

KAJIAN RESPON ANTIBODI RABIES PADA ANJING POST VAKSINASI DI PULAU BALI

(Serosurvey of Rabies Antibody Response in Vaccinated Dogs in Bali
Island)

Gunawan Setiaji dan Ni Luh Putu Agustini

Balai Besar Veteriner Denpasar

ABSTRAK

Rabies merupakan salah satu penyakit prioritas di Bali. Sejak November 2008 hingga Desember 2010, rabies di Bali telah mengakibatkan 113 kematian pada manusia. umumnya infeksi terjadi karena gigitan anjing. Vaksinasi masal pada anjing telah dilakukan guna mengurangi penyebaran penyakit, studi ini dilakukan untuk mengetahui respon serologis pada anjing yang telah divaksinasi secara masal. Survey serologis dengan kajian *crosssectional* dilakukan pada bulan Desember 2010. 67 Desa dipilih sebagai studi area dan dilakukan secara random. 20 serum anjing diambil pada setiap desa, data yang dikumpulkan meliputi sejarah vaksinasi, umur, jenis kelamin, status anjing. Uji serologis dikerjakan di Balai Besar Veteriner Denpasar dengan menggunakan ELISA Pusvetma. Analisa statistik dilakukan dengan uji logistik regresi dengan memakai program EpiInfo. Secara total, 1,354 serum anjing berhasil diperoleh, hanya 41.88 % (567/1,354) yang menunjukkan titer antibodi lebih besar atau sama dengan 0.5 IU/ml. Analisis multivariate menunjukan bahwa pada post vaksinasi lebih dari 2 bulan memiliki titer antibodi yang rendah dibandingkan post vaksinasi kurang atau sama dengan 2 bulan ($p < 0.001$). Anak anjing memiliki titer antibodi yang tinggi dibandingkan anjing muda ($p > 0.02$) dan dewasa ($p > 0.001$). Studi ini menunjukkan rendahnya respon antibodi setelah vaksinasi pada anjing. Kajian lebih lanjut sebaiknya dilakukan untuk mengetahui faktor yang mempengaruhi respon antibodi.

Kata kunci : *rabies, anjing, ELISA, Bali.*

ABSTRACT

One of the major public health concerns in Bali is rabies. During November 2008 to December 2011 there have been 113 human deaths on the island of Bali, Most of them got infection from domestic dog. Mass vaccination campaign has been conducted in domestic dog to mitigate disease spreading. This study aimed to determine serological response in dog following rabies vaccination campaign. A cross-sectional serological survey following vaccination campaign in dog was conducted in December 2010. 67 villages in Bali Island were randomly selected as study area. 20 dog serums from each village as well as history of vaccination, status, gender, breed, and age were collected. Rabies antibodies were measured by Disease Investigation Centre, Denpasar using Pusvetma ELISA. Statistical analysis of survey data was determined by logistic regression using EpiInfo software. Totally, 1,354 dog serums were collected. Only 41.88 % (567/1,354) showed antibody equal or greater than 0.5 IU/ml.

Multivariable analysis showed that dog being vaccinated longer than 2 months had lower antibody titer than dog being vaccinated within two months significantly ($p < 0.001$). Puppy had significant higher antibody titers than in young ($p < 0.02$) and adult ($p < 0.001$) dogs. This study showed low antibody response after vaccination in dog. Follow-up studies should be conducted immediately to determine factors that influence antibody response.

Keywords: *rabies, dogs, ELISA, Bali.*

PENDAHULUAN

Rabies merupakan salah satu penyakit yang menjadi prioritas di Bali. Sejak November 2008 hingga Desember 2010 rabies di Bali telah mengakibatkan 113 kematian pada manusia (Anonim,2010), sedangkan kasus konfirmasi rabies pada hewan berjumlah 473, 98.2 % pada anjing, 0,63 % pada sapi, 0.42 % pada kucing serta 0.21 % masing- masing pada babi dan kambing. Vaksinasi merupakan metode pengendalian rabies yang paling utama, namun informasi mengenai respon serologis terhadap anjing yang divaksinasi di Bali masih terbatas. Pada studi survey serologis terdahulu yang dilakukan pada bulan September 2010 di 45 desa, sebanyak 337 serum yang berasal dari seluruh kabupaten di Bali. Hanya 144 (41%) memiliki titer antara 0.5 sampai 7.3 IU/ml, usia anjing ($p=0.13$), status kepemilikan ($p=0.57$) tidak berasosiasi dengan antibodi lebih besar atau sama dengan 0.5 IU/ml, karena itu studi ini akan mengkonfirmasi hasil terdahulu dengan besaran sampel dan jumlah desa yang lebih banyak.

MATERI DAN METODA

1. Bahan dan Alat

Sediaan kit Rabies Elisa Pusvetma yang terdiri dari 2 (dua) buah plat-sumur/well dengan antigen-coating 94 buah well, kontrol positif, kontrol negatif, antibodi sekunder reprotein A-HRP 20 IU konsentrat,

ABTS 30 ml, SDS 1 % dan PBS Tween konsentrat 10 kali, sedangkan Alat yang digunakan meliputi Mikroplate 96 well, 10 μ l, 50 μ l, 300 μ l, alat pencuci mikroplat manual atau mesin, plastik penutup dan Reader.

Buffer phosphat (konsentrat 10 x g/liter), pH 7.4. Buffer digunakan sebagai pelarut sampel, konjugat dan proses pencucian dengan melarutkan 1:9 dengan air destilasi, sampel serum di inaktifasi dengan memanaskan waterbath 56°C selama 30 menit, konjugat diencerkan 8000 kali, sampel serum 5 μ l diencerkan dengan menambahkan pelarut sebanyak 245 μ l pada mikroplate, sampel serum diurutkan sedemikian rupa sehingga enceran sampel dapat dipindahkan kedalam sumur-sumur pada mikroplate uji.

2. Pengujian

Enceran serum dipindahkan dengan pipet multichanel ke templat ke mikroplat uji sebanyak 100 μ l, sumur H11 H12 sebagai kontrol. Serum kontrol dipindahkan sebanyak 100 μ l sesuai urutan, mikroplate ditutup dengan plastik penutup dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 45-60 menit. Konjugat disiapkan pada pengenceran 8.000 kali dengan diluen PBS-Tween, larutan PBS yang mengandung 0.05 % Tween 20 (Tween 80) dengan pengenceran 10 kali. Cairan serum pada mikroplate uji dibuang dan dilakukan pencucian ELISA sebanyak minimal 5 kali, cairan

pencuci di keringkan dengan membalikan mikroplat diatas kertas tissue tebal. Konjugat ditambahkan sebanyak 100 μ l pada semua sumur, kecuali H11 dan H12 sebagai kontrol, mikroplat ditutup dengan plastik penutup dan diinkubasikan 37 °C selama 45 -60 menit. Cairan dibuang dan dilakukan pencucian, ABTS ditambahkan sebanyak 100 μ l pada semua sumur dan diinkubasikan pada suhu kamar serta pada kondisi gelap selama 15 – 30 menit. Selama inkubasi timbulnya warna kebiruan diamati, bila warna antara kontrol positif dan negatif bisa dibedakan secara visual maka dilakukan penghentian dengan penambahan stop solution sebanyak 100 μ l pada semua lubang, Densitas optik dibaca pada mesin pembaca dengan panjang gelombang 405 nm atau 415 nm.

3. Pembacaan hasil

Garis persamaan dibuat dengan di Microsoft Excel, data serum kontrol dan serum sampel dipindahkan kemudian dibuat nilai rata-rata, grafik serum kontrol (+) dan negatif (-) dibuat, OD kontrol positif dan kontrol negatif tidak boleh bersinggungan, grafik selisih nilai OD antara kontrol positif dan negatif dibuat, garis logaritmik sebagai garis koreksi dan garis positif murni ditentukan, hasil akhir pada pengujian ELISA dinyatakan dalam kesetaraan *Ekuivalen Unit* (EU).

4. Area studi

Studi ini dilakukan diseluruh sembilan kabupaten di Pulau Bali, sampling dilakukan secara multistage, 1360 sampel serum akan diambil dari 68 desa, setiap desa diambil sebanyak 20 serum, secara rinci disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1.

Jumlah sampel serum pada anjing post vaksinasi di Pulau Bali.

Kabupaten/Kota	Jumlah Desa	Jumlah desa yang disampling	Total sample serum
Badung	62	6	120
Bangli	72	7	140
Buleleng	149	14	280
Gianyar	70	7	140
Jembrana	52	5	100
Karangasem	79	7	140
Klungkung	59	6	120
Denpasar	43	4	80
Tabanan	131	12	240
Jumlah Total	717	68	1360

Semua serum diuji di Balai Besar Veteriner Denpasar (BBVet) Denpasar dengan menggunakan uji ELISA Pusat Veterenaria Farma (Pusvetma).

5. Analisa statistik

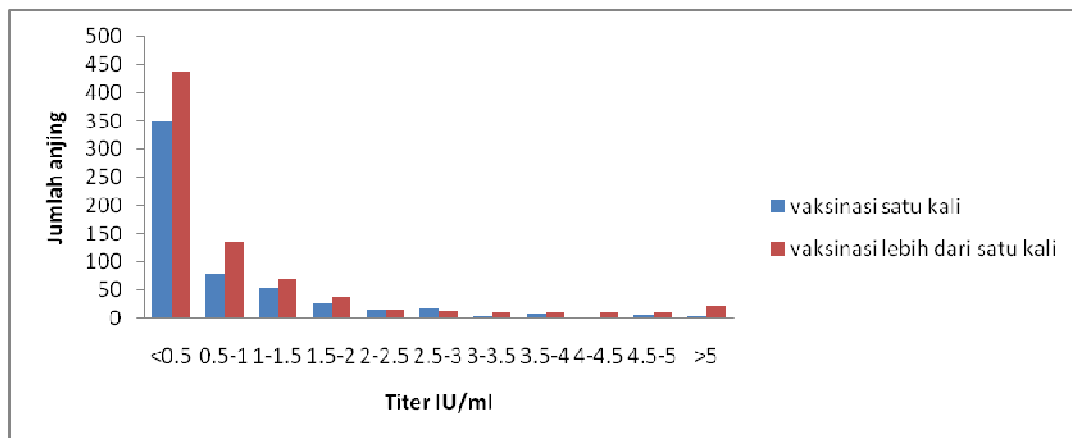
Asosiasi antara variabel dependent yaitu titer ≥ 0.5 IU/ml dan < 0.5 IU/ml dengan beberapa faktor resiko yang potensial meliputi : interval waktu antara vaksinasi dan pengambilan serum, jenis kelamin, frekuensi vaksinasi, status anjing (berpemilik tidak diliarkan dan berpemilik diliarkan), status vaksinasi (anjing yang divaksin satu kali dan serta anjing yang divaksin lebih dari satu kali) akan dianalisa dengan univariate

logistik regresi, selanjutnya apabila ditemukan secara signifikan akan dilanjutkan dengan multivariate logistik. Analisa statistik menggunakan program EpiInfo.

HASIL

Deskriptif dan analisis unvariabel.

Sebanyak 1354 serum anjing dari 67 desa dapat diperoleh, sedangkan target sampling adalah 68 desa (kurang satu desa dari Kabupaten Klungkung), hasil uji ELISA yang menunjukan titer $\geq 0,5$ IU/ml hanya sekitar 567 (41, 88%).



Gambar 1.

Profil titer antibodi berdasarkan jumlah anjing dan frekuensi vaksinasi

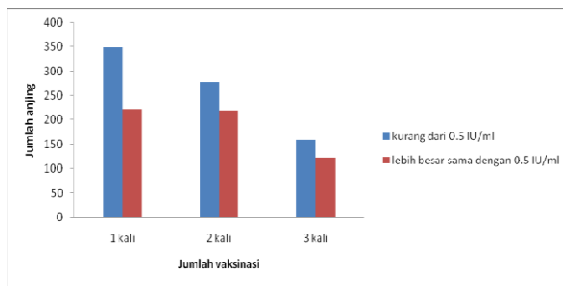
Status vaksinasi anjing dikategorikan menjadi dua yaitu anjing yang divaksin satu kali dan anjing yang divaksin lebih dari

satu kali, distribusi profil dan perbandingan antibodi masing – masing disajikan dalam gambar 1 dan tabel 2.

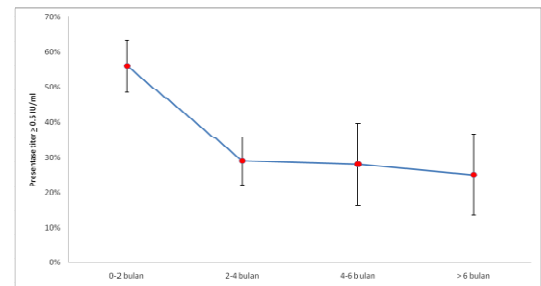
Tabel 1 .

Distribusi profil antibodi berdasarkan interval waktu antara vaksinasi dan pengambilan serum .

Status vaksinasi	Jumlah anjing	Interval waktu antara vaksinasi dan pengambilan serum							
		0-2 Bulan		2-4 Bulan		4-6 Bulan		> 6 Bulan	
		Rata-rata (\pm SD)	≥ 0.5 IU/ml (%)	Rata-rata (\pm SD)	≥ 0.5 IU/ml (%)	Rata-rata (\pm SD)	≥ 0.5 IU/ml (%)	Rata-rata (\pm SD)	≥ 0.5 IU/ml (%)
Satu kali vaksinasi	572	1.31 \pm 2.27	57	0.54 \pm 0.83	29	0.62 \pm 0.99	28	0.45 \pm 0.63	26
Lebih dari satu kali vaksinasi	782	1.65 \pm 3.7	61	0.67 \pm 1.08	35	0.77 \pm 1.2	36	0.47 \pm 0.9	26



a.



b.

Gambar 2.

- Titer antibodi rabies berdasarkan jumlah vaksinasi.
- Pengaruh titer antibodi berdasarkan interval waktu antara vaksinasi dan pengambilan serum.

Anjing yang divaksin lebih dari satu kali menunjukan 44 % (344/782) dengan titer ≥ 0.5 IU/ml, hasil ini lebih tinggi dibandingkan anjing yang divaksin satu kali yaitu 39 % (223/472), namun hasil ini hampir berbeda nyata ($p=0.065$). Persentase anjing dengan titer ≥ 0.5 IU/ml menjadi lemah secara signifikan ($p=0.00001$) pada periode dua sampai empat bulan setelah vaksinasi (Tabel 3.). Tidak ada perbedaan yang

signifikan antara bangsa anjing ($p=0.2$), anjing jantan, anjing jantan kastrasi dan betina ($p=0.2$), namun secara signifikan anak anjing memiliki persentase titer ≥ 0.5 IU/ml yang lebih besar (77 %) dibandingkan anjing muda dan dewasa ($p=0.00001$), demikian pula dengan anjing berpeliharaan tidak dilaikan (45 %) dengan anjing berpeliharaan dilaikan ($p=0.03$), secara detail disajikan pada Tabel.

Tabel 3.

Persentase titer protektif rabies berdasarkan interval waktu antara vaksinasi dengan pengambilan serum dan status vaksinasi.

Variabel	Jumlah titer ≥ 0.5 IU/ml	Jumlah anjing yang disampling	%	OR	CI 95 %
1. Interval	P= 0.00001				
0-2 bulan	315	535	58.8 %	-	
2-4 bulan	151	458	32.97 %	0.36	0.23-0.57
4-6 bulan	36	113	31.86 %	0.32	0.15-0.69
> 6 bulan	64	247	25.91 %	0.24	0.16-0.37
2. Status vaksinasi	P= 0.065				
Satu kali vaksinasi	223	472	39 %	-	-
Lebih dari satu vaksinasi	344	782	44 %	1.23	0.98-1.5
3. Usia	P= 0.00001				
Anak anjing (3-5 bulan)	40	52	77 %	1	
Muda (6-11bulan)	73	151	48 %	0.12	0.18-0.84
Dewasa (> 12 bulan)	454	1151	39 %	0.18	0.23-0.50
4. Bangsa	P= 0.2				
Ras	57	160	35 %	1	
Kros	61	143	42 %	1.34	0.84-2.1
Lokal	448	1049	43 %	1.35	0.95-2.0
Tidak tercatat	2				
5. Jenis kelamin	P= 0.2				
Kastrasi	71	195	36 %	1	
Betina	159	376	42 %	1.24	0.87-1.7
Jantan tidak kastrasi	334	773	43 %	1.27	0.9-1.7
6. Status	P= 0.03				
Berpemilik tidak diliarkan	318	712	45 %	1	
Berpemilik diliarkan	248	640	39 %	1.2	1.02-1.5

1. Analisis multivariabel

Dari enam variabel, hanya umur dan interval waktu antara vaksinasi dengan pengambilan serum dan status anjing yang akan dianalisa dengan multivariabel analisis, sedangkan kabupaten menjadi efek random. Pada hasil akhir analisa hanya umur dan interval waktu antara vaksinasi dengan pengambilan

serum yang sangat berpengaruh terhadap respon antibodi ($p < 0.05$), sedangkan status anjing berperan sebagai *confounding*. Pada studi ini penurunan antibodi terjadi secara signifikan pada tiga bulan atau lebih, anak anjing memiliki sedikit jumlah titer yang kurang dari 0.5 IU/ml, dibandingkan anjing muda atau tua (Tabel 4.)

Tabel.4Hasil akhir analisis multivariable dengan nilai signifikan ($p < 0.05$)

Variabel	Odds ratio	CI 95 %		P-value
Interval				
0-2 bulan	1	-	-	-
2 - 4 bulan	0.36	0.23	0.57	<.0001
4-6 bulan	0.33	0.15	0.69	0.00
> 6 bulan	0.24	0.16	0.37	<.0001
Usia				
Anak anjing	1	-	-	-
Muda	0.24	0.12	0.51	0.001
dewasa	0.39	0.18	0.84	0.02

PEMBAHASAN

Pada bulan Desember 2010, sebanyak 1354 serum darah anjing telah berhasil dikoleksi, ini merupakan jumlah sampel terbanyak yang pernah diambil untuk mengetahui respon imun, pada anjing yang telah divaksinasi di Pulau Bali, Hasil uji ELISA menunjukkan hanya sekitar 41.88 % (457/1354) titer ≥ 0.5 IU/ml, dua bulan post vaksinasi, 57 % anjing yang divaksinasi satu kali menunjukan titer ≥ 0.5 IU/ml, kemudian menurun secara tajam pada bulan kedua (29 %) dan keempat (28 %). Anjing yang divaksinasi lebih dari satu kali memiliki pola yang sama, hasil ini rendah dibandingkan studi lain, Hiramaya *et al* (1990) melaporkan pada *neutralizing* titer antibodi pada anjing berpemilik, menurun sampai 40 % titer ≥ 0.5 IU/ml pada bulan keempat post vaksinasi, karena itu direkomendasikan vaksin ulang dari 1 tahun menjadi 6 bulan, studi di Alaska memperlihatkan, 2 bulan post vaksinasi sebanyak 73 % titer dengan nilai ≥ 0.5 IU/ml

(Sage *et al.*, 1993), lebih dari itu studi di Swedia mengungkapkan 4 sampai 5 bulan post vaksinasi, 92.6 % titer ≥ 0.5 IU/ml (Berndtsson *et al.*, 2011). Anak anjing memiliki titer antibodi yang lebih tinggi dibandingkan anjing dewasa dan tua, hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh maternal antibodi dari induk yang telah divaksin. Jumlah vaksinasi menunjukkan hasil yang tidak terduga, namun hampir mendekati nilai signifikan ($p=0.065$). Tidak ada perbedaan yang nyata antara bangsa anjing serta jenis kelamin, hasil ini mengkonfirmasi hasil dari studi lain (Berndtsson *et al.*, 2011; Kennedy, 2007). Menurut WHO, (1998) faktor – faktor yang mempengaruhi keberhasilan vaksinasi diantaranya 1) vaksin yang digunakan (vaksin yang dapat protektif selama 2 tahun atau lebih dengan satu kali vaksinasi) ; 2) tim vaksinasi yang terlatih ; 3) pengelolaan komponen sistem rantai dingin yang benar, adapun komponen sistem rantai dingin meliputi : pengguna pelayanan kesehatan, peralatan untuk penyimpanan

dan transportasi vaksin, prosedur pengelolaan program dan kontrol distribusi vaksin, menurunnya potensi vaksin dapat disebabkan terpapar panas atau disimpan dalam keadaan beku (*freezer*), oleh karena itu vaksin harus berada dalam temperatur yang tepat pada saat penyimpanan dan transportasi.

Vaksinasi pada anjing berpemilik ditiadakan dengan menggunakan vaksin injeksi sangat sulit, untuk mengatasi hal tersebut perlu dipertimbangkan penggunaan vaksin secara oral dengan menggunakan umpan (Zhang *et al.*, 2007).

KESIMPULAN

Pada studi ini menunjukkan rendahnya respon antibodi pada anjing yang telah divaksin, studi lanjutan sebaiknya dilakukan untuk mengetahui faktor yang mempengaruhi rendahnya respon antibodi seperti kualitas vaksin dan sistem rantai dingin, sehingga kekebalan kelompok (*herd immunity*) yang diharapkan dapat tercapai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada Bapak Kepala Balai Besar Veteriner Denpasar, atas ijin dan tugas untuk melaksanakan serosurvey ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh Tim survey Balai Besar Veteriner Denpasar serta para petugas Dinas Peternakan (yang membidangnya) di seluruh

Provinsi Bali atas segala bantuan dan kerjasamanya selama kegiatan serosurvey dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim (2010). Laporan penanggulangan rabies Provinsi Bali. Dinas Peternakan Provinsi Bali.

Berndtsson, L.T., Nyman, A.K.J., Rivera. E., Klingeborn B., (2011). Factor associated with the success of rabies vaccination in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53:3

Chilique, Y., Verdier, Y., Sagné, L., Aubert, M., Schereffer, J.L., Selve, M., Wasniewski, M., Servat, A., (2003). Neutralising antibody titration in 25,000 sera of dogs and cats vaccinated against rabies in France, in the framework of the new regulations that offer an alternative to quarantine. *Rev Sci Tech Off IntEpiz*, 22:857-86

Hiramaya, N., Djusa, E.R., Aeny, R. M., Sakaki, K., Ogata, M., (1990). Immune state of dogs injected with rabies vaccines in the West Java, Indonesia. *Jpn J Vet Sci*, 52:1099-1011.

Kennedy, L.J., Lunt, M., Barnes, A., McElhinney, L., Fooks AR, Baxter DN, Ollier WER., (2007). Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies. *Vaccine*, 25:8500-8507.

Sage, G., Khawplod, P., Wilde, H., Lobaugh, C., Hemachudha, T., Tepsumethanon, W., Lumlertdaecha. B. (1993). Immune response to rabies vaccine in Alaskan dogs: failure to achieve a consistently protective antibody response. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 87: 593-595.

World Health Organization,. (1998). Global programmed for vaccine and immunization, WHO/EPILHIS/89.02. 7-8.

Zhang, .,Liu,Y., Fooks, R.A.,Zhang,F Hu,R.,(2007). Oral vaccination of dogs

(*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. Vaccine, 26:348-349.