



The 13<sup>th</sup> Continuing Medical Education in Clinical Pathology

# **PENDIDIKAN BERKESINAMBUNGAN PATOLOGI KLINIK 2014**

**SIMPOSIUM  
PEMERIKSAAN SUMSUM TULANG**



Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

**PEMERIKSAAN SUMSUM TULANG**

**Pendidikan Berkesinambungan Patologi Klinik 2014**

**Editor: Dalima AW Astrawinata, Ina S Timan**

**ix + 73 hal**

**21 x 29 cm**

**ISBN 978-602-7655-12-6**

**Copyright 2014**

**Hak Cipta Dilindungi Undang-undang**

**Dilarang memperbanyak, mencetak, dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan dalam bentuk apapun juga tanpa seizin penulis dan penerbit**

**Diterbitkan pertama kali oleh**

**Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia**

**Jakarta, September 2014**

## **DAFTAR KONTRIBUTOR TULISAN**

**Prof. dr. Abdul Muthalib, SpPD-KHOM**

Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia & Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

**dr. Agnes Stephanie Harahap, SpPA**

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia & Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

**dr. Dewi Wulandari, SpPK, MSc**

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia & Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

**dr. Fify Henrika, SpPK(K)**

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia & Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

**dr. Ninik Sukartini, DMM, SPPK(K)**

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia & Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

**dr. Nuri Dyah Indrasari, SpPK(K)**

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia & Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

**Prof. dr. Riadi Wirawan, SpPK(K)**

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia & Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta

### Jadwal Acara

07.30 – 09.00	Registrasi dan rehat kopi
<b>Simposium C: PEMERIKSAAN SUMSUM TULANG</b> Moderator: Dr. dr. Diana Aulia, SpPK(K)	
09.00 – 09.30	<b>Aspirasi dan biopsi sumsum tulang: Indikasi dan kontraindikasi</b> Prof. dr. Abdul Muthalib, SpPD-KHOM
09.30 – 10.00	<b>Membuat dan memulas sediaan sumsum tulang</b> dr. Nuri Dyah Indrasari, SpPK(K)
10.00 – 10.30	<b>Identifikasi sel sumsum tulang normal dan abnormal</b> dr. Fify Henrika, SpPK(K)
10.30 – 11.00	<b>Pemeriksaan flowcytometry sumsum tulang pada keganasan hematologi</b> dr. Dewi Wulandari, SpPK, MSc
11.00 – 11.30	Diskusi
11.30 – 12.30	Makan Siang
12.30 – 13.00	<b>Pemeriksaan sitogenetik pada sumsum tulang</b> dr. Ninik Sukartini, DMM,
13.00 – 13.30	<b>Peran pemeriksaan biopsi sumsum tulang pada kelainan hematologi</b> dr. Agnes Stephanie Harahap, SpPA
13.30 – 14.00	<b>Penilaian dan pelaporan sediaan sumsum tulang menurut ICSH 2008</b> Prof. dr. Riadi Wirawan, SpPK(K)
14.00 – 14.30	<b>Studi kasus evaluasi sumsum tulang</b> Prof. dr. Riadi Wirawan, SpPK(K)
14.30 – 15.00	<b>Diskusi</b>
15.00 – 15.15	<b>Doorprize</b>
15.15 – 15.30	<b>Penutupan</b>
15.30 - selesai	<b>Rehat Kopi</b>

# **PEMERIKSAAN FLOWCYTOMETRY SUMSUM TULANG PADA KEGANASAN HEMATOLOGI**

**Dewi Wulandari**

Departemen Patologi Klinik FKUI-RSCM

## **ABSTRAK**

Kemajuan teknologi laboratorium terutama terkait dengan antibodi monoklonal, fluorokrom, dan instrumentasi, menjadikan *imunophenotyping* dengan *flowcytometry* menjadi alat diagnostik yang sangat berguna dan semakin populer di bidang hematopatologi. *Flowcytometry* dapat membantu membedakan antara kondisi neoplastik dan non-neoplastik klasifikasi dan identifikasi lini hematopoietik yang terlibat, dan identifikasi *minimal residual disease*. Keuntungan *floweytometry* terutama disebabkan karena tingginya efisiensi dan sensitivitas, serta lebih reproduibel dibandingkan teknik mikroskopik. Saat ini, seringkali pemeriksaan *immunophenotyping* hanya dikerjakan apabila diagnosis sulit dipastikan secara morfologis. Akan tetapi, sejalan dengan perkembangan di bidang kedokteran, pemeriksaan *immunophenotyping* semakin diperlukan karena selain dapat membantu memastikan diagnosis juga dapat menentukan prognosis dan strategi pengobatan.

Keberhasilan pemeriksaan *flowcytometry* sangat ditentukan pada strategi pemilihan panel antibodi monoklonal, dan kemampuan analisis pemeriksaan. Selain itu, sampel pemeriksaan yang representatif dan memenuhi syarat sangat berperan penting dalam menentukan validitas hasil pemeriksaan.

## **PENDAHULUAN**

Leukemia akut merupakan suatu kelompok keganasan yang sangat bervariasi dengan masing-masing mempunyai gambaran klinis, prognosis, dan protokol terapi yang berbeda.<sup>1,2</sup> Penatalaksanaan leukemia akut sangat bergantung pada identifikasi sel leukerik dan lini hematopoietik dari mana sel leukemik tersebut berasal. Diagnosis yang cepat dan tepat pada keganasan hematologi penting dalam penatalaksanaan klinis yang tepat. Pada tahun 2008, *World Health Organization* (WHO) meluncurkan sistem klasifikasi baru pada

keganasan system hematolimfoid, yang memasukkan aspek molekular, genetik, dan klinis untuk memperbaharui klasifikasi yang sudah ada sebelumnya.<sup>3</sup> Klasifikasi *French-American British (FAB) group* yang telah dipakai selama lebih dari 20 tahun, memakai gambaran sitomorfologi dan reaksi sitokimia sel hematopoietik untuk menentukan klasifikasi leukemia akut.<sup>4</sup> Pemeriksaan mikroskopik masih merupakan baku emas, terutama untuk menentukan persentase sel blas pada diagnosis leukemia akut, namun kadangkala sulit untuk mengidentifikasi sel leukemia, terutama jika lebih dari satu lini hematopoietic terlibat.<sup>1</sup>

Pemeriksaan *immunophenotyping* dilakukan dengan menggunakan antibodi monoclonal untuk mengidentifikasi fenotip suatu sel. Saat ini sudah dipakai ratusan antibody monoclonal terhadap antigen leukosit (*cluster of differentiation = CD*) dan antigen non-CD untuk mengidentifikasi fenotipe sel. Pola fenotip ini dapat memberikan gambaran awal untuk identifikasi abnormalitas genetik yang dijadikan dasar klasifikasi WHO 2008, walaupun untuk memastikan adanya abnormalitas genetik tersebut pemeriksaan molekular dan sitogenetik tetap diperlukan.<sup>1-3,5</sup> Makalah ini akan membahas prinsip dasar pemeriksaan *immunophenotyping* dan dasar aplikasinya pada leukemia akut.

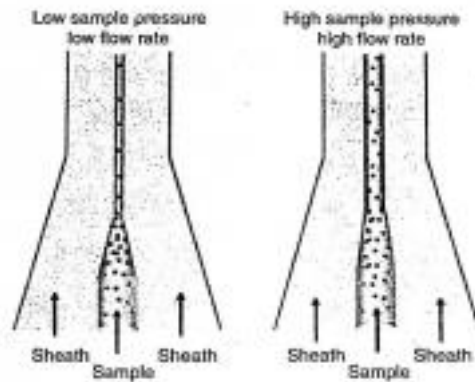
## **PRINSIP DASAR PENERAPAN IMMUNOPHENOTYPING UNTUK LEUKEMIA AKUT**

### **Prinsip Pemeriksaan *Flowcytometry***

Flow cytometry terdiri dari tiga sistem, yaitu sistem fluidic, optik, dan elektrik. Sistem fluidic adalah sistem yang dibuat untuk mengalirkan suspensi sel melalui berkas cahaya laser untuk pemeriksaan (interrogation point). Setiap sel harus melalui interrogation point satu per satu, dan pada titik yang sama. Sistem yang memastikan sel bergerak pada satu garis lurus pada saat melewati interrogation point adalah hydrodynamic focusing, dengan cara mengatur tekanan aliran sampel dan tekanan aliran sheath fluid (Gambar 1).<sup>2</sup>

Sistem kedua pada setiap alat flowcytometer adalah sistem optik. Sistem ini terdiri dari sumber cahaya, biasanya laser, prisma, seperangkat lensa, cermin, dan filter, yang berfungsi mengarahkan cahaya pada masing-masing detektor (Gambar 2).

Banyaknya filter dan detektor pada alat menentukan kemampuan alat flowcytometri dalam deteksi multi warna (multi-color detection). Multi-color flowcytometry yang mampu mendeteksi 3 fluorokrom atau lebih dalam setiap tabung merupakan metode yang dianjurkan untuk immunophenotyping pada leukemia.<sup>1</sup>



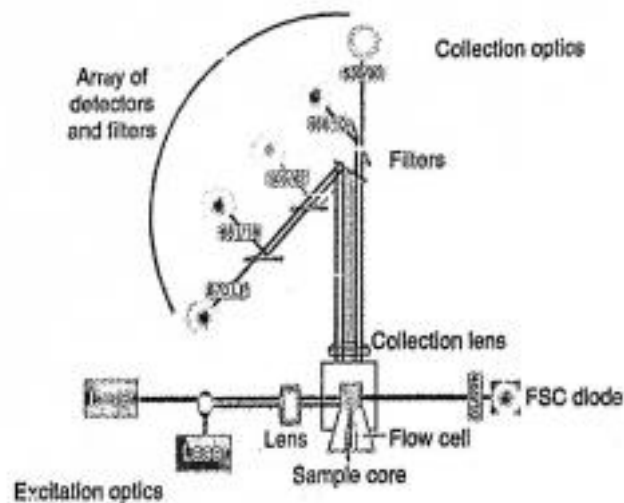
**Gambar 1. Sistem fluidic pada flowcytometry.**

*Hydrodynamic focusing* dengan pengaturan tekanan sampel dan *sheath fluid* akan membantu memusatkan aliran sel pada garis tengah.<sup>2</sup>

Pada saat sel melalui *interrogation point* sinar akan dibiaskan dan sebagian diteruskan. Detektor yang terletak tepat di depan sumber cahaya disebut *forward scattered light detector (FSC)*. Sinyal pada FSC sebanding dengan ukuran sel. Sedangkan detektor yang terletak pada sudut antara  $20^0$ - $90^0$  akan mendeteksi banyaknya sinar yang dibiaskan pada saat sel melalui berkas sinar laser. Detektor ini disebut *side scattered light detector (SSC)*. Sinyal pada SSC menggambarkan kompleksitas internal sel yang melalui *interrogation point*. Kedua detektor ini mempunyai rentang panjang gelombang deteksi sesuai dengan panjang gelombang sinar laser.<sup>2</sup>

Selain detektor FSC dan ssc, *multi-color flowcytometer* mempunyai 3 atau lebih detektor yang mempunyai rentang panjang gelombang deteksi lebih sempit. Rentang deteksi dari detektor inilah yang menjadi dasar pemilihan fluorokrom yang akan dipakai. Panjang gelombang emisi dari fluorokrom yang dipilih harus masuk dalam rentang deteksi satu detektor, tetapi tidak terdeteksi oleh detektor yang lain.<sup>2</sup>

Sistem ketiga adalah sistem elektrik yang berfungsi mengubah sinyal cahaya menjadi sinyal numerik untuk analisis selanjutnya. Setiap cahaya mengenai *photodetector*, foton yang sampai akan dikonversi menjadi muatan listrik. Denyut muatan listrik ini sesuai dengan foton yang timbul dari setiap sel yang melalui berkas sinar laser. Setiap partikel atau sel melalui berkas sinar laser satu akan dihasilkan satu denyut *voltage* yang besar sinyalnya sesuai dengan partikel yang melalui berkas sinar laser. Oleh karena itu, dengan menentukan *threshold* pada alat dapat dibedakan antara sel dan debris yang melalui *interrogation point*. Setiap partikel yang menimbulkan satu denyut *voltage* disebut *event*.<sup>2</sup>



**Gambar 2. Sistem optik *flowcytometry*.**

Pada *4-color flowcytometer* terdapat 2 laser dengan panjang gelombang yang berbeda sebagai sumber cahaya, dan 4 detektor fluoresensi dengan rentang deteksi yang terbatas.<sup>2</sup>

### **Sampel Pemeriksaan**

Berbagai bahan biologis dapat dipakai sebagai sampel pemeriksaan *flowcytometry*. Sampel terbaik adalah sampel berupa suspensi sel seperti darah perifer dan aspirat sumsum tulang. Tetapi sampel berupa jaringan biopsi pun dapat dipergunakan dengan berbagai tahap pendahuluan untuk membuatnya menjadi suspensi sel tunggal. Namun demikian, setiap sampel mempunyai karakteristik yang perlu diperhatikan.<sup>1,2</sup>

#### **1. Darah perifer**

Darah perifer merupakan sampel paling kon untuk pemeriksaan *flowcytometry*. Namun dalam hal leukemia akut, untuk meningkatkan ketepatan denudkael sol leukemic pada leukemia akut dalam darah tepi diperlukan jumlah selblas yang memadai. Oleh karena itu, sampel darah perifer tidak dapat digunakan untuk keperluan deteksi *minimal residual disease*.<sup>1,2</sup>

Sampel darah perifer harus menggunakan antikoagulan EDTA dan heparin merupakan antikoagulan yang dianjurkan. Sampel pemeriksaan sebaiknya segera dipreparasi, karena penundaan akan menyebabkan perubahan morfologi sel, dan dapat mempengaruhi Ikatan antibodi monoklonal pada antigen permukaan sel. Jika keadaan mengharuskan penundaan, sampel dapat disimpan pada suhu 4-25 °C maksimal selama 48 jam.<sup>2</sup>

## 2. Aspirat sumsum tulang

Aspirat sumsum tulang merupakan sampel yang terbaik untuk leukemia akut seperti halnya darah perifer, penggunaan antikoagulan diperlukan pada aspirat sumsum tulang, dan kesegaran sampel sangat berpengaruh dalam analisis dan interpretasi hasil. Beberapa hal yang juga harus diperhatikan pada sampel sumsum tulang. Hal pertama adalah kemungkinan adanya cecaran darah perifer pada aspirat sumsum tulang, sehingga akan mempengaruhi perhitungan persentase sel leukemik. Hal kedua yang juga perlu disadari adalah bahwa aspirat sumsum tulang tidak selalu mewakili komposisi sumsum tulang, terutama pada keadaan di mana lesi bersifat multi fokal, seperti mieloma, atau keadaan yang menyebabkan deposisi retikulin, seperti dapat ditemukan pada limfoma Hodgkin dan non-Hodgkin, kelainan pada sel mast, dan tumor non-hematopoietik. Selain itu juga perlu diingat bahwa aspirat sumsum tulang mengandung banyak prekursor eritrosit yang mungkin akan lisis pada proses pelisisan eritrosit.<sup>1,2</sup>

## 3. Cairan efusi

Cairan pleura, perikardial, dan peritoneal dapat dianalisis menggunakan *flowcytometry* untuk melihat keterlibatan organ dalam berbagai keganasan. Limfoma limfoblastik T merupakan salah satu contoh, di mana dapat ditemukan di massa mediastinum, di cairan efusi pleura atau perikardial.<sup>2</sup>

#### 4. Cairan serebrospinal

Cairan serebrospinal dapat dianalisis menggunakan *flowcytometry* untuk melihat keterlibatan sistem saraf pusat pada leukemia akut. Sel dalam cairan serebrospinal sangat sedikit dibandingkan darah perifer dan sumsum tulang. Oleh karena itu dibutuhkan cairan dalam jumlah cukup banyak untuk mendapatkan jumlah sel yang memadai untuk analisis. Tidak ada konsensus mengenai jumlah sel yang cukup untuk dilakukan analisis. Namun secara umum disepakati bahwa  $> 25 \text{ event}$  dianggap positif,  $10-25 \text{ event}$  menunjukkan kecurigaan, dan  $<10 \text{ event}$  dianggap negatif.

**APLIKASI IMMUNOPHENOTYPING PADA LEUKEMIA AKUT** Jika klasifikasi berdasarkan WHO 2008 diterapkan, aplikasi *immunophenotyping* pada leukemia akut pada dasarnya merupakan *triage* untuk menapis jenis leukemia, mempersempit kemungkinan diagnosis diferensial, dan menapis untuk pemeriksaan molekular dan sitogenetik selanjutnya. Aplikasi *immunophenotyping* pada leukemia akut antara lain untuk mengidentifikasi adanya populasi leukemik, mengidentifikasi lini hematologi yang terlibat, mengidentifikasi adanya keterlibatan multi lini, dan identifikasi *minimal residual disease (MRD)*.<sup>7,8</sup>

#### PEMILIHAN PANEL

Saat ini tersedia banyak sekali antibodi monoklonal spesifik untuk keperluan *flowcytometry*, dan jumlahnya terus semakin bertambah. Namun hanya sedikit antigen yang ekspresinya terbatas pada satu tipe sel saja (*lineage specific*). Sebagai contoh ekspresi CD3 menunjukkan limfosit T, CD5 secara umum diekspresikan oleh limfosit T namun juga ditemukan pada subset limfosit B, dan CD2 dan CD7 selain ditemukan pada limfosit T juga pada sel NK. Sebaliknya, ekspresi CD38, HLA-DR, dan CD45 diekspresikan oleh hampir semua jenis sel, tetapi masih tetap penting dalam analisis karena mempunyai pola ekspresi yang khas selama proses maturasi, dan bisa terjadi peningkatan ekspresi (*over expressed*) atau penurunan ekspresinya (*under expressed*) pada populasi neoplastik. Suatu pola imunofenotipik pada sel abnormal yang teridentifikasi pada saat diagnostik akan sangat berguna pada pemantauan pasca terapi dan deteksi MRD. Beberapa penanda yang sering digunakan pada *flow cytometric immunophenotyping* leukemia akut tercantum pada Tabel 1 berikut.<sup>1,2,7</sup>

Pembuatan panel untuk *immunophenotyping* pada leukemia akut bisa dibagi menjadi panel skrining untuk membedakan lini mieloid dan lini limfoid, dan panel lengkap untuk mengelaborasi lebih dalam lini yang terlibat, tetapi sebagian laboratorium langsung menerapkan panel lengkap untuk memperpendek *turn around time* pemeriksaan.<sup>2</sup>

Leukemia akut ditandai dengan adanya akumulasi blas/prekursor hematopoietik di sumsum tulang, darah tepi, dan/atau di jaringan lain. Sebagaimana sudah disebutkan di atas, bahwa saat ini tidak ada antibodi monoklonal yang spesifik untuk sel prekursor neoplastik. Sebagai contoh, penanda umum sel prekursor seperti CD34, CD117, dan TDT dan penanda aktivasi sel seperti HLA-DR dan CD38, diekspresikan oleh sel leukemik maupun sel progenitor sumsum tulang normal. Oleh karena itu, dalam analisis hasil *immunophenotyping*, penting untuk menganalisis keseluruhan pola ekspresi (*leukemia associated phenotype*). Hal penting dalam mengenali populasi sel leukemik adalah mengenali perubahan pola non-random yang berbeda dari pola ekspresi pada populasi normal. Pola *non-random* ini meliputi ekspresi aberans, misalnya blas mieloid yang mengekspresikan penanda limfoid, ko-ekspresi penanda imaturitas dan penanda maturitas, dan adanya penurunan atau peningkatan intensitas ekspresi.<sup>2,8-10</sup>

**Tabel 1.** Daftar penanda (*marker*) untuk *immunophenotyping* pada leukemia akut.<sup>1</sup>

Antigen	Myelo- blasts	Promyelo- cytes	Maturing Gran	Mon- cytes	Erythro- cytes	Megakar- yocytes	B Lym- phoid	T Lym- phoid	Comments
CD2	-	-	-	-	-	-	-	+	LFA-2; pan T-cell marker
CD3	-	-	-	-	-	-	-	+	OKT3; pan T-cell marker
CD4	-	-	-	-	-	-	-	+	AMC-II associated; helper T cells
CD5	-	-	-	-	-	-	-	+	Leu-1; pan T-cell marker
CD7	-	-	-	-	-	-	-	+	Leu-8; pan T-cell marker
CD8	-	-	-	-	-	-	-	Sub	AMC-I associated; cytotoxic T cells
CD19	-	-	-	-	-	-	+	-	Leu-12; pan B-cell marker
CD20	-	-	-	-	-	-	+	-	L26; B-cell marker
CD22	-	-	-	-	-	-	+	-	BL-CAM; pan B-cell marker
CD79a	-	-	-	-	-	-	+	-	MB-1; pan B-cell marker
CD13	+	+	+	+	-	-	-	-	Aminopeptidase N; pan myeloid marker
CD14	-	-	+	++	-	-	-	-	LPS receptor; bright on monocytes
CD15	-	+	+	-	-	-	-	-	LeuM1; maturing granulocytes
CD33	+	+	+	++	+	-	-	-	Sialic acid adhesion molecule; pan myeloid marker
CD36	-	-	-	+	+	+	-	-	GP IIb/IIIa
CD117	+	+	-	-	+	-	-	-	c-kit; bright on mast cells
CD64	-	-	+	+	-	-	-	-	FC-γ receptor
MPO	Sub	+	+	+/+	-	-	-	-	Myeloperoxidase; definitive myeloid marker
CD71	-	-	-	-	++	-	-	-	Transferrin receptor; dim expression on activated cells
GlyA	-	-	-	-	++	-	-	-	CD235a; carries MN antigens on red cells
CD41	-	-	-	-	-	+	-	-	GP IIb; megakaryocytic
CD61	-	-	-	-	-	+	-	-	GP IIIa; megakaryocytic
CD10	-	-	+	-	-	-	Sub	-	CALLA, also expressed by hematopoieses
CD38	+	Var	Var	+	-	-	Var	Var	Broadly expressed
CD45	+	+	+	+	-	+	+	+	Leukocyte common antigen
HLA-DR	+	-	-	+	-	-	+	-	Class II MHC component
CD34	+	-	-	-	-	-	Sub	-	Adhesion molecule; marker of immature cells
TdT	-	-	-	-	-	-	Sub	-	Nucleotide transferase; marker of immature cells

Identifikasi populasi sel blas secara *immunophenotyping* dapat dilakukan dengan dua strategi, yaitu identifikasi dengan *scattergram* SSC/CD45 dan identifikasi menggunakan CD34+. Pada *scattergram* SSC/CD45, populasi sel blas umumnya mempunyai ekspresi SSC sedang, dan CD45 lemah (dim). Pada keadaan normal, proporsi populasi dengan SSC/CD45<sup>dim</sup> hanya sekitar 4,7%. Dengan strategi ini, umumnya sel progenitor dari semua lini hematopoietik dapat diidentifikasi.<sup>2</sup>

Setelah populasi sel blas teridentifikasi, analisis lanjutan diperlukan untuk identifikasi lini hematopoietik dari sel blas. Penggunaan *anchor* antigen CD34 dan CD45 di setiap tabung membantu mengidentifikasi sel blas secara konsisten pada setiap tabung. Penanda paling dini

yang dianggap spesifik untuk lini mieloid adalah CD117. Namun CD117 pada klasifikasi WHO 2008, penanda untuk lini mieloid adalah MPO (*myeloperoxidase*) yang dianggap lebih spesifik. Sedangkan penanda paling dini untuk lini limfoid adalah TdT.<sup>2,3</sup>

Karakterisasi blas leukemik pada leukemia akut, selain dari ekspresi antigen penanda imaturitas, adalah ketiadaan ekspresi antigen penanda maturasi. Penanda maturasi yang dipakai untuk ALL-B adalah imunoglobulin sitoplasmik dan permukaan. CD20 walaupun merupakan antigen yang sering dihubungkan dengan maturasi sel B, namun dalam hal leukemia akut CD20 tidak dapat dipakai sebagai penanda maturitas. Pada ALL-T penanda maturasi adalah CD3 membran. CD3 sitoplasmik merupakan penanda imaturitas pada ALL-T. Selain itu, CD4/CD8 positif ganda atau negatif ganda juga merupakan penanda imaturitas, karena pada limfosit T matur akan berdiferensiasi menjadi positif tunggal CD4, atau CD8. Sedangkan penanda maturitas pada AML adalah CD10, CD116, CD15, CD16 dan CD65. Walaupun sering juga dijumpai ekspresinya bersamaan dengan penanda imaturitas.<sup>2,3,9,10</sup>

Pada AML urutan antigen dari yang paling spesifik sebagai penanda lini mieloid adalah MPO, kemudian CD117, CD13, dan yang paling kurang spesifik adalah CD33. CD33 merupakan antigen yang paling sering diekspresikan pada AML, namun dianggap kurang spesifik, karena juga sering ditemukan pada ALL. Walaupun pada klasifikasi WHO 2008, antigen yang dianggap penentu lini mieloid adalah MPO, namun pada keadaan di mana MPO negatif seperti pada M0 atau AML dengan diferensiasi monositik, penentu lini mieloid adalah CD13, CD33, dan CD117. Khusus untuk diferensiasi monositik, perlu ditambah dengan ekspresi dua atau lebih antigen yang menunjukkan lini mielomonositik, antara lain CD11c, CD14, atau CD64. Diagnosis AML dipastikan bila ditemukan MPO atau penanda diferensiasi lini mielomonositik, tanpa disertai ekspresi antigen spesifik penanda lini limfoid T (CD3) dan B (Tabel 2). Namun perlu diperhatikan bahwa cukup sering ditemukan ekspresi aberans antigen limfoid pada AML, demikian pula sebaliknya antigen mieloid dalam ALL. Oleh karena itu, perlu kehati-hatian dalam menyimpulkannya sebagai ekspresi aberans atau lini ambigu (*acute leukemia of ambiguous lineage*).<sup>2,3</sup>

Pada keganasan limfoid B, tidak seperti AML, tidak ada antigen yang sangat spesifik untuk

lini limfoid B. CD19 yang dianggap cukup spesifik untuk lini limfoid B dan diekspresikan cukup dini pada diferensiasi limfosit B, ternyata juga cukup sering ditemukan pada AML, terutama M2 (FAB). Oleh karena itu, untuk memastikan lini limfoid B, sangat penting ditemukan ko-ekspresi beberapa penanda antigen limfoid B lain bersama CD19. Berdasarkan kriteria WHO 2008, lini limfoid B dipastikan jika ditemukan ekspresi kuat CD19 disertai salah satu dari CD79a, CD22, atau CD 10, atau jika ekspresi CD19 lemah, harus disertai paling tidak dua dari antigen tersebut.<sup>2,3</sup>

Sebaliknya pada keganasan limfoid T, ekspresi CD3 merupakan penanda yang sangat spesifik untuk lini limfoid T. Niolekul CD3 merupakan komponen dari reseptor sel T yang diekspresikan cukup kuat di sitoplasma prekursor limfosit T, dan pada tahap diferensiasi selanjutnya diekspresikan pada membran limfosit T.

Oleh karena itu ekspresi CD3 sudah cukup sebagai penentu lini limfoid T. Diagnosis ALL T

dan B ditegakkan bila ditemukan ekspresi antigen spesifik lini limfoid T atau B, tanpa disertai ekspresi antigen spesifik mieloid. Antigen spesifik mieloid yang dimaksud di sini adalah MPO dan penanda lini mielomonositik yang telah disebutkan di atas. Sedangkan CD13 dan CD33 dianggap antigen non-spesifik mieloid, sehingga ekspresinya pada ALL dianggap ekspresi aberans, dan bukan lini ambigu.<sup>2,3</sup>

**Tabel 2.** Kriteria WHO 2008 untuk penentuan lini pada leukemia akut.<sup>2,3</sup>

Lini	Antigen
Mieloid	MPO Antigen monositik (minimal dua dari CD110, CD14, CD64)
Limfoid T	CD3 sitoplasmik/membran
Limfoid B	CD19 kuat, dengan minimal satu dari CD79a, CD22, CD10 CD19 lemah dengan minimal dua dari CD79a, CD22, CD10

Pada leukemia akut lini ambigu harus dibuktikan bahwa terdapat dua atau lebih ekspresi kriteria lini yang disebutkan di atas, ditemukan bersamaan pada populasi blas leukemik, baik diekspresikan pada sel yang sama, atau pada dua populasi sel yang berbeda. Ko-ekspresi pada populasi sel yang sama dulu dikenal sebagai leukemia akut bifenotipik, sedangkan jika ditemukan dua populasi dengan dua ekspresi disebut leukemia akut *bilineage*. Namun kriteria WHO 2008 tidak lagi membedakan keduanya, tetapi mengelompokkannya sebagai *mixed phenotype acute leukemia (MPAL)*. Sebaliknya, jika tidak ditemukan ekspresi lini spesifik tersebut di atas, WHO 2008 mengelompokkannya sebagai *acute undifferentiated leukemia (AUL)*. Pada AUL seringkali hanya ditemukan CD34<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD45 lemah/positif. M0 (FAB) bisa masuk dalam kriteria ini. Namun untuk memastikan suatu AUL, harus terlebih dahulu disingkirkan kemungkinan lini megakariositik, eritroid, dan tumor hematopoietik dan infiltrasi non-hematopoietik lain.<sup>3,4</sup>

## RINGKASAN

Leukemia akut merupakan suatu kelompok penyakit yang sangat heterogen, dan masing-masing mempunyai strategi penatalaksanaan dan prognosis yang berbeda. Oleh karena itu, ketepatan diagnosis sangat penting dalam penatalaksanaan pasien leukemia akut. Klasifikasi dan identifikasi sel leukemik secara sitomorfologi tidak selalu dapat memenuhi kebutuhan tersebut. *Immunophenotyping* dengan *flowcytometry* pada leukemia akut membantu mengidentifikasi lebih tepat, terlebih pada kasus MPAL dan AUL. Selain itu, karena kemampuannya dalam mengkarakterisasi sel leukemik walaupun dalam jumlah yang kecil, *immunophenotyping* leukemia akut juga dapat dipakai untuk pemantauan terapi, dan identifikasi *minimal residual disease*. Namun, keberhasilan *immunophenotyping* pada leukemia akut sangat ditentukan oleh ketepatan sampel, pemilihan panel, dan kemampuan dalam analisis. Pengenalan sel blas dan pola ekspresinya pada leukemia akut sangat penting, terutama dalam membedakannya dengan populasi blas normal. Umumnya blas leukemik menunjukkan ekspresi antigen penanda imaturitas, disertai ekspresi abnormal lain, misalnya disertai koekspresi penanda maturitas, atau koekspresi dari penanda dari lini hematopoietik yang lain. Pola abnormal ini penting untuk membedakan leukemia akut dengan berbagai

kondisi sumsum tulang reaktif. Selain itu, hal ini juga penting untuk mengidentifikasi MRD, dan membedakannya dengan pemulihan blas normal pasca terapi yang berhasil.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flowcytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135:44-54.
2. Leach M, Drummond M, Doig A. *Practical flowcytometry in haematology diagnosis*. Oxford: Wiley-Blackwell. 2013.
3. Borowitz MJ, Bene MC, Harris NL, Purwit A, Matutes E. Acute leukemia of ambiguous lineage. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris EL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al, editors. *WHO classification of tumour of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4<sup>th</sup> ed. IARC: Lyon. 2008. p. 150-5.
4. Acute leukemia. In: Bain JB, editor. *Leukemia diagnosis*. 3rd ed. UK: Blackwell Publishing Ltd. 2003. p. 57-70.
5. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flowcytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods*. 2000; 243:77-97.
6. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999; 341(14):1051-9.
7. Bene MC. Immunophenotyping of acute leukemia. *Immunol letter*. 2005; 98:9-21.
8. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, te Marvelde WJG, Westerdal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry*. 2004; 60B:1-13.
9. Qadir M, Barcos M, Stewart CC, Sait NJS, Ford LA, Baer MR. Routine immunophenotyping in acute leukemia: role in lineage assignment and reassignment. *Cytometry*. 2006; 70B:329-34.
10. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Bruce G, Kussick SJ, et al. 2006 Bethesda international consensus recommendations on hematolymphoid neoplasia by flowcytometry: optimal reagents and reporting for the flowcytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry*. 2007 72B:14-22.