

INDONESIAN JOURNAL OF
**Clinical Pathology and
Medical Laboratory**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 19	No. 3	Hal. 141-219	Surabaya Juli 2013	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	--------------	-----------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terakreditasi No: 66b/DIKTI/KEP/2011, Tanggal 9 September 2011

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

Caspase-3 Aktif di Leukemia Mielositik Akut (LMA) dan Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) (<i>Active Caspase-3 in Acute Myeloid Leukaemia (AML) and Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)</i>) Agus Setiawan, Indarini, Lyana Setiawan, Siti Boedina Kresno, Nugroho Prayogo, Arini Setiawati	141-145
Modifikasi Prinsip Pemeriksaan β -D-glucan untuk Mendeteksi <i>Candida albicans</i> dalam Serum (<i>Principle Modification of β-Glucan Detection from Candida albicans in Serum</i>) Ruben Dharmawan, Darukutni, Sri Haryati, Murkati, Yulia Sari, Afiono Agung Prasetyo	146-149
Apoptosis Index between Females and Males in Regular Hemodialysis (<i>Indeks Apoptosis antara Perempuan dan Laki-Laki pada Hemodialisis Reguler</i>) Djoko Santoso	150-155
Kekurangan Zat Besi di Perempuan Hamil Menggunakan Hemoglobin Retikulosit (RET-HE) (<i>Iron deficiency in pregnant women by haemoglobin reticulocyte (RET-He)</i>) Petrian Primastanti, Ninik Sukartini	156-160
Kadar CTX Perempuan Osteoporosis Lebih Tinggi daripada Perempuan Normal dan Osteopenia (<i>Higher Level of CTX in Osteoporotic Women Compared to Normal and Osteopenic Women</i>) Ira Puspitawati, Windarwati, Usi Sukorini, Erlina, Pratiwi Herowati, Arlan Prabowo, Riswan Hadi Kusuma	161-166
Cystatin C, HbA1c, dan Rasio Albumin Kreatinin (<i>Cystatin C, HbA1c and Albumin Creatinine Ratio</i>) Juliani Dewi	167-173
Lactate Dehydrogenase (LDH) Selama Penyimpanan (<i>Lactate Dehydrogenase (LDH) During Storage</i>) Teguh Triyono, Umi Solekhah Intansari, Caesar Haryo Bimoseno	174-177
Limfosit T CD4 ⁺ sebagai Peramal Perjalanan Penyakit Pasien yang Mengalami Sepsis (<i>CD4⁺ T Lymphocyte as a Prognosis Predictor in Sepsis Patients</i>) Lestari Ekowati, Aryati, Hardiono	178-184
Angiotensin II di Perbenihan Adiposit yang Dipajan Glukosa Tinggi (<i>Angiotensin II on Adipocytes Culture Exposed With High Glucose</i>) Novi Khila Firani	185-189
Pengukuran Jumlah Limfosit CD4 Metode <i>Panleucogating</i> pada Pasien Terinfeksi <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (HIV) (<i>the Panleucogating Method For Lymphocyte CD4 Counting in HIV Patients</i>) Umi S. Intansari, Budi Mulyono, Usi Sukorini	190-196
Komplemen Serum C3c dan Limfosit T-CD4 ⁺ Darah (<i>C3c Serum Complement and Blood T-CD4⁺ Lymphocyte</i>) I. Komang Parwata, Endang Retnowati, Betty Agustina Tambunan	197-203

TELAAH PUSTAKA

Hemostasis Berlandaskan Sel Hidup (*In Vivo*)
(*Cell Based Hemostatis – In Vivo*)

Liong Boy Kurniawan, Mansyur Arif 204-210

LAPORAN KASUS

Neonatal Acute Myeloid Leukaemia
(*Leukemia Mielosistik Akut pada Neonatus*)

Luh Putu Rihayani Budi, Ketut Ariawati, Sianny Herawati 211-217

INFOMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU 218-219

Ucapan terima kasih kepada penyunting Vol. 19 No. 3 Juli 2013

Krisnowati, Maimun Z. Arthamin, Rahayuningsih Dharma, Purwanto AP, Ida Parwati, AAG Sudewa,
Endang Retnowati, Jusak Nugraha, Noormartany, M. Yolanda Probahoosodo

Dewan Redaksi Majalah IJCP

PENGUKURAN JUMLAH LIMFOSIT CD4 METODE PANLEUCOGATING PADA PASIEN TERINFEKSI HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV)

(the Panleucogating Method For Lymphocyte CD4 Counting in HIV Patients)

Umi S. Intansari, Budi Mulyono, Usi Sukorini

ABSTRACT

The standard method for absolute lymphocyte CD4 count is by the use of flow cytometric analysis, but due to the high costly matter, a simpler method and less costly fee of PanLeucogating dual platform is needed. The aim of this study is to know how to replace the single platform by PanLeucogating dual platform by determining the agreement between both methods and to test the proportion of patient who have CD4 <200 cell/ul measured by PanLeucogating and single platform method. A cross sectional study was carried out in the Departement of Clinical Pathology Faculty of Medicine Gadjah Mada University Yogyakarta. The inclusion criteria of the study are HIV/AIDS patients who their CD4 were measured. Absolute count of CD4 was using FACS Calibur measured with both PanLeucogating and single platform method. The bias, correlation, regression and limit of agreement between both methods were analyzed using Bland Altman analysis to decide whether the two methods are interchangeable. The result of the study revealed an excellent correlation between the two methods ($r=0.996$; $y=-0.906 + 0.0.987$). Bland Altman analysis revealed bias=5 cells/uL; standard deviation=18.7 and Limit of agreement (LOA)=-31.6 – 40.75. The Mean Percentage Difference (MPD)=2%; dan%LOA=-7.96 – 12.5%. PanLeucogating method has a good agreement with the single platform method and can be used interchangeable. There was no difference of the proportion of patient who has CD4 <200 cell/ul measured by Panleucogating method and single platform.

Key words: Lymphocyte CD4 count, PanLeucogating, HIV infection

ABSTRAK

Metode baku pengukuran jumlah limfosit CD4 adalah metode *single platform* menggunakan *flow cytometer*. Namun, karena tingginya biaya, diperlukan metode pilihan lain dengan *PanLeucogating* yang cara kerjanya sederhana dan berbiaya lebih murah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kesesuaian metode *PanLeucogating* dengan *single platform* dan menguji perbedaan proporsi pasien dengan jumlah limfosit CD4<200 sel/uL yang diperiksa dengan kedua metode. Penelitian ini menggunakan rancangan potong lintang yang dilakukan di Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan RSUP Dr. Sardjito. Patokan kesertaan subjek adalah pasien terinfeksi HIV yang memeriksakan jumlah limfosit CD4. Jumlah limfosit CD4 diukur dengan metode *PanLeucogating* dan *single platform* menggunakan *FACS Calibur*. Analisis *Bland Altman* dilakukan untuk mengetahui apakah kedua cara tersebut dapat saling menggantikan. Metode *PanLeucogating* bernasab sangat baik dengan *single platform* ($r=0,996$; $y=-0,906 + 0,0,987$). Analisis *Bland Altman* menghasilkan bias=5; simpang baku=18,7; MPD=2; *Limit of agreement* (LOA)=-31,6 – 40,75; dan%LOA=-7,96-12,5%. Metode *PanLeucogating* berkesesuaian baik dengan *single platform* dalam pengukuran jumlah absolut limfosit CD4. Metode *PanLeucogating* juga tidak mempengaruhi perbandingan pasien yang diobati berdasarkan jumlah limfosit absolut<200 sel/ μ L.

Kata kunci: Jumlah limfosit CD4, *PanLeucogating*, infeksi HIV

PENDAHULUAN

Penentuan jumlah limfosit CD4 secara absolut maupun relatif merupakan tolok ukur yang penting dalam memantau perjalanan penyakit dan pengobatan individu yang terinfeksi *human immunodeficiency virus* (HIV). Limfosit CD4 digunakan untuk menilai derajat kerusakan sistem imun dan kecepatan perjalanan penyakit menjadi *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), menentukan saat yang tepat untuk pencegahan infeksi oportunistik dan memantau pengobatan anti retroviral (ARV).¹

Pengobatan antiretroviral (ARV) telah memperbaiki cara mengobati pasien HIV/AIDS yang menjanjikan perlambatan atau penghentian keparahan penyakit.^{2,3} Keberadaan program WHO dan tersedianya obat ARV generik menyebabkan pengobatan ARV di negara yang sedang berkembang telah banyak dilakukan. Meskipun demikian pelayanan di laboratorium yang tersedia untuk memantau jumlah sel T CD4 masih merupakan kendala, karena biaya pemeriksaannya tinggi.^{2,4} Metode baku untuk mengukur jumlah absolut limfosit T CD4 adalah imunofenotiping dengan teknik *flow cytometri*.⁵ Pengukuran ini menggunakan sejumlah

teknik yang menggunakan pewarnaan sel tunggal atau multiwarna dan strategi *gating* yang logis. Panel antibodi monoklon yang disarankan adalah CD3, CD4 dan CD45. Penggunaan CD3 sebagai pengenalan limfosit T dan CD45 untuk yang pan leukosit disarankan oleh *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS (NIAID/DAIDS)*, yang menyatakan bahwa sel T CD4+ seharusnya dinilai sebagai sel CD3+CD4+.⁶

Terdapat dua konsep yang dipakai untuk menghitung limfosit T CD4, yaitu *single platform* (SP) atau *dual platform* (DP). Teknik *single platform* menghitung jumlah sel absolut secara langsung dengan mengenali populasi sel T CD4+ dalam volume darah tertentu (asas volumetrik) dan konsep penambahan *fluorospheres* atau *microbeads* dengan jumlah tertentu. Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa *single platform* mempunyai koefisien ragam yang lebih baik dan menjadi kandidat untuk menjadi baku emas baru dalam penilaian jumlah sel absolut. Meskipun demikian cara ini sangat mahal dan sulit untuk diterapkan di negara dengan sumber daya terbatas. Teknologi penghitungan *dual platform* terdiri dari dua peralatan yaitu *hematology analyzer* (HA) untuk mendapatkan jumlah absolut limfosit dan *flow cytometer* (FCM) untuk menentukan persentase sel T CD4 dalam populasi limfoid yang sesuai sebagai denominator umum.⁷⁻¹¹

Keterbatasan metode *dual platform* dibandingkan dengan *single platform* khususnya disebabkan oleh cara yang berbeda yang digunakan oleh alat hematologi otomatis untuk menghasilkan data jumlah limfosit absolut.¹² Masalah ini penting dalam pemeriksaan klinik, karena kesalahan dalam penghitungan limfosit sering terjadi pada sampel limfopenik yang diambil dari pasien yang terinfeksi HIV. Penundaan pemeriksaan lebih dari 6–12 jam juga mengakibatkan kesalahan dalam penghitungan leukosit dan lebih sering lagi memberikan hasil yang tidak tepat dalam penghitungan jenisnya. Keragaman analitik jumlah leukosit juga dilaporkan lebih kecil daripada jumlah limfosit.¹³ Selanjutnya, kesesuaian antara limfosit yang didefinisikan oleh hasil hematologi dan oleh *flow cytometry* mungkin tidak tepat benar, sebab bergantung sistem yang digunakan.¹⁴

Metode alternatif *dual platform PanLeucogating* (PLG) diperkenalkan oleh Glencross, *et al.*¹⁴ Penghitungan limfosit CD4 dilakukan menggunakan analisis *dual platform* dengan hanya menggunakan antibodi monoklon CD45/CD4 dan jumlah leukosit sebagai denominator umum, sehingga diharapkan dapat mengeliminasi kesalahan yang disebabkan oleh penghitungan limfosit sebagai populasi rujukan. Jumlah leukosit juga dapat diperoleh dengan menggunakan HA yang lebih sederhana. Di samping

itu, metode *PanLeucogating* hanya menggunakan dua (2) antibodi monoklon, sehingga biaya pemeriksaan absolut limfosit CD4+ dapat lebih terjangkau.

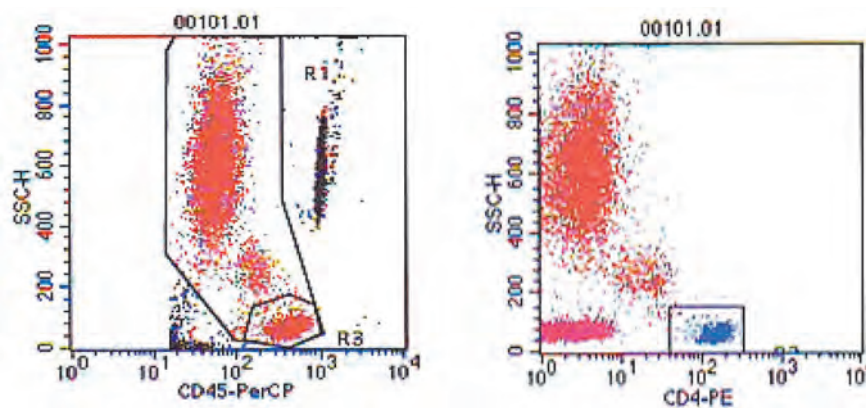
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lewat pengujian kesesuaian hasil hitungan limfosit CD4 dengan metode *PanLeucogating* menggunakan panel CD4/45 dibandingkan dengan *single platform* berpanel CD3/4/45. Kemudian mengkaji hasilnya untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan perbandingan pasien HIV yang diobati ARV sesuai nilai ambang WHO (2003) berdasarkan hasil ukuran limfosit CD4 yang diperiksa dengan metode *PanLeucogating* berpanel CD4/45 dibanding *single platform* berpanel CD3/4/45.

METODE

Kajian ini menggunakan rancangan penelitian potong lintang, dilakukan selama tiga (3) bulan, di Instalasi Patologi Klinik RSUP Dr. Sardjito dan Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran UGM. Sampel penelitian berupa 3 mL darah tepi yang diambil dari pasien infeksi HIV yang melakukan pemeriksaan absolut limfosit CD4. Patokan ketidak-sertaan adalah apabila pengambilan sampel darah sudah melebihi 24 jam dari waktu pengambilan darah.

Uji ketepatan dilakukan untuk sampel darah yang normal, pada hari yang sama (*within day*) dengan 10 kali pemeriksaan, baik dengan metode *single platform* maupun *PanLeucogating*. Ketepatan pemeriksaan jumlah leukosit dihitung mulai pemeriksaan bahan pembanding yang dilakukan mulai hari pertama ke hari berikutnya (*day to day*), selama 20 hari. Kalibrasi alat dilakukan dengan *Calibrite beads FACS Comp* untuk mengatur detektor, kompensasi fluorokrom dan kepekaan FCM.

Pemeriksaan jumlah limfosit CD4 absolut dilakukan dengan *flow cytometer FACS Calibur*, metode *dual platform PanLeucogating* menggunakan CD4 FITC/45 PerCP dan *single platform* dengan *Trucount tube* menggunakan CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP. Pemeriksaan dilakukan dengan HA untuk mendapatkan hasil jumlah leukosit kemudian dijadikan denominator metode *PanLeucogating*. Sepuluh μL panel antibodi monoklon CD3/4/45 dan 50 μL darah lengkap dimasukkan ke dalam tabung *Trucount* yang mengandung *beads* dengan jumlah yang diketahui. Tabung diinkubasi di ruang gelap selama 15 menit pada suhu kamar, kemudian ditambahkan 450 μL *FACS lysing solution*, dan digoyang dengan alat *vortex*. Setelah inkubasi 15 menit lalu dianalisis dengan *flow cytometer*. Dengan metode *single platform* sebagai *state of the art*, pemeriksaan limfosit CD4 dilakukan dengan program *Multiset*. Dalam metode *dual platform PanLeucogating*, persiapan sampel dilakukan dengan



Gambar 1. Pengukuran limfosit CD4 metode *PanLeucogating*

cara seperti *single platform*, tetapi yang digunakan adalah panel CD4/45. Tatalangkah pemeriksaan dengan *flow cytometer* seperti yang telah dijelaskan oleh Glencross dkk.¹⁵ Teknik ini menggunakan jumlah leukosit sebagai denominator, yang dikenali dan dikeluarkan-masukkan berdasarkan ciri SSC dan CD45+. dan *CELLQUEST software*. Leukosit CD45+ tersebut ditampilkan dalam histogram kedua, dengan sumbu CD4 vs SSC untuk menentukan persentase limfosit CD4+ dalam populasi leukosit /CD45+. Jumlah sel T CD4 absolut dihitung secara manual dengan cara mengalikan persentase sel CD4+ dengan jumlah leukosit dari HA (lihat gambar 1).

Hasil telitian dianalisis dengan uji kenasaban dan regresi linear serta statistik *Bland-Altman* untuk menguji kesesuaian hasil hitungan limfosit CD4 absolut antara kedua metode.¹⁵ Uji *chi square* digunakan untuk menguji perbedaan perbandingan pasien HIV yang diobati antaranya dengan pengukuran jumlah CD4 absolut dengan metode *PanLeucogating* panel CD4/45 dan *single platform* panel CD3/4/45.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penampilan Analitik Pengukuran CD4

Penampilan analitik dalam hal ini diwakili oleh uji ketepatan. Uji ketepatan pemeriksaan jumlah limfosit CD4 absolut dilakukan dalam hari yang sama untuk sampel darah orang normal dengan 10 kali pemeriksaan jumlah limfosit CD4 absolut dengan metode *single platform* dan *PanLeucogating*. Koefisien ragam (KV) metode *single platform* sedikit lebih kecil daripada yang *PanLeucogating*, yaitu masing-masing sebesar 2,1 dan 2,4%. Uji ketepatan terhadap jumlah leukosit dari HA dilakukan menggunakan bahan pembanding kadar normal, dilakukan pada hari yang berurutan selama 20 hari. Besarnya jumlah leukosit bahan pembanding masuk dalam rentang nilai sasaran dan koefisien ragam dari jumlah leukosit sebesar

1,55%. Besarnya nilai KV jumlah leukosit tersebut masuk dalam batas penetapan hematologik, yaitu sebesar 5%.

Dalam penelitian ini diperoleh 65 sampel yang berasal dari pasien dewasa yang terinfeksi HIV, yaitu laki-laki sebanyak 46 (70,8%) dan perempuan 19 (29,2%). Usia pasien berkisar antara 18 sampai 57 tahun (rerata 30 tahun). Pasien berasal dari RSUP Dr. Sardjito, RS. Bethesda, RS. Panti Rapih dan laboratorium swasta di Yogyakarta. Hasil pemeriksaan jumlah limfosit CD4 absolut metode *single platform* berkisar dari 7 sampai 780 sel/ μ L dengan rerata 325 sel/ μ L.

Perbandingan hasil mengukur limfosit CD4 absolut, simpang baku, dan *standar error of the mean* (SEM) antara metode *single platform* dan *dual platform PanLeucogating* ditunjukkan dalam tabel 1. Tidak terdapat perbedaan rerata jumlah limfosit CD4 absolut antara metode *PanLeucogating* dan *single platform* ($p > 0,05$). Sebaran hasil kedua metode menunjukkan hal yang serupa dan tersebar secara normal.

Pasien pengidap HIV yang diteliti sebagian besar (78,5%) telah mengalami penurunan jumlah limfosit CD4 absolut (< 500 sel/ μ L) dan hanya 21,5% yang normal. Penurunan ringan sampai sedang (200–500 sel/ μ L) didapatkan di 46,2% pasien dan penurunan lanjut (≤ 200 sel/ μ L) ditemukan di 32,3%, bahkan 18,5% di antaranya mempunyai jumlah limfosit CD4 sangat rendah, kurang dari 100 sel/ μ L.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan jumlah limfosit CD4 metode *SinglePlatform* dan *PanLeucogating*

Tolok ukur	<i>Single Platform</i>	<i>PanLeucogating</i>
Jumlah sampel (n)	65	65
Nilai Terendah	7 sel/ μ L	6 sel/ μ L
Nilai Tertinggi	780 sel/ μ L	790 sel/ μ L
Rerata	325 sel/ μ L*	321 sel/ μ L*
SD	211	210,98
SEM/RGB	26,17	26,17

* $p = 0,051$

Uji Perbandingan Proporsi Pasien dengan Nilai CD4 ≤ 200 sel/ μ L antara Metode *Single Platform* dengan *PanLeucogating*

Jumlah pasien yang terinfeksi HIV dan mendapat pengobatan ARV di negara sedang berkembang meningkat sejalan dengan program WHO. *World Health Organization* menyarankan untuk memulai pengobatan ARV bagi pasien HIV stadium I, II, dan III dengan jumlah CD4 < 200 sel/ μ L.³ Dalam penelitian ini pasien dengan jumlah limfosit CD4 absolut < 200 sel/ μ L dan pemeriksaan metode *PanLeucogating* didapatkan sebanyak 21 pasien (32,3%) dan *single platform* sebanyak 20 pasien (31%). Di satu (1) pasien didapatkan perbedaan, yaitu ia yang memiliki jumlah limfosit absolut < 200 sel/ μ L dengan metode *PanLeucogating*, tetapi memiliki ≥ 200 sel/ μ L dengan yang *single platform* (lihat tabel 2). Apabila pasien diobati berdasarkan pengukuran jumlah limfosit CD4 absolut dengan metode *PanLeucogating*, maka tidak ada pasien yang tidak terobati dan hanya terdapat satu (1) orang (1,5%) yang mendapat pengobatan lebih awal. Hal ini masih dapat ditoleransi, karena dalam penanganan pasien HIV, pengobatan lebih awal adalah lebih baik daripada yang terlambat

Hasil uji *chi square* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara pasien HIV dengan jumlah limfosit CD4 absolut < 200 antara pengukuran metode *PanLeucogating* dengan *single platform*. Hal ini berarti metode pengukuran limfosit CD4 absolut *PanLeucogating* tidak akan mempengaruhi jumlah pasien yang diobati dengan nilai ambang CD4 < 200 sel/ μ L untuk permulaan pengobatan ARV.

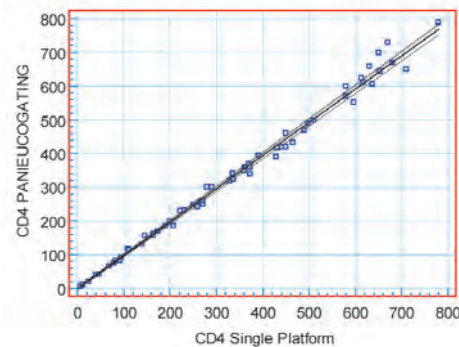
Beberapa alat dan metode telah dikembangkan untuk dapat menghasilkan pemeriksaan CD4 yang murah dan sederhana seperti *PanLeucogating* dan yang terkait volumetrik *single platform* dengan pewarnaan tunggal.^{4,16}

Analisis Regresi Linier Metode *Single Platform* dan *PanLeucogating*

Hasil uji kenasaban dalam penelitian ini menunjukkan terdapat nasab positif yang sangat baik antara metode *single platform* dengan *PanLeucogating* ($r=0,9962$ $p<0,0001$).

Tabel 2. Perbandingan jumlah pasien berdasarkan nilai ambang WHO 2004.

Jumlah limfosit CD4 (sel/uL)	<i>Single platform</i> (n)	<i>PanLeucogating</i> (n)	<i>Chi square</i>
<200	20	21	$p=0,86$
≥ 200	45	44	



Gambar 2. Kenasaban jumlah limfosit CD4 absolut metode *PanLeucogating* dengan *single platform*

Persamaan regresi antara kedua metode adalah $y = -0,906 + 0,987x$. Dari persamaan tersebut 95% *confidence interval* (CI) untuk *intercept* adalah -3,1365–1,2422 sedangkan 95% CI untuk *slope* adalah 0,9689–1,0030.

Hasil telitian ini sesuai dengan kepunyaan Glencross dkk¹⁴ yang menunjukkan bahwa metode *PanLeucogating* bernasab baik dengan *single platform bead-based* panel CD4/8/3 ($r=0,968$; dengan persamaan garis regresi $y=0,979x + 1,9$) dan dengan *single platform* terkait volumetrik menunjukkan ($r=0,934$; dengan persamaan regresi $y=0,954x + 3,4$). Kenasaban lebih rendah didapatkan antara metode *single platform* dan *dual platform lymphogating* yaitu $r=0,871$; dengan persamaan garis regresi $y=0,61x + 70,7$.

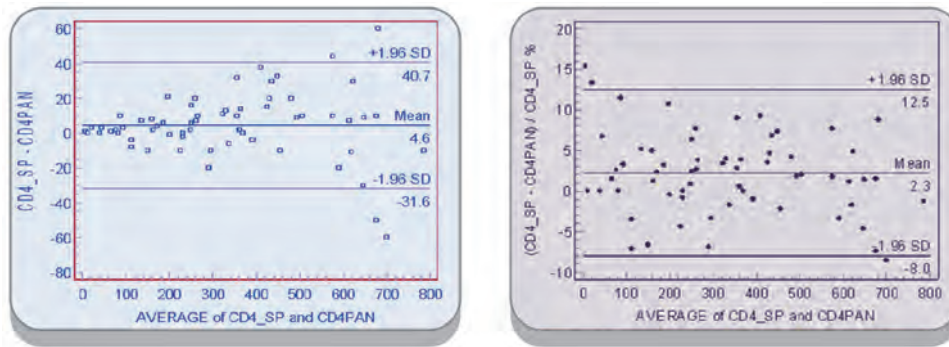
Chianese *et al.*,²⁰ membandingkan metode baku *dual platform lymphogating* dan *leucogating* di 132 pasien dengan jumlah limfosit CD4 berkisar antara 3 sampai 3277 sel/uL. Didasari telitian tersebut dapat disimpulkan adanya kesesuaian antara kedua metode dengan kenasaban $r=0,987$.

Pattanapanyasat dkk⁴ membandingkan metode *PanLeucogating* dengan *dual platform/standar panel penuh (lymphogating)* (CD3/4/45) pada 611 pasien yang terinfeksi HIV dan mendapatkan kenasaban yang sangat baik yaitu $r=0,95$ ($p=0,0001$) dengan persamaan garis regresi $y=0,9x - 3,93$.

Analisis statistik *Bland-Altman*

Metode analisis *Bland-Altman* digunakan untuk menguji kesesuaian hasil di antara kedua pemeriksaan yang disebutkan di atas. Kesesuaian dinilai dari nilai bias (*d*) yang dinyatakan oleh rerata perbedaan hasil jumlah limfosit CD4 absolut di antara kedua metode, yaitu simpang baku (*s*) dan *limit of agreement* (LOA) ($d \pm 1,96s$)

Bias jumlah limfosit CD4 absolut adalah 4,6 (≈ 5) sel/ μ L (95% CI: -0,03 – 9,13), dengan simpang baku



Gambar 3. Sebaran perbedaan hasil jumlah limfosit CD4 absolut dan Persentase perbedaan jumlah limfosit CD4 metode *PanLeucogating* dan *single platform*

18,47. Batas terendah sebesar -31,6 (95% CI: -39,5 – -23,8) dan batas tertinggi sebesar 40,75 (95%CI:32,9-48,6), sehingga LOA kedua metode adalah -31,6 – 40,75 sel/ μ L.

Bland-Altman plot juga berguna untuk menunjukkan hubungan antara besarnya perbedaan tersebut dengan tingginya jumlah limfosit CD4 absolut dan juga untuk mencari kemungkinan kesalahan sistematis.

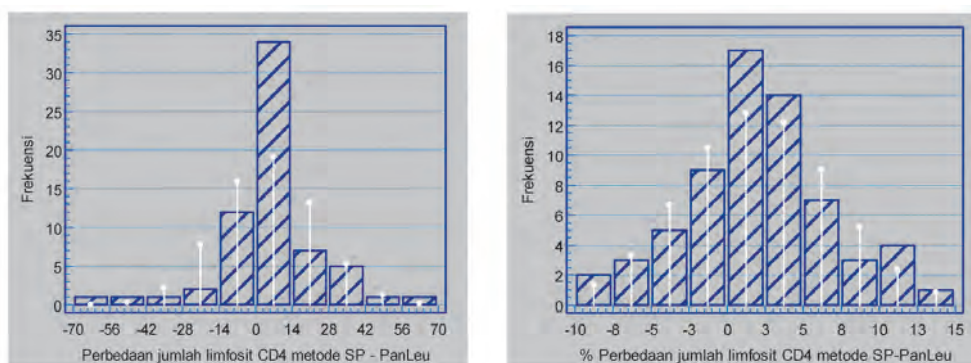
Di gambar 3 sebelah kiri tampak bahwa semakin besar jumlah limfosit CD4 absolut, semakin besar pula nilai perbedaan/bias di antara kedua metode. Untuk mengatasi hal tersebut disarankan untuk menyatakan nilai perbedaan sebagai persentase jumlah limfosit CD4 metode rujukan (lihat Gambar 3). Besarnya bias dalam hal ini dinyatakan sebagai *Mean Percentage Difference* (MPD), yaitu rerata dari persentase perbedaan kedua metode/jumlah limfosit CD4 absolut menurut *single platform*. Dengan cara tersebut tampak bahwa persentase perbedaan dalam jumlah limfosit CD4 absolut rendah menjadi lebih besar.

Besarnya nilai MPD antara kedua metode adalah 2% (95% CI: 0,96– 3,5), dengan simpang baku 5,21%. Batas terendah sebesar -7,96 (95% CI: -10,2 – -5,74) dan yang tertinggi sebesar 12,46 (95% CI:10,259 - 14,68), sehingga LOA kedua metode adalah sebesar -8%–12,5%. Nilai MPD dalam telitian ini lebih rendah daripada kepunyaan

Glencross dkk¹⁴, yaitu sebesar $6 \pm 17\%$ (bias) $\pm s$ antara *PanLeucogating* dan *single platform* terkait volumetrik serta $1 \pm 29\%$, antara *PanLeucogating* dan *single platform bead-based panel CD3/CD4/CD8*. Nilai bias metode *dual platform lymphogating* menunjukkan bias yang lebih besar, yaitu $4 \pm 31\%$.

Untuk melengkapi *Bland-Altman plot* dan mempermudah melihat jarak bias dari nilai 0, dibuat histogram nilai perbedaan kedua metode berhadapan dengan kekerapan perbedaan absolut maupun persentase (lihat gambar 4). Dari gambar tersebut tampak bahwa nilai perbedaan absolut maupun persentase dari kedua metode terpusat disekitar angka 0. Kesesuaian dua metode dicerminkan oleh terpusatnya perbedaan di angka 0 dan sempitnya kurva yang terbentuk. *Full agreement* antara keduanya secara ideal dicerminkan sebagai perbedaan 0%.

Analisis *Bland-Altman* juga dilakukan oleh Chianese *et al.*,¹⁷ dan Pattanapanyasat *et al.*,³ yang membandingkan metode baku *dual platform lymphogating* dan *leucogating* (tabel 3). Chianese *et al.*,¹⁷ memperoleh bias=-56,2 sel/ μ L; LOA=-208,12 – 95,68 sel/ μ L; dan MPD=-16,2%. Kedua metode dikatakan mempunyai kesesuaian yang baik dan besarnya bias absolut disebabkan oleh penentuan jumlah limfosit yang diperoleh dari HA. Pattanapanyasat *et al.*,³ melaporkan kesesuaian antara



Gambar 4. Kekerapan perbedaan jumlah limfosit CD4 absolut dan persentase metode *single platform* dan *PanLeucogating*

Tabel 3. Perbandingan kesesuaian metode *PanLeucogating* (PLG) dengan yang baku *single* (SP) dan *dual platform* (DP)

Tolok ukur	Penelitian ini PLG – SP	Glencross, 2002 ¹⁴ PLG – SP	Chianese, 2003 ¹⁷ PLG-DP	Pattanapanyasat, 2005 ³ PLG - DP
Kenasaban	0,99	0,995	0,98	0,95
Persamaan regresi	$y=0,91+0,987x$	$Y=0,95X+3,4$		$y=0,9x + 5,32$
Bias	5 sel/ μ L		-56,22 sel/ μ L	18 sel/ μ L
LOA	-31,6 – 40,7 sel/ μ L		-208 – 95,7 sel/ μ L	97,4 – 133,1 sel/ μ L
MPD	2%	6 \pm 17%	-16,2%	
LOA(%)	-7,96 – 12,5%			

PanLeucogating dengan metode *dual platform* standar. Jika jumlah absolut limfosit CD4 dikelompokkan menjadi 0 – 250 dan >250 sel/ μ L maka diperoleh bias masing-masing 11 sel/ μ L (LOA -50,5 – 73,5 sel/ μ L) dan 24,2 sel/ μ L (LOA -125,6 – 174 sel/ μ L).

Metode *PanLeucogating* yang merupakan hal baru dalam pengukuran CD4 belum diterima secara luas, karena belum termasuk dalam pedoman penghitungan sel T CD4 terbaru di Eropa dan Amerika Utara. Meskipun demikian, metode ini didasarkan pada strategi *gating* FCM, yaitu gabungan CD45 primer (SSC/CD45) dan CD4 primer (SSC/CD4).³ *Gating* CD4 primer ini telah terbukti dapat dipercaya untuk pengukuran jumlah CD4 absolut dan persentasenya (%) dalam metode *single platform*. Molekul CD3, petanda khas sel T tidak diperlukan dalam mengenali sel T CD4.^{13, 18} Penggunaan pengendali isotipe seperti yang disarankan oleh CDC juga tidak diperlukan karena populasi subset limfosit terpisah.¹⁹ Populasi limfosit yang tidak tertandai dapat menjadi pengendali imunologik internal.²⁰

Penggunaan jumlah leukosit menggantikan jumlah limfosit sebagai denominator akan mengurangi keragaman pengukuran limfosit CD4 metode *dual platform*. Simson dan Groner¹⁴ membandingkan hasil pemeriksaan jumlah limfosit dan jumlah leukosit di berbagai HA dan menyatakan bahwa keragaman analitik jumlah limfosit jauh lebih besar (KV=12,4%) daripada yang terkait jumlah leukosit (KV=4,9%).

Nilai bias, MPD dan LOA dalam penelitian ini, dengan didukung oleh telitian sebelumnya dimungkinkan dapat diterima secara klinis. Di samping koefisien kenasaban dan persamaan garis regresi, kesesuaian dua metode dapat dilihat dari besarnya nilai bias atau MPD, LOA dan batas terendah lebarnya 95% CI maupun tertinggi dari LOA.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil telitian ini dapat disimpulkan, bahwa terdapat kesesuaian hasil hitungan jumlah limfosit CD4 absolut metode *PanLeucogating* menggunakan panel CD4/45 dengan metode *single platform* menggunakan panel CD3/4/45. Perbandingan

pasien HIV yang diobati ARV tidak terdapat perbedaan, yaitu hal yang sesuai dengan nilai ambang WHO, berdasarkan hasil ukuran jumlah limfosit CD4 absolut metode *PanLeucogating* berpanel CD4/45 dengan *single platform* berpanel CD3/4/45.

DAFTAR PUSTAKA

- Whitby L, Granger V, Storie I, Goodfellow K, Sawle A, Relly JT, Barnett D. Quality Control of CD4+ T-Lymphocyte Enumeration: Results From the Last 9 Years of The United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Immune Monitoring (1993–2001). *Cytometry (Clinical cytometry)*, 2002; 50: 102–110.
- World Health Organization. Scaling up Antiretroviral Therapy in Resource-limited Settings; Treatment Guidelines for a Public Health Approach, 2003 revision, Geneva, 2004; 9–24.
- Pattanapanyasat K, Shain H, Noulis E, Lerdwana S, Thepthai C, Prasertsilpa V, et al. A Multicenter Evaluation of PanLeucogating Method and the Use of Generic Monoclonal Antibody Reagents for CD4 Enumeration in HIV-infected Patients in Thailand. *Cytometry Part B*, 2005; 65B: 29–36.
- Karcher H, Bohning D, Downing R, Mashate S, Harms G. Comparison of Two Alternative Methods for CD4+ T-cell Determination (coulter manual CD4 count and Cy flow) against Standar Dual Platform Flow Cytometry in Uganda. *Cytometry Part B (clinical cytometry)* 2006; 70B: 163–169.
- CDC-Centers for Disease Control and Prevention. Revised Guidelines for Performing CD4+ T Cell Determination in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). *MMWR*, 1997; 46: 1–29.
- Gelman R. and Wilkening C. Analysis of Quality Assessment Studies using CD45 for Gating Lymphocytes for CD3+4+%. *Cytometry*, 2000; 42: 1–4.
- Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, et al. Cytofluorometric methods for Assessing Absolute Numbers of Cell Subsets in Blood. *Cytometry (Communication in Clinical Cytometry)*, 2000; 42: 327–346.
- Barnett D, Bird G, Hodges E, Linch DC, Matutes E, Newland AC, Reilly JT. Guidelines for the Enumeration of CD4+ T Lymphocytes in Immunosuppressed Individuals. *Clin Lab Hematol*, 1997; 19: 231–241.
- Nicholson JKA, Learn TI, Cross GD., White MD for the Center for Disease Control (CDC). Revised Guidelines for Performing CD4+ T Cell Determination in Person Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). *MMWR* 1997; 46: 1–9.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Clinical Application of Flow Cytometry: Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline, NCCLS Document H42A. 1998; 18 (21): 7–30.
- O’Gorman MRG and Nicholson JKA. Adoption of Single-Platform Technologies for Enumeration of Absolute T-Lymphocyte

- Subset in Peripheral Blood. *Clinical and Diagnostic laboratory Immunology*, 2000; 7(3): 33–335.
12. Simson E, dan Groner W. Variability in Absolute Lymphocyte Counts Obtained by Automated Cell Counters. *Cytometry*, 1995; 22: 26–34.
 13. Barnett D, Granger V, Whitby I, Storie I, Reilly JT. Absolute CD4+ T Lymphocytes and CD34+ Stem Cell Counts by Single Platform Flow Cytometry: The Way Forward. *Br J Haematol*, 1999; 106: 1059–62.
 14. Glencross D, Scott LE, Jani IV, Barnett D, and Janossy G. CD45-Assisted PanLeucogating for Accurate, Cost-Effective Dual-Platform CD4 T-Cell Enumeration. *Cytometry (Clinical Cytometry)*, 2002; 50: 69–77.
 15. Bland JM, dan Altman DG. Statistical Methods for Assessing Agreement between Two Methods of Clinical Measurement. *Lancet*, 1986; 307–310.
 16. Zijenah LS, Kadzirange G, Madzime S, Borok M, Mudiwa C, Tobaiwa O, et al. Affordable Flow Cytometry for Enumeration of Absolute CD4+ T-lymphocytes to Identify Subtype C HIV-I Infected Adults Requiring Antiretroviral Therapy (ART) and Monitoring Response to ART in a Resource-limited Setting. *Journal of Translational Medicine*, 2006; 4: 33.
 17. Chianese R, Nebuloni E, De Paschale M, Gatti A, Mena M. Absolute T CD4+ Counting by a Minimalist Dual-platform Flow Cytometric Method. *J Biol Regul Homeost Agent*, 2003; 17(4): 358–65.
 18. Jani IV, Janossy G, Iqbal A. Affordable CD4+ T Cell Count by Flow Cytometry II. The use of fixed whole blood in resource poor setting. *J Immunol Method*, 2001; 257: 145–154.
 19. Sherman GG, Galpin JS, Patel JM, Mendelow BV, Glencross DG. CD4+ T Cell Enumeration in HIV Infection with Limited Resources. *J. Immunol Methods*, 1999; 222: 209–21.
 20. Schnitzlein-Bick CT, Mandy FF, Gorman MRG, Paxton H, Nicholson JKA, Hulthin LE, Gelman RS, Wilkening CL, and Livnar D. Use of CD45 Gating in Three and Four-Color Flow Cytometric Immunophenotyping: Guideline From The National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. *Cytometry (Clinical Cytometry)*, 2002; 50: 46–52.