

Kesalahan Interpretasi Gram sebagai Laporan Pendahuluan pada Kultur Darah Positif

Errors in Interpretation of Gram Stain in The First Notification from Positive BACTEC Blood Cultures in Clinical Microbiology Laboratory of Dr. Kariadi Hospital

Maryani^{1,2*}, Desvita Sari^{1,3}, Ridha Wahyutomo^{1,4*}, Masfiah^{1,4}

ABSTRACT

Background: Blood cultures in conjunction with the initial Gram stain of positive cultures have often been considered the "gold standard" for the diagnosis of bacteremia. When blood cultures turn positive, the attending physicians are usually notified immediately about Gram stain findings. However, information on the accuracy of Gram staining is very limited. We examined the error of preliminary blood culture reports provided by a local laboratory in an observational study.

Design and Method: This was an observational study with a cross sectional approach. In this study, 369 blood cultures were examined. The positive blood cultures (135 samples) were then examined by Gram stain. Blood cultures handled on Bactec 9050, while the Gram stain was done in standard procedure Gram. Interpretation errors of Gram stain were confirmed by cultures result.

Result: During one month (April 2011) we examined 369 blood cultures which 135 are positive (36.5%). Positive blood cultures were misread for 6 (4.4%) of 135 patients, they were two read as gram positive cocci had gram negative organisms by culture which were *Acinetobacter baumannii*, one read as gram positive bacilli had gram negative bacilli by culture which was *Klebsiella pneumoniae*. One isolate read as gram negative bacilli had gram positive bacilli which was *Bacillus* species, while two sample read as gram negative bacilli only had polymicrobial by culture, of these one isolate grew to be *Enterobacter aerogenes* and *Staphylococcus aureus* and the other were *Escherichia coli* and *Acinetobacter* spp.

Conclusion: The overall 4.4% error rate of misinterpreted Gram stains from positive blood culture bottles is relatively high, so laboratory professionals and clinical microbiologist must be aware of the potential types of error that occur (*Sains Medika*, 4(1):23-29).

Key words: Blood culture, Gram stain, error interpretation.

ABSTRAK

Pendahuluan: Kultur darah disertai dengan laporan pemeriksaan mikroskopis Gram dari kultur yang positif seringkali dianggap sebagai "baku emas" untuk diagnosis bakteremia. Bila kultur darah menunjukkan positif, dokter penanggung jawab pasien diberitahu segera mengenai hasil pemeriksaan Gram. Namun, catatan keakuratan hasil pemeriksaan mikroskopis Gram belum diteliti secara luas. Kami meneliti kesalahan interpretasi pemeriksaan mikroskopis Gram pada laporan awal dari kultur darah yang positif pada laboratorium mikrobiologi RS Dr. Kariadi dalam studi observasional.

Metode Penelitian: Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan pendekatan *cross sectional*. Dalam penelitian ini, dilakukan 369 kultur darah. Kultur darah yang positif (135 sampel) kemudian diperiksa dengan pewarnaan Gram. Kultur darah dilakukan dengan metode pada mesin BACTEC 9050, sedangkan pewarnaan Gram dilakukan dengan prosedur standar Gram. Interpretasi pemeriksaan Gram dikonfirmasi dengan hasil kultur, kesalahan interpretasi dihitung dalam prosentase.

Hasil Penelitian: Selama satu bulan (April 2011) kami memeriksa kultur darah sebanyak 369 kultur darah, 135 diantaranya positif (36,5%). Kultur darah positif yang terjadi kesalahan interpretasi didapatkan 6 (4,4 %) dari 135 pasien, dua sampel diinterpretasi sebagai kokus gram positif, pada hasil kultur tumbuh batang gram negatif yaitu *Acinetobacter baumannii*, satu sampel diinterpretasi sebagai batang gram positif, pada kultur tumbuh batang gram negatif yaitu *Klebsiella pneumoniae*. Satu sampel didapatkan batang gram negatif, pada kultur tumbuh batang gram positif yaitu *Bacillus* spp, sementara dua sampel

1 PPDS Mikrobiologi Klinik FK Univ Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi,

2 Bagian Mikrobiologi FK Univ Sebelas Maret/RSUD Dr. Muwardi,

3 RSUD Dr. Kariadi,

4 Bagian Mikrobiologi FK Univ Sultan Agung

* E-mail : dr.maryani@gmail.com

diinterpretasi sebagai batang gram negatif saja, sedangkan pada kultur tumbuh polimikrobia, satu sampel muncul *Enterobacter aerogenes* dan *Staphylococcus aureus*, satu sampel yang lain tumbuh *Escherichia coli* dan *Acinetobacter spp.*

Kesimpulan: Secara keseluruhan 4,4% kesalahan interpretasi Gram dari kultur darah positif relatif tinggi, maka dari itu teknisi laboratorium dan ahli mikrobiologi klinis harus mengetahui jenis potensi kesalahan yang terjadi (Sains Medika, 4(1):23-29).

Kata kunci : kultur darah, pengecatan Gram, kesalahan interpretasi

PENDAHULUAN

Bakteremia merupakan keadaan klinis yang serius yang mempunyai angka kematian di Rumah Sakit cukup tinggi lebih dari 20% (Sogaard *et al.*, 2007). Kecepatan dan ketepatan pemberian antibiotika empirik mempengaruhi angka survival pasien dengan bakteremia. Sebelum dilakukan *preliminary report* dengan pemeriksaan Gram, lebih dari 40% pasien dengan bakteremia mendapatkan pengobatan antibiotika yang tidak adekuat, oleh karena itu tugas laboratorium mikrobiologi dalam memberikan laporan awal pada kultur darah yang positif dapat memandu klinisi dalam memilih antibiotika (Stone and Steele, 2009).

Laporan awal dari pemeriksaan Gram pada kultur darah positif sangat bermakna dalam membantu penatalaksanaan pasien dengan bakteremia (Strand, 2006). Dokter belum memberikan antibiotika pada pasien (12-20%) bakteremia sebelum mendapatkan laporan awal Gram, sedangkan dokter segera mengganti antibiotika berdasarkan hasil laporan awal Gram pada 30-45% pasien (Sogarrd *et al.*, 2007). Pemeriksaan Gram telah nampak mempunyai peran yang besar dalam penatalaksanaan antibiotika pada pasien dengan bakteremia, bahkan dibandingkan dengan hasil kultur (Stone and Steele, 2009).

Keseksamaan pemeriksaan, pengenalan morfologi dan sifat mikroorganisme yang dijumpai pada preparat dengan baik diperlukan agar hasil pemeriksaan mikroskopis Gram dapat dimanfaatkan sebagai pemandu pemilihan terapi antibiotika (Rand and Tillan, 2006). Oleh karena itu, diperlukan ketrampilan teknisi yang tinggi, yaitu telah terlatih dan berpengalaman dalam pemeriksaan Gram (Strand, 2006). Data mengenai angka kesalahan interpretasi pemeriksaan mikroskopis Gram di RSUP Dr. Kariadi belum pernah ada, sehingga perlu dilakukan pengamatan mengenai hal tersebut.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan pendekatan observasional. Ruang lingkup penelitian adalah bidang ilmu Mikrobiologi Klinik. Tempat penelitian

adalah Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang. Penelitian dilakukan selama 1 bulan pada bulan April 2011.

Sampel berupa kultur darah yang diterima oleh laboratorium RS Dr. Kariadi Semarang dari penderita rawat inap seluruh bangsal. Kultur darah dilakukan dengan metode pada mesin dilakukan dengan sistem Bactec 9050, menggunakan botol Bactec Plus Aerobis dan Bactec Ped Plus Aerobic (BD Diagnostic Systems, Spark, MD). Setiap kultur darah yang positif dilakukan pengecatan Gram (BD Gram stain), selanjutnya identifikasi dilakukan dengan identifikasi koloni dan uji biokimia kuman.

Pengecatan Gram dilakukan sebagai berikut setelah preparat apusan dibuat, kristal violet digenangkan selama 45 sampai 60 detik, preparat dicuci pada air mengalir, kemudian iodin digenangkan selama 60 detik, dekolorisasi dengan alkohol 95% dengan aseton (3:1) selama 10 detik, preparat dicuci dengan air mengalir, terakhir safranin digenangkan selama 40 – 60 detik (Sogaard *et al.*, 2007).

Seluruh kultur darah yang positif dicatat dalam *log book*. Pengecatan Gram dilakukan, selanjutnya setelah identifikasi selesai, hasil kultur dikonfirmasi dengan pengecatan Gram. Kesalahan utama interpretasi pengecatan Gram dibedakan menjadi 3 yaitu: (1) Hasil pengecatan Gram menunjukkan gram positif, sedangkan kultur menunjukkan gram negatif, (2) Hasil pengecatan Gram menunjukkan gram negatif, sedangkan kultur menunjukkan gram positif, (3) Hasil pengecatan menunjukkan monomikrobal, sedangkan hasil kultur menunjukkan polimikrobal. Penemuan *yeast dieksklusi* dalam penelitian ini (Rand and Tillan, 2006).

HASIL PENELITIAN

Sebanyak 369 kultur darah dilakukan dalam kurun waktu satu bulan, kultur darah positif ditemukan sebanyak 135 sampel (36.5%). Kesalahan interpretasi pemeriksaan mikroskopis Gram dikonfirmasi dengan kultur disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kesalahan interpretasi pemeriksaan mikroskopis Gram

Hasil pengecatan Gram	Jumlah Positif	Kesalahan interpretasi	Kesalahan utama		
			1	2	3
Gram (+) kokus	32	2	2	0	0
Gram (+) batang	3	1	1	0	0
Gram (-) kokus	0	0	-	-	-
Total	135	6	3	0	2

Kesalahan interpretasi mikroskopis Gram didapatkan sebanyak 4.4% (6/135), kesalahan utama (1) ditemukan pada 2 sampel yang pada pengecatan gram ditemukan kokus gram positif sedangkan hasil kultur muncul *Acinetobacter baumannii*, dan 1 sampel yang pada pengecatan gram ditemukan batang gram positif sedangkan hasil kultur ditemukan *Klebsiella pneumoniae*. Kesalahan utama (2) ditemukan pada 1 sampel dimana pengecatan gram ditemukan gram negatif batang, sedangkan hasil kultur ditemukan *Bacillus sp*. Kesalahan utama (3) ditemukan pada 2 sampel dimana pengecatan gram menunjukkan gram negatif batang sedangkan hasil kultur ditemukan 2 species kuman, yaitu satu sampel ditemukan *Staphylococcus aureus* dan *Enterobacter aerogenes*, satu sampel ditemukan *Escherichia coli* dan *Acinetobacter spp*.

Jenis kuman yang diisolasi dari kultur darah dapat dilihat pada Tabel 2. Ditemukannya *Staphylococcus epidermidis* dan *Bacillus sp* dipikirkan suatu kontaminan oleh karena kesalahan tindakan saat pengambilan sampel. Walaupun sebenarnya tidak dapat begitu saja ditentukan sebagai kontaminan oleh karena pengambilan sampel hanya dilakukan satu botol saja, sedangkan standar sampel untuk kultur darah adalah dua botol (aerob dan anaerob).

Kultur darah positif terbanyak adalah dari Bagian Pediatri yaitu dari bangsal Pediatri sebanyak 45.9% (62/135) dan dari rawat intensif pediatri (PICU/NICU) sebanyak 17.8% (24/135) (Tabel 3). Kuman-kuman oportunistik (*Pseudomonas spp*, *Enterobacter spp*, *Acinetobacter spp*) banyak ditemukan di bagian pediatri karena anak-anak adalah kelompok resiko imunokompromais.

Tabel 2. Jenis kuman yang diisolasi dari kultur darah

Jenis kuman	Jumlah isolat
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34
<i>Staphylococcus aureus</i>	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
<i>Enterobacter spp</i>	14
<i>Escherecia coli</i>	10
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Proteus spp</i>	2
<i>Bacillus spp</i>	2
<i>Salmonella typhi</i>	2
<i>Serratia</i>	1
<i>Bulkhorderia cepacia</i>	1

Tabel 3. Pola kuman dari kultur darah di Pediatri

Jenis kuman	Bangsai pediatri (jumlah isolat)	Rawat intensif pediatri (jumlah isolat)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	8
<i>Escherichia coli</i>	6	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	7
Lain-lain	7	3
Total	62	24

PEMBAHASAN

Dinding sel Gram positif mengandung lapisan peptidoglikan yang tebal yang mampu menahan lepasnya kompleks kristal violet-iodin (mordant) pada proses dekolonisasi dengan alkohol-aseton. Pada kuman gram negatif, kompleks kristal violet-iodin terlarutkan oleh alkohol-aseton bersamaan dengan kerusakan dinding sel karena peptidoglikan yang tipis, sehingga kuman mengikat warna safranin (Ferre *et al.*, 2011; Musher *et al.*, 2004).

Bacillus spp dalam pengecatan Gram 95%-100% nampak sebagai sebagai gram positif pada fase-fase awal pertumbuhan dalam medium, namun 40%-50% akan menjadi gram negatif pada fase akhir pertumbuhan dan akhirnya 90%-95% nampak sebagai gram negatif pada fase stasioner. Pada penelitian ini didapatkan satu sampel yang pada mikroskopis Gram ditemukan gram negatif batang, sedangkan hasil kultur tumbuh *Bacillus spp*. Belajar dari keadaan tersebut, maka pemeriksaan mikroskopis Gram sebaiknya dilakukan sesegera mungkin ketika kultur dinyatakan positif (Musher *et al.*, 2004).

Pada kuman-kuman gram negatif, kesalahan pemeriksaan mikroskopis gram terutama disebabkan oleh proses dekolonisasi yang tidak sempurna, sehingga warna kristal violet tidak seluruhnya hilang. Hal ini membuat kuman gram negatif terbaca sebagai gram positif. Pada penelitian ini didapatkan 2 sampel yang pada pemeriksaan gram terlihat sebagai kokus gram positif, pada hasil kultur tumbuh *Acinetobacter baumannii* (kokobasil gram negatif), dan satu sampel yang pada pemeriksaan gram nampak sebagai batang gram positif, hasil kultur tumbuh *Klebsiella pneumoniae*. Dalam hal ini, teknisi harus lebih seksama dalam melakukan seluruh rangkaian proses pengecatan gram, misalnya konsentrasi reagen, waktu yang diperlukan setiap reagen

pada penggenangan preparat dan teknik dekolorisasi (Stoone and Steel, 2009).

Polimikrobal yang pada pemeriksaan mikroskopis gram hanya nampak monomorfologi, hal tersebut dapat dijelaskan bahwa kuman tersebut hanya sedikit terdapat dalam sampel. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhannya didominasi oleh salah satu kuman, sehingga pada pewarnaan gram kuman tersebut tidak nampak. Berdasarkan pertimbangan tersebut, teknisi harus seksama dalam melakukan pengamatan mikroskopis Gram dengan membuat dua atau tiga apusan untuk meminimalkan kesalahan interpretasi ini (Murdoch, 2004).

Staphylococcus epidermidis ditemukan hampir 25% (15/62) dari bangsal Pediatri, akan tetapi belum dapat dipastikan apakah isolat tersebut kontaminasi atau infeksi sejati. Hal tersebut disebabkan pengambilan sampel hanya satu botol, standar pemeriksaan kultur darah adalah dua botol (anaerob dan aerob atau 2 aerob) atau tiga botol (2 aerob, 1 aerob). Pengambilan sampel pada pediatri mempunyai tingkat kesulitan lebih tinggi dari pada pasien dewasa, sehingga dimungkinkan terjadi kontaminasi dari flora kulit. Oleh karena itu, sampel sebaiknya diambil dengan vacutainer dua botol sekali sampling. Kontaminan dipertimbangkan apabila botol pertama positif sedangkan botol kedua negatif. Apabila kedua botol menunjukkan hasil positif dipertimbangkan sebagai infeksi sejati (Murdoch, 2004; Saini, 2011).

KESIMPULAN

Angka kesalahan pemeriksaan Gram pada penelitian ini adalah 4.4%, relatif tinggi untuk suatu pemeriksaan yang digunakan sebagai acuan terapi awal. Diharapkan angka kesalahan ini dapat diturunkan seminimal mungkin dengan berbagai upaya antara lain pelatihan teknisi agar ketrampilan teknisi optimal, mengevaluasi dan meningkatkan kualitas reagen, serta meningkatkan kepatuhan teknisi terhadap petunjuk prosedur pemeriksaan. Dengan demikian pemeriksaan Gram dapat digunakan secara pasti sebagai panduan awal terapi empirik suatu kasus bakteremia.

DAFTAR PUSTAKA

Ferre C, Llopis F, Jacob J, Juan A, Palom X, Bardes I, Salazar A, 2011, Is sputum Gram staining useful in the emergency departement's management of pneumonia?, *Emergencias*, Vol 23, p 108-111

- Murdoch DR, Greenlees RL, 2004, Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from Bact/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics, *Journal of Clinical Pathology*, Vol 57, p 199-201
- Musher DM, Montoya R, Wanahita A., 2004, Diagnostic Value of Microscopic Examination of Gram-Stained Sputum and Sputum Cultures in Patients with Bacteremic Pneumococcal Pneumonia, *Journal of Infectious Diseases*, Vol 29, p 165-169
- Rand KH, Tillan M., 2006, Errors in Interpretation of Gram Stain From Positive Blood Cultures, *American Journal of Clinical Pathology*, Vol 126, p 686-690
- Saini S, Katiyar R, Deorukhkar S, 2011, Gram Stain versus Culture for Diagnosis of Pyogenic Infections, *Pravara Medical Review*, Vol 6(1), p 9-11
- Sogaard M, Norgaard M, Schonheyder HC., 2007, First Notification of Positive Blood Cultures and the High Accuracy of the Gram Stain Report, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 54:4, p 1113-1117
- Strand, CL, 2006, Positive Blood Cultures : Can We Always Trust the Gram Stain, *American Journal of Clinical Pathology*, Vol 126, p 671-672
- Stone RB, Steele JC, 2009, Impact of Reporting Gram Stain Result From Blood Cultures on the Selection of Antimicrobial Agents, *American Journal of Clinical Pathology*, Vol 132, p 5-6