

Diagnosis imunologik karsinoma nasofaring (KNF) dengan metode imunoperoxidase (IPA) menggunakan IgA anti-VCA-EBV

Indrayani Purba, Budi Muljono, R. Soeharjanto

Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada/
Instalasi Patologi Klinik, RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta

ABSTRACT

Indrayani Purba, Budi Muljono, R. Soeharjanto - *Immunological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) by immunoperoxidase assay (IPA) method using anti-VCA-EBV IgA.*

Nasopharyngeal Carcinomas (NPC) are the most frequent malignancy cases found at Ear, Nose and Throat (ENT) Department. Patients are commonly admitted in a severe condition. The success of therapy depends on the early detection of the disease. The most frequently NPC is WHO III type. WHO II and III types have close relationship to EBV. One of the methods to detect an early stage of the disease is by sero-immunology examination for anti VCA-EBV-IgA (VCA-IgA) using IPA method. The results of this VCA-IgA examination in this study were compared to the clinical examinations of NPC and biopsies to observe an analytical performance in terms of reproducibility, diagnostic performance and comparison test (significance and correlation tests). The VCA-IgA examination has been performed at the Department of Clinical Pathology, Dr. Sardjito General Hospital on 30 patients with clinical examination of NPC confirmed by biopsy, 30 normal subjects, 10 suspected KP patients, and 10 patients with positive ASTO. The results of this examination indicated that the reproducibility of VCA-IgA examination by IPA method is very good (Kappa = 81%). For diagnostic performance, a high sensitivity result is obtained (96%). There is no significant difference between the result of VCA-IgA examination with IPA method and NPC with clinical examination & biopsy ($p > 0,05$). It can be concluded that IgA anti VCA-EBV examination IPA method is useful in the early NPC diagnosis.

Key Word : nasopharyngeal carcinoma - IgA anti VCA-EBV - immunoperoxidase assay - analytic & diagnostic performance - reproducibility

ABSTRAK

Indrayani Purba, Budi Muljono, R. Soeharjanto - *Diagnosis imunologik karsinoma nasofaring (KNF) dengan pemeriksaan IgA anti VCA-EBV metode IPA*

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan kasus terbanyak di Unit Telinga, Hidung dan Tenggorok. Biasanya pasien datang sudah pada stadium lanjut. Keberhasilan terapi tergantung dari penemuan dini penyakit. KNF yang paling banyak ditemukan adalah tipe WHO III. Tipe WHO yang sangat erat hubungannya dengan EBV adalah tipe WHO II dan III. Salah satu cara untuk menemukan penyakit pada stadium dini adalah dengan pemeriksaan serologi-imunologi yaitu IgA anti VCA-EBV (IgA-VCA) metode IPA. Hasil pemeriksaan IgA-VCA ini dibandingkan dengan hasil pemeriksaan klinis KNF dan biopsi untuk melihat penampilan analitik dalam hal reproduksibilitas, penampilan diagnostik dan uji perbandingan (uji kemaknaan dan korelasi). Telah dilakukan pemeriksaan IgA-VCA terhadap 30 orang dengan pemeriksaan klinis KNF dan biopsi, 30 orang normal, 10 orang suspek KP dan 10 orang dengan ASTO positif, di Instalasi Patologi Klinik RSUP Dr. Sardjito. Untuk penampilan analitik dalam hal reproduksibilitas dianalisis dengan uji statistik Kappa (K) dan deskripsi orang sakit dengan *geometric mean titer* (GMT). Penampilan diagnostik dianalisis dengan *Chi* kuadrat menggunakan tes *Fisher exact*. Korelasi antara hasil pemeriksaan IgA-VCA dengan pemeriksaan klinis KNF dan biopsi dengan indeks phi

($r\varnothing$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa antara hasil pemeriksaan IgA-VCA dengan pemeriksaan klinis KNF dan biopsi mempunyai penampilan analitik yang sangat baik ($K=81\%$). Deskripsi orang sakit, makin tinggi stadium makin tinggi GMT. Untuk penampilan diagnostik didapatkan hasil sensitivitas yang tinggi (96%). Tidak terdapat perbedaan hasil pemeriksaan IgA-VCA metode IPA dengan pemeriksaan klinis KNF dan terdapat biopsi ($p > 0,05$), dan korelasi positif ($r\varnothing = 0,46$). Pemeriksaan IgA anti VCA-EBV metode IPA berperan penting dalam diagnosis dini KNF.

(B.I.Ked. Vol. 29, No. 2:69-74, Juni 1997)

PENGANTAR

Di Indonesia karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan di daerah kepala dan leher yang paling sering ditemukan.¹ Di RSUP Dr. Sardjito kasus KNF setiap tahun meningkat, yaitu 48 orang pada tahun 1992, 58 orang pada tahun 1993, dan 63 orang pada tahun 1994.² Periode puncak umumnya terjadi pada dekade ke 4 dan 5. Perbandingan laki-laki dan wanita (2-3):1.³ Etiologinya adalah multifaktorial yaitu faktor genetik, faktor lingkungan dan infeksi virus Epstein Barr (EBV). Gejala klinis KNF tidak khas mirip rinitis atau sinusitis sehingga sering diabaikan dan KNF merupakan tumor yang sering salah di diagnosis.⁴ Secara klinis diagnosis sulit karena letak nasofaring yang tersembunyi, tumor biasanya kecil dan berwarna sama dengan mukosa sekitar, tumbuh endofitik, dan adanya *occult primary* (pembesaran kelenjar leher, destruksi dasar tengkorak, kelumpuhan saraf otak tanpa ditemukan lesi primer di nasofaring). Tidak jarang dijumpai hasil biopsi yang negatif walaupun dilakukan berulang kali di daerah yang dicurigai. Menurut *World Health Organization* (WHO), secara histopatologis KNF dibagi 3 tipe. Tipe I: karsinoma sel skuamosa dengan keratinisasi; Tipe II: karsinoma sel skuamosa tanpa keratinisasi dan Tipe III: karsinoma tanpa diferensiasi.⁵ Umumnya penderita datang sudah dalam stadium lanjut sehingga kemungkinan untuk sembuh sangat minimal.^{6,7} Perjalanan KNF sangat cepat, begitu muncul gejala pertama atau bahkan tanpa gejala sama sekali kasus telah berkembang menjadi stadium lanjut.⁸ Untuk menghindari ini perlu dilaksanakan upaya ke arah penemuan dini KNF.

Dibuktikan bahwa EBV sebagai etiologi KNF telah membuka jalan ke arah upaya diagnosis dini dengan pemeriksaan serologi-imunologi yaitu IgA anti viral capsid antigen EBV (IgA-VCA). Antibodi IgA diproduksi secara lokal dan ber-

peran dalam imunologi mukosal. Sel plasma yang ada di sekitar jaringan sel epitelial tumor mungkin sebagai sumber IgA.⁹ Antigen EBV yang dipakai adalah virus capsid antigen (VCA) yang merupakan virus antigen yang aktif, karena kapsid diperlukan dalam kelangsungan hidup virion. KNF Tipe WHO II dan III sangat erat hubungannya dengan infeksi EBV dan ditemukan titer IgA-VCA yang meninggi pada penderita KNF.¹⁰ Kasus yang paling banyak ditemukan adalah tipe III. Sastrowijoto *et al.*² mendapatkan hasil tipe III (89,41%), II (2,94%), dan I (7,65%).

Pada penelitian ini diperiksa adanya antibodi IgA dalam serum penderita KNF dengan metode pemeriksaan *immunoperoksidase assay* (IPA). Metode ini sederhana dan mudah dikerjakan, dapat dipercaya, cepat dan murah. Korelasi positif dengan IFA ($r = 0,94$) dan hanya dengan mikroskop cahaya biasa.^{11,12}

Penelitian ini bertujuan untuk menguji bagaimana penampilan analitik dalam hal reproduktibilitas, penampilan diagnostik, uji perbandingan IgA-VCA dengan metode IPA serta pemeriksaan klinis dan biopsi sebagai baku emas.

BAHAN DAN CARA

Penelitian tes diagnostik ini dilakukan dengan pengamatan sekali (*cross sectional*) terhadap penderita suspek KNF di unit rawat jalan Staf Medik Fungsional (SMF) Telinga Hidung Tenggorok (THT) RSUP Dr. Sardjito, antara bulan Agustus sampai dengan Desember 1996. Subyek penelitian terdiri dari kelompok penderita suspek KNF yang dilakukan biopsi. Kelompok kontrol adalah orang sehat (tidak merokok, tidak faringitis). Karena di Indonesia prevalensi penyakit infeksi sangat tinggi, perlu dipikirkan faktor-faktor yang mungkin mengganggu dalam hal pemeriksaan, seperti Koch pulmonum (KP) dan anti Streptolisin O (ASTO).

Bahan pereaksi: sumur slide mengandung EBV/VCA, kontrol positif dan negatif, *HRP Conjugated anti human IgA*, substrat, *medium mounting*, *IgG/Rf stripping solution*, reagen strip stop, konsentrat *EBV-IgA diluent*, konsentrat *IPAzime buffer*, dan akuabides.

Alat penelitian: Kaca penutup, rak tabung, mikro pipet, inkubator 37°C, refrigerator 4, *centrifuge* 4, mikroskop cahaya.

Cara pemeriksaan IgA-VCA metode IPA: 1) serum dibersihkan dari IgG-VCA dan IgA Rf dengan *IgG/Rf stripping solution*, inkubasi 30 menit suhu 0 - 4°C kemudian sentrifus; 2) Supernatan dimasukkan ke dalam sumur slide yang mengandung antigen, inkubasi 60 menit suhu 37°C, cuci; 3) Tambahkan *HRP conjugate anti-human IgA*, inkubasi 45 menit suhu 37°C, cuci; 4) Tambahkan substrat, inkubasi 10 menit pada suhu kamar, cuci; 5) Tambahkan *mounting medium* ditutup dengan kaca penutup dilihat dengan mikroskop. Reaksi positif adalah adanya presipitasi warna biru gelap di bagian dalam sel-sel terinfeksi 25% dari seluruh populasi sel. Interpretasi hasil positif: jika titer 1/32 positif, 1/64 positif dan titer 1/32 positif, 1/64 border line (±). Interpretasi negatif: jika titer 1/32 positif, 1/64 negatif dan 1/32 negatif dan 1/64 negatif.

Untuk menguji penampilan analitik pemeriksaan IgA-VCA dalam hal reproduibilitas dilakukan analisis dengan uji statistik Kappa, deskripsi titer penderita dengan *Geometric Mean Titer* (GMT) dengan rumus: GMT =

$$\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n X_i} \quad \frac{n}{\pi} = X_1 \times X_2 \times X_3$$

Uji perbandingan kemaknaan dengan *Chi kuadrat* menggunakan tes *Fisher exact* dan korelasi dengan indeks phi ($r\phi$).

HASIL

Selama 5 bulan penelitian didapatkan 30 penderita suspek KNF. Pada pemeriksaan histopatologis 28 penderita positif KNF dan pada pemeriksaan IgA-VCA 28 penderita positif. Kasus terbanyak umur 46 - 55 tahun (43,3%). Perbandingan laki-laki dan wanita 2,75 : 1 (TABEL 1).

Distribusi menurut umur dan jenis kelamin

TABEL 1. - Distribusi penderita KNF menurut umur dan jenis kelamin

Kelamin Umur	Laki-laki		Wanita		Total	
	Σ	%	Σ	%	Σ	%
16 - 25	2	6,7	0	0	2	6,7
26 - 35	3	10,0	2	6,7	5	16,7
36 - 45	1	3,3	1	3,3	2	6,6
46 - 55	10	33,3	3	10	13	43,3
56 - 65	4	13,3	2	6,7	6	20,0
66 - 70	2	6,7	0	0	2	6,7
Jumlah	22	73,3	8	26,7	30	100

Stadium klinis penderita KNF

Umumnya penderita datang sudah dalam stadium lanjut. Penderita yang paling banyak ditemukan adalah stadium III (56,7%) (TABEL 2).

TABEL 2. - Stadium klinis penderita KNF

Stadium	Σ	%
I	0	0
II	4	13,3
III	17	56,7
IV	9	30
Jumlah	30	100

Gambaran histopatologis KNF

Gambaran histopatologis penderita positif KNF adalah jenis karsinoma tanpa diferensiasi atau tipe III (100%).

Hasil pemeriksaan kelompok kontrol

Hasil pemeriksaan IgA-VCA orang normal, suspek KP dan ASTO positif sebagai kontrol dapat dilihat pada TABEL 3.

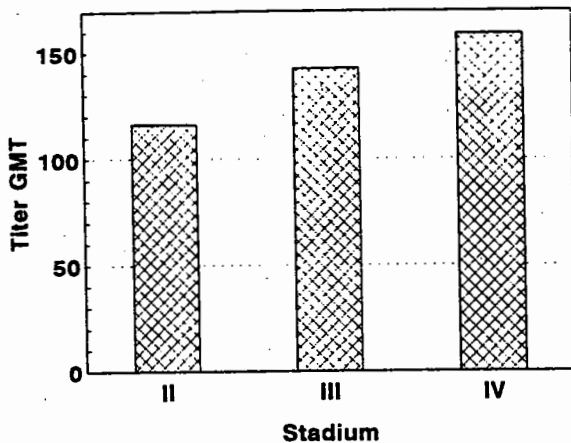
TABEL 3. - Hasil pemeriksaan IgA-VCA, orang normal, suspek KP dan ASTO positif

IgA-VCA	Orang normal	Suspek KP	ASTO (+)	Jumlah
+	1	0	5	6
-	29	10	5	44
Jumlah	30	10	10	50

Deskripsi titer penderita

Deskripsi titer IgA-VCA penderita dilihat dengan GMT. Persentase peningkatan GMT kadar serum IgA-VCA penderita KNF berdasarkan

stadium, dapat dilihat pada GAMBAR 1.



GAMBAR 1. - Histogram penderita KNF IgA-VCA stadium II, III dan IV

Penampilan analitik dengan reproduibilitas

Penampilan analitik dengan reproduibilitas ditentukan derajat kepositifan dalam pemeriksaan IgA-VCA yaitu (+) bila sel terinfeksi berwarna biru muda, (++) bila sel terinfeksi berwarna biru gelap, (+++) bila sel terinfeksi berwarna biru sangat gelap. Kesepakatan dari hasil pemeriksaan antara 2 orang pemeriksa dianalisis dengan uji Kappa ($K = 81\%$).

Sensitivitas dan spesifisitas, nilai ramal positif (NRP) dan nilai ramal negatif (NRN)

TABEL 4. - Pemeriksaan IgA-VCA pada penderita KNF dan bukan penderita KNF

		KNF (+)	KNF (-)
IgA-VCA	+	27	7
	-	1	45

Sensitivitas dan spesifisitas hasil uji berturut-turut adalah 96 dan 87%, sedangkan nilai ramal positif dan nilai ramal negatifnya berturut-turut 79 dan 97% (TABEL 4).

PEMBAHASAN

Selama 5 bulan penelitian didapatkan 28 penderita positif KNF berdasarkan pemeriksaan histopatologis. Kasus terbanyak dijumpai pada kelompok umur antara 46 - 55 tahun yaitu 43,3%

(TABEL 1). Hasil ini sesuai dengan peneliti terdahulu¹, bahwa kasus KNF mencapai puncak pada umur dekade 4 dan 5. Perbandingan laki-laki dan wanita 2,75 : 1. Penelitian sebelumnya menemukan perbandingan laki-laki dan wanita (2-3): 1.³ Umumnya penderita datang sudah dalam stadium lanjut yaitu stadium III dan IV.¹ Pada penelitian ini penderita yang paling banyak adalah stadium III. Secara histopatologis 28 penderita positif KNF adalah tipe III (100%). Penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa berdasarkan gambaran histopatologi yang paling banyak ditemukan adalah tipe III.² Menurut pembagian WHO KNF yang berhubungan erat dengan infeksi EBV adalah tipe II dan III dan didapatkan titer antibodi IgA-VCA yang meninggi. Juga disebutkan bahwa pada tipe ini tumor kecil, submukosa dan sulit dideteksi.⁴ Oleh karena itu pemeriksaan serologi-imunologi IgA-VCA dapat membantu diagnosis KNF.

Di antara kelompok kontrol yang meliputi 10 penderita dengan KED meningkat (suspek KP), 10 penderita dengan ASTO positif dan 30 individu klinis sehat hasil positif palsu terutama terjadi pada individu dengan ASTO positif (50%); 3% individu sehat yang ternyata setelah dikonfirmasi dengan pemeriksaan ASTO memberi hasil positif (200 IU/ml). Hal ini dapat diterangkan bahwa kemungkinan individu dengan ASTO positif ini memiliki kondisi poliklonal gamopati di dalam serumnya, sebagai hasil kumulasi berbagai protein fase akut yang terbentuk selama aktivasi penyakit atau selama fase eksaserbasi akut. IgG yang sering memberi hasil positif palsu terutama pada ELISA,¹³ di sini hasil-hasil tersebut tidak dapat dikonfirmasi. Dari 10 penderita dengan IgG meningkat (suspek KP dengan KED meningkat) tidak satupun memberi hasil positif palsu. Untuk ini ada beberapa kemungkinan, pertama IgG memang tidak bereaksi silang dengan IgA-VCA (sudah dibersihkan oleh *IgG stripping solution*); kedua, sampel dengan IgG meningkat terlalu sedikit (10 orang) atau KED yang meningkat pada individu-individu suspek KP tidak dikoreksikan IgG.

Pada reproduibilitas pemeriksaan IgA-VCA metode IPA (uji Kappa) didapatkan hasil 81%. Menurut Neel *et al.*¹⁴ nilai $K > 0,75$ adalah sangat baik (kesepakatan interpretasi hasil pada sampel berdasarkan derajat kepositifan oleh 2

orang pemeriksa hasilnya sesuai yaitu positif pada pemeriksa I juga positif pada pemeriksa II).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa makin tinggi stadium KNF, makin tinggi pula nilai GMT nya. Walaupun pada stadium IV bisa didapatkan titer IgA-VCA negatif, ini mungkin karena pada stadium IV dapat terjadi status imunologi penderita mengalami *bankruptcy*.¹⁵ Untuk membuktikan ini perlu pemeriksaan angka leukosit (AL) dan globulin.¹⁶ Pada penampilan diagnostik didapatkan sensitivitas 96% dan spesifisitas 87%. Nilai spesifisitas hasil uji ini (87%) lebih rendah dari pada penelitian sebelumnya, yaitu 97%.¹⁷ Penampilan operasional, nilai ramal positif (NRP) 79% dan nilai ramal negatif (NRN) 97%.

Hasil uji kemaknaan antara IgA-VCA metode IPA dengan pemeriksaan klinis dan biopsi secara statistik tidak berbeda bermakna. Dengan demikian untuk mendeteksi penderita yang diduga KNF secara klinis dapat digunakan pemeriksaan IgA-VCA metode IPA. Uji korelasi didapatkan hasil indeks *phi* 0,46, hasil ini berkorelasi positif.¹⁸ Seperti disebutkan di atas bahwa antara pemeriksaan IgA-VCA dengan biopsi di dalam mendiagnosis KNF memiliki kesamaan yang sangat tinggi (96%) artinya positif pada IgA-VCA juga positif secara biopsi. Sementara hasil uji statistik menunjukkan korelasi dalam level sedang. Hal ini mungkin disebabkan karena terlalu sedikitnya sampel dengan biopsi negatif (1 orang).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kasus karsinoma nasofaring yang paling banyak ditemukan adalah tipe III dan pasien datang kebanyakan sudah stadium lanjut. Pada penampilan analitik dengan reproduibilitas didapatkan hasil Kappa yang sangat baik (81%). Deskripsi titer IgA-VCA penderita menunjukkan bahwa makin tinggi stadium KNF makin tinggi nilai GMT. Pada penampilan diagnostik didapatkan nilai sensitivitas yang tinggi (96%) dan uji kemaknaan statistik antara pemeriksaan IgA-VCA metode IPA dengan biopsi tidak menunjukkan perbedaan ($p > 0,05$). Kesesuaian diagnosis pemeriksaan IgA-VCA dengan biopsi adalah 96% dengan korelasi positif ($r = 0,46$). Untuk dipakai sebagai pemeriksaan penyaring perlu dilakukan penelitian penampilan operasional IgA-

VCA pada populasi terpilih dan diusahakan dengan jumlah sampel yang memenuhi persyaratan epidemiologi.

KEPUSTAKAAN

1. Soetjipto D, Iskandar HN, Munir HM. Karsinoma nasofaring dalam tumor telinga hidung diagnosis dan penatalaksanaan. Jakarta: Fakultas Kedokteran UI. 1989: 71-85.
2. Sastrowijoto S, Losin K, Setiamika M. Tinjauan retrospektif karsinoma nasofaring di RSUP Dr Sardjito Selama tiga tahun (1992-1994) Kumpulan Naskah Konas XI Perhati 4-7 Oktober Yogyakarta: Perhati, 1995:1221-27.
3. Ablashi DV. Epstein Barr virus markers in the diagnosis and prognosis of nasopharyngeal carcinoma. Cancer in Asia and Pacific Progress. In: Tjokronegoro A, Himawan S, Jusuf A, editors. Clinical, Epidemiological and Biological Aspects of Cancer, Vol I. Jakarta: Yayasan Kanker Indonesia 1988: 471- 81.
4. Neel HB, Taylor WF. Application of Epstein Barr virus serologic testing and a new staging system to North American patients with nasopharyngeal carcinoma In: Head and Neck Cancer, Vol 2. Toronto: Decker Inc. 1990: 153-55.
5. Shanmugaratnam K, Sobin LH. Histologic typing of upper respiratory tract tumours In: International Histological Classification of Tumours no 19. World Health Organization, Geneva. 1978.
6. Soetjipto D, Syafril A: Pemeriksaan serologi karsinoma nasofaring. ORL Indosiana. 1986; 17(4):181-87.
7. Cakra IGM. Kanker nasopharinx. Simposium Oncology Yogyakarta: 1991.
8. Soetjipto D. Karsinoma nasofaring. Mungkinkah Melakukan Diagnosis Dini ? Kumpulan Naskah Ilmiah Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhati 28-30 Oktober Bukit Tinggi. Perhati, 1993:284-97.
9. Greenwood BM, Whittle H.C. Immunological aspect of some common tropical tumours In: Immunology of medicine in the tropics. Churchill Livingstone. 1986: 211-29.
10. Weiland LH. Clinical pathology of nasopharyngeal carcinoma in current status In: Prasad U, Ablashi DV, Levine PH and Pearson GR, editors. Nasopharyngeal carcinoma current concepts, Kuala Lumpur: University of Malaysia. 1983:35-39.
11. Cevenini R, Donati M, Rumpianesi F, Moroni A., Paulucci P. An immunoperoxidase assay for detection of spesific IgA antibody in Epstein Barr virus infection. J Clin Pathol. 1984; (37)440-43.
12. Anonim. Kit IPA zyme EBV/VCA IgA. Savyon Diagnostic. 1989:2-16.
13. Suwarso. Positif palsu ELISA Anti HIV: Ciri, Penyebab dan Tes Konfirmasi. BIKed. 1995; 27:183-90.
14. Fleiss JL. The measurement of interrater agreement statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley & Sons. 1981:212-36.
15. Neel HB, & Taylor WF. Clinical presentation and diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: Current Status.

- In: Prasad U, Ablashi DV, Levine PH, & Pearson GR, editors. Nasopharyngeal carcinoma current concepts, Kuala Lumpur: University of Malaysia. 1983:1-9.
16. Oppenheim JJ, Francis W, Ruscetti, Faltynek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG. editors. Basic and clinical immunology, 8th ed. San Fransisco: Prentice-Hall International Inc. 1993: 105-10.
 17. Chew CT. Early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Ann Acad Med.* 1990 : 270-74.
 18. Hadi S. Metodologi Research. Jilid III. edisi VII. Yogyakarta: Yayasan Penerbitan Fakultas Psikologi. Universitas Gadjah Mada. 1982:271-90.