

Diagnosis Serologis Infeksi *Human Immunodeficiency Virus*

Edyana Durman

Departemen Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia

Abstrak

Jumlah penderita AIDS setiap tahun terus bertambah. Penyebabnya adalah *human immuno deficiency virus* (HIV), termasuk golongan retrovirus yang menyerang sistem kekebalan tubuh dan mampu merangsang pembentukan antibodi. Protein yang diproduksi oleh virus tersebut berupa glikoprotein (gp) 120/126, (gp) 41 & p 24, (gp) 34, (gp) 140 dan p 26. Diagnosis infeksi HIV dapat dilakukan dengan mendeteksi antibodi atau antigen. Pemeriksaan serologi yang dipakai untuk menegakkan diagnosis HIV diharapkan mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Pemeriksaan yang mempunyai sensitifitas tinggi akan memberikan hasil positif pada orang yang terinfeksi HIV dan memberikan hasil negatif palsu yang kecil. Pemeriksaan yang mempunyai spesifisitas yang tinggi akan memberikan hasil yang negatif pada orang yang tidak terinfeksi HIV dan memberikan hasil positif palsu yang rendah. Metode pemeriksaan antibodi HIV terdiri atas pemeriksaan memakai metode ELISA/EIA yang harus dipastikan dengan metode western blot atau deteksi asam nukleat.

Kata kunci: HIV antibodi, ELISA, *rapid test*

Serological Diagnosis for Human Immunodeficiency Virus

Abstract

The number of people living with HIV and AIDS increasing every year. The causative agent is human immunodeficiency viruses (HIV), classified as retrovirus group which attacks the immune system and stimulates the formation of antibody. A group of proteins produced by HIV are glycoprotein (gp) 120/126, (gp) 41 & p 24, (gp) 34, (gp) 140, and p 26. Diagnosis of HIV infection can be done by detecting and measuring the antibody or antigen. Serological diagnostic should have high sensitivity and high specificity. High sensitivity test will give positive results in HIV-infected people with a very low false negative results. Whereas high specificity examination would give negative results in people who are not infected with HIV and a very low false positive results. ELISA/EIA, immunoblotting methods (western blot) and rapid method are the common available methods being used.

Key word: HIV antibody, ELISA, Rapid test

Pendahuluan

Di seluruh dunia, sejak tahun 1981 pasien terinfeksi HIV yang meninggal karena mencapai stadium AIDS berjumlah sekitar 25 000 000 orang. Di Indonesia, pada triwulan I tahun 2012 tercatat 5 991 kasus baru terinfeksi HIV dan 551 orang penderita AIDS.¹ Infeksi HIV ditularkan melalui kontak seksual, transfusi darah, secara transplasental dari ibu ke anak, penggunaan narkotika intra vena dan *needle stick injury*. *Human immunodeficiency virus* termasuk golongan retrovirus yang dapat menyerang sistem kekebalan, dan mampu merangsang pembentukan antibodi sehingga dalam tubuh penderita HIV selain ada antigen yang merupakan bagian virus juga terbentuk antibodi terhadap virus HIV.²

Sebagai reaksi terhadap infeksi, tubuh membentuk antibodi yang dapat ditemukan dalam cairan tubuh seperti darah. Hal tersebut dapat dipergunakan untuk diagnosis penyakit infeksi. Diagnosis infeksi HIV dapat dilakukan dengan deteksi antibodi. Antibodi yang paling banyak ditemukan adalah antibodi anti HIV-1. Antibodi akan terbentuk 3 – 6 bulan sesudah infeksi HIV. Sebelum periode itu antibodi belum dapat dideteksi, namun pasien dapat menularkan virus ke orang lain. Periode tanpa antibodi tersebut dinamakan periode jendela. Dengan menggunakan uji *enzyme immune assay* (EIA) generasi ketiga periode jendela dapat dipersingkat menjadi tiga minggu.

Hasil pemeriksaan serologi pada HIV sangat dipengaruhi oleh sensitifitas dan spesifisitas perangkat yang digunakan. Cara pemeriksaan yang mempunyai sensitifitas yang tinggi akan memberikan hasil positif pada orang terinfeksi HIV namun dapat memberikan hasil positif palsu, sedangkan pemeriksaan yang mempunyai spesifisitas tinggi akan memberikan hasil negatif pada orang yang tidak terinfeksi HIV dan hanya sedikit memberikan hasil positif palsu.^{3,4}

Pemeriksaan serologi untuk diagnosis HIV diharapkan mempunyai sensitifitas dan spesifisitas tinggi.⁵ Pemeriksaan serologi yang digunakan untuk diagnosis HIV adalah deteksi antibodi. Pemeriksaan tersebut terdiri atas pemeriksaan penyaring dengan metode ELISA dan *rapid*, sedangkan metode *western blot* (WB) digunakan untuk memastikan hasil pemeriksaan penyaring.

Untuk diagnosis infeksi HIV, *World Health Organization* (WHO) menetapkan tiga strategi.⁶

Strategi I, bahan klinik yang diperiksa menggunakan satu jenis pemeriksaan yang harus memiliki sensitifitas yang tinggi. Bahan klinik yang reaktif dinyatakan positif sedangkan yang tidak reaktif dinyatakan negatif. Hasil pemeriksaan strategi I tidak boleh dipakai untuk menegakkan diagnosis HIV akibat transfusi atau transplantasi.

Strategi II, semua bahan klinik diperiksa menggunakan dua jenis pemeriksaan. Pemeriksaan pertama harus lebih sensitif dibandingkan pemeriksaan kedua, memakai antigen atau prinsip reaksi berbeda dari pemeriksaan pertama. Bila pada pemeriksaan pertama hasilnya tidak reaktif dinyatakan hasilnya negatif, tetapi jika pemeriksaan pertama reaktif dan pemeriksaan kedua juga reaktif maka dinyatakan hasil pemeriksaan positif HIV. Sebaliknya bila pemeriksaan pertama reaktif sedangkan pemeriksaan kedua tidak reaktif, harus diperiksa ulang. Bila hasilnya tetap sama dinyatakan *indeterminate*. Tetapi bila pada pemeriksaan ulang, didapatkan pemeriksaan pertama tidak reaktif dan pemeriksaan kedua juga tidak reaktif maka hasilnya dinyatakan HIV negatif.

Strategi III, semua bahan klinik diperiksa menggunakan tiga jenis metode pemeriksaan. Pemeriksaan pertama harus lebih sensitif, dan pemeriksaan kedua harus menggunakan

antigen atau prinsip pemeriksaan yang berbeda dari yang pertama. Pemeriksaan yang ketiga harus menggunakan antigen atau prinsip pemeriksaan yang berbeda dari pertama dan kedua. Jika pemeriksaan pertama tidak reaktif hasil dinyatakan negatif. Tetapi bila pemeriksaan pertama, kedua dan ketiga reaktif hasil dinyatakan positif. Sebaliknya jika pada pemeriksaan pertama reaktif, pemeriksaan kedua reaktif dan pemeriksaan ke tiga tidak reaktif, atau pemeriksaan pertama reaktif, pemeriksaan ke dua tidak reaktif dan pemeriksaan ketiga reaktif maka dinyatakan *indeterminate*.^{6,7}

Pemeriksaan dengan Sistem *Enzyme Immuno Assay*

Pemeriksaan *enzyme immuno assay* (EIA) adalah jenis pemeriksaan penyaring yang efektif dan banyak dipakai untuk mendeteksi antibodi anti HIV karena mempunyai sensitifitas yang tinggi.⁸ Sebagai bahan pemeriksaan dipakai darah, cairan rongga mulut, atau urin. Umumnya metode EIA mendeteksi antibodi terhadap protein p6 dan gp 41 yang merupakan bagian virus HIV.^{9,10} Hasil pemeriksaan dibandingkan dengan nilai *cut off* yang didapat saat pemeriksaan ELISA dilakukan.

Bila nilai sampel lebih kecil dari nilai *cut off* dianggap non reaktif, tetapi bila nilai sampel lebih besar dari nilai *cut off*, pemeriksaan diulang kembali (induplikat) dengan memakai sampel yang baru. Jika hasil pemeriksaan ulangan tersebut lebih besar dari nilai *cut off* berarti hasil pemeriksaan reaktif terhadap HIV. Bila nilai sampel mendekati nilai *cut off* pemeriksaan ulang dilakukan 2-4 minggu kemudian, karena diharapkan dalam periode tersebut antibodi yang terbentuk sudah dapat dideteksi.¹¹

Hasil negatif palsu dapat terjadi karena rendahnya titer antibodi atau akibat terapi immunosupresi. Hasil positif palsu dapat terjadi karena kesalahan teknik pemeriksaan

(pencucian yang salah, suhu yang tidak tepat atau sampel terkontaminasi), sampel mengalami hemolisis atau lipemik atau terjadi reaksi silang dengan retrovirus lain. Setiap hasil pemeriksaan EIA harus dikonfirmasi dengan pemeriksaan WB karena lebih spesifik.



Gambar 1. Lempeng mikro untuk uji EIA (diunduh dari virology-online.com/viruses/HIV.htm)

Pemeriksaan Western Blot

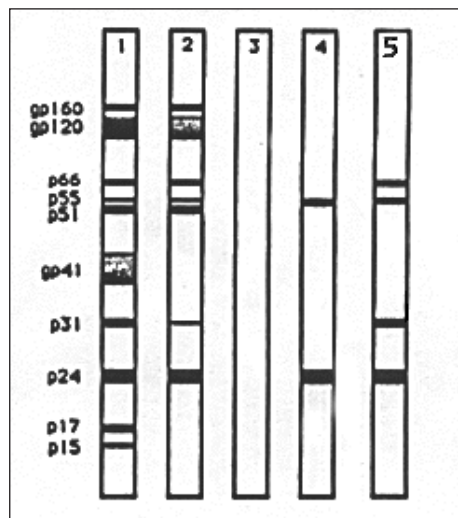
Pemeriksaan WB merupakan metode konfirmasi yang paling banyak dipakai setelah dilakukan pemeriksaan penyaring misalnya dengan EIA. Prinsip pemeriksaan nya adalah reaksi antara antibodi anti HIV dengan antigen HIV.

Protein yang berasal dari virus HIV didenaturasi dan selanjutnya dipisahkan dengan metode elektroforesis dengan menggunakan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel* (SDS-PAGE). Protein dengan berat molekul besar akan bermigrasi lambat, sedangkan protein dengan berat molekul ringan akan bermigrasi lebih cepat. Selanjutnya dari gel, protein ditransfer ke membran nitroselulose dan direaksikan dengan serum pasien. Selanjutnya dilakukan visualisasi hingga hasil WB terlihat sebagai pita.^{12,13,14}

Hasil dinyatakan positif bila terdapat pita sekurang-kurangnya dua dari antigen berikut ini yaitu, inti (Gag) protein (p24), (env) glikoprotein (gp41) atau gp 120/160,

sedangkan hasilnya negatif bila tidak ditemukan pita.^{15,16} Hasil pemeriksaan meragukan bila ditemukan ada pita tetapi tidak memenuhi kriteria untuk disebut positif. Menurut WHO bila hasil meragukan, dilakukan pemeriksaan ulang setelah dua minggu. Bila hasil tetap negatif selama satu bulan berarti infeksi HIV dapat disingkirkan.¹⁷

US Food and Drug Administration (FDA) menyetujui empat jenis pemeriksaan *rapid test* yaitu *OraQuick® Advance Rapid, Reveal™ G-2 Rapid HIV-1 Antibody test, Uni-Gold Recombigen, Multispot HIV-1/HIV-2*.



Gambar 2. Interpretasi hasil pemeriksaan WB untuk deteksi antibodi HIV. 1). kontrol positif (kuat), 2). kontrol positif (lemah), 3). Kontrol negatif, 4). *indeterminate profile*, 5). *indeterminate profile (highly suggestive)* (dimodifikasi dari virology-online.com/viruses/HIV.htm)

Rapid Test

Rapid test untuk deteksi antibodi anti HIV telah banyak digunakan selama dekade terakhir.¹⁸ Dasar *rapid test* adalah immunokromatografi untuk deteksi antibodi HIV-1 dan antibodi HIV-2 secara kualitatif. Pemeriksaan di atas mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus serta tidak memerlukan tenaga terlatih. Hasilnya dapat dibaca dalam waktu kurang dari 30 menit. Karena itu *rapid test* sangat berguna untuk membantu menetapkan status medis pada orang yang diduga terinfeksi HIV sehingga dapat mengurangi penularan infeksi karena hasil pemeriksaan diperoleh dalam waktu yang singkat dan pasien dapat segera ditangani.

OraQuick Rapid HIV-1 / 2 Antibody Test

Spesimen klinik berupa darah vena, atau ujung jari dan cairan rongga mulut. Darah dimasukan ke dalam tabung pengencer yang mengandung 1 ml larutan buffer lalu dikocok hingga merata, kemudian dimasukkan alat penguji (strip/carik celup) ke dalam tabung pengencer tersebut. Cairan oral diperoleh dengan usapan pada gusi luar atas dan bawah, yang langsung dimasukan ke dalam tabung pengencer. Antibodi anti HIV pada sampel akan mengikat reagen protein A koloid emas. Kompleks antibodi HIV-protein koloid emas akan bereaksi dengan antigen di membran nitroselulosa yang mengandung peptida sintetik gp 41 (HIV-1) dan gp 36 (HIV-2) yang sesuai

Table 1. Kit untuk pemeriksaan antibodi HIV yang disetujui US *Food and Drug Administration* (FDA)

Rapid HIV test	Jenis spesimen	Sensitivitas	Spesifisitas
OraQuick® Advance Rapid	Oral fluid	99.3% (98.4–99.7)	
	Whole blood (fingerstick or venipuncture)	99.6% (98.5–99.9)	100% (99.7–100)
	Plasma	99.6% (98.9–99.8)	99.9% (99.6–99.9)
Reveal™ G-2 Rapid HIV-1 Antibody test	Serum	99.8% (99.5–100)	99.1% (98.8–99.4)
	Plasma	99.8% (99.5–100)	99.1% (98.8–99.4)
Uni-Gold Recombigen® or venipuncture HIV test	Whole blood (fingerstick)	100% (99.5–100)	99.7% (99.0–100)
Multispot HIV-1/HIV-2	Serum	100% (99.94–100)	99.93% (99.79–100)
Rapid test	Plasma	100% (99.94–100)	99.91% (99.77–100)

Dikutip dari: Greenwald *et al.*¹⁹

dengan *goat anti-human* IgG dan akan membentuk warna merah. Garis merah yang muncul di area kontrol menandakan hasil yang reaktif. Hasil dibaca dalam waktu 20 sampai 40 menit. Bila pembacaan kurang dari 20 menit (terhitung mulai carik celup dimasukan ke dalam tabung pengencer) kemungkinan akan menghasilkan negatif palsu. Sebaliknya bila pembacaan hasil lebih dari 40 menit akan memberikan hasil positif palsu. Bila tidak timbul warna merah maka dapat disebut hasil non reaktif.

Antibodi HIV-1 dan antibodi HIV-2 tidak dapat dibedakan dengan pemeriksaan ini.^{20,21} Hasil pemeriksaan yang positif lemah pada *rapid test* harus dipastikan dengan tes EIA atau Western Blot.^{9,20,22} Biasanya bahan pemeriksaan yang berasal dari cairan oral

tidak seakurat bahan dari pemeriksaan darah. Pada laporan kasus didapatkan bayi berusia di bawah 18 bulan yang diperiksa dengan rapid tes memberikan hasil negatif palsu. Hal itu mungkin disebabkan tertekannya pembentukan antibodi bayi oleh antibodi IgG ibu dan akibat immunosupresi.²¹

Polymerase Chain Reaction

Untuk diagnosis infeksi HIV selain deteksi antibodi juga dikembangkan deteksi antigen diantaranya dengan mengukur *viral load* memakai metode *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi asam nukleat virus HIV. Dilakukan biasanya pada bayi di bawah usia 18 bulan karena pada usia kurang 18 bulan antibodi belum terbentuk.

Tabel 2 : Perbedaan tes serologi HIV

	Elisa	WB	Rapid
Deteksi	Antibodi anti HIV IgG/ IgM	Antigen inti(Gag) protein (p 24),envelope glikoprotein (gp 41)atau gp 120/160	Antibodi HIV secara kualitatif
Kemudahan pekerjaan	Mudah dilakukan	Sulit	Mudah
Biaya	Relatif murah	Mahal	Relatif murah
Hasil	< 24 jam	> 24 jam	< 30 menit

Diadaptasi dari: Kleinman *et al.*¹⁵ Guan,¹⁶ Branson¹⁸

Dengan pengukuran HIV RNA di dalam darah, dapat dinilai besarnya replikasi virus. Tiap virus HIV membawa dua kopi RNA. Jika hasil pemeriksaan didapatkan jumlah HIV RNA sebesar 20 000 kopi per ml maka berarti di dalam tiap mililiter darah terdapat 10 000 partikel RNA virus dalam plasma yang dapat diukur secara kuantitatif melalui beberapa cara misalnya *polymerase chain reaction* (PCR), *branched-chain DNA* (b-DNA), dan *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA).

Pengukuran HIV RNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

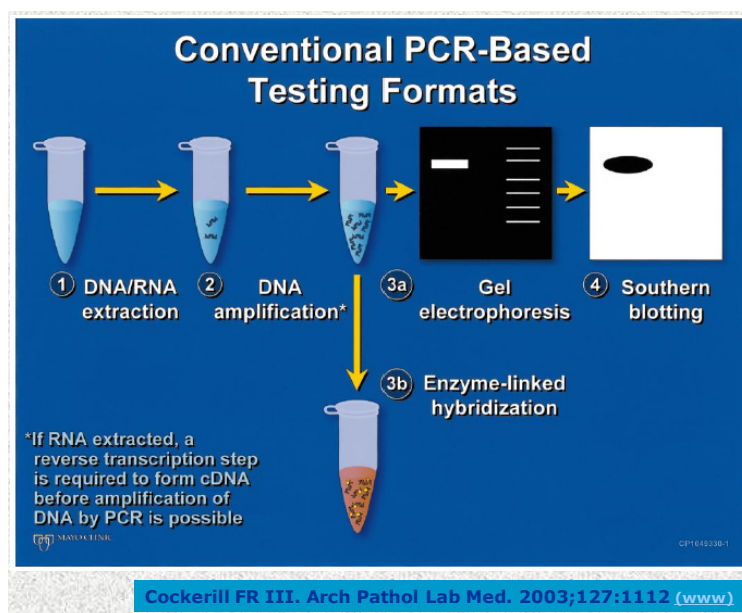
Saat ini pemeriksaan yang memiliki sensitifitas tinggi adalah amplifikasi asam nukleat RNA HIV dalam plasma dengan cara PCR. Pemeriksaan tersebut didasarkan pada amplifikasi target menggunakan enzim *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang merubah RNA menjadi DNA. Dengan metode ultrasensitif tersebut dapat di deteksi RNA HIV antara 50 – 75000 kopi/ml. Antikoagulan yang dipakai untuk pemeriksian tersebut adalah

ethylene diamine tetra acetate (EDTA) dan *acid citrate dextrose* (ACD).

Pemeriksaan kuantitatif virus HIV juga dapat dilakukan dengan metode hibridisasi b-DNA yang didasarkan pada amplifikasi sinyal *branched DNA*. Pemeriksaan itu sensitifitasnya tinggi dan dapat mendeteksi hingga 50 kopi RNA/ml plasma.

Pengukuran HIV RNA dengan *Nucleic Acid Sequence-based Amplification* (NASBA)

Pada pemeriksaan NASBA, dilakukan isolasi asam nukleat dengan cara lisis, sehingga terjadi ikatan RNA virus dengan mikropartikel *silicon dioxide* (silica), diikuti amplifikasi isothermal (*target amplification*) memakai *reverse transcriptase*, *RNAase H*, dan *T7 RNA polymerase*. Sensitivitas pemeriksaan itu sekitar 40 RNA kopi/ml. Antikoagulan yang dipakai adalah EDTA, ACD, dan heparin. Hasil pemeriksaan *viral load* dikatakan bermakna bila didapatkan hasil tiga kali lebih tinggi atau lebih rendah dari hasil pemeriksaan sebelumnya.²⁴



Gambar 3. Pengukuran HIV RNA dengan *branched chain deoxyribonucleic acid* (b-DNA). Dengan cara tersebut beban virus dapat ditetapkan dan diagnosis infeksi HIV dapat ditegakkan. (Sumber: dimodifikasi dari Cockerill²³)

Penutup

Pemeriksaan utama untuk menegakkan diagnosis infeksi HIV adalah pemeriksaan serologi untuk deteksi antibodi. Pada perkembangannya juga dapat dilakukan deteksi antigen. Pemeriksaan serologi terdiri atas pemeriksaan penyaring dan pemeriksaan konfirmasi yang masing-masing mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Pemeriksaan penyaring dilakukan dengan metode ELISA dan *rapid test* sedangkan metode WB digunakan untuk konfirmasi. Pemeriksaan antigen atau partikel virus dilakukan untuk menetapkan *viral load* dengan memakai metode PCR.

Daftar Pustaka

1. Komisi Penanggulangan AIDS. Diunduh dari <http://www.aidsindonesia.or.id> pada tanggal 29 Maret 2012
2. Serological test for HIV. Diunduh dari <http://www.wellness.com/reference/allergies/serological-tests-for-hiv> pada tanggal 29 Maret 2012
3. HIV test. Diunduh dari http://www.lumrix.net/medical/serology/hiv_test.html pada tanggal 29 Maret 2012
4. Tes HIV-AIDS. Diunduh dari http://zubairidjoerban.wordpress.com/2008/07/27/test-hiv-aids_ tanggal 29 Maret 2012
5. Constantine N. HIV Antibody assay .Diunduh dari <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-02-01> pada 30 Maret 2012
6. Yoveline A, Wahyuningsih R, Kumalawati Y, Sungkar S. Peran rapid oral HIV tes dalam diagnosis infeksi HIV. *Maj Kedokt Indon*. 2008; 58: 525–30
7. Sato PA, Maskill WJ, Tamashiro H, Heymann DL. Strategies for laboratory HIV testing: an Examination of alternative approaches not requiring western blot. *Bull World Health Organ*. 1994; 72 (1): 129–134.
8. Fletcher M, Burbano MJ, Posner G, Lopez V, Lai H, Baum MK. Diagnosis of human Immunodeficiency virus infection using an immunoglobulin E-based assay. *Clin Diag Lab Immunol*. 2000; 7:55-7
9. Khurana S, Norris PJ, Haynes BT, Park S, Sasono P, Milsana K, *et al*. HIV-selectest enzyme immunoassay and rapid test. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 281-85.
10. Elisa test for HIV. Diunduh dari <http://www.buzzle.com/article/elisa-test-for-hiv.html> tanggal 30 Maret 2012
11. Yeom JS, Lee JB, Ryu SH, Kang HJ, Kim S, Kim YA, *et al*. Evaluation of a new third generation ELISA for the detection of HIV infection. *Ann Clin Lab Sci*. 2006; 36:73-8
12. Western blotting: sample preparation to detection. Diunduh dari: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=411572> pada 30 Maret 2012
13. Western Blot. Diunduh dari <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=8259A7B67DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193> pada tanggal 30 Maret 2012.
14. Western blot test for HIV. Diunduh dari <http://westernblot.org/western-blot-test/> tanggal 30 Maret 2012.
15. Kleinman S, Busch MP, Hall L, Thomson R, Glynn S, Gallahan D, *et al*. False- Positive HIV-1 test results in a low-risk screening setting of voluntary blood donation *JAMA* 1998; 208:1080-5.
16. Guan M. Frequency, causes, and new challenges of indeterminate results in western blot confirmatory testing for antibodies to HIV. *Clin Vacc Immunol*. 2007; 14:649-59
17. Anderson GJ, M Cipolla C, Kennedy RT. Western blotting using capillary electrophoresis *Ann Chem*. 2011; 83: 1350-5.
18. Branson BM. Point-of-care rapid test for HIV antibodies. Diunduh dari <http://www.cdc.gov/hiv> pada tanggal 30 Maret 2012
19. Greenwald J L, Burstein G R, Pincus J, Branson B. A Rapid review of rapid HIV antibody tests. *Curr Infect Dis Report*. 2006; 8:125– 31
20. Pesce MA, Chow KF, Hod E, Spitalnik SL . Rapid HIV antibody testing. *Clin Pathol*. 2006; 126 : 61-70.
21. Zhang Y, Wang J, Wilson GJ, Tang YW, Zoulu H. Negative results of a rapid antibody test for HIV in 16 month-old infant with AIDS. *Ann Clin Lab Sci*. 2008; 38: 293-5
22. Geenwald JL, Burstein GR. A rapid review of rapid HIV antibody test. Diunduh dari: http://www.cdc.gov/hiv/topics/testing/resources/journal_article/pdf/rapid_review.pdf pada tanggal 20 Maret 2012
23. Cockerill FR III. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1112-20
24. Ciccaglione AR, Miceli M, Pisani G, Bruni R, Iudicone P, Costantino A, *et al*. Improving HIV-2 detection by a combination of serological and nucleic acid amplification test assay. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2902-8