,92	Very good agreement
	25	96,81	95,45	98,00	97,67	96,08	0,97	Excellent	0,94	Very good	0,94	0,94	Very good agreement
SNP II	5	95,74	97,73	94,00	93,48	97,92	0,96	Excellent	0,92	Very good	0,92	0,92	Very good agreement

Keterangan :

- ¹ Kategori akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk AUC menurut Šimundic (2008).
- ² Kategori akurasi diagnostik (*diagnostic accuracy benchmarking*) untuk Youden's index menurut Okeh and Okoro (2012).
- ³ Kategori derajat kesesuaian (*agreement benchmarking*) untuk *inter reliability agreement* menurut Altman (1991).

PPV (*positive predictive value*) ; NPV (*negative predictive value*) ; AUC (*area under curve*) ; CO (*cut off*)

Adapun pilihan lainnya untuk kriteria penetapan nilai CO definitif dan universal yang masih dapat diaplikasikan sebagai alternatif adalah kriteria $S/N \geq 2$; $S/P \geq 40$ dan $SNP \geq 25$.

Empat kriteria penetapan nilai CO definitif dan universal berdasarkan pengujian oleh operator 1 dan 2 merupakan kriteria yang mampu mempertahankan performa pengujian terbaik sesuai kompetensi masing-masing operator. Akurasi, sensitivitas dan spesifisitas diagnostik dari kit ELISA Surra oleh operator 2 adalah 96,81% ; 95,45% dan 98%. Adapun pada operator 1, performa kit ELISA Surra mengalami penurunan akurasi, sensitivitas dan spesifisitas diagnostiknya sebesar 2,13-4,26% ; 4,54% dan 4%. Data tersebut menunjukkan bahwa perubahan performa uji suatu kit ELISA yang telah ditetapkan akan terjadi apabila pengujian dilakukan oleh operator yang memiliki kualifikasi keahlian berbeda. Oleh sebab itu pengujian pada sejumlah operator yang berbeda keahlian dipandang perlu dilakukan untuk dapat digunakan sebagai pertimbangan memilih satu kriteria penetapan nilai CO definitif yang universal agar dapat diaplikasikan pada beragam kondisi di lapangan.

Evaluasi Perbandingan menggunakan ROC. Beberapa peneliti melakukan validasi hanya berdasarkan analisis menggunakan ROC. Umumnya hasil analisis dengan ROC akan menetapkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibanding nilai yang riil/nyata. Hal demikian karena ROC akan mengkalkulasi seluruh data yang diinput sehingga diperoleh prediksi yang paling optimal. *Receiver Operating Characteristic* (ROC) hanya bersifat prediktif sehingga menggunakan informasi tersebut untuk menetapkan performa uji yang final terhadap suatu kit diagnostik merupakan tindakan yang tidak tepat.

Pada analisis dengan menggunakan ROC, maka kedua penguji (operator 1 dan operator 2) memiliki nilai ambang yang berbeda untuk memperoleh performa pengujian terbaiknya. Hal demikian berkonsekuensi bahwa nilai ambang serum standar negatif yang digunakan kedua penguji tersebut harus berbeda agar mendapatkan nilai CO sesuai hasil analisis tersebut. Operator 1 memiliki nilai ambang $MSD \geq 0,303$ dengan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik sebesar 90,91% dan 98% (Tabel 8). Adapun operator 2 memiliki nilai ambang $MSD \geq 0,119$ dengan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik sebesar 97,7% dan 98% (Tabel 8). Kondisi tersebut mustahil untuk

diterapkan dalam suatu kit diagnostik apabila setiap operator harus menggunakan serum kontrol negatif yang berbeda dan memiliki kriteria nilai CO yang juga berbeda. Oleh sebab itu harus ditetapkan nilai CO definitif dan universal yang berasal dari serum kontrol negatif yang sama dan berlaku pada semua pengujian di lapang. Pada metode MSD, nilai CO definitif yang universal dapat ditetapkan berdasarkan kriteria $MSD \geq 2SD$ yang menghasilkan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik sebesar 90,91% dan 98% pada operator 1, serta sebesar 95,46% dan 98% pada operator 2 (Tabel 8). Dengan demikian, penggunaan nilai CO definitif yang bersifat universal tetap mampu mempertahankan performa pengujian yang tinggi pada kedua operator tersebut (Tabel 8).

Demikian pula halnya pada analisis performa uji dengan metode S/N, S/P dan SNP menggunakan ROC juga menetapkan nilai CO yang berbeda-beda pada masing-masing operator. Pada analisis dengan ROC, sensitivitas dan spesifisitas diagnostik kit ELISA Surra tertinggi oleh operator 1 adalah 90,9% dan 98% , adapun pada operator 2 sebesar 97,7% dan 98%. Nilai operator 1 tersebut diperoleh melalui analisis dengan ROC pada $S/N > 2,11$ atau $SNP > 28,22$ sedangkan pada operator 2 diperoleh pada $S/N > 1,83$ atau $SNP > 22,04$. Kondisi tersebut mustahil diaplikasikan pada suatu kit ELISA yang akan didistribusikan apabila metode penetapan nilai CO setiap individu berbeda-beda.

Penggunaan nilai CO definitif dengan kriteria yang universal bagi semua operator dapat dilakukan dengan menggunakan $S/N > 2$ sehingga diperoleh sensitivitas dan spesifisitas diagnostik sebesar 90,91% dan 94% pada operator 1 serta 95,45% dan 98% pada operator 2. Konsekuensi dari penggunaan nilai CO universal akan menyebabkan perubahan nilai sensitivitas dan spesifisitas uji. Namun, perubahan tersebut tidak bersifat ekstrim sehingga performa pengujian kit ELISA Surra tetap dapat dipertahankan memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi.

Bukti-bukti tersebut menunjukkan bahwa hasil validasi untuk menetapkan performa uji hanya menggunakan ROC memiliki beberapa perbedaan yang sangat mendasar. Pertama, performa uji berupa nilai sensitivitas dan spesifisitas diagnostik antar operator akan berbeda karena perbedaan keahlian. Kedua, konsekuensi validasi dengan ROC tidak dapat menetapkan nilai CO definitif dan universal

Tabel 8. Perbandingan analisis dengan ROC dan Tabel Kontingensi 2x2 menggunakan beberapa pilihan nilai CO definitif dan universal.

Penguji	Metode dan Kriteria		ROC		Tabel 2x2	
			Sensitivitas	Spesifisitas	Sensitivitas	Spesifisitas
Operator 1	MSD	2SD	-	-	90,91	98,00
		0,30*	90,9	98,00	-	-
	S/N	1,5	-	-	95,45	84,00
		2	-	-	90,91	94,00
	S/P	2,11*	90,9	98,0	-	-
		35	-	-	90,91	88,00
		40	-	-	90,91	94,00
	SNP	42,82*	90,9	98,0	-	-
		15	-	-	93,18	84,00
		20	-	-	90,91	90,00
		25	-	-	90,91	94,00
	SNP II	28,22*	90,9	98,0	-	-
		5	-	-	97,73	74,00
		28,58*	90,9	98,0	-	-
Operator 2	MSD	2SD	-	-	95,46	98,00
		0.12*	97,7	98,00	-	-
	S/N	1,5	-	-	97,73	94,00
		2	-	-	95,45	98,00
	S/P	1,83*	97,7	98,0	-	-
		35	-	-	97,73	94,00
		40	-	-	95,45	98,00
	SNP	38,39*	97,7	98,0	-	-
		15	-	-	97,73	94,00
		20	-	-	97,73	94,00
		25	-	-	95,45	98,00
	SNP II	22,04*	97,7	98,0	-	-
		5	-	-	97,73	94,00
		6,05*	97,7	98,0	-	-

Keterangan: ROC (*Receiver Operating Characteristic*) ; CO (*cut off*) ; * = merupakan nilai *cut off* yang secara otomatis dihitung oleh software MedCalc pada saat analisis dengan ROC.

karena masing-masing operator atau penguji akan memiliki nilai CO yang berbeda-beda. Hal demikian mustahil diaplikasikan di lapangan apabila kit ELISA Surra tersebut disebarakan pada berbagai laboratorium pengguna. Ketiga, hasil validasi menggunakan analisis ROC akan menghasilkan nilai performa pengujian (sensitivitas dan spesifisitas diagnostik) yang semu dan cenderung lebih tinggi dibanding nilai performa pengujian yang sebenarnya (riil). Oleh sebab itu, validasi berdasarkan analisis dengan ROC belum menunjukkan performa pengujian yang sebenarnya tetapi hanya memberikan prediksi yang bersifat temporer dan belum siap diaplikasikan secara universal di lapangan.

Metode yang lebih tepat dan valid adalah

dengan mengevaluasi performa pengujian secara bertingkat. Pada validasi awal dievaluasi menggunakan analisis ROC dan dilanjutkan dengan validasi lanjutan berdasarkan nilai CO definitif dan universal yang ditetapkan. Apabila hasil analisis ROC menunjukkan performa pengujian yang tidak baik, maka optimasi prosedur pra ELISA harus diperbaiki. Sebaliknya, apabila hasil analisis ROC menunjukkan performa pengujian yang sangat baik, maka dilakukan seleksi terhadap serum standar negatif untuk mendapatkan serum kontrol negatif berdasarkan nilai CO yang ditetapkan dari hasil analisis ROC tersebut. Selanjutnya, menggunakan serum kontrol negatif dan positif yang terpilih tersebut

dilakukan penetapan nilai CO definitif dan universal dengan berbagai metode dan kriterianya sebagaimana telah dibahas. Pada tahap ini akan terpilih nilai CO definitif yang bersifat universal untuk menjamin teraplikasikannya kit ELISA tersebut pada beragam kondisi atau situasi di lapang. Contoh yang dapat dipaparkan sebagai simulasi adalah nilai CO definitif dan universal dalam kit ELISA Surra yaitu $S/N > 2$ sehingga mewajibkan semua operator atau penguji untuk memutuskan seropositif atau seronegatifnya sampel lapang yang diuji berdasarkan ketetapan baku tersebut. Dengan demikian setiap penguji akan mengacu pada nilai CO definitif dan universal yang sama yaitu $S/N > 2$.

Beberapa penelitian pengembangan dan validasi ELISA untuk deteksi antibodi *T. evansi* di berbagai belahan dunia umumnya hanya berhenti pada analisis ROC. Davison *et al.* (1999), melakukan pengembangan ELISA untuk deteksi antibodi *T. evansi* di Indonesia dan melaporkan hasil validasinya hanya berdasarkan analisis ROC menggunakan data yang telah dikonversi dengan metode S/P. Hasil validasinya menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik sebesar 89% dan 92% dengan $S/P > 20$. Demikian pula Desquesnes *et al.* (2009) dan Kocher *et al.* (2015) yang mengkonversi nilai OD menggunakan metode SNP berdasarkan serum standar negatif dan positif yang ditentukan secara *arbitrer*. Kedua peneliti tersebut kemudian menganalisis nilai SNP yang diperoleh tersebut hanya dengan ROC dan menyatakan sensitivitas serta spesifisitas diagnostiknya sebesar 92,51% dan 94,22% pada $SNP > 18,38$. Tran *et al.* (2009) juga telah mengembangkan dan memvalidasi ELISA antibodi terhadap *T. evansi* menggunakan protein solubel (ELISA/*T. evansi*) dan protein rekombinan ISG75 (ELISA/rISG75) hanya berdasar analisis ROC. Tran *et al.* (2009) mengklaim sensitivitas dan spesifisitas diagnostik dari ELISA/*T. evansi* sebesar 98,2% dan 98% dengan $SNP > 12$. Adapun ELISA/rISG75 diklaim memiliki sensitivitas dan spesifisitas diagnostik sebesar 94,62% dan 100% dengan $SNP > 19,3$ (Tran *et al.*, 2009). Demikian pula halnya dengan Rudramurthy *et al.* (2015) yang telah melaporkan ELISA/rISG75 memiliki sensitivitas dan spesifisitas diagnostik sebesar 98,47% dan 99,1% dengan nilai $CO > 0,506$.

Adapun untuk ELISA/WCL dan ELISA/RoTat 1.2, masing-masing diklaim memiliki sensitivitas/spesifisitas diagnostik sebesar 89,66% / 93,79% dengan $CO > 0,499$ dan 95,02% / 94,28% dengan $CO > 0,509$ (Rudramurthy *et al.*, 2015). Namun demikian, semua deskripsi sensitivitas dan spesifisitas diagnostik yang diklaim Rudramurthy *et al.* (2015) dan para peneliti lain tersebut bersifat prediktif dan temporer karena hanya berdasarkan analisis dengan ROC. Nilai sensitivitas dan spesifisitas diagnostik yang sesungguhnya dari teknik ELISA hasil penelitian tersebut belum diketahui dengan pasti sehingga belum layak diaplikasikan di lapangan.

SIMPULAN

Kit ELISA Surra yang telah dikembangkan memiliki sensitivitas dan spesifisitas sebesar 95,8% dan 98,2% pada analisis dengan ROC. Akurasi, sensitivitas dan spesifisitas diagnostik riil menggunakan nilai *cut off* definitif sebesar 96,15%; 93,75% dan 98,21%. Kriteria penentuan nilai *cut off* definitif terbaik yang dapat digunakan adalah $MSD \geq 2SD$, $S/P \geq 40$, $SNP \geq 25$. Adapun kriteria nilai *cut off* definitif yang dapat diaplikasikan untuk menghasilkan performa pengujian terbaik berdasarkan evaluasi oleh dua penguji yang berbeda adalah $MSD \geq 2SD$.

SARAN

Disarankan untuk melakukan evaluasi dengan melibatkan jumlah operator yang lebih banyak untuk dapat menetapkan kriteria nilai *cut off* yang dapat diaplikasikan pada beragam kondisi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ungkapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Hardiman selaku Kepala Balai Penelitian Veteriner Bogor (Bblitvet), Drh. Sulaxono Hadi selaku Kepala Balai Veteriner Banjarbaru dan Ir. Chaerunisa Safitri, MSi selaku Kepala Bidang Kerjasama dan Pendayagunaan Hasil Penelitian Bblitvet yang telah mendukung

DAFTAR PUSTAKA

- Altman DG. 1991. *Practical Statistics for Medical Research*. London. Chapman and Hall. Hlm. 403-409.
- Cabán-Hernández K, Gaudier JF, Ruiz C, Espino AM. 2014. Development of Two Antibody Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Serodiagnosis of Human Chronic Fascioliasis. *J Clin Microbiol* 52(3): 766-772.
- Camargo R, Izquier A, Uzcanga GL, Perrone T, Acosta-Serrano A, Carrasquel L, Arias LP, Escalona JL, Cardozo V, Bubis J. 2015. Variant surface glycoproteins from Venezuelan trypanosome isolates are recognized by sera from animals infected with either *Trypanosoma evansi* or *Trypanosoma vivax*. *Vet Parasitol* 207: 17-33.
- Davison HC, Thrusfield MV, Muharisni S, Husein A, Partoutomo S, Rae PF, Masake R, Luckins AG. 1999. Evaluation of antigen detection and antibody detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia. *Epid Infect* 123(1): 149-55.
- Desquesnes, M, Kamyngkird K, Pruvot M, Kengradomkij C, Bossard G, Sarataphan N, Jittapalapong S. 2009. Antibody-ELISA for *Trypanosoma evansi*: Application in a serological survey of dairy cattle, Thailand, and validation of a locally produced antigen. *Prev Vet Med* 90: 233-241.
- Desquesnes M, Holzmuller P, Lai D-H, Dargantes A, Lun ZR, Jittapalapong S. 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra : A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International*. Volume 2013, Article ID 194176, 22 pages. [http:// dx.doi.org/10.1155/2013/194176](http://dx.doi.org/10.1155/2013/194176).
- Dirkeswan (Direktorat Kesehatan Hewan). 2012. *Pedoman pengendalian dan pemberantasan penyakit Trypanosomiasis (Surra)*. Jakarta. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian.
- Kementan (Kementerian Pertanian). 2013. *Petikan Keputusan Menteri Pertanian No 4026/Kpts./OT.140/3/2013, Tentang Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis*. Jakarta. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Kocher A, Desquesnes M, Kamyngkird K, Yangtara S, Leboucher E, Rodtian P, Dargantes A, Jittapalapong S. 2015. Evaluation of an Indirect-ELISA Test for *Trypanosoma evansi* Infection (Surra) in Buffaloes and Its Application to a Serological Survey in Thailand. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 361037,8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/361037>.
- Kumar R, Kumar S, Khurana SK, Yadav SC. 2013. Development of an antibody-ELISA for seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in equids of North and North-western regions of India. *Vet Parasitol* 196: 251-257.
- Kundu K, Tewari AK, Kurup SP, Baidya S, Rao JR, Joshi P. 2013. Sero-surveillance for surra in cattle using native surface glycoprotein antigen from *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol* 196: 258-264.
- Marquest LC, Machado RZ, Alessi AC, de Aquino LPCT. 2001. Humoral immune response of horses experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Semina: Ci. Agrárias, Londrina* 22(2): 131-133.
- Ouma LA, Owino VA, Gichuki CW, Masiga DK. 2014. Variant Surface Glycoprotein 4, a potential diagnostic candidate for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections. *Int J Applied Sci Engineer Res* 3(2): 504-511.
- Okeh UM, Okoro CN. 2012. Evaluating Measures of Indicators of Diagnostic Test Performance: Fundamental Meanings and Formulas. *J Biometric Biostat* 3: 132. doi:10.4172/2155-6180.1000132.
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of Neospora sp. infection in cattle. *J Vet Diag Invest* 7: 352-359.
- Reid SA. 2002. *Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia. *Trends in Parasitology* 18(5): 214-224.
- Reid SA, Copeman DB. 2003. The development and validation of an antibody-ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea. *Prev Vet Med* 61: 195-208.

- Reyna-Bello A, García FA, Rivera M, Sansó B, Aso PM. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Vet Parasitol* 80: 149-157.
- Rudramurthy GR, Sengupta PP, Metilda B, Balamurugan V, Prabhudas K, Rahman H. 2015. Development of an enzyme immunoassay using recombinant invariant surface glycoprotein (rISG) 75 for serodiagnosis of bovine trypanosomosis. *Indian J Exp Biol* 53: 7-15
- Subekti DT, Yuniarto I. 2018. Identifikasi Protein dan Seleksi Isolat *Trypanosoma evansi* Bersifat Imunogenik untuk Kandidat Pengembangan Imunoasai. *J Biol Indonesia* 14(2): 109-121.
- Sudan V, Tewari AK, Singh H. 2015. A native whole cell lysate antigen (WCLA) based ELISA for the sero-detection of surra in Indian cattle. *Indian J Animal Sci* 85(6): 601-603.
- Thompson, CK., SS. Godfrey & RCA. Thompson. 2014. Trypanosomes of Australian mammals: A review. *Int J Parasitol : Parasites and Wildlife* 3: 57-66.
- Tran T, Claes F, Verloo D, Greve HD, Büscher P. 2009. Towards a New Reference Test for Surra in Camels. *Clin Vacc Immunol* 16(7): 999-1002.
- Verloo D, Holland W, My LN, Thanh NG, Tam PT, Goddeeris B, Vercruysse J, Büscher P. 2000. Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. *Vet Parasitol* 92: 87-96.
- Yadav SC, Kumar R, Manuja A, Goyal L, Gupta AK. 2014. Early detection of *Trypanosoma evansi* infection and monitoring of antibody levels by ELISA following treatment. *J Par Dis* 38(1): 124-127.
- Zayed AA, Habeeb SM, Allam NAT, Ashry HMZ, Mohamed AHH, Ashour AA, Taha HA. 2010. A Critical comparative study of parasitological and serological differential diagnostic methods of *Trypanosoma evansi* infections in some farm animals in Egypt. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 8(6): 633-642.