

Stabilitas Immunoglobulin M (IgM) Campak pada *Dried Serum Spots*

Kartika Dewi Puspa, Mursinah, Ratumas Rosmawati Budianto

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI

email : kartika_dewi@litbang.depkes.go.id dan kartika.apt@gmail.com

Diterima: 5 Februari 2013

Direvisi: 3 Mei 2013

Disetujui: 20 Agustus 2013

Abstract

Shipping and storage of measles serum specimens from fields to the reference laboratory must consider the cold chain in order to maintain the stability of immunoglobulin M (IgM) in serum. Meanwhile, to maintain the cold chain needs special handling. This study aimed to determine the use of filter paper as an alternative in shipping and storage of specimens. This experimental study used measles positive serum received at the National Measles Laboratory Center for Biomedical and Basic Technology of Health from January until March 2011. There were three groups of sample. Each group consisted of 9 specimens. The effects of temperature and storage period on the stability of measles IgM of dried serum spots (DSS) stored in 4°C and 25°C for one, three, six, nine, twelve, and five teen days were tested at the National Measles Laboratory Center for Biomedical and Basic Technology of Health from July until December 2011. The stability of measles IgM of DSS that were stored at 4°C and 25°C temperature showed no significant difference ($p = 0.316$) compared to the serums stored at a temperature of 4°C in the measurements on the third day. Dried serum spots can not be used as sample alternative for detection of measles virus-specific immunoglobulin M

Keywords : *Dried serum spots, Immunoglobulin M, Measles*

Abstrak

Pengiriman dan penyimpanan serum spesimen campak dari daerah ke laboratorium rujukan harus mempertahankan *cold chain* untuk menjaga stabilitas imunoglobulin M (IgM) dalam serum, sementara untuk mempertahankan *cold chain* diperlukan penanganan khusus. Tujuan penelitian ini adalah untuk menilai penggunaan kertas saring sebagai alternatif dalam pengiriman dan penyimpanan spesimen. Desain penelitian ini adalah eksperimental. Sampel dalam penelitian ini adalah serum positif campak hasil pemeriksaan ELISA yang diterima oleh Laboratorium Campak Nasional Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan pada bulan Januari hingga Maret 2011. Sampel dibagi dalam 3 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 9 spesimen. Pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap stabilitas IgM campak pada *dried serum spots* (DSS) yang disimpan pada suhu 4°C dan 25°C selama satu, tiga, enam, sembilan, dua belas dan lima belas hari telah diperiksa di Laboratorium Nasional Campak, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan pada bulan Juli hingga Desember 2011. Stabilitas IgM campak pada *dried serum spots* yang disimpan pada suhu 4°C dan 25°C menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna dengan IgM pada kelompok serum ($p=0,316$) dibandingkan terhadap serum yang disimpan pada suhu 4°C pada hari ketiga. DSS tidak dapat digunakan sebagai alternatif sampel untuk pemeriksaan IgM campak.

Kata kunci : *Dried serum spots, Imunoglobulin M, Campak*

Pendahuluan

Gold standard pemeriksaan laboratorium untuk campak menggunakan metode ELISA, yaitu dengan mendeteksi adanya imunoglobulin M campak yang terdapat pada spesimen serum yang diambil setelah onset gejala muncul.¹

Dalam pengiriman dan penyimpanan spesimen campak yang berupa serum dari daerah ke laboratorium rujukan harus mempertahankan *cold chain* agar titer imunoglobulin M (IgM) dalam serum tidak menurun. Serum harus disimpan dan ditangani dengan tepat untuk menjaga stabilitasnya dalam jangka waktu yang lama. Serum paling stabil bila disimpan beku dan terlindung dari cahaya. Suhu penyimpanan yang direkomendasikan untuk serum adalah -5°C and -20°C. Frekuensi *freeze-thaw* harus dihindari karena dapat menurunkan stabilitas serum.^{2,3}

Pemeriksaan konfirmasi rutin spesimen menjadi salah satu komponen yang penting dalam pemastian mutu pemeriksaan dalam jejaring laboratorium campak. Walau bagaimanapun, pengiriman spesimen serum dari laboratorium nasional ke laboratorium rujukan cukup mahal, khususnya saat pengiriman dengan *cold chain*.⁴

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *filter paper* dapat digunakan dalam pengiriman dan penyimpanan spesimen.^{5,6} Telah dilaporkan bahwa spesimen yang berupa *whole blood*, serum atau plasma dalam *filter paper* memiliki kinerja yang baik dalam pemeriksaan serologi dan molekuler pada infeksi virus yang berbeda-beda, termasuk infeksi yang dikarenakan citomegalovirus, HIV, hepatitis C, campak dan rubela.⁵

Penggunaan *Dried Serum Spots* (DSS) meskipun tidak mudah dalam proses pengumpulan spesimennya, tetapi dapat

mempermudah dalam pengiriman dan penyimpanan spesimen.⁷ Hal ini penting dalam pengiriman spesimen serum ke laboratorium rujukan dan kemungkinan terjadinya keterlambatan dalam pengiriman sehingga pengujian tidak dapat dilakukan dengan segera. Kemungkinan mengirimkan DSS dalam amplop bisa mempermudah studi epidemiologi bila dibandingkan dengan menggunakan *cold chain*. Penggunaan *filter paper* dalam pengiriman dan penyimpanan spesimen dapat menjadi alternatif yang tepat.

Metode

Serum Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah serum yang diterima di Laboratorium Campak Nasional Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan pada bulan Januari – Maret 2011. Sampel dalam penelitian ini adalah serum positif campak hasil pemeriksaan ELISA yang diterima oleh Laboratorium Campak Nasional, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Manusia pada bulan Januari – Maret 2011. Sebanyak 9 serum positif campak dengan *Optical Density* (OD) > 0,7 dan volume sampel > 200 µL dipilih untuk digunakan dalam penelitian ini.

Penyiapan *Dried Serum Spots*

Sebanyak 20 µL serum ditetaskan pada *filter paper* (Whatman, 903[®] Protein Saver Cards). *Filter paper* dikeringkan selama 4-5 jam pada suhu kamar dan kemudian dikemas terpisah dalam plastik *Ziploc Storage Bags* 4"x6". DSS disimpan selama 3, 6, 9, 12 dan 15 hari pada suhu 4°C dan 25°C.

Deteksi IgM Campak pada DSS

Pada setiap *filter paper*, sekitar ± 3 mm di luar diameter lingkarannya digunting. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang setelah ditambahkan 450 µL POD buffer sampel yang tersedia dalam kit

yang terpisah dengan Enzygnost Anti-Measles Virus/IgM dari Dade Behring® kemudian divorteks selama 15 detik. Lakukan inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, divorteks kembali selama 15 detik dan selanjutnya disentrifuse selama 1 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Diambil 170 µL larutan dan dicampurkan dengan 170 µL RF, inkubasi 15 menit lalu dicuci dengan *washing solution* sebanyak 4 kali. Tambahkan 100 µL *konjugat microbial* (1:50) ke masing-masing *well*. Tutup *plate* dengan kertas kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. *Plate* dicuci dengan *washing solution* sebanyak 4 kali, kemudian tambahkan 100 µL campuran chromogen TMB dan substrat TMB (1:10) pada tiap *well*. *Plate* ditutup dengan kertas kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Tambahkan 100 µL *stop solution* ke tiap *well*. Pengukuran IgM dilakukan dengan menggunakan ELISA *reader spectrophotometer* pada panjang gelombang 450 nm dan 630 nm.

Deteksi IgM pada Serum

Blue solution dicampur dengan *sample diluent* dengan perbandingan 1:20. Ambil 400 µL campuran *blue solution* kemudian masukkan ke tiap *hidrologic tube*. Tambahkan masing-masing 20 µL sampel, negatif kontrol dan positif kontrol. Ambil 200 µL dari semua *hidrologic tube* berisi sampel kemudian di pindahkan ke *hidrologic tube* yang baru, tambahkan RF absorbent sebanyak 200 µL dan inkubasi selama 10 menit. Masukkan 150 µL *Anti-Measles Virus Reference P/N*, *Anti-Measles*

Virus Reference P/P, 150 µL sampel dan pada baris *well* terakhir 150 µL *Anti-Measles Virus Reference P/P*. Tutup *plate* dengan kertas, inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian cuci dengan *washing solution* sebanyak 4 kali. Selanjutnya tambahkan 100 µL campuran chromogen TMB dan substrat TMB (1:10) pada tiap *well*. *Plate* ditutup dengan kertas kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Tambahkan 100 µL *stop solution* ke tiap *well*. Pengukuran imunoglobulin M dilakukan dengan menggunakan ELISA *reader spectrophotometer* pada panjang gelombang 450 nm dan 630 nm. Sampel serum dan DSS dengan nilai $OD \geq 0,2$ dinyatakan positif campak, nilai $0,1 \geq OD \geq 0,2$ dinyatakan equivocal, sedangkan hasil pengukuran dengan $OD < 0,1$ dinyatakan negatif campak.⁸

Untuk meningkatkan reproduksibilitas, nilai OD untuk semua sampel serum dan DSS dikoreksi dengan menggunakan nilai rata-rata OD positif kontrol dari kitnya.

Hasil dan Pembahasan

Penggunaan sistem *cold chain* dalam proses pengiriman sampel tidaklah mudah, karena memerlukan penanganan khusus dan biaya yang relatif mahal. Penggunaan *filter paper* sebagai alternatif sampel menjadi pilihan yang memudahkan dalam pengiriman sampel karena tidak memerlukan *cold chain*.

Tabel 1. Hasil pengukuran IgM sampel dengan metode ELISA

Pengukuran IgM	Kontrol		DSS 4		DSS 25	
	Rerata $\pm$ SD	P*	Rerata $\pm$ SD	P*	Rerata $\pm$ SD	P*
Hari ke-0	0,498 $\pm$ 0,160	Rujukan	0,446 $\pm$ 0,126	Rujukan	0,446 $\pm$ 0,126	Rujukan
Hari ke-3	0,488 $\pm$ 0,140	0,834	0,442 $\pm$ 0,13	0,889	0,392 $\pm$ 0,108	0,043
Hari ke-6	0,511 $\pm$ 0,154	0,767	0,387 $\pm$ 0,105	0,109	0,267 $\pm$ 0,039	0,001
Hari ke-9	0,571 $\pm$ 0,107	0,057	0,454 $\pm$ 0,104	0,513	0,263 $\pm$ 0,081	0,000
Hari ke-12	0,498 $\pm$ 0,092	0,981	0,324 $\pm$ 0,092	0,012	0,184 $\pm$ 0,071	0,000
Hari ke-15	0,476 $\pm$ 0,052	0,721	0,360 $\pm$ 0,122	0,099	0,182 $\pm$ 0,98	0,000

*Uji tes t

DSS : *dried serum spots*

4 : suhu 4 ° C

25 : suhu 25 ° C

Tabel 2. Perbandingan rata-rata antar kelompok

Pengukuran IgM		Jumlah Kuadrat	Df	Rata-Rata Kuadrat	F	P
Hari ke-0	Antar kelompok	0,016	2	0,008	0,413	0,666
	Dalam kelompok	0,458	24	0,019		
	Total	0,473	26			
Hari ke-3	Antar kelompok	0,041	2	0,020	1,208	0,316
	Dalam kelompok	0,407	24	0,017		
	Total	0,448	26			
Hari ke-6	Antar kelompok	0,267	2	0,134	11,052	0,000
	Dalam kelompok	0,290	24	0,012		
	Total	0,558	26			
Hari ke-9	Antar kelompok	0,435	2	0,217	22,715	0,000
	Dalam kelompok	0,230	24	0,010		
	Total	0,665	26			
Hari ke-12	Antar kelompok	0,447	2	0,224	30,614	0,000
	Dalam kelompok	0,175	24	0,007		
	Total	0,623	26			
Hari ke-15	Antar kelompok	0,394	2	0,197	21,908	0,000
	Dalam kelompok	0,216	24	0,009		
	Total	0,611	26			

Pada Tabel 1 terlihat bahwa terdapat perbedaan antara DSS yang disimpan pada suhu 4°C dan yang disimpan pada suhu 25°C. Pada kelompok serum, tidak ada perbedaan yang bermakna untuk setiap pengukuran sampai hari ke-15. Selanjutnya, pada kelompok DSS yang disimpan pada suhu 4°C mulai terjadi penurunan hasil pengukuran pada hari ke-12 jika dibandingkan dengan kelompok serum. Sedangkan pada kelompok DSS yang disimpan pada suhu 25°C, penurunan mulai terjadi pada hari ke-3.

Secara umum, dapat dilihat bahwa spesimen dalam bentuk serum yang disimpan pada suhu 4°C cukup stabil dibandingkan dengan DSS yang disimpan baik pada suhu 4°C maupun suhu 25°C. Sampai pengukuran hari ke-3, baik pada DSS yang disimpan pada suhu 4°C maupun pada suhu 25°C terdapat perbedaan yang tidak bermakna dengan IgM pada kelompok serum ($p=0,316$).

Penggunaan DSS dalam sistem surveilans memiliki beberapa keterbatasan, diantaranya harus ada sentrifuse dan listrik yang cukup di lapangan untuk memisahkan serum dari *whole blood*. Selain itu, volume serum sebanding dengan volume darah yang diambil sehingga menyulitkan pengambilan sampel, sedangkan *dried blood spots* (DBS) cukup dengan meneteskan beberapa μ L darah pada *filter paper*.

Pada penelitian ini terlihat bahwa IgM kelompok serum yang disimpan pada suhu 4°C stabil sampai hari terakhir pengukuran. Selanjutnya, DSS yang disimpan pada suhu 4°C hasil pengukuran IgM menurun setelah hari ke-9. Pada kelompok DSS yang disimpan pada suhu 25°C hasil pengukuran menurun setelah hari ke-1.

Berdasarkan hasil uji Anova, dapat diketahui bahwa penggunaan DSS yang disimpan pada suhu 4°C maupun suhu 25°C

masih *reliable* sampai penyimpanan hari ketiga. Hal ini berbeda dengan data yang didapat dari studi pilot yang telah dilakukan oleh laboratorium EUR dan EMR, bahwa DSS yang disimpan pada suhu 37°C stabil selama 1 minggu.⁹ Lain halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Desbois et al, bahwa serum dalam DSS yang disimpan pada suhu 37°C maupun suhu kamar stabil selama 1 bulan.⁵

Keterbatasan penelitian ini adalah adalah umur arsip sampel yang tidak beragam dinilai dapat memengaruhi kualitas sampel sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan umur arsip sampel dipilih dalam rentang waktu yang lebih pendek lagi atau pengambilan sampel pada hari yang sama.

Kesimpulan

DSS tidak dapat digunakan sebagai alternatif sampel untuk pemeriksaan IgM campak.

Daftar Rujukan

1. CDC. *Recommendations from an Ad Hoc Meeting of the WHO Measles and Rubella Laboratory Network LabNet) on Use of Alternative Diagnostic Samples for Measles and Rubella Surveillance*. Morbidity and Mortality Weekly Report Vol. 57 No. 24, June 2008. CDC. 2008. [diunduh 12 Desember 2012]. Tersediadi <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF>
2. Atlanta Biological. *Bulletin Technical : Storing, Thawing and Freezing Serum*. [diunduh 12 Desember 2010]. Tersedia di: <http://www.atlantabio.com/assets/TechnicalBulletins/File/TechnicalBulletin-Storing, Thawing and Freezing Serum.pdf>
3. Departement of Vaccines and Biological, WHO. 2000. *Manual for the laboratory Diagnosis of Measles Virus Infection*. Geneva : WHO. Tersedia di [http://measlesrubellainitiative.org/mi-files/Tools/Guidelines/WHO/Manual for the Laboratory Diagnosis of Measles Virus Infection.pdf](http://measlesrubellainitiative.org/mi-files/Tools/Guidelines/WHO/Manual%20for%20the%20Laboratory%20Diagnosis%20of%20Measles%20Virus%20Infection.pdf) [diunduh tanggal 9 April 2013].
4. WHO. *Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection*. 2007. Tersediadi: http://who.int/immunization_monitor

- ing/LabManualFinal.pdf [diunduh tanggal 4 Oktober 2010].
5. Delphine D. et al. *Use of Dried Serum Spots for Serological and Molecular Detection of Hepatitis A Virus*. 2009. [diunduh 25 Oktober 2010]. Tersedia di: <http://jcm.asm.org/cgi/content/full/47/5/1536>.
 6. World Health Organization (WHO). *Use of Serum Dried onto Filter Paper for IgM Antibody Confirmatory Testing*. WHO. 2009.
 7. Measles virus. <http://virology-online.com/viruses/MEASLES.htm>. [diunduh 12 Desember 2010].
 8. Siemens. *Product Guide's of Enzygnost® Anti-Measles Virus/IgM*. Germany : Siemens Healthcare Diagnostics Product GmbH. 2008.
 9. World Health Organization (WHO). 2007. *Recomendation 5th Global Measles and Rubella laboratory Network Meeting 26 – 28 September 2007 at Geneva*. [diunduh 13 Desember 2010]. Tersedia di: http://www.who.int/immunization_delivery/adc/measles/FINAL_Summary_Recs_Global_LabNetmeeting_20Nov07.pdf