

Diagnosis Kriptokokosis Meningeal pada Penderita AIDS dengan Deteksi Antigen *Glucuronoxylomanan* pada Cairan Otak

Robiatul Adawiyah,¹ Retno Wahyuningsih,^{1,2*} Ridhawati Sjam,¹ Darma Imran³

¹Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

²Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia

³Departemen Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/ RSCM

Abstrak

Kriptokokosis meningeal karena ragi berkapsul *Cryptococcus* sering didapatkan pada penderita AIDS dan menyebabkan kecacatan dan kematian. Diagnosis dini yang diharapkan dapat diatasi dengan diagnosis pemeriksaan tinta India yang rendah dan kultur yang perlu 5-7 hari. Sebagai alternatif, WHO merekomendasikan deteksi antigen dengan cara uji aglutinasi lateks untuk deteksi antigen *glucuronoxylomanan* (GXM) dan *lateral flow assay* yang mendeteksi kompleks antigen *Cryptococcus* sp. Mengingat antigen GXM juga dapat ditemukan pada orang sehat, perlu ditetapkan nilai batas (*cut off*) yang untuk mendiagnosis kriptokokosis klinis. Pada penelitian ini, nilai *cut off* GXM dicari dengan memeriksa cairan otak yang tidak diencerkan, diencerkan 100×, 300×, dan 500× dengan menggunakan metoda aglutinasi lateks (PASTOREX™ CRYPTO PLUS 61747 (kat. 7EM2093, Bio-Rad Perancis). Tiap dilusi dihitung sensitivitas, spesifisitas, NPP, NPN, dan nilai *kappa* untuk menilai kesetaraan antara metode uji dengan baku emas (tinta india dan kultur) serta uji *McNemar* untuk mengetahui perbedaan antara metode uji dan baku emas. *Receiver operating characteristics* (ROC) *curve* dinilai untuk mengetahui kombinasi terbaik sensitivitas dan spesifisitas. Deteksi antigen GXM pada cairan otak menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang bervariasi pada dilusi yang berbeda. Sensitivitas terbaik didapatkan pada LCS yang tidak diencerkan, namun spesifisitas terbaik ditemukan pada dilusi 500× (100%) disusul oleh dilusi 300× (98,1%). Secara keseluruhan berdasarkan sensitivitas, spesifisitas, NPP, NPN, nilai *kappa* dan nilai ROC, dilusi 300× merupakan dilusi terbaik. Uji *McNemar* memperlihatkan tidak ada perbedaan antara metode uji dan baku emas. Dilusi cairan otak 300× merupakan nilai *cut off* deteksi GXM untuk menegakkan diagnosis kriptokokosis meningeal.

Kata kunci: *Cryptococcus neoformans*, meningitis, diagnosis

Diagnosis of Cryptococcal Meningitis in Patient with AIDS by Detection of Glucuronoxylomanan Antigen in Spinal Fluid

Abstract

Meningeal cryptococcosis is caused by encapsulated yeast *Cryptococcus*. This infection has a high morbidity and mortality rate. Early diagnosis is one of the keys to reduce morbidity and mortality. India ink examination is hampered by its low sensitivity, while culture is time consuming. WHO recommends antigen detection methods as an alternative, i.e. latex agglutination for *Glucuronoxylomannan* (GXM) and lateral flow assay (LFA) for antigen complex for *Cryptococcus*. Since GXM antigen is also found in healthy people, cut off value for clinical cryptococcosis needs to be established. In this study, the GXM antigen detection was conducted by latex agglutination test (PASTOREX™ CRYPTO PLUS 61747 kat. 7EM2093, Bio-Rad, France). To establish the cut off value, a neat concentration, as well as 100, 300 and 500 times dilution of spinal fluids were tested. Sensitivity, specificity, PPV, NPV and kappa value for each dilution were calculated against the gold standard (india ink examination and culture). *McNemar* test was performed to evaluate the difference between the test and the gold standard. *Receiver operating characteristics* (ROC) *curve* was used to determine the best combination of sensitivity and specificity. GXM antigen detection on spinal fluid showed variation of sensitivity and specificity in different dilutions. The neat solution gave the best sensitivity, while the best specificity was shown by 500× dilution (100%) and then followed by 300× dilution (98,1%). Overall, 300× dilution gave the best combination of sensitivity, specificity, PPV, NPV,

kappa value and ROC curve. McNemar test also showed no difference between this cut-off and the gold standard ($p=0,07$). In conclusion, 300× dilution of spinal fluid is the best cut off value for GXM detection for diagnosing meningeal cryptococcosis.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, meningitis, diagnosis

*RW: Penulis Koresponden: E-mail: retnet@hotmail.com

Pendahuluan

Dalam dekade terakhir insidensi pasien terinfeksi HIV meningkat cepat di seluruh dunia termasuk Indonesia.¹ Infeksi jamur merupakan infeksi oportunistik yang sering ditemukan pada penderita HIV, bahkan dapat menjadi penanda AIDS, stadium akhir infeksi HIV. Salah satu infeksi oportunistik yang sering ditemukan pada AIDS adalah kriptokokosis. Kriptokokosis umumnya disebabkan oleh *Cryptococcus neoformans*,² dan manifestasi klinis terbanyak pada pasien AIDS adalah meningitis. Kriptokokosis meningeal merupakan penyebab kecacatan tertinggi dan kematian terbanyak pada penderita AIDS dengan gangguan susunan saraf pusat.² Keterlambatan pengobatan akan mengakibatkan kecacatan dan kematian.

Diagnosis pasti kriptokokosis meningeal ditegakkan dengan menemukan jamur dalam cairan otak, yaitu dengan pemeriksaan langsung dengan tinta india dan kultur. Pemeriksaan langsung tinta India menguntungkan karena mudah, murah dan hasilnya cepat, namun hasil positif hanya akan didapatkan jika sel jamur dalam cairan otak $> 10^3$ - 10^4 sel/ml dengan sensitivitas 93,5%.³ Kultur bahan klinik lebih sensitif dengan sensitivitas 95,7%,^{4,5} namun membutuhkan waktu lama untuk pertumbuhan jamur yakni 5-7 hari pada media sabouraud. Selain itu masih diperlukan pemeriksaan mikroskopis atau biokimiawi untuk memastikan.^{5,6} Hal ini menjadi masalah karena pasien kriptokokosis meningeal adalah penderita dengan kondisi klinis buruk yang memerlukan pengobatan segera. Diagnosis dini diharapkan dapat mengatasi hal tersebut. Metode diagnosis

kriptokokosis dengan deteksi antigen *glucuronoxylomannan* (GXM) dan deteksi kompleks antigen *Cryptococcus* sp. dengan metode *lateral flow assay* (LFA) direkomendasikan oleh WHO dan diharapkan dapat membantu diagnosis dini penyakit ini. Antigen GXM merupakan faktor virulensi penting yang dilepaskan oleh *C. neoformans* dan dapat dideteksi di berbagai cairan tubuh seperti cairan otak, darah, serum dan urin.^{4,5} Dalam kondisi saprofit *C. neoformans* juga dapat melepaskan antigen GXM. Hal itu dibuktikan dengan penelitian pendahuluan untuk deteksi GXM pada 10 orang sehat. (tidak diterbitkan)

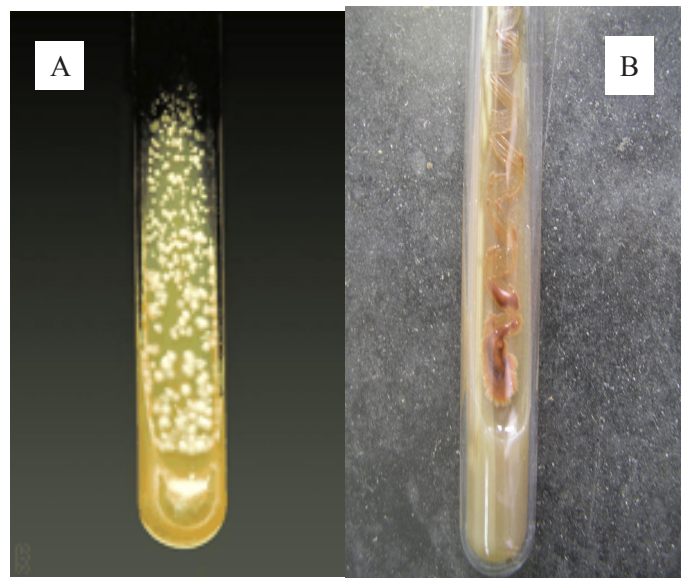
Pada penelitian ini dilakukan deteksi Ag GXM untuk diagnosis sekaligus mengetahui dinamika kadar Ag dalam cairan otak pada pasien terinfeksi HIV dengan kriptokokosis meningeal.

Bahan dan Cara

Penelitian ini bersifat *potong lintang* analitik dengan jenis uji diagnostik. Penelitian dilakukan di laboratorium Mikologi Departemen Parasitologi FKUI. Sampel adalah cairan otak penderita AIDS dengan gangguan SSP yang disimpan di laboratorium mikologi Departemen Parasitologi FKUI. Berdasarkan pemeriksaan mikologi didapatkan dua kelompok sampel, yaitu 52 sampel mengandung *Cryptococcus* dan digolongkan menjadi kelompok mikologi positif (KM+). Sisanya sebanyak 52 sampel memberikan hasil negatif atau tidak ditemukan jamur baik pada tinta India maupun kultur sehingga dikelompokkan menjadi kelompok mikologi negatif atau (KM-).

Baku emas penelitian ini adalah pemeriksaan mikologi (pemeriksaan langsung dengan tinta india dan kultur). Kultur yang digunakan adalah menanam pada media *sabouraud dextrose agar* (SDA) dan *bird seed agar* (BSA) untuk memastikan yang tumbuh adalah *Cryptococcus* sp. (Gambar 1) Deteksi antigen GXM dengan metode aglutinasi lateks (PASTOREX™ CRYPTO PLUS 61747 (kat. 7EM2093, Bio-Rad Perancis).⁶ Untuk pemeriksaan aglutinasi lateks, setiap sampel akan mengalami empat perlakuan yaitu tidak

diencerkan, serta diencerkan berturut-turut 100×, 300×, dan 500×. Tiap dilusi dihitung sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif (NPP), nilai prediksi negatif (NPN), dan nilai *kappa* untuk menilai kesetaraan antara metode uji dengan baku emas serta uji Mc Nemar. Nilai $p < 0,05$ dipakai untuk menyatakan perbedaan bermakna antara metode uji dan baku emas. *Reverse of curve* (ROC) dinilai untuk mengetahui kombinasi terbaik antara sensitivitas dan spesifisitas, dan menjadi dasar untuk mendapatkan nilai *cut off* dilusi GXM.



Gambar 1. A. Koloni *Cr. neoformans* pada media SDA. Koloni ragi berwarna putih dengan permukaan licin.
 1.B. Koloni *Cr. neoformans* pada media BSA. Jamur tumbuh sebagai koloni ragi berwarna coklat gelap.

Hasil

Deteksi antigen GXM pada cairan otak menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang bervariasi pada masing-masing dilusi. Sensitivitas terbaik didapatkan pada LCS yang tidak diencerkan, namun spesifisitas terbaik ditemukan pada dilusi 500× (100%) disusul oleh dilusi 300× (98,1%). Secara keseluruhan berdasarkan sensitifitas, spesifisitas, NPP, NPN, nilai *kappa* dan nilai ROC didapatkan dilusi 300× merupakan

dilusi terbaik. Uji *McNemar* memperlihatkan tidak ada perbedaan antara metode uji dan baku emas ($p = 0,070$).

Tabel 1. menampilkan perbandingan sensitivitas, spesifisitas, NPP, NPN, nilai *Kappa* dan *McNemar* pada 4 dilusi. Sensitivitas pada sampel yang tidak diencerkan 98,1%, spesifisitasnya 63%, NPP 73%, NPN 97% dan memperlihatkan perbedaan bermakna dengan pemeriksaan mikologi $p < 0,001$, serta kesetaraannya dengan pemeriksaan mikologi hanya 0,612. Dilusi 100× memiliki

sensitivitas 92,3%, sedangkan spesifisitasnya rendah, 69,2%. NPP pemeriksaan tersebut 75%, NPN sebesar 90%, menunjukkan perbedaan bermakna ($p = 0,012$, $p < 0,05$) dan kesetaraan yang rendah (0,615) dengan metode baku emas. Sensitivitas dan spesifisitas dilusi 300× cukup tinggi, yaitu 86,5% dan 98,1 %, sedangkan NPP 97,8% dan NPN nya sebesar 87,9%. Dilusi ini menunjukkan

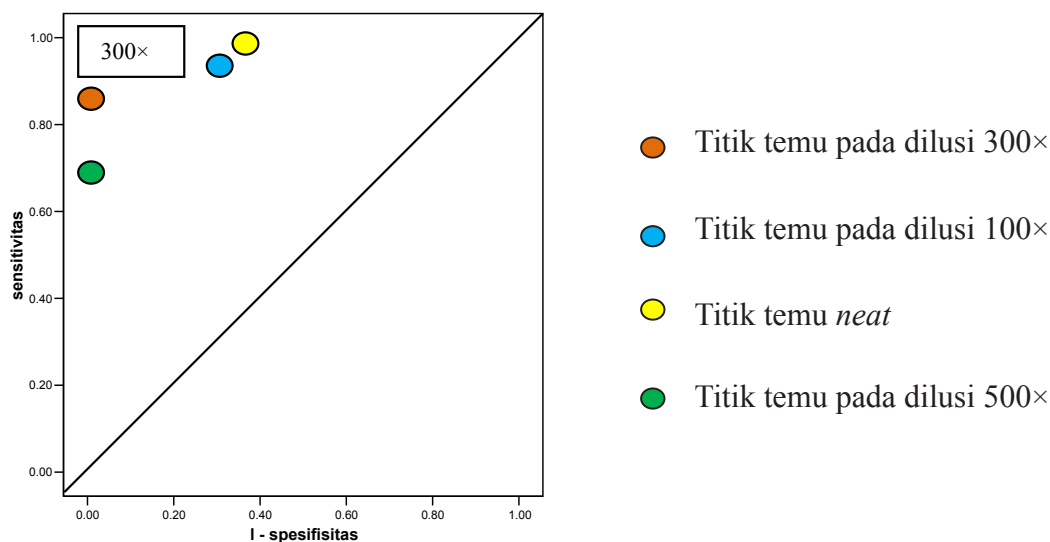
tidak berbeda bermakna ($p = 0,070$, $p > 0,05$) dan memperlihatkan kesetaraan paling tinggi (0,846) terhadap metode baku emas. Dilusi 500× menunjukkan sensitivitas rendah 69,2%, namun spesifitas tinggi 100%. NPP dilusinya 100% dan NPN sebesar 76,5%, namun memperlihatkan adanya perbedaan bermakna $p < 0.001$ dan kesetaraan yang rendah (0,692) terhadap baku emas.

Tabel 1. Nilai Sensitifitas, Spesifisitas, NPP, NPN, Nilai Kappa dan Uji Mc Nemar pada Setiap Jenis Dilusi Sampel

	Dilusi			
	Tidak dilusi	100×	300×	500×
Sensitivitas	98,1%	92,3%	86,5%	69,2%
Spesifisitas	63%	69,2%	98,1%	100%
NPP	73%	75%	97,8%	100%
NPN	97%	90%	87,9%	76,5%
Nilai <i>Kappa</i>	0,612	0,615	0,846	0,692
Mc Nemar	$p < 0.000$	$p = 0,012$	$p = 0,070$	$p < 0.000$

Nilai titik temu sensitivitas dan spesifisitas deteksi GXM pada keempat dilusi sampel pada grafik ROC menunjukkan bahwa titik pemeriksaan dengan dilusi 300×

terletak paling kiri atas dan merupakan kombinasi terbaik dengan spesifisitas 98,1% dan sensitifitas 86,5% (Gambar 2).



Gambar 2. Gambar Kurva ROC Titik Pertemuan Sensitifitas dan 1- spesifisitas dari keempat Pemeriksaan Antigen GXM

Diskusi

Sebelum pandemi AIDS, kriptokokosis merupakan penyakit yang bersifat sporadis dan ditemukan pada pasien dengan penurunan imunitas seperti pasien leukemia, limfoma, sarkoidosis, sirosis, penggunaan kortikosteroid jangka panjang serta penderita dengan transplantasi organ.⁶

Manifestasi klinis kriptokokosis yang paling banyak ditemukan pada pasien AIDS adalah meningitis. Kriptokokosis meningeal merupakan penyebab kecacatan tertinggi pada penderita AIDS yang mengalami gangguan SSP, dengan angka kematian yang cukup tinggi (13-44%).⁷ Diagnosis dini akan membantu mempercepat pengobatan sehingga diharapkan angka kecacatan dan kematian dapat diturunkan. Salah satu alternatif dalam upaya menegakkan diagnosis dini adalah deteksi antigen GXM dalam cairan tubuh.

Pada penelitian ini dilakukan deteksi antigen GXM pada cairan otak penderita AIDS dengan gangguan SSP. Dilakukan dilusi bertahap untuk menetapkan nilai antigen GXM yang dapat menyatakan penderita yang bersangkutan menderita kriptokokosis meskipun pada pemeriksaan mikologi tidak ditemukan jamur. Secara keseluruhan nilai sensitifitas dilusi 100× tinggi yaitu 92,3%, sedangkan spesifisitasnya hanya 69,2% dimana dilusi 100× hanya dapat menyatakan bahwa 69,2% pasien benar-benar tidak menderita kriptokokosis, sisanya mungkin negatif palsu yang terlihat pada pemeriksaan cairan otak tanpa dilusi. Bila ditinjau dari nilai NPN dilusi 100× memiliki daya prediksi negatif 90%, namun bila melihat kesetaraan antara deteksi GXM dan pemeriksaan mikologi yang merupakan baku emas hanya didapat nilai kappa 0,615, yang menunjukkan kesetaraan yang rendah. Sehingga dilusi 100× tidak dapat digunakan untuk menetapkan diagnosis kriptokokosis. Hal itu didukung uji Mc Nemar yang

memperlihatkan perbedaan bermakna antara pemeriksaan mikologi dan deteksi GXM dengan dilusi 100×.

Nilai sensitivitas dilusi 300× cukup baik yaitu 86,5%, yang artinya dilusi 300× dapat mendeteksi 86,5% pasien menderita kriptokokosis dan 13,5% tidak terdeteksi. Sedangkan spesifisitasnya sangat tinggi yaitu 98,1%, yang artinya bahwa dilusi 300× dapat menyatakan 98,1% sampel benar-benar tidak menderita kriptokokosis. Nilai spesifisitas yang tinggi menunjukkan rendahnya hasil negatif semu. Bila ditinjau dari nilai NPP dilusi 300× memiliki daya prediksi positif 97,8%, hal itu didukung oleh kesetaraan yang tinggi antara dilusi 300× dan pemeriksaan mikologi ($\kappa = 0,846$). Sehingga dilusi 300× dapat digunakan untuk menetapkan diagnosis kriptokokosis. Uji Mc Nemar memperlihatkan tidak ada perbedaan bermakna antara pemeriksaan mikologi dan deteksi GXM.

Penetapan dilusi 300× sebagai titik potong atau nilai batas penetapan diagnosis kriptokokosis meningeal didukung oleh hasil ROC yang menunjukkan bahwa dilusi 300× menduduki titik potong terbaik.

Nilai sensitivitas dilusi 500× cukup rendah yaitu 69,2%, hanya dapat mendeteksi 69,2% pasien menderita kriptokokosis dan menghasilkan positif palsu yang cukup tinggi. Nilai spesifisitasnya sangat tinggi 100%, dapat menyatakan seluruh pasien benar-benar negatif. Bila ditinjau dari nilai NPP dilusi 500× memiliki daya prediksi positif 100%, namun tidak didukung oleh kesetaraan dengan hasil pemeriksaan mikologi karena nilai kappa yang rendah yaitu 0,692. Selain itu daya prediksi negatif dilusi 500× juga rendah yaitu 76,5%, yang menunjukkan bahwa peluang pasien untuk tidak sakit dengan hasil pemeriksaan negatif hanya 76,5%, sisanya negatif palsu. Sehingga dilusi 500× tidak dapat digunakan untuk menetapkan diagnosis kriptokokosis, hal itu didukung uji Mc Nemar yang

memperlihatkan perbedaan bermakna antara pemeriksaan mikologi dan deteksi GXM tanpa dilusi.

Keterbatasan penelitian terletak pada penggunaan bahan klinis LCS yang disimpan cukup lama sehingga mungkin terjadi digradasi antigen meskipun bahan disimpan dalam suhu rendah (-20°C).

Kesimpulan

Dilusi cairan otak untuk deteksi antigen GXM yang dapat membantu menegakkan diagnosis kriptokokosis meningeal pada pasien AIDS dengan gangguan SSP adalah dilusi 300×

Daftar Pustaka

1. Profil Kesehatan Indonesia. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. diunduh dari <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan-indonesia/profil-kesehatan-Indonesia-2015> 23 Maret 2017.
2. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis AIDS 2007, 21:2119–2129
3. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the Era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995;8(4):515-48
4. Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV. Detection of Cryptococcus by conventional, serological and molecular methods. J Med Microbiol 2009, 58, 1098–1105
5. Buku panduan PASTOREX™ CRYPTO PLUS 61747. Detection of soluble *Cryptococcus neoformans* antigen in Biological Fluids.
6. Pyrgos V, Seitz AE, Steiner CA, Prevots DR, Williamson PR. Epidemiology of Cryptococcal Meningitis in the US: 1997–2009. PLoS ONE 2013. 8(2): e56269. doi:10.1371/journal.pone.0056269.
7. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS. 2009. 20;23(4): 525-30