

Sensitivitas dan Spesifisitas α -Globin Strip Assay dalam Mendeteksi Mutasi Thalassemia- α

Dian Puspita Sari,* Pustika Amalia W**

*Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya/RS Moh Hoesin, Palembang, **Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/RS. Dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta

Latar belakang. Thalassemia- α merupakan kelainan genetik yang dapat menyebabkan gejala klinis berat pada pasien. Deteksi mutasi thalassemia- α di Indonesia umumnya menggunakan metode PCR sebagai baku emas. Saat ini, telah dikembangkan suatu metode tes strip α -globin strip assay yang lebih mudah, cepat, dan murah pengerjaannya.

Tujuan. Mengetahui sensitivitas dan spesifisitas α -globin strip assay dalam mendeteksi mutasi thalassemia- α dibandingkan dengan PCR rutin.

Metode. Uji diagnostik dilakukan mulai bulan Oktober 2014 sampai Maret 2015 terhadap seluruh pasien thalassemia- α beserta keluarga intinya yang berobat di RS Cipto Mangunkusumo dan Lembaga Biomolekular Eijkman. Seluruh subyek diperiksa darah perifer lengkap, indeks eritrosit, analisis Hb, morfologi darah tepi, PCR dan α -globin strip assay. Dihitung kesesuaian, sensitivitas dan spesifisitas α -globin strip assay terhadap PCR rutin dalam mendeteksi mutasi thalassemia- α .

Hasil. Didapatkan 35 subyek, 17 pasien thalassemia- α dan 18 keluarga intinya. Tujuh jenis mutasi ditemukan, mutasi Hb CS dan 3,7 kb merupakan jenis dengan jumlah terbanyak (25,7% dan 17,1%). Empat subyek yang merupakan orang tua pasien ditemukan tidak memiliki mutasi. Pemeriksaan α -globin strip assay memiliki kesesuaian penuh terhadap PCR rutin sehingga didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas sebesar 100%.

Kesimpulan. Metode α -globin strip assay akurat dalam mendeteksi mutasi thalassemia- α sehingga dapat menjadi alternatif yang baik terhadap PCR rutin. **Sari Pediatri** 2016;17(5):349-54.

Kata kunci: thalassemia- α , PCR, α -globin strip assay

Sensitivity and Specificity of α -Globin Strip Assay in Detecting Thalassemia- α Mutations

Dian Puspita Sari, Pustika Amalia W

Background. α -thalassemia is a genetic disorder that may cause severe symptoms in those affected. Detection of α -thalassemia mutations in Indonesia are commonly performed using PCR. A new test strip method (α -globin strip assay) has been developed, that is easier, faster and less costly.

Objective. To determine sensitivity and specificity of α -globin strip assay in detecting mutations in α -thalassemia compared to routine PCR.

Method. A diagnostic study was conducted from October 2014 to March 2015 that included all α -thalassemia patients being treated in Cipto Mangunkusumo Hospital and Eijkman Biomolecular Institute, Jakarta and their immediate family members. Complete blood count, red cell indices, Hb analysis (HPLC), peripheral blood morphology, PCR and α -globin strip assay were performed on all subjects. Agreement, sensitivity and specificity of α -globin strip assay compared to routine PCR were determined.

Result. Thirty five subjects were enrolled into the study, consisted of 17 α -thalassemia patients and their 18 immediate family members. Seven types of mutation were identified, with Hb CS and 3.7 kb mutations were the most common (25.7 and 17.1% respectively). Four parents of patients were found without any mutation. α -globin strip assay has a perfect agreement with PCR, yielding sensitivity and specificity values of 100 %.

Conclusion. α -globin strip assay is accurate in detecting α -thalassemia mutations and can be considered to be a good alternative to routine PCR. **Sari Pediatri** 2016;17(5):349-54.

Keywords: α -thalassemia, PCR, α -globin strip assay

Alamat korespondensi: Dr. Dian Puspita Sari, Sp.A, M.Kes, Departemen Kesehatan Anak RSUP Dr. Mohammad Hoesin/Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Jl. Jendral Sudirman KM 3.5 Palembang,

Thalassemia- α adalah kelainan genetik pada sintesis rantai globin- α yang membentuk Hb. Kelainan ini dapat menyebabkan gejala klinis anemia berat pada penderitanya sehingga memerlukan transfusi darah seumur hidup. Kematian intrauterin dan *hydrops fetalis* juga dapat terjadi pada mutasi yang sangat berat. Pengobatan saat ini terutama masih terbatas pada transfusi darah dan mengatasi kelebihan besi, sedangkan tindakan pencegahan antara lain melalui skrining dan diagnosis prenatal.¹

Indonesia merupakan salah satu wilayah yang memiliki kasus thalassemia cukup tinggi, tetapi frekuensi gen thalassemia- α di Indonesia belum diketahui pasti dan penelitiannya masih sedikit dilakukan.^{2,3} Berdasarkan nilai MCH, frekuensi pembawa sifat thalassemia- α di Jawa adalah 2,7%, Sulawesi Selatan 10%, dan Sumatera Selatan 11%.⁴

Sejumlah 32 jenis mutasi non delesi, 8 jenis mutasi delesi dua gen globin- α dan 21 jenis mutasi delesi satu gen globin- α penyebab thalassemia- α telah terdeteksi sejak tahun 1997, di antaranya 11 jenis ditemukan di Indonesia. Mutasi yang paling sering ditemukan yaitu delesi 2 gen globin- α tipe *South East Asia* (SEA) dan delesi 1 gen tipe 3,7 kilobasa (kb).⁴⁻⁶

Deteksi mutasi thalassemia- α memerlukan suatu metode diagnostik khusus. Lembaga Biomolekular Eijkman Jakarta menggunakan metode tabung tunggal PCR multikompleks dan PCR *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Metode tersebut membutuhkan peralatan laboratorium lengkap, reagen yang mahal, dan tenaga yang terampil.⁷

Saat ini telah dikembangkan suatu metode baru, yaitu metode tes strip (*α -globin strip assay*) yang dapat mendeteksi 21 macam mutasi pada gen globin- α secara simultan yang mencakup mutasi yang terdapat di Indonesia. Pemeriksaan ini hanya membutuhkan DNA dalam jumlah sedikit. Dibandingkan PCR rutin, pemeriksaan *α -globin strip assay* lebih cepat, mudah, dan murah dilakukan. Penelitian Puehringer dkk⁸ menunjukkan sensitivitas metode strip 96,47% dibandingkan PCR rutin. Hasil penelitian Lembaga Biomolekular Eijkman menunjukkan bahwa tes strip memberikan nilai sensitivitas 100% dan spesifisitas 94,74% dalam mendeteksi delesi dua gen globin- α tipe SEA.⁷

Meskipun sensitivitas dan spesifisitas *α -globin strip assay* telah dilaporkan, penelitian untuk populasi

spesifik Indonesia yang lebih luas belum pernah dilakukan sehingga perlu dilakukan suatu studi perbandingan untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas *α -globin strip assay* untuk mendeteksi mutasi thalassemia- α dengan metode PCR rutin sebagai baku emas.

Metode

Penelitian uji diagnostik untuk membandingkan metode diagnosis dan deteksi mutasi gen pada thalassemia- α menggunakan *α -globin strip assay* terhadap PCR rutin di RS Cipto Mangunkusumo dan Lembaga Biomolekular Eijkman mulai bulan Oktober 2014 sampai dengan Maret 2015. Sampel penelitian adalah seluruh pasien yang sudah diketahui mengidap penyakit thalassemia- α berdasarkan nilai indeks eritrosit, analisis Hb (ada atau tidak HbH/Hb Barts) dan atau diketahui jenis mutasinya yang berobat di RS Cipto Mangunkusumo dan Lembaga Biomolekular Eijkman Jakarta beserta keluarga intinya (orang tua atau saudara kandung) yang setuju untuk mengikuti penelitian.

Dilakukan pengambilan darah pada semua subyek untuk pemeriksaan darah perifer lengkap, indeks eritrosit, analisis Hb (HPLC), morfologi darah tepi, dan dilakukan isolasi DNA dari *whole blood*. Penentuan jenis mutasi thalassemia- α dengan teknik PCR menggunakan alat PCR Gene Amp 270. Deteksi jenis mutasi delesi 2 gen globin- α , yaitu SEA, Filipino, dan Thailand serta delesi 1 gen globin- α , yaitu delesi 3,7 kb dan 4,2 kb dilakukan dengan metode PCR multipleks. Deteksi mutasi non delesi yaitu Hb CS [Cd 142 (α_2)], TAA \rightarrow CAA(Gln + 30aa) dan Hb Adana [CD59(α_2), GGC (Gly) \rightarrow (Asp)] dilakukan dengan teknik PCR-RFLP.

Pemeriksaan *α -globin strip assay* dilakukan menggunakan *α -Globin Strip Assay®* (Vienna Lab Diagnostic GmbH) dengan langkah-langkah berupa isolasi DNA, amplifikasi PCR dengan *biotinylated primer*, hibridisasi hasil amplifikasi dengan strip yang mengandung alel spesifik oligonukleotida, dan selanjutnya interpretasi hasil.

Hasil pemeriksaan kemudian dibandingkan untuk mendapatkan nilai-nilai kesesuaian, sensitivitas dan spesifisitas *α -globin strip assay* terhadap pemeriksaan PCR rutin dalam mendeteksi mutasi thalassemia- α .

Hasil

Terdapat 35 orang subyek penelitian, 17 subyek yang merupakan pasien yang telah terdiagnosis thalassemia- α dan 18 subyek keluarga inti pasien tersebut. Karakteristik demografi subyek tertera pada Tabel 1.

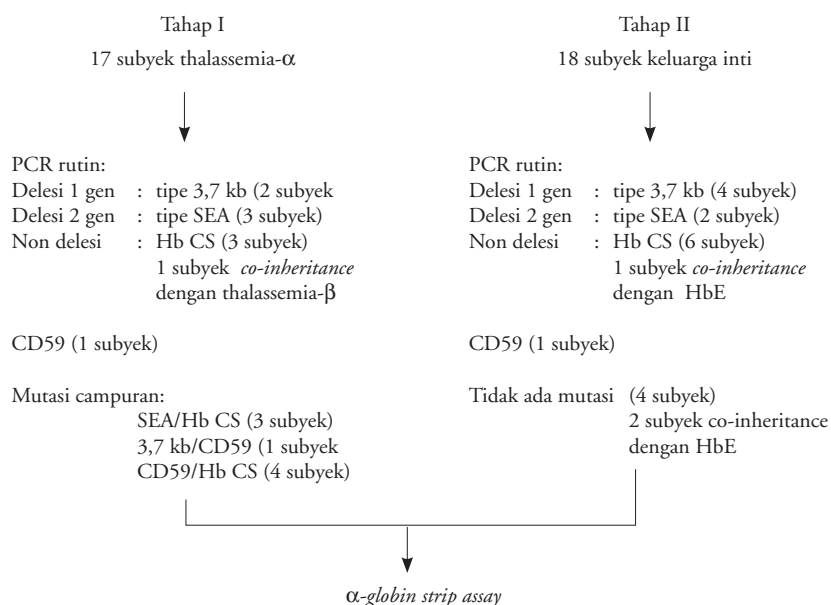
Kelompok pasien terdiri atas 17 subyek dengan usia antara 6 bulan sampai 24 tahun, sedangkan kelompok keluarga inti terdiri atas 18 subyek dengan mayoritas perempuan berusia antara 7 bulan sampai 59 tahun. Dilakukan pemeriksaan PCR rutin pada semua subyek. Rekrutmen dan hasil pemeriksaan PCR rutin tertera pada Gambar 1.

Enam subyek dikeluarkan saat perhitungan dan pembahasan nilai-nilai hematologi dan diikutkan kembali pada saat pengujian uji diagnostik. Hal tersebut dilakukan karena subyek memiliki hasil nilai hematologi dan analisis Hb yang ekstrim. Terdapat empat subjek memiliki *co-inheritance* dengan jenis thalassemia lain, yaitu satu di antaranya dengan *co inheritance thalassemia- β* sehingga memiliki nilai HbF tinggi dan tiga lainnya memiliki *co-inheritance* dengan HbE sehingga memiliki kadar HbA₂ yang tinggi serta terdapat dua subjek yang tidak ditemukan mutasi. Subyek dengan *co-inheritance thalassemia- β* merupakan pasien thalassemia- α dengan mutasi Hb CS, tetapi pasien ini tidak memiliki keluarga inti yang bersedia

untuk diperiksa. Tiga subyek dengan *co-inheritance* HbE merupakan keluarga inti pasien, terdiri atas dua orang ibu tanpa mutasi thalassemia- α , satu memiliki

Tabel 1. Sebaran karakteristik demografi subyek penelitian

Karakteristik demografi	Frekuensi	
	n	%
Jenis kelamin		
Lelaki	13	37,1
Perempuan	22	62,9
Umur (tahun)		
0-5	6	17,1
6-11	3	8,6
12-16	3	8,6
17-25	7	20,0
26-35	8	22,9
36-45	5	14,3
46-55	1	2,9
55-65	2	5,7
Suku		
Jawa	15	42,9
Betawi	2	5,7
Sunda	11	31,4
Melayu	1	2,9
Cina	4	11,4
Batak	2	5,7
Jumlah	35	100



Gambar 1. Rekrutmen subyek dan hasil PCR rutin

anak berupa pasien dengan mutasi SEA dan satu orang lagi memiliki anak dengan mutasi Hb CS serta satu orang ayah dengan mutasi Hb CS dari pasien dengan mutasi CD59/Hb CS. Hasil pemeriksaan hematologi dan analisis Hb setelah eksklusi keenam subyek tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Sebaran nilai indeks eritrosit, analisis Hb, dan nilai hematologi pada subyek (n=29)

Parameter	Pasien, (n=16) rerata (SD)	Pembawa, (n=13) rerata (SD)
MCV (fL)	69,7 (6,1)	72,9 (4,8)
MCH (pg)	20,9(2,4)	23,1(2,6)
MCHC (g/dL)	30,7(2,4)	31,2(1,7)
HbA ₂ (%)	2,4 (0,8)	2,7 (0,3)
HbF (%)	2,0(1,9)	1,2 (2,1)
RBC (M/mcL)	4,0 (SD 0,9)	5,2 (0,6)
RDW (%)	28,1 (SD 8,3)	16,0 (1,6)
Hb (g/dL)	8,7 (SD 1,7)	12,2 (1,3)

MCV: Mean corpuscular volume, MCH: Mean corouscular hemoglobin, MCHC: Mean corpuscular hemoglobin cosentrasi, RBC: Red blood cell, RDW: Red cell distribution width

Nilai indeks eritrosit pada kelompok pasien lebih rendah dibandingkan dengan kelompok pembawa sifat. Nilai MCV, MCH, MCHC, RBC, dan Hb lebih rendah pada pasien dibandingkan pembawa sifat, sedangkan RDW lebih tinggi. Pada analisis Hb, nilai HbA₂ pasien lebih rendah dari pembawa sifat.

Pemeriksaan α -globin strip assay mendapatkan tujuh jenis mutasi yang sama seperti pada PCR rutin. Mutasi Hb CS merupakan jenis yang terbanyak sebesar 25,7% dan yang jumlahnya terkecil adalah mutasi 3,7 kb/CD59 sebesar 2,9%. Empat subyek yang merupakan keluarga inti ditemukan tidak memiliki mutasi. Hasil pemeriksaan α -globin strip assay beserta perbandingannya dengan PCR rutin tertera pada Tabel 3.

Metode α -globin strip assay ditemukan memiliki kesesuaian penuh terhadap PCR rutin sebagai baku emas dalam mendeteksi mutasi thalassemia- α sehingga didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 100%.

Pembahasan

Diagnosis thalassemia- α cukup sulit dan mahal serta memakan waktu lama karena harus menggunakan pemeriksaan DNA. Saat ini tersedia *bedside kit* berupa α -globin strip assay untuk mendeteksi mutasi gen pada thalassemia- α yang pada beberapa studi sebelumnya sudah terbukti mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang baik dibandingkan dengan pemeriksaan baku emasnya PCR. Perangkat tersebut berupa tes yang bisa mendeteksi sekitar 21 mutasi thalassemia- α yang umum dan sering ditemui di seluruh dunia, termasuk mutasi di Asia Tenggara.^{7,8} Pada penelitian kami, pemeriksaan α -globin strip assay dibandingkan terhadap pemeriksaan PCR rutin sebagai baku emas pada subyek

Tabel 3. Jenis mutasi pada subyek berdasarkan pemeriksaan metode α -globin strip assay dengan metode PCR (n=35)

α -globin strip assay	PCR							
	3,7kb	CD59	Hb CS	SEA	3,7kb;CD59	CD59;Hb CS	SEA;Hb CS	Tidak ditemukan mutasi
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
3,7kb	6(17,1)							
CD59		3(8,6)						
Hb CS			9(25,7)					
SEA				5(14,3)				
3,7kb;CD59					1(2,9)			
CD59;Hb CS						4(11,4)		
SEA;Hb CS							3(8,6)	
Tidak ditemukan mutasi								4(11,4)
Jumlah	6(17,1)	3(8,6)	9(25,7)	5(14,3)	1(2,9)	4(11,4)	3(8,6)	4(11,4)

berupa pasien yang telah terdiagnosis thalassemia- α dan keluarga intinya.

Pemeriksaan hematologi dan indeks eritrosit pasien menunjukkan hasil yang sesuai untuk thalassemia- α umumnya, yaitu adanya sedikit penurunan nilai MCH (≤ 27 pg) dan nilai MCV (< 80 fL).^{2,9} Analisis Hb juga menunjukkan hasil yang dapat dijumpai pada pembawa sifat thalassemia- α , yaitu HbA₂ $\leq 3,5\%$. Peningkatan nilai RDW yang cukup tinggi (normal 10-15%) pada penelitian ini sesuai dengan temuan pada thalassemia mayor.¹⁰⁻¹³ Nilai-nilai MCV, MCH, MCHC, Hb, HbA₂ pada subyek keluarga inti yang merupakan pembawa sifat juga menurun dan nilai RDW meningkat meski derajatnya tidak sebesar pada kelompok pasien. Temuan tersebut konsisten dengan karakteristik pembawa sifat.^{2,10,14} Hasil nilai hematologi dan analisis Hb yang mungkin tidak spesifik pada pembawa sifat menyebabkan pemeriksaan genetik sangat penting nilainya dalam mendeteksi pembawa sifat thalassemia- α .

Deteksi mutasi thalassemia- α menggunakan α -globin strip assay memiliki kesesuaian penuh dengan pemeriksaan PCR sebagai baku emas sehingga didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas masing-masing sebesar 100%. Hasil tersebut tidak berbeda jauh dengan penelitian oleh Puehringer dkk⁸ yang melaporkan bahwa metode strip memiliki potensi mendiagnosis mutasi thalassemia- α dengan sensitivitas 96,4%. Melihat hasil dari penelitian ini, α -globin strip assay dapat digunakan sebagai metode untuk mendeteksi mutasi thalassemia- α dengan kemampuan deteksi sama, tetapi memiliki keunggulan dalam segi waktu dan biaya dibandingkan dengan PCR rutin.

Kami menemukan tujuh jenis mutasi, yaitu 3,7kb; CD59; Hb CS; SEA; 3,7kb/CD59; CD59/Hb CS; dan SEA/Hb CS. Mutasi Hb CS dan mutasi 3,7 kb merupakan jenis mutasi dengan proporsi terbesar, sedangkan mutasi 3,7kb/CD59 paling jarang ditemukan. Jenis dan sebaran mutasi ini sesuai dengan penelitian terdahulu di Indonesia yang menemukan 11 jenis mutasi thalassemia- α .^{4,6} Kekhawatiran penggunaan metode α -globin strip assay adalah rentang mutasi yang dapat dideteksi lebih sedikit dibandingkan metode PCR rutin. Pada penelitian kami semua mutasi dapat terjaring oleh pemeriksaan α -globin strip assay. Terdapat empat subyek pada keluarga inti yang semuanya adalah orang tua pasien dengan klinis thalassemia- α minoryang tidak terdeteksi adanya mutasi, tetapi hasil tersebut juga telah terkonfirmasi menggunakan PCR rutin.

Penelitian ini tidak berbasis populasi, tetapi menggunakan subyek spesifik, yaitu pasien yang telah terdiagnosis berdasarkan analisis Hb dan keluarganya sehingga nilai-nilai diagnostik mungkin tidak dapat diterapkan untuk skrining populasi. Skenario yang menjadi dasar pemikiran penelitian ini adalah klinisi harus melakukan deteksi pada keluarga untuk konseling genetik dan pencegahan. Akan tetapi, hasil penelitian ini dapat menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut yang lebih luas, misalnya skrining pembawa sifat pada populasi.

Kesimpulan

Metode α -globin strip assay akurat dalam mendeteksi mutasi thalassemia- α dibandingkan metode PCR rutin sebagai baku emas dan memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dan dapat mencakup mutasi yang ditemukan di Indonesia. Keunggulan berupa pengerjaan yang lebih sederhana, cepat, dan biaya yang lebih murah menyebabkan metode α -globin strip assay dapat menjadi alternatif yang baik untuk mendeteksi mutasi pada thalassemia- α . Diperlukan penelitian lanjutan dengan menggunakan sampel yang lebih banyak pada subyek dengan thalassemia- α maupun pembawa sifat thalassemia- α .

Daftar pustaka

1. Hoffbrand AV, Pettit JE. Genetic disorders of haemoglobin. Dalam: Hoffbrand AV, Pettit JE, penyunting. Color atlas of clinical hematology. Edisi ketiga. London: Mosby; 2001.h.85-98.
2. Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Peto TE, Clegg JB, Weatherall DJ. Alpha+-thalassemia protects children against disease caused by other infection as well as malaria. Proc Natl Sci USA 1997;94:14736-41.
3. Liu YT, Old JM, Miles K, Fisher CA, Weatherall DJ. Rapid detection of alpha-thalassemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reaction. Br J Haematol 2000;108:295-9.
4. Setianingsih I, Harahap A, Nainggolan IM. Alpha thalassaemia in Indonesia: phenotypes and molecular defects. Adv Exp Med Biol 2003;531:47-55.
5. Lie-Injo LE. Hemoglobin of newborn infant in Indonesia. Nature 1959;183:1125-6.

6. Lie-Injo LE. Haemoglobinopathies in East Asia. *Ann Hum Genet* 1964;28:101-11.
7. Puspitasari S, Supartini, Nainggolan IM. Validasi metode tes strip (α -globin strip assay) terhadap metode PCR rutin dalam mendeteksi mutasi thalassemia alfa tipe Southeast Asia. *Bionatura* 2012;14:133-9.
8. Puehringer H, Najnamadi H, Law W, Kruglunger, Vip V, Pissard dkk, Validation of reverse-hybridization strip assay for the simultaneous analysis of common α thalassemia point mutation and deletion. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:605-10.
9. Liliani RV. Cacat molekul thalassemia- α dalam populasi Melayu di Palembang (tesis). Palembang: Program Pasca Sarjana Universitas Sriwijaya, 2004.
10. Bowman E, Watts J, Burrows R, Chui DH. Hemoglobin bart's hydrops fetalis syndrome. *Haematologia (Budap)* 1987;20:125-30.
11. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemia syndromes. Edisi keempat. Oxford: Blackwell Science; 2001.
12. Cao A, Moi P. Regulation of the globin genes. *Pediatr Res* 2002;51:415-21.
13. Mukiarti D, Wahidiyat PA, Nainggolan I, Setianingsih I. Thalassemia alpha mayor dengan mutasi non delesi heterozigot ganda. *Sari Pediatri* 2006;3:244-50.
14. Fucharoen S, Winichagoon P. Prevention and control of thalassemia in Asia. *Asian Biomed* 2007;1:1-6.