



Uji kulit serum otolog modifikasi pada pasien Urtikaria Otoimun di RSUP Palembang

Modified Autologous serum skin test for autoimmune Urticaria in RSUP Palembang

M. Athuf Thaha

Department of Dermatology & Venerology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University, Palembang

KEYWORDS *histamine release assay; autologous serum skin test; functional autoantibodies*

ABSTRACT *There is an urgent need to find reliable and relevant diagnostic tools for patients with autoimmune urticaria especially in a developing country such as Indonesia. The basophil histamine release assay (HRA) is currently the "gold standard" for detecting functional autoantibodies in serum of patients with chronic urticaria. However, this bioassay is difficult to standardize because it requires fresh basophils from healthy donors, is not widely commercially available, and is time consuming. The detection of patients with autoantibodies using in vivo autologous serum skin test (ASST) also poses challenges. Firstly, the ASST is at best around 80% sensitive and specific using in vitro HRA as the "gold standard", and secondly, there is some divergence results obtained by different methods used to detect patients with autoantibodies, due to inconsistency in methods, results and interpretation of the ASST in the literatures. The purpose of this study was to find and develop a new method of ASST. This new method should be practical and with higher reliability (sensitivity and specificity) as a diagnostic tool for autoimmune urticaria. The method used in this study was to perform a preliminary study followed by advanced study through cross sectional designs. The results of this study showed that the new ASST, has a higher reliability than the former ASST methods reported in literatures. In addition, we also found that disease severity with cut-off value of < 12, could be used as an adjunct to detect patients with positive functional autoantibodies. Finally, we also report with pride that we have now the ability to perform HRA which was never done before.*

Urtikaria merupakan kelainan kulit yang umum dijumpai. Berdasarkan data kepustakaan, kisaran 15-20% populasi akan mengalami episode urtikaria paling tidak 1 kali dalam hidupnya, dan diperkirakan 25% dari mereka akan menderita urtikaria kronik (UK). Kisaran 80 - 90% kasus UK penyebabnya belum dapat diidentifikasi, sehingga dinamai urtikaria kronik 'idiopatik' (UKI). Penyakit ini masih menyisakan tantangan utama, terutama dalam identifikasi penyebab, diagnosis, dan penatalaksanaannya, walaupun telah terdapat kemajuan berarti dalam pemahaman mengenai urtikaria kronik (Docrat, 2006). Sejak 20 tahun terakhir, diketahui sebanyak 60% kasus UKI atau 30% kasus UK ternyata disebabkan oleh proses otoimunitas sehingga dinamai urtikaria otoimun (UO) (Sheikh, 2005; Sabroe & Greaves, 2006). Pasien UO memiliki otoantibodi IgG (subtipe IgG1/ IgG3) sebagai faktor pelepas histamin (*histamine releasing factors*) dalam sirkulasi, yaitu otoantibodi anti-FcεRIα dan/atau anti-IgE (Fiebiger *et al.*, 1998). Otoantibodi tersebut

kebanyakan (30-40%) terikat pada rantai-α reseptor IgE berafinitas tinggi (FcεRIα), dan sebagian kecil (5-10%) terikat pada IgE yang terdapat pada permukaan mastosit dan sel basofil (Fux, 2005).

Pemeriksaan *histamine release assay* (HRA), sampai saat ini merupakan baku emas diagnosis UO, karena pemeriksaan tersebut merupakan satu-satunya pemeriksaan *in vitro* yang dapat mengidentifikasi sekaligus melihat fungsi anti-FcεRIα dan anti-IgE yang terdapat dalam serum pasien UKI. Kelemahan pemeriksaan HRA, selain sulit distandar-disasi, juga tidak praktis atau sulit dilakukan karena memerlukan sel basofil segar dari darah donor sehat (Sabroe *et al.*, 1999), memerlukan waktu yang lama untuk memperoleh hasil, dan biaya yang lumayan besar (Grattan *et al.*, 2002).

Correspondence:

Dr. dr. H. M. Athuf Thaha, Department of Dermatology & Venerology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University, Palembang, Jalan Dr. Moh. Ali Komp. RSMH Palembang 30126, Telephone (0711) 352342, Facsimile: 373438, E-mail: athubthaha@yahoo.com

Berdasarkan hal tersebut di atas, sangat diperlukan sarana diagnostik alternatif UO yang mudah, cepat dan praktis, cukup akurat, dan sekaligus murah terutama untuk negara berkembang seperti Indonesia.

Pemeriksaan *in vivo autologous serum skin test* (ASST), seperti halnya pemeriksaan *in vitro* HRA, bertujuan mendeteksi adanya otoantibodi fungsional dalam serum pasien UKI. Uji kulit ini merupakan uji klinis prediktif yang dapat dipercaya dan merupakan uji klinis *in vivo* terbaik saat ini untuk mendeteksi aktivitas pelepas histamin yang terdapat dalam serum otolog terhadap mastosit kulit (Sabroe *et al.*, 1999).

Keuntungan utama tes kulit ini adalah derajat kepraktisannya yang tinggi, sehingga dapat dilaksanakan di samping tempat tidur penderita, dan dengan biaya yang relatif murah sehingga amat tepat untuk dipakai di negara sedang berkembang seperti Indonesia. Kelemahan pemeriksaan ASST, adalah belum ada metode/ teknik yang baku (Di Lella *et al.*, 2004), masing-masing peneliti menggunakan teknik yang berbeda dalam menilai positività ASST. Sebagai akibatnya, penelitian yang dilakukan selama ini, menghasilkan sensitivitas dan spesifisitas ASST bervariasi antara peneliti yang satu dan peneliti yang lain (Nettis *et al.*, 2002).

Permasalahan tersebut di atas mendorong dikembangkannya suatu sarana diagnostik ASST yang baru, yang merupakan modifikasi dari ASST lama. Pengalaman di klinik dengan menggunakan ASST yang baru ini memberi kesan bahwa sarana diagnostik ini memberikan hasil yang lebih baik dari pada ASST peneliti sebelumnya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik laboratorik dengan desain potong lintang. Penelitian ini terdiri atas penelitian pendahuluan dan penelitian lanjutan.

Penelitian pendahuluan berguna untuk mengembangkan sarana diagnostik ASST baru yang sensitivitas dan spesifisitas diagnostiknya lebih baik. Disamping itu penelitian ini dilakukan untuk mencari upaya yang tepat dan baku agar dapat melakukan pemeriksaan HRA yang sangat diperlukan untuk menguji keandalan sarana diagnostik ASST baru.

Penelitian pendahuluan meliputi.

- A. Mencari cara pemeriksaan HRA yang tepat dan baku.

- A.1 Cara pemisahan sel basofil dari darah donor sehat yang tepat dan baku.

- A.2 Cara pelepasan histamin *stimulated*, spontan, dan total yang tepat dan baku.

- A.3 Cara pembuatan kurva baku dan persamaan linear.

- B. Tahapan pengembangan uji ASST baru dan pengujian pendahuluannya secara klinis.

- B.1a. Meneliti ulang ASST peneliti sebelumnya (Goryachkina *et al.*, 2004; Fagiolo *et al.*, 2000; Platzer *et al.*, 2005; Toubi *et al.*, 2004; Altman, 2003; dan Sabroe *et al.*, 1999)

- B.1b. Meneliti sensitivitas dan spesifisitas semua parameter yang menentukan positività ASST, secara tunggal maupun kombinasi

- B.1c. Meneliti variabel yang belum pernah dipakai sebelumnya (diameter *weal* serum dan *weal* salin pada 0 menit).

- B.2 Merangkum hasil ASST peneliti sebelumnya dan hasil ASST peneliti, menghasilkan ASST teoritik baru.

- B.3 Menentukan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik ASST teoritik baru.

- B.4 Membuat kesimpulan dalam bentuk ASST operasional baru.

Hasil penelitian pendahuluan, selanjutnya dipakai pada penelitian lanjutan untuk menentukan nilai diagnostik ASST baru dengan baku emas HRA, menilai sensitivitas dan spesifisitas diagnostik variabel derajat keparahan klinis dengan baku emas HRA, dan meneliti hubungan antara variabel derajat keparahan klinis dan ASST baru.

Subyek penelitian

Pada penelitian pendahuluan, pemeriksaan ASST dilakukan terhadap 34 pasien UKI, dan pada penelitian lanjutan dilakukan pada 79 pasien UKI. Semua sampel penelitian berasal dari pasien yang berobat jalan pada Subbagian Alergi-Imunologi, poliklinik Dept Kulit dan Kelamin, RSUP Palembang.

Semua pasien UKI, tidak mengkonsumsi antihistamin 2 hari menjelang pemeriksaan ASST. Imunosupresan tidak dikonsumsi minimal 2 bulan sebelum ASST, dan semua pasien berusia ≥ 18 tahun.

Penelitian ini telah dinyatakan layak etik untuk dilaksanakan oleh Unit Bioetika dan Humaniora, FK Unsri, Palembang.

Teknik ASST

Darah vena sampel penelitian ditampung dalam tabung gelas steril tanpa *clotting accelerator*, diamankan membeku pada suhu kamar selama 30 menit. Serum diperoleh dengan sentrifugasi pada

2500 rpm selama 15 menit, untuk selanjutnya dibagi ke dalam beberapa *aliquots* untuk pemeriksaan ASST dan HRA.

Sampel serum otolog, histamin (10 µg/mL), dan salin steril (0.9%), masing-masing 50 µL, disuntikkan intradermal dengan jarak 5 cm pada bagian volar lengan bawah yang bebas lesi urtika minimal 24 jam.

Waktu pembacaan respon *weal* dan *flare* pada lokasi suntikan histamin, serum, dan salin disesuaikan dengan metode tiap peneliti. Pengukuran *weal* dan *flare* akibat serum dikoreksi dengan nilai *weal* dan *flare* akibat salin dan/ atau histamin tiap subyek. Perubahan warna *weal* akibat serum pada pembacaan 30 menit dibandingkan dengan perubahan warna *weal* akibat salin dan diberi skor 0 bila warna *weal* akibat serum sama dengan warna *weal* akibat salin (*skin coloured* atau *pink*); skor 1 bila warna *weal* akibat serum adalah *pink* sedangkan warna *weal* akibat salin adalah *skin coloured*; dan skor 2 bila warna *weal* akibat serum adalah merah.

Kriteria positif ASST mengikuti kriteria masing-masing peneliti.

Pemeriksaan HRA

Metode pemeriksaan HRA yang akan dipakai dalam penelitian ini diperoleh melalui rangkaian penelitian ulang berbagai metode HRA yang dilakukan peneliti sebelumnya, sebagai berikut.

1. Cara pemisahan sel basofil dari darah donor sehat.

Metode pemisahan sel basofil ialah metode *dextran sedimentation*, yang dilaksanakan sebagai berikut. Enam mililiter darah vena dalam tabung BD *vacutainer* berlapis K2 EDTA 5.4 mg (3 ml) ditambah 2 mL larutan dekstran 3% (berat molekul 250.000), glukose 3%, salin 0.15 M dan akuades 100 mL. Campuran diinkubasi selama 45 menit pada 37° C sampai darah terpisah menjadi 3 lapisan, lapisan teratas berupa plasma, lapisan di tengah berupa *buffy coat* mengandung lekosit dan trombosit, dan lapisan terbawah berupa sedimen yang mengandung eritrosit.

Supernatan yang mengandung plasma, trombosit, dan lekosit dipisahkan dari sedimen secara hati-hati. Supernatan disentrifus pada 2500 rpm selama 5 menit, sehingga terbentuk sedimen lekosit, sedangkan trombosit terpisah dalam supernatan. Selanjutnya supernatan dibuang.

Pelet lekosit ditambah 3 mL larutan 0.8% NH₄Cl untuk melisis eritrosit yang masih tersisa (penambahan NH₄Cl diulang 2 x agar semua eritrosit

mengalami lisis), kemudian disentrifugasi pada 2500 rpm selama 5 menit.

Supernatan dibuang, pelet dicuci 2 x dengan larutan 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.7 KCl, 0.4 mM NaH₂PO₄, 5 mM glukose, dan akuades, serta disuplemen dengan 0.3% *human serum albumin* (HSA). Campuran ini disentrifugasi pada 2500 rpm selama 5 menit, lalu supernatan dibuang. Pelet diresuspensi dalam larutan yang sama tanpa HSA, sehingga volume 600 µL.

Jumlah lekosit/mL dalam suspensi lekosit yang dibutuhkan adalah 2 x 10⁵/mL. Suspensi lekosit (2 x 10⁵/mL) dibagi dalam 3 tabung, masing-masing mengandung 50 µl suspensi lekosit donor sehat.

2. Cara memperoleh histamin *stimulated* (stiHR), histamin spontan (spoHR), dan histamin total (totHR).

2.1. Limapuluh mikroliter suspensi lekosit dalam tabung 1 diinkubasi selama 40 menit pada 37° C dalam 50 µl serum (pasien UKI atau non-urtikaria), selanjutnya reaksi dihentikan dengan pendinginan di atas es. Sentrifus selama 10 menit pada 3500 rpm, dan supernatan yang diperoleh diperiksa untuk menentukan *stimulatedHR* (stiHR) pasien UKI/ non-urtikaria.

2.2. Limapuluh mikroliter suspensi lekosit dalam tabung 2 ditambah 50 µl PBS, dipanaskan pada 85° C selama 40 menit, kemudian disentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh diperiksa untuk menentukan histamin total (totHR) pasien UKI dan non-urtikaria.

2.3. Limapuluh mikroliter suspensi lekosit dalam tabung 3 diinkubasi selama 40 menit pada 37° C dalam 50 µl PBS, dilanjutkan dengan pendinginan di atas es, selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit pada 3500 rpm. Supernatan yang diperoleh diperiksa untuk menentukan *spontaneousHR* (spoHR) pasien UKI dan non-urtikaria.

3. Uji ELISA kompetitif langsung memakai kit ELISA dari Neogen's Corporation.

Uji ELISA kompetitif langsung dilakukan sesuai dengan petunjuk dari penghasil kit, dan nilai absorbensi ditentukan dengan memakai *microELISA reader* yang diset pada 450 nm.

4. Cara pembuatan kurva baku dan persamaan linear.

4.1. Nilai absorbensi histamin baku dikonversi ke dalam persentasi ikatan maksimal (%B/Bo) dan logit, dan konsentrasi histamin baku

- dikonversi ke dalam $\log_{Concentration}$ (\log_{Conc}).
- 4.2. Kurva baku dan persamaan linear dibuat berdasarkan nilai logit dan \log_{Conc} memakai program Excel.
- 4.3. Penghitungan stiHR, spoHR, dan totHR memakai persamaan linear yang diperoleh ($y = -599.3x + 2178.5$).
- 4.4. Persentasi pelepasan histamin (%HR) donor sehat (non-urtikaria) dihitung memakai formula $[(stiHR - spoHR)/totHR] \times 100$, dan penentuan *cut-off* HRA+/- ($mean + 2 SD$).
- 4.5. Persentasi pelepasan histamin (%HR) pasien UO: $\geq (mean + 2 SD)$, dan pasien UKI non-UO: $< (mean + 2 SD)$.

Analisis statistik

- Data ASST (positif/ negatif) dan HRA (positif/ negatif) dianalisis untuk menentukan nilai diagnostik ASST

- Data derajat keparahan klinis dan ASST baru dianalisis menggunakan analisis korelasi, dan analisis regresi logistik majemuk.
- Perbedaan nilai diagnostik antara 2 metode pemeriksaan ASST dianalisis menggunakan uji beda proporsi.
- Data derajat keparahan klinis dan HRA dianalisis untuk menentukan nilai *cut-off*, menggunakan uji diagnostik dengan HRA sebagai baku emas.

HASIL

A. Penelitian pendahuluan

1. Pemeriksaan ASST

1.1. Sensitivitas diagnostik (SnDx) dan spesifisitas diagnostik (SpDx) ASST metode peneliti sebelumnya

Tabel 1. Perbandingan SnDx dan SpDx metode ASST beberapa peneliti

	AUC	S.E.	p	95% C.I.	Sn Dx	Sp Dx	+P V Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
Altman, 2003	0.500	0.102	1.0	0.324 - 0.676	100	0	21.5		1.0		
Asero et al., 2004	0.500	0.102	1.0	0.324 - 0.676	100	0	21.5		1.0		
Fagiolo et al., 2000	0.500	0.102	1.0	0.324 - 0.676	100	0	21.5		1.0		
Goryachkina et al., 2006	0.714	0.093	0.03	0.534 - 0.855	92.9	50	33.7	96.2	1.86	0.14	67.6
Platzner et al., 2005	0.668	0.097	0.10	0.486 - 0.819	78.6	55	32.4	90.4	1.75	0.39	64.7
Sabroe et al., 1999	0.707	0.093	0.04	0.527 - 0.850	71.4	70	39.5	89.9	2.38	0.41	70.6
Toubi et al., 2004	0.525	0.525	0.80	0.347 - 0.698	50	55	23.3	80.1	1.11	0.91	52.9

Keterangan singkatan.

AUC: *area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve*

S.E.: *standard error*

p: nilai kemaknaan pada 0.05

C.I.: *confidence interval*

PV: *predictive value*

LR: *likelihood ratio*

Efis.Dx: efisiensi diagnostik (akurasi)

Pemeriksaan ASST metode Sabroe menghasilkan Sensitivitas dan Spesifisitas diagnostik yang lebih baik dari metode peneliti yang lain, disusul metode Gory dengan Sensitivitas dan Spesifisitas diagnostik.

1.2. Sensitivitas dan spesifisitas ASST berdasarkan perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, dan 2.5 mm) pada pembacaan 30 menit

Tabel 2. Sn Dx dan Sp Dx ASST berdasarkan parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin pada 30 menit (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, dan 2.5 mm)

Parameter diameter	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				lower	upper							
S30u0.5	0.500	0.102	1.00	0.500	0.700	100	0	21.5		1.0		
S30u1.0	0.489	0.102	0.916	0.289	0.690	92.9	5	21.5		1.0		41.2
S30u1.5	0.514	0.102	0.889	0.315	0.713	92.9	10	22	83.6	1.03	0.71	44.1
S30u2.0	0.689	0.091	0.064	0.511	0.868	92.9	45	31.6	95.8	1.69	0.16	64.7
S30u2.5	0.646	0.098	0.151	0.455	0.838	64.3	65	33.5	86.9	1.84	0.55	64.7

Perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (2.0 mm) pada 30 menit paling besar (S30u2.0), menghasilkan Sensitivitas 92.95% dan Spesifisitas diagnostik 45%, disusul berturut-turut S30u2.5 dengan Sn Dx: 64.3% dan Sp Dx: 65% (AUC = 0.646, +PV Dx: 33.5%, -PV Dx: 86.9%, efisiensi Dx: 64.7%), dan S30u1.5 dengan Sn Dx: 92.9% dan Sp Dx: 10% (AUC = 0.514, +PV Dx: 22%, -PV Dx: 83.6%, efisiensi Dx: 44.1%).

1.3. Sensitivitas dan spesifisitas ASST berdasarkan parameter perubahan warna

Tabel 3. SnDx dan SpDx ASST berdasarkan parameter perubahan warna *weal* akibat serum pada 30 menit

	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				lower	upper							
rs0	0.50	0.10	1.0	0.3	0.7	100	0	21.5		1.0		
rs1	0.67	0.09	0.08	0.49	0.86	85.7	50	32.0	92.7	1.71	0.29	64.7
rs2	0.74	0.09	0.01	0.57	0.92	78.6	70	41.8	92.3	2.62	0.31	73.5

Parameter perubahan warna *weal* serum (merah) pada 30 menit (rs2) menghasilkan parameter Sensitivitas dan Spesifisitas diagnostik yang lebih baik daripada parameter rs1.

1.4. Sensitivitas dan spesifisitas ASST berdasarkan waktu pembacaan pada 20, 30, dan 40 menit.

Tabel 4. SnDx dan SpDx ASST berdasarkan waktu pembacaan (20, 30, dan 40 menit) perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (1.5 mm dan 2.0 mm)

Parameter Waktu	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				lower	upper							
S30u2.0	0.68	0.09	0.06	0.511	0.868	92.9	45	31.6	95.8	1.69	0.16	64.7
S20u2.0	0.48	0.10	0.88	0.286	0.696	57.1	40	22.7	79.3	1.07	0.95	47
S40u2.0	0.41	0.10	0.40	0.217	0.612	42.9	40	28.1	83.6	1.43	0.71	41.1
S30u1.5	0.51	0.10	0.88	0.315	0.713	92.9	10	22	83.6	1.03	0.71	44.1

Sensitivitas dan Sp ASST berdasarkan perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (2.0 mm) pada pembacaan 30 menit (S30u2.0), menghasilkan parameter yang lebih baik daripada pembacaan pada 20 menit dan 40 menit.

1.5. Sensitivitas dan spesifisitas ASST berdasarkan perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, dan 2.5 mm) pada pembacaan 0 dan 30 menit.

Tabel 5. SnDx dan SpDx ASST berdasarkan perbedaan parameter diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin pada 0 dan 30 menit

Parameter	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn Dx	Sp Dx	+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
				<i>lower</i>	<i>upper</i>							
O menit												
Sdsg030u1.5	0.704	0.09	0.04	0.526	0.882	85.7	55	34.3	93.4	1.9	0.26	67.6
Sdsg030u2.0	0.657	0.09	0.12	0.469	0.846	71.4	60	32.8	88.5	1.79	0.48	64.7

Parameter tunggal, yaitu perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin pada 0 dan 30 menit (1.5 mm) menghasilkan Sn Dx dan Sp Dx masing-masing 85.7% dan 55% (AUR: 0.704, +PV Dx: 34.3%, -PV Dx: 93.4%, efisiensi Dx: 67.6%).

1.6. Sensitivitas dan spesifisitas ASST berdasarkan kombinasi parameter

Tabel 6. SnDx dan SpDx ASST berdasarkan kombinasi parameter Sdsg030u1.5 - rs2 (S030u1.5rs2), S30u2.0rs2, dan S30u1.5rs2

	ASST teoritik baru	AUR	S.E.	p	Sn Dx	Sp Dx	95% C.I.		+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis. Dx
1	S030u1.5rs2	0.86	0.07	0.000	78.6	95	0.726	1.009	81.1	94.6	15.71	0.23	88.2
2	S30u2.0rs2	0.78	0.08	0.006	71.4	85	0.614	0.950	56.6	91.6	4.76	0.34	79.4
3	S30u1.5rs2	0.70	0.09	0.042	71.4	70	0.525	0.889	39.5	89.9	2.38	0.41	70.6

Pemeriksaan ASST berdasarkan kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (≥ 1.5 mm) pada 0 dan 30 menit, dan parameter warna *weal* akibat serum merah pada 30 menit (**S030u1.5rs2**), disusul dengan S30u2.0rs2.

Penjelasan.

- S0301.5rs2 adalah kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (1.5 mm) pada 0 dan 30 menit dan parameter warna *weal* akibat serum (merah).
- S30u2.0rs2 adalah kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (2.0 mm) pada 30 menit dan parameter warna *weal* akibat serum (merah).
- S30u1.5rs2 adalah kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin (1.5 mm) pada 30 menit dan parameter warna *weal* akibat serum (merah).

1.7. Sarana diagnostik ASST operasional baru yang ditemukan.

Sarana diagnostik ASST operasional baru yang ditemukan ialah S030u1.5rs2, karena jauh lebih baik daripada S30u2.0rs2 dan S30u1.5rs2 (nilai AUC, +PV Dx, -PV Dx, dan efis. Dx lebih baik).

1.8. Kriteria ASST positif

Pemeriksaan ASST baru yang dipakai peneliti disebut positif bila kombinasi perbedaan diameter *weal* akibat serum-diameter *weal* akibat salin pada 0 dan 30 menit ≥ 1.5 mm dan warna *weal* akibat serum sama dengan warna *weal* akibat histamin pada 30 menit (merah).

B. Penelitian lanjutan

1. Metode ASST baru

Tabel 7. Sensitivitas Dx dan SpDx ASST baru (S030u1.5rs2), S30u1.5rs2 (cara Sabroe), dan S30u2.0rs2, dengan baku emas HRA, memakai program SPSS dan MedCalc

	AUC	S.E.	p	95% C.I.		Sn	Sp	+PV	-PV	+LR	-LR	Efis.
				<i>lower</i>	<i>Upper</i>	Dx	Dx	Dx	Dx			Dx
S030u1.5rs2	0.88	0.05	0.000	0.767	0.992	82.4	93.5	77.8	95.1	12.76	0.19	91.1
S30u1.5rs2	0.70	0.07	0.009	0.566	0.850	70.6	71.0	40	89.8	2.43	0.41	70.9
S30u2.0rs2	0.68	0.07	0.023	0.530	0.833	58.8	77.4	41.6	87.3	2.61	0.53	73.4

Sensitivitas Dx dan spesifisitas Dx ASST baru adalah 82.4% dan 93.5%.

Keterangan:

S030u1.5rs2: Sarana Dx ASST baru, yang memakai kombinasi parameter perbedaan diameter *weal* akibat serum-*weal* akibat salin pada 0 dan 30 menit, dan warna *weal* serum pada 30 menit.

S30u1.5rs2 dan S30u2.0rs2: adalah sarana Dx ASST teoritis baru yang ditemukan pada penelitian pendahuluan.

Tabel 8. Hasil uji beda proporsi antara Sn Dx ASST baru dan Sn Dx S30u1.5rs2 (ASST Sabroe), memakai program EpiCalc

Proporsi Sn dan besar sampel	Z score	95% C.I	p - value (one - sided)	p - value (two - sided)
ASST baru (82.4%, 79)				
vs	1.56	11.8%	0.05	0.11
S30u1.5rs2 (70.6%, 79)				

Keterangan.

Uji beda proporsi antara Sn Dx ASST baru dan Sn Dx S30u1.5rs2 (skor Z: 1.56, p = 0.05), menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna.

Tabel 9. Hasil uji beda proporsi antara Sp Dx ASST baru dan Sp Dx S30u1.5rs2 (ASST Sabroe)

Proporsi Sp dan besar sampel	Z score	95% C.I.	p - value (one - sided)	p - value (two - sided)
ASST baru (93.5%, 79)				
vs	3.49	22.5%	0.000	0.000
S30u1.5rs2 (71%, 79)				

Uji beda antara Sp Dx ASST baru dan Sp Dx ASST Sabroe penelitian (skor Z = 3.49, p < 0.000), menunjukkan ada perbedaan bermakna.

2. Hasil pemeriksaan variabel derajat keparahan klinis

2.1. Sensitivitas Dx, spesifisitas Dx, dan nilai *cut-off* variabel derajat keparahan klinis.

Variabel derajat keparahan klinis merupakan penjumlahan 7 nilai variabel: diameter dan jumlah urtika, keluhan gatal, distribusi lesi urtika, angioedema, pemicu urtika, faktor atopi, dan keluhan sistemik. Rentang skor derajat keparahan klinis adalah 3 - 24.

Tabel 10. Sensitivitas Dx dan spesifisitas Dx variabel derajat keparahan klinis (skala kontinyu) dengan baku emas HRA

<u>Cut-off</u>	SnDx	SpDx	AUC	S.E.	p	95% C.I.		+PV Dx	-PV Dx	+LR	-LR	Efis Dx
						<i>upper</i>	<i>lower</i>					
12	76.5	74.2	0.753	0.058	0.001	0.620	0.887	44.8	92.0	2.96	0.32	74.7

Sensitivitas Dx dan SpDx variabel derajat keparahan klinis pada *cut-off* 12, ialah 76.5% dan 74.2%.

Tabel 11. Hasil uji beda proporsi antara SnDx variabel derajat keparahan klinis dan SnDx variabel ASST baru, menggunakan program EpiCalc2000

Proporsi Sn dan besar sampel	<u>Z score</u>	<i>p-value (one-sided)</i>	<i>p-value (two-sided)</i>	95% C.I.
Derajat keparahan klinis (76.5%, 79 pasien)				
vs				
ASST baru (82.4%, 79 pasien)	0.72	0.235	0.471	-7.93 to 19.73

Tidak terdapat perbedaan kemaknaan antara SnDx keparahan klinis dan SnDx ASST baru

Tabel 12. Hasil uji beda proporsi antara SpDx variabel keparahan klinis dan SpDx variabel ASST baru, menggunakan program EpiCalc2000

Proporsi Sp dan besar sampel	<u>Z score</u>	<i>p-value (one-sided)</i>	<i>p-value (two-sided)</i>	95% C.I.
Sp keparahan klinis (74.2%, 79 pasien)				
vs				
Sp ASST baru (93.5%, 79 pasien)	3.08	0.001	0.002	6.96 to 31.64

Terdapat perbedaan kemaknaan antara Sp derajat keparahan klinis dan Sp ASST.

PEMBAHASAN

1. Reliabilitas dan relevansi metode

1.1. Reliabilitas dan relevansi pemeriksaan HRA yang berhasil dikerjakan peneliti

Pemeriksaan HRA dipakai dalam penelitian ini karena sampai saat ini masih merupakan baku emas untuk mendeteksi otoantibodi fungsional di dalam serum pasien UKI (Tanus *et al.*, 1996; Fiebiger *et al.*, 1998), karena pemeriksaan *in vitro* lainnya, seperti *immunoblot*, dan *flow cytometry* tidak dapat membedakan apakah

otoantibodi tersebut fungsional atau tidak. Selain itu, pemeriksaan penurunan jumlah sel basofil dengan *flow cytometry* (Grattan *et al.*, 1997), pemeriksaan petanda aktivasi sel basofil CD63 (Wedi *et al.*, 2000) dan CD203a (Vasagar *et al.*, 2004; Buhring *et al.*, 2004), masih memerlukan validasi.

Metode pemisahan leukosit donor sehat yang berhasil dilakukan peneliti, diawali dengan inkubasi darah EDTA donor sehat dalam larutan 3% dextran (BM 250.000), dilanjutkan dengan

sentrifugasi, dan penambahan amonium klorida untuk melisis eritrosit yang tersisa. Komposisi larutan dekstran 3% BM 250.000, dan penambahan amonium klorida yang dipakai pada penelitian ini menghasilkan jumlah lekosit yang cukup untuk pemeriksaan ELISA, dan suspensi lekosit tersebut bebas dari eritrosit. Percobaan memakai komposisi larutan dekstran dengan BM berbeda, tidak berhasil memperoleh jumlah lekosit yang memadai. Proses pelisisan eritrosit memakai larutan salin hipotonik (Anon, 2000), larutan akuades dan 10xPBS (Young, 2006), dan akuades dikombinasikan dengan *light vortexing* (Long *et al.*, 1998) menghasilkan suspensi lekosit yang belum bebas dari eritrosit. Setelah proses pelisisan eritrosit, dilanjutkan dengan pencucian dengan larutan bufer (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.7 KCl, 0.4 mM NaH₂PO₄, 5 mM glukose, dan akuades), yang disuplemen dengan 0.3% HSA, sentrifugasi (2500 rpm selama 5 menit), dan diresuspensi (dalam bufer yang sama, tanpa HSA), lalu dilakukan penghitungan dan penyesuaian jumlah lekosit memakai bantuan mikroskop cahaya, dan jumlah sel yang diperoleh dimasukkan dalam formula Hudson, Hay (1989), sehingga menjadi 2×10^5 sel/mL. Jumlah sel/mL tersebut sesuai dengan spesifikasi kit ELISA yang dipakai dalam penelitian ini. Metode pemisahan sel basofil yang dipakai dalam penelitian ini tidak memakai metode pemurnian sel basofil dengan Percoll *density gradients* atau *elutriation* dan *negative selection* dengan *magnetic beads*, karena kedua cara tersebut hanya dipakai pada penelitian sekresi *interleukin* sel basofil atau pada penelitian *intracellular signaling events* sel basofil. Selain itu, walaupun sel basofil bercampur dengan sel lekosit lain, campuran sel tersebut tidak mempengaruhi pemeriksaan HRA karena histamin hanya terdapat dalam granul sel basofil.

Suspensi sel basofil selanjutnya dibagi dalam 3 tabung, tabung 1 diinkubasi dengan serum pasien UKI atau serum orang sehat selama 40 menit pada 37^o C, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit. Untuk mendapatkan supernatan yang mengandung *stimulated histamine* sampel penelitian atau *stimulated histamine* sampel orang sehat, tabung 3 diinkubasi dengan PBS selama 40 menit pada 37^o C, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 3500 rpm selama 10 menit. Untuk mendapatkan supernatan yang mengandung *spontaneous histamine*, dan tabung 2 diinkubasi dengan PBS,

dilanjutkan dengan pemanasan pada 85^oC selama 40 menit untuk mendapatkan supernatan yang mengandung *total histamine*. Metode pemanasan pada 85^oC selama 40 menit dipakai dalam penelitian ini karena menghasilkan nilai absorben terkecil dibandingkan metode pendidihan (Tong *et al.*, 1997), pemanasan pada 60^o C, dan metode *repeated thawing and freezing* (Wedi *et al.*, 2000). Selain itu, metode yang dipakai peneliti menghasilkan nilai absorben yang hampir tidak berbeda dengan yang dihasilkan metode *ultrasonic disintegrator* dengan *ice cold jacket* yang merupakan baku emas untuk memperoleh histamin total.

Kit ELISA Neogen's Corporation, USA dipakai dalam penelitian ini karena kit tersebut dipakai secara luas di Perancis, Inggris, Canada, Amerika, dalam berbagai penelitian penghitungan kadar histamin. Antibodi monoklonal terhadap histamin telah dilapiskan pada permukaan sumuran lempengan polistiren oleh perusahaan, sehingga terjamin kemurnian maupun distribusinya pada dinding sumuran dari lempengan. Spesifikasi performan kit (limit kuantifikasi, rentangan kuantifikasi, presisi inter-asai dan intra-asai) menunjukkan keandalan kit mendeteksi histamin.

Pembuatan kurva baku penelitian ini (penghitungan %B/B₀, logit, dan logConc), dan pembuatan persamaan linear (model *log-logit curve fitting*) berdasarkan kurva baku, mengikuti petunjuk penghasil kit ELISA.

1.2 Reliabilitas dan relevansi pemeriksaan ASST baru

Pemisahan serum otolog dari darah sampel UKI dilakukan secara standar mengikuti pedoman *Specimen, Collection, Preparation, Reparation, and handling* (Anon, 2007), dan sesuai dengan persyaratan penyakit yang diteliti (darah diambil waktu penyakit aktif). Prosedur baku pemisahan serum tersebut menghindarkan kemungkinan pelepasan C5a dan bradikinin yang dapat pula memicu pelepasan histamin dari mastosit. Peneliti tidak memakai anti-FcεRIα fungsional sebagai pengganti serum, karena sampai saat ini belum ada sarana untuk memperoleh anti-FcεRIα fungsional.

Pembacaan diameter *weal* akibat serum dan salin dilakukan pada 0 dan 30 menit. Waktu dan alasan pembacaan pada 0 menit tersebut adalah hasil pengamatan peneliti selama penelitian ini berlangsung. Pada pengamatan selama

penelitian, ternyata diameter akibat suntikan serum, salin, dan histamin pada 0 menit tidak selalu sama walaupun volume serum, salin, dan histamin telah diukur dengan cermat. Pada 0 menit, edema akibat suntikan salin dan serum terjadi bukan oleh proses imunologis, tetapi oleh pengaruh volume cairan yang disuntikkan. Pada pembacaan 30 menit, terjadi absorpsi cairan pada lokasi suntikan serum dan salin, sehingga perbedaan diameter antara kedua lokasi hanya disebabkan proses imunologis (lokasi serum mengandung bahan imunologis, sedangkan lokasi salin tidak). Peneliti berpendapat apabila perbedaan diameter pada 0 menit tersebut tidak diperhitungkan, akan mempengaruhi perbedaan diameter pada 30 menit. Pembacaan pada 30 menit dipakai dalam penelitian ini, karena hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa pembacaan pada 20 dan 40 menit menghasilkan Sn dan Sp ASST yang jauh lebih kecil dibandingkan pada pembacaan 30 menit. Demikian pula, pemilihan parameter warna *weal* akibat serum pada 30 menit (merah), karena menghasilkan Sn dan Sp yang lebih baik dibandingkan dengan perubahan warna merah muda.

1.3. Reliabilitas dan relevansi nilai *cut-off* variabel derajat keparahan klinis (DerKepKlin)

Variabel derajat keparahan klinis mempunyai skala kontinyu (3 - 24), dan variabel ASST baru (S030u1.5rs2) berskala binomial. Uji Kolmogorov-Smirnov (*one sample*) terhadap variabel S030u1.5rs2 dan DerKepKlin, menunjukkan data variabel S030u1.5rs2 tidak terdistribusi normal ($p < 0.05$), sedangkan data variabel derajat keparahan klinis terdistribusi normal ($p \geq 0.05$). Analisis korelasi Spearman antara kedua variabel menunjukkan adanya korelasi positif bermakna (0.509).

Uji diagnostik menggunakan kurva ROC untuk menentukan Sn Dx dan Sp Dx variabel DerKepKlin dengan HRA sebagai baku emas, dapat dilakukan karena skala variabel DerKepKlin adalah kontinyu. Nilai *cut-off* (12) derajat keparahan klinis diperoleh pada kombinasi Sn Dx dan Sp Dx derajat keparahan klinis yang optimal (76.5% dan 74.2%, efis.Dx: 74.7%).

2. Sarana diagnostik ASST baru

Sarana diagnostik ASST baru yang ditemukan pada penelitian pendahuluan dan

dipakai pada penelitian utama ini adalah penambahan parameter perbedaan diameter *weal* serum-*weal* salin pada 0 menit, selain parameter perbedaan diameter *weal* serum-*weal* salin pada 30 menit dan parameter perubahan warna *weal* serum pada 30 menit (S030u1.5rs2).

Sensitivitas Dx dan SpDx parameter kombinasi S030u1.5rs2 yang ditemukan peneliti pada penelitian pendahuluan, menghasilkan Sn Dx dan Sp Dx (78.6% dan 95%, AUC = 0.868, +PV Dx: 81.1%, efis.Dx: 88.2%), lebih tinggi daripada hasil penelitian memakai metode Sabroe *et al.*, 1999: S30u1.5rs2 (71.4% dan 70%, AUC = 0.707, +PVDx: 39.5%, efis.Dx: 70.6%), dan penelitian Sabroe sendiri (65% dan 81%).

Hasil di atas menunjukkan peningkatan Sn Dx dan Sp Dx dari sarana diagnostik ASST yang signifikan, sehingga kesalahan mendeteksi pasien UO maupun kesalahan mendeteksi pasien yang bukan UO akan makin kecil. Dampaknya bagi pasien, adalah makin banyak pasien UO dapat segera diobati, dan makin kecil kemungkinan pemberian obat spesialisik terhadap pasien urtikaria yang bukan UO.

3. Cara pemeriksaan HRA yang tepat dan baku.

Upaya yang dilakukan pada penelitian pendahuluan telah berhasil mendapatkan cara melakukan pemeriksaan HRA yang tepat dan standar yang belum pernah dilakukan di Indonesia dan yang sangat diperlukan untuk menguji keandalan sarana diagnostik ASST baru. Perbedaan utama cara pemeriksaan HRA peneliti dari metode pemeriksaan HRA sebelumnya ialah pada proses mendapatkan histamin total memakai metode pemanasan pada 85°C selama 40 menit.

Keberhasilan pemeriksaan HRA merupakan nilai tambah penelitian. Selama ini pemeriksaan tersebut belum pernah dilakukan.

4. Temuan *cut-off* variabel DerKepKlin.

Penelitian ini mendapatkan nilai *cut-off* derajat keparahan klinis sebesar 12 pada Sn Dx dan Sp Dx variabel derajat keparahan klinis yang optimal, yaitu 76.5% dan 74.2% (AUC = 0.803, 95% C.I.: 0.698 - 0.884, +PV: 44.8%, +LR: 2.96, efis. Dx: 74.7%).

Uji beda proporsi (SnDx dan SpDx variabel derajat keparahan klinis dan sarana diagnostik ASST baru), menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan dalam SnDx ($z = 0.72$, $p > 0.05$), tetapi berbeda secara signifikan dalam SpDx ($z = 3.08$, $p < 0.05$). Perbedaan kemaknaan tersebut menunjukkan

bahwa perubahan nilai *cut-off* derajat keparahan klinis (< 12) akan berpengaruh terhadap deteksi pasien urtikaria dengan otoantibodi positif, tetapi tidak dapat diandalkan dalam mendeteksi pasien dengan otoantibodi negatif.

Secara khusus, penemuan sarana diagnostik ASST baru yang lebih sensitif dan spesifik, dan penemuan nilai *cut-off* variabel derajat keparahan klinis (12), akan lebih menguntungkan pasien UKI dari segi biaya yang dikeluarkan, karena tidak memerlukan pemeriksaan HRA yang biayanya mahal.

KESIMPULAN

1. Metode ASST yang baru mempunyai sensitivitas dan spesifisitas diagnostik yang tinggi sehingga bisa diklasifikasikan sebagai sarana diagnostik yang andal untuk mendeteksi UO.
2. Spesifisitas diagnostik yang berbeda secara bermakna menunjukkan bahwa perubahan nilai *cut-off* derajat keparahan klinis (< 12) dapat diandalkan untuk mendeteksi pasien urtikaria dengan otoantibodi positif, tetapi tidak dapat diandalkan untuk mendeteksi pasien dengan otoantibodi negatif.
3. Penemuan metode ASST baru dan metode pemeriksaan HRA, tidak diragukan lagi telah membantu pengembangan Ilmu Pengetahuan dan teknologi kedokteran, terutama dalam pemeriksaan penunjang urtikaria otoimun.

SARAN

Masih diperlukan penelitian lebih lanjut dengan skala yang lebih luas untuk memperoleh metode ASST yang mempunyai keandalan yang mantap.

KEPUSTAKAAN

Altmann LC 2003. Serum skin test definitive for chronic, autoimmune urticaria: differential Dx. The Pacific Northwest Dermatological Society.

Anon 2000. Methods for Sample Preparation. National Referral Laboratory for Lysosomal, Peroxisomal and Related Genetic Disorders. Department of Chemical Pathology, Adelaide.

Anon 2007. Specimen Collection, Preparation, Reproduction, and handling, Available from: http://www.labcorp.com/datasets/labcorp/html/frontm_group/frontm/section/speccal.htm#qns

Asero R, Lorini M, Tedeschi A 2004. Chronic autoreactive urticaria at six years of age J Invest Allergol Clin Immunol 14(4):343-345.

Buhring HJ, Strebler A, Valent P 2004. The Basophil-Specific Ecto-enzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for Cell Activation and Allergy Diagnosis. Int Arch Immunol 133:317-329.

Di Lella E, Agostinelli D, Brunelli L, Stingeni L and Lisi P 2004. The intradermal autologous serum skin test: possible interfering factors. Societa' Italiana di Dermatologia Allergologica Professionale Ambientale (SIDAPA) 58:12-15.

Docrat ME 2006. Skin Focus. Curr Allergy Clin Immunol 19:145-150.

Fagiolo U, Kricek F, Ruf C, Peserico A, Amadori A, Cancian M, 2000. Effects of complement Inactivation and IgG depletion on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria. J Allergy Clin Immunol. 106:567-572.

Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G and Maurer D 1998. Anti - FcεRIα Autoantibodies in Autoimmune-mediated Disorders. Identification of a Structure-Function Relationship. J. Clin. Invest. 101:243-251.

Fux M 2005. A New Molecular Approach for Monitoring Autoantibodies against FcεRIα in Healthy Donors and Urticaria Patients (Dissertation). Inaugural dissertation der Philosophisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität, Bern.

Goryachkina LA, Nenasheva NM, Borzova EU 2004. The clinical relevance of autologous serum skin test in autoimmune chronic urticaria. Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Department of Clinical Allergology.

Grattan CE, Walpole D, Niimi N 1997. Flow cytometric analysis of basophil numbers in Chronic urticaria: basopenia is related to serum histamine releasing activity. Clin Exp Allergy 27:1417-1424.

Grattan CEH, Sabroe RA, Greaves MW 2002. Chronic urticaria. Continuing Medical Education. J Am Acad Dermatol. 46:645-657.

Hudson L, Hay FC 1991. Cell counting with haemocytometer in Practical Immunology, 3rd ed., pp. 94-95, Oxford Blackwell Scientific Publications.

Long CM, Drew L, Miner R, McMullen DJ, Impraim C, Kao S-Y 1998. Detection of Cytomegalovirus in Plasma and Cerebrospinal Fluid Specimens from Human immunodeficiency Virus-Infected Patients by AMPLICOR CMV Test. J Clin Microbiol 36:2434-2438.

Neogen Corporation 2004. Competitive direct ELISA. The Histamine ELISA test kit.

Nettis E, Dambra P, D'Oranzio L 2002. Reactivity to autologous serum skin test and clinical features in chronic idiopathic urticaria. Clin Exp. Dermatol. 27:29-31.

Platzer MH, Grattan CEH, Poulsen LK, Skov PS 2005. Validation of basophil histamine release against the autologous serum skin test and outcome of serum - induced basophil histamine release studies in a large population of chronic urticaria patients. Allergy 60:1152-1156.

Sabroe RA, Grattan CEH, Francis DM 1999. The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. Brit J Dermatol 140:446-452.

Sabroe RA and Greaves MW 2006. Chronic idiopathic urticaria with functional auto-antibodies: 12 years on. Br J Dermatol 154:813-819.

Sheikh J 2005. Autoantibodies to the High-affinity IgE Receptor in Chronic Urticaria. How important are they? Curr Opin Allergy Clin Immunol 5(5):403-407.

Tanus T, Atkins PC, Zweiman M 1996. Comparison of serum histamine-releasing activity and Clinical Manifestations in Chronic Idiopathic Urticaria. Clin Diag Lab Immunol 3:135-137

- Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP 1997. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 99:461-465.
- Toubi E, Kessel A, Avshovich N, Bamberger E, Sabo E, Nusem D, Panasoff J 2004. Clinical and laboratory parameters in predicting chronic urticaria duration: a prospective study of 139 patients. Original article. *Allergy* 59 (8), 869-873.
- Vasagar K, Vonakis BM, Viksman et al., 2004. Evidence of in vivo basophil activation in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 113:S257-S259.
- Wedi B, Novacovic V, Koerner M, Kaap A 2000. Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production, and basophil CD63 surface expression – Inhibitory effects of anti-inflammatory drugs. *Dermatologic and Ocular diseases. J Allergy Clin Immunol* 105:552-560.
- Young DJ 2006. Dextran Sedimentation of Erythrocytes. University of California, San Diego (UCSD).