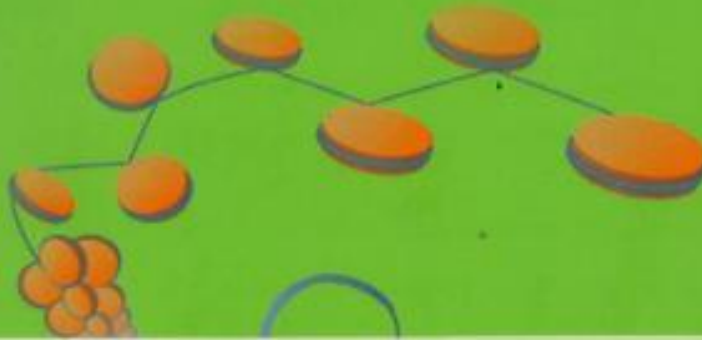




PENDIDIKAN BERKESINAMBUNGAN PATOLOGI KLINIK 2016



MAKALAH LENGKAP

LOGI KLINIK
EM



Pendidikan Berkesinambungan Patologi Klinik 2016

Editor: Ninik Sukartini, Ina S Timan

xii + 265 hal

15 x 21 cm

ISBN 978-602-7655-32-4

Copyright 2016

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Dilarang memperbanyak, mencetak, dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan dalam bentuk apapun juga tanpa seizin penulis dan penerbit

Diterbitkan pertama kali oleh

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas

Indonesia

Jakarta, Agustus 2016

DAFTAR ISI

Prakata	iii
Sambutan Ketua Umum Perhimpunan	v
Daftar kontributor tulisan.....	vii
Daftar Isi	xi
Peta kuman dan kuman multi/panresisten selama lima tahun di rscm, apa yang terjadi?.....	1
Tonny Loho	
Patogen penyebab masalah infeksi di rumah sakit.....	11
Dalima A. W Astrawinata	
Multidrug resistant tuberculosis: Epidemiologi, deteksi, pengelolaan, dan pencegahan.....	28
Ida Parwati	
Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor (GEPNET).....	50
Ina S. Timan.	
Penanda fekal pada kanker kolorektal	64
Yusra	
Diagnosis dan tatalaksana terkini tumor neuroendokrin gastroenteropankreatik.....	78
Murdani Abdullah	
Patofisiologi dan diagnosis infiltrasi leukemia limfoblastik akut ke sistem saraf pusat	92
FifyHenrika	
Peran flow cytometry dalam mendeteksi infiltrasi leukemia akut ke susunan saraf pusat.....	109
Dewi Wulandari	
Tatalaksana leukemia limfoblastik akut dengan Infiltrasi sistem saraf pusat.....	119
Murti Andriastuti	

Patofisiologi anemia aplastic	128
Farida Oesman	
Sitogenetik pada anemia aplastik	137
Ninik Sukartini	
Diagnosis anemia aplastic	145
Riadi Wirawan	
Kelainan metabolik bawaan: Pendekatan sistematis menuju diagnosis	154
Titis Prawitasari	
Pemeriksaan laboratorium kelainan metabolik bawaan pada anak	175
Nuri Dyah Indrasari	
Pemeriksaan konfirmasi kelainan metabolik bawaan pada anak.....	189
Merci Monica Pasaribu	
Peran Galectin-3 sebagai penanda fibrosis jantung.....	211
Sri Suryo Adiyanti/Marzuki Suryaatmadja	
Copeptin sebagai penanda baru gagal jantung	222
Suzanna Immanuel	
Diagnosis dan tatalaksana mutakhir gagal jantung	251
Rarsarsi Soerarso	

PERAN FLOW CYTOMETRY DALAM MENDETEKSI INFILTRASI LEUKEMIA AKUT KE SUSUNAN SARAF PUSAT

Dewi Wulandari

Departemen Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Uninversitas Indonesia
RS Cipto Mangunkusumo Jakarta

Abstrak

Keterlibatan susunan saraf pusat merupakan komplikasi leukemia dan limfoma yang relatif jarang. Namun demikian, kondisi ini mempunyai dampak prognostik yang serius, dan memerlukan keputusan penting dalam pengobatan termasuk di antaranya pemberian terapi intratekal. Lokalisasi leptomeningeal secara konvensional didiagnosis melalui identifikasi sel leukemik di cairan serebrospinal dengan analisa sitomorfologi. Namun metode ini mempunyai sensitivitas rendah dengan tingkat negatif palsu mencapai 60% dari seluruh kasus. Berbagai penelitian akhir-akhir ini melaporkan, penggunaan flow cytometry multi parameter untuk pemeriksaan cairan otak mempunyai efisiensi yang lebih baik dalam mendeteksi keterlibatan susunan saraf pusat karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik daripada analisa sitomorfologi. Berbagai penelitian melaporkan penggunaan flow cytometry bersama dengan sitomorfologi dapat meningkatkan kemampuan deteksi 17-86% dibandingkan dengan analisa sitomorfologi saja. Oleh karena itu, berbagai negara telah menerapkan flow cytometry sebagai pemeriksaan rutin bersama dengan sitomorfologi. Kendala jumlah sel yang sedikit dalam cairan otak untuk pemeriksaan flow cytometry dapat diatasi dengan sentrifugasi berkecepatan rendah, dan penggunaan multiparameter dalam satu tabung. Kesulitan lain adalah stabilitas sel dalam cairan otak yang lebih pendek, sehingga diperlukan pemeriksaan sesegera mungkin setelah pengambilan sampel. Selain itu, pada kondisi traumatic tap, sulit ditentukan bahwa sel leukemik yang ditemukan bukan berasal dari sel leukemik di darah tepi.

Pendahuluan

Infiltrasi ke susunan saraf pusat merupakan salah satu komplikasi leukemia akut yang cukup sering dan mempunyai dampak prognostik dan terapeutik yang penting. Infiltrasi sel leukemia ke susunan saraf pusat umumnya leptomeningeal, tetapi dapat juga berupa infiltrasi parenkimal. Infiltrasi leptomeningeal dapat dideteksi dengan analisa cairan otak, sedangkan infiltrasi parenkimal dideteksi dengan metode pencitraan.¹

Selama ini infiltrasi leptomeningeal dari keganasan hematologi maupun tumor padat sulit ditemukan, karena metode pemeriksaan yang digunakan belum mempunyai kapabilitas yang maksimal dalam mendeteksi adanya sel ganas di cairan serebrospinal. Metode yang ada saat ini adalah pemeriksaan sitomorfologi dengan sitosentrifugasi. Namun beberapa penelitian, di antaranya penelitian *post-mortem*, melaporkan bahwa pemeriksaan sitologi ini mempunyai sensitivitas yang rendah. Angka negatif palsu yang pernah dilaporkan mencapai 60%. Walaupun demikian, pemeriksaan sitomorfologi cairan serebrospinal hingga saat ini dianggap sebagai baku emas, karena memiliki spesifisitas 100%.^{1,2}

Sejak dekade yang lalu, pemeriksaan *flow cytometry* untuk analisis cairan serebrospinal mulai diperkenalkan untuk mendeteksi infiltrasi leptomeningeal pada leukemia akut. Berbagai penelitian melaporkan penggunaan *flow cytometry* mempunyai sensitivitas yang lebih baik dibandingkan analisa sitomorfologi. Oleh karena itu, di beberapa negara pemeriksaan *flow cytometry* mulai diterapkan sebagai pemeriksaan rutin bersama sitomorfologi.² Pada makalah ini akan dibahas secara singkat mengenai aplikasi sitology cairan serebrospinal, aplikasi *flow cytometry*, aspek teknis pemeriksaan, kelebihan, dan keterbatasan *flow cytometry* dalam deteksi infiltrasi leptomeningeal leukemia akut.

Pemeriksaan sitologi cairan serebrospinal

Pemeriksaan sitologi cairan serebrospinal untuk mendeteksi infiltrasi keganasan ke susunan saraf pusat pada umumnya didasarkan atas hitung sel dan morfologi. Pada pasien dengan infiltrasi leptomeningeal dari keganasan hematologi maupun tumor solid, umumnya ditemukan pleositosis limfositik. Identifikasi sel ganas pada pemeriksaan sitomorfologi dikerjakan dengan preparasi sitosentrifugasi dan diwarnai dengan pewarnaan Wright atau May-Grunwald Giemsa.²

Namun pemeriksaan ini mempunyai sensitivitas yang rendah. Berbagai penelitian melaporkan pemeriksaan sitologi hanya mampu mendeteksi 38-60% kasus yang terbukti infiltrasi SSP pada autopsi. Penelitian lain juga melaporkan hanya sekitar 50% pasien terdeteksi pada lumbal pungsi yang pertama, sedangkan 80% di antaranya baru terdeteksi pada pungsi lumbal kedua, dan bahkan sekitar 10-20% tetap tidak terdeteksi pada pungsi lumbal ke tiga. Interpretasi pemeriksaan sitologi seringkali sulit, karena jumlah sel yang sangat sedikit dan secara morfologi kadang-kadang sulit dibedakan antara sel ganas dengan sel jinak.^{1,2}

Pada tahun 1986, suatu kelompok studi merekomendasikan bahwa diagnosis infiltrasi SSP ditegakkan apabila ditemukan leukosit ≥ 5 sel/ul ditambah minimal satu sel yang dapat dipastikan sebagai blas. Namun demikian hitung eritrosit perlu

juga dilakukan untuk mengidentifikasi *traumatic lumbar puncture (traumatic LP)* bila ditemukan eritrosit ≥ 10 sel/ul atau *bloody lumbar puncture (bloody LP)* bila ditemukan eritrosit > 500 sel/ul. Kondisi ini cukup sering terjadi pada pasien leukemia limfoblastik akut pediatrik, dan terlebih pada pasien dengan hitung trombosit rendah, dan jarak dengan pungsi lumbal sebelumnya terlalu dekat. Pada kedua kondisi tersebut blas yang ditemukan pada cairan bisa jadi merupakan kontaminasi dari blas yang berasal dari sirkulasi, bukan blas akibat infiltrasi leptomeningeal. Hal ini terutama pada pasien dengan blas yang tinggi di sirkulasi.²

Beberapa tahun terakhir, pemeriksaan imunohistokimia juga dikerjakan untuk meningkatkan ketepatan pemeriksaan sitomorfologi jika jumlah sel dalam sample mencukupi.. Pemeriksaan ini meningkatkan spesifisitas, namun tidak meningkatkan sensitivitas. Penggunaan antibodi monoklonal pada pemeriksaan ini membantu mengidentifikasi sel leukemik di cairan serebrospinal. Namun demikian, pada jumlah sel yang terbatas, antibodi monoklonal yang dipakai harus ditentukan secara cermat berdasarkan gambaran sitomorfologi, karena sulit menerapkan beberapa antibodi monoklonal secara simultan pada pemeriksaan ini.²

Pemeriksaan cairan otak dengan flow cytometry

Tantangan terbesar dalam analisis cairan serebrospinal adalah jumlah sample yang diperoleh terbatas, dengan jumlah sel yang sedikit. Selain itu, kondisi cairan serebrospinal yang berbeda dari serum dapat menyebabkan sel mudah terdegradasi, sehingga pemeriksaan harus dikerjakan sesegera mungkin.^{2,3,4}

Kemajuan dalam instrumentasi dan pengembangan reagensia pada flow cytometry polikromatik sangat membantu dalam deteksi sebagian besar karakteristik selular, termasuk sample dengan jumlah sel yang terbatas. Berbagai strategi diterapkan untuk mengatasi keterbatasan jumlah sel dalam sample cairan serebrospinal, seperti penggunaan beberapa antibodi monoklonal dengan fluorokrom yang berbeda secara simultan dalam satu tabung yang dikenal sebagai *multiparameter flow cytometry*.^{4,5}

Sensitivitas pemeriksaan

Berbagai penelitian, sebagaimana yang dirangkum oleh Ahluwalia et al.⁵ (table 1) melaporkan bahwa pemeriksaan flow cytometry multiparameter mempunyai sensitivitas 2-3 kali lebih baik dibandingkan pemeriksaan sitomorfologi. Beberapa studi bahkan melaporkan bahwa beberapa pasien tanpa gejala neurologis yang terdeteksi positif dengan flow cytometry, pada follow-up selanjutnya secara klinis terbukti adanya infiltrasi susunan saraf pusat. Hal ini menunjukkan bahwa infiltrasi susunan saraf pusat dapat terdeteksi bahkan

sebelum ada manifestasi klinis.

Tabel 1. Perbandingan sensitivitas antara flow cytometry dan sitologi konvensional dalam deteksi limfosit malignan pada pasien dengan keganasan hematologi⁵

Studi Jumlah kasus Sensitivitas

FCM* Positif Sitologi Positif

Hedge (2005) 51 11 (22%) 1 (2%) Di Noto (2008) 42 11 (26%) 4 (9.5%) Quijano (2009) 123 27 (22%) 7 (6%) suspicious in 3 (2%)

Bromberg (2007) 219 44 (73%) 19 (32%) Schinstine (2006) 32 19 (59%) Repeat cytology: 9(47% of 19)

*FCM = flow cytometry

Sensitivitas merupakan hal yang penting dalam analisa sel dalam cairan serebrospinal. Subira et al.⁴ dalam penelitiannya dengan menggunakan pengenceran sel secara serial mendapatkan bahwa flow cytometry mampu mengidentifikasi sub populasi limfosit dalam minimal 1 ml sample dengan hitung sel 1 sel/ul. Selain itu, penelitian tersebut juga melaporkan bahwa untuk penetapan suatu kelompok *event* sebagai suatu populasi sel spesifik, cukup dengan 13 *event* yang berkelompok (*clustered*). *Event* berkelompok yang < 10 dianggap negatif.^{3,4}

Technical pitfalls

Selularitas rendah

Rendahnya selularitas pada sample cairan serebrospinal merupakan tantangan utama dalam deteksi infiltrasi leptomenigeal. Jumlah minimal sel yang diperlukan untuk analisis belum ditetapkan secara universal. Di berbagai kepustakaan menyebutkan jumlah sel minimal yang bervariasi antara 100 limfosit untuk karakterisasi subset limfosit, hingga 1000 sel untuk kecurigaan limfoma susunan saraf pusat. Untuk memperoleh jumlah sel yang maksimal untuk analisis, sample cairan serebrospinal dapat dipisahkan dengan sentrifugasi berkecepatan rendah. Dengan sentrifugasi 200g selama 15 menit pada 4°C, tidak terjadi kehilangan sel yang cukup bermakna pada sample dengan hitung leukosit < 10 sel/ul. Selain itu, pewarnaan intraselular yang sedapat mungkin dihindarkan, karena proses pencucian berulang pada proses pewarnaan intraselular akan menyebabkan kehilangan sel yang cukup besar.^{2,5}

Strategi lain yang dapat diterapkan untuk sample dengan selularitas yang rendah adalah penggunaan multiparameter secara simultan dalam satu tabung. Namun, beberapa penelitian melaporkan, penggunaan lebih dari 6 fluorokrom secara simultan dapat menyebabkan *spectral overlap* yang memerlukan ketelitian dalam

kompensasi fluoresensi. Panel antibodi monoklonal yang disarankan terdiri dari minimal 3 fluorokrom yang terdiri dari penanda limfosit T, CD10, CD19, CD34, CD45, dan CD117.¹ Panel ini merupakan panel penyaring yang pada kebanyakan kasus sudah cukup untuk menegakkan diagnosis, tetapi pada kasus tertentu dapat dilanjutkan dengan panel tambahan sesuai dengan kebutuhan berdasarkan hasil dari pemeriksaan penyaring dan data immunophenotyping dari darah tepi atau sumsum tulang pada saat diagnosis.^{2,5}

Kecepatan Degradasi Sel

Tantangan berikutnya yang harus dihadapi pada analisa sel pada cairan serebrospinal adalah kecepatan degradasi sel dalam sample. Berbagai penelitian melaporkan, dalam 30 menit pasca pengambilan sample, telah terjadi penurunan jumlah sel secara bermakna, dengan kecepatan degradasi setiap jenis sel yang berbeda. De Graaf et al.² dalam penelitiannya mendapatkan monosit dan granulosit mengalami degradasi yang lebih cepat di bandingkan limfosit. Degradasi sel secara selektif ini akan sangat berpengaruh dalam analisis flow cytometry dan dapat menyebabkan kesalahan interpretasi. Sample dengan pleositosis dapat terbaca sebagai sample normal.²

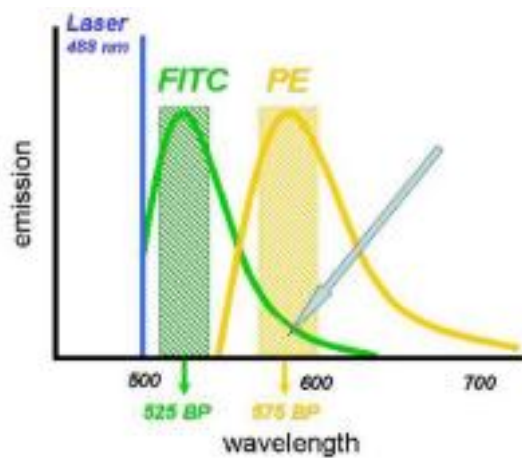
Berbagai cara dikembangkan untuk mengatasi hal ini, antara lain dengan penambahan media kultur sel yang mengandung serum segera setelah pengambilan sample. Penambahan media yang mengandung serum ini ternyata dapat mencegah degradasi sel hingga 24 jam setelah pengambilan sample. Saat ini juga sudah tersedia secara komersial tabung penampung berisi sel fiksatif (Transfix®) yang lebih praktis dan dapat mencegah degradasi sel hingga 24 jam.^{1,2,4,6}

Fluoresensi non spesifik

Fluoresensi non spesifik dapat menyebabkan masalah yang serius, terutama dalam hal deteksi *event* yang jarang. Fluoresensi non spesifik ini dapat terjadi akibat autofluoresensi, *spectral overlap*, dan pengikatan antibodi secara non spesifik. Autofluoresensi dapat terjadi akibat eksitasi komponen alamiah sel, misalnya flavoprotein yang terdapat pada granula granulosit, dan bukan disebabkan karena fluorokrom yang terikat pada antibodi. Hal ini dapat diatasi dengan perangkat tertentu, misalnya *single laser excitation*, atau koreksi autofluoresensi.^{1,2}

Hal berikutnya adalah *spectral overlap*, yang terjadi karena tumpang tindih dari panjang gelombang eksitasi dari fluorokrom yang dipakai secara simultan dari satu tabung. Akibatnya satu fluorokrom dapat menyebabkan dua signal positif pada dua detektor yang berbeda. (gambar 1). Hal ini menjadi masalah, terutama jika menggunakan lebih dari 4 fluorokrom.² Untuk mengatasi hal tersebut, disarankan menggunakan kombinasi fluorokrom yang tidak saling tumpang tindih

atau minimal. Selain itu juga dapat dilakukan kompensasi fluoresensi, yang membutuhkan sample sel yang cukup dan kecermatan operator.²



Gambar 1. *Spectral overlap*

Kontaminasi darah

Ditemukannya eritrosit dalam sample cairan serebrospinal dapat mengindikasikan perdarahan susunan saraf pusat atau trauma pungsi di mana terdapat darah yang mencemari sample cairan serebrospinal. Jika sample yang tercemar darah perifer ini ditujukan untuk mencari adanya infiltrasi leptomeningeal dari keganasan hematologi, maka ditemukannya sedikit sel neoplastic hanya bermakna diagnostik jika sel tersebut tidak ditemukan di darah perifer yang diperiksa secara bersamaan.^{1,2,5}

Oleh karena itu, pada leukemia akut tidak disarankan untuk melakukan pungsi lumbal pada fase akut, di mana sel blas di darah perifer masih sangat tinggi. Apabila sample cairan tercemar darah perifer, kemungkinan hasil positif palsu akan sangat tinggi.^{2,5}

Ringkasan

Infiltrasi leptomeningeal dari keganasan hematologi merupakan salah satu komplikasi yang mempunyai implikasi penting dalam tatalaksana dan prognosis. Analisa cairan serebrospinal untuk mendeteksi infiltrasi leptomeningeal dari keganasan hematologi saat ini masih mengandalkan pemeriksaan sitomorfologi. Pemeriksaan ini dianggap baku emas karena memiliki spesifisitas yang sangat tinggi. Namun demikian sensitivitasnya rendah.

Pemeriksaan flow cytometry merupakan pemeriksaan yang sensitif dan spesifik. Dalam dekade terakhir, berbagai penelitian melaporkan aplikasi flow cytometry multiparameter pada deteksi infiltrasi leptomeningeal dari keganasan hematologi memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang baik, dengan jumlah sample yang sedikit dan selularitas yang rendah.

Namun demikian, hingga saat ini belum ada konsensus universal mengenai panel antibodi monoklonal, jumlah sel minimal, dan kriteria diagnostik untuk pemeriksaan flow cytometry pada cairan serebrospinal.

Daftar Pustaka

1. Crespo-Solis E, Lopez-Karpovitch X, Higuera J, Vega-Ramos B. Diagnosis of acute leukemia in cerebrospinal fluid (CSF-Leukemia). *Curr Oncol Rep* 2012;14:369-78.
2. de Graaf MT, de Jongste AHC, Kraan J, Boonstra JG, Sillevius-Smitt PAE, Gratama, JW. Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry* 2011;80B:271-81.
3. Craig FE, Ohori NP, Gorril TS, Swerdlow SH. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Am J Clin Pathol* 2011;135:22-34.
4. Subira D, Castanon S, Aceituno E, Hernandez J, Jimenez-Garofano C, Jimenez A, et al. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid sample and its usefulness in routine clinical practice. *Am J Clin Pathol* 2002;117:952-958
5. Ahluwalia MS, Wallace PK, Peereboom DM. Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis. *Cancer* 2012 Apr 1;118(7):1747-53.
6. Weston CL, Glantz MJ, Connor JR. Detection of cancer cells in the cerebrospinal fluid: current methods and future directions. *Fluids and Barriers of the CNS* 2011, 8:14