

Metoda-metoda untuk Mendeteksi Adanya Infeksi HPV

Bambang Dwipoyono
 Staf Medik Fungsional Ginekologi Onkologi RS. Kanker "Dharmais"

ABSTRAK

Usaha menurunkan insiden dan prevalen juga kematian kanker serviks uteri adalah dengan menemukannya di populasi perempuan yang dikenal sebagai deteksi dini. Beberapa metoda menemukan sel-sel prekanker maupun kanker sudah dikenal sejak cukup lama, yang awalnya berbasis pada sitologi. Dengan majunya pengetahuan tentang perjalanan alamiah penyakit maupun makin berkembangnya teknologi biologi molekular maka ditemukannya teknik-teknik lain yang lebih baik secara sensitifitas maupun spesifitasnya. Setiap metoda mempunyai nilai diagnostiknya sendiri-sendiri, sehingga pemilihannya disesuaikan dengan kebutuhan yang diinginkan.

Kata kunci : metoda, deteksi, HPV

ABSTRACT

Early detection is proposed to reduce the incidence and prevalence of cervical cancer in women population. Most of the detection method was based on cytological examination of the cervical cancer cells. Nowadays, some other methods have been invented which is more sensitive and specific based on natural history of the disease and molecular biology techniques. Every each of method have their own diagnostic value, and their goal.

Key words : method, detection, HPV

PENDAHULUAN

Kematian yang disebabkan oleh kanker serviks uteri pertahunnya diperkirakan sebesar 230.000 juta perempuan dan sebagian besar terdapat di negara-negara berkembang, diantaranya Indonesia. Usaha menurunkan angka kejadian dan kematian dilakukan dengan mengaplikasi program pencegahan, terutama di negara maju, sedangkan untuk negara berkembang belum ada ataupun jika sudah ada belum mencakup paling kurang 80% target sasarannya.

Program deteksi dini dilakukan dengan pemeriksaan sitologi yang didapat dengan melakukan tes Papanicolaou (Pap), dimana diperlukan pengambilan sampel dari serviks. Kemudian sampel akan dibaca oleh sito-teknisi akan membacanya, dengan berusaha mencari adanya kemungkinan sel-sel abnormal yang mengarah keganasan. Sehingga program deteksi ini menjadi mahal, adanya kemungkinan terjadi kesalahan, dan diperlukannya logistik, sehingga sulit diimplementasikan khususnya di negara-negara berkembang.

Dari penelitian-penelitian epidemiologik, molekular, hampir dipastikan bahwa kanker serviks disebabkan oleh infeksi virus papiloma manusia karena ditemukannya virus tersebut pada hampir 100% kasus kanker serviks. Penularan infeksi ini terjadi melalui

hubungan seksual, dan ini umum terjadi pada usia-usia muda. Akan tetapi sebagian besar infeksi akan hilang dalam waktu 1-2 tahun. Infeksi yang persisten oleh subtype yang onkogenik akan meningkatkan resiko terjadinya displasia ataupun kanker serviks.

Dengan majunya teknologi molekular, saat ini sudah dimungkinkan melakukan deteksi adanya infeksi HPV, meskipun jika digunakan secara umum masih cukup mahal dan tidak praktis, apalagi jika digunakan sebagai alat deteksi dini kanker serviks.

Dalam makalah ini dibahas beberapa metoda yang sudah dikenal lama untuk mendeteksi adanya sel-sel abnormal, maupun perkembangan teknologi molekular yang dapat digunakan sebagai alat deteksi.

HUBUNGAN ANTARA INFEKSI HPV DAN KANKER SERVIKS

Meskipun sudah dinyatakan penyebab kanker serviks adalah infeksi HPV onkogenik, akan tetapi untuk sampai lesi intra epitelial maupun kanker serviks masih diperlukan hal-hal lain. Sebagian besar infeksi akan menghilang dalam 1-2 tahun (70% dalam tahun pertama dan 90% akan hilang dalam tahun kedua), sehingga hanya sekitar 5% saja, jika infeksi tersebut tidak ditangani dengan baik akan menyebabkan menjadi kanker serviks. Sebagian kasus infeksi HPV akan menyebabkan lesi

ALAMAT KORESPONDENSI

dr. Bambang Dwipoyono, Sp. OG, SMF Ginekologi Onkologi Lt V RS. Kanker "Dharmais"
 Jl. S. Parman Kav 84-86, Slipi Jakarta Barat
 Email : bdwipoyono@hotmail.com

intra epitelial derajat rendah, akan tetapi sebagian besar akan terjadi regresi menjadi normal kembali; hanya sekitar 15% lesi tersebut berkembang menjadi lesi intra epitelial derajat tinggi dalam 2 tahun. Lesi derajat tinggi inilah yang berpotensi menjadi kanker, sekitar 30% akan menjadi kanker dalam 10 tahun.

Prevalensi infeksi HPV tinggi pada perempuan usia muda, kemudian setelah usia 25 tahun akan menurun. Akan tetapi risiko terjadinya kanker serviks meningkat sampai mendekati usia 50 tahun-an, hal ini dikaitkan dengan adanya infeksi HPV yang persisten.

DIAGNOSIS INFEKSI HPV

Perjalanan alamiah kanker serviks dapat dilihat dengan terjadinya perubahan yang kontinyu dan *gradual* dari lesi serviks derajat rendah kemudian menjadi lebih berat dan mikroinvasi dan kanker serviks. Hal-hal tersebut merupakan basis mendiagnosa, pengobatan maupun pencegahan sekunder. HPV tidak dapat dikultur di laboratorium sedangkan esei imunologik tidak dapat mendeteksi adanya infeksi HPV. Usaha mendeteksi HPV pada awalnya dengan menggunakan sitologik maupun histologik, akhir-akhir ini digunakan molekular untuk mendeteksi sekuens DNA HPV.

1. Sitologik konvensional, metoda ini menggunakan pewarnaan Papanicolaou sudah diperkenalkan tahun 1949 sebelum ditemukan penyebab kanker serviks. Metoda ini digunakan dalam mendeteksi adanya perubahan sel zona transformasi dari serviks. Pelaporan hasil tes pap yang awalnya menggunakan klasifikasi NIS (CIN) menjadi yang terakhir adalah sistim Bethesda. Hal ini merefleksikan makin dimengertinya perjalanan alamiah (biologi) kanker serviks dari bermula hanya melihat perubahan arsitektur sel secara kontinyu dari lesi pra kanker menjadi kanker, kemudian mulai memperhatikan faktor-faktor lain seperti adekuasi spesimen, adanya korelasi dengan yang ditemukan secara histologik dan pengalaman klinik dan laboratorik. Prosedur apusan ini mempunyai beberapa limitasi. Sampel yang tidak adekuat dapat mencapai 8%. Selain itu negatif palsu dapat mencapai 20-30%; hal ini karena sel-sel spesimen yang bergumpal dan tidak tersebar merata pada kaca benda. Kadang-kadang ditemukannya kontaminasi oleh darah, bakteri, jamur yang dapat mengganggu pendeteksian sel abnormal. Rata-rata akan didapatkan 50.000-300.000 per slaid yang harus dievaluasi, jika hanya beberapa sel abnormal di antara sel-sel lain tentu akan sulit ditemukan, terutama jika sudah membaca banyak slaid.
2. Sitologik lapis tunggal (*monolayer*), teknik ini bertujuan menurunkan angka negatif palsu. Sel-sel dikumpulkan dulu ke dalam suatu cairan yang bersifat fiksatif (preservasi). Pengambilan sampel dengan menggunakan sikat (*brush*), yang akan memperbanyak jumlah sel yang dikumpulkan. Slaid dipersiapkan dengan metoda 1 (satu) lapis, keadaan ini akan mencegah terbentuknya lapisan yang tidak merata, sekaligus mempermudah pembacaan untuk membedakan debris dan sel-sel serviks. Saat ini tersedia 2
3. Histopatologik, spesimen diperoleh melalui tindakan kolposkopi dan biopsi target. Setelah melakukan aplikasi asam asetat 3-5% pada serviks untuk kemudian dilakukan evaluasi adanya gambaran epitel putih maupun pola pembuluh darah yang merupakan karakteristik dari displasia maupun kanker serviks. Jika kolposkopi tidak dapat melihat batas skuamokolumnar sebaiknya dilakukan konisasi. Dari hasil biopsi dapat dilihat gambaran patologik adanya infeksi HPV seperti epitel yang hiperplasia (akantosis), degenerasi sitoplasma bervakuol (koilositosis) pada lapisan berkeratinosit dengan inti sel yang atipik. Pewarnaan khusus untuk mendeteksi antigen HPV maupun asam nukleat HPV dilakukan dengan menggunakan antibodi monoklonal maupun poliklonal. Metoda tersebut dikenal sebagai pewarnaan peroksidase-antiperoksidase immuno-sitokimia. DNA maupun RNA HPV juga dapat dideteksi (dari hasil biopsi) dengan teknik hibridisasi *in situ* yang dilabel dengan radioisotop maupun ligan kimiawi untuk kemudian dideteksi secara otoradiografi, fluoresens, maupun perubahan warna yang terjadi diakibatkannya. Teknik *in situ* dapat berupa tidak diamplifikasikan, amplifikasi target dengan PCR maupun amplifikasi sinyal. Adanya pengetahuan tentang imunohistokimia ini memungkinkan mempelajari faktor prognostik lainnya seperti CD44v6, HER-2/neu9 (c-erbB-2), VEGF, MVD, cytokeratin, dan lain-lain dalam penanganan suatu kasus kanker serviks.
4. Deteksi DNA HPV, ada beberapa yang mungkin digunakan secara biologi molekular, diantaranya PCR, teknik hibridisasi berbasis cairan dan deteksi mRNA HPV. Teknik PCR, biasanya diaplikasikan untuk keperluan riset saja adanya keterbatasan hasil keluaran sehingga diperlukan multipel PCR untuk setiap sampel. Terdapat 2 (dua) jenis PCR:

macam sistim *monolayer* yang sudah disetujui Food and Drug Administration (FDA), Amerika Serikat, yaitu sistem *Prepstain* dan *Thinprep*. Sistim *prepstain* menggunakan etanol sebagai larutan preservatif, setelah sel dikumpulkan kemudian dengan menggunakan pengempuran yang berbasis perbedaan densitas dipisahkan sel-sel peradangan maupun debris yang tidak diperlukan. Sel-sel yang sudah dikumpulkan tersebut akan disedimentasikan pada slaid mikroskop untuk kemudian diwarnai secara pewarnaan pap. Sedangkan teknik *Thinprep*, menggunakan cairan preservatif penyangga alkohol. Sel-sel yang sudah dikumpulkan kemudian dicampur dengan larutan preservatif tadi untuk kemudian diempur dengan kecepatan tinggi sehingga terjadi emulsi yang homogen. Untuk memisahkan sel-sel target maka suspensi disaring dengan menggunakan media polikarbonat dengan suasana vakum. Sel-sel yang sudah terfiltrasi dipindahkan pada glas objek kemudian diwarnai dengan pewarnaan pap. Teknik *monolayer* akan meningkatkan sensitifitas dari diagnostik adanya abnormalitas sebesar 4-117%. Adekuasi spesimen juga meningkat 11-29% dari beberapa penelitian.

1). Sangat spesifik, berbasis pada variasi sekuens gen E6 dan E7 dari sub tipe HPV, 2). *General*, bertarget pada gen L1 HPV yang selalu tetap (*conserved*). *Liquid hybridization* yang beredar saat ini dan disetujui oleh *Food Drugs Administration* (FDA) adalah *hybrid capture* (HC). Merupakan esei berbasis antibodi/hibridisasi dengan cairan/amplifikasi sinyal yang digunakan mendeteksi adanya HPV secara kualitatif. DNA HPV yang diperoleh dari spesimen pasien akan didenaturasi terlebih dahulu kemudian dicampur dengan prob RNA yang sudah terdapat dalam tabung tes. Ada 2, prob RNA yang digunakan, prob A yang dapat mengenali sub tipe HPV resiko rendah (6, 11, 42, 43, dan 44) dan prob B yang mengenali sub tipe HPV resiko tinggi (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59 dan 68). Esei ini tidak dapat membedakan diantara sub tipe yang ada dalam prob yang sama. Kompleks ikatan DNA dan RNA akan diimobilisasi pada sumur-sumur (*wells*) yang terdapat pada plat mikrotites yang sudah dilapisi oleh antibodi yang anti hibrid DNA-RNA. Hibrid tersebut akan dikenali oleh antibodi kedua yang berkonjugasi pada alkali fosfatase. Proses ikatan-ikatan ini akan meningkatkan (amplifikasi) dari sinyal untuk kemudian dikenal oleh substrat yang dapat menghasilkan cahaya jika berikatan dengannya untuk kemudian dibandingkan dengan nilai cutoff yang sudah ada. Sensitivitas metoda ini berkisar antara 6,6-17,6 pg/ml HPV. Teknik *hybrid capture* digunakan (pada umumnya) sebagai: 1). Membantu penegakkan diagnosis sub tipe HPV (risiko rendah dengan risiko tinggi), 2). Penapis terhadap kasus dengan ASCUS untuk perlu tidaknya dilakukan kolposkopi, 3). Membantu melengkapi hal tes pap

dengan LSIL atau HSIL sebagai prediktor terjadinya kanker serviks. Akan tetapi tes ini tidak dapat digunakan secara independen tanpa tes Pap.

5. Deteksi mRNA HPV (*In-Cell*), tes viral load ini gunakan tidak hanya untuk mendeteksi adanya mRNA dari gen E6 dan E7 akan tetapi juga melihat keaktifan gen-gen tersebut. Spesimen yang didapatkan dari sitologik berbasis cairan akan melalui esei dengan teknik *flow cytometri* maupun langsung pada slaid tes Pap untuk kemudian divisualisasikan melalui mikroskop *fluoresence*. Sensitivitas mencapai 100% dengan spesifisitas 70% jika dibandingkan dengan tes Pap.

KE Simpulan

Adanya infeksi HPV dapat dideteksi melalui beberapa cara, secara konvensional adalah dengan melihat adanya perubahan pada sel-sel serviks baik secara sitologik maupun histologik, maupun secara molekular yaitu dengan melakukan deteksi adanya DNA dan atau RNA dari HPV.

KE Pustaka an

1. Malloy C, Sherris J, Herdman C. HPV DNA Testing: Technical and Programmatic Issues for Cervical Cancer Prevention in Low Resource Setting. *Path*, 2000
2. Burd E, M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003; 16: 1-17
3. Kohlberger P, Gitsch G. Immunology of cervical cancer. *CME Journal of Gynecologic Oncology* 2001; 6: 383