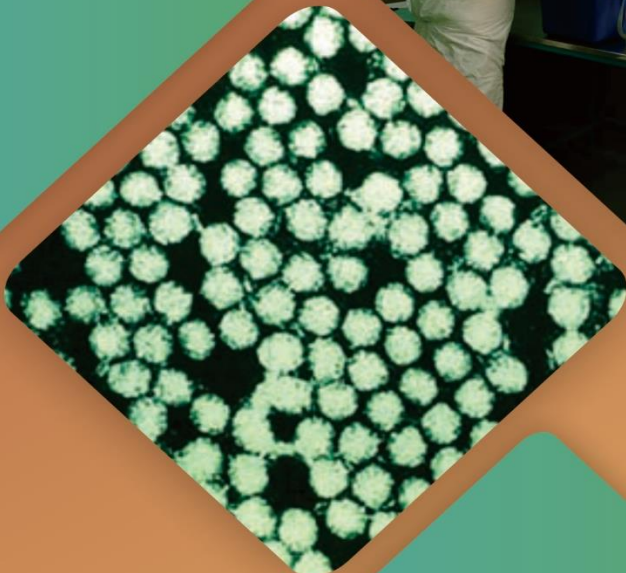


Prosedur Operasional Baku
Standard Operating Procedure

S O P



**UJI NETRALISASI VIRUS/
VIRUS NEUTRALIZATION TEST (VNT)
PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK)**



KEMENTERIAN PERTANIAN
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karuniaNya PROSEDUR OPERASIONAL BAKU-STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) UJI NETRALISASI VIRUS/ VIRUS NEUTRALIZATION TEST (VNT) PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK) Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma ini dapat tersusun.

Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma Surabaya merupakan Unit Pelaksana Teknis (UPT) Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian. yang bertanggung jawab kepada Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Sebagaimana tercantum pada Peraturan Menteri Pertanian Nomor 43 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Unit Pelaksana Teknis Lingkup Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan BAB II, Bagian Kesatu PUSAT VETERINER FARMA, menyebutkan bahwa tugas pokok dan fungsi Pusvetma adalah melaksanakan produksi, pengujian, distribusi dan pemasaran serta pengembangan produk vaksin, antisera, diagnostika dan bahan biologis lain serta bertanggung jawab atas pelaksanaan surveilans dan diagnosa penyakit mulut dan kuku; pelaksanaan uji rujukan penyakit mulut dan kuku; dan pelaksanaan pengendalian penyakit mulut dan kuku.

SOP Uji VNT PMK untuk menganalisa daya protektifitas terhadap virus PMK pada populasi sapi yang divaksinasi oleh Vaksin PMK Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma ini disusun dengan maksud untuk memberikan pedoman bagi seluruh pegawai dan masyarakat pengguna layanan/pelanggan/stake holder Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma dalam menyelenggarakan pelayanan publik dan memberikan informasi yang terkait dengan pelayanan Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma khususnya Penyakit Mulut dan Kuku. Selain itu, dengan penetapan dan penerapan SOP Uji VNT PMK Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma ini maka akan tercipta pelayanan publik yang jelas, berkualitas, cepat, transparan, mudah, terjangkau dan terukur demi terwujudnya pelayanan prima dan diperolehnya kepercayaan masyarakat.

Pada akhirnya kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang secara aktif membantu kelancaran penyusunan SOP Uji VNT PMK Balai Besar Veteriner Farma Pusvetma ini. Semoga dapat bermanfaat bagi kita semua.

Surabaya, 27 Juni 2023

Kepala BBVF Pusvetma,



drh. EDY BUDI SUSILA, M.Si.
NIP. 197404132003121003

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	1
HALAMAN REVISI	2
DAFTAR ISI	3
1. PENDAHULUAN	4
1.1. Latar Belakang	4
1.2. Tujuan	4
2. UJI NETRALISASI VIRUS (VNT) PMK.....	4
2.1 Peralatan	5
2.2 Bahan Uji	5
2.3 Prosedur	5
2.4 Hasil	6
3. LAMPIRAN	7
4. DAFTAR PUSTAKA.....	7
LEMBAR KERJA	8

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit mulut dan kuku (PMK) adalah penyakit infeksi pada hewan yang bersifat akut dan sangat menular pada hewan berkuku genap/belah. PMK disebabkan oleh virus RNA sense positif untai tunggal genus Aphthovirus dalam famili Picornaviridae dengan tujuh serotipe yaitu O, A, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2 dan SAT 3. Deteksi pertama virus PMK O/ISA/22 dari beberapa kejadian penyakit dengan gejala PMK pada sapi dan kambing di Indonesia pada Mei 2022 dan menunjukkan perbedaan nukleotida ISA-22 > 4,7 % dengan sub-silsilah O/MESA/Ind-2001 yang ada. Vaksinasi yang dilakukan diharapkan menimbulkan respon imun yang bersifat kuat dan homogen, menginduksi antibodi pelindung yang kuat serta durasi kekebalan yang panjang pada sebagian besar hewan yang divaksinasi. Respon imun yang kuat berguna dalam upaya pembentukan kekebalan kelompok untuk mencegah infeksi berulang. Pengujian titer antibody PMK dapat menggunakan uji liquid phase blocking ELISA (LPBE) dan virus netralisasi test (VNT). LPBE seringkali menghasilkan positif palsu dan membutuhkan VNT sebagai verifikasi hasil pengujian.

1.2 Tujuan

Tujuan uji VNT ini untuk menganalisa daya protektifitas terhadap virus PMK pada populasi sapi yang divaksinasi oleh Vaksin PMK.

2. UJI NETRALISASI VIRUS (VNT) PMK

2.1 PERALATAN

Beberapa peralatan yang digunakan adalah:

- Freezer
- Autoclave
- Biosafety cabinet level 3
- Mikroskop inverted
- Waterbath
- Inkubator CO₂ 37°C, vortex
- Hemositometer neubauer chamber
- Vortex
- Sarung tangan, syringe 5 mL
- Cryotube 2 mL
- Spidol hitam permanent
- Single channel 50 µL,
- Multichannel 50 µL, 100 µ,
- Reservoir

- Spidol, permanent
- Fintip disposibel 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl
- *Microplate* datar
- Tabung flash 250 ml
- Flask

2.2 BAHAN UJI

Bahan yang digunakan antara lain:

- Sel BHK21
- Seed PMK
- Serum yang akan diuji
- Asam sitrat cair
- Alkohol,
- Serum kontrol/ serum referensi positif dan negatif,
- Phosphat buffer saline - (PBS-)
- HEPES,
- Advance minimum eagle medium (MEM),
- Versene tripsin (VT),
- 10% fetal bovine serum (FBS)
- Glycerol
- Kantong plastik dan plastik autoclavable

2.3 PROSEDUR

Metode Titrasi Virus

1. Masukkan 50 µL media ke dalam setiap well ke 2, untuk well pertama diisi dengan virus 100TCID₅₀ sebanyak 100 µL
2. Lakukan pengenceran mulai well ke 2 dst sampai well ke 10, well ke 11 dan 12 bisa kita gunakan untuk kontrol sel, media dan back titrasi
3. Masukkan sel yang sudah dihitung dan split sebanyak 50 µL
4. Masukkan kedalam incubator CO₂
5. Lakukan pengamatan selama 24 sampai 72 jam

Metode Titration Serum

1. Masukkan 75 μ L media ke dalam well ke A dan well B sampai H diisi 50 μ L media
2. Masukkan 25 μ L serum secara duplo sesuai dengan penomorannya
3. Lakukan pengenceran mulai dari well A dst sampai well H, well ke 11 dan 12 bisa kita gunakan untuk kontrol sel, media dan back titration
4. Masukkan 50 μ L virus 100TCID₅₀ ke dalam setiap well
5. Masukkan ke dalam incubator CO₂ selama 1 jam
6. Masukkan sel yang sudah dihitung dan split sebanyak 50 μ L
7. Masukkan ke dalam incubator CO₂
8. Lakukan pengamatan selama 24 sampai 72 jam

2.4 HASIL

Kriteria yang Dapat Diterima

Tes dianggap valid asalkan:

1. Dosis virus yang diberikan (titer akhir dikurangi *Challenge Dilution*) berada dalam kisaran 1,5 hingga 2,5 TCID₅₀.
2. Titer serum referensi berada dalam log₁₀ 0,3 dari rata-rata, pada dosis virus yang dapat diterima (lihat di atas).
3. Lapisan sel dalam kontrol sel utuh dan tidak menunjukkan efek seperti CPE

Hasil untuk serum uji individu dianggap dapat diterima asalkan:

1. Dosis virus yang diberikan (lihat di atas) berada dalam kisaran 1,5 hingga 2,5 TCID₅₀.
2. Kontaminasi atau toksisitas tidak mencegah serum uji terbaca secara akurat.

Interpretasi Hasil

Dengan asumsi kriteria penerimaan hasil terpenuhi, serum tes dianggap negatif jika memiliki titer 1/11 atau kurang. Jika, karena volume serum uji yang kecil, pengenceran awal adalah 1/16 daripada 1/8, maka <16 diberikan sebagai hasil negatif. Sera juga dapat dinyatakan negatif dengan titer tersebut jika dosis virus terlalu rendah, dan/atau jika titer serum referensi terlalu tinggi. Hal ini didasarkan pada kondisi yang telah bias mendukung netralisasi terjadi. Sera dengan titer lebih besar dari 1/11 tetapi kurang dari atau sama dengan 1/32 dianggap meragukan dan dicatat sebagai "tidak meyakinkan" (hewan impor/ekspor harus dikeluarkan darahnya kembali dan diuji ulang atau harus dilakukan pemeriksaan veteriner). Titer serum lebih besar dari atau sama dengan 1/45 (1,65) dianggap positif.

3. RETENSI DAN PEMUSNAHAN SAMPEL/BIOSAFETY & BIOSECURITY

Pemusnahan sampel dilakukan sesuai dengan SOP pemusnahan sampel yang berlaku. Personil yang melakukan Uji VNT merupakan personil yang telah mendapatkan pelatihan tentang biosafety dan biosecurity.

4. DAFTAR PUSTAKA

Office International des Epizooties. OIE Terrestrial Manual Foot And Mouth Disease (Infection With Foot And Mouth Disease Virus. 2021.

1. Lembar Kerja

Sample No.								
Titre							Reading	
ref serum							Plate number	
							1	
							Lab Batch	
							0	
							Virus	
							0	
							Virus dose	
Sample No.								
Titre								

Sample No.								
Titre							Reading	
							Plate number	
							2	
							Lab Batch	
							0	
							Virus	
							0	
							Virus dose	
Sample No.								
Titre								

Sample No.								
Titre							Reading	
							Plate number	
							3	
							Lab Batch	
							0	
							Virus	
							0	
							Virus dose	
Sample No.								
Titre								