

**Deteksi *Cryptosporidium sp* pada Feses Pasien
Terinfeksi HIV/AIDS dengan Diare Kronis**

TESIS

SRI WAHDINI
0606150795



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
AGUSTUS 2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun
dirujuk telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Sri Wahdini

NPM : 0606150795

Tanda tangan :

Wahdini




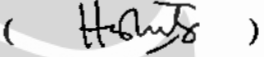
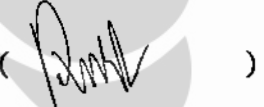


Tanggal : 31 Agustus 2009

HALAMAN PENGESAHAN

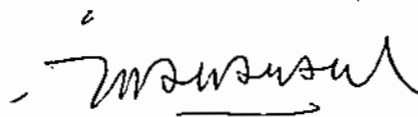
Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Sri Wahdini
NPM : 0606150795
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Imunologi
Judul Tesis :
Deteksi *Cryptosporidium sp* pada Feses Pasien
Terinfeksi HIV/AIDS dengan Diare Kronis

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr Agnes Kurniawan, PhD, SpParK ()
Pembimbing II : dr. Evy Yuniastuti, SpPD ()
Penguji I : Drs. Kusmardi, MS ()
Penguji II : Dr. Taniawati Supali ()
Penguji III : dr. Anis Karuniawati, SpMK, Ph.D ()

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 10 Agustus 2009
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



(Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi)

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SubhanahuwaTa'ala, Maha Penguasa Segala, karena atas segala rahmat dan karunia-Nya maka penulis dapat menyelesaikan Tesis ini meskipun masih banyak terdapat kekurangan disana-sini.

Tesis ini dilaksanakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta. Penelitian dalam Tesis ini berjudul "Deteksi *Cryptosporidium sp* pada Feses Pasien Terinfeksi HIV/AIDS dengan Diare Kronis".

Selama penelitian Tesis dan proses penyusunan laporan, penulis merasa mendapatkan banyak bantuan dan bimbingan serta dukungan dari segenap pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini dengan segala hormat dan kerendahan hati, penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

1. Dr. dr. Ratna Sitompul, Sp.M (K) sebagai dekan FKUI dan Prof. dr. Menaldi Rasmin, Sp. P (K), FCPP sebagai dekan FKUI periode 2004-2008 yang memberi kesempatan penulis menuntut ilmu di FKUI.
2. Dr. rer. physiol.dr. Septelia Inawati W. sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan pengarahan selama penulis menjalankan pendidikan.
3. Prof. dr. Saleha Sungkar, MS, DAP&E, Sp. ParK sebagai Kepala Departemen Parasitologi FKUI dan dr. Alida Harahap, PhD, SpPK serta DR. Drs. Heri Wibowo, Mbiomed sebagai ketua kekhususan Imunologi atas nasehat dan motivasi selama pendidikan.
4. dr. Agnes Kurniawan, Ph.D., Sp.ParK, sebagai dosen pembimbing I dalam tesis sekaligus dosen wali/ penasehat akademik pada Program Sudi Ilmu Biomedik Kekhususan Imunologi FKUI. Terima kasih atas bimbingan dan dukungan yang diberikan selama penulis mengerjakan tesis.
5. dr. Evy Yuniastuti, SpPD sebagai dosen pembimbing II dalam tesis. Terima kasih atas bimbingannya dalam penelitian tesis.
6. dr. Nikmah Salaria Idris, SpA, atas penggunaan sampel dan data sekundernya.

7. DR. Drs. Heri Wibowo, MS atas bimbingan metode statistika penelitian.
8. Seluruh staf pengajar/dosen, tata usaha dan karyawan PMIB FKUI, Departemen Parasitologi dan POKDISUS.
9. Suami, Amirullah yang selalu memberikan dukungan penuh selama penyelesaian studi. Terima kasih atas kesabaran dan keikhlasannya.
10. Alm. Marzuki Mizan dan ibu Yuniati sebagai orang tua yang begitu besar perannya dalam mendidik dan membimbing semenjak kecil. Begitu juga dengan bapak dan ibu mertua yang juga sangat mendukung studi ini. Serta saudara-saudara tercinta.
11. Teman-teman seperjuangan di PMIB FKUI, semoga perjuangan kita memberikan hasil yang bermanfaat untuk masa depan.
12. Semua guru yang telah mendidik semenjak kecil hingga sekarang.
13. Serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu saran, masukan dan kritik untuk kemajuan penulis di masa depan sangat diharapkan. Penulis berharap semoga tesis ini bermanfaat kepada semua pihak dalam proses belajar dan dapat memberikan sumbangan bagi kemajuan ilmu pengetahuan. Amin.

Jakarta, Agustus 2009

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sri Wahdini
NPM : 0606150795
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Imunologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Deteksi *Cryptosporidium sp* pada Feses Pasien Terinfeksi HIV/AIDS dengan Diare Kronis

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia / format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya .

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : Agustus 2009
Yang menyatakan



(Sri Wahdini)

ABSTRAK

Nama : Sri Wahdini
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Immunologi
Judul : Deteksi *Cryptosporidium sp* pada Feses Pasien Terinfeksi HIV/AIDS dengan Diare Kronis

Cryptosporidium sp adalah parasit yang merupakan protozoa penyebab diare pada individu imunodefisiensi seperti penderita HIV/AIDS. Diagnosis criptosporidiosis dengan menemukan ookista pada tinja menggunakan metode pulasan tahan asam dinilai kurang sensitif. Deteksi koproantigen *Cryptosporidium sp* menggunakan ELISA diketahui lebih sensitif dan spesifik. Penelitian ini bertujuan untuk deteksi koproantigen *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV/AIDS dengan diare kronik menggunakan ELISA dan MTA serta melihat korelasi antara nilai absorbansi dengan hitung ookista. Sebanyak 95 sampel tinja dari pasien HIV/AIDS dengan diare kronik diperiksa menggunakan pulasan tahan asam yang merupakan *gold standart* dan deteksi koproantigen. Frekuensi kriptosporidiosis menggunakan deteksi koproantigen sebesar 36,8% dan dengan metode MTA 11,6%. Nilai sensitivitas dan spesifisitas koproantigen dibandingkan dengan pulasan tahan asam sebesar 100% dan 71,4%. Tidak terdapat korelasi antara nilai absorbansi dengan hitung ookista.

Kata kunci:

Cryptosporidium sp, HIV/AIDS, diare kronik, ELISA,MTA

ABSTRACT

Name : Sri Wahdini
Study Program : Biomedical Science, Immunology
Title : Detection of *Cryptosporidium sp* in Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency syndrome patient with chronic diarrhea

Cryptosporidium sp is a protozoan parasite, causes severe diarrhea in immunodeficient hosts like the HIV/AIDS patients. Diagnosis of cryptosporidiosis by finding the oocyst from stool by modified acid fast staining, is insensitive. Coproantigen detection offers more sensitive and specific technique to detect *Cryptosporidium* infection. The objective of this study is to determine cryptosporidiosis proportion among HIV/AIDS patients by Cryptosporidial antigen detection in stool compare it to modified acid fast staining and determine its correlation with oocysts count. A number of 95 stool specimens from the HIV/AIDS patients with chronic diarrhea were subjected to coproantigen ELISA test and modified acid-fast staining (gold standard). The frequency of Criptosporidial infection was 36,8% and 11,6% respectively by coproantigen detection and AF staining with 100% sensitivity and 71,4% specificity. There is no correlation between optical density and oocyst count.

Key word:

Cryptosporidium sp, HIV/AIDS, chronic diarrhea, ELISA, modified acid-fast

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Pertanyaan Penelitian.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	4
2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Sejarah Infeksi <i>Cryptosporidium sp.</i>	5
2.2 Daur Hidup <i>Cryptosporidium sp.</i>	6
2.3 Gambaran Klinis.....	7
2.4 Diagnosis <i>Cryptosporidium sp.</i>	10
2.4.1 Metode Mikroskopis.....	10
2.4.2 Metode Imunologi.....	11
2.4.3 Uji Molekular.....	12
2.5 Respon Imun <i>Cryptosporidium sp.</i>	13
2.5.1 Imunitas Nonspesifik.....	14
2.5.2 Imunitas Spesifik.....	16
2.5.3 Sitokin.....	17
METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Desain Penelitian.....	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	19
3.3 Sampel dan Perhitungan Besar Sampel.....	19
3.3.1 Sampel.....	19
3.3.2 Kriteria Inklusi.....	19
3.3.3 Kriteria Eksklusi.....	20
3.3.4 Perhitungan Jumlah Sampel.....	20
3.4 Prosedur Penelitian.....	20
3.4.1 Alat dan Bahan.....	20
3.4.2 Cara Kerja.....	21
3.4.2.1 Konsentrasi Feses.....	21

3.4.2.2	Deteksi Ookista <i>Cryptosporidium</i> sp dari Tinja	21
3.4.2.3	Pemeriksaan Koproantigen dengan ELISA	22
3.5	Definisi Operasional.....	22
3.6	Alur Penelitian.....	24
3.7	Analisis Data	24
3.8	Etik Penelitian	24
4	HASIL PENELITIAN.....	25
4.1	Karakteristik Pasien	25
4.2	Hasil Deteksi Koproantigen dengan ELISA	26
4.2.1	Perbandingan Deteksi <i>Cryptosporidium</i> sp antara Pemeriksaan Koproantigen dengan Deteksi Ookista Menggunakan Pewarnaan MTA	26
4.2.2	Korelasi antara Nilai Absorbansi dengan Densitas Ookista	28
4.3	Distribusi Demografi Penderita HIV dengan Infeksi <i>Cryptosporidium</i> sp	29
5	PEMBAHASAN.....	31
6	KESIMPULAN DAN SARAN.....	36
	DAFTAR PUSTAKA	37
	LAMPIRAN.....	
	RIWAYAT HIDUP.....	
	DRAFT ARTIKEL.....	

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1:	Gambaran klinis kriptosporidiosis	9
Tabel 2.2:	Pilihan diagnosis untuk deteksi <i>Cryptosporidium sp</i> pada sampel tinja	11
Table 3.1:	Klasifikasi WHO, derajat imunodefisiensi HIV berdasarkan CD4	23
Tabel 4.1:	Karakteristik pasien	25
Tabel 4.2:	Hasil deteksi <i>Cryptosporidium sp</i> pada pasien HIV berdasarkan pulasan MTA dan pemeriksaan koproantigen ...	27
Table 4.3:	Hasil pemeriksaan mikroskopis dan deteksi koproantigen <i>Cryptosporidium sp</i> pada feses pasien HIV/AIDS	28
Tabel 4.4:	Densitas ookista <i>Cryptosporidium</i> dan nilai absorbansi koproantigen	28
Tabel 4.5:	Deteksi korpoantigen pada berbagai kelompok umur berdasarkan klasifikasi imunodefisiensi oleh WHO	29
Table 4.6	Terapi ARV yang diduga mempengaruhi hasil deteksi <i>Cryptosporidium sp</i>	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1:	Daur hidup <i>Cryptosporidium parvum</i> terjadi dalam tahap aseksual dan seksual	7
Gambar 2.2:	Mekanisme kerja sitokin dalam respon imun <i>Cryptosporidium sp.</i>	14
Gambar 3.1:	Alur penelitian	24
Gambar 4.1:	Hasil positif pada deteksi koproantigen dengan teknik ELISA	26
Gambar 4.2:	Korelasi antara nilai absorbansi dengan densitas ookista	29
Gambar 4.3	Hasil pemeriksaan <i>Cryptosporidium</i> berdasarkan jumlah CD4 pada kelompok imunodefisiensi berat kelompok umur ≥ 5 tahun	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1:	Perbandingan Hasil Deteksi <i>Cryptosporidium sp</i> Berdasarkan Pulasan MTA dan Pemeriksaan koproantigen	44
Lampiran 2:	Uji Statistik Korelasi antara Hitung Ookista dengan Nilai Absorbansi	45
Lampiran 3:	Surat Keterangan Lolos Kaji Etik	46
Lampiran 4:	<i>Kit Insert, Diagnostic Automation, Inc.</i> <i>Cryptosporidium</i>	47

DAFTAR SINGKATAN

AF	= Auramin fenol
AIDS	= <i>Acquired Immune Deficiency Virus</i>
CDC	= <i>Centre for Diseases Control</i>
COWP	= <i>Cryptosporidium oocyst wall protein</i>
DNA	= <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EIA	= <i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	= <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
sp	= spesies
FITC-C-Mabs	= <i>Fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-Cryptosporidium Mab</i>
GALT	= <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
HIV	= <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HAART	= <i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
IFA	= <i>Immuno Fluorescence Assay</i>
IFN γ	= <i>Interferon gamma</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
iNOS	= <i>inducible nitric oxide synthase</i>
MBL	= <i>manose binding lectin</i>
MHC	= <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MTA	= <i>Modifikasi Tahan Asam</i>
NF-kB	= <i>Nuclear factor kB</i>
NK	= <i>Natural killer</i>
PCR	= <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGE2	= <i>Prostaglandin E2</i>
rRNA	= <i>ribosomal Ribo Nucleic Acid</i>
RANTES	= <i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i>
sIgA	= <i>Secretory IgA</i>
TLRs	= <i>tool-like receptor</i>
TNF	= <i>Tumor Necrosis Factor</i>

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Cryptosporidium sp adalah protozoa intestinal penyebab diare yang *self-limiting* pada individu imunokompeten, sedangkan pada individu imunokompromais menyebabkan diare kronik. Beberapa peneliti telah melaporkan kejadian kriptosporidiosis pada pasien terinfeksi *human immunodeficiency virus (HIV)/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. Infeksi *Cryptosporidium sp* dengan manifestasi intestinal kronik (>1 bulan), merupakan salah satu parasit penyebab selain *Isospora* dan menjadi indikator AIDS berdasarkan klasifikasi CDC.¹

Pada tahun 2005 di Venezuela ditemukan 15% infeksi *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV dengan diare.² Sedangkan di India tahun 2007 didapatkan 25% kasus infeksi *Cryptosporidium sp* pada penderita HIV dewasa dengan gejala klinis diare, demam, mual muntah dan 18% asimptomatik.³ Di bagian barat daya Nigeria pada tahun 2007 ditemukan 52,7% pasien HIV dengan diare yang disebabkan oleh *Cryptosporidium sp*.⁴ Pemeriksaan yang dilakukan terhadap 318 sampel tinja pasien terinfeksi HIV dengan gejala diare pada periode November 2004 sampai Maret 2007 di Departemen Parasitologi FKUI, ditemukan *Cryptosporidium sp* sebagai parasit terbanyak kedua setelah *Blastocystis hominis* yaitu sebesar 11,9%.⁵

Cryptosporidium sp merupakan patogen oportunistik karena paling sering menyebabkan penyakit bila status imun hospes menurun misalnya anak-anak dan individu imunokompromis. Gejala klinis dan berat penyakit berkaitan erat dengan status kekebalan tubuh dan diare merupakan manifestasi klinis utama.^{6,7} Pada beberapa studi dilaporkan bahwa diare kriptosporidiosis ditemukan pada pasien dengan hitung sel T CD4 < 200 sel/mm³ darah.⁸ Caludio Vieira et al melaporkan infeksi *Cryptosporidium sp* terdeteksi pada pasien dengan hitung CD4 < 100 sel/mm³, dengan gejala klinis diare kronik, penurunan berat badan dan bahkan menimbulkan kematian.⁹ Sejak digunakannya ARV pada tahun 1995-1996, prevalensi kriptosporidiosis intestinal pada pasien HIV/AIDS di negara-negara maju menurun. Pemberian *antiretro viral (ARV)* pada pasien AIDS dapat

mengeradikasi infeksi *Cryptosporidium* intestinalis. Beberapa pasien AIDS dengan diare yang disebabkan oleh *Cryptosporidium* dan diobati dengan ARV menunjukkan perbaikan secara klinis dan histologi serta penurunan jumlah parasit.^{2,9}

Diagnosis kriptosporidiosis dapat dilakukan secara mikroskopis, deteksi antigen dengan teknik imunoassai dan molekuler.^{6,10} Pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA) dengan atau tanpa konsentrasi merupakan metode yang paling umum digunakan, dalam diagnosis laboratorium kriptosporidiosis di berbagai laboratorium di dunia termasuk Indonesia.¹¹⁻¹³ Pada pemeriksaan dengan teknik mikroskopis diperlukan jumlah ookista yang banyak atau minimal $1 \times 10^6/\text{ml}$, tenaga laboratorium yang terlatih, dan berpengalaman. Pada tahap awal infeksi saat ookista belum banyak dikeluarkan di feses maka hasil pemeriksaan mikroskopis akan negatif.¹⁴ Selain itu ekskresi ookista intermiten dengan jumlah bervariasi dari hari ke hari.⁶ Pada kasus dengan kecurigaan tinggi terhadap kriptosporidiosis tetapi tidak ditemukan ookista pada tinja, maka perlu dilakukan pemeriksaan dengan teknik lain salah satunya adalah deteksi antigen.¹⁵ Kaushik et al, tahun 2008 melaporkan 4,9% kriptosporidiosis pada pasien HIV dengan teknik pewarnaan MTA sedangkan dengan pemeriksaan deteksi koproantigen didapatkan sebesar 18,9%.¹⁶ Evaluasi yang dilakukan oleh Jayalakshmi et al, di rumah sakit Coimbatore, India terhadap penggunaan ELISA untuk deteksi antigen *Cryptosporidium sp* pada spesimen feses pasien HIV/AIDS didapatkan infeksi *Cryptosporidium sp* sebesar 12,4% dengan spesifisitas 90,8% dan sensitivitas 99,0% dibandingkan pemeriksaan mikroskopis dengan pulasan MTA.¹⁷

Penelitian Werner et al, yang membandingkan teknik diagnostik deteksi ookista dan koproantigen pada tahun 2004 menyimpulkan bahwa uji imunoenzim lebih baik daripada metode mikroskopis untuk mengidentifikasi *Cryptosporidium sp* di tinja.¹⁸ Dagan et al, menyebutkan beberapa kelebihan teknik deteksi antigen untuk mendeteksi *Cryptosporidium sp*. Pertama, lebih sensitif, spesifik, mudah dan tidak memerlukan tenaga laboratorium yang terlatih dan berpengalaman serta prosedurnya sama dengan prosedur uji imunoenzim lainnya. Kedua, teknik imunoenzim dapat dilakukan terhadap feses yang telah disimpan dalam preservasi, tanpa mempengaruhi hasil sehingga dapat digunakan dalam penelitian

lapangan atau skrining dengan jumlah sampel yang banyak. Ketiga, spesimen tidak perlu dikonsentrasi atau melalui proses apapun dan hasil dapat dibaca secara visual dengan melihat ada tidaknya perubahan warna.¹⁹

Rentannya pasien HIV/AIDS terhadap infeksi lain baik ko-infeksi maupun yang bersifat oportunistik menyebabkan perjalanan penyakitnya bertambah berat dan dapat berakibat fatal, terutama pada kasus dengan hitung sel T CD4⁺ yang rendah. *Cryptosporidium sp* merupakan parasit oportunistik penyebab diare yang bisa berakibat fatal pada keadaan status imun yang rendah, karena adanya autoinfeksi internal dan kemungkinan menyebar ke organ lain seperti saluran pernapasan, sehingga perlu dilakukan deteksi sedini mungkin. Teknik pemeriksaan yang ada saat ini masih mengandalkan deteksi ookista dengan pulasan modifikasi tahan asam yang sekalipun spesifisitasnya tinggi, tapi sensitivitas rendah, sehingga sulit mendeteksi kasus asimtomatis atau intensitas infeksi rendah. Untuk itu, perlu dikembangkan alternatif teknik deteksi infeksi *Cryptosporidium sp*.

1.2 Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan permasalahan yang dikemukakan pada latar belakang timbul pertanyaan:

1. Berapa frekuensi kriptosporidiosis pada pasien terinfeksi HIV /AIDS dengan diare kronis dengan deteksi koproantigen dan MTA?
2. Bagaimanakah nilai sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan koproantigen dibandingkan teknik MTA?
3. Apakah terdapat korelasi antara nilai absorbansi koproantigen dengan hitung ookista?
4. Bagaimanakah distribusi frekuensi infeksi *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV/AIDS berdasarkan umur, status imundefisiensi dan riwayat pengobatan ARV?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Mendeteksi *Cryptosporidium sp* pada feses pasien HIV/AIDS dengan diare kronis dan faktor-faktor terkait.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui frekuensi kriptosporidiosis pada pasien HIV/AIDS dengan diare kronis dengan cara deteksi koproantigen.
2. Mengetahui frekuensi kriptosporidiosis pada pasien HIV/AIDS dengan diare kronis dengan pulasan MTA.
3. Menilai sensitivitas dan spesifisitas dari pemeriksaan koproantigen dibandingkan pulasan MTA.
4. Mengetahui hubungan nilai absorbansi koproantigen dengan hitung ookista.
5. Mengetahui distribusi frekuensi infeksi *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV/AIDS Berdasarkan kelompok umur, status imundefisiensi dan riwayat pengobatan ARV.

1.4 Manfaat

Jika deteksi koproantigen terbukti lebih baik, maka teknik ini dapat disarankan untuk dipakai dalam deteksi kriptosporidiosis.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sejarah Infeksi *Cryptosporidium* sp.

Genus *Cryptosporidium* sp merupakan parasit coccidian bersel tunggal, seukuran sel darah merah yang jika tertelan masuk ke dalam tubuh akan menginfeksi daerah mikrovili sel-sel epitel yang melapisi saluran cerna dan pernapasan vertebrata. Penyakit yang disebabkan oleh parasit ini disebut kriptosporidiosis.^{6,20} *Cryptosporidium* sp. pertama kali ditemukan oleh Tyzzer tahun 1907 pada kelenjar lambung mencit. Infeksi *Cryptosporidium* sp pada manusia pertama kali dilaporkan pada tahun 1976 yang menginfeksi anak sehat dan orang dewasa dengan status immunosupresi dengan gejala diare.²¹

Kasus kriptosporidiosis sebagai patogen pada manusia mulai banyak dilaporkan antara tahun 1980-1983, yaitu ditemukannya lebih dari 80 kasus di luar negeri.^{21,22} Perhatian terhadap parasit ini meningkat karena kasus kriptosporidiosis pada manusia banyak dilaporkan dari berbagai negara, antara lain dari Denmark, Venezuela, Australia, Haiti, Selandia Baru, Muangthai, Filipina.²³ Di Indonesia, pada tahun 1990, dilaporkan hasil penelitian pertama tentang *Cryptosporidium* sp dan dari hasil ini belum dapat disimpulkan *Cryptosporidium* sp. sebagai agen utama penyebab diare, karena tidak diteliti enteropatogen lain seperti virus dan bakteri yang lebih sering sebagai penyebab diare.²⁴ Pada tahun 1998 dilaporkan 2,8% kriptosporidiosis pada anak dengan diare dan 1,4% pada anak tanpa diare.²⁵ *Cryptosporidium* sp. adalah agen penyebab diare dan bersifat oportunistik, terutama pada anak-anak dan individu immunokompromais seperti pada penderita AIDS dan bermanifestasi sebagai diare akut, transien, intermiten hingga kronik. Infeksi parasit ini juga bisa terjadi pada individu immunokompeten.^{6,26}

Ada 16 spesies *Cryptosporidium* sp (berdasarkan hospesnya) yang menginfeksi ikan, reptil, burung dan mamalia. Yaitu *C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. wrairi*, *C. saurophilum*, *C. suis*, *C. scophthalmi*, *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. serpentis*, *C. molnari*, *C. galli*, *C. meleagridis* dan *C. baileyi*. Hanya delapan spesies yang diduga dapat menginfeksi mamalia terutama manusia. *C. parvum* dan *C. hominis* adalah spesies utama yang menginfeksi manusia^{23,27}

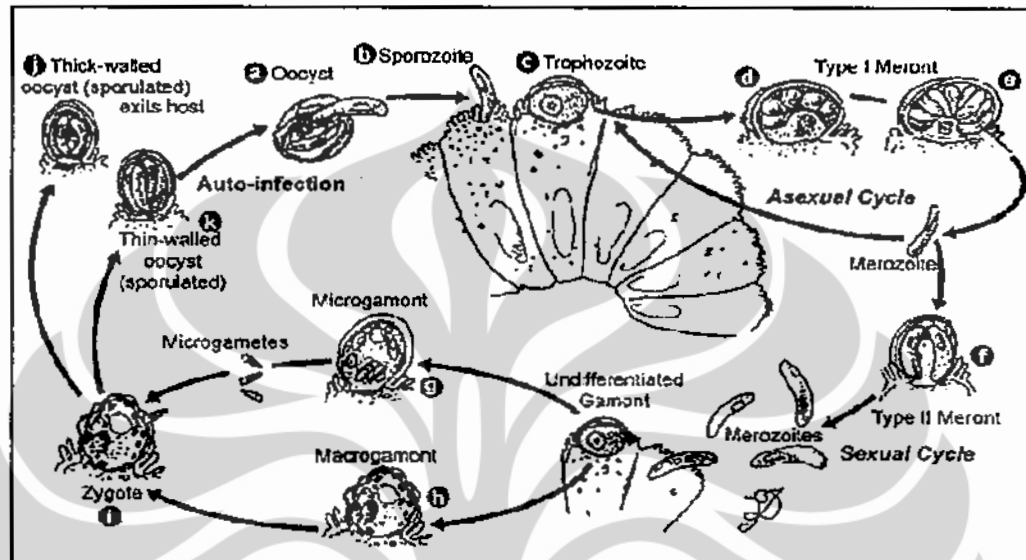
Infeksi *Cryptosporidium sp* terjadi bila tertelan ookista matang yang dikeluarkan oleh tinja hospes terinfeksi, dengan masa prepaten, yaitu waktu antara infeksi dan pengeluaran ookista berkisar 5-21 hari. Lama pengeluaran ookista sebulan atau lebih pada orang yang imunokompeten, sedangkan pada yang imunokompromais jauh lebih lama. Ookista berukuran 4-6 μm , dindingnya tebal sehingga melindunginya dari berbagai disinfektan. Ookista dapat dibunuh dengan pemanasan sampai 65°C selama 30 menit atau memasak air sampai mendidih selama 1 menit, dengan 5% sodium hipoklorit atau 5%-10% amonia.²⁸⁻³¹

2.2 Daur Hidup *Cryptosporidium sp*.

Cryptosporidium sp adalah protozoa yang termasuk kelas sporozoa yang berkembang biak secara aseksual dan seksual bergantian. *Cryptosporidium sp*. di dalam usus, melekatkan diri di permukaan sel epitel pada "brush border", sehingga tampak menonjol ke dalam lumen usus, sedangkan perkembangan parasit terjadi di dalam vakuola parasitoforus. Parasit ini intraseluler, tetapi ekstrasitoplasmik pada *brush border* sel hospesnya.⁶ Pada pangkal perlekatan antara parasit dan mikrovili ada daerah yang mengalami fusi, sehingga terjadi kontak langsung antara sel epitel dan parasit. Daerah tersebut mempunyai struktur sangat tipis dan berbentuk lipatan-lipatan dan disebut *feder organella* tempat terjadinya aliran nutrisi dari sel hospes ke parasit *Cryptosporidium sp*.³²

Siklus hidup *Cryptosporidium sp* sangat kompleks (Gambar 1) yang dimulai pada saat kista tertelan melalui makanan atau minuman. Di traktus gastrointestinal atas, terjadi ekskistasi ookista mengeluarkan sporozoit yang akan menembus sel-sel epitel intestinal dan berkembang menjadi trofozoit (bentuk bola). Sporozoit berkembang biak secara aseksual menghasilkan meron tipe satu yang berisi 6-8 inti matang dan berkembang menjadi 6-8 merozoit. Merozoit dari meron tipe satu akan menghasilkan merozoit baru, kemudian mengalami siklus aseksual lagi dan berkembang menjadi meron tipe dua. Masing-masing merozoit pada meron tipe dua yang matang, berkembang menjadi empat merozoit dan mengalami siklus seksual. Pada perkawinan seksual (sporogoni), merozoit berdiferensiasi menjadi mikro dan makrogamet dan setelah pembuahan akan menghasilkan zigot, yang berkembang menjadi ookista yang berisi empat

sporozoit. Ookista ada dua jenis, yang berdinding tipis (20%) mengeluarkan sporozoit di dalam usus dan menyebabkan autoinfeksi, sedangkan yang berdinding tebal (80%) dikeluarkan melalui tinja dan dapat menginfeksi hospes lainnya.^{22,27}



Gambar 2.1. Daur hidup *Cryptosporidium parvum* terjadi dalam tahap aseksual dan seksual²²

2.3 Gambaran Klinis

Gejala klinis kriptosporidiosis pada manusia berkaitan erat dengan status kekebalan tubuh penderita (Tabel 1).²³ Diare adalah gejala predominan yang ditemukan pada 80-90% kasus.³³ Faktor usia individu yang terserang kriptosporidiosis tidak berpengaruh terhadap ada tidaknya gejala klinis. Diare dan malnutrisi merupakan faktor penting yang secara tidak langsung dapat menyebabkan kematian pada penderita kriptosporidiosis.^{6,7}

Pada individu imunokompeten, *Cryptosporidium sp* dapat menyebabkan diare yang biasanya kurang dari sebulan atau diare akut yang dapat sembuh sendiri, tetapi paling banyak asimtomatik.^{7,20,22} Pada individu imunokompromis seperti penderita AIDS, spektrum klinis mulai dari infeksi tanpa gejala, diare akut, dehidrasi, dan malabsorpsi serta diare kronis dalam waktu lama atau menahun dan pada beberapa kasus bisa menyebabkan kematian.^{6,7,27,34,35}

Gejala klinis lain yang menyertai antara lain demam ringan, pusing, nyeri ulu hati, sakit perut, mual, muntah, anoreksia, sukar tidur dan nafsu makan

berkurang yang berakibat pada penurunan berat badan.^{6,7,36,37} Herbowo, melaporkan gejala klinis kriptosporidiosis yang timbul pada anak batita dengan status imun normal di daerah Kampung Melayu Jakarta yaitu diare, anoreksia, demam, berat badan turun dan vomitus.³⁸ Ajjampur et al, melaporkan dari 28 kasus kriptosporidiosis 10 pasien mengalami diare selama lebih 3 bulan, 8 pasien mengalami 2-3 kali episode diare dalam 12 bulan dan 10 pasien mengalami diare akut dalam 12 bulan. Selain diare 50% pasien mengalami demam, 14,3% mual dan 14,3% mengalami mual muntah.³ Ada empat kelompok gejala klinis pada pasien HIV dengan kryptosporidiosis yaitu: diare seperti kolera yang membutuhkan terapi rehidrasi intravena, diare kronik, intermiten dan transien/semntara.³⁵

Dari beberapa penelitian dilaporkan bahwa prevalensi infeksi pada pasien HIV dilaporkan 0-100% dengan median 32%. Perbedaan ini timbul karena adanya perbedaan dari rancangan studi yang dipilih, lokasi geografis, kelompok populasi, sensitifitas metode diagnosis dan stadium penyakit.⁷ Flanigan, menyatakan bahwa pasien dengan jumlah sel T CD4⁺ lebih besar dari 180 sel/mm³ dapat sembuh dari infeksi secara spontan sedangkan 87% pasien dengan jumlah sel T CD4⁺ kurang dari 180 sel/mm³ akan mengalami diare kronik.^{6,35} Penelitian di India oleh Dwivedi et al, melaporkan bahwa pasien HIV dengan diare kronik memiliki rerata jumlah CD4 lebih rendah (123 sel/mm³) daripada pasien dengan diare akut (265 sel/mm³).²³ Risiko infeksi pada individu ini selain dipengaruhi oleh jumlah CD4, juga dipengaruhi oleh faktor sosial dan kebiasaan seperti kebiasaan seksual, memelihara hewan di rumah, mendatangi lokasi sauna, spa atau penggunaan toilet umum, pemilihan sumber makanan dan minuman, serta pemakaian obat secara injeksi.⁷

Patofisiologi banyaknya cairan yang hilang pada kriptosporidiosis tidak spesifik, bahkan diduga sama dengan toksin kolera. Kriptosporidiosis pada manusia ditandai dengan diare cair, tidak selalu "profus" dan tidak disertai darah. Jumlah cairan yang hilang melalui tinja antara 3-17 liter/hari.³²

Walaupun saluran intestinal merupakan tempat utama kriptosporidiosis, sistem organ lain juga dapat terlibat diantaranya paru-paru, telinga bagian tengah, saluran empedu, pankreas dan lambung. Infeksi di saluran empedu menyebabkan

kolesistitis alithiasis, kolangitis sklerosis, papilitis dan stenosis saluran empedu terminal, sedangkan manifestasi pada saluran pernafasan berupa bronkhitis kronik.⁶

Tabel 2.1 Gambaran klinis kriptosporidiosis²³

Karakteristik	Individu Imunokompromise	Individu Imunokompeten
Populasi rentan	Semua kelompok umur terutama pasien AIDS	Anak-anak (terutama < 1 tahun) dan dewasa semua umur (terutama lansia)
Lokasi infeksi	Intestinal atau ekstraintestinal	Biasanya intestinal
Manifestasi infeksi	Asimtomatik, transien, kronik atau fulminan	Asimtomatik, akut atau persisten
Manifestasi klinis	Diare, demam, nyeri abdomen kuadran atas, kuning, muntah dan berat badan turun	Diare, demam, keram perut, muntah, mual, berat badan turun
Durasi infeksi	2 hari sampai seumur hidup	Sampai 2 minggu
Keparahan berdasarkan jumlah CD4: > 200 sel/mm ³ < 100 sel/mm ³ < 50 sel/mm ³	Sembuh spontan Kronik dan ekstraintestinal Fulminan	—
Prognosis	- Transient atau asimtomatik (5-184 minggu) - Kronik (3-127 minggu) - Fulminan (2-28 minggu sampai kematian)	Mortalitas tinggi pada bayi dan anak-anak di negara berkembang
Terapi	Antiretrovirus (<i>highly active anti-retroviral therapy</i>) dengan atau tanpa antiparasit (paromomycin)	Nitazoxanide

Kriptosporidiosis pada manusia mempunyai distribusi yang luas di seluruh dunia.^{20,30,36} Manusia dan hewan pada semua tingkatan usia dapat terinfeksi *Cryptosporidium* sp, mulai dari bayi usia 3 hari (yang mendapat infeksi dari vagina ibu dengan kriptosporidiosis) sampai orang dewasa yang berumur 95 tahun.³⁷ Yang paling rentan terinfeksi adalah anak-anak usia 1-5 tahun, wanita hamil dan individu immunokompromis.³⁷ Kerentanan terhadap infeksi bervariasi untuk setiap individu, karena faktor latar belakang genetik dan status imun.^{7,33}

Insidens kriptosporidiosis baru dilaporkan pada masa dekade ini dan masih sedikit orang yang mengetahui jenis parasit *Cryptosporidium* sp, sehingga perhatian terhadap parasit ini masih kurang. Sumber infeksi utama selain tinja yang mengandung ookista adalah sputum penderita kriptosporidiosis paru.²¹ Ada beberapa cara transmisi *Cryptosporidium* sp. yaitu: manusia ke manusia, hewan ke manusia, kontaminasi air dan makanan.³⁰

2.4 Diagnosis *Cryptosporidium* sp

Tiga teknik diagnosis yang dapat digunakan untuk deteksi *Cryptosporidium* sp di tinja adalah metode pewarnaan untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp, metode imunologi untuk mendeteksi antigen dan deteksi asam nukleat dengan menggunakan PCR. Pemilihan teknik diagnosis oleh suatu laboratorium tergantung kepada beberapa faktor antara lain biaya, fasilitas dan tingkat kemampuan teknisi Tabel 2.⁴⁰

2.4.1 Metode Pewarnaan

Ookista *Cryptosporidium* sp. dapat dideteksi secara langsung dengan menggunakan mikroskop. *Cryptosporidium* sp. yang berasal dari sampel feses sebaiknya dikonsentrasi untuk mendapatkan ookista yang tidak bertumpuk di dalam debris feses. Ukuran ookista *Cryptosporidium* sp. yang relatif kecil, mengakibatkan diagnosis kurang akurat, sehingga dikembangkan metode pewarnaan. Garcia dkk melakukan beberapa metode perwarnaan untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* sp yaitu giemsa, trikrom, ziel-neelsen tahan asam dan modifikasi tahan asam (MTA).¹¹ Metode pewarnaan MTA merupakan metode yang terbaik dan paling umum digunakan, karena kebanyakan instansi/laboratorium mempunyai mikroskop cahaya biasa. Dengan metode ini, ookista akan terlihat berwarna merah dengan latar belakang kehijauan. Apabila jumlah ookista yang ditemukan sedikit akan menyulitkan untuk mendiagnosis *Cryptosporidium* sp. Ukuran ookista *Cryptosporidium* sp. juga harus dibedakan dari ukuran spora jamur (6-8 μ m). Keuntungan metode ini adalah waktu untuk membuat pulasan tidak lama dan biaya murah, sedangkan kekurangannya adalah tidak sensitif dan spesifik.^{11,40}

Tabel 2.2 Pilihan diagnosis untuk deteksi *Cryptosporidium sp* pada sampel tinja⁴⁰

Teknik	Sensitivitas	Spesifisitas	Kecepatan	Kemudahan Identifikasi	Keuntungan	Kerugian
MTA	+	+	++	++	Biaya murah	Sensitivitas dan spesifisitas rendah
AF	++	++	+++	+++	Skrining cepat	Sensitivitas dan spesifisitas rendah; biaya mahal (alat)
EIA	+++	+++	+++	+++	Sensitif (32,9 ng protein <i>Cryptosporidium</i>) [Meridian Diagnostic, Inc., Cincinnati, OH]; dibutuhkan training singkat	Biaya mahal
IFA	+++	+++	++	+++	Sensitif (100 ookista/ml) [Meridian Diagnostic, Inc., Cincinnati, OH]	Biaya mahal
PCR	+++	+++	++	++	Sensitif (1 ookista); <i>permits genotyping</i>	Metode tidak distandardisasi; biaya mahal; dibutuhkan peralatan dan training khusus

MTA= modifikasi tahan asam, AF = auramin fenol, EIA= *enzyme immunoassay*, IFA= *immunofluorescence* PCR= *Polymerase Chain Reaction*; + = sedang, ++ = baik, +++ = sangat baik

2.4.2 Metode Immunologi

Pemeriksaan imunologi dapat dilakukan dengan cara imunofluoresensi, deteksi antigen *Cryptosporidium sp* dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), dan imunokromatografi. Diagnosis dengan metode ini membutuhkan biaya lebih mahal dibandingkan metode pewarnaan. Pemeriksaan imunofluoresensi menggunakan *fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-Cryptosporidium Mab* (FITC-C-Mabs) yang akan mengenali permukaan epitop ookista.⁴⁰ Prinsip imunokromatografi adalah antibodi yang diikat pada membran fase solid, antigen *Cryptosporidium sp* yang terlarut dilewatkan pada membran sehingga terbentuk reaksi antigen antibodi. Hasil dinyatakan secara kualitatif,

yaitu positif jika terlihat sebagai garis berwarna pada lokasi tertentu di membran.⁴¹

Deteksi antigen di feces (koproantigen) dengan ELISA dibuat dengan menggunakan antibodi monoklonal dan poliklonal. Pada kit diagnostik komersial terdapat sumur yang telah dilapisi *anti-Cryptosporidium* yang akan menangkap koproantigen *Cryptosporidium sp*, antibodi *anti-Cryptosporidium* dikonjugasi dengan enzim, substrat, kromogen dan *stop solution*. Setiap kit dilengkapi dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Teknik ELISA dengan metode *sandwich* menggunakan prinsip antibodi yang diikat pada plat yang terdiri dari 96 sumur dan akan menangkap antigen *Cryptosporidium sp* di tinja. Penambahan antibodi kedua bertujuan untuk mengikat epitop antigen. Reaksi tersebut dapat divisualisasikan dengan cara antibodi kedua dilabel dengan enzim atau penambahan antibodi ketiga yang telah di label enzim dengan tujuan meningkatkan sensitifitas pemeriksaan. Reaksi diikuti dengan penambahan substrat yang akan dikatalisasi oleh enzim menghasilkan warna yang intensitasnya dapat dinilai secara visual atau diukur dengan spektrofotometer.⁴⁰

Kelebihan teknik imunoenzim untuk mendeteksi *Cryptosporidium sp* adalah lebih sensitif, spesifik, mudah dan tidak memerlukan tenaga laboratorium yang terlatih dan berpengalaman serta prosedurnya sama dengan prosedur uji immunoassay lainnya. Teknik ini juga dapat dilakukan terhadap tinja yang telah disimpan dalam preservasi misalnya formalin 10% tanpa mempengaruhi hasil sehingga dapat digunakan dalam penelitian lapangan atau skrining dengan jumlah sampel yang banyak. Kelebihan lainnya adalah tinja tidak perlu dikonsentrasi atau melalui proses apapun dan hasil dapat dibaca secara visual dengan melihat ada tidaknya perubahan warna.¹⁹

2.4.3 Uji Molekuler

Uji molekuler terutama dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) semakin ditingkatkan untuk diagnosis laboratorium kriptosporidiosis.⁴² Metode PCR dapat digunakan untuk meningkatkan deteksi *Cryptosporidium sp* dalam bahan klinis, menentukan spesies dan identifikasi genotip. Ada tiga tahap yang

dilakukan untuk deteksi DNA *Cryptosporidium sp* yaitu isolasi ookista, ekstraksi dan amplifikasi DNA.⁴⁰

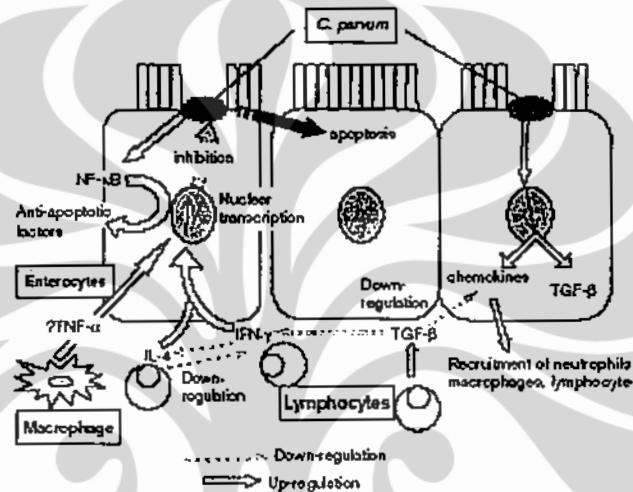
Teknik PCR lebih sensitif dan spesifik dalam deteksi ookista *Cryptosporidium sp* dibandingkan teknik mikroskopis seperti pulasan tahan asam. Teknik PCR dapat mendeteksi kurang dari 20 ookista/gram tinja atau hanya 1 ookista, sedangkan untuk deteksi secara mikroskopis dibutuhkan 10.000-500.000 ookista/gram tinja.^{30,42} Namun, teknik PCR membutuhkan waktu lama, biaya mahal dan pemeriksaan berpengalaman. PCR juga dapat dihambat prosesnya oleh komponen lain di tinja, seperti kompleks polisakarida, garam empedu dan bilirubin, sehingga perlu menambah prosedur tertentu untuk menghilangkan residu tersebut dari dalam tinja.^{6,30}

Tahap pencucian pada teknik konsentrasi dengan menggunakan air tanpa ion yang dilakukan berulang kali dapat membuang residu larutan pengawet sehingga tidak mengganggu hasil PCR. Penggunaan larutan pengawet yang tepat akan mempermudah deteksi DNA *Cryptosporidium sp*. Ada beberapa gen yang dapat mendeteksi *Cryptosporidium sp*, yang paling tinggi sensitivitas dan spesifisitasnya ada 2 gen yaitu gen 18S rRNA dan gen *Cryptosporidium oocyst wall protein* (COWP). Gen 18S rRNA dapat mendeteksi 1 ookista, sedangkan gen COWP dapat mendeteksi minimal 10 ookista. Ada teknik nested PCR yang dapat menentukan spesies dari *Cryptosporidium sp*.^{40,42}

2.5 Respons Imun *Cryptosporidium*

Penelitian infeksi *Cryptosporidium sp* pada mencit menunjukkan bahwa imunitas yang terbentuk tergantung dari jumlah sel T CD4⁺ yang meningkat bersamaan dengan limfosit intraepitel intestinal dan akan menghasilkan interferon gamma melalui IL-12. Peranan antibodi dalam eliminasi infeksi sangat sedikit, hal ini dibuktikan dengan tidak adanya perbedaan yang bermakna antara tikus dengan sel B normal dan tikus tanpa sel B. Peranan sel T CD8 dalam kontrol infeksi masih terus diteliti sampai sekarang. Sel mast yang merupakan bagian dari imunitas alami memiliki peranan untuk mengeliminasi parasit sedangkan peranan sel NK masih belum jelas.^{39,43-47}

Infeksi terhadap *C. parvum* menyebabkan peningkatan ekspresi kemokin sebagai mediator untuk menarik leukosit ke daerah infeksi. Parasit juga akan mengaktifkan sel-sel limfosit sehingga akan mengeluarkan sitokin tipe 1, tipe 2, interferon gamma dan IL-4. Sitokin-sitokin tersebut bekerja secara sinergis untuk menginduksi perubahan fenotip sel enterosit sehingga akan menghambat perkembangan parasit (Gambar 2).⁴⁵



Gambar. 2.2 Mekanisme kerja sitokin dalam respon imun *Cryptosporidium sp*⁴⁵

2.5.1 Imunitas Nonspesifik

Imunitas nonspesifik yang berperan dalam infeksi *Cryptosporidium sp* yaitu sel epitel, sel NK, interferon dan komplemen. Di usus kecil, sporozoit *Cryptosporidium* yang dilepaskan ookista akan menyerang enterosit dengan menempel melalui membrane apikal dan pada proses ini kemungkinan melibatkan lectin spesifik terhadap Gal/GalNac. Elemen aktin sitoskeleton hospes terinduksi sehingga terbentuk vakuol parasitophorous yang merupakan tempat terjadinya reproduksi parasit secara seksual dan aseksual.⁴⁶

Pada percobaan sel kultur, reaksi antara parasit dan sel epitel menyebabkan meningkatnya ekspresi imunitas nonspesifik seperti netrofil dan kemokin (IL-8, GRO-α, RANTES, MCP-1, dan MIP-2a) dalam 24-48 jam pasca infeksi dan berperan dalam timbulnya respon inflamasi di lamina propia. Respon inflamasi juga diperantarai oleh NF-κB yang akan menginduksi ekspresi molekul-molekul proinflamasi termasuk prostaglandin dan kemokin. Hambatan aktivitas NF-κB pada sel-sel yang terinfeksi *Cryptosporidium* akan menurunkan

sekresi IL-8. Infeksi sel-sel epitel oleh *Cryptosporidium* juga menginduksi PGE2 yang akan menstimulasi produksi musin dan meregulasi respon sel T untuk mengeluarkan sitokin.^{43,45}

Sel-sel epitel mengekspresikan TLRs yang merupakan kelompok sensor molekular yang bersifat nonspesifik terhadap antigen yang memiliki struktur yang *conserved* seperti lipopolisakarida bakteri (TLR4), komponen dinding bakteri (TLR2), atau DNA (TLR9). Signaling sel melalui molekul adaptor MyD88 yang berasosiasi dengan TLRs menyebabkan aktivasi dan migrasi NF- κ B ke inti sel. Selama infeksi *Cryptosporidium* terjadi aktivasi NF- κ B yang akan menghambat infeksi ke sel melalui apoptosis dan aktivasi sel epitel kantung empedu melalui TLR2 dan TLR4. Defisiensi MyD88 pada sel epitel meningkatkan kemampuan replikasi parasit dan mempengaruhi kerentanan sel tersebut terhadap infeksi *Cryptosporidium*. Sel-sel epitel intestinal dapat memproduksi peptide antimikroba yang dapat membunuh bakteri dan parasit dengan cara merusak membrane sel. Ekspresi defensin B meningkat pada intestinal sapi yang terinfeksi *Cryptosporidium*. Peptida human defensin B 1 dan 2 secara invitro dapat membunuh sporozoit atau mencegah perkembangannya.⁴³

Sel NK merupakan limfosit non-T, non-B yang peran utamanya adalah respon imun nonspesifik terhadap infeksi intraselular oleh virus, bakteri, parasit dan sel-sel tumor. Sel NK secara lamiah sudah merupakan limfosit sitotoksik yang ditemukan sejak lahir yang berperan pada sistem imun selular nonspesifik.⁴⁷ Ada dua mekanisme kerja sel NK yaitu sekresi sitotoksik terhadap sel-sel terinfeksi dan produksi sitokin proinflamasi terutama IFN γ yang berperan untuk mengontrol infeksi intraselular. Sel dendritik dan makrofag yang terstimulasi karena adanya infeksi akan mengeluarkan sitokin untuk mengaktivasi sel-sel NK.⁴³ Pada permukaan sel NK terdapat suatu kompleks reseptor aktivasi atau inhibisi yang berfungsi meregulasi sitotoksitas. Reseptor inhibisi mengenali molekul MHC class I pada sel berinti yang akan menghambat aktivitas lisis oleh sel NK. Jika ekspresi MHC class I menurun, maka sel NK menjadi sitotoksik dan melepaskan protein perforin dan granzim yang akan membuat lubang-lubang kecil pada membran sel sasaran sehingga menimbulkan influks ion abnormal dan kebocoran metabolit esensial dari sitoplasma yang berujung pada kematian sel. Aktivasi

reseptor yang akan menginduksi sitotoksitas terjadi jika terjadi kontak dengan molekul ligan yang spesifik pada sel terinfeksi atau sel yang mengalami stress seperti MHC like MICA atau MICB pada manusia, atau peptida patogen yang terekspresi pada permukaan sel-sel infeksi.^{43,47,48}

Beberapa komponen komplemen diproduksi oleh enterosit, tetapi peran komplemen dalam mengontrol infeksi *Cryptosporidium* masih belum jelas. Aktivasi komplemen melalui jalur klasik dapat terjadi melalui 2 mekanisme sehingga terjadi pemecahan secara enzimatik C4 dan C2 menghasilkan C3 convertase. Pemecahan dapat diinisiasi secara enzimatik terhadap C1 oleh kompleks Ag-Ab atau protease serin yang berasosiasi dengan *manose binding lectin* (MBL) yang dihasilkan oleh bagian luar dari mikroorganisme. Aktivasi komplemen melalui jalur lektin akan mengaktifkan C3 setelah MBL yang merupakan kolektin diikat melalui bagian lektin karbohidrat kuman. Pasien HIV dengan mutasi pada gen MBL lebih rentan terhadap infeksi *Cryptosporidium sp* dan defisiensi MBL pada serum anak-anak di Haiti berhubungan dengan meningkatnya insiden kriptosporidiosis. Kedua hal tersebut menunjukkan bahwa MBL dapat menghalangi perlekatan parasit ke sel-sel epitel atau mengaktifkan kompleks perlekatan komplemen ke membran.^{46,48}

2.5.2 Imunitas Spesifik

Sel limfosit merupakan sel yang berperan dalam sistem imun spesifik, sel T pada imunitas selular dan Sel B pada imunitas humoral. Pada imunitas humoral, sel T CD4⁺ berinteraksi dengan sel B dan merangsang proliferasi dan diferensiasi sel B, sedangkan pada imunitas selular sel T CD4⁺ mengaktifkan makrofag untuk menghancurkan mikroba intraselular yang menginfeksi sel. Kedua sistem imun tersebut bekerja sangat erat satu sama lain. Respon sel T dipacu oleh pengenalan spesifik antigen. Sel T akan mengenal fragmen peptide dari antigen yang diikat oleh molekul permukaan yang disandi oleh gen MHC.

Infeksi oleh *Cryptosporidium* akan menyebabkan timbulnya respon inflamasi sel limfosit dan fagosit sehingga kadang-kadang terjadi atrofi vili dan hiperplasi kripti yang merupakan karakteristik patologi yang diinduksi oleh sel T. Infeksi terhadap *Cryptosporidium parvum* akan meningkatkan jumlah dan variasi

subset sel T di jaringan mukosa serta meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi yang berhubungan dengan patologi yang ditimbulkan pada saluran intestinal. Jika infeksi dapat terkendali maka populasi sel T akan kembali normal.^{43,44}

Sel T CD4⁺ merupakan komponen utama sel-sel di lamina propria intestinal dan termasuk dalam populasi sel T yang jumlahnya menurun pasca infeksi oleh HIV tipe 1 terutama menyerang sel T CD4⁺ di daerah intestinal atau *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) menyebabkan kerusakan sel dan keutuhan struktur jaringan. Kerusakan ini bersifat irreversibel sehingga memudahkan penetrasi bakteri dan produknya yang akan mengaktifkan imun sistemik nonspesifik dan aktivasi limfosit yang menginduksi kematian sel T. Protein gp120 HIV-1 akan berikatan dengan reseptor integrin $\alpha_4\beta_7$ yang banyak terekspresi di sel T CD4⁺ intestinal.^{49,50}

Selama infeksi terbentuk antibodi anti parasit yang beredar di sirkulasi dan mukosa. IgM, IgG dan IgA meningkat selama infeksi dan menurun setelah perbaikan walaupun IgG serum masih bertahan selama beberapa bulan lebih lama dari IgM. Pada penelitian terhadap sampel feses orang dewasa menunjukkan adanya *secretory IgA* (sIgA) selama terjadinya infeksi tanpa ditemukannya IgG atau IgM. Di negara-negara berkembang, titer IgG anti parasit di serum akan terus meningkat sejalan dengan waktu. Kemungkinan hal tersebut terjadi akibat paparan dari lingkungan yang terjadi secara terus menerus pada penderita diare kronis yang diikuti dengan menurunnya IgA dan IgM. sIgA berfungsi melindungi permukaan sel-sel mukosa host terhadap toksin dan mikroba patogen.⁴⁴

2.5.3 Sitokin⁴³⁻⁴⁶

Sitokin merupakan protein sistem imun yang mengatur interaksi antarsel dan memacu reaktivitas imun baik pada imunitas nonspesifik maupun spesifik. Sitokin diproduksi oleh sel imunitas spesifik yaitu sel limfosit dan sel-sel imunitas nonspesifik antara lain makrofag, endotel dan beberapa sel epitel.

TNF alfa merupakan sitokin proinflamasi yang dihasilkan oleh sel T dan sel-sel lain jika terjadi infeksi dan sitokin ini berperan untuk menstimulasi mekanisme killing antimikroba seperti pada proses inflamasi. Beberapa penelitian pada mencit dan manusia yang terinfeksi *Cryptosporidium sp* terjadi peningkatan

sitokin di daerah intestinal. Kegagalan mencit C57BL/6 IFN gamma mengontrol infeksi yang terjadi berkaitan dengan rendahnya ekspresi TNF alfa di intestinal dan jika diberikan terapi TNF alfa proses reproduksi parasit dapat ditekan. TNF alfa secara signifikan akan menghambat perkembangan *Cryptosporidium parvum* pada *enterocyt cell line* manusia dan tikus.

Selain TNF alfa, ada sitokin proinflamasi lainnya seperti IL-1 dan IL-6 yang memiliki aktivitas yang sama seperti TNF alfa. IL-1 menghambat reproduksi parasit di enterosit dan jumlahnya akan meningkat saat infeksi pada manusia dan mencit. Ekspresi IL-6 meningkat pada mencit defisiensi Th1 yang terinfeksi *Cryptosporidium parvum* dan dapat menghambat perkembangan parasit secara *in vitro*.

IL-18 dan IL-15 dikeluarkan oleh makrofag, sel dendritik, dan sel-sel epitel yang akan mengaktifkan sel NK dan sel T untuk mengeluarkan IFN gamma. IL-15 juga berperan dalam homeostasis sel NK dan sel T memori. Pemberian IL-18 dari luar akan mengurangi multiplikasi parasit pada sel line. Pasien imunokompeten dengan kriptosporidiosis yang gagal mengekspresikan IFN gamma biasanya akan dihasilkan IL-15 di saluran intestina. Peran utama IFN gamma dan sitokin proinflamasi lainnya adalah aktivasi mekanisme antimicrobial killing yang meliputi produksi derivat toksik *nitric oxide* atau radikan oksigen, membuat keadaan defisiensi metabolit yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganisme seperti triptofan atau besi selular.

Kadar *nitric oxide* yang tinggi distimulasi oleh IFN gamma kadang-kadang bersamaan dengan sitokin lainnya seperti TNF alfa. Sitokin menginduksi ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang akan mengubah arginin menjadi citrulline dan *nitric oxide*. Kadar derivat *nitric oxide nitrate* dan nitrite di plasma meningkat selama infeksi seperti halnya ekspresi iNOS yang dideteksi secara imunohistokimia. Keuntungan lain meningkatnya produksi NO adalah ekspresi PGE2 akan meningkat sehingga fungsi barrier sel-sel epitel juga akan meningkat. Peran utama TNF alfa adalah mencegah invasi parasit dan sedikit efek terhadap perkembangan parasit intraselular, sedangkan kedua fungsi tersebut dimiliki oleh IFN gamma. IL-4 tidak mempengaruhi perkembangan parasit, tetapi secara sinergis dengan IFN gamma dapat mencegah replikasi parasit.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan desain penelitian *cross sectional* (potong lintang).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI). Waktu penelitian Desember 2008 – Mei 2009.

3.3 Sampel dan Perhitungan Besar Sampel

3.3.1 Sampel

Sampel yang diteliti adalah feses penderita HIV/AIDS dengan diare kronis yang dikirim dari POKDISUS AIDS dan bangsal rawat anak RSUPNCM untuk dilakukan pemeriksaan feses parasit lengkap di Laboratorium Parasitologi FKUI. Sebagian besar sampel merupakan koleksi Departemen Parasitologi yang dikumpulkan sejak Juni – Desember 2008. Sampel diberi larutan pengawet formalin 10% dengan perbandingan 1: 4 dan disimpan pada suhu 4^o C. Informasi tentang data klinis, hitung CD4, demografi sampel merupakan data sekunder, didapatkan dari rekam medik.

3.3.2 Kriteria inklusi

Sampel dengan keterangan klinis diare kronik dari pasien HIV/AIDS yang berasal dari RSUPNCM.

3.3.3 Kriteria eksklusi

- Sampel tanpa keterangan klinis atau keterangan klinis diare akut
- Sampel dengan keterangan klinis diare kronik dari pasien imunokompromais lain seperti keganasan, imunodefisiensi bawaan.

3.3.4 Perhitungan Besar Sampel

Perhitungan besar sampel berdasarkan rumus⁵¹:

$$n = \frac{Z\alpha^2 pq}{d^2}$$

Keterangan :

- α : Tingkat kemaknaan sebesar 5% (0,05)
- $Z\alpha$: Z skor untuk α sebesar 0,05 adalah 1,96
- p : Estimasi proporsi kejadian pada populasi = 18,9% (0,189)
- q : $1-p = 1-0,189 = 0,811$
- d : Ketelitian, ditetapkan 8% (0,08)
- n : Perkiraan jumlah sampel

Dari rumus di atas didapatkan hasil sampel sebanyak :

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,189 \times 0,811}{0,08^2} = 92$$

3.4 Prosedur Penelitian

Setiap sampel yang memenuhi kriteria penelitian diperiksa dengan pulasan metode pewarnaan modifikasi tahan asam untuk deteksi ookista *Cryptosporidium sp* dan ELISA untuk deteksi koproantigen. Data demografi, klinis, status pengobatan dan hitung CD4 diperoleh dari rekam medis.

3.4.1 Alat dan Bahan

3.4.1.1 Alat : Tabung eppendorf 1500 μ l, *Micro pipet*, *Vortex* (Maxi Mix II, Mixer-37600 USA), *Centrifuge* (Sorval Biofuge Pico, D-37520, German), Mikroskop (Olympus), timer, counter, *ELISA Reader* (Organoteknik),

3.4.1.2 Bahan: *Aquabidest*, metanol absolut (Merck, cat.no. 1.06009), HCl (Merck, cat.no. 1.00317), *carbol fuchsin* (Merck, cat.no 1.09215), *malachite green* (Merck cat.no. 1.01398), kaca objek dan kaca tutup ukuran 22x22mm, kit deteksi koproantigen *Cryptosporidium sp Diagnostic automation, inc. Microwell ELISA Cryptosporidium*, kat. 8301 yang terdiri atas: test strip 96 sumur *microwells* yang dilapisi antibodi *Cryptosporidium* poliklonal, reagen 1: (antibodi *goat anti-Cryptosporidium*), reagen 2: (peroksidase anti-*goat*), kontrol positif, kontrol negatif, kromogen (tetramethylbenzidine dan peroksida), *wash concentrat* 20X (buffer dan surfactan dengan Thimerasol), *stop solution* (1M *phosphoric acid*).

3.4.2 Cara Kerja:

3.4.2.1 Konsentrasi Feses⁵²

Sampel feses sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1500 µl, selanjutnya ditambahkan 700 µl *aquabidest*, divorteks selama 30 detik. Ditambahkan 400 µl dietil eter, di bolak balik sebanyak 10 kali. Sampel kemudian disentrifugasi pada 13000×g selama 1 menit. Supernatan dibuang dan disisakan kira-kira 200µl, selanjutnya ditambahkan 1 ml *aquabidest* steril, divorteks selama 30 detik. Pencucian diulangi lagi dengan penambahan 1ml *aquabidest*. Pelet disisakan 50 µl dan disimpan di kulkas 4°C untuk dilakukan prosedur selanjutnya.

3.4.2.2 Deteksi Ookista dari Tinja dengan pulasan MTA^{11,14}

Sebanyak 5 µl feses hasil konsentrasi dioleskan di atas kaca objek, kemudian dikeringkan pada suhu ruang, selanjutnya difiksasi dengan metanol absolut selama 3 menit. Preparat dimasukkan ke dalam botol pewarnaan berisi larutan *carbol fuchsin* 2,3% selama 15 menit, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir, lalu dicelupkan ke dalam larutan metanol HCl 1% selama 10 - 15 detik. Kemudian dicuci di bawah air mengalir dan diberi pulasan dengan *malachite green* 0,4% selama 30 detik, terakhir dicuci di bawah air mengalir dan

dikeringkan pada suhu ruang. Hasil diperiksa di bawah mikroskop pada pembesaran 400× dan 1000×. Ookista akan tampak berwarna merah, berbentuk bulat dan berukuran 4 – 6 µm dengan latar belakang hijau (*pale green*). Ada tidaknya sporozoit dalam ookista juga diperhatikan. Hasil positif jika ditemukan satu atau lebih ookista *Cryptosporidium* sp. pada seluruh lapang pandang. Sampel dinilai hasilnya dengan penilaian kualitatif atau nominal dikotom (positif dan negatif). Ookista dihitung secara kuantitatif pada semua lapang pandang.

3.4.2.3 Pemeriksaan Koproantigen dengan ELISA

Pemeriksaan koproantigen *Cryptosporidium* sp dilakukan dari feses yang diawetkan dengan formalin 10% dan dilakukan sesuai dengan petunjuk kerja yang tersedia di dalam kit (lampiran 3). Sebanyak 100 µl supernatan sampel feses ditetaskan dalam sumur ELISA (ELISA plate), sumur A1 diisi dengan 100 µl kontrol negatif dan sumur A2 dengan 100 µl kontrol positif (Gambar 4.1). Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar (15-25°C) selama 30 menit dan setelah itu dicuci 3 kali dengan larutan pencuci. Pada masing-masing sumur ditambahkan 2 tetes reagen 1 kemudian inkubasi selama 5 menit dan dicuci. Setelah pencucian tambahkan 2 tetes reagen 2 kemudian inkubasi selama 5 menit dan dicuci. Kemudian ditambahkan 2 tetes kromogen dan inkubasi selama 5 menit. Terakhir tambahkan 2 tetes *stop solution*. Hasil dapat dibaca secara visual atau dengan *ELISA reader* pada 450 nm. Hasil pemeriksaan diinterpretasikan sebagai berikut:

Positif : nilai absorbansi ≥ 0.15 OD.

Negatif : nilai absorbansi < 0.15 OD.

3.5. Definisi Operasional

1. Diare adalah peningkatan frekuensi defekasi ($>3x/hari$), jumlah ($>10\text{gram/kgBB/hari}$), dan atau perubahan konsistensi tinja menjadi lebih cair. Diare kronik adalah diare yang berlangsung lebih dari 14 hari.
2. Infeksi HIV adalah terdapatnya virus HIV pada tubuh seorang individu yang ditandai dengan tes antibodi HIV positif (ELISA/Western Blot) atau

pemeriksaan produk virus (HIV-RNA atau HIV-DNA dan/atau antigen HIV p24) yang positif.⁵³

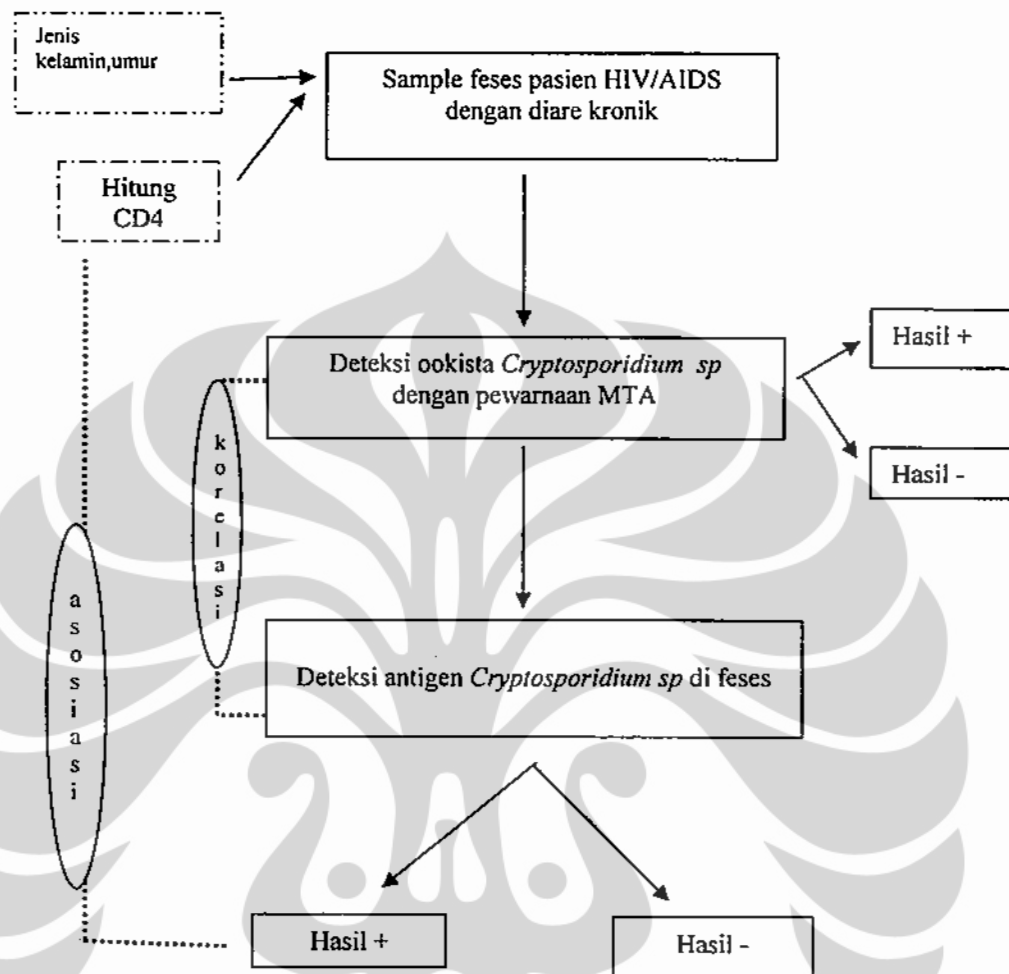
3. AIDS adalah semua individu yang terinfeksi HIV dengan jumlah CD4 <200 sel/mm³ (atau persentase <15%) untuk usia ≥ 5 tahun atau CD4 < 15% untuk usia 36-59 bulan atau CD4 < 20% untuk usia 12-35 bulan atau CD4 < 25% untuk usia < 12 bulan; atau dengan gejala dan kondisi yang terkait dengan HIV.⁵³
4. Jumlah sel CD4 dalam 6 bulan terakhir sebelum pemeriksaan tinja parasit dinyatakan dalam persentase untuk anak < 5 tahun dan CD4 absolut umur ≥ 5 tahun. Derajat imundefisiensi menggunakan nilai CD4 berdasarkan WHO tahun 2006 terlihat pada tabel 3.1⁵³

Table 3.1 Klasifikasi WHO, derajat imundefisiensi HIV berdasarkan CD4

Imunodefisiensi	Nilai CD4 menurut umur			
	< 12bulan (%)	12-35 bulan (%)	36-59 bulan (%)	≥ 5 tahun (sel/mm ³)
Tidak ada	> 30	> 30	> 25	> 500
Ringan	30 – 35	25 -30	20 - 25	350 -499
Sedang	25 – 30	20 - 25	15 - 20	200 – 349
Berat	< 25	< 20	< 15	< 200 atau < 15%

5. Baku emas (*gold standard*) merupakan standar untuk pembuktian ada atau tidaknya ookista *Cryptosporidium* sp. pada spesimen, dan merupakan metode deteksi terbaik yang ada (meskipun bukan yang termurah atau termudah)⁵¹ yaitu menggunakan pulasan tahan asam yang diperiksa di bawah mikroskop.
6. Sensitivitas adalah proporsi sampel dengan hasil uji deteksi positif (positif benar) dibanding seluruh sampel positif (positif benar + negatif palsu).⁵¹
7. Spesifisitas adalah proporsi sampel dengan hasil uji deteksi negatif (negatif benar) dibandingkan dengan seluruh sampel yang negatif (negatif benar + positif palsu).⁵¹

3.6 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian

3.7 Analisis Data

Data disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan grafik. Karakteristik sampel ditampilkan secara tabular. Pengolahan data dilakukan dengan bantuan piranti lunak SPSS 11.0 for Windows.

3.8 Etik Penelitian

Persetujuan etik penelitian diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, No 172/PT02.FK/ETIK/2009 (lampiran).

4. HASIL PENELITIAN

Selama kurun waktu penelitian sejak Juni 2008 – Mei 2009 terdapat 116 sampel pasien HIV/AIDS dengan diare kronik yang dikirim ke laboratorium Parasitologi FKUI untuk pemeriksaan tinja parasit. Sebanyak 9 sampel tidak disimpan dengan baik dalam larutan preservasi dan 8 sampel tidak diketahui identitasnya, sehingga hanya 95 sampel yang dimasukkan ke dalam penelitian.

4.1 Karakteristik Pasien

Pasien HIV pada penelitian ini terdiri atas 65 (68.4%) laki-laki dan 30 (31.6%) perempuan dengan rentang usia 4 bulan hingga 58 tahun. Sebagian besar (22 pasien, 72.6%) penderita berada pada kelompok umur ≥ 5 tahun, dengan 3 diantaranya berusia 5-7 tahun dan sisanya yaitu 66 pasien merupakan pasien dewasa atau berusia > 17 tahun.

Tabel 4.1 Karakteristik pasien

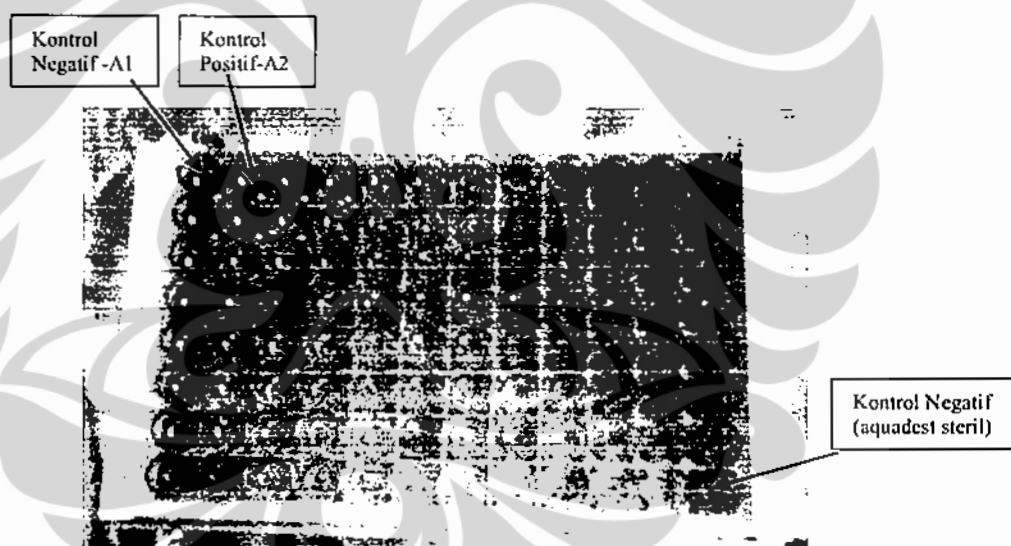
Karakteristik	N	%
Umur dalam tahun (median, range)	27, 0.3 – 58	
Kelompok umur (n=95)		
< 1 tahun	4	4.2
1 - 3 tahun	15	15.8
3 - 5 tahun	7	7.4
≥ 5 tahun	69	72.6
Jenis Kelamin (n=95)		
Laki-laki	65	68.4
Perempuan	30	31.6
Data Persentase atau hitung CD4		
Diketahui CD4 (N=62)		
< 1 tahun	0	
1 - 3 tahun	7	
3 - 5 tahun	5	
≥ 5 tahun	50	
Tidak diketahui	33	
Status imunodefisiensi pasien (n=62)		
Ringan	2	
Sedang	4	
Berat	56	
Terapi ARV (N=95)		
Ya	31	32.6
Tidak	64	67.4
Daerah domisili (N=95)		
Jakarta Pusat	26	27.4
Jakarta Selatan	9	9.5
Jakarta Utara	5	5.3
Jakarta Timur	15	15.8
Jakarta Barat	11	11.6
Luar DKI	29	30.5

Di antara 95 pasien yang diterima, hanya 62 orang yang diketahui data hitung CD4 yaitu 7 pasien usia 1-3 tahun, 5 pasien usia 3-5 tahun dan 50 pasien usia ≥ 5 tahun. Lima puluh enam dari 62 pasien yang diketahui hitung CD4 berada dalam status imundefisiensi berat. Lebih dari setengah pasien (64 pasien, 67.4%) belum mendapat terapi anti retroviral (ARV).

Sebagian besar penderita berasal dari Jakarta Pusat (26 pasien, 27,4%) dan luar Jakarta (29 pasien, 30.5%) yang tersebar di Tangerang (15 orang) Bekasi (11 pasien), Depok (2 pasien) dan Bandung (1 pasien) (Tabel 4.1)

4.2 Hasil Deteksi Koproantigen dengan ELISA

Secara visual hasil negatif tidak menunjukkan perubahan warna sedangkan hasil positif berwarna kuning. Sebagai kontrol negatif selain digunakan kontrol negatif dari kit juga dilakukan terhadap sampel aquadest steril. (Gambar 4.1)



Gambar 4.1 Hasil positif pada deteksi koproantigen dengan teknik ELISA

4.2.1 Perbandingan Deteksi *Cryptosporidium* sp. antara Pemeriksaan Koproantigen dengan Deteksi Ookista menggunakan Pewarnaan MTA

Tabel 4.2 memperlihatkan perbandingan deteksi *Cryptosporidium* sp antara pemeriksaan koproantigen dengan pemeriksaan ookista pulasan MTA. Pada pemeriksaan ookista dengan pulasan MTA terdeteksi 11 sampel positif *Cryptosporidium* sp, sedangkan pada deteksi koproantigen menggunakan

imunoenzim (ELISA) didapatkan 35 sampel hasil positif dan 24 diantaranya tidak ditemukan ookista *Cryptosporidium sp.* Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p= 0,000$, $Kappa=0,367$ Lampiran 1) antara hasil pemeriksaan koproantigen dengan deteksi ookista dengan pulasan MTA. Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas deteksi koproantigen terhadap metode MTA yaitu sebesar 100% dan 71.4%. Nilai prediksi positif (NPP) 31.4% dan nilai prediksi negatif (NPN) 100%.

Tabel 4.2 Hasil deteksi *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV berdasarkan pulasan MTA dan pemeriksaan koproantigen

		Hasil MTA		Total
		+	-	
Koproantigen	+	11	24	35 (36.8%)
	-	0	60	60 (63.2%)
Total		11 (11.6%)	84 (88.4%)	95 (100%)

Tabel 4.3 memperlihatkan hasil pemeriksaan koproantigen *Cryptosporidium sp* di feses berdasarkan jenis parasit yang ditemukan pada pemeriksaan mikroskopis. Berdasarkan pemeriksaan mikroskopis *Cryptosporidium* merupakan jenis parasit terbanyak kedua setelah *Blastocystis hominis*, yaitu sebanyak 11 dari 95 sampel baik sebagai infeksi tunggal (6 sampel) maupun infeksi campur dengan *Blastocystis hominis* (4 sampel) dan *B. hominis*, *Entamoeba coli* (1 sampel). Semua hasil pemeriksaan *Cryptosporidium sp* positif dengan mikroskopis memberikan hasil koproantigen positif. Sedangkan pemeriksaan menggunakan mikroskopis yang dinyatakan negatif, *B. hominis* atau *G. lamblia* menunjukkan hasil deteksi koproantigen positif masing-masing sebesar 12/44 sampel, 10/36 sampel dan 2/4 sampel.

Table 4.3 Hasil pemeriksaan mikroskopis dan deteksi koproantigen *Cryptosporidium* sp pada feses pasien HIV/AIDS

Parasit dengan pemeriksaan mikroskopis	N=95	Koproantigen positif
Negatif	44	12
<i>B. hominis</i>	36	10
<i>G. lamblia</i>	4	2
<i>Cryptosporidium</i>	6	6
<i>B. hominis, Cryptosporidium</i>	4	4
<i>E.coli, B. hominis, Cryptosporidium</i>	1	1

4.2.2 Korelasi antara Nilai Absorbansi dengan Densitas Ookista

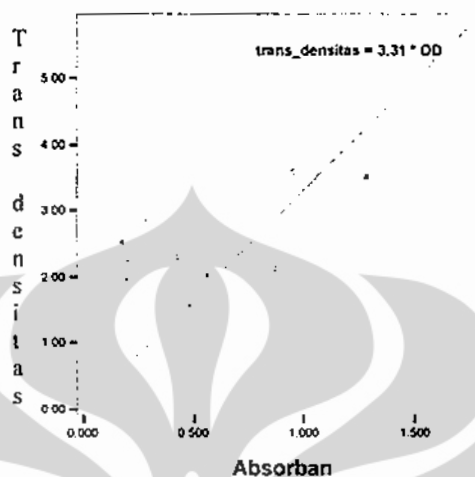
Pada pemeriksaan mikroskopis dengan pulasan MTA dilakukan penghitungan jumlah ookista di semua lapang pandang pada sampel yang positif. (Tabel 4.4) Jumlah ookista berkisar 30 sampai dengan 3400 per slide. Selanjutnya hasil perhitungan ookista tersebut dihubungkan dengan nilai absorbansi

Tabel 4.4 Densitas ookista *Cryptosporidium* dan nilai absorbansi koproantigen

Densitas ookista	Nilai absorbansi
30	0.513
73	0.231
79	0.364
87	0.598
105	0.910
146	0.233
152	0.462
292	0.208
592	0.325
2710	1.324
3400	0.987

Hasil uji korelasi dengan uji Pearson setelah dilakukan transformasi data untuk menormalkan data densitas ookista yang distribusinya tidak normal dengan metode log₁₀, menunjukkan bahwa arah korelasi positif dengan kekuatan korelasi sedang ($r=0.596$). Korelasi antara nilai absorbansi hasil pemeriksaan koproantigen

dengan densitas ookista secara statistik tidak bermakna dengan $p = 0.053$ (Gambar 4.2)



Gambar 4.2 Korelasi antara nilai absorbansi dengan densitas ookista

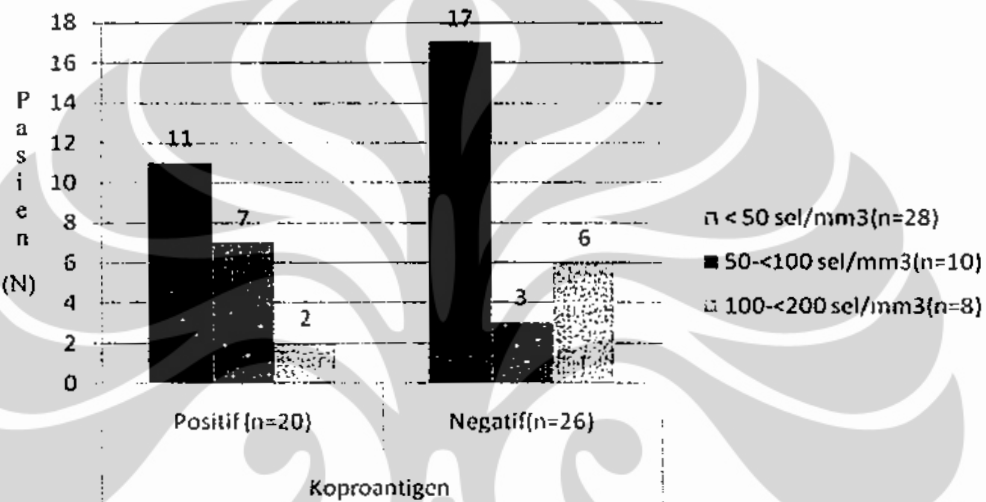
4.3 Distribusi Demografi Penderita HIV dengan Infeksi *Cryptosporidium sp*

Tabel 4.5 menunjukkan sebaran pasien berdasarkan status imunodefisiensi (WHO,2006) pada setiap kelompok umur. Semua pasien pada kelompok umur < 1 tahun ($n=4$) tidak diketahui hitung CD4 sehingga tidak bisa diketahui status imunodefisiensinya. Dari 7 pasien kelompok umur 1-3 tahun yang diketahui hitung CD4 semuanya berada pada status imunodefisiensi berat. Sedangkan pasien kelompok umur 3-5 tahun dan ≥ 5 tahun yang diketahui hitung CD4 berada pada status imunodefisiensi ringan sampai berat.

Table 4.5 Deteksi koproantigen pada berbagai kelompok umur berdasarkan klasifikasi imunodefisiensi oleh WHO

Usia (tahun)	Ringan		Sedang		Berat		Tidak diketahui imunodef.		Total	
	N	Koproantigen +	N	Koproantigen +	N	Koproantigen +	N	Koproantigen +	N	Koproantigen +
< 1	0	0	0	0	0	0	4	0	4	0
1-3	0	0	0	0	7	4	8	2	15	6
3-5	1	0	1	0	3	1	2	1	7	2
≥ 5	1	0	3	2	46	20	19	5	69	27
Total	2	0	4	2	56	25	33	8	11	35

Dari 50 pasien kelompok umur ≥ 5 tahun yang diketahui hitung CD4, 46 diantaranya memiliki status imunodefisiensi berat yang berarti memiliki jumlah CD4 < 200 sel/mm³. Jika dianalisa lebih lanjut hasil pemeriksaan *Cryptosporidium sp* pada kelompok ini berdasarkan hitung CD4 memberikan hasil seperti yang terlihat pada gambar 4.3. Infeksi *Cryptosporidium sp* lebih banyak terdeteksi pada kelompok CD4 < 50 sel/mm³.



Gambar 4.3 Hasil pemeriksaan *Cryptosporidium* berdasarkan jumlah CD4 pada imunodefisiensi berat kelompok umur ≥ 5 tahun

Tabel 4.6 menggambarkan hasil pemeriksaan *Cryptosporidium sp* dengan pulasan MTA dan koproantigen setelah terapi ARV. Dari 11 pasien yang memberikan hasil positif pada pewarnaan MTA, 7 pasien mendapat terapi ARV sedangkan 3 pasien belum mendapat terapi. Sedangkan dari 35 pasien yang positif koproantigen, 15 diantaranya mendapat terapi ARV. Lama pemberian ARV berkisar antara 2 minggu sampai 1 tahun.

Tabel 4.6 Terapi ARV diduga memengaruhi hasil deteksi *Cryptosporidium*

Terapi ARV	MTA + N=11	Koproantigen + N=35
Ya	7	15
Tidak	4	20

5. PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan terhadap sampel feses pasien HIV dengan diare kronik yang dikirim ke Laboratorium Parasitologi untuk pemeriksaan feses parasit. Salah satu kendala dalam penelitian ini adalah dokter pengirim tidak menuliskan identitas pasien dan diagnosis klinis dengan jelas.

Studi yang meneliti kejadian infeksi *Cryptosporidium sp* di Indonesia pada individu immunodefisiensi dengan diare kronik masih terbatas. Penelitian yang dilakukan oleh Rasad et al, tahun 1992 melibatkan populasi immunokompeten usia 13- 18 tahun dengan diare tanpa membedakan akut atau kronis.⁵⁴ Penelitian lain yang dilakukan oleh Katsumata, melibatkan populasi anak dan dewasa dengan diare akut dan tanpa diare.²⁵ Berbeda dengan penelitian ini, kedua penelitian tersebut tidak memasukkan status HIV/AIDS dan diare kronik sebagai kriteria inklusi. Penelitian terbaru dilakukan oleh Kurniawan et al, untuk mengetahui secara umum parasit penyebab diare pada populasi HIV dengan diare kronik.⁵ Pada ketiga penelitian di atas, deteksi *Cryptosporidium sp* hanya dilakukan dengan pulasan MTA. Sebaliknya, pada penelitian ini deteksi *Cryptosporidium sp* dilakukan dengan pulasan MTA dan deteksi koproantigen dan memperhitungkan status HIV/AIDS dengan diare kronik sebagai kriteria inklusi.

Diagnosis kriptosporidiosis yang digunakan secara umum adalah deteksi ookista pada pulasan yang diwarnai MTA dengan menggunakan mikroskop cahaya. Pemeriksaan ini sangat ditentukan oleh kemampuan dan pengalaman tenaga laboratorium. Penelitian ini menggunakan antibodi poliklonal anti-*Cryptosporidium* yang akan mengenali antigen *Cryptosporidium sp* pada supernatan tinja, dan antibodi sekunder yang dilabel enzim (*sandwich* ELISA) yang merupakan anti-antibodi pertama (produk *Diagnostic Automation, Inc Cryptosporidium*).

Kedua teknik pemeriksaan tersebut mudah untuk dilakukan. Pada pemeriksaan mikroskopis, proses konsentrasi atau sedimentasi tinja sangat dianjurkan untuk meningkatkan hasil deteksi parasit walaupun akan menambah waktu pemeriksaan. Pada teknik ELISA untuk deteksi koproantigen, proses

tersebut tidak perlu dilakukan karena akan mempengaruhi keakuratan hasil.¹⁵ Interpretasi hasil mikroskopis lebih sulit daripada ELISA membutuhkan tenaga berpengalaman dan pembesaran hingga 1000X. Hasil pemeriksaan dengan ELISA dapat dibaca secara visual tanpa memerlukan spektrofotometer sehingga pemeriksaan ini dapat dilakukan pada penelitian survey lapangan dan dilakukan pada laboratorium yang tidak dilengkapi spektrofotometer. Pembacaan dengan bantuan spektrofotometer sangat berguna untuk penentuan hasil pemeriksaan yang *borderline*.^{9,19}

Pada penelitian ini, frekuensi kriptosporidiosis pada pasien HIV/AIDS dengan diare kronik di RSUPNCM dengan deteksi koproantigen adalah sebesar 36,8%. Penelitian Silva di Brazil, didapat 13,5% infeksi *Cryptosporidium* dari 52 pasien HIV/AIDS dengan dan tanpa gejala menggunakan teknik imunoenzim (ProSpecT Microplate Assay, Alexon Inc.).⁹ Lebih tingginya frekuensi kriptosporidiosis pada penelitian ini mungkin berhubungan dengan pemilihan pasien HIV/AIDS dengan diare kronik yang merupakan kriteria inklusi ataupun prevalensi *Cryptosporidium sp* di Indonesia yang jauh lebih tinggi daripada di Brazil dengan higiene dan sanitasi lingkungan yang lebih rendah.

Pada penelitian ini, dengan teknik pewarnaan modifikasi tahan asam didapat hasil sebesar 11,6% (11/95), sedangkan dengan deteksi koproantigen didapat 36,8%.(35/95). Kaushik et al, di India tahun 2008 melaporkan 4,9% kriptosporidiosis pada pasien HIV dengan dan tanpa diare menggunakan teknik pewarnaan ZN dan 18,9% dengan pemeriksaan deteksi koproantigen.¹⁶ Berdasarkan hasil pemeriksaan ELISA terdapat perbedaan hasil positif dengan MTA yang cukup besar. Hal ini bisa terjadi, karena teknik mikroskopis tidak dapat mendeteksi stadium selain ookista sedangkan pada tahap penyembuhan kriptosporidiosis, antigen atau produk dari *Cryptosporidium* masih dikeluarkan melalui feses walaupun tanpa ookista utuh.⁵⁵

Kelebihan deteksi koproantigen yaitu dapat mengidentifikasi pasien kriptosporidiosis yang pada saat dilakukan pengumpulan tinja tidak terjadi ekskresi ookista⁵⁵ dan pengumpulan tinja hanya perlu dilakukan satu kali. Pada pemeriksaan mikroskopis dianjurkan untuk dilakukan pemeriksaan 2-3 sampel tinja berbeda yang diambil pada hari berturut-turut atau selang sehari karena akan

meningkatkan angka deteksi parasit. Cartwright, menganjurkan pemeriksaan dua spesimen tinja saja karena pemeriksaan ketiga hanya memberikan informasi tambahan pada 8% kasus, sedangkan pemeriksaan dua spesimen sudah memberikan sensitivitas deteksi sebesar 92%.⁵⁶ Berdasarkan hasil studi Branda, dinyatakan bahwa pemeriksaan spesimen tunggal secara komprehensif sudah mencukupi jika prevalensi infeksi parasit tersebut di populasi mencapai 20%.⁵⁷

Pada penelitian ini, metode deteksi koproantigen mempunyai sensitivitas sebesar 100% dan spesifisitas 71,4% terhadap MTA. Nilai sensitivitas dan spesifisitas dapat saling mempengaruhi satu sama lainnya, dimana makin rendah spesifisitas makin tinggi sensitivitasnya demikian juga sebaliknya. Hasil ini berbeda dengan penelitian Marques tahun 2005 yang mendapatkan nilai sensitivitas 100%, spesifisitas 96%, NPP dan NPN sebesar 89% dan 100% yang menggunakan ELISA dari Alexon, Inc, BIOBRAS.⁵⁸ Pada penelitian Jayalakshmi¹⁷ didapatkan sensitivitas dan spesifisitas ELISA (RIDASCREEN *Cryptosporidium*, R-Biofarm, Germany) dibandingkan dengan MTA sebesar 90,9% dan 98,7%. Perbedaan ini karena konsistensi tinja,²⁴ alat yang digunakan dan kemampuan pemeriksa pada tiap penelitian serta pemilihan kit diagnostik yang menggunakan antibodi poliklonal atau monoklonal. Faktor visual dan psikologis pemeriksa sangat berpengaruh dalam penegakan diagnosis.

Semua hasil pemeriksaan *Cryptosporidium sp* positif dengan mikroskopis memberikan hasil koproantigen positif. Sebanyak 44 sampel yang dinyatakan negatif berdasarkan pemeriksaan mikroskopis, 12 diantaranya memberikan hasil deteksi koproantigen positif. Sedangkan 36 sampel yang ditemukan *B.hominis* dan 4 sampel *G.lambli*a menunjukkan hasil deteksi koproantigen positif masing-masing 10 dan 2 sampel. Spesimen yang tidak terdeteksi ookista *Cryptosporidium sp* secara mikroskopis tetapi positif secara koproantigen menunjukkan kemungkinan pasien terinfeksi *Cryptosporidium sp*⁵⁵ tetapi jumlah ookista yang diekskresikan di bawah ambang deteksi mikroskopis yaitu 1×10^6 ookista/ml tinja.¹⁵ Kemungkinan lain adalah adanya reaksi silang antibodi *Cryptosporidium sp* dengan parasit usus lain karena antibodi yang digunakan merupakan antibodi poliklonal, walaupun beberapa penelitian sudah melaporkan bahwa tidak ditemukan reaksi silang antibodi dengan parasit usus lainnya.^{15,55}

Sel T CD4⁺ merupakan komponen utama sel-sel di lamina propria intestinal dan termasuk dalam populasi sel T yang jumlahnya menurun pasca infeksi oleh HIV tipe 1 terutama menyerang sel T CD4⁺ di daerah intestinal atau *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) menyebabkan kerusakan sel dan keutuhan struktur jaringan. Kerusakan ini bersifat irreversibel sehingga memudahkan penetrasi parasit dan produknya yang berakibat pada kematian sel T. Protein gp120 HIV-1 akan berikatan dengan reseptor integrin $\alpha_4\beta_7$ yang banyak terekspresi di sel T CD4⁺ intestinal.^{49,50}

Infeksi oleh *Cryptosporidium* akan menyebabkan timbulnya respon inflamasi sel limfosit dan fagosit sehingga kadang-kadang terjadi atrofi vili dan hiperplasi kripti yang merupakan karakteristik patologi yang diinduksi oleh sel T. Infeksi terhadap *Cryptosporidium sp* akan meningkatkan jumlah dan variasi subset sel T di jaringan mukosa serta meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi yang berhubungan dengan patologi yang ditimbulkan pada saluran intestinal. Jika infeksi dapat terkendali maka populasi sel T akan kembali normal.^{43,44}

Dari hasil pemeriksaan secara MTA dan koproantigen didapatkan *Cryptosporidium sp* lebih banyak menginfeksi kelompok status imundefisiensi berat dibandingkan dengan status imundefisiensi sedang. Jumlah CD4 sebagai komponen sistem imun mempunyai peran dalam mengontrol infeksi terhadap *Cryptosporidium sp*. Walaupun parasit oportunistik dapat menginfeksi setiap saat pada pasien-pasien HIV, beberapa studi melaporkan bahwa infeksi *Cryptosporidium* menetap pada pasien dengan jumlah CD4 < 200 sel/mm³.⁷ Namun ada juga penelitian yang menyebutkan bahwa kriptosporidiosis intestinal terjadi pada penderita HIV/AIDS dengan jumlah CD4 < 100/ul.^{22,41} Penelitian yang dilakukan di Brazil 2003, didapatkan 100% infeksi *Cryptosporidium* ditemukan pada pasien dengan jumlah CD4 sepuluh hingga limapuluh sel/mm³ dengan mean 23.3 sel/mm³.⁸ Infeksi *Cryptosporidium sp* pada penelitian ini ditemukan pada pasien dengan jumlah CD4 < 200 sel/mm³ dan jumlah terbanyak pada pasien-pasien dengan CD4 < 50 sel/mm³.

Salah satu faktor yang mempengaruhi infeksi *Cryptosporidium sp* adalah pemberian terapi ARV, yang diharapkan dapat meningkatkan populasi CD4 intraepitelial sehingga dapat mencegah dan mengeliminasi parasit. Pada penelitian

ini, frekuensi *Cryptosporidium sp* dengan pemeriksaan pulsan MTA ditemukan lebih tinggi pada kelompok yang diberikan terapi ARV (7/11) dibandingkan belum mendapat ARV. Dari status di dapatkan bahwa 3 dari 7 pasien positif ookista *Cryptosporidium*, mendapatkan terapi ARV kurang dari 1 bulan sehingga belum tercapai CD4 yang adekuat untuk eliminasi parasit. Cimerman dalam studinya, menyatakan bahwa prevalensi kriptosporidiosis di Sao Paulo pada pasien HIV dengan diare ditahun pertama pengobatan ARV sebesar 24.4%.⁵⁹ Di sisi lain, Bachur melaporkan terjadinya resolusi kriptosporidiosis 6 bulan pasca pengobatan ARV.⁶⁰ Pada deteksi koproantigen, hasil positif lebih banyak terdapat pada kelompok yang belum mendapatkan terapi ARV dibandingkan dengan kelompok yang mendapat ARV. Ada beberapa faktor lain yang turut berperan terhadap timbulnya infeksi *Cryptosporidium sp* yaitu, daerah tempat tinggal, ada atau tidak binatang peliharaan atau kontak dengan binatang yang terinfeksi *Cryptosporidium*, sumber air minum, kebiasaan mencuci tangan dan kepatuhan minum obat ARV bagi pasien HIV/AIDS.

Pada studi ini, infeksi *Cryptosporidium* ditemukan pada kelompok umur 1- <3 tahun, 3- <5 tahun dan ≥ 5 tahun masing-masing sebesar 40%(6/15), 29%(2/7) dan 39.1% (27/69). Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna angka infeksi *Cryptosporidium sp* diantara kelompok umur tersebut. Pemeriksaan terhadap 800 pasien dewasa dan 202 anak-anak di rumah sakit Andhara Pradesh India, infeksi *Cryptosporidium sp* dilaporkan masing-masing sebesar 0.12% dan 2.99%.⁶¹ Populasi rentan terhadap infeksi *Cryptosporidium* pada individu immunosupresi meliputi semua kelompok umur.²³

6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN

1. Frekuensi kriptosporidiosis pada pasien HIV/AIDS dengan diare kronik dengan deteksi koproantigen sebesar 36.8% lebih tinggi daripada MTA 11.6%.
2. Sensitivitas dan spesifisitas teknik imunoenzim terhadap teknik mikroskopis dengan pewarnaan MTA adalah 100 % dan 71.4%
3. Hubungan antara nilai absorbansi koproantigen dengan hitung ookista tidak bermakna secara statistik ($p=0.053$, $r=0.596$).
4. Frekuensi kejadian koproantigen positif pada kelompok imundefisiensi sedang 2/4 pasien, kelompok imundefisiensi berat 25/56 pasien. Berdasarkan kelompok umur, kejadian kriptosporidiosis ditemukan 6, 2 dan 27 masing-masing pada kelompok umur 1-3 tahun, 3-5 tahun dan ≥ 5 tahun.

6.2. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian dengan sampel pasien diare akut dan tanpa diare pada individu HIV/AIDS.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan PCR untuk menyingkirkan positif palsu.

DAFTAR PUSTAKA

1. About the AIDS Education and Training Centers (AETC). HIV classification: CDC and who staging systems. Diunduh dari: http://www.aidsetc.org/aidsetc?page=cm-105_disease%20. 4 Juni 2009.
2. Certad G, Arenas-Pinto A, Pocaterra L, Ferrara G, Castro J, Bello A. Cryptosporidiosis in HIV-infected venezuelan adults is strongly associated with acute or chronic diarrhea. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(1):54-7.
3. Ajjampur SR, Asirvatham JR, Mutusamy D, Gladstone BP, Abraham OC, Mathai D, et al. Clinical features and risk factors associated with cryptosporidiosis in HIV infected adults in India. *Indian J Med Res.* 2007;126:553-7.
4. Adesiji Y, Lawal RO, Taiwo SS, Fayemiwo SA, Adeyeba OA. Cryptosporidiosis in HIV infected patients with diarrhoea in osun state southwestern Nigeria. *Eur J Gen Med.* 2007;4(3):119-22.
5. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans Royal Society Trop Med Hyg.* 2009;103:892-8
6. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):554-63.
7. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(1):145-54.
8. Gupta S, Narang S, Nunavath V, Singh S. Chronic diarrhea in HIV patients: prevalence of coccidian parasites. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26(2):172-5.
9. Silva C.V, Ferreira M, Goncalves-Pires MR, Costa-Cruz JM. Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patient by using a

- commercially available immunoenzymatic assay. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(8):1097-9.
10. Mehta P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Postgrad Med. 2002;48:217.
 11. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Clin Pathol. 1985;38:1337-41.
 12. Weber R, Byan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. J Clin Microbiol. 1992;30(11):2869-73.
 13. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J Clin Microbiol. 1983;18(1):185-90.
 14. Office International des Epizooties (OIE). Cryptosporidiosis chapter 2.9.4. In terrestrial manual 2008. Diunduh dari <http://www.oei.int/eng/normes/enmmanual.htm>. 20 November 2008
 15. Rosenblatt JE, Sloan L. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of *Cryptosporidium* in stool specimens. J Clin Microbiol. 1993;31(6):1468-71.
 16. Kaushik K, Khurana S, Wanchu A, Malla N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of Cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. Acta Trop. 2008;107(1):1-7.
 17. Jayalakshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. Indian J Pathol Microbiol. 2008;51(1):137-8.
 18. Werner, Sulima P and Majewska. Evaluation of usefulness of different methods for detection of *Cryptosporidium* in human and animal stool samples. Wiad Parazytol. 2004;50(2):209-20.

19. Dagan R, Fraser D, El-On J, Kossis I, Deckelbaum R, Turner S. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* sp. in stool specimens from infants and young children in field studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(2):134-8.
20. Roy SL, DeLong SM, Stenzel SA. Risk factor for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the united states from 1999 to 2001. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):2944-51.
21. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(1):67-85.
22. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4(3):325-58.
23. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 2004;38:818-62.
24. Rasad R, Adjung SA, Rukmono B, Sunoto, Suharyono. *Cryptosporidium* infection in children with diarrhea. 25th Annual Scientific Seminar, Research priorities for Trop Med in the 90's. Proceedings of the 25th Silver Jubilee Seminar of the Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine; 1989 Feb 23 -25.
25. Katsumata T, Hosea D, Wasito EB, Kohno S, Hara K, Seoparto P, et al. Cryptosporidiosis in Indonesia: a hospital based study and a community vased survey. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(4):628-32.
26. Fayer R, Ungar BL. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):458-83.
27. Xiao L, Cama V. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: Fayer R, Xiao L, editors. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd ed. London: CRC press; 2007.p.57-108.
28. White AC Jr. Cryptosporidiosis. In: Mandell G, Bennet J, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases.* 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005:3215-28.

29. Palmateer G. *Cryptosporidium parvum* is a very successful and lethal parasite. Environmental Science and Engineering. Diunduh dari: <http://www.esemag.com/index.html>. 4 Juni 2009.
30. Sears CL, Kirkpatrick BD. Cryptosporidiosis and isosporiasis. In: Gillespie SH, Pearson RD, editors. Principles and practice of clinical parasitology. New York: John Wiley & Sons Inc; 2001.p.139-59.
31. Tzipori S. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol Rev. 1983;47(1):84-96.
32. Southwick FS. Infectious Diseases in 30 Days. New York: McGraw-Hill Companies Inc; 2003.
33. Smith HV. Environmental aspects of *Cryptosporidium* species: a review. J Royal Society Med. 1990;83:629-31.
34. Chokephaibulkit K, Wanachiwanawin D, Tosasuk K, Pavitpok J, Vanprapar N, Chearskul S. Intestinal parasitic infections among human immunodeficiency virus-infected and uninfected children hospitalized with diarrhea in Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2001;32(4):770-5.
35. Smith HV, Nichols RAB. *Cryptosporidium* In: Shabbir S, editor. Foodborne Diseases. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007.p.233-76.
36. Khan WA, Rogers KA, Karim MM, Ahmed S, Hibberd PL, Calderwood SB, et al. Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(4):412-9.
37. Pereira MDGC, Atwill ER, Barbosa AP, Silva SAE, Zapata MTAG. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiania, Goias, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(6):787-93.
38. Soetomenggolo H, Firmansyah A, Kurniawan A, Trihono PP. Cryptosporidiosis in children less than three years old in Ciliwung Riverside, Kampung Melayu Village Jakarta, Indonesia. Pediatrica Indonesiana; 2005;48:99-102.

39. Dwivedi KK, Prasad G, Saini S, Mahajan S, Lal S, Baveja UK. Enteric opportunistic parasites among HIV infected individuals: associated risk factor and immune status. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60:76-81.
40. Smith HV. Diagnosis. In: Fayer R, Xiao L, editors. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd ed. London: CRC press; 2007.p.173-203.
41. Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, Gaines JK. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1989;27(5):1135-6.
42. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RC. Comparison of PCR and microscopy for detection to *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):995-8.
43. McDonald V. Immune responses. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2nd ed. London: CRC Press; 2008.p.210-24.
44. Morales MA, Pozio E. Humoral and cellular immunity against *Cryptosporidium* infection. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2002;2:291-301.
45. Lean IS, McDonald V, Pollok R. The role of cytokines in the pathogenesis of *Cryptosporidium* infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15:229-34.
46. Riggs MW. Recent advances in cryptosporidiosis the immune response. *Microbes Infect.* 2002;4:1067-80.
47. Baratawidjaja KG. *Imunologi dasar.* Edisi 7. Jakarta:FKUI; 2006.p.322-33.
48. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology.* 5th ed Philadelphia:WB Saunders Co; 2005.
49. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha_4\beta_7$, the gut

- mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(3):301-9.
50. Sattentau Q. HIV's gut feeling. *Nat Immunol.* 2008;9:225-7.
51. Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. edisi 2. Jakarta: Sagung Seto; 2006.
52. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. *J Clin Microbiol.* 1995;33(10):2592-5.
53. WHO. WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children. Diunduh dari <http://www.who.int/hiv>. 14 Juni 2009.
54. Rasad R, Adjung S, Daldiyono. Infeksi *Cryptosporidium* pada orang dewasa yang menderita diare. Laporan penelitian direktorat Pembina penelitian dan pengabdian pada masyarakat Dikti; 1992 Agustus.
55. Ungar BP. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2491-5.
56. Cartwright CP. Utility of multiple stool specimen ova and parasite examination in a high prevalence setting. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2408-11.
57. Branda JA, Lin TYD, Rosenberg ES, Halpem EF, Ferraro MJ. A rational approach to the stool ova and parasite examination. *Clin Infect Dis.* 2006;42:972-8.
58. Merques RF, Cardoso LV, Cavasini CE, Carmem M, Bassi NA, Gottardo MT, et al. Performance of an Immunoenzymatic assay for *Cryptosporidium* diagnosis of fecal sample. *Braz J Infec Dis.* 2005;9(1):3-5.
59. Saksirisampant W, Eampokalap B, Rattanasnthong M, Likansakul S, Wiwanitkit V, Nasinkam A, et al. A prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients. *J Med Assoc Thai.* 2002;85 (Suppl 1):S424-8.

60. Bachur TP, Vale JM, Branco IV, Queiroz TR, Chaves C. enteric parasitic infections in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. *Braz. J. Infect.* 2008; 12:115-22
61. Nagamani K, Rajkumari A, Gyaneshwari. Cryptosporidiosis in a tertiary care hospital in Andhra Pradesh. *Indian J Med Microbiol.* 2001;19:215-6.



Lampiran 1.

Perbandingan Hasil Deteksi *Cryptosporidium sp* Berdasarkan Pulasan MTA dan Pemeriksaan koproantigenCoproantigen * MTA *Cryptosporidium* Crosstabulation

		MTA <i>Cryptosporidium</i>		Total		
		Negatif	Positif			
Coproantigen	negatif	Count	60	0	60	
		Expected Count	53.1	6.9	60.0	
		% within Coproantigen	100.0%	.0%	100.0%	
		% within MTA <i>Cryptosporidium</i>	71.4%	.0%	63.2%	
		positif	Count	24	11	35
		Expected Count	30.9	4.1	35.0	
	% within Coproantigen	68.6%	31.4%	100.0%		
	% within MTA <i>Cryptosporidium</i>	28.6%	100.0%	36.8%		
Total	Count	84	11	95		
	Expected Count	84.0	11.0	95.0		
	% within Coproantigen	88.4%	11.6%	100.0%		
	% within MTA <i>Cryptosporidium</i>	100.0%	100.0%	100.0%		

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	21.327 ^b	1	.000		
Continuity Correction ^a	18.367	1	.000		
Likelihood Ratio	24.532	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	21.102	1	.000		
McNemar Test				.000 ^c	
N of Valid Cases	95				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.05.

c. Binomial distribution used.

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.367	.086	4.618	.000
N of Valid Cases		95			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Lampiran 2.

Uji Statistik Korelasi antara Hitung Ookisia dengan Nilai Absorbansi

Correlations

		trans_ densitas	Absorban
trans_densitas	Pearson Correlation	1	.596
	Sig. (2-tailed)		.053
	N	11	11
Absorban	Pearson Correlation	.596	1
	Sig. (2-tailed)	.053	
	N	11	99



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

NOMOR : 172 /PT02.FK/ETIK/2009

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL — CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:

“Deteksi Coproantigen *Cryptosporidium* sp pada Tinja Penderita HIV/AIDS dengan Diare Kronis Menggunakan Teknik Imunoenzim”.

Peneliti Utama : dr.Sri Wahdini
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Program Magister Ilmu Biomedik FKUI

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal.

4 Mei 2009

Jakarta,



Chairman
Ketua

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

CE


DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.

23961 Craftsman Road, Suite E/F, Calabasas, CA 91302

Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383


onestep@rapidtest.com


technicalsupport@rapidtest.com

www.rapidtest.com

 IVD


See external label

 2°C-8°C

 Σ=96 tests

 Cat # 8301

Cryptosporidium

Cat # 8301

Intended Use

This ELISA is an *in vitro* immunoassay for the qualitative determination of *Cryptosporidium* antigen in feces. It is a double antibody (sandwich) ELISA using an anti-*Cryptosporidium* antibody to capture the antigen from the stool supernatant. A second anti-*Cryptosporidium* antibody is then added which sandwiches the captured antigen. This reaction is visualized by the addition of an anti-second antibody conjugated to peroxidase and the chromogen tetramethylbenzidine (TMB). The resulting blue color development indicates the presence of *Cryptosporidium* antigens being bound by the anti-*Cryptosporidium* antibodies.

Summary

Cryptosporidium is a coccidian parasite that is recognized as an important enteric pathogen. The organism causes an acute, though self-limiting infection in immunocompetent individuals. Incubation periods of 1 to 12 days have been reported with most oocyst shedding ending by day 21. Symptoms range from mild to severe diarrhea with a variety of complications. ^{1,8,9,10,11,13}

The infection in immunocompromised patients is much more severe and may often be life threatening. Passage of fluid, up to 12 liters per day, has been reported. ^{1,2,3,12,14,16}

Multiple pathways of *Cryptosporidium* transmission have been implicated. These include animal to human, water contamination and person-to-person. The latter may include contact between members of the same household, day care centers, and homosexual men. ^{1,2,12,14,16}

Diagnosis of *Cryptosporidium* infections was done originally by direct detection techniques. Of these, microscopic examination of stools using stains or fluorescence labeled antibodies has been the most common. However, this method relies on an experienced technician and subsequent observation of intact organisms. Because of the historically low proficiency of correct microscopic examinations, alternative diagnostic methods have been investigated.^{4,5,16,17}

One important alternative has been the development of an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for use with stools. These tests, which have shown comparable sensitivity to experienced microscopic examinations, are fairly simple to perform and do not require the observation of intact organisms.^{6,7}

Principle of Procedure

During the first incubation, *Cryptosporidium* antigens present in the stool supernatant are captured by antibodies attached to the wells. The second incubation adds an additional anti-*Cryptosporidium* antibody that "sandwiches" the antigen. The next incubation adds an anti-second antibody conjugated to peroxidase. After washings to remove unbound enzyme, a chromogen is added which develops a blue color in the presence of the enzyme complex and peroxide. The stop solution ends the reaction and turns the blue color to yellow.

Reagents

Item	Description	Symbol
Test Strips	Microwells containing anti- <i>Cryptosporidium</i> polyclonal antibodies - 96 test wells in a test strip holder.	MT PLATE
Reagent 1	One (1) bottle containing 11 ml of goat anti- <i>Cryptosporidium</i> antibodies with blue dye and Thimerosal.	Ab
Reagent 2	One (1) bottle containing 11 ml of anti-goat-peroxidase with red dye and Thimerosal.	CONJ
Positive Control	One (1) vial containing 2 ml of a diluted <i>Cryptosporidium</i> positive formalinized stool supernatant.	CONTROL +
Negative Control	One (1) vial containing 2 ml of a <i>Cryptosporidium</i> negative formalinized stool supernatant.	CONTROL -
Chromogen	One (1) bottle containing 11 ml of the chromogen tetramethylbenzidine (TMB) and peroxide.	SUBS TMB
Wash Concentrate (20X)	Two (2) bottles containing 25 ml of concentrated buffer and surfactant with Thimerosal.	WASH BUF
Stop Solution	One (1) bottle containing 11 ml of 1 M phosphoric acid.	SOLN

Precautions

Do not use solutions if they precipitate or become cloudy.

Exception: Wash concentrate may precipitate during refrigerated storage, but will dissolve upon warming.

Do not add azides to the samples or any of the reagents.

Controls and some reagents contain Thimerosal as a preservative.

Treat all reagents and samples as potentially infectious materials. Use care to prevent aerosols and decontaminate any spills of samples.

Storage Conditions

Reagents, strips and bottled components:

Store between 2 – 8 °C.

Squeeze bottle containing diluted wash buffer may be stored at room temperature.

Preparation

Wash Buffer - Remove cap and add contents of one bottle of Wash Concentrate to a squeeze bottle containing 475 ml of DI water. Swirl to mix. Squeeze bottle should have a narrow tip to optimize washings.

Collection of Stool (Feces)

No modification of collection techniques used for standard microscopic O&P examinations is needed. Stool samples may be used as unpreserved or frozen, or in preservation media of 10% formalin, SAF or MF.

Unpreserved samples should be kept at 2 – 8 °C and tested within 24 hours of collection. Samples that cannot be tested within this time should be frozen at -20 °C or lower until used. Freezing does not adversely affect the test.

Formalized, SAF and MF preserved samples may be kept at room temperature (15-25 °C) and tested within 18 months of collection. **DO NOT** freeze preserved samples.

All dilutions of unpreserved stools must be made with the wash buffer.

Preparation of sample:

Fresh/Frozen Stools

Thaw sample if needed. Add sufficient diluted wash buffer to make approximately a 1:4 dilution (1 gram or a pea size of fecal sample to 3 ml of diluted wash buffer) and mix well.

Preserved Stools (Formalin, SAF and MF)

Mix contents thoroughly inside collection container. No further processing is required.

Procedure

Materials Provided

Cryptosporidium Stool Antigen Microwell ELISA Kit

Materials Required But Not Provided

Transfer Pipettes
Squeeze bottle for washing strips (narrow tip is recommended)
Graduated Cylinder
Reagent grade (DI) water

Suggested Equipment

ELISA plate reader with 450 and 620-650 nm filters

All incubations are at room temperature (15 to 25 °C)

Test Procedure

1. Break off the required number of wells needed (number of samples plus 2 for controls) and place in holder.
2. Add 2 drops (approximately 100 µl) of negative control to well # 1 and 2 drops of positive control to well # 2.
3. Add 2 drops of the stool supernatant to each test well.
4. Incubate for 30 minutes at room temperature (15-25 °C), then wash.*
5. Add 2 drops of Reagent 1 (blue solution) to each well.
6. Incubate for 5 minutes, then wash.
7. Add 2 drops of Reagent 2 (red solution) to each well.
8. Incubate for 5 minutes, then wash.
9. Add 2 drops of Chromogen to each well.
10. Incubate 5 minutes.
11. Add 2 drops of Stop Solution to each well. Mix wells by gently tapping the side of the strip holder with index finger.
12. Read results visually or at 450/620-650 nm. Zero reader on air.

* Washings consist of vigorously filling each well to overflowing and decanting contents three separate times.

Controls must be included each time the kit is run.

Interpretation of Results – Visual

Reactive: Any sample well that is obviously more yellow than the negative control well.

Non-reactive: Any sample well that is not obviously more yellow than the negative control well.

NOTE: The negative control, as well as some samples, may show some slight color. A sample well must be obviously darker than the negative control well to be called a positive result.

Interpretation of Results - ELISA Reader

Zero reader on air. Read all wells at 450/620-650 nm.

Reactive: Absorbance reading of 0.15 OD units and above indicates the sample contains *Cryptosporidium* antigen.

Non-reactive: Absorbance reading less than 0.15 OD units indicates the sample does not contain detectable levels of *Cryptosporidium* antigen.

Test Limitations

Test results should be used as an aid in diagnosis and should not be interpreted as diagnostic by themselves.

DO NOT concentrate stool samples. Assay will not give accurate results on a concentrated sample.

A negative result can occur from an antigen level lower than the detection limits of this assay.

Multiple samples over time may be indicated for those patients that are suspected of being positive for *Cryptosporidium*.

Expected Results

Normal healthy individuals should be free of *Cryptosporidium* and should test negative. A positive reaction indicates that the patient is shedding detectable amounts of *Cryptosporidium* antigen.

Certain populations, such as homosexual men and children in day care settings, have shown higher rates of infection with *Cryptosporidium* than the normal population. Please refer to the Summary section for references.

Performance Characteristics

Study #1 – vs. Microscopy

N = 71

		Microscopy	
		+	-
DAI	+	25	1
	-	2	43

Sensitivity – $25/27 = 93\%$

Specificity – $43/44 = 98\%$

Analytical Sensitivity

This assay can detect approximately 30 nanograms per ml of *Cryptosporidium* antigen.

Quality Control

The use of a positive and negative control allows easy validation of kit stability. For a valid test, the positive control must have an absorbance of at least 0.5 OD units and the negative control must be less than 0.15 OD units. Should the value fall below this limit, the kit should not be used.

Troubleshooting

Problem: Negative control has substantial color development.

Correction: Washings were insufficient. Repeat test with more vigorous washings.

References

1. Chapman, P.A. "Cryptosporidiosis: Recent Trends in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment." Serodiag & Immunother Infect Dis #2, 1988, pp. 311-317.
2. Meyer, E.A. "Waterborne *Giardia* and *Cryptosporidium*." Parasit Today. Vol. 4, #7, 1988, pp. 200-201.
3. Garcia, L., Bruckner, D., Brewer, T., "Cryptosporidiosis in Patients with AIDS." ACPR, May 1988, pp. 38-41.
4. Stibbs, H., Ongerth, J. "Immunofluorescence Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Fecal Smears." J Clin Micro, Vol 24 #4, Oct. 1986, pp.517-521.
5. McLaughlin, J. et al. "Identification of *Cryptosporidium* Oocysts by Monoclonal Antibody." Lancet, January 3, 1987, pp.51.
6. Ungar, B. "Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of *Cryptosporidium* Antigens in Fecal Specimens." J Clin Micro, Vol. 28 #11, Nov 1990, pp. 2491-2495.
7. Anusz, K., et al. "Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Bovine Feces by Monoclonal Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay." J. Clin Micro, Vol. 28 #12, dec. 1990, pp. 2770-2774.
8. Jokipii, L., et al. "*Cryptosporidium*: A Frequent Finding In Patients With Gastrointestinal Symptoms." Lancet, August 13, 1983, pp. 358-360.
9. Shephard, R., et al. "Shedding of Oocysts of *Cryptosporidium* in Immunocompetent Patients." J Clin Pathol, Vol. 41, 1988, pp. 1104-1106.
10. Holten-Anderson, W., et al. "Prevalence of *Cryptosporidium* Among Patients with Acute Enteric Infection." J. Infect, Vol. 9, 1984, pp. 277-282.
11. Jokipii, L. and Jokipii, M. "Timing of Symptoms and Oocyst Excretion in Human Cryptosporidiosis." N Engl J Med, Vol. 315 #26, 1986, pp.1643-1647.
12. Egger, M., et al. "Symptoms and Transmission of Intestinal Cryptosporidiosis." Arch Dis Child, Vol 65, pp 445-447.
13. Hart, M., et al. "Acute Self-Limited Colitis Associated with *Cryptosporidium* in an Immunocompetent Patient." J Ped Gastro Nutr, Vol. 8, 1989, pp. 401-403.

14. Nwanyanwu, O., et al. "Cryptosporidiosis in a Day-Care Center." Texas Med, Vol. 85, June 1989, pp. 40-43.
15. Sloan, L.M., and Rosenblatt, J.E. "Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Cryptosporidium* spp. in Stool Specimens." J Clin Micro, Vol. 31 #6, June 1993, pp. 1468-1471.
16. Current, W. and Garica, L. "Cryptosporidiosis." Clin Micro Rev, Vol. 4 #3, July 1991, pp. 325-358.
17. Weber, R. et al. "Threshold of Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Human Stool Specimens; Evidence for Low Sensitivity of Current Diagnostic Methods." J Clin Micro, Vol. 29 #7, July 1991, pp. 1323-1327.

Date Adopted	Reference No.
2007-08-01	DA-Cryptosporidium-2008



DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.
 23961 Craftsman Road, Suite E/F, Calabasas, CA 91302
 Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383
 ISO 13485-2003



Revision Date: 6/24/08

RIWAYAT HIDUP



- 1 Nama Lengkap : dr. Sri Wahdini
- 2 NPM : 0606150795
- 3 Tempat/Tanggal Lahir : Lhokseumawe/ 2 juni 1981
- 4 Agama : Islam
- 5 Alamat : Grand Depok City, Anggrek I Blok C3 No. 5
Depok – Jawa Barat
- 6 Pekerjaan : Staf PTT Departemen Parasitologi FKUI
- 7 Alamat Instansi : Jl. Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat
- 8 Riwayat Pendidikan

SDN 29 Banda Aceh	1987 – 1993
MTsN 1 Banda Aceh	1993 – 1996
SMAN 3 Banda Aceh	1996 – 1999
S1 Fakultas Kedokteran UJ	1999 - 2005
- 9 Riwayat Pekerjaan:

Staf PTT Departemen Parasitologi FKUI	Agustus 2006 - sekarang
---------------------------------------	-------------------------

Jakarta, 10 Agustus 2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Wahdini'.

(Sri Wahdini)

**Deteksi Koproantigen *Cryptosporidium sp*
pada Pasien HIV/AIDS dengan Diare Kronik**

Agnes Kurniawan,* Sri Wahdini,* Evy Yunihastuti**

*Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

**Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Cryptosporidium sp adalah parasit yang merupakan protozoa penyebab diare pada individu imunodefisiensi seperti penderita HIV/AIDS. Diagnosis dengan menemukan ookista pada tinja menggunakan mikroskop sulit dilakukan karena bergantung kepada keterampilan serta pengalaman tenaga mikroskopis sehingga kurang sensitive. Deteksi koproantigen *Cryptosporidium sp* menggunakan ELISA diketahui lebih sensitive dan specific. Penelitian ini bertujuan untuk deteksi koproantigen *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV/AIDS dengan diare kronik menggunakan ELISA. Sebanyak 95 sampel tinja dari pasien HIV/AIDS dengan diare kronik diperiksa menggunakan pulasan tahan asam yang merupakan *gold standart* dan deteksi koproantigen. Sebanyak 35 sampel (36.8%) memberikan hasil positif koproantigen. Sensitivitas dan spesifisitas koproantigen dibandingkan dengan pulasan tahan asam sebesar 100% dan 71.4%. Tidak terdapat korelasi antara nilai absorbansi dengan densitas ookista

Kata kunci:

Cryptosporidium sp, HIV/AIDS, diare kronik, koproantigen.

**Detection of *Cryptosporidium sp* in Human Immunodeficiency Virus/Acquired
Immunodeficiency syndrome patient with chronic diarrhea**

Agnes Kurniawan,* Sri Wahdini,* Evy Yunihastuti^

*Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

^Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Cryptosporidium sp is a protozoan parasite, causes severe diarrhea in immunodeficient hosts like the HIV/AIDS patients. Diagnosis of cryptosporidiosis by finding the oocyst from stool by modified acid fast staining, is insensitive. Coproantigen detection offers more sensitive and specific technique to detect *Cryptosporidium* infection. The objective of this study is to determine cryptosporidiosis proportion among HIV/AIDS patients by *Cryptosporidium* antigen detection in stool compare it to modified acid fast staining and determine its correlation with oocysts count. A number of 95 stool specimens from the HIV/AIDS patients with chronic diarrhea were subjected to coproantigen ELISA test and modified acid-fast staining (gold standard). The frequency of *Cryptosporidium* infection was 36.8% and 11.6% respectively by coproantigen detection and AF staining with 100% sensitivity and 71.4% specificity. There is no correlation between optical density and oocyst count.

Key word:

Cryptosporidium sp, HIV/AIDS, chronic diarrhea, coproantigen

Pendahuluan

Cryptosporidium sp adalah protozoa intestinal penyebab diare yang *self-limiting* pada individu imunokompeten sedangkan pada individu imunokompromais menyebabkan diare kronis. Beberapa peneliti telah melaporkan kejadian kriptosporidiosis pada penderita *human immunodeficiency virus (HIV/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS))*. Infeksi *Cryptosporidium sp* dengan manifestasi intestinal kronik (>1 bulan) merupakan salah satu infeksi parasit selain *Isospora* yang menjadi indikator AIDS berdasarkan klasifikasi CDC. Pada tahun 2005 di Venezuela ditemukan 15% infeksi *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV positif dengan diare.¹ Sedangkan di India tahun 2007 didapatkan 25% kasus infeksi *Cryptosporidium sp* pada penderita HIV dewasa dengan gejala klinis dan 18% asimtomatik.² Di bagian barat daya Nigeria pada tahun 2007 ditemukan 52,7% pasien HIV dengan diare yang disebabkan oleh *Cryptosporidium sp*.³ Pemeriksaan yang dilakukan terhadap 318 sampel tinja pasien HIV dengan gejala diare pada periode November 2004 sampai Maret 2007 di Departemen Parasitologi FKUI ditemukan *Cryptosporidium sp* sebagai parasit terbanyak kedua setelah *Blastocystis hominis* yaitu sebesar 11,9%.⁴

Cryptosporidium sp merupakan patogen oportunistik karena paling sering menyebabkan penyakit bila status imun hospes menurun. Gejala klinis dan berat penyakit kriptosporidiosis berkaitan erat dengan status kekebalan tubuh dan diare merupakan manifestasi klinis utama.⁵ Pada beberapa studi

dilaporkan bahwa sel/mm³ darah.⁶ Caludio Vieira et al melaporkan infeksi *Cryptosporidium sp* terdeteksi pada pasien dengan hitung CD4 < 100 sel/mm³ dengan gejala klinis diare kronik penurunan berat badan dan bahkan menimbulkan kematian.⁷ Pemberian *highly active antiretroviral therapy (HAART)* pada pasien AIDS dapat mengeradikasi infeksi intestinal *Cryptosporidium sp*. Beberapa pasien AIDS dengan diare yang disebabkan oleh *Cryptosporidium sp* dan diobati dengan HAART menunjukkan perbaikan secara klinis dan histologi serta penurunan jumlah parasit.^{8,9}

Diagnosis kriptosporidiosis dapat dilakukan dengan menggunakan metode mikroskopis, deteksi antigen dengan immunoassay dan molekuler. Pewarnaan modifikasi tahan asam (MTA) merupakan metode mikroskopis untuk mendeteksi *Cryptosporidium sp* yang umum dipakai oleh berbagai laboratorium di dunia, termasuk Indonesia.¹⁰ Pada pemeriksaan dengan teknik mikroskopis diperlukan jumlah ookista yang banyak atau minimal 1x10⁶/ml, tenaga laboratorium yang terlatih, berpengalaman dan memerlukan waktu yang lebih lama.¹¹⁻¹³ Infeksi awal saat ookista belum dikeluarkan dalam jumlah banyak melalui tinja maka hasil pemeriksaan mikroskopis akan negatif. Selain itu ookista dikeluarkan secara intermiten dan jumlahnya bervariasi dari hari ke hari. Pada kasus dengan kecurigaan tinggi terhadap kriptosporidiosis tetapi tidak ditemukan ookista pada tinja maka perlu dilakukan pemeriksaan dengan teknik lain salah satunya adalah deteksi

antigen.¹⁴ Kaushik et al tahun 2008 melaporkan 4,9% kriptosporidiosis pada pasien HIV dengan teknik pewarnaan ZN sedangkan dengan pemeriksaan deteksi koproantigen didapatkan sebesar 18,9%.¹⁵ Evaluasi yang dilakukan oleh Jayalakshmi J et al di rumah sakit Coimbatore, India terhadap penggunaan ELISA untuk deteksi antigen *Cryptosporidium sp* pada spesimen tinja pasien HIV/AIDS didapatkan infeksi *Cryptosporidium sp* sebesar 12,4% dengan spesifisitas 90.8% dan sensitivitas 99.0%.¹⁶

Penelitian Werner. A et al yang membandingkan teknik diagnostik deteksi ookista dan coproantigen pada tahun 2004 menyimpulkan bahwa uji imunoenzim lebih baik daripada metode mikroskopis untuk mengidentifikasi *Cryptosporidium sp* di tinja.¹⁷ Ron Dagan et al menyebutkan beberapa kelebihan teknik imunoenzim untuk mendeteksi *Cryptosporidium sp* yaitu pertama lebih sensitif, spesifik, mudah dan tidak memerlukan tenaga laboratorium yang terlatih dan berpengalaman serta prosedurnya sama dengan prosedur uji imunoenzim lainnya. Kedua teknik imunoenzim dapat dilakukan terhadap tinja yang telah disimpan dalam preservasi tanpa mempengaruhi hasil sehingga dapat digunakan dalam penelitian lapangan atau skrining dengan jumlah sampel yang banyak. Ketiga spesimen tidak perlu dikonsentrasi atau melalui proses apapun dan hasil dapat dibaca secara visual dengan melihat ada tidaknya perubahan warna.¹⁸

Rentannya pasien HIV/AIDS terhadap infeksi lain baik ko-infeksi maupun yang bersifat oportunistik menyebabkan perjalanan

penyakitnya bertambah berat dan dapat berakibat fatal terutama pada kasus dengan hitung sel T CD4 yang rendah. *Cryptosporidium sp* merupakan parasit oportunistik penyebab diare yang bisa berakibat fatal pada keadaan status imun yang rendah karena adanya autoinfeksi internal dan kemungkinan menyebar ke organ lain seperti saluran pernapasan sehingga perlu dilakukan deteksi sedini mungkin. Teknik pemeriksaan yang ada saat ini masih mengandalkan deteksi ookista dengan pulasan modifikasi tahan asam yang sekalipun spesifisitasnya tinggi, tapi sensitivitas rendah sehingga sulit mendeteksi kasus asimtomatis atau intensitas infeksi rendah. Untuk itu perlu diterapkan alternatif teknik deteksi infeksi *Cryptosporidium sp*.

Bahan dan Cara Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi FKUI dan POKDISUS, RSUPN Cipto Mangunkusumo Juni 2008 sampai dengan Mei 2009. Sampel yang digunakan sebanyak 83 tinja pasien HIV/AIDS. Sampel feses disimpan di dalam larutan Formalin 10%. Data klinis, domisili dan jumlah CD4 diambil dari rekam medis.

Deteksi Ookista dari Tinja dengan Pulasan MTA²⁰

Sebanyak 10 µl tinja langsung, dioleskan di atas kaca objek, kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya difiksasi dengan metanol absolut selama 3 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam botol pewarnaan berisi larutan *carbol fuchsin* selama 15 menit. Selanjutnya dicuci di bawah air mengalir, lalu dicelupkan ke dalam larutan metanol HCl 1% selama 10 - 15 detik.

Kemudian dicuci di bawah air mengalir dan diberi pulasan dengan *malachite green* 0,4% selama 30 detik. Selanjutnya dicuci di bawah air mengalir, dikeringkan pada suhu ruang. Hasil diperiksa di bawah mikroskop pada pembesaran 400x dan 1000x.

Pemeriksaan Koproantigen dengan ELISA

Pemeriksaan koproantigen *Cryptosporidium sp* dilakukan dari tinja yang diawetkan dengan formalin 10% dan dilakukan sesuai dengan petunjuk kerja yang tersedia di dalam kit. Hasil dapat dibaca secara visual atau dengan *ELISA reader* pada 450 nm. Hasil pemeriksaan diinterpretasikan sebagai berikut: positif jika hasil pemeriksaan terlihat berwarna lebih kuning daripada kontrol negatif atau nilai absorbansi ≥ 0.15 OD. Negatif jika hasil pemeriksaan terlihat berwarna lebih muda daripada kontrol negatif atau nilai absorbansi < 0.15 OD.

Hasil

Karakteristik Pasien

Pasien HIV pada penelitian ini terdiri atas 65 (68.4%) laki-laki dan 30 (31.6%) perempuan dengan rentang usia 4 bulan hingga 58 tahun. Sebagian besar (22 pasien, 72.6%) penderita berada pada kelompok umur ≥ 5 tahun, dengan 3 diantaranya berusia 5-7 tahun dan sisanya yaitu 66 pasien merupakan pasien dewasa atau berusia > 17 tahun.

Di antara 95 pasien yang diterima, hanya 62 orang yang diketahui data hitung CD4 yaitu 7 pasien usia 1-3 tahun, 5 pasien usia 3-5 tahun dan 50 pasien usia ≥ 5

tahun. Lima puluh enam dari 62 pasien yang diketahui hitung CD4 berada dalam status imundefisiensi berat. Lebih dari setengah pasien (64 pasien, 67.4%) belum mendapat terapi anti retroviral (ARV).

Tabel 1 Karakteristik pasien

Karakteristik	N	%
Umur dalam tahun (median, range)	27, 0.3 - 58	
Kelompok umur (n=95)		
< 1 tahun	4	4.2
1 - 3 tahun	15	15.8
3 - 5 tahun	7	7.4
≥ 5 tahun	69	72.6
Jenis Kelamin (n=95)		
Laki-laki	65	68.4
Perempuan	30	31.6
Data Persentase atau hitung CD4		
Diketahui CD4 (N=62)	0	
< 1 tahun	7	
1 - 3 tahun	5	
3 - 5 tahun	50	
≥ 5 tahun	33	
Tidak diketahui		
Status Imundefisiensi pasien (n=62)	2	
Ringan	4	
Sedang	56	
Berat		
Terapi ARV (N=95)		
Ya	31	32.6
Tidak	64	67.4
Daerah domisili (N=95)		
Jakarta Pusat	26	27.4
Jakarta Selatan	9	9.5
Jakarta Utara	5	5.3
Jakarta Timur	15	15.8
Jakarta Barat	11	11.6
Luar DKI	29	30.5

Sebagian besar penderita berasal dari Jakarta Pusat (26 pasien, 27,4%) dan luar Jakarta (29 pasien, 30,5%) yang tersebar di Tangerang (15 orang) Bekasi (11 pasien), Depok (2 pasien) dan Bandung (1 pasien) (Tabel 1)

Hasil Deteksi Koproantigen dengan ELISA

Tabel 2 memperlihatkan perbandingan deteksi *Cryptosporidium sp* antara pemeriksaan koproantigen dengan pemeriksaan ookista pulasan MTA. Pada pemeriksaan ookista dengan pulasan MTA terdeteksi 11 sampel positif *Cryptosporidium sp*, sedangkan pada deteksi

koproantigen menggunakan imunoenzim (ELISA) didapatkan 35

Tabel 2 Hasil deteksi *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV berdasarkan pulasan MTA dan pemeriksaan koproantigen

	Hasil MTA		Total
	+	-	
Koproantigen	11	24	35
n	0	60	60
Total	11	84	95

sampel hasil positif dan 24 diantaranya tidak ditemukan ookista *Cryptosporidium sp*. Pada uji statistik dengan *Mc Nemar test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p= 0,000$) dengan nilai $Kappa=0,367$ (Lampiran 1) antara hasil pemeriksaan koproantigen sampel tinja dengan deteksi ookista sampel tinja yang diwarnai MTA. Dari data di atas juga dapat dinilai sensitivitas dan spesifisitas deteksi koproantigen terhadap metode MTA yaitu sebesar 100% dan 71.4%. Nilai prediksi positif (NPP) 31.4% dan nilai prediksi negatif (NPN) 100%.

Tabel 3 memperlihatkan hasil pemeriksaan koproantigen *Cryptosporidium sp* pada tinja berdasarkan jenis parasit yang ditemukan pada pemeriksaan mikroskopis. Berdasarkan pemeriksaan mikroskopis *Cryptosporidium* merupakan jenis parasit terbanyak kedua setelah *Blastocystis hominis*, yaitu sebesar 11/95 baik sebagai infeksi tunggal (6 sampel) maupun infeksi campur dengan *Blastocystis hominis* 4 sampel dan *B.hominis*, *E.coli* (1

Table 3 Deteksi koproantigen *Cryptosporidium sp* pada tinja penderita HIV/AIDS dengan infeksi protozoa usus lain

Parasit dengan pemeriksaan mikroskopis	N=95 (%)	Koproantigen positif (%)
Negatif	44 (46.3)	12
<i>B. hominis</i>	36 (37.9)	10
<i>Cryptosporidium</i>	6 (6.3)	6
<i>G. lamblia</i>	4 (4.2)	2
<i>B. hominis</i> , <i>Cryptosporidium</i>	4 (4.2)	4
<i>E.coli</i> , <i>B. hominis</i> , <i>Cryptosporidium</i>	1 (1.1)	1

sampel. Semua hasil pemeriksaan *Cryptosporidium sp* positif dengan mikroskopis memberikan hasil koproantigen positif. Sedangkan pemeriksaan menggunakan mikroskopis yang dinyatakan negatif, *B.hominis* atau *G.lamblia* menunjukkan hasil deteksi koproantigen positif masing-masing sebesar 12/44 sampe 10/36 sampel dan 2/4 sampel.

Pada pemeriksaan mikroskopis dengan pulasan MTA dilakukan penghitungan jumlah ookista di semua lapang pandang pada sampel yang positif. (Tabel 4.4) Jumlah ookista berkisar 30 sampai dengan 3400 per slide. Selanjutnya hasil perhitungan ookista tersebut dihubungkan dengan nilai absorbansi

Hasil uji korelasi dengan uji Pearson setelah dilakukan transformasi data untuk menormalkan data densitas ookista yang distribusinya tidak normal dengan metode log10, menunjukkan bahwa arah korelasi positif dengan kekuatan korelasi sedang ($r=0.596$). Korelasi antara nilai absorbansi hasil pemeriksaan koproantigen dengan densitas ookista secara statistik tidak bermakna dengan $p =0.053$

Distribusi Demografi Penderita HIV dengan Infeksi *Cryptosporidium sp*

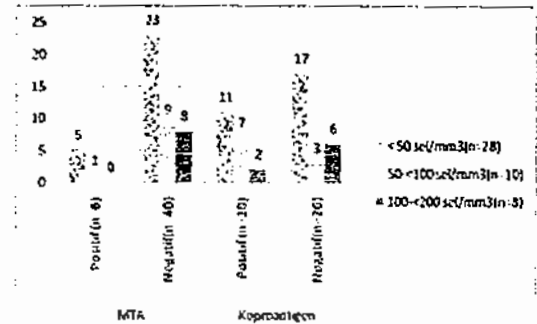
Tabel 4 menunjukkan sebaran pasien berdasarkan status imundefisiensi pada setiap kelompok umur. Semua pasien pada kelompok umur < 1 tahun (n=4) tidak diketahui hitung CD4 sehingga tidak bisa diketahui status imundefisiensinya. Dari 7 pasien kelompok umur 1-3 tahun yang diketahui hitung CD4 semuanya berada pada status imunodefisiensi berat. Sedangkan pasien kelompok umur 3-5 tahun dan ≥ 5 tahun yang diketahui hitung CD4 berada pada status imundefisiensi ringan sampai berat.

Tabel 4 Distribusi pasien berdasarkan status imundefisiensi

Kelompok umur	Status imundefisiensi			
	Ringan	Sedang	Berat	Tidak diketahui
<1	0	0	0	4
1-3	0	0	7	8
3-5	1	1	3	2
≥5	1	3	46	19

Pada kelompok umur < 1 tahun tidak satupun terinfeksi *Cryptosporidium sp* baik dengan pemeriksaan MTA maupun koproantigen. Pada kelompok umur 1- 3 tahun, 3-5 tahun dan ≥ 5 tahun jumlah infeksi *Cryptosporidium sp* lebih banyak ditemukan dengan deteksi koproantigen daripada MTA. Pada kelompok umur yang diketahui status imundefisiensi, *Cryptosporidium sp* lebih banyak menginfeksi kelompok status imundefisiensi berat baik dengan deteksi MTA maupun koproantigen.

Dari 50 pasien kelompok umur ≥ 5 tahun yang diketahui hitung CD4, 46 diantaranya memiliki status imundefisiensi berat



Gambar 2. Hasil pemeriksaan *Cryptosporidium* berdasarkan jumlah CD4 pada kelompok imundefisiensi berat

yang berarti memiliki jumlah CD4 < 200 sel/mm³. Jika dianalisa lebih lanjut hasil pemeriksaan *Cryptosporidium sp* pada kelompok ini berdasarkan hitung CD4 memberikan hasil seperti yang terlihat pada gambar 4.3. Infeksi *Cryptosporidium sp* pada kelompok < 50 sel/mm³, 50-100 sel/mm³, dan 100-200 sel/mm³ lebih banyak terdeteksi dengan koproantigen daripada MTA. Hasil pemeriksaan statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada semua kelompok tersebut baik dengan pemeriksaan koproantigen maupun MTA (p=1.00). Infeksi terbanyak baik dengan pemeriksaan MTA maupun koproantigen didapatkan pada kelompok CD4 < 50 sel/mm³.

Dari 11 pasien yang memberikan hasil pewarnaan MTA positif, 7 pasien mendapat terapi ARV sedangkan 3 pasien belum mendapat terapi. Sebaliknya dengan deteksi koproantigen, pasien yang belum mendapat terapi memberikan hasil positif lebih banyak daripada pasien yang sudah mendapat terapi. Satu pasien mendapatkan terapi Paromomicin memberikan hasil negatif dengan pulasan MTA dan deteksi koproantigen.

Diskusi

Penelitian ini dilakukan terhadap sampel tinja pasien HIV dengan diare kronik yang dikirim ke Laboratorium Parasitologi untuk pemeriksaan tinja parasit. Salah satu kendala dalam penelitian ini adalah dokter pengirim tidak menuliskan identitas pasien dan diagnosis klinis dengan jelas.

Studi yang meneliti kejadian infeksi *Cryptosporidium sp* di Indonesia pada individu imunodefisiensi dengan diare kronik masih terbatas. Penelitian yang dilakukan oleh Rasad et al, tahun 1992 melibatkan populasi imunokompeten usia 13- 18 tahun dengan diare tanpa membedakan akut atau kronis.⁵⁴ Penelitian lain yang dilakukan oleh Katsumata, melibatkan populasi anak dan dewasa dengan diare akut dan tanpa diare.²¹ Berbeda dengan penelitian ini, kedua penelitian tersebut tidak memasukkan status HIV/AIDS dan diare kronik sebagai kriteria inklusi. Penelitian terbaru dilakukan oleh Kurniawan et al, untuk mengetahui secara umum parasit penyebab diare pada populasi HIV dengan diare kronik.⁵ Pada ketiga penelitian di atas, deteksi *Cryptosporidium sp* hanya dilakukan dengan pulasan MTA. Sebaliknya, pada penelitian ini deteksi *Cryptosporidium sp* dilakukan dengan pulasan MTA dan deteksi koproantigen dan memperhitungkan status HIV/AIDS dengan diare kronik sebagai kriteria inklusi.

Diagnosis kriptosporidiosis yang digunakan secara umum adalah deteksi ookista pada pulasan yang diwarnai MTA dengan menggunakan mikroskop cahaya. Pemeriksaan ini sangat ditentukan oleh kemampuan dan pengalaman tenaga

laboratorium. Pada penelitian ini digunakan produk *Diagnostic Automation, Inc Cryptosporidium* menggunakan antibodi poliklonal anti-*Cryptosporidium* yang akan mengenali antigen *Cryptosporidium sp* pada supernatant tinja. Kit ini menggunakan antibodi sekunder (*sandwich* ELISA) yang akan berikatan dengan antigen yang telah berikatan dengan antibodi pertama.

Kedua teknik pemeriksaan tersebut mudah untuk dilakukan. Pada pemeriksaan mikroskopis, proses konsentrasi atau sedimentasi tinja sangat dianjurkan untuk meningkatkan hasil deteksi parasit walaupun akan menambah waktu pemeriksaan. Pada teknik ELISA untuk deteksi koproantigen, proses tersebut tidak perlu dilakukan karena akan mempengaruhi keakuratan hasil.¹⁵ Interpretasi hasil mikroskopis lebih sulit daripada ELISA membutuhkan tenaga berpengalaman dan pembesaran hingga 1000X. Hasil pemeriksaan dengan ELISA dapat dibaca secara visual tanpa memerlukan spektrofotometer sehingga pemeriksaan ini dapat dilakukan pada penelitian survey lapangan. Pembacaan dengan bantuan spektrofotometer sangat berguna untuk penentuan hasil pemeriksaan yang *borderline*.^{9,19}

Frekuensi kriptosporidiosis pada pasien HIV/AIDS dengan diare kronik dengan deteksi koproantigen pada penelitian ini sebesar 36,8%. Penelitian Silva di Brazil, didapat 13,5% infeksi *Cryptosporidium* dari 52 pasien HIV/AIDS dengan dan tanpa gejala menggunakan teknik imunoenzim (ProSpecT Microplate Assay, Alexon Inc.).⁹ Lebih tingginya frekuensi kriptosporidiosis pada penelitian ini mungkin berhubungan dengan pemilihan

pasien HIV/AIDS dengan diare kronik ataupun epidemiologi di Indonesia yang berkaitan erat dengan tingkat higiene dan sanitasi lingkungan.

Pada penelitian ini, dengan teknik pewarnaan modifikasi tahan asam didapat hasil sebesar 11.6% (11/95), sedangkan dengan deteksi koproantigen didapat 36,8% (35/95). Kaushik et al, di India tahun 2008 melaporkan 4,9% kriptosporidiosis pada pasien HIV dengan dan tanpa diare menggunakan teknik pewarnaan ZN dan 18,9% dengan pemeriksaan deteksi koproantigen.¹⁶ Berdasarkan hasil pemeriksaan ELISA terdapat perbedaan hasil positif dengan MTA yang cukup besar. Hal ini bisa terjadi, karena teknik mikroskopis tidak dapat mendeteksi stadium selain ookista sedangkan pada tahap penyembuhan kriptosporidiosis, antigen atau produk dari *Cryptosporidium* masih dikeluarkan melalui tinja walaupun tanpa ookista utuh.²²

Kelebihan ELISA yaitu dapat mengidentifikasi pasien kriptosporidiosis yang pada saat dilakukan pengumpulan tinja tidak terjadi ekskresi ookista²² dan pengumpulan tinja hanya perlu dilakukan satu kali. Pada pemeriksaan mikroskopis dianjurkan untuk dilakukan pemeriksaan 2-3 sampel tinja berbeda yang diambil pada hari berturut-turut atau selang sehari karena akan meningkatkan angka deteksi parasit. Cartwright, menganjurkan pemeriksaan dua spesimen tinja saja karena pemeriksaan ketiga hanya memberikan informasi tambahan pada 8% kasus, sedangkan pemeriksaan dua spesimen sudah memberikan sensitivitas deteksi sebesar 92%.²³ Berdasarkan hasil

studi Branda, dinyatakan bahwa pemeriksaan spesimen tunggal secara komprehensif sudah mencukupi jika prevalensi infeksi parasit tersebut di populasi mencapai 20%.²⁴ Faktor yang menyebabkan hasil negatif palsu pada pulasan MTA antara lain pada proses pembuatan sediaan, karena terlalu sedikit bahan yang diapus pada kaca objek, bisa juga terlalu tipis atau justru terlalu tebal⁸ dan kualitas alat (mikroskop) yang digunakan untuk memeriksa. Selain itu penggunaan metode pewarnaan konvensional, masih sulit untuk deteksi ookista yang ukurannya kecil (4-6 µl) sehingga terkadang luput dari pemeriksaan terutama pada infeksi ringan.

Pada penelitian ini, metode deteksi koproantigen mempunyai sensitivitas sebesar 100% dan spesifisitas 71.4% terhadap MTA. Nilai sensitivitas dan spesifisitas dapat saling mempengaruhi satu sama lainnya, dimana makin rendah spesifisitas makin tinggi sensitivitasnya demikian juga sebaliknya. Hasil ini berbeda dengan penelitian Marques tahun 2005 yang mendapatkan nilai sensitivitas 100%, spesifisitas 96%, NPP dan NPN sebesar 89% dan 100% yang menggunakan ELISA dari Alexon, Inc, BIOBRAS.²⁵ Pada penelitian Jayalakshmi¹⁷ didapatkan sensitivitas dan spesifisitas ELISA (RIDASCREEN *Cryptosporidium*, R-Biofarm, Germany) dibandingkan dengan MTA sebesar 90,9% dan 98,7%. Perbedaan ini karena konsistensi tinja,²⁴ alat yang digunakan dan kemampuan pemeriksa pada tiap penelitian serta pemilihan kit diagnostik yang menggunakan antibodi poliklonal atau monoklonal. Faktor visual dan psikologis pemeriksa sangat

berpengaruh dalam penegakan diagnosis. Deteksi koproantigen membantu menegakkan diagnosis kriptosporidiosis pada individu imunokompromais, terutama yang disertai dengan gejala klinis tetapi pada pemeriksaan mikroskopis tidak ditemukan ookista.¹⁷ Selain itu tes ini dapat digunakan pada penelitian epidemiologi dengan jumlah sampel yang banyak.^{16,18,19}

Semua hasil pemeriksaan *Cryptosporidium sp* positif dengan mikroskopis memberikan hasil koproantigen positif. Sedangkan pemeriksaan menggunakan mikroskopis yang dinyatakan negatif, *B.hominis* atau *G.lambli*a menunjukkan hasil deteksi koproantigen positif masing-masing sebesar 27.3%, 27.8% dan 50%. Beberapa penelitian sudah melaporkan bahwa tidak ditemukan reaksi silang antibodi dengan parasit usus lainnya,^{15,24} Spesimen yang tidak terdeteksi secara mikroskopis tetapi positif secara koproantigen menunjukkan kemungkinan pasien terinfeksi *Cryptosporidium sp*²⁵ tetapi jumlah ookista yang diekresikan di bawah ambang deteksi mikroskopis yaitu 1×10^6 ookista/ml tinja.¹⁵

Dari hasil pemeriksaan secara MTA dan koproantigen didapatkan *Cryptosporidium sp* lebih banyak menginfeksi kelompok status imundefisiensi berat dibandingkan dengan status imundefisiensi sedang. Pada kelompok imundefisiensi berat, infeksi *Cryptosporidium* lebih banyak ditemukan dengan deteksi koproantigen (25/56) dibandingkan dengan MTA (8/56). Berdasarkan hasil studi Kaushik, dinyatakan bahwa teknik pewarnaan salah satunya MTA kurang sensitif untuk

deteksi *Cryptosporidium sp* pada pasien HIV dengan $CD4 > 200$ sel/mm³.¹⁶

Jumlah CD4 sebagai komponen sistem imun mempunyai peran dalam mengontrol infeksi terhadap *Cryptosporidium sp*. Walaupun parasit oportunistik dapat menginfeksi setiap saat pada pasien-pasien HIV, beberapa studi melaporkan bahwa infeksi *Cryptosporidium* menetap pada pasien dengan jumlah $CD4 < 200$ sel/mm³.⁷ Namun ada juga penelitian yang menyebutkan bahwa kriptosporidiosis intestinal terjadi pada penderita HIV/AIDS dengan jumlah $CD4 < 100/\mu$ l.^{22,25} Penelitian yang dilakukan di Brazil 2003, didapatkan 100% infeksi *Cryptosporidium* ditemukan pada pasien dengan jumlah CD4 sepuluh hingga limapuluh sel/mm³ dengan mean 23.3 sel/mm³.⁸ Infeksi *Cryptosporidium sp* pada penelitian ini ditemukan pada pasien dengan jumlah $CD4 < 200$ sel/mm³ dan jumlah terbanyak pada pasien-pasien dengan $CD4 < 50$ sel/mm³.

Salah satu faktor yang mempengaruhi infeksi *Cryptosporidium sp* adalah pemberian terapi ARV, yang diharapkan dapat meningkatkan populasi CD4 intraepitelia sehingga dapat mencegah dan mengeliminasi parasit. Pada penelitian ini, frekuensi *Cryptosporidium sp* dengan pemeriksaan pulasan MTA ditemukan lebih tinggi pada kelompok yang diberikan terapi ARV (7/11) dibandingkan belum mendapat ARV. Dari status di dapatkan bahwa 3 dari 7 pasien positif ookista *Cryptosporidium*, mendapatkan terapi ARV kurang dari 1 bulan sehingga belum tercapai CD4 yang adekuat untuk eliminasi

parasit. Cimerman dalam studinya, menyatakan bahwa prevalensi kriptosporidiosis di Sao Paulo pada pasien HIV dengan diare ditahun pertama pengobatan ARV sebesar 24.4%.²⁹ Di sisi lain, Bachur melaporkan terjadinya resolusi kriptosporidiosis pasca 6 bulan pengobatan ARV.³⁰ Pada deteksi koproantigen, hasil positif lebih banyak terdapat pada kelompok yang belum mendapatkan terapi ARV. Ada beberapa faktor risiko terhadap infeksi *Cryptosporidium* sp lain yaitu, daerah tempat tinggal, ada atau tidak binatang peliharaan atau kontak dengan binatang yang terinfeksi *Cryptosporidium*, sumber air minum, pemakaian obat injeksi dan kebiasaan seksual, kebiasaan mencuci tangan.

Pada studi ini, infeksi *Cryptosporidium* ditemukan pada kelompok umur 1-<3 tahun, 3-<5 tahun dan ≥ 5 tahun masing-masing sebesar 40%(6/15), 29%(2/7) dan 39.1% (27/69). Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna angka infeksi *Cryptosporidium* sp diantara kelompok umur tersebut. Pemeriksaan terhadap 800 pasien dewasa dan 202 anak-anak di rumah sakit Andhara Pradesh India, infeksi *Cryptosporidium* sp dilaporkan masing-masing sebesar 0.12% dan 2.99%.³¹ Populasi rentan terhadap infeksi *Cryptosporidium* pada individu immunosupresi meliputi semua kelompok umur.²³

DAFTAR PUSTAKA

1. Departments of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. HIV Classification [diunduh 8 April 2009]. <http://www.cdc.gov/hiv>.
2. Certad G, Arenas-Pinto A, Pocaterra L, Ferrara G, Castro J, Bello A.

Cryptosporidiosis in HIV-infected venezuelan adults is strongly associated with acute or chronic diarrhea. The American of TroMed.2005;73(1):54-57.

3. Ajjampur SR, Asirvatham JR, Mutusamy D, Gladstone BP, Abraham OC, Mathai D, et al. Clinical features and risk factors associated with cryptosporidiosis in HIV infected adults in India. Indian J Med Res. 2007;126:553-7.
4. Adesiji Y, Lawal RO, Taiwo SS, Fayemiwo SA, Adeyeba OA. Cryptosporidiosis in HIV infected patients with diarrhoea in osun state southwestern Nigeria. Eur J Gen Med 2007;4(3):119-122.
5. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintarsi SW, Sari IP, Yunihasuti E, Djauzi S, Smith HV. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta , Indonesia. Trans of the royal society of tropmed and hygiene.2009;30:1-7.
6. Clark DP. New insights into human cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):554-63.
7. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. Clinical Microbiology Rev.2002; 15(1):145-54.
8. Gupta S, Narang S, Nunavath V, Singh S. Chronic diarrhea in HIV patients: prevalence of coccidian parasites. Indian Journal of Medical Microbiology. 2008;26(2):172-5.
9. Silva C.V, Ferreira M, Goncalves-Pires MR, Costa-Cruz JM. Detection of *Cryptosporidium*-specific coproantigen in Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency syndrome patient by using a commercially available immunoenzymatic assay. Mem Inst Oswaldo Cruz.2003;98(8):1097-99.
10. Mehta P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Postgrad Med 2002;48:217.
11. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J Clin Pathol. 1985;38:1337-41.
12. Weber R, Byan RT and Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of

- Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. J Clin Microbiol. 1992;30(11):2869-73.
13. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. J Clin Microbiol 1983;18(1):185-90.
 14. OIE (Office International des Epizooties). Cryptosporidiosis chapter 2.9.4. In terrestrial manual 2008. Available from: http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm. Diakses tanggal 20 November 2008
 15. Rosenblatt JE, Sloan L. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of *Cryptosporidium* in stool specimens. Journal of Clinical Microbiology. 1993;31(6):1468-71.
 16. Malla N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of Cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. Acta Trop. 2008;107(1):1-7.
 17. Jayalakshmi J, Appalaraju B, Mahadevan K. Evaluation of an enzyme-linked immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* antigen in fecal specimens of HIV/AIDS patients. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 2008;51(1):137-8.
 18. Werner, Sulima P and Majewska. Evaluation of usefulness of different methods for detection of *Cryptosporidium* in human and animal stool samples. Wiad Parazytol. 2004;50(2):209-20.
 19. Dagan R, Fraser D, El-On J, Kossis I, Deckelbaum R, Turner S. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* sp. In stool specimens from infants and young children in field studies. Am. J. Trop. Med. Hvg. 1995;52(2):134-8.
 20. Roy SL, DeLong SM, Stenzel SA. Risk factor for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the united states from 1999 to 2001. J Clin Microbiol 2004; 42(7):2944-51.
 21. Rasad R, Adjung S, Daldiyono. Infeksi *Cryptosporidium* pada orang dewasa yang menderita diare. Laporan penelitian direktorat Pembina penelitian dan pengabdian pada masyarakat, Dikti. Agustus 1992.
 22. Katsumata T, Hosea D, Wasito EB, Kohno S, Hara K, Seoparto P, Ranuh IG. Cryptosporidiosis in Indonesia: a hospital based study and a community based survey. Am.J.Trop.Med.Hyg.1998;59(4):628-32.
 23. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. 1995;33(10):2592-5.
 24. Cartwright CP. Utility of multiple stool specimen ova and parasite examination in a high prevalence setting. J Clin Microbiol 1999;37:2408-11.
 25. Siobhan M, Tumwine JK, Naumova EN, Ndeezi G, Tzipori S. Microsporidiosis and malnutrition in children with persistent diarrhea, Uganda. Emerg Inf Dis. 2009;15(1):49-52
 26. Branda JA, Lin TYD, Rosenberg ES, Halpem EF, Ferraro MJ. A rational approach to the stool ova and parasite examination. Clin Infect Dis 2006;42:972-8.
 27. Rasad R, Adjung SA, Rukmono B, Sunoto, Suharyono. *Cryptosporidium* infection in children with diarrhea. 25 th Annual Scientific Seminar, Research priorities for Trop Med in the 90's. (Makalah ini telah dikemukakan dalam: "25th Silver Jubilee Seminar of the Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine 23 rd - 25 th February 1989").
 28. Saksirisampant W, Eampokulap B, Rattanasanthong M, Likansakul S, Wiwanitkit V, Nasinkam A, et al. A prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients. J Med assoc Thai 2002;85 (suppl 1):424-8
 29. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev. 1991;4(3):325-58.
 30. Rusnak J, Hadfield TL, Rhodes MM, Gaines JK. Detection of

Cryptosporidium oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1989;27(5):1135-6.

31. Idris NS. Anak imunokompromais dengan diare :profil infeksi parasit dan respon terapi. Tesis 2009.
32. Nagamani, K., A. Rajkumari and Gyaneshwari. Cryptosporidiosis in a tertiary care hospital in Andhra Pradesh. Ind. J. Med. Microbiol. 2001;19: 215-216.

