

Uji diagnostik apusan *buffy coat* dengan pewarnaan gram pada sepsis neonatorum

Christina Kastanti Nugrahani, Achmad Surjono, Tonny Sadjimin
Bagian Ilmu Kesehatan Anak
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/RS Dr. Sardjito
Yogyakarta

ABSTRACT

Christina Kastanti Nugrahani, Achmad Surjono, Tonny Sadjimin - *Diagnostic test of buffy coat smear with Gram staining at sepsis neonatorum.*

Background: Neonatal sepsis is known as a leading cause of neonatal morbidity and mortality. It is hard to diagnose clinically sepsis due to its nonspecific manifestations. Blood culture has been the gold standard for neonatal sepsis. Unfortunately, it takes time to get the result, it is costly, and it is not easily performed. Buffy coat smear with Gram stain in attempt to diagnose neonatal sepsis is less costly and easily performed.

Objective: To know the diagnostic value of buffy coat smear with Gram staining to diagnose neonatal sepsis.

Methods: This cross sectional study was carried out at the Maternal-Perinatal Installation of Dr. Sardjito Hospital, Yogyakarta, between October 1st, 2003 to March 31st, 2004. The inclusion criteria was clinically sepsis neonates (0-28 days old). Neonates with blood disorder, congenital anomaly, or had got antibiotic previously were excluded from this study. The buffy coat smear with Gram staining was examined and than was blindly validated with blood culture.

Result: There were 127 neonates enrolled in this study. Buffy coat smear with Gram stain to diagnose neonatal sepsis produced sensitivity 77% (95% CI, 65-88), specificity 85% (95% CI, 77-93), positive predictive value (PPV) 78% (95% CI, 67-90), negative predictive value (NPV) 84% (95% CI, 76-92), positive likelihood ratio 5,24 (95% CI, 2,98-9,24), and negative likelihood ratio 0,3 (95% CI, 0,16-0,45).

Conclusion: Buffy coat smear with Gram stain was sufficiently accurate as diagnostic test for neonatal sepsis. The diagnostic value of buffy coat is expected to be useful for clinicians to predict neonatal sepsis earlier and guide them in making decision for clinical management.

Keywords: neonatal sepsis - diagnostic test - buffy coat - gram positive staining

ABSTRAK

Christina Kastanti Nugrahani, Achmad Surjono, Tonny Sadjimin - *Uji diagnostik apusan buffy coat dengan pewarnaan gram pada sepsis neonatorum*

Latar Belakang: Sepsis neonatorum merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas. Secara klinis sulit untuk mendiagnosis sepsis karena manifestasinya yang tidak spesifik. Biakan darah merupakan baku emas untuk sepsis neonatorum. Sayangnya, uji ini perlu waktu untuk memperoleh hasilnya, mahal, dan tidak mudah dilaksanakan. Apusan *buffy coat* dengan pewarnaan gram dalam upaya untuk mendiagnosis sepsis neonatorum lebih murah dan mudah dilakukan.

Tujuan : Mengetahui nilai diagnostik pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan gram untuk mendiagnosis sepsis neonatorum.

Bahan dan Cara: Penelitian potong lintang ini dilaksanakan di Instalasi Maternal-Perinatal RS Dr. Sardjito, Yogyakarta, antara 1 Oktober 2003 - 31 Maret 2004. Kriteria inklusi adalah neonatus (umur 0-28 hari) dengan klinis sepsis Neonatus dengan kelainan darah, anomali kongenital, atau sebelumnya telah mendapat terapi antibiotika dikeluarkan dari penelitian ini. Apusan *buffy coat* dengan pewarnaan gram diperiksa adanya bakteri dan secara buta divalidasi dengan biakan darah.

Hasil: Sebanyak 127 neonatus dimasukkan dalam penelitian ini. Identifikasi bakteri secara mikroskopik pada apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram untuk mendiagnosis sepsis menghasilkan sensitivitas 77% (IK95% 65-88), spesifisitas 85% (IK95% 77-93), nilai prediksi positif (NPP) 78% (IK95% 67-90), nilai prediksi negatif (NPN) 84% (IK95% 76-92), rasio kecenderungan positif 5,24 (IK95% 2,98-9,24), dan rasio kecenderungan negatif 0,3 (IK95% 0,16-0,45).

Simpulan: Apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram cukup akurat untuk uji diagnosis sepsis neonatorum. Diharapkan uji ini bermanfaat bagi klinisi dalam menegakkan secara awal diagnosis sepsis neonatorum dan merupakan penuntun dalam membuat keputusan manajemen klinis.

(B.I.Ked. Vol. 37, No.1: 21-26, 2005)

LATAR BELAKANG

Sepsis neonatorum adalah sindrom klinis yang secara patofisiologi dihasilkan oleh efek infeksi lokal atau sistemik yang terjadi dalam bulan pertama kehidupan^{1,2}, dengan penyebab terbanyak adalah bakteri.

Sepsis neonatorum masih merupakan penyebab penting morbiditas dan mortalitas neonatus, baik di negara maju maupun di negara berkembang. Angka kejadian sepsis neonatorum yang dilaporkan bervariasi, antara 1-8 per 1000 kelahiran hidup, dengan kejadian terbanyak pada bayi kurang bulan dengan berat badan lahir rendah. Hal ini disebabkan oleh sistem imun pada bayi kurang bulan yang belum matang sehingga risiko terkena infeksi menjadi lebih besar.³ Insidensi sepsis neonatorum di negara berkembang sangat bervariasi menurut waktu dan lokasi. Insidensi yang bervariasi di berbagai rumah sakit tersebut dihubungkan dengan angka prematuritas, perawatan perinatal, persalinan, dan kondisi lingkungan waktu perawatan.¹ Kepustakaan di Indonesia belum banyak melaporkan angka kejadian sepsis neonatorum di rumah sakit rujukan. Angka kejadian kasus tersebut di beberapa rumah sakit rujukan berkisar antara 1,5 - 3,72%, sedangkan angka kematiannya berkisar antara 37 - 80%.⁴ Di RS Dr. Ciptomangunkusumo Jakarta dilaporkan insidensi sepsis neonatorum 3,98% dengan angka mortalitas 47,3%.⁵

Di RS Dr. Sardjito Yogyakarta, jumlah kasus sepsis neonatorum menunjukkan variasi dari tahun ke tahun. Data yang diperoleh dari Instalasi Rekam Medik RS Dr. Sardjito, rerata jumlah kasus 3 tahun terakhir kurang lebih 45/tahun (4,22%) dan angka kematiannya 42,9%.

Risiko seorang bayi menderita sepsis meningkat dengan adanya prematuritas dan berat badan lahir rendah, ketuban pecah dini, infeksi atau demam

peripartum pada ibu, masalah air ketuban, resusitasi waktu lahir, kehamilan ganda, prosedur invasif, dan lain-lain.²

Menegakkan diagnosis sepsis bukan suatu hal yang mudah, oleh karena sepsis seringkali tidak menunjukkan gejala yang spesifik. Angka kesembuhan sepsis neonatorum akan meningkat bila terdeteksi dini dan ditangani segera.⁴ Pengembangan jenis dan metode pemeriksaan untuk deteksi dini bermanfaat bagi para klinisi untuk menetapkan penatalaksanaan. Manfaat ini tidak hanya pada peningkatan angka kesembuhan dan penurunan angka mortalitas, melainkan juga mengurangi penggunaan antibiotik yang tidak perlu sehingga mengurangi resistensi antibiotik.

Pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram merupakan salah satu alternatif untuk mendeteksi sepsis bakterial secara dini. Pemeriksaan ini dapat dilakukan dengan mudah, cepat, dan tidak memerlukan biaya yang mahal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai diagnostik pemeriksaan apusan darah *buffy coat* dengan pewarnaan Gram pada sepsis neonatorum.

BAHAN DAN CARA

Rancangan penelitian ini adalah uji diagnostik potong lintang. Pengumpulan sampel dilakukan sejak 1 Oktober 2003 sampai dengan 31 Maret 2004.

Subyek penelitian dipilih secara konsekutif dari bayi-bayi suspek sepsis yang dirawat di Instalasi Maternal Perinatal RS Dr. Sardjito Yogyakarta. Besar sampel dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$n = \frac{Z^2_{1-\alpha/2} p \cdot q}{d^2}$$

Diasumsikan bahwa sensitivitas yang diinginkan 80%, lebar penyimpangan nilai p yang masih diterima (d) = 0,1, rentang kepercayaan 95%, dengan $Z^{2(1-\alpha/2)} = 1,96$, maka: Besar sampel minimal untuk estimasi sensitivitas diagnostik (n_1):

$$n_1 = \frac{1,96^2 (0,80) \cdot (0,20)}{(0,10)^2} = 61$$

Berdasarkan data dari penelitian sebelumnya⁵, jumlah kasus sepsis neonatorum kurang lebih 60%, maka banyak pasien yang harus diamati adalah = $100/60 \times 61 = 102$ orang.

Kriteria inklusi untuk penetapan subyek penelitian adalah: (1) Bayi usia 0-28 hari yang dirawat di RS Dr. Sardjito Yogyakarta, (2) Bayi dengan gejala klinis sepsis, dan (3) orang tua/wali mengizinkan bayinya untuk diikutsertakan dalam penelitian setelah diberi penjelasan (menandatangani *informed consent*). Bayi dengan kelainan darah, kelainan kongenital, mendapat antibiotik sebelumnya, atau ibu mendapat antibiotik intrapartum dikeluarkan dari penelitian.

Sepsis klinis diperoleh dari anamnesis dan pemeriksaan klinis. Anamnesis dan pemeriksaan fisik dilakukan oleh residen anak yang sedang menjalani stase di Instalasi Maternal Perinatal RS Dr. Sardjito Yogyakarta.

Diagnosis klinis sepsis neonatorum ditegakkan atas ditemukannya satu gejala atau lebih pada paling tidak empat dari enam kelompok: 1) bayi tampak sakit, tidak mau minum, suhu badan naik atau turun; 2) gejala gastrointestinal muntah, diare, kembung, atau splenomegali; 3) gejala saluran pernapasan dispneu, lakipneu, sianosis; 4) gejala kardiovaskular takikardia, edema, dehidrasi; 5) gejala neurologis letargi, iritabel, kejang; dan 6) gejala hematologis ikterus splenomegali, petekie, perdarahan.

Pengambilan sampel darah dilakukan oleh perawat terlatih yang sedang bertugas di Instalasi Maternal Perinatal RS Dr. Sardjito Yogyakarta. Darah vena diambil sebanyak 2 ml, sebelumnya kulit dibersihkan dengan alkohol 70%. Sampel darah untuk pemeriksaan biakan darah dimasukkan ke dalam tabung biakan darah, dan sampel untuk apusan *buffy coat* dimasukkan ke dalam 2 tabung hematokrit. Tabung-tabung tersebut segera dikirim ke laboratorium dalam waktu kurang dari 8 jam setelah pengambilan darah.

Apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram dan pemeriksaan biakan darah dilakukan oleh

laboran yang sudah dilatih sebelumnya di laboratorium Mikrobiologi Instalasi Patologi Klinik RS Dr. Sardjito/ FK UGM Yogyakarta. Untuk mengukur dan menjaga keandalan hasil pemeriksaan, interpretasi dilakukan oleh dua orang laboran yang sama secara buta (tersamar), dan dilakukan perhitungan indeks Kappa pada 15 sampel yang dipilih secara acak.

Uji diagnostik ditentukan dengan menggunakan tabel 2 x 2 untuk menghitung nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif (NDP), nilai duga negative (NDN), rasio kecenderungan positif (RKP), dan rasio kecenderungan negative (RKN). Perhitungan dilakukan menggunakan Program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 9.0. dengan interval kepercayaan 95%.

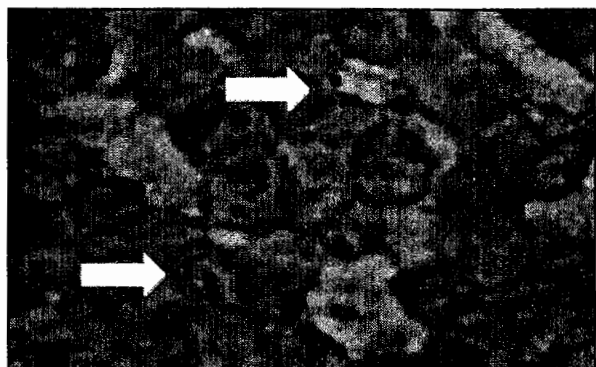
HASIL PENELITIAN

Selama periode penelitian ada 461 neonatus yang dirawat di Instalasi Maternal Perinatal RS Dr. Sardjito Yogyakarta. Dua ratus tiga puluh delapan (51,6%) neonatus memenuhi kriteria klinis sepsis, tetapi hanya 127 neonatus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk diobservasi selanjutnya. Karakteristik subyek penelitian dapat dilihat pada TABEL 1.

TABEL 1. Karakteristik Subyek Penelitian

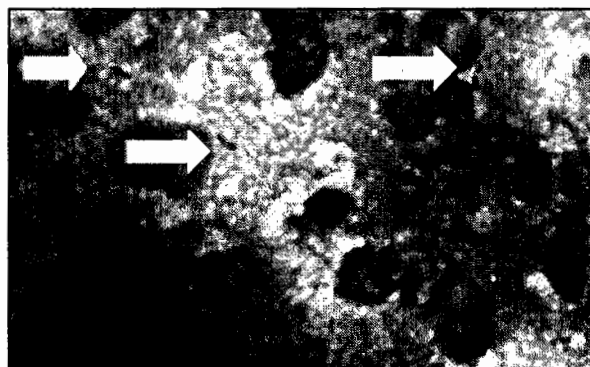
Variabel	Jumlah n = 127 (%)
Usia	
7 hari	98 (77,2)
≥ 7 hari	29 (22,8)
Jenis kelamin	
Laki-laki	78 (61,4)
Perempuan	49 (38,6)
Berat badan lahir	
BBLR (<2500 gram)	52 (40,9)
BBLC (2500-4000 gram)	67 (52,8)
BBLB (>4000 gram)	8 (6,3)
Umur kehamilan	
Kurang bulan (<37 minggu)	37 (29,1)
Cukup bulan (37-42 minggu)	83 (65,4)
Lebih bulan (>42 minggu)	7 (5,5)
Demam intrapartum	19 (14,9)
Ketuban pecah dini	24 (18,9)
Air ketuban keruh	42 (33,1)
Lama perawatan (hari)	
Median	10
Rentang	1 - 64
Kedadaan pulang	
Sembuh	87 (68,5)
Meninggal	25 (19,7)
APS (atas permintaan sendiri)	15 (11,8)

Di antara 52 neonatus dengan biakan darah positif, yang menunjukkan hasil positif pada pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram ada 40 (76,9%), terdiri dari kuman Gram positif 26 (65%) dan kuman Gram negatif 14 (35%).



GAMBAR 1. Bakteri bentuk kokus gram positif, dilihat dengan mikroskop perbesaran 100x (tanda panah)

Gambaran bakteri dalam apusan *buffy coat* dengan pengecatan Gram dapat dilihat pada gambar 1 (bakteri Gram positif) dan gambar 2 (bakteri Gram negatif).



GAMBAR 2. Bakteri bentuk batang gram negatif, dilihat dengan mikroskop perbesaran 100x (tanda panah)

TABEL 2. Kesepakatan antara dua pemeriksa

		Pemeriksa II		Total
		Hasil Positif	Hasil Negatif	
Pemeriksa I	Hasil Positif	9	1	10
	Hasil negatif	0	5	5
Total		9	6	15

TABEL 2 memperlihatkan kesepakatan antara 2 pemeriksa gambaran bakteri pada *buffy coat* yang

menunjukkan nilai kappa = 0,75, kesepakatan yang cukup baik.

TABEL 3. Nilai diagnostik pemeriksaan *buffy coat* terhadap baku emas biakan

		Biakan		Total
		Hasil Positif	Hasil Negatif	
<i>Buffy coat</i>	Hasil Positif	40	11	51
	Hasil negatif	12	64	76
Total		52	75	127

Sensitivitas	77%	(IK95%	65-88)
Spesifisitas	85%	(IK95%	77-93)
NDP	78%	(IK95%	67-90)
NDN	84%	(IK95%	76-92)
RKP	5,24%	(IK95%	2,98-9,24)
RKN	0,27	(IK95%	0,16-0,45)
Prevalensi	41%	(IK95%	32-49)

TABEL 3 menunjukkan nilai diagnostik pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram untuk sepsis neonatorum.

PEMBAHASAN

Pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram pada penelitian ini dilakukan oleh 2 orang laboran yang sebelumnya telah diuji kesepakatannya. Uji kesepakatan di antara kedua laboran tersebut menunjukkan nilai Kappa sebesar 0,75. Hal ini berarti bahwa pemeriksaan apusan *buffy coat* yang dilakukan oleh dua orang laboran tersebut cukup baik bagi penelitian ini (TABEL 2).

Penelitian ini, yaitu pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram dibandingkan dengan biakan darah sebagai baku emas, memiliki sensitivitas 77% (IK 95%; 65-88%), yang berarti bahwa uji tersebut memiliki kemampuan mendeteksi 77% pada kelompok sepsis neonatorum dan hanya 23% kasus sepsis neonatorum tidak terdeteksi karena hasil negatif semu. Pada nilai ini, pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram juga memiliki spesifisitas 85% (IK 95%; 77-93%), yang berarti bahwa uji tersebut memiliki kemampuan mendeteksi 85% pada kelompok tidak sepsis dan hanya 15% kasus sepsis neonatorum terdiagnosis salah karena hasil positif semu (TABEL 3).

Dengan sensitivitas dan spesifisitas diagnostik sebesar angka tersebut, pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram memberi NDP 78% (IK 95%; 67-90%) dan NDN 84% (IK 95%; 76-92%) pada prevalensi kasus sepsis neonatorum. Apabila seorang klinisi berhadapan dengan neonatus yang mempunyai gejala klinis sepsis, maka pasien ini memiliki probabilitas sepsis neonatorum lebih kurang 60% (sesuai kondisi prevalensi setempat). Apabila kemudian pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram menunjukkan hasil positif maka probabilitas neonatus menderita sepsis neonatorum berubah menjadi 78%. Apabila hasil pemeriksaan menunjukkan hasil negatif maka probabilitas neonatus tidak menderita sepsis neonatorum sebesar 84%.

Pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram memiliki besar rasio kecenderungan positif 5,24 (IK 95%; 2,98-9,24) dan rasio kecenderungan negatif 0,27 (IK 95%; 0,16-0,45). Prevalensi pada penelitian ini 41%, sehingga

perhitungan melalui odds dimulai dengan mengubah probabilitas menggunakan rumus $\text{odds} = \text{probabilitas} / (1 - \text{probabilitas})$, sehingga $\text{pre-test odds} = 41\% / (1 - 41\%) = 0,69$. *Pre-test odds* selanjutnya diubah menjadi *post-test odds* dengan cara mengalikannya dengan rasio kecenderungan, $\text{post-test odds} = 0,69 \times 5,24 = 3,6$. Untuk mengembalikan ke probabilitas *post-test*, digunakan rumus $\text{probabilitas} = \text{odds} / (\text{odds} + 1)$, sehingga probabilitas *post-test* = $3,6 / (1 + 3,6) = 0,783 = 78,3\%$. Rasio kecenderungan positif 5,24 menggambarkan bahwa pemeriksaan ini membuat perubahan moderat dari probabilitas *pre-test* sebesar 60% ke probabilitas *post-test* sebesar 78,3%, sehingga pemeriksaan ini cukup bermanfaat.

Penelitian serupa sebelumnya dilakukan oleh Saraswathi *et al.*⁶ menunjukkan hasil pemeriksaan apusan *buffy coat* untuk deteksi dini septikemia memiliki nilai sensitivitas 76,5% dan spesifisitas 91,2%. Perbedaan penelitian tersebut dengan penelitian ini adalah subyek penelitian Saraswathi anak umur 0-14 tahun, sedangkan penelitian ini dengan subyek penelitian neonatus. Penelitian ini memilih neonatus sebagai subyek penelitian dengan asumsi bahwa sistem imun bayi masih imatur, lebih-lebih pada bayi kurang bulan. Pada kondisi sistem imun yang imatur, proses opsonisasi terhadap bakteri pada bayi lebih buruk dibandingkan pada orang dewasa, sehingga pada keadaan bakteremia konsentrasi bakteri dalam darah bayi lebih banyak daripada konsentrasi bakteri dalam darah anak yang lebih besar atau orang dewasa. Oleh karena di dalam *buffy coat* terdapat banyak leukosit polimorfonuklear, maka apusan *buffy coat* dapat digunakan untuk menunjukkan adanya bakteri.⁷ Dengan alasan itu diharapkan apusan *buffy coat* pada neonatus lebih menampakkan bakteri dibanding pada anak yang lebih besar atau orang dewasa.

Keterbatasan penelitian ini adalah bahwa populasi hanya pada neonatus dengan gejala sepsis klinis. Seperti diketahui, agar suatu uji diagnostik dapat diterapkan pada populasi (neonatus) secara umum, seharusnya subyek penelitian meliputi semua spektrum pasien dengan berbagai gejala, mulai dari tanpa gejala, gejala ringan, hingga gejala berat. Untuk menerapkan hasil penelitian ini pada populasi yang lebih luas, diperlukan penelitian lanjutan dengan populasi semua spektrum neonatus.

Pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram dikembangkan dengan harapan dapat memberi manfaat yang lebih dibanding pemeriksaan diagnostik lain untuk sepsis neonatorum. Secara teknis, pemeriksaan apusan *buffy coat* lebih mudah, lebih sederhana, lebih murah, dan lebih cepat dibanding pemeriksaan biakan darah.^{7,8,9}

Dengan hasil deteksi dini, klinisi diharapkan dapat menentukan penatalaksanaan selanjutnya yang paling tepat dan cepat untuk pasien. Bagi pasien sepsis neonatorum, deteksi dini dan keputusan terapi yang tepat akan sangat menguntungkan. Di samping menghemat biaya berbagai macam kebutuhan logistik, termasuk memperpendek lama perawatan, juga mengurangi risiko resistensi akibat pemakaian antibiotika yang kurang tepat. Keputusan penatalaksanaan klinis secara dini juga diharapkan akan memberi prognosis penyakit yang lebih baik dan dapat menurunkan mortalitas neonatus.

SIMPULAN

Pemeriksaan apusan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram cukup akurat untuk mendiagnosis sepsis neonatorum.

SARAN

Untuk menguji validitas hasil penelitian ini sebagai alat uji diagnostik sepsis neonatorum, perlu dilakukan penelitian tahap kedua berupa pemanfaatan uji diagnostik, yaitu penerapan klinis pemeriksaan

apsuan *buffy coat* dengan pewarnaan Gram terhadap sejumlah penderita sepsis neonatorum yang lain.

KEPUSTAKAAN

1. Gotoff SP, Infections of the neonatal infant. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson Textbook of Pediatrics, 16th edition, pp: 538-51. Philadelphia: WB Saunders, 2000.
2. Gomella TL, Cunningham MD, Eyal FG, Zenk KE. Infectious diseases. In: Neonatology: Management, procedures, on-call problems, diseases and drugs, 2th edition, pp: 333-9. East Norwalk, Paramount, 1994.
3. Edwards MS, Baker CJ. Sepsis in the newborn. In: Katz SL, Gershon AA, Hotez PJ, editors. Krugman's Infectious Disease of Children, 10th, pp: 415-28. Missouri: Mosby, 1998.
4. Yu VYH, Monintja HE. Infeksi sistemik pada neonatus. Beberapa masalah perawatan intensif neonatus. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1977.
5. Monintja HE. Investigations on the aetiology and antibiotic management of neonatal septicemia. Paediatrica Indonesiana 1988; 28:105-15.
6. Saraswathi K, Gogate A, Raghavan K. C-reactive protein and buffy coat smear in early diagnosis of childhood septicemia. Indian J Pathol Microbiol 1998; 41(1):23-6.
7. Faden HS. Early diagnosis of neonatal bacteremia by buffy coat examination. J Pediatr 1976; 88:1032-4.
8. Kumar Y, Qunibi M, Neal TJ, Yoxall CW. Time to positivity of neonatal blood cultures. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2001; 85:F182-6.
9. Garcia-Prats JA, Cooper TR, Schneider VF, Strager CE, Hansen TN. Rapid detection of microorganisms in blood cultures of newborn infants utilizing an automated blood culture system. Pediatrics 2000; 105:523-7.