



Smásjárskoðun blóðsýna nýbura

Forspárgildi fyrir klínískt greinda blóðsýkingu nýbura og samræmi í mati á forstigum daufkyrninga innan Blóðmeinafræðideildar LSH

Arna Óttarsdóttir

**Ritgerð til diplómaprófs
Háskóli Íslands
Læknadeild
Námsbraut í Lífeindafræði
Heilbrigðisvísindasvið**



HÁSKÓLI ÍSLANDS

Smásjárskoðun blóðsýna nýbura

Forspárgildi fyrir klínískt greinda blóðsýkingu nýbura og samræmi í mati á forstigum daufkyrninga innan Blóðmeinafræðideildar LSH

Arna Óttarsdóttir

Ritgerð til diplómaprófs á meistarastigi í Lífeindafræði

Umsjónarkennari: Martha Ásdís Hjálmarsdóttir

Leiðbeinendur: Brynjar Viðarsson

Rósa B. Jónsdóttir

Páll Torfi Öundurson

Læknadeild

Námsbraut í Lífeindafræði

Heilbrigðisvísindasvið Háskóla Íslands

Júní 2010

Ritgerð þessi er til diplómaprófs á meistarastigi í lífeindafræði og er óheimilt að afrita ritgerðina á nokkurn hátt nema með leyfi réttshafa.

© Arna Óttarsdóttir 2010

Prentun: Prentstofan Hvíta Örkin

Reykjavík, Ísland 2010

Ágrip

Aðal markmið þessarar rannsóknar var að kanna hvort smásjárskoðun blóðsýna nýbura segði til um mögulega blóðsýkingu hjá þeim. Athugað var hversu áreiðanleg smásjárskoðun sýnanna er með því að skoða niðurstöður þriggja lífeindafræðinga á LSH, m.a. til að sjá hvort nauðsynlegt sé að smásjárskoða þau utan dagvinnutíma. Þá voru niðurstöður CRP mælinga hjá nýburunum ásamt niðurstöðum úr Sysmex blóðhagstækinu skráðar og athugað hvort eitthvað af þeim gildum myndi hjálpa við greiningu á „sepsis syndrome“.

Í rannsókninni voru notuð 50 blóðstrokssýni. Stuðst var við nafnalista frá Sýklafræðideild LSH um nýbura sem höfðu verið teknar blóðræktanir af á ákveðnu áður skilgreindu tímabili. Þau 50 sýni sem voru valin voru með jákvæða blóðræktun, neikvæða blóðræktun („sepsis syndrome“) og svo sýni frá heilbrigðum nýburum til samanburðar. Tveir reyndir lífeindafræðingar ásamt nema skoðuðu þessi 50 sýni bæði í smásjá og í Cellavision án vitneskju um ástæðu blóðtökunnar eða niðurstöður hvors annars. Sérstaklega var horft á vinstri hneigð, toxískar granúlur, vacoulur, og Döhle korn. Tölfræðilegur samanburður var síðan gerður á samræmi mats á hverju blóðstroki meðal lífeindafræðinganna og hvort smásjárskoðunin segði eitthvað til um mögulega blóðsýkingu í nýburum. Einnig voru fyrri svör úr rannsóknarkerfi LSH fengin og borin saman við smásjárskoðunina. Niðurstöður úr Sysmex blóðhagsmælingunum og CRP gildi voru skráð og athugað hvort það hjálpaði til við greininguna. Þá var kannað hversu nákvæm smásjárskoðunin var og hversu mikill breytileiki væri á milli lífeindafræðingana í greiningu á stöfum. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi á milli vinstri hneigðar og toxískra breytinga var einnig athugað.

Helstu niðurstöður þessarar rannsóknar voru þær að greining á forstigum daufkyrninga er mjög mismunandi eftir lífeindafræðingum (inter-observer variability). Hins vegar var samræmi í talningu lífeindafræðinganna með öðrum tveimur mismunandi aðferðum (Cellavision og smásjá) gott (intra-observer variability). Samræmi er í talningu lífeindafræðinga og þegar Sysmex tækið er notað til að telja heildarfjölda daufkyrninga, sem segir til um góða aðgreiningu daufkyrninga frá öðrum hvítum blóðkornum. CRP gildi, auk talningar á heildarfjölda daufkyrninga, eitelfruma og einkyrninga úr Sysmex tækinu hjálpa lítið sem ekkert til við greiningu á mögulegri blóðsýkingu, þó svo að fjöldi daufkyrninga kæmist næst því að greina þar á milli. Heildarfjöldi hvíttra blóðkorna, blóðrauðamagn (hemóglóbín) og blóðflögutalning úr Sysmex tækinu hjálpar heldur ekki til við þessa greiningu. I:T og I:M stuðlar samkvæmt skilgreiningu Rodwell og Manroe hafa hvorki gott næmi né góða sértæki, og ekki er hægt að nota jákvætt eða neikvætt forspárgildi til að segja til um mögulega blóðsýkingu hjá nýburunum.

Rannsóknin leiddi í ljós að smásjárskoðun hjálpaði ekki til við greiningu á mögulegri blóðsýkingu eða „sepsis syndrome“ hjá nýburum þar sem allt of mikill munur var á talningu forstiga daufkyrninga. Þó svo að ómarktækur munur sé á deilitalningu með tveimur mismunandi aðferðum hjá hverjum lífeindafræðing fyrir sig (intra-observer variability) er munurinn á milli þeirra (inter-observer variability) óásættanlega mikill. Má því álykta að smásjárskoðun blóðstroka utan dagvinnutíma þegar misreyndir lífeindafræðingar sjá um skoðunina sé ekki hjálpleg við greiningu blóðsýkinga. Hins vegar er ljóst að setja þarf skýrari og markvissari reglur um mat á forstigum daufkyrninga á Blóðmeinafræðideild LSH.

Þakkir

Ég vil þakka leiðbeinendum mínum, þeim Brynjari Viðarssyni, Rósu B. Jónsdóttur og Páli Torfa Önundarsyni kærlega fyrir alla leiðsögnina. Þau veittu mér mikla aðstoð við alla vinnuna á bak við rannsóknina, ritgerðarskrifin og túlkun á niðurstöðum rannsóknarinnar. Einnig vil ég þakka Ragnheiði Laugu Jónsdóttur sérstaklega fyrir aðstoðina við rannsóknina. Karl G. Kristinssyni og Þórði Þórkelssyni vil ég þakka veitta aðstoð. Verkefnið var unnið á Blóðmeinafræðideild LSH. Vil ég þakka öllu starfsfólki Blóðmeinafræðideildarinnar LSH innilega fyrir alla hjálpsemina.

Efnisyfirlit

Ágrip	3
Þakkir.....	5
Efnisyfirlit	6
Myndaskrá	8
Töfluskrá.....	8
Listi yfir skammstafanir	10
1 Inngangur.....	11
1.1 Blóðsýking	11
1.1.1 Áhættuþættir	11
1.1.2 Klínísk greining	12
1.1.3 Önnur greining.....	12
1.2 Smásjárskoðun á blóði	13
1.2.1 Greining bakteríusýkinga í smásjá	13
1.3 Smásjárskoðun á blóðsýnum nýbura sem forspárgildi fyrir blóðsýkingu	14
1.4 C-reactive prótein (CRP)	17
1.5 Cellavision	17
1.6 Sysmex XE-5000 blóðhagstæki	18
2 Markmið	19
3 Efni og aðferðir	20
3.1 Deilitalning HBK.....	20
3.1.1 Sýni 20	
3.1.2 Sýnataka.....	20
3.1.3 Gerð blóðstroks	20
3.1.4 Framkvæmd á deilitalning á hvítum blóðkornum í smásjá.....	21
3.1.5 Framkvæmd á deilitalning á hvítum blóðkornum í Cellavision	24
3.2 C-reactive prótein	25
3.3 Blóðhagsdeilitalning.....	25
3.4 Forrit og skráning niðurstaðna.....	26
3.5 Tölfræði	27
3.6 Leyfi	27
4 Niðurstöður	28
4.1 Heildartaling daufkyrninga	29
4.2 C-reactive prótein mæling	30
4.3 Sysmex mælingar	30
4.4 Heildarfjöldi óþroskaðra daufkyrninga meðal lífeindafræðinga A, B og D.....	32
4.5 Óþroskaðir: heildarfjöldi daufkyrninga stuðull.....	33
4.6 Óþroskaðir: þroskaðir daufkyrninga stuðull	36

4.7	Heildarfjöldi óþroskaðra daufkyrninga meðal lífeindafræðinga A, B, D og einnig C	39
4.8	Rodwell flokkunarkerfi	41
4.9	Manroe flokkunarkerfi	43
4.10	Kynjahlutfall milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðra nýbura	44
5	Umræður.....	45
5.1	Heildartalning daufkyrninga	45
5.2	C-reactive prótein mæling	45
5.3	Systemex mælingar	45
5.4	Heildarfjöldi óþroskaðra daufkyrninga meðal lífeindafræðinga A, B og D.....	46
5.5	Óþroskaðir: heildarfjöldi daufkyrninga stuðull (I:T).....	46
5.6	Óþroskaðir: þroskaðir daufkyrninga stuðull (I:M).....	47
5.7	Heildarfjöldi óþroskaðra daufkyrninga meðal lífeindafræðinga A,B, D og einnig C.	47
5.8	Rodwell flokkunarkerfi	47
5.9	Manroe flokkunarkerfi	48
5.10	Kynjahlutfall á milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðra nýbura	48
5.11	Takmarkanir og næstu skref.....	48
6	Ályktanir	49
7	Heimildaskrá.....	50
	Fylgiskjöl.....	52

Myndaskrá

Mynd 1. Daufkyrningur og forstíg hans	14
Mynd 2. Breytingar sem geta fundist í HBK í bakteríusýkingum	14
Mynd 3. Hvít blóðkorn á CellaVision	17
Mynd 4. Gott blóðstrok og mjög lélegt blóðstrok	21
Mynd 5. Blóðstrok-of þétt svæði og of þunnt svæði	22
Mynd 6. Blóðstrok-rétt valinn staður	22
Mynd 7. Heildartalning daufkyrninga	29
Mynd 8. Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga í Cellavision og í smásjá	32
Mynd 9. Óproskaðir: heildarfjöldi daufkyrninga stuðull	33
Mynd 10. Óproskaðir: þroskaðir daufkyrninga stuðull	36
Mynd 11. Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga í Cellavision	39
Mynd 12. Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga í smásjá	40
Mynd 13. Rodwell flokkunarkerfi (Rodwell neonatal sepsis-scoring system)	41
Mynd 14. Manroe flokkunarkerfi (Manroe neonatal sepsis-scoring system)	43

Töfluskrá

Tafla 1. APGAR stigun nýbura	12
Tafla 2. Rodwell kvarðinn	15
Tafla 3. Manroe, Rodwell og Spector kvarðar	15
Tafla 4. Blóðstrok er varða rauð blóðkorn	22
Tafla 5. Blóðstrok er varða hvít blóðkorn	23
Tafla 6. Viðmiðunarmörk fyrir deilitalningu HBK á nýburasýnum	24
Tafla 7. Viðmiðunarmörk blóðhags	26
Tafla 8. Meðaltal og miðgildi CRP gilda	30
Tafla 9. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi CRP gildsins	30
Tafla 10. Meðaltal og miðgildi ANC, ALC og AMC	30
Tafla 11. Meðaltal og miðgildi HBK, Hb og Bfl	31
Tafla 12. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins A í Cellavision	34
Tafla 13. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins B í Cellavision	34
Tafla 14. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins D í Cellavision	34
Tafla 15. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins A í smásjá	35
Tafla 16. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins B í smásjá	35
Tafla 17. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins D í smásjá	35
Tafla 18. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins A í Cellavision	37
Tafla 19. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins B í Cellavision	37
Tafla 20. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins D í Cellavision	37

Tafla 21. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins A í smásjá.....	38
Tafla 22. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins B í smásjá.....	38
Tafla 23. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins D í smásjá.....	38
Tafla 24. Meðaltal og miðgildi Rodwell stuðulsins í Cellavision	42
Tafla 25. Meðaltal og miðgildi Rodwell stuðulsins í smásjá	42
Tafla 26. Meðaltal og miðgildi Manroe stuðulsins í Cellavision.....	44
Tafla 27. Meðaltal og miðgildi Manroe stuðulsins í smásjá.....	44
Tafla 28. „Sepsis syndrome“ og heilbrigðir eftir kyni.	44

Listi yfir skammstafanir

HBK: Hvít blóðkorn

RBK: Rauð blóðkorn

CRP: C-reactive prótein

KNS: Kóagúlasa neikvæðir stafýlókokkar

RNA: Ríbósakjarnsýra (Ribonucleic acid)

PMN: Kleyfkjarnar (Polymorphonuclear)

CBC: Heildartalning blóðkorna (Complete blood count)

GBS: Grúppu B streptókokkar (Group B streptococcus)

HSS: Flokkunarkerfi (Hematological scoring system)

DNA: Deoxýríbósakjarnsýra (Deoxyribonucleic acid)

LSH: Landspítali háskólasjúkrahús

HCT: Hematocrit

MCH: Mean corpuscular hemoglobin

MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration

PI: Propidium iodide

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ANC: Absolute neutrophil count

ALC: Absolute lymphocyte count

AMC: Absolute monocyte count

AEC: Absolute eosinophil count

ABC: Absolute basophil count

WBC: Hvít blóðkorn (White blood cell)

Abn: Afbrigðilegt (Abnormal)

NRBC: Kyrnd rauð blóðkorn (Nucleated Red Blood Cells)

IG: Immature granulation

CV: Cellavision

Ss: Sepsis syndrome

1 Inngangur

1.1 Blóðsýking

Sýklasótt (septicemia) er alvarleg bakteríusýking í blóði. Sýklasótt hjá nýburum, skilgreind sem blóðsýking hjá börnum á fyrsta mánuði lífs, er sérstaklega alvarleg og fylgir henni há dánartíðni (1-4). Sýklasótt lýsir sér oft sem klínískt ástand sem erfitt er að staðfesta með jákvæðum blóðræktunum. Eru þær oft neikvæðar þó að um klínískt ástand sýklasóttar sé að ræða og er það ástand kallað heilkenni sýklasóttar (sepsis syndrome) (5). Tíðni staðfesta blóðsýkinga á Íslandi á árunum 1976-1995 var tvö af hverjum 1000 lifandi fæddum börnum (4). Mun fleiri nýburar eru samt grunaðir um blóðsýkingu og eru meðhöndlaðir með sýklalyfjum.

Sýklasótt hjá nýburum er skipt í þrjá flokka.

Talað er um snemmkominn sjúkdóm ef hann kemur fram á fyrstu 5-7 dögum eftir fæðingu. Þetta er vanalega svæsinn fjölþátta sjúkdómur með áberandi öndunarerfiðleikum. Uppruni sýkingarinnar er yfirleitt frá kynfærum móðurinnar og smitast við fæðingu (1, 5).

Seinkominn sjúkdómur er skilgreindur sem sýking eftir þessa fyrstu 5-7 daga. Flest þessara barna eru með heilahimnubólgu ásamt blóðsýkingu og er sýkingin oft tilkomin vegna smits frá fæðingarvegi móðurinnar en einnig eftir snertingu frá öðrum manneskjum eða frá menguðum hlutum (1, 5).

Að lokum er talað um spítalasýkingar. Þær koma oftast upp hjá ónæmisbældum nýburum eins og fyrirburum eða nýburum með undirliggjandi sjúkdóma. Oftast er um að ræða tækifærissýkla úr umhverfinu (1, 5).

1.1.1 Áhættuþættir

Sýklasótt er bæði algengari og hættulegri í nýburum en í öðrum aldursflokkum og eru orsakir þess margþátta. Ónæmiskerfi nýbura er vanþroskað og þarf bæði tíma og áreiti til að þroskast. Líkami fósturs verður t.d. ekki fyrir því áreiti sem hann þarf á að halda í móðurkviði til að mynda varnir í formi mótefna (6). Fyrirburafæðing er ein algengasta ástæða sýklasóttar þar sem m.a. lág fæðingarþyngd og sjúkdómsástand móðurinnar eru mikilvægir áhættuþættir. Margar ástæður geta hins vegar verið fyrir blóðsýkingu og er því skoðun og mat á nýburanum mikilvæg. Einnig þarf að meta ástand móður við fæðingu m.a. tímasetningu rofs á belghimnu, hita hjá móðurinni eða sýkingu (belghimnubólga, þvagfærasýking, leggangasýking, spangarsýking) eða önnur vandamál tengd fæðingunni sjálfri eins og ótímabærar hríðir, barnabikslitað (e.meconium) legvatn og lág APGAR stigun (< 6 við 5 mínútur) (tafla 1) (1, 7).

Aðrir áhættuþættir sýklasóttar hjá nýburum eru hiti við fæðingu, daufkyrningafæð, öndunaraðstoð, endurlífgun, önnur veikindi, meðfæddur galaktósadreyri, ýmsir ónæmisgallar og miltisleysi (1, 7). Drengir smitast einnig fjórum sinnum oftar en stúlkur þar sem genin sem stjórna mótefnaframleiðslunni eru staðsett á X-litning. Stúlkur hafa tvo X-litninga og eru þess vegna fyrri til við að framleiða mótefni en drengir (1, 6). Blóðsýking er einnig algengari í svörtum en hvítum nýburum en þetta mætti skýra með aukinni tíðni á ótímabæru rofi á belghimnu, hita hjá móður og lágri fæðingarþyngd. Lág þjóðfélagsstaða er þekktur áhættuþáttur er gæti m.a. skýrst af lægri fæðingarþyngd og auknum sýkingum í umhverfinu (1).

Tafla 1. APGAR stigun nýbura (8).

APGAR	0	1	2
Hjartsláttur	Enginn	Minna en 100	Meira en 100
Öndun	Engin	Hæg og óregluleg	Góð
Vöðvaspenna	Slök	Smáhreyfingar	Góðar hreyfingar
Litarháttur	Fölur eða blár	Búkur rauður	Rauður
Svar við ertingu	Ekkert	Grátur	Kröftugur grátur

Gefin eru stig á kvarðanum 0 til 10 í heildina, frá núll og upp að tveimur stigum fyrir hvern lið um sig, hjartslátt, öndun, vöðvaspennu, litarhátt og svar við ertingu. Núll er þá versta ástandið og tveir það besta fyrir hvern lið. Þetta er gert til að meta ástand nýbura fljótt og örugglega á skýran hátt sem er samkvæmt alþjóðlegum skilgreiningum (9).

1.1.2 Klínísk greining

Upphafsgreining sýklasóttar hjá nýburum er alltaf klínísk enda mikilvægt að hefja meðferð áður en niðurstöður blóðræktana liggja fyrir. Klínísk greining er hins vegar mjög erfið og oft er ekki hægt að setja hana með vissu þar sem einkenni og teikn um blóðsýkingu í nýburum eru oftast ósértæk. Einna algengast er að sjá hitsveiflur (skammvinnur ofurhiti eða kuldi 66% nýbura), hlé eða óreglu í andardrætti (55%) ásamt aukinni hjartsláttartíðni og sinnuleysi. Meltingartengd einkenni eru margvísleg eins og uppköst, niðurgangur, vanþrif (sýgur illa, þyngdartap) og þaninn kviður. Þá sést oft þjúgmyndun, blóðsykurslækkun eða hækkun, lélegt yfirborðsgegnumflæði húðar, blámi, skellumyndun, fölvi, punktblæðingar, útbrot, vefjahersli og gula (1, 6, 7).

1.1.3 Önnur greining

Greining á mögulegri blóðsýkingu nýbura verður að byrja með vandlegu mati á klínískum einkennum og teiknum (7). Þar sem staðfesting á blóðsýkingu úr blóðræktun tekur að minnsta kosti 24-72 klst og getur þá verið of seint að hefja sýklalyfjameðferð (3, 5, 10, 11).

Ef grunur er um sýklasótt þarf að taka ræktanir frá nýburanum, m.a. blóðræktanir og aðrar þær ræktanir sem klínísk skoðun segir til um (hráki, þvag, mænuvökvi o.s.frv.). Sýklasótt er svo staðfest með jákvæðum blóðræktunum. Margt getur haft áhrif á niðurstöður ræktana, m.a. sýklalyf sem móðirin fær fyrir fæðinguna, erfiðleika við að fá gott sýni og suma sýkla er erfitt að rækta og einangra (1, 3, 5, 7, 11). Í rannsókn um blóðsýkingar barna á Íslandi sem birt var í læknablaðinu árið 1997 var rætt um erfiðleika þess að taka blóð úr nýburum með sérstöku tilliti til þeirrar hættu sem fylgdi því að sýnið mengist. Oft var notast við ræktanir frá æðaleggjum þrátt fyrir aukna tíðni bakteríumengunar. Kóagúlasa neikvæðir stafylókokkar (KNS) ræktuðust oftast úr blóðræktunum hjá börnum á fyrsta aldursári, en var það talið vera líkleg mengun í 91,8% tilfella. Þó er hlutfall KNS sýkinga að aukast á Íslandi sem gæti tengst auknum fjölda aðgerða og notkun æðaleggja og tækja til lækninga. Meðferð

fyrirbura er mun betri en áður og eykur það ef til vill fjölda KNS sýkinga í tengslum við æðaleggi og tækjanotkun sem fylgja fullkomnari meðferðum (12).

Hægt er að styðjast við aðrar greiningaraðferðir t.d. mótéfnisvakapróf fyrir grúppu B streptókokka, *Neisseria meningitidis*, *Hemophilus influenzae* og *Streptococcus pneumoniae*. Þvag og mænuvökvi eru þeir vökvar sem eru venjulega notaðir í þessi próf. Mikilvægt er að gera sér grein fyrir að þetta er aðeins aðstoðartæki við greiningu á alvarlegri sýkingu eins og blóðsýkingu en ekki lokagreining (1).

Rannsóknir hafa bent til þess að heildarfjöldi og deilitalning hvítra blóðkorna geti hjálpað til við greiningu blóðsýkingar. Hlutfall yngri og minna þroskaðra daufkyrninga (neutrophila) af heildarfjölda þeirra hefur reynst hafa gott forspárgildi fyrir blóðsýkingu (2, 13). Mjög margt hefur hins vegar áhrif á fjölda daufkyrninga og skiptingu þeirra í undirflokk, bæði hjá móður (hiti, hár blóðþrýstingur, o.fl.) hjá nýburanum (súrefnisskortur, barnabiks ásvelgning, loftbrjóst, o.fl.) (1, 5, 7) og sömuleiðis er sundurgreining þeirra á rannsóknarstofum háð ákveðnum annmörkum. Nánar er fjallað um þetta í kaflanum um smásjárskoðun á blóðsýnum frá nýburum.

Samkvæmt nokkrum rannsóknum hefur fækkun á blóðflögum sést hjá nýburum með blóðsýkingu en er það talið koma bæði seint fram og vera mjög ósértækt (1, 3, 14).

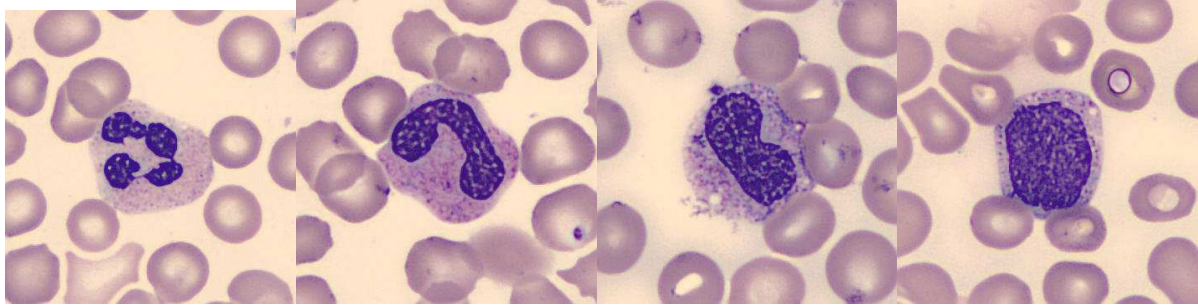
Ýmis önnur efni sem hægt er að mæla í blóðþrúfum hafa verið notuð í þessum sama tilgangi, m.a. „akút fasa“ hvarfefni. Þau eru flókin margþátta virkur flokkur efna sem samanstanda m.a. af komplement frumþáttum, storkupróteinum, próteasa hemlum og C-reactive próteini (CRP). Styrkur akút fasa efna hækka í sermi í tengslum við vefjaskemmdir. Niðurstöður mælinga á CRP, sökkhraða rauðra blóðkorna, cytokín IL-1 β , IL_6 og TNF og óeðlilegar niðurstöður fyrir bilirúbín, glúkósa og natríum hafa í viðeigandi klínískum aðstæðum aðstoðað við greiningu á blóðsýkingu í nýburum (1).

1.2 Smásjárskoðun á blóði

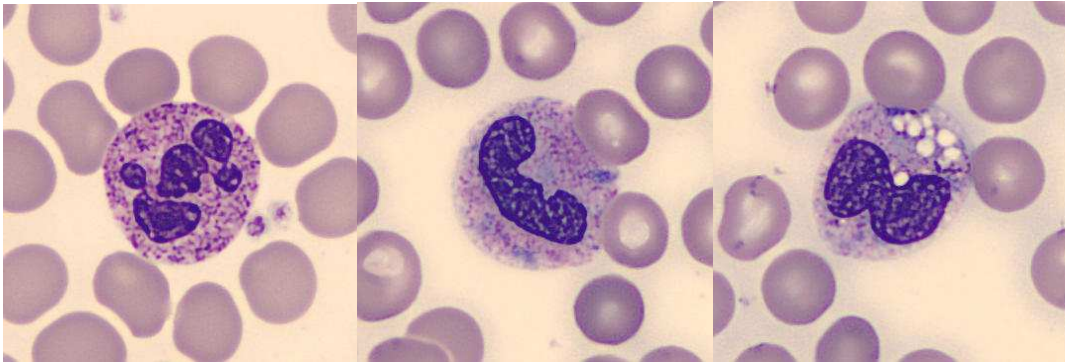
Smásjárskoðun á blóði er gerð bæði til að greina blóðsjúkdóma og einnig til að veita upplýsingar um ýmsa aðra sjúkdóma. Skoðun blóðstroks hjálpar m.a. til við að meta meðferð sjúklinga, bæði verkun og aukaverkanir lyfjameðferða. Blóðstrokið þarf þess vegna að vera rétt meðhöndlað og skoðað með það að markmiði að lækni geti túlkað niðurstöðurnar (15).

1.2.1 Greining bakteríusýkinga í smásjá

Daufkyrningar eyða sumum örverum m.a. sýklum sem koma inn í blóðrásina. Auk fjölgunar daufkyrninga (neutrophila) í blóðrás frá beinmerg fer hann að sleppa þeim út fyrr og minna þroskuðum. Kallast þetta vinstri hneigð. Stafir verða áberandi svo og metamyelocytar og myelocytar (mynd 1). Útlit daufkyrninga breytist líka. Aukning verður á dökkum kornum (toxískar granúlur), ásamt holum (vacuolum sem eru phagosom) og Döhle kroppar korn koma fram í umfrymi (mynd 2). Kornin eru rauðleitari og dekkri en áður og kallast forkorn (primer granúlur), þau fyrstu sem við sjáum í þroska frumnanna. Þessum breytingum fylgir oft blá slæða í umfryminu sem er kallað Döhle korn. eru þau gerð af þráðum af endoplasmic reticulum sem hafa safnast saman og mynda þennan bláma (RNA). Loftbólurnar í umfryminu myndast vegna þess að fruman er virk og er að eyða óvelkomnum örverum. Stundum er hægt að sjá örverurnar inni í vacuolum (16).



Mynd 1. Daufkyrningur og forstíg hans. Eðlilegur daufkyrningur, stafur, metamyelocyte og myelocyte (17).



Mynd 2. Breytingar sem geta fundist í HBK í bakteríusýkingum. Toxískar granúlur, Döhle korn og Vacuolur (17).

1.3 Smásjárskoðun á blóðsýnum nýbura sem forspárgildi fyrir blóðsýkingu

Smásjárskoðun blóðstroka er bæði tímafrek og erfið og þarfnast oft talsverðar túlkunar sem þjálfun og reynsla leyfir. Mismunandi mat á deilitalningu hvítra blóðkorna, einkum sundurgreining stafa frá þroskuðum daufkyrningum, hefur því dregið í efa gildi smásjárskoðunar sem tækis í mati á mögulegri blóðsýkingu. Vant og vel þjáfað starfsfólk metur blóðkornamynd sama sýnis mismunandi, og á það bæði við um mismunandi starfsmenn (inter-observer variability) og einnig ef sama sýnið er skoðað af sama einstaklingi með ákveðnu millibili (intra-observer variability). Sem dæmi um þessa skekkju meta samtök líffærameinafræðinga í Bandaríkjunum (the College of American Pathologists) ekki lengur kunnáttu í aðgreiningu á stöfum og meira þroskuðum daufkyrningum, og er það byggt á slægri aðgreiningu þessara frumuhópa hjá stórum hópi blóðmeinafræðinga (5).

Margt annað en sýking hefur áhrif á fjölda, útlit og deilitalningu HBK. Mikið álag á fóstrið getur t.d. aukið fjölda stafa í blóði (18) og líkamleg áhrif sýnatökunnar geta leitt til dramatískra breytinga í heildartalningu á HBK. Aldur nýburans, sýnataka úr slagæð eða bláæð og það hvort nýburinn gráti kröftuglega eða ekki getur haft áhrif á blóðhag (5).

Skiptar skoðanir eru því á nauðsyn og gildi smásjárskoðunar sem mælikvarða á mögulega blóðsýkingu og þá sérstaklega hjá nýburum. Hafa margar rannsóknir verið gerðar á því efni. Í þessum rannsóknum hefur aðallega verið horft á hlutfallið milli óþroskaðra daufkyrninga og heildar fjölda þeirra, svokallaðan I:T stuðull (immature: total neutrophil count). Aðrir þættir, eins og blóðhagur (CBC-complete blood count) og CRP, hafa einnig verið athugaðir.

Mismunandi flokkunarkerfi (HSS-hematological scoring system) til að spá fyrir um mögulega sýklasótt hjá nýburum hafa þróast út frá þessum rannsóknum og eru þau helstu kennd við Rodwell, Manroe og Spector (2).

Tafla 2. Rodwell kvarðinn. Kvarði (score) til notkunar í flokkunarkerfum (13).

Viðmiðun	Afbrigðileiki	Kvarði
I:T stuðull	↑ hækkun	1
Heildar PMN (polymorphonuclear) talning	↓ lækkun eða ↑ hækkun	1
I:M stuðull	≥ 0.3	1
Óproskuð PMN talning	↑ hækkun	1
Heildar HBK talning	↑ eða ↓ ($\leq 5000/\text{mm}^3$ eða $\geq 25\ 000$, 30 000 og 21 000 við fæðingu, 12-24 klst og 2 dagar áfram hver af öðrum	1
Blóðflögutalning	$\leq 1,50,000/\text{mm}^3$	1
Hrönnunarbreytingar í PMN	≥ 3 + fyrir vacuolur, toxískar granúlur eða Döhle korn	1

Tafla 3. Manroe, Rodwell og Spector kvarðar. Skilmerki notuð til ákvörðunar á líkum blóðsýkingar (Criteria used in neonatal sepsis-scoring systems) (2).

Manroe; 2 eða fleiri af eftirfarandi:

Óproskaðir: heildar daufkyrninga stuðull $>0,16$

Heildar daufkyrninga talning <7500 eða $>14\ 500/\text{mm}^3$

Óproskaðir daufkyrningar talning $>1400/\text{mm}^3$

Rodwell; 3 eða fleiri af eftirfarandi:

Óproskaðir: heildar daufkyrninga stuðull $>0,16$

Heildar daufkyrninga talning <7500 or $>14\ 500/\text{mm}^3$

Óproskaðir: þroskaðir daufkyrningar stuðull $\geq 0,30$

Óproskaðir daufkyrningar talning $>1400/\text{mm}^3$

Heildar HBK talning ≤ 5000 eða $\geq 25\ 000/\text{mm}^3$ við fæðingu

Heildar HBK talning ≤ 5000 eða $\geq 30\ 000/\text{mm}^3$ við 12-24 klst

Hrönnunarbreytingar í daufkyrningum

Blóðflögutalning $\leq 150\ 000/\text{mm}^3$

Spector; 3 eða fleiri af eftirfarandi:

≥ 2 einkenni í tengslum við klínískt mat

HBK talning $<10\,000$ eða $\geq 20\,000/\text{mm}^3$

Heildar daufkyrningar $<1000/\text{mm}^3$

Óþroskaðir: þroskaðir daufkyrningar stuðull $\geq 0,10$

Aldur >1 vika

Í amerískri rannsókn, sem stóð í þrjú ár (1996-1999) og var gerð á 1665 nýburum sem uppfylltu skilyrði þess að vera í áhættuhóp fyrir blóðsýkingu kom í ljós að CBC bætir lítið við klíniska skoðun í að greina og hafa stjórn á snemmkominni blóðsýkingu í einkennalausum nýburum (19).

Í ástralískri rannsókn sem var gerð á 1000 nýburum á einu ári (1988-1989) var hins vegar notast við aðferð Manroe í deilitalningu og greiningu á HBK og flokkunarkerfi (hematological scoring system, HSS) samkvæmt aðferð Rodwell (sjá töflu 2). Þar var ályktað að HSS eða I:T stuðull í bland við klíniska greiningu séu mikilvæg töl í upphafsgreiningu á blóðsýkingum í nýburum með daufkyrningafæð. Hjá nýburum með daufkyrningafæð og klínísk einkenni um blóðsýkingu eykur HSS ≥ 3 eða hækkun á I:T stuðli líkur á því að blóðsýking sé til staðar (13).

Í annarri rannsókn frá árinu 2001 á 150 nýburum með klínískan grun um blóðsýkingu var einnig notast við HSS aðferð Rodwell. Þeirra ályktun var sú að heildar HBK deilitalning hjálpi lítið við greiningu á þessum sýkingum vegna mikils breytileika og skörunar á eðlilegum og óeðlilegum gildum. Samt sem áður væri nákvæm blóðkornatalning auðveld í framkvæmd og þegar hún væri rétt túlkuð ásamt deilitalningu gæti hún hjálpað til við greiningu blóðsýkinga hjá nýburum. Að auki töldu höfundarnir að blóðflögufæð gæti gefið til kynna mögulega blóðsýkingu og lögðu til gildið $< 150 \times 10^9/\text{L}$ sem mögulegan skimunarmæli á blóðsýkingu (3).

Rannsókn á 19 nýburum með greinda blóðsýkingu af völdum keðjusýkla (GBS- group B streptococcus) og 33 nýburum án sýkingar til samanburðar, studdist við hin þrjú stigunarkerfi Manroe, Rodwell og Spector (tafla 3). Blóð var tekið 1-7 klst eftir fæðingu og svo aftur 12-24 klst frá fæðingu. Í fyrra sýninu voru 32-69% af sýktum nýburum með eðlilega HBK deilitalningu miðað við stigunarkerfin þrjú. Þegar aftur á móti deilitalningin var endurtekin eftir 12-24 klst misstu stigunarkerfi Manroe eða Rodwell ekki af neinum sýktum nýbura. Virtist sem mikilvægasti tímaháði þáttur smásjárskoðunarinnar væri I:T stuðullinn, sem hækkaði mikið í sýktum nýburum. Ósýktir nýburar sýndu ekki tímaháða aukningu á I:T stuðli og hélst hún innan eðlilegra marka með teknu tilliti til aldurs (2). Upphafstalning á fjölda og deilitalning hvítra blóðkorna getur því verið eðlileg í mjög alvarlega sýktum nýburum. Önnur rannsókn frá 1985 á fjórum nýburum með blóðsýkingu sýndi einnig að heildar deilitalning á HBK geti verið eðlileg fyrstu klukkustundirnar (20).

Í indverskri rannsókn frá árinu 1999 á 105 nýburum með klínískan grun um blóðsýkingu var stuðst við aðferð Rodwell við deilitalningu á HBK. Þeirra niðurstaða var að I:T stuðull og I:M stuðull (óþroskaðir daufkyrningar sem hlutfall af þroskuðum daufkyrningum) voru næmastir til greiningar nýbura með blóðsýkingu. Ef stuðlarnir voru lágir og blóðflögufæð ekki til staðar var neikvætt forspárgildi yfir 94%. Rannsóknin sýndi einnig að því hærrí sem stuðlarnir væru því meiri líkur voru á blóðsýkingu. Þeirra niðurstaða var að stigunarkerfi væri einföld, fljótleg, ódýr og góð aðferð í snemmgreiningu blóðsýkinga í nýburum og gæti aðstoðað við ákvörðun sýklalyfjameðferða (14).

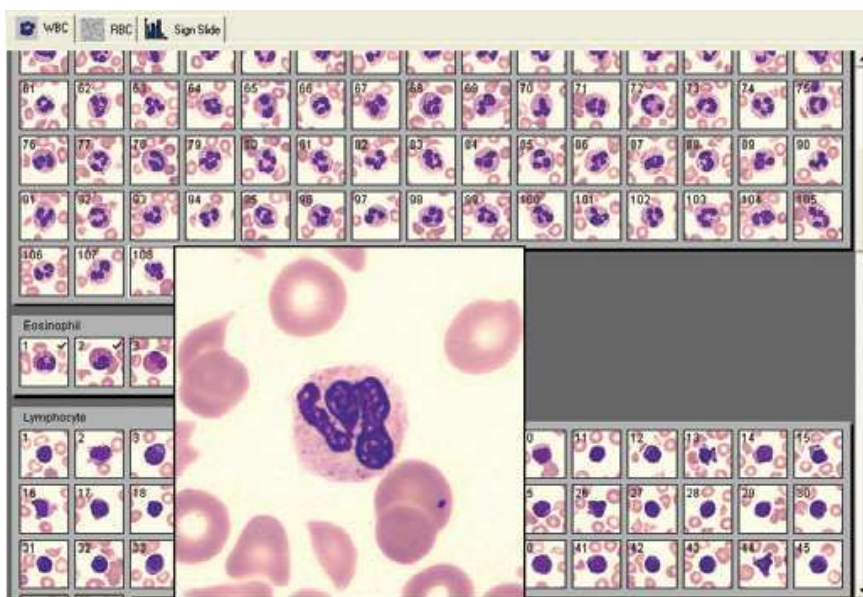
1.4 C-reactive prótein (CRP)

C-reactive prótein (akút fasa prótein) er þekkt prótein í blóðvökva sem framleitt er í lifur og hækkar við bráða bólgu. Vefjaskemmdir vegna sýkinga, áverka eða annarra bólguvaldandi sjúkdóma, hækka CRP allt að 1000 falt. Hækkun CRP endurspeglar umfang vefjaskemmdarinnar og getur sagt til um gang undirliggjandi sjúkdóms (21, 22).

Nýlegar greinar benda til að CRP geti hjálpað til við að greina ósýkta nýbura frá sýktum og þannig dregið úr sýklalyfjameðferðum. Eðlilegar CRP niðurstöður virðast hafa mjög gott neikvætt forspárgildi (96-99,7%) en aftur á móti lélegt næmi (35-40%). Segir CRP hækkun því lítið til um það hvort blóðsýking sé til staðar eða ekki. Hins vegar kom í ljós að CRP mæling hefur enga yfirburði yfir mat á HBK blóðmyndinni hvorki ein og sér né með HBK talningu (3, 10).

1.5 Cellavision

Cellavision DM96 er nýleg tölvutengd smásjá sem skannar með myndavél blóðstrok í lítilli stækkun til að bera kennsl á hvít blóðkorn og tekur stafrænar myndir af þeim í mikilli stækkun. Myndirnar eru síðan bornar saman við áður skilgreindan gangabanka af mismunandi frumum og þær síðan aðgreindar með hjálp tölvutækni. Myndir af frumuhópum birtast á tölvuskjá til frekari aðgreiningar, fínflokunar og að lokun staðfestingar (mynd 7). Cellavision leyfir einnig mat á rauðum blóðkornum og blóðflögum. Þessi nýja tækni hefur leitt af sér tímasparnað og aukin gæði í smásjárskoðun í samanburði við hefðbundna smásjárskoðun. Nú er hægt að geyma sýnið á rafrænu formi og jafnvel tengja það við rafræna sjúkraskrá einstaklinga í framtíðinni eða senda til sérfræðings. Þá geta menn einnig komið saman og skoðað sömu frumurnar sem ætti að leiða til aukinnar nákvæmni og meiri áreiðanleika á mati blóðkorna. Þó að nákvæmni Cellavision við undirflokkun HBK sé góð þarf þó alltaf sérfróðan lífeindafræðing til að fara yfir flokkunina, endurflokka og samþykkja (23, 24).



Mynd 3. Hvít blóðkorn á CellaVision. Fyrirframflokkuð hvít blóðkorn eins og þau birtast á tölvuskjá CellaVision DM96 (23).

1.6 Sysmex XE-5000 blóðhagstæki

Blóðhagur er mældur með blóðhagsmælum (hematology analyser) og á Blóðmeinafræðideild LSH er notast við Sysmex XE-5000 tækið. Blóðhagsmæling er mjög hjálpleg við að greina blóðsjúkdóma eða sjúkdóma í öðrum líffærum vegna þeirra breytinga sem verða í blóði.

Tækið telur og mælir blóðkorn með mismunandi hætti, flokkar og sundurgreinir. Það styðst við viðnámsmælingar (talning fruma, stærð) og ljósbrotsmælingar (blóðrauði, korn í umfrymi). Margar fleiri stærðir í mati á rauðum blóðkornum eru síðan afleiddar (reiknaðar) út frá hinum mældu stærðum (HCT, MCH, MCHC) (25).

Sysmex XE-5000 hefur fremur fullkomið aðvörunarkerfi (flögg) sem var þróað til að þekkja óeðlilegar frumur í HBK deilitalningu. Sex stillanleg flögg eru til staðar til að greina blasta, óþroskuð HBK, vinstri hneigð, rauð blóðkorn með kjarna, óvenjulegar (atýpískar) eitilfrumur og blóðflögukekkjun. Nokkrar rannsóknir hafa verið gerðar til að meta áreiðanleika og næmi tækjatalningar samanborið við gullstikuna (gold standard) sem er smásjárskoðun með deilitalningu. Ein rannsókn bar saman Sysmex flögg fyrir óeðlilegar frumur í blóðhag miðað við 100 frumur HBK deilitalningu í smásjá. Alls voru 1,153 sýni skoðuð, og fannst fullt samræmi milli aðferðanna í 90,8% tilfella, hálf samræmi í 5,2% tilfella, falskt jákvæð dreifing í 1,6% tilfella og formfræðilega (morphological) falskt eðlileg 4,6%. Því fleiri flögg sem voru notuð þeim mun færri óeðlileg sýni sluppu óskoðuð í gegn (falskt neikvætt). Fleiri flöggum og strangari skilmerkjum fylgir hins vegar mikið meiri vinna við smásjárskoðun þar sem mun meira af eðlilegum sýnum fá á sig óþarfa flögg (falsk jákvætt) (26).

Samanburðarrannsókn, á 240 sýnum frá börnum á aldrinum 1 mánaðar til 14 ára (45% illkynja sjúkdóma) á flöggum blóðhagsmæla (eldri tæki og ekki eins næm: Coulter STKS og Sysmex NE-1500) og hefðbundinni smásjárskoðun, leiddi í ljós óásættanlega lélegt næmi tækjanna. Virtust tækin greina mjög vel þroskuð hvít blóðkorn en illa óþroskuð hvít blóðkorn. Í viðbótarrannsókn sem var aðeins gerð á nýburasýnum þar sem 80% voru fyrirburar, var einnig takmarkað næmi fyrir greiningu erythroblasta. Niðurstaðan var því sú að aukinn fjöldi af óeðlilegum frumum og mjög takmarkað næmi tækjanna til greiningar þeirra þýddi smásjárskoðun allra nýburasýna (27).

Það er óhætt að breyta afmörkunargildunum flagga á Sysmex. Þetta getur leyft rannsóknarstofum að minnka mikið þau tilfelli sem þarf að smásjárskoða og deilitelja hvít blóðkorn, sem leiðir til skilvirkari aðferða og sparnaðar á vinnuafli (28). Niðurstöður undirstrika enn fremur mikilvægi þess að hafa gagnrýna túlkun á sjálfvirkum deilitalningartækjum, vegna greiningartakmörkunar ($\geq 1\%$ óeðlileg HBK $> 20\%$ sýnanna ekki rétt flögguð af neinum af tækjunum) (29).

2 Markmið

Markmið þessarar rannsóknar var að kanna hvort smásjárskoðun blóðsýna nýbura segði til um mögulega blóðsýkingu í þeim. Athugað var hversu áreiðanleg smásjárskoðun sýnanna er með því að skoða niðurstöður þriggja lífeindafræðinga á LSH, m.a. til að sjá hvort nauðsynlegt sé að smásjárskoða þau utan dagvinnutíma. Þá voru niðurstöður CRP mælinga hjá nýburum ásamt niðurstöðum úr Sysmex blóðhagstækinu skráðar og athugað hvort eitthvað af þeim gildum myndi hjálpa til við greiningu blóðsýkinga.

3 Efni og aðferðir

3.1 Deilitalning HBK

3.1.1 Sýni

375 sýnum frá vökudeild LSH á tímabilinu 15. desember 2009 til 5. mars 2010 var safnað og þau smásjárskoðuð. Listi var fenginn frá Sýklafræðideild LSH um blóðræktanir nýbura á sama tímabili, en gengið var út frá því að nýburar sem væru grunaðir um blóðsýkingu hefðu verið teknar blóðræktanir af. Í rannsókninni var síðan valinn 50 sýna hópur sem var skipt í þrjá hópa, einn með jákvæða blóðræktun (fjórir nýburar), annan með mögulega blóðsýkingu en neikvæðar blóðræktanir (klínískt sepsis syndrome) (31 nýburi) og svo heilbrigðir nýburar til samanburðar (15 nýburar). Tveir reyndir lífeindafræðingar ásamt nema skoðuðu þessi 50 sýni bæði í smásjá og Cellavision án vitneskju um ástæðu blóðtökunnar eða niðurstöður hvors annars. Sérstaklega var horft á vinstri hneigð, toxískar granúlur, vacoulur, og Döhle korn. Tölfræðilegur samanburður var gerður á samræmi mats á hverju blóðstroki meðal lífeindafræðinganna og hvort smásjárskoðunin segði eitthvað til um mögulega blóðsýkingu í nýburum. Einnig voru fyrri svör úr rannsóknarstofukerfi LSH (FlexLab) skráð og borin saman við niðurstöður smásjárskoðunarinnar. Niðurstöður úr Sysmex blóðhagsmælingunum og CRP gildi voru skráð og athugað hvort það hjálpaði til við greininguna. Kannað var hversu nákvæm smásjárskoðunin var og hversu mikill breytileiki væri á milli lífeindafræðinga í greiningu á stöfum (inter-observer variability) sem og breytileiki í talningu hjá sama lífeindafræðing á sama sýni með tveimur mismunandi aðferðum (intra-observer variability). Næmi, sértækni, jákvætt og neikvætt forspárgildi á milli vinstri hneigðar og toxískra breytingar var einnig athugað.

3.1.2 Sýnataka

Sýni úr nýburum á vökudeild er yfirleitt tekið úr bláæð í míkroglas með EDTA storkuvara. Þegar blóð er tekið í EDTA glas þarf það að berast rannsóknarstofunni innan tveggja klukkustunda frá sýnatöku því eftir það breytast blóðkornin í glasinu. Rauðu blóðkornin verða tennt og að lokun hringlaga og kjarnar hvítu blóðkornana verða einsleitari og þeir skiljast að, ásamt því að jaðrar hvítu blóðkornanna verða óljósari og vacoulur myndast í umfrymi.

3.1.3 Gerð blóðstroks

Fengin voru blóðstrok af nýburum sem höfðu verið strokið úr blóði úr EDTA glasi sem barst á rannsóknarstofuna á tímabilinu.

Blóðstrok var gert með HemaPrep® blóðstrokstæki sem er stöðluð aðferð við gerð blóðstroks í stað handstroks með ákveðinni lengd, þykkt og breidd. Smásjargler er sett í slæðuhaldarann og er möttu hliðinni á glerinu snúið upp og á móti fremri hliðinni á tækinu. Sett eru 5-6 µl af fersku EDTA blóði á glerið á ákveðið svæði sem er skilgreint með svartri doppu á tækinu sem sést í gegnum smásjarglerið. Blóðdropinn ætti að vera settur nákvæmlega fyrir ofan þessa doppu og ætti að vera svipaður í þvermál og doppan. Ýtt á takkann framan á tækinu með staðfastri en mjúklegrri hreyfingu. Þegar takkanum hefur verið ýtt alveg niður er honum sleppt snögglega. Dreifingarblöðin eru færð fram til að ná snertingu við blóðið. Eftir sjálfkrafa pásu, til að láta blóðið dreifast lágrétt, toga dreifingarblöðin blóðið varlega yfir glerið. Á þessari færslu er blóðinu dreift. Endinn á strokinu ætti að enda við 10mm - 30mm

frá endanum á glerinu. Hraði færslunnar á dreifingunni er ákveðinn með sérstakri viðmiðsstillingu og er sér stilling fyrir blóðsýni frá nýburum (30).

Stundum eru blóðstrokin gerð handvirkt en er það aðallega gert þegar illa gengur að strjúka með tækinu. Þá er dropa af vel blönduðu blóði látið miðlægt nálægt matta enda glersins. Strokglírið látið mynda 45° horn við glírið og dregið að blóðdropanum. Hann látinn renna út og storkglírinu strokið létt og snögg áfram (25). Blóðstrok úr blóðsýnum frá nýburum er oft erfitt að strjúka út vegna þess hversu hátt hemóglóbínið er og stundum er líka fita í sýninu. Mikilvægt er að vanda til þegar blóðdropanum er strokið á glírið. Taumar eftir glírinu skekkja dreifingu blóðkornanna. Blóðstrok sem er vel strokið og annað sem er illa strokið er sýnt á mynd 4.

Blóðstrokið er látið þorna, sett í ákveðna litunargrind sem er því næst sett ofan í festivökva með metanóli í 5 mínútur og litað með May-Grünwald í 5 mínútur og Giemsa litun í 15 mínútur. Í lokin er strokið skolað snögg 10 sinnum í köldu vatni. May-Grünwald liturinn inniheldur 200 ml af May-Grünwald lit og 200 ml af Nyfeldts fofatlausn (pH 6,5) og Giemsa liturinn inniheldur 40 ml af Giemsa lit og 400 ml af Nyfeldts fosfatupplausn (pH 6,5) og eru litirnir blandaðir daglega (31).



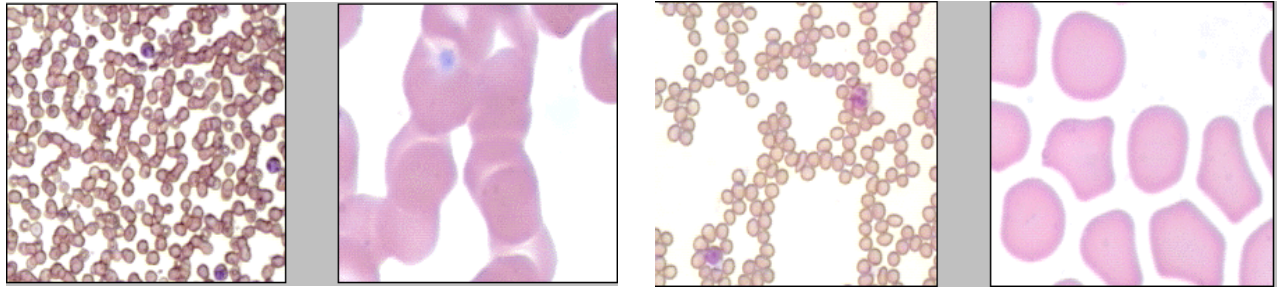
Mynd 4. Gott blóðstrok og mjög lélegt blóðstrok (32).

3.1.4 Framkvæmd á deilitalning á hvítum blóðkornum í smásjá

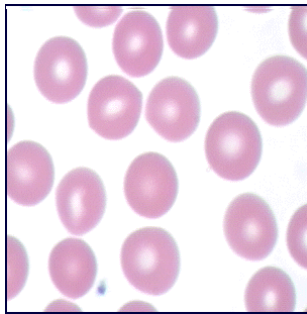
Blóðstrokið er skoðað eftir fyrirfram ákveðnum reglum. Við litla stækkun (10x) eru litunargæði blóðstroksins skoðuð, hversu góð dreifing er á frumunum á strokinu og athuga hvort það sé blóðflögukekkjun eða um ungar frumur að ræða. Blóðstrokið var skannað til að meta fjölda HBK og möguleg forstig.

Í 50x stækkun eru rauðu blóðkornin og blóðflögurnar greindar og fundið gott svæði til að deilitelja á. Er það oft nærri fjarðraðri brún (feathered edge) blóðstroksins. Á of þykku svæði mynda RBK stöfla (rouleaux), HBK verða einsleit og ekki er hægt að greina kjarna almennilega (mynd 5). Á of þunnu svæði missa RBK hins vegar einkenni og lögun, HBK verða teygð og toguð og kjarnar eyðileggjast (mynd 5). Á réttum stað eru RBK með miðjufólva c.a. 1/3 af heildar stærð og eru á stærð við kjarna í lítilli eitilfrumu (lymphocyte) (6-8 μ) (mynd 6). Rauða blóðkornamyndin er metin eftir stærð, lögun, hemóglóbín innihaldi, agna innan RBK, aldri, dreifingu á glíri og utanaðkomandi áhrifa. Útlit RBK er metið í 50x stækkun sem og blóðflögurnar. Í henni sést t.d. mismunandi stærð (anisocytosis), mismunandi lögun (poikilocytosis), vanrauðun (hypochromasia), netfrumur með bláma vegna RNA (polychromasia) o.s.frv (tafla 4). Kyrnd RBK (erythroblastar) eru talin og deilitalning HBK leiðrétt ef fleiri en 10 eru til staðar fyrir hver 100 HBK en það er aðeins gert ef engir erythroblastar koma frá Sysmex blóðhagstækinu en eru í tilstaðar í strokinu. Blóðflögurnar eru einnig metnar í þessari stækkun með tilliti til útlits og stærðar og talning gerð í 10 reitum (15).

Í 100x stækkun með olíu eru 100 HBK skoðuð og deilitalin, þ.e. afbrigðileiki þeirra greindur. Er þannig fundið út hlutfall undirflokka HBK, stafir, daufkyrningar (neutróphilar, ANC), rauðkyrningar (eosinophilar, AEC), blákyrningar (basophilar, ABC), eitilfrumur (lymphocytar, ALC), einkyrningar (monocytar, AMC). Óþroskaðri forstigi eru einnig skráð í deilitalningu 100 fruma eins og, metamyelocytar og myelocytar. Einnig eru skráðar breytingar HBK eins og vacuolur, Döhle korn og toxískar granúlur (tafla 5). Viðmiðunarmörk deilitalningar hvíttra blóðkorna í sýnum frá nýburum eru í töflu 6.



Mynd 5. Blóðstrok-af þétt svæði og of þunnt svæði (32).



Mynd 6. Blóðstrok-rétt valinn staður (32).

Rauða blóðkornamyndin er metin eftir stærð, lögun, hemóglóbín innihaldi, agna innan þeirra, aldri, dreifingu á gleri og utanaðkomandi áhrifum.

Tafla 4. Blóðstrok er varða rauð blóðkorn (25).

Stærð

Normocyte	Rauð blóðkorn af eðlilegri stærð
Anisocytosis	Mismunandi stærð rauðra blóðkorna
Macrocyte	Stór rauð blóðkorna blóðmynd
Microcyte	Lítill rauð blóðkorna blóðmynd

Lögun

Poikilocytosis	Mismunandi lögun rauðra blóðkorna
Elliptocyte	Vindlalaga rauð blóðkorn
Ovalocyte	Sporöskjulaga rauð blóðkorn
Spherocyte	Hnattlaga rauð blóðkorn án miðfólva
Droprumur	Rauð blóðkorn eins og tár í laginu

Acanthocyte	Rauð blóðkorn með misdreifðum göddum, minnkað yfirborð
Echinocyte	Rauð blóðkorn með jafndreifðum oddum
Schistocyte	Brot af rauðum blóðkornum
Target fruma	Rautt blóðkorn eins og skotskífa
Stomatocyte	Rauð blóðkorn með rifu í miðju (sparibaukur)

Hemóglóbín innihald

Normochromia	Rauð blóðkorn með eðlilegan lit og eðlilegan miðfólva
Hypochromia	Rauð blóðkorn þar sem miðfólvi er of mikill
Anisochromia	Rauð blóðkorn með mismunandi lit. Þegar saman fara í blóðstroki hypochrome- og normochrome blóðkorn

Agnir innan rauðra blóðkorna (inclusions)

Basophil stippling	RNA leifar dreifðar um blóðkornið litast sem svartir punktar
Howell- Jolly body	Kjarnaleif í útjaðri rauðra blóðkorna litast svört
Pappenheimer bodies	Járn-innihaldandi korn í rauðum blóðkornum, litast svartar.

Aldur

Polychromia	Ung rauð blóðkorn sem innihalda RNA (bláleit í blóðstroki)
Netfrumur (reticulocyte)	Ung rauð blóðkorn sem innihalda RNA (sérlytun)
Erythroblast	Óproskuð rauð blóðkorn. Kjarninn enn til staðar

Dreifing á gleri

Rouleaux	Rauð blóðkorn raðast í keðjur eða stafla í gegnum allt strokið
Agglutination	Blóðkornin kekkjast saman (kuldaagglutination)

Utanaðkomandi áhrif

Glampi í rauðum blóðkornum	Þekjugler límt og fljótt á blóðstrokið eftir litun. Ekki gefinn nægur tími til að láta glerið þorna vel
Echinocyte	Breytingar við að blóðið þornar á glerinu Breytingar vegna storkuvarans Blóðið of gamalt þegar blóðstrokið er gert

Tafla 5. Blóðstrok er varða hvít blóðkorn (25).

Vinstri hneigð	Aukning á stafkjarna daufkyrningum og jafnvel yngri forstigum
Hægri hneigð	Kjarnaskipting daufkyrninga er aukin (5-6 kjarnahlutar eða fleiri)
Döhle korn	Ljósbláar RNA leifar í umfrymi daufkyrninga
Toxískar granúlur	Dökk korn í umfrymi daufkyrninga
Vacuolur	Loftbólur í umfrymi daufkyrninga

Tafla 6. Viðmiðunarmörk fyrir deilitalningu HBK á nýburasýnum (33).

Hvít blóðkorn	100%
B-Neutrófíl stafir	<11 %
B-Neutrófíl segment	17-59 %
B-Eósínófilar	<7 %
B-Basófilar	<2 %
B-Lymfócýtar	27-67 %
B-Mónócýtar	<10 %
B-Mýelócýtar	0
B-Metamýelócýtar	0

3.1.5 Framkvæmd á deilitalning á hvítum blóðkornum í Cellavision

CellaVision DM96 samanstendur af slæðuaðleiðslu einingu (slide feeder unit), sjóneiningu sem samanstendur af smásjá og myndavél og tölvukerfi sem inniheldur öflunar og flokkunar gagnabanka CellaVision DM. Það er mikilvægt að gerð sýnis á smásjargleri sé stöðluð eins og lýst er að ofan (HemaPrep® tæki). Smásjarglerin eru sett í ákveðin hól sem taka 12 gler. Það er síðan sett í aðleiðslu eininguna sem færir hólfið frá færibandinu til gleraðleiðslu einingarinnar. Sú eining flytur glerin úr hólfinu til strikamerkjalesarans sem les strikamerkin á bæði glerinu og hólfinu. Hreyfanleg smásjá fyrir sjálfkrafa staðsetningu og fókus á glerinu er notuð (fixed-XY-stage upprétt ljóssmásjá með hreyfanlegum linsu fókus, 5-staðsetningar linsu snúningshaus og 100 W halógen lýsingarkerfi). Immersion olíueining setur sjálfkrafa dropa af immersion olíu á glerið. Myndavélin er hágæða stighækkandi-skönnunar CCD litamyndavél, sem tekur tiltölulega hratt mjög góðar myndir af einstaka frumum og er stillt til að taka myndir af 200 hvítum blóðkornum. Þessar myndir eru síðan sýndar á tölvuskjá og leggur tækið til frumflokkun fyrir HBK byggt á gagnabanka í tækinu. Þessa frumflokkun þarf síðan að staðfesta eða endurflokka og er það gert af lífeindafræðing handvirkt. Cellavision sýnir einnig yfirlitsmynd af rauðum blóðkornum og leggur til formfræðilega (morphological) flokkun ásamt því að bjóða uppá mat á blóðflögum (34).

Cellavision flokkar HBK í eftirfarandi flokka: stafkjarna daufkyrninga (band neutrophil), daufkyrninga (segmented neutrophil), rauðkyrninga (eosinophil), blákyrninga (basophil), eitilfrumur (lymphocyte), átfrumur (monocyte), promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, blasta, eitilfrumu afbrigði (lymphocyte variant form) og plasma frumur. Kerfið flokkar einnig kyrnd RBK (erythroblast), stórar blóðflögur, blóðflögukekkjun, klessufrumur og útfellingar (artefact). Sumt er þó ekki flokkað vegna lágs trúverðuleika og fer það í „óflokkada“ hópinn. Tækið flokkar RBK af yfirlitsmynd í flokka eftir formfræðilegum einkennum og eru þeir eftirfarandi: polychromasia, hypochromasia, anisocytosis, microcytosis, macrocytosis og poikilocytosis. Lífeindafræðingur eða annar stjórnandi getur síðan flokkað RBK í frekari undirflokka: Target frumur, Schistocytosis, Helmet frumur, Sickle frumur, Spherocytosis, Elliptocytosis, Ovalocytosis, Dropa frumur, Stomatocytosis, Acanthocytosis, Echinocytosis, Howell-Jolly bodies, Pappenheimer bodies, Basophil stippling, sníkjudýr ofl. Lífeindafræðingur eða annar stjórnandi getur talið og/eða metið blóðflögurnar á yfirlitsmynd (34).

3.2 C-reactive prótein

Hæsta CRP gildi fyrstu fjóra dagana eftir grun um blóðsýkingu var notað í rannsókninni. CRP mælingar voru fengnar úr rannsóknarstofukerfi LSH. Þegar CRP er mælt er notast við sermi en einnig er hægt að mæla það í mænuvökva. Aðferðin er byggð á heterogenimmúnósamlöku tækni. CRP tengist ósérhæft á þar til gerðar plastkúlur en sérhæft við mónóklónal anti-CRP. Peroxídasi á mótefnið hvatar oxun litarefnis með aðstoð hydrogenperoxíðs en liturinn er mældur í ljósmæli við 670 nm. Viðmiðunarmörk CRP eru < 10 mg/L (35).

3.3 Blóðhagsdeilitalning

Bláæðarblóð er tekið í EDTA glas með storkuvara. Strax og rétt magn af blóði hefur verið tekið í glasið skal velja því nokkrum sinnum til að hindra storknun. Fyrir almenna blóðrannsókn blóðhags þarf lágmark 0,5 ml af sýni en lágmark 300 µl af háráðarblóði í míkroglasi (36). Blóðhagur er mældur í frumugreiningartæki frá Sysmex XE-5000. Sysmex notast við rafviðnámsmælingu, flæðifrumugreiningu, flúrljómun og ljósmælingu. Tækið mælir stærð og fjölda blóðfruma og reiknar út aðrar stærðir rauðra blóðkorna og blóðflagna. Það deilitelur HBK og greinir stofnfrumur og þroskuð forstíga sem ekki eiga að finnast í blóðrás. Tækið gefur upp athugasemdir og aðvaranir þegar ástæða er til að veita einhverju sérstaka athygli eins og t.d. þegar gildin fara út fyrir viðmiðunarmörkin (tafla 7) (25).

Tafla 7. Viðmiðunarmörk blóðhags (37).

	<4 daga	<8 daga	<2 vikna	<4 vikna	<2 mán.	< 6 mán.	<2 ára	<12 ára	<15 ára	Fullorðnir
HBK x109/L	6,8-14,3	8,3-14,8	8,2-15,4	7,4-14,7	6,7-15,1	6,8-16,0	6,2-15,0	4,5-11,5	4,4-10,2	4,0-10,5
ANC x109/L	1,7-8,4	1,8-5,1	1,7-5,4	1,3-4,3	1,2-4,9	1,4-6,7	1,6-9,1	1,8-7,4	2,0-6,9	1,9-7,0
ALC x109/L	2,2-5,4	4,3-7,7	4,2-8,3	3,9-8,9	3,2-9,1	2,8-8,4	1,2-7,0	1,1-4,7	0,9-2,7	1,1-4,0
AMC x109/L	0,2-2,2	0,2-2,2	0,1-3,0	0,2-3,5	0,2-2,7	0,5-1,9	0,3-2,0	0,3-1,2	0,4-0,9	0,3-0,9
AEC x109/L	<0,6	<0,7	<0,8	<0,8	<0,6	<0,5	<0,3	<0,4	<0,4	<0,5
ABC x109/L	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
RBK 1012/L										
Strákar	4,20-5,50	3,90-5,40	3,40-5,10	3,10-4,60	2,90-3,90	3,50-4,70	4,10-5,00	4,00-4,90	4,20-5,30	4,30-5,80
Stelpur	3,40-5,40	3,50-5,50	3,20-5,00	3,10-4,60	2,90-4,10	3,40-4,60	4,10-4,90	4,00-4,90	4,00-4,90	4,00-5,40
HB g/L										
Strákar	147-186	134-179	111-167	99-149	89-119	97-122	103-124	105-133	115-148	134-171
Stelpur	127-183	122-187	119-169	105-147	89-123	97-120	104-127	107-133	112-135	118-152
HKT l/L										
Strákar	0,43-0,56	0,40-0,55	0,34-0,51	0,30-0,44	0,26-0,35	0,29-0,36	0,31-0,37	0,32-0,39	0,35-0,44	0,39-0,50
Stelpur	0,37-0,56	0,39-0,57	0,36-0,51	0,31-0,45	0,26-0,37	0,29-0,36	0,31-0,37	0,32-0,40	0,34-0,41	0,35-0,46
MCV fl	97-114	96-112	93-109	89-103	85-97	74-88	71-82	73-88	78-91	80-97
MCH pg	32,5-37,8	31,1-36,6	30,6-36,5	30,1-34,6	28,4-32,9	24,5-29,6	23,2-27,6	24,1-29,6	25,8-30,4	26,5-33,5
MCHC g/L	316-347	318-346	320-350	320-350	322-355	320-351	318-350	319-352	316-350	318-358
RDW %	16,4-19,1	15,7-18,5	15,6-17,9	15,1-17,9	14,3-17,1	12,4-15,5	13,0-15,6	12,5-15,0	12,5-14,6	10,6-13,2
NETFR. 109/L	37-120	37-120	37-120	37-120	37-120	37-120	29-92	29-106	39-102	25-140
BFL 109/L	130-400	130-500	130-600	130-600	130-600	130-600	130-470	150-400	150-400	150-400
MPV fl	7,1-8,6	7,5-9,3	8,1-10,1	8,0-10,9	7,0-11,3	3,8-9,0	7,0-9,3	7,0-9,4	7,0-9,7	5,8-9,4

Viðmiðunargildi fyrir börn eru byggð á Soldin SJ, Brugnara C, et al. Eds. Pediatric reference ranges, 2nd ed. Washington, DC:AACC Press, 1997 og „Reference values“ frá Boston Children’s Hospital, og tóku gildi 9.maí 2005. Viðmiðunarmörk fyrir fullorðna voru fengin með mælingu á 210 heilbrigðum einstaklingum og tóku gildi í febrúar 2004. Endurskoðað í nóvember 2006.

3.4 Forrit og skráning niðurstaðna

Niðurstöðurnar voru skráðar inn í Microsoft Excel töflureikni. Þær voru flokkaðar í tvo hópa eftir því hvort send hefði verið blóðræktun af nýburanum (sepsis syndrome) eða ekki (heilbrigðir nýburar). CRP gildi, HBK talning á Sysmex, ásamt hemóglóbín mælingu og blóðflögutalningu voru skráðar. Heildarfjöldi í undirflokkun HBK var skráður niður og meðaltal reiknað. Sysmex aðvaranir (flögg) voru sérstaklega skráðar fyrir sérhvert sýni.

Skráning á niðurstöðum smásjárskoðunar og skoðunar með Cellavision var notuð til að reikna út I:T og I:M stuðul. Samanburður var síðan gerður á heildartalningu HBK milli nema og tveggja lífeindafræðinga og fyrri niðurstaðna sem skráð var inn í rannsóknarstofukerfi LSH (FlexLab).

Tölfræðiforritið GraphPad Prism 5 var notað við úrvinnslu niðurstaðnana.

Breytublað fyrir skráningu niðurstaðna er sýnt í fylgiskjali 1.

3.5 Tölfræði

Notast var við GraphPad Prism 5 í öllum tölfræðilegum útreikningum. Þegar verið var að bera saman þrjá eða fleiri hópa t.d. lífeindafræðing A, B og D var notast við Kruskal Wallis One way ANOVA próf og þá athugað hvort martækur munur væri á milli hópanna. Notast var við Mann-Whitney próf þegar tveir hópar (sepsis syndrome og heilbrigðir) voru bornir saman og marktækni athuguð ásamt skráningu á meðaltali og miðgildi. Einnig var notast við Mann-Whitney prófið þegar „intra observer variability“ var metinn. Unpaired t próf var notað þegar kynjahlutfallið á milli sepsis syndrome og heilbrigðra var borið saman og marktækni athuguð. Þegar næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi var athugað á I:T og I:M stuðlinum var notast við Fisher exact próf.

3.6 Leyfi

Fengin voru leyfi frá Siðanefnd Landspítala og framkvæmdarstjóra lækninga og eru þau sýnd í fylgiskjali 2 og 3. Sótt var um leyfi Persónuverndar við notkun mælingarniðurstaðna úr rannsóknarstofukerfi LSH.

4 Niðurstöður

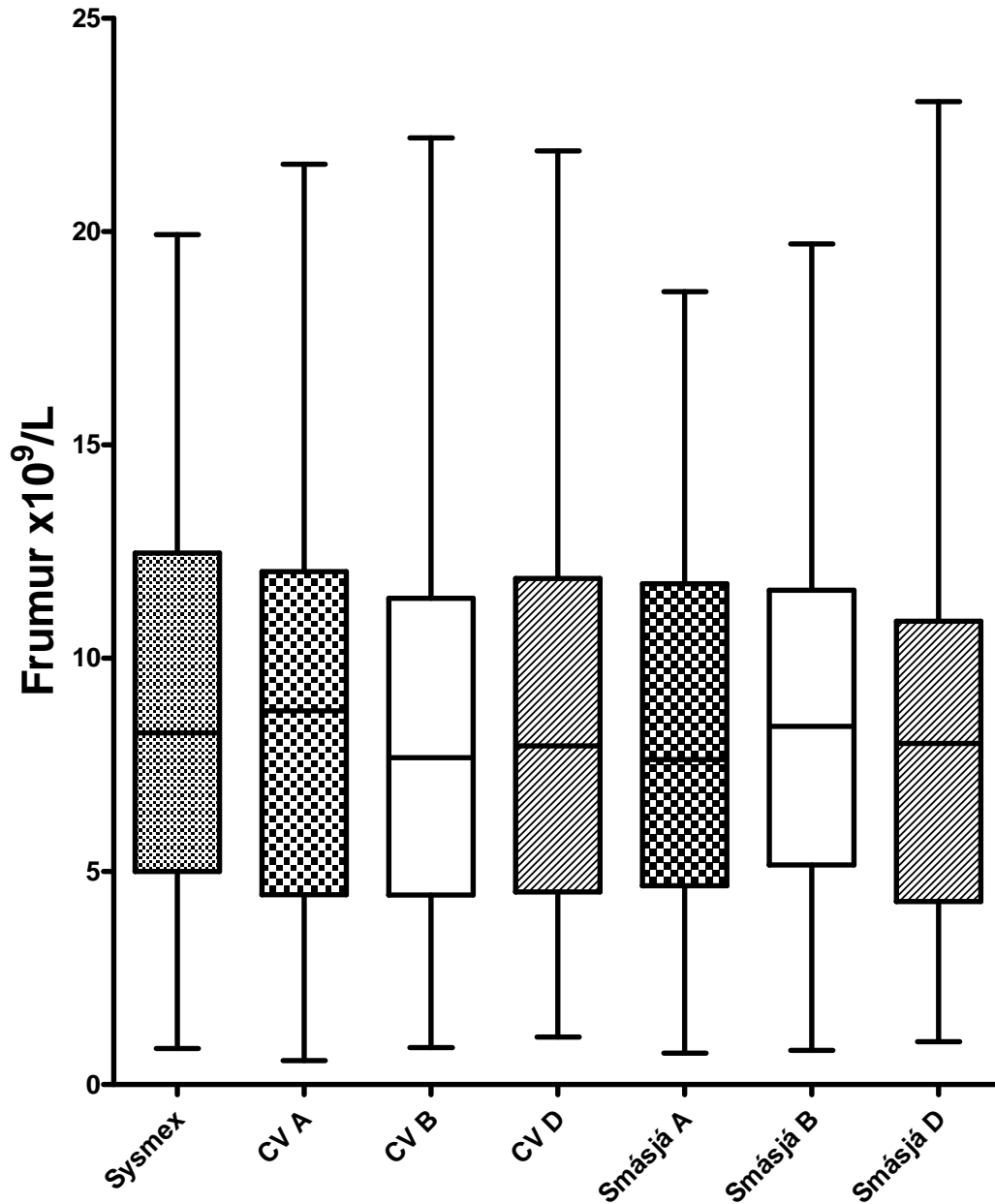
Niðurstöður er byggðar á skoðun 50 sýna, 35 sýni frá nýburum sem höfðu verið teknar blóðræktanir af og greindir klínískt með sepsis syndrome og 15 sýni frá heilbrigðum nýburum til samanburðar. Af þessum 35 sýnum er voru frá nýburum sem höfðu verið teknar blóðræktanir af reyndust einungis fjórir vera með jákvæðar blóðræktanir en 31 með neikvæðar. Við frekari eftirgrennslan voru öll fjögur sýnin jákvæð fyrir kóagúlása neikvæðum stafýlókokkum (KNS) og því talið líklegast að um mengun væri að ræða. Var því ákveðið að setja alla nýbura sem höfðu verið teknar blóðræktanir af í einn flokk grunaða um blóðsýkingu, þ.e. „sepsis syndrome“ og bera saman við heilbrigða nýbura. Allir útreikningar byggjast því á tveimur hópum en ekki þremur.

Lífeindafræðingar er tóku þátt í rannsókninni eru nefndir A og B og neminn nefndur lífeindafræðingur D. Lífeindafræðingur C er notað yfir þann lífeindafræðing er skoðaði sýnið upphaflega og gaf út formlegt svar í svarakerfi LSH (þar er um að ræða marga einstaklinga). Einungis er hægt að nota þær niðurstöður í samanburði á heildarfjölda sýnanna þar sem hluti þeirra var skoðaður á Cellavision (dagvinna) og hluti á smásjá (utan dagvinnu).

Eftirfarandi myndir og tölur sýna öll þau próf sem voru notuð í rannsókninni. Marktækni miðast við P gildið $< 0,05$ í öllum tölfræðilegum útreikningum.

4.1 Heildartalning daufkyrninga

Heildartalning daufkyrninga



Mynd 7. Heildartalning daufkyrninga í Sysmex miðað við heildartalningu daufkyrninga í Cellavision og í smásjá hjá lífeindafræðingum A, B og D.

Kruskal-Wallis One-way ANOVA test gert á 50 gildum. Enginn marktækur munur er á milli heildartalningar daufkyrninga í Sysmex og hjá lífeindafræðingum A, B og D í bæði Cellavision og smásjá. P gildi = 0,99.

4.2 C-reactive prótein mæling

Tafla 8. Meðaltal og miðgildi CRP gilda milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðra nýbura

Hópar	Meðaltal CRP mg/L	Miðgildi CRP mg/L
Sepsis syndrome	28,8	18
Heilbrigðir	16,7	11

Mann Whitney test gert á 35 „sepsis syndrome“ gildum og 10 heilbrigðum gildum, þar sem 5 heilbrigð sýni voru ekki mæld.

P gildi = 0,113 Ekki martækur munur á milli hópana

Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi var reiknað með Fisher exact test fyrir CRP gildið <10 mg/L eins og viðmiðunarmörk LSH eru sett.

Tafla 9. Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi CRP gildsins <10 mg/L.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við >10 mg/L	Jákvætt	23	5	Jákvætt forspárgildi = 82%
Greining miðað við ≤10 mg/L	Neikvætt	12	5	Neikvætt forspárgildi = 29%
		Næmi = 66%	Sértæki = 50%	P gildi = 0,47

4.3 Sysmex mælingar

Tafla 10. Meðaltal og miðgildi ANC, ALC og AMC milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðra nýbura

Hópar	Meðaltal ANC cells x 10 ⁹ /L	Miðgildi ANC cells x 10 ⁹ /L	Meðaltal ALC cells x 10 ⁹ /L	Miðgildi ALC cells x 10 ⁹ /L	Meðaltal AMC cells x 10 ⁹ /L	Miðgildi AMC cells x 10 ⁹ /L
Sepsis syndrome	9,4	9,7	4,1	3,5	1,5	1,5
Heilbrigðir	6,6	6,5	4,7	4,5	1,2	1

Mann Whitney test gert á 31 „sepsis syndrome“ gildum og 12 heilbrigðum gildum. Þar sem tækið mældi ekki ANC, ALC og AMC vegna WBC abn scattergram á 7 sýnum.

ANC P gildi = 0,08 Ekki tölfræðilega martækur munur á milli hópana en þó tilhneiging til hærri ANC (P < 0,1).

ALC P gildi = 0,47 Ekki martækur munur á milli hópana.

AMC P gildi = 0,25 Ekki martækur munur á milli hópana.

Tafla 11. Meðaltal og miðgildi HBK, Hb og Bfl milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðra nýbura

Hópar	Meðaltal HBK cells x 10 ⁹ /L	Miðgildi HBK cells x 10 ⁹ /L	Meðaltal Hemóglóbín g/L	Miðgildi Hemóglóbín g/L	Meðaltal Blóðflögur x 10 ⁹ /L	Miðgildi Blóðflögur x 10 ⁹ /L
Sepsis syndrome	15,9	15,7	178,5	176	219,3	221
Heilbrigðir	13,6	11,8	169,1	166	226,9	220

Mann Whitney test gert á 35 „sepsis syndrome“ gildum og 15 heilbrigðum gildum.

HBK P gildi = 0,19 Ekki martækur munur á milli hópana.

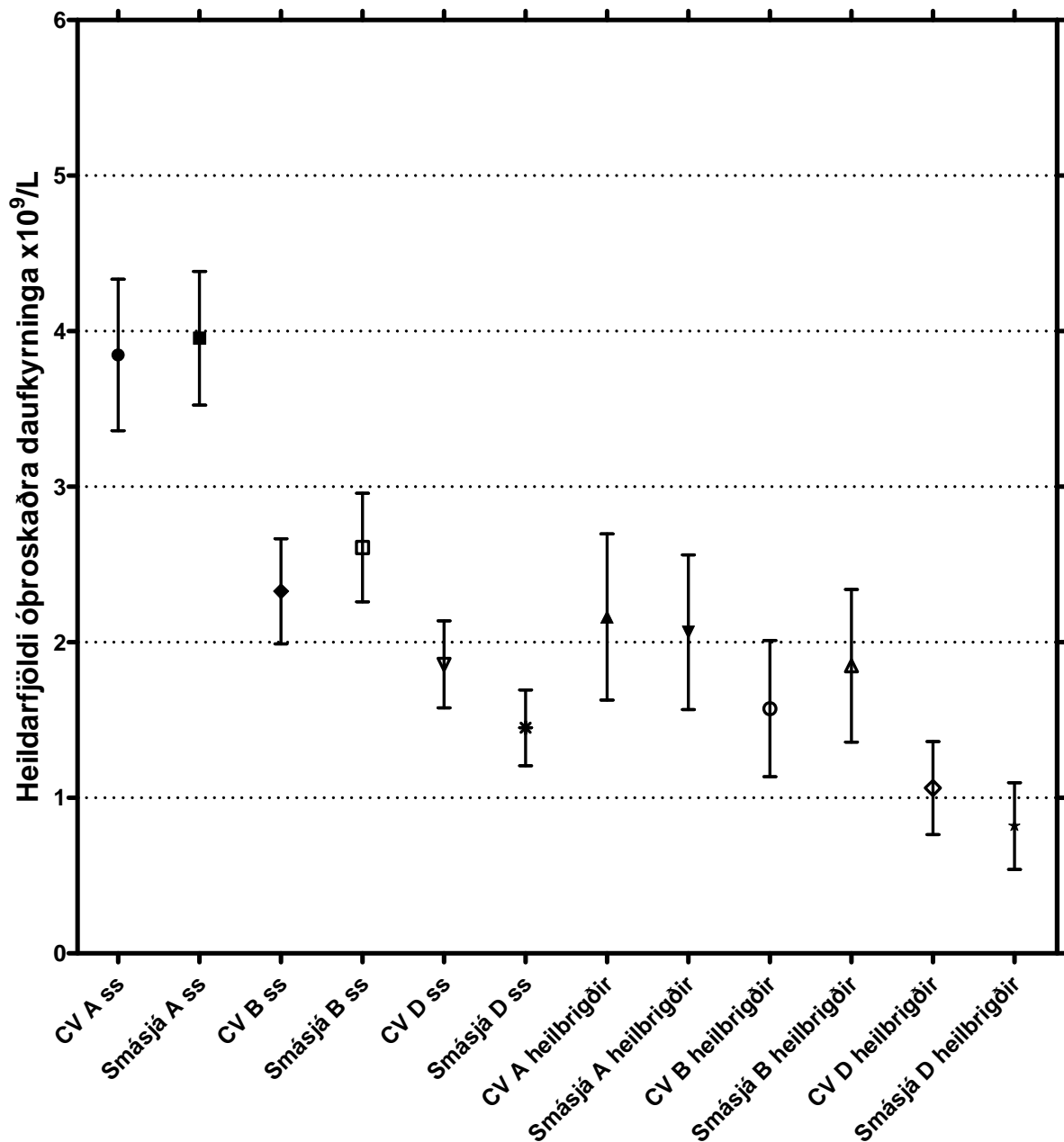
Hemóglóbín P gildi = 0,18 Ekki martækur munur á milli hópana.

Blóðflögur P gildi = 0,73 Ekki martækur munur á milli hópana.

Sysmex flöggin eru sýnd í fylgiskjali 4 fyrir öll sýnin.

4.4 Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga meðal lífeindafr. A, B og D.

Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga



Mynd 8. Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga (óproskaðar frumur/ 100 * (HBK)) milli lífeindafræðinga A, B og D í Cellavision og í smásjá milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðir hópa.

Kruskal-Wallis One-way ANOVA test gert á 35 „sepsis syndrome“ gildum og 15 heilbrigðum gildum.

Marktækur munur er á milli lífeindafræðinga A, B og D í talningu á óproskuðum daufkyrningum hjá „sepsis syndrome“ hópnum í Cellavision og í smásjá. P gildi < 0,0001

Ekki er marktækur munur á milli lífeindafræðinga A, B og D í talningu á óproskuðum daufkyrningum hjá heilbrigðum hópnum í Cellavision og í smásjá. P gildi = 0,11

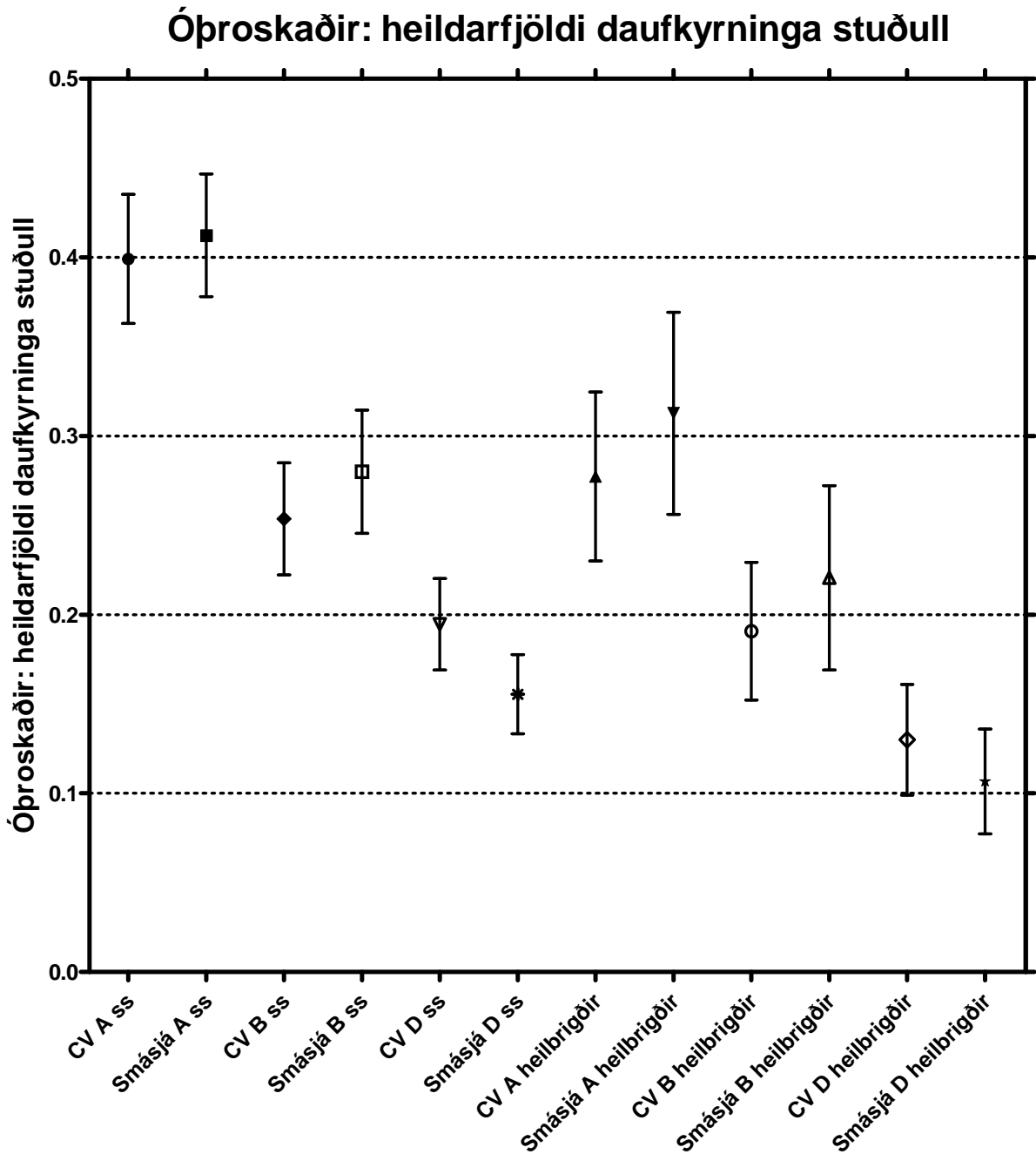
Mann Whitney test gert á 35 „sepsis syndrome“ gildum og 15 heilbrigðum gildum.

Ekki er marktækur munur á intra-observer variability hjá lífeindafræðing A í „sepsis syndrome“ hópnum P gildi = 0,8 né í heilbrigða hópnum P gildi = 0,9.

Ekki er marktækur munur á intra-observer variability hjá lífeindafræðing B í „sepsis syndrome“ hópnum P gildi = 0,6 né í heilbrigða hópnum P gildi = 0,8.

Ekki er marktækur munur á intra-observer variability hjá lífeindafræðing D í „sepsis syndrome“ hópnum P gildi = 0,2 né í heilbrigða hópnum P gildi = 0,7.

4.5 Óproskaðir: heildarfjöldi daufkyrninga stuðull



Mynd 9. Óproskaðir: heildarfjöldi daufkyrninga stuðull milli lífeindafræðinga A, B og D í Cellavision og í smásjá milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðir hópa.

Kruskal-Wallis One-way ANOVA test gert á 35 „sepsis syndrome“ gildum og 15 heilbrigðum gildum. Marktækur munur er á milli lífeindafræðinga A, B og D í I:T (óþroskuðum: heildarfjöldi daufkyrninga) stuðlinum hjá sepsis syndrome hópnum í Cellavision og í smásjá. P gildi < 0,0001

Marktækur munur á milli lífeindafræðinga A, B og D í I:T stuðlinum hjá heilbrigðum hópnum í Cellavision og í smásjá. P gildi = 0,0048

Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi var reiknað með Fisher exact test. I:T stuðullinn >0,16 var notaður sem „cut-off value“ eins og Rodwell og Manroe leggja til.

Tafla 12. Cellavision: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins >0,16 hjá lífeindafræðing A.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við >0,16	Jákvætt	30	11	Jákvætt forspárgildi = 73%
Greining miðað við ≤0,16	Neikvætt	4	3	Neikvætt forspárgildi = 43%
		Næmi = 88%	Sértæki = 21%	P gildi = 0,4

Tafla 13. Cellavision: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins >0,16 hjá lífeindafræðing B.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við >0,16	Jákvætt	23	8	Jákvætt forspárgildi = 74%
Greining miðað við ≤0,16	Neikvætt	10	7	Neikvætt forspárgildi = 41%
		Næmi = 70%	Sértæki = 47%	P gildi = 0,34

Tafla 14. Cellavision: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins >0,16 hjá lífeindafræðing D.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við >0,16	Jákvætt	17	4	Jákvætt forspárgildi = 81%
Greining miðað við ≤0,16	Neikvætt	17	11	Neikvætt forspárgildi = 39%
		Næmi = 50%	Sértæki = 73%	P gildi = 0,21

Tafla 15. Smásjá: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins >0,16 hjá lífeindafræðing A.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við >0,16	Jákvætt	31	11	Jákvætt forspárgildi = 74%
Greining miðað við ≤0,16	Neikvætt	4	4	Neikvætt forspárgildi = 50%
		Næmi = 89%	Sértæki = 27%	P gildi = 0,22

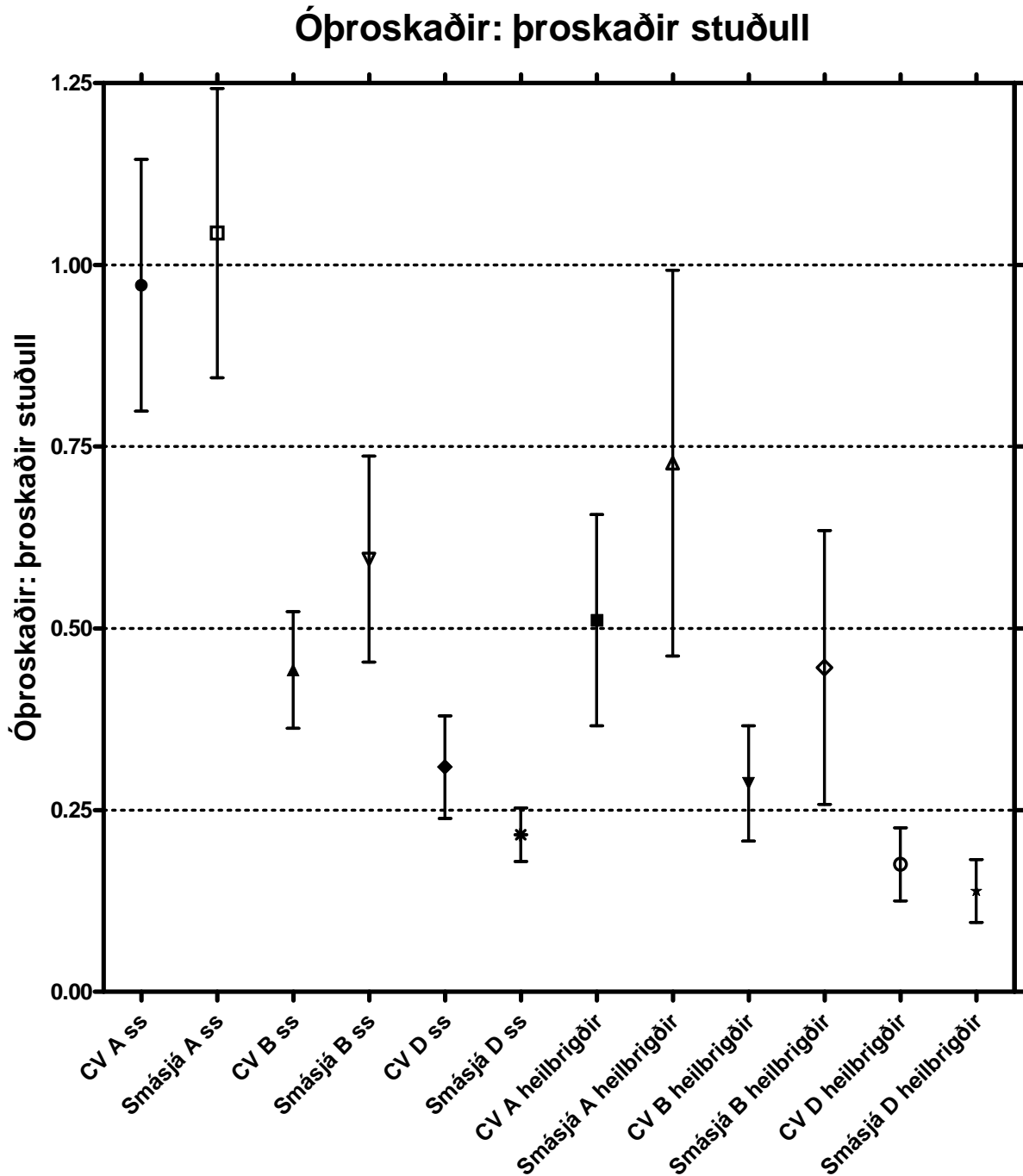
Tafla 16. Smásjá: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins >0,16 hjá lífeindafræðing B.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við >0,16	Jákvætt	22	8	Jákvætt forspárgildi = 73%
Greining miðað við ≤0,16	Neikvætt	13	7	Neikvætt forspárgildi = 35%
		Næmi = 63%	Sértæki = 47%	P gildi = 0,55

Tafla 17. Smásjá: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins >0,16 hjá lífeindafræðing D.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við >0,16	Jákvætt	14	3	Jákvætt forspárgildi = 82%
Greining miðað við ≤0,16	Neikvætt	21	12	Neikvætt forspárgildi = 36%
		Næmi = 40%	Sértæki = 80%	P gildi = 0,21

4.6 Óproskaðir: þroskaðir daufkyrninga stuðull



Mynd 10. Óproskaðir: þroskaðir daufkyrninga stuðull milli lífeindafræðinga A, B og D í Cellavision og í smásjá milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðir hópa.

Kruskal-Wallis One-way ANOVA test gert á 35 „sepsis syndrome“ gildum og 15 heilbrigðum gildum. Marktækur munur er á milli lífeindafræðinga A, B og D í I:M (óþroskaðir:þroskaðir daufkyrningar) stuðlinum hjá sepsis syndrome hópnunum í Cellavision og í smásjá. P gildi < 0,0001

Marktækur munur á milli lífeindafræðinga A, B og D í I:M stuðlinum hjá heilbrigðum hópnunum í Cellavision og í smásjá. P gildi = 0,0054

Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi var reiknað með Fisher exact test. I:M stuðullinn $\geq 0,30$ var notaður sem „cut-off value“ eins og Rodwell leggur til.

Tafla 18. Cellavision: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins $\geq 0,30$ hjá lífeindafræðing A.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við $\geq 0,30$	Jákvætt	26	8	Jákvætt forspárgildi = 76%
Greining miðað við $< 0,30$	Neikvætt	7	7	Neikvætt forspárgildi = 50%
		Næmi = 79%	Sértæki = 47%	P gildi = 0,09

Tafla 19. Cellavision: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins $\geq 0,30$ hjá lífeindafræðing B.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við $\geq 0,30$	Jákvætt	12	5	Jákvætt forspárgildi = 71%
Greining miðað við $< 0,30$	Neikvætt	21	10	Neikvætt forspárgildi = 32%
		Næmi = 36%	Sértæki = 67%	P gildi = 1

Tafla 20. Cellavision: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins $\geq 0,30$ hjá lífeindafræðing D.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við $\geq 0,30$	Jákvætt	11	3	Jákvætt forspárgildi = 79%
Greining miðað við $< 0,30$	Neikvætt	23	12	Neikvætt forspárgildi = 34%
		Næmi = 32%	Sértæki = 80%	P gildi = 0,5

Tafla 21. Smásjá: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins $\geq 0,30$ hjá lífeindafræðing A.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við $\geq 0,30$	Jákvætt	29	9	Jákvætt forspárgildi = 76%
Greining miðað við $< 0,30$	Neikvætt	6	6	Neikvætt forspárgildi = 50%
		Næmi = 83%	Sértæki = 40%	P gildi = 0,15

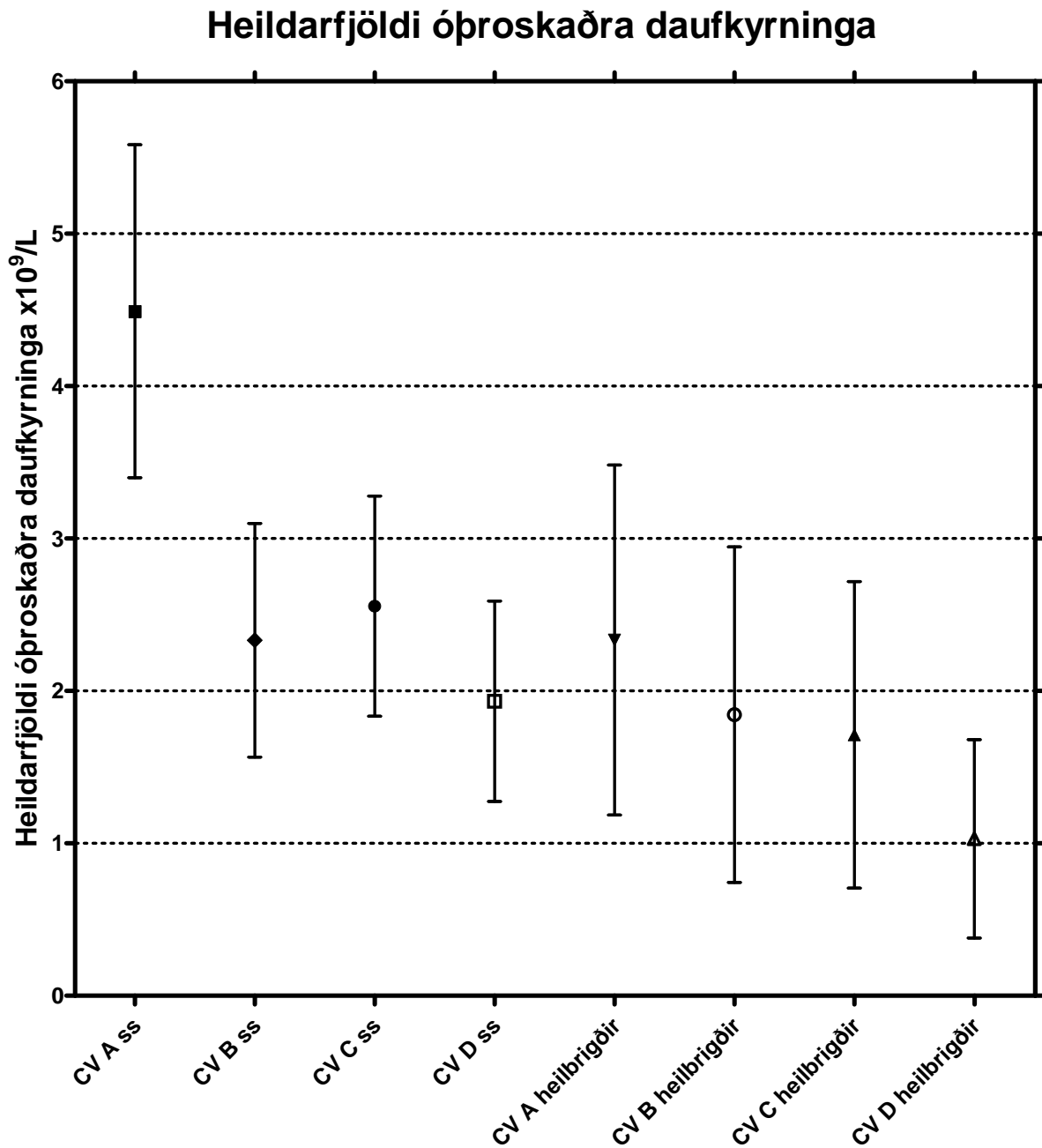
Tafla 22. Smásjá: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins $\geq 0,30$ hjá lífeindafræðing B.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við $\geq 0,30$	Jákvætt	16	5	Jákvætt forspárgildi = 76%
Greining miðað við $< 0,30$	Neikvætt	19	10	Neikvætt forspárgildi = 34%
		Næmi = 46%	Sértæki = 67%	P gildi = 0,54

Tafla 23. Smásjá: Næmi, sértæki, jákvætt og neikvætt forspárgildi I:M stuðulsins $\geq 0,30$ hjá lífeindafræðing D.

		Nýburar með ss	Heilbrigðir nýburar	
		Jákvætt	Neikvætt	
Greining miðað við $\geq 0,30$	Jákvætt	10	3	Jákvætt forspárgildi = 77%
Greining miðað við $< 0,30$	Neikvætt	25	12	Neikvætt forspárgildi = 32%
		Næmi = 29%	Sértæki = 80%	P gildi = 0,73

4.7 Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga meðal lífeindafræðinga A, B, D og einnig C



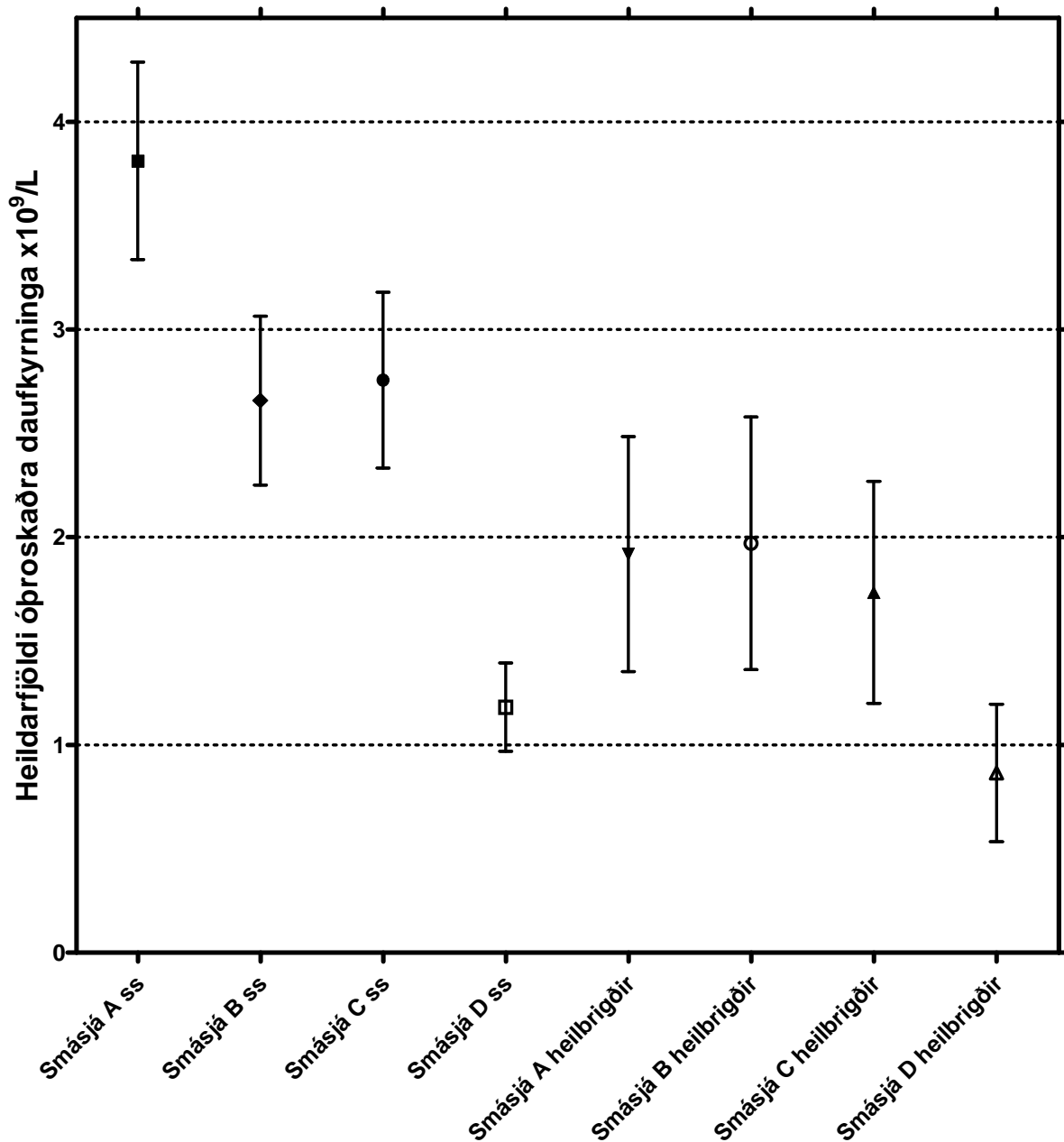
Mynd 11. Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga (óproskaðar frumur/ 100 * (HBK)) milli lífeindafræðinga A, B,C og D í Cellavision milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðir hópa.

Kruskal-Wallis One-way ANOVA test gert á 11 „sepsis syndrome“ gildum og 5 heilbrigðum gildum.

Ekki er marktækur munur er á milli lífeindafræðinga A, B, C og D í talningu á óproskuðum daufkyrningum hjá sepsis syndrome hópnum í Cellavision. P gildi = 0,16

Ekki er marktækur munur á milli lífeindafræðinga A, B, C og D í talning á óþroskuðum daufkyrningum hjá heilbrigðum hópnum í Cellavision. P gildi = 0,63

Heildarfjöldi óþroskaðra daufkyrninga



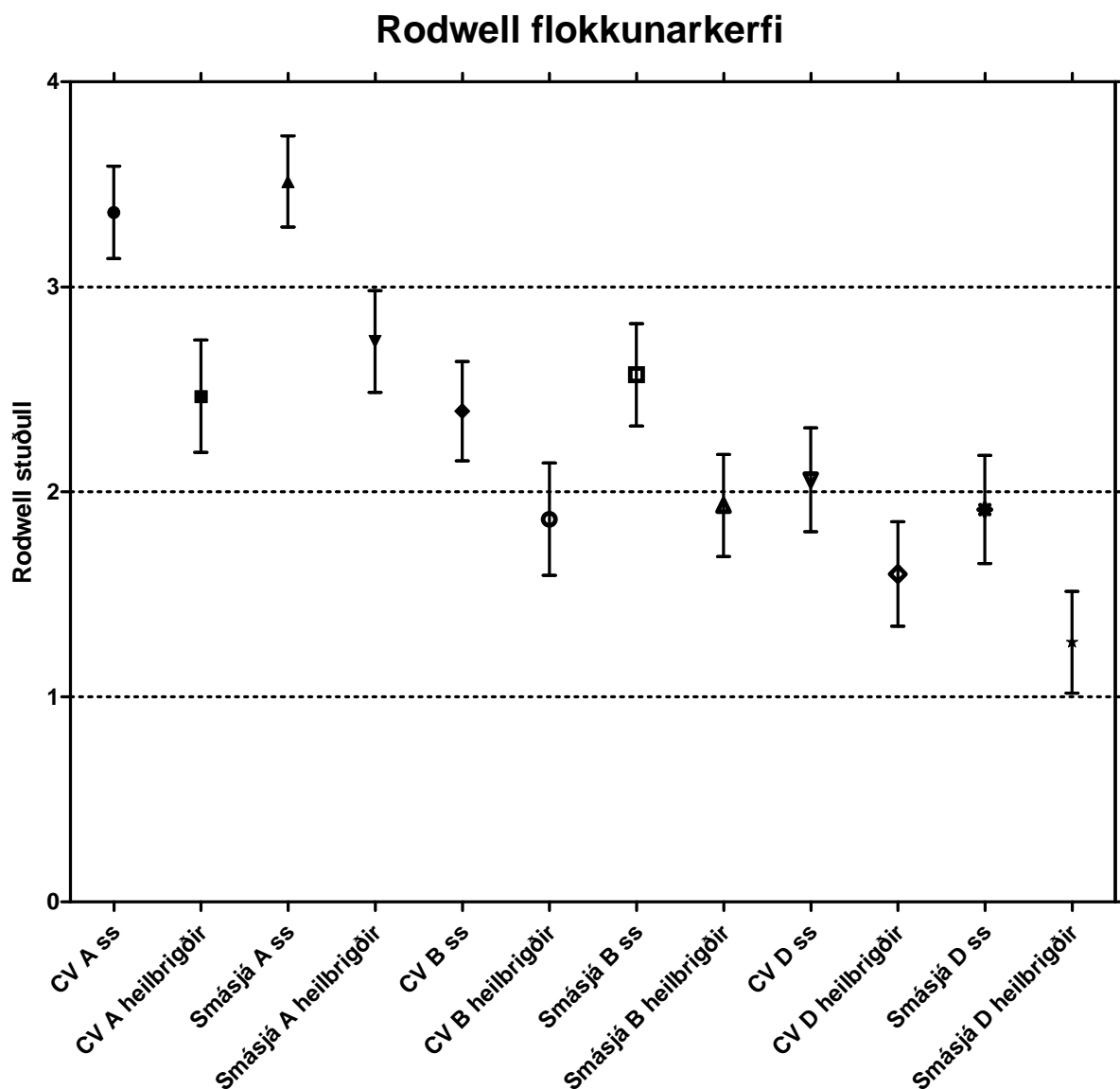
Mynd 12. Heildarfjöldi óþroskaðra daufkyrninga (óþroskaðar frumur/ 100 * (HBK)) milli lífeindafræðinga A, B,C og D í smásjá milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðir hópa.

Kruskal-Wallis One-way ANOVA test gert á 24 „sepsis syndrome“ gildum og 10 heilbrigðum gildum. Marktækur munur er á milli lífeindafræðinga A, B, C og D í talning á óproskuðum daufkyrningum hjá sepsis syndrome hópnum í smásjá. P gildi = 0,0002

Ekki er marktækur munur á milli lífeindafræðinga A, B og C ef lífeindafræðingi D er sleppt í talningu á óproskuðum daufkyrningum hjá sepsis syndrome hópnum í smásjá. P gildi = 0,15

Ekki er marktækur munur á milli lífeindafræðinga A, B, C og D í talning á óproskuðum daufkyrningum hjá heilbrigðum hópnum í smásjá. P gildi = 0,41

4.8 Rodwell flokkunarkerfi



Mynd 13. Rodwell flokkunarkerfi (Rodwell neonatal sepsis-scoring system)

Kruskal-Wallis One-way ANOVA test gert á 35 „sepsis syndrome“ gildum og 15 heilbrigðum gildum. Marktækur munur er á milli lífeindafræðinga A, B og D í I:T stuðlinum hjá „sepsis syndrome“ hópnum í Cellavision og í smásjá. P gildi < 0,0001

Marktækur munur á milli lífeindafræðinga A, B og D í I:T stuðlinum hjá heilbrigðum hópnum í Cellavision og smásjá. P gildi = 0,029

3 eða fleiri af eftirfarandi:

Óþroskaðir: heildar daufkyrninga stuðull >0,16

Heildar daufkyrninga talning <7500 or >14 500/mm³

Óþroskaðir: þroskaðir daufkyrningar stuðull ≥0,30

Óþroskaðir daufkyrningar talning >1400/mm³

Heildar HBK talning ≤5000 eða ≥25 000/mm³ við fæðingu

Heildar HBK talning ≤5000 eða ≥30 000/mm³ við 12-24 klst

Hrönnunarbreytingar í daufkyrningum

Blóðflögutalning ≤150 000/mm³

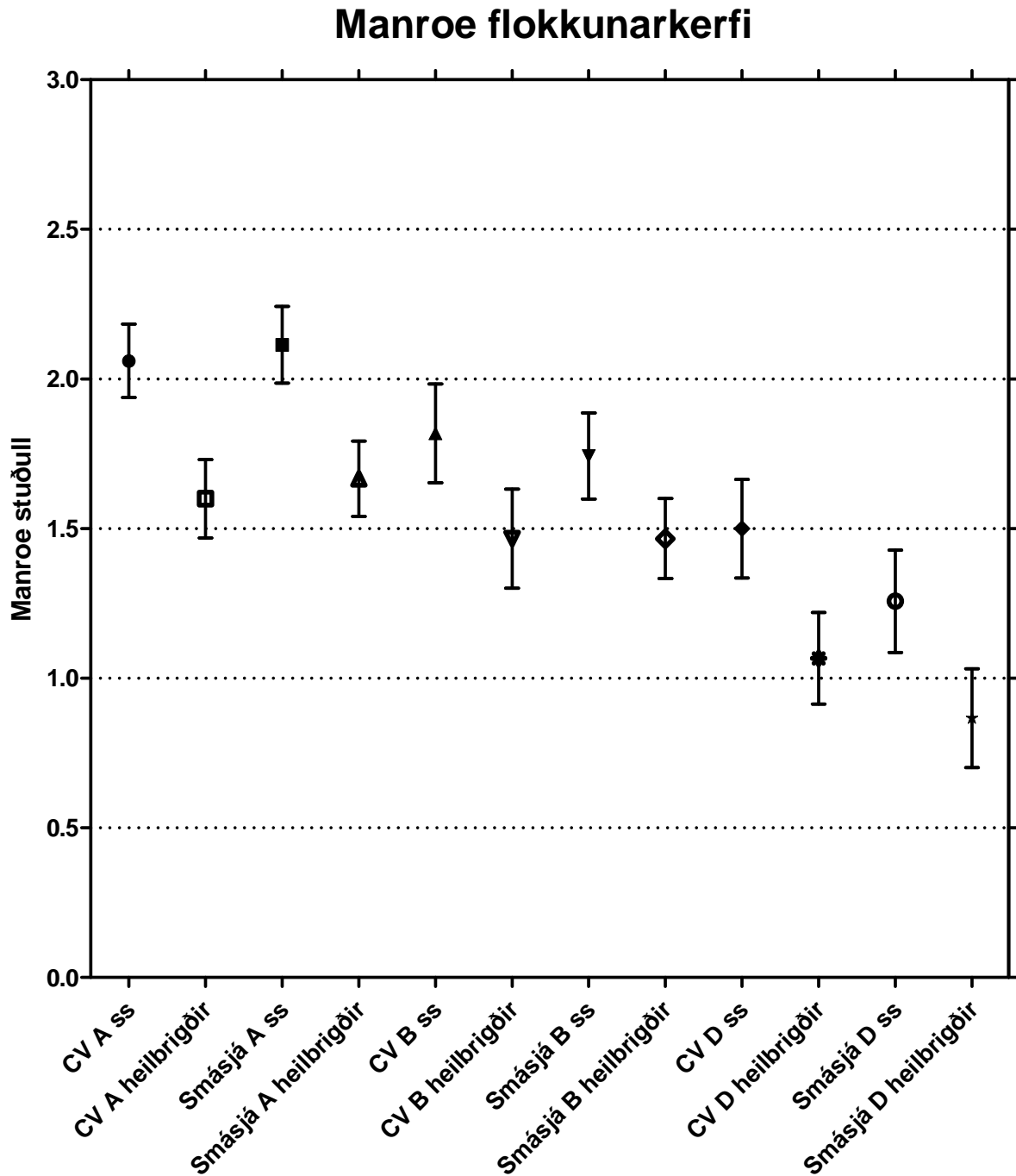
Tafla 24. Meðaltal og miðgildi Rodwell stuðulsins í Cellavision hjá lífeindafræðingum A, B og D

Hópar	Meðaltal CV A	Miðgildi CV A	Meðaltal CV B	Miðgildi CV B	Meðaltal CV D	Miðgildi CV D
„Sepsis syndrome“	3,4	3	2,4	2	2,1	2
Heilbrigðir	2,5	3	1,9	2	1,6	1

Tafla 25. Meðaltal og miðgildi Rodwell stuðulsins í smásjá hjá lífeindafræðingum A, B og D

Hópar	Meðaltal smásjá A	Miðgildi smásjá A	Meðaltal smásjá B	Miðgildi smásjá B	Meðaltal smásjá D	Miðgildi smásjá D
„Sepsis syndrome“	3,5	4	2,6	3	1,9	2
Heilbrigðir	2,7	3	1,9	2	1,3	1

4.9 Manroe flokkunarkerfi



Mynd 14. Manroe flokkunarkerfi (Manroe neonatal sepsis-scoring system)

Kruskal-Wallis One-way ANOVA test gert á 35 „sepsis syndrome“ gildum og 15 heilbrigðum gildum.

Marktækur munur er á milli lífeindafræðinga A, B, C og D í I:M stuðlinum hjá „sepsis syndrome“ hópnum í Cellavision og í smásjá. P gildi = 0,0007

Marktækur munur á milli lífeindafræðinga A, B og D í I:M stuðlinum hjá heilbrigðum hópnum í Cellavision og smásjá. P gildi = 0,0026

2 eða fleiri af eftirfarandi:

Óproskaðir: heildar daufkyrninga stuðull $>0,16$

Heildar daufkyrninga talning <7500 eða $>14\ 500/\text{mm}^3$

Óproskaðir daufkyrningar talning $>1400/\text{mm}^3$

Tafla 26. Meðaltal og miðgildi Manroe stuðulsins í Cellavision hjá lífeindafræðingum A, B og D

Hópar	Meðaltal CV A	Miðgildi CV A	Meðaltal CV B	Miðgildi CV B	Meðaltal CV D	Miðgildi CV D
„Sepsis syndrome“	2,1	2	1,8	2	1,5	1
Heilbrigðir	1,6	2	1,5	2	1,1	1

Tafla 27. Meðaltal og miðgildi Manroe stuðulsins í smásjá hjá lífeindafræðingum A, B og D

Hópar	Meðaltal smásjá A	Miðgildi smásjá A	Meðaltal smásjá B	Miðgildi smásjá B	Meðaltal smásjá D	Miðgildi smásjá D
„Sepsis syndrome“	2,1	2	1,7	2	1,3	1
Heilbrigðir	1,7	2	1,5	1	0,9	1

4.10 Kynjahlutfall milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðra nýbura

Tafla 28. „Sepsis syndrome“ og heilbrigðir eftir kyni.

Hópar	Strákar	Stelpur
„Sepsis syndrome“	22	13
Heilbrigðir	7	8

Unpaired t test gert á 35 gildum sepsis syndrome og marktækur munur er á milli stráka og stelpna $P=0,012$.

Unpaired t test gert á 15 gildum heilbrigðra og ekki er marktækur munur á milli stráka og stelpna $P=0,29$.

63% þeirra sem eru í „sepsis syndrome“ hópnum eru strákar.

53% þeirra sem eru í heilbrigðir hópnum eru stelpur.

5 Umræður

Markmið rannsóknarinnar var að kanna hvort smásjárskoðun blóðsýna nýbura segði til um mögulega blóðsýkingu hjá þeim þar sem talsvert er lagt upp úr þeirri skoðun á LSH á öllum tímum sólarhrings. Niðurstöður rannsóknarinnar virðist hins vegar ekki benda til þess að þessi skoðun sé mjög hjálpleg þar sem mikill munur er á talningu reyndra lífeindafræðinga, hvort heldur sem er á hefðbundinn hátt með smásjá eða með nýju tölvusmásjárskoðunartæki, Cellavision. Að vísu er mjög gott samræmi í talningu hvers lífeindafræðings með þessum tveim aðferðum, þ.e. intra-observer variability, en inter-observer variability er óásættanlegt. Á þetta við um öll forstig daufkyrninga og heildartalningu sem og notkun áður skilgreindra kvarða (HSS) og stuðla (I:T og I:M). CRP mælingar, ANC, ALC og AMC talning úr Sysmex hjálpi lítið sem ekkert til við greiningu á „sepsis syndrome“, nema ANC sem er nálægt martækni og gefur því heildarhækkun á ANC úr Sysmex að líkindum vísbendingu. Blóðhagsmæling (HBK, Hb og blóðflögur) úr Sysmex hjálpar ekki heldur til við greiningu á „sepsis syndrome“.

5.1 Heildartalning daufkyrninga

Heildartalning daufkyrninga (ANC) kom vel út milli Sysmex blóðhagstækisins og lífeindafræðinga A, B og D sem bendir til góðs samræmis milli talningar tækisins og mats lífeindafræðinga á daufkyrningafjölda í hvort sem er í Cellavision eða í smásjá (mynd 7).

5.2 C-reactive prótein mæling

Meðaltal og miðgildi CRP mælinga innan „sepsis syndrome“ hópsins reyndist aðeins hærra en hjá heilbrigðum nýburum en ekki marktækt ($P = 0,113$) og því ósértækt í greiningu „sepsis syndrome“ (tafla 8). CRP mælingin reyndist einnig hafa lélegt neikvætt forspárgildi (29%) fyrir blóðsýkingu (tafla 9) og þannig í mótsögn við fyrri rannsóknir um þetta efni (3, 10). Rannsóknin er hins vegar takmörkuð við mælingar hjá tíu heilbrigðum nýburum og gæti aukinn fjöldi hækkað neikvæða forspárgildið.

5.3 Sysmex mælingar

Þegar Sysmex niðurstöður fyrir ANC, ALC og AMC voru athugaðar fannst enginn marktækur munur á sepsis syndrome hópnunum og heilbrigðum nýburum. Var ANC talning samt nálægt marktæki ($P=0,08$). Aðeins var gert Mann-Whitney próf á 43 sýnum (31 „sepsis syndrome“ og 12 heilbrigðum) vegna HBK afbrigðileika (WBC abn scattergram) á mælingunum sem Sysmex ræður ekki við, gæti það hugsanlega skekkt niðurstöðurnar.

Blóðhagsmælingar (HBK, Hb og blóðflögur) sýndu ekki marktækan mun á milli „sepsis syndrome“ og heilbrigða hópsins. Í fyrri rannsóknum hefur blóðflögufækkun undir $150 \times 10^9/L$ verið tengt blóðsýkingum (3) en þó meðaltal blóðflagana sé lægra hjá „sepsis syndrome“ hópnunum heldur en heilbrigða hópnunum (tafla 11), er munurinn ekki marktækur og er blóðflögutalningin ekki undir þessu ákveðna gildi.

Flagga-kerfi Sysmex er mjög ósértækt og flögguðu nánast öll sýnin. Reyndist það algjörlega tilviljanakennt hvort þau væru í „sepsis syndrome“ hópnunum eða heilbrigða hópnunum (fylgiskjal 4) og því

voru flögginn ekki hjálpleg í greiningu á blóðsýkingu nýbura. Kemur þetta heim og saman við fyrri rannsókn sem var gerð á á eldri tækjum og ekki eins næmum þar sem þeim tókst illa að greina óþroskuð hvít blóðkorn (27).

5.4 Heildarfjöldi óþroskaðra daufkyrninga meðal lífeindafræðinga A, B og D.

Talning á heildarfjölda óþroskaðra daufkyrninga í Cellavision og smásjá var borinn saman hjá hverjum lífeindafræðing (A, B og D) (mynd 8). Intra-observer variability var metið og reyndist ekki marktækur munur á talningunni, hvort heldur hvít blóðmynd var metin í Cellavision eða í smásjá. Eins kom fram að reyndir lífeindafræðingar eru samkvæmir sjálfum sér í mati á þroska HBK. Hins vegar kom í ljós marktækur munur á talningu á óþroskuðum daufkyrningum hjá „sepsis syndrome“ hópnnum milli lífeindafræðingana (inter-observer variability). Bendir það til mjög misjafnar túlkunar á því hvaða þroskamerki tilheyra hverjum undirhóp óþroskaðra daufkyrninga og er það vel þekkt vandamál á rannsóknarstofum (5). Ekki reyndist munur á talningu forstiga hjá heilbrigða hópnnum sem gæti stafað af færri forstigum í þeim sýnum. Þeir sem voru í „sepsis syndrome“ hópnnum voru almennt með hærri talningu á óþroskuðum daufkyrningum hjá öllum lífeindafræðingunum en munurinn var svo mismikill að ekki væri hægt að setja ákveðið „cut-off value“ fyrir líkum á „sepsis syndrome“ hjá þeim.

5.5 Óþroskaðir: heildarfjöldi daufkyrninga stuðull (I:T)

Þegar I:T stuðullinn er skoðaður kemur í ljós að marktækur munur er á milli lífeindafræðingana (inter-observer variability) í samanburði á „sepsis syndrome“ hópnnum og heilbrigða hópnnum (mynd 9). Vegna þessa mismunar hjálpar I:T stuðullinn ekki til við greiningu á „sepsis syndrome“.

Þegar horft er á næmi og sértæki I:T stuðulsins miðað við $>0,16$ gildið hjá lífeindafræðing A kemur í ljós að næmið er gott (88% Cellavision og 89% smásjá) þ.e. greinir rétt 88-89% af þeim sem eru með „sepsis syndrome“ (tafla 12 og 15). Sértækið er hins vegar lágt (21% Cellavision og 27% smásjá) og því erfitt að útiloka blóðsýkingu hjá heilbrigðum nýburum. Jákvætt forspárgildi reyndist frekar gott (73% Cellavision og 74% smásjá) sem segir til um það hversu stór hluti þeirra sem greinast með hækkaðan I:T stuðul eru rétt greindir með sepsis syndrome. Hins vegar er neikvætt forspárgildi I:T stuðulsins lélegt (43%-50% þeirra sem greinast heilbrigðir eru heilbrigðir). Ekki fannst marktækur munur á hópunum ($P = 0,22$ smásjá; $P = 0,4$ Cellavision). Þessi niðurstaða er í mótsögn við niðurstöður indverskrar rannsóknar þar sem neikvætt forspárgildi var 94% ef stuðlarnir voru lágir og blóðflögufæð ekki til staðar (14).

Rannsóknin mín er samt þeim takmörkunum háð að engir nýburar með staðfesta blóðsýkingu voru í henni og að aðeins voru skoðuð 50 sýni.

Aftur sýnir þessi mikli munur á lífeindafræðingum A, B og D að erfitt væri að setja ákveðið viðmiðunargildi í því að greina „sepsis syndrome“ meðal nýburana. Þegar horft er á næmið, sértækið, jákvætt og neikvætt forspárgildi hjá lífeindafræðingum B og D til viðbótar við lífeindafræðing A sést mikill munur í gildunum og eru engar af þeim niðurstöðum marktækar (tafla 13, 14, 16 og 17).

5.6 Óproskaðir: þroskaðir daufkyrninga stuðull (I:M)

Þegar horft er á I:M stuðulinn sést enn og aftur að mikill marktækur munur er á milli lífeindafræðingana í mati á forstigum daufkyrninga (mynd 10). I:M stuðullinn hjálpar því ekki til við greiningu á „sepsis syndrome“ hópnum.

Þegar horft er á næmi og sértæki I:M stuðulsins miðað við $\geq 0,30$ gildið hjá lífeindafræðing A sést nokkuð gott næmi (79% Cellavision og 83% smásjá) en eins og með I:T stuðulinn á undan reynist sértækið lélegt (47% Cellavision og 40% smásjá). Jákvætt forspárgildi er einnig frekar gott (76% Cellavision og smásjá) (tafla 18 og 21). Aðeins gildin sem voru gerð í Cellavision hjá lífeindafræðing A komust næst því að vera marktæk eða P gildi = 0,09, en annars voru öll prófin ómarktæk (tafla 19, 20, 22 og 23). I:M stuðullinn greinir því ekkert betur en I:T stuðullinn líkur á að greina rétt þá sem eru í „sepsis syndrome“ hópnum frá heilbrigðum nýburum. Aftur er þó takmörkunin sú að aðeins 50 sýni voru skoðuð og ekkert þeirra frá nýbura með staðfesta blóðsýkingu.

5.7 Heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga meðal lífeindafræðinga A,B, D og einnig C.

Þegar heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga í Cellavision var reiknaður fyrir lífeindafræðinga A, B, C og D (11 „sepsis syndrome“, fimm heilbrigðir) kemur í ljós að ekki er marktækur munur á milli lífeindafræðinganna fyrir báða hópana (mynd 11). Væri því hugsanlega hægt að setja ákveðið „cut-off value“ fyrir mat á forstigum daufkyrninga í Cellavision. Takmörkun en hins vegar á þessum samanburði þar sem aðeins 16 gildi voru skoðuð.

Þegar heildarfjöldi óproskaðra daufkyrninga á smásjá var reiknaður fyrir lífeindafræðinga A, B, C og D (24 „sepsis syndrome“, tíu heilbrigðir), sést marktækur munur á milli lífeindafræðinganna í „sepsis syndrome“ hópnum en ekki í heilbrigða hópnum (mynd 12). Væri mögulegt að skoða þann möguleika að setja ákveðið „cut-off value“ fyrir heilbrigða hópinn og jafnvel fyrir „sepsis syndrome“ hópinn ef við ákveðum að taka ekki lífeindafræðing D með þar sem hann er óreyndur og telur greinilega mun færri forstig heldur en lífeindafræðingar A, B og C. Þegar lífeindafræðingi D er sleppt fáum við ekki marktækan mun á milli lífeindafræðinganna ($P=0,15$) og væri þess vegna hægt að setja ákveðin „cut-off value“ fyrir bæði heilbrigða hópinn og sepsis syndrome hópinn.

5.8 Rodwell flokkunarkerfi

Þegar farið er eftir Rodwell skilmerkjum fyrir líkum á blóðsýkingu (þrjú eða fleiri skilmerki til staðar), kemur í ljós að aðeins hjá lífeindafræðing A er ≥ 3 af skilmerkjunum í „sepsis syndrome“ hópnum til staðar bæði í Cellavision og smásjá (mynd 13). Verður því að telja að Rodwell neonatal sepsis-scoring system hjálpi ekki til við greiningu á „sepsis syndrome“. Styður þetta við rannsóknina frá árið 2001 um að heildar HBK deilitalning hjálpi lítið við að greiningu á þessum sýkingum vegna mikils breytileika og skörunar á eðlilegum og óeðlilegum gildum (3).

5.9 Manroe flokkunarkerfi

Þegar farið er eftir Manroe skilmerkjunum fyrir líkum á blóðsýkingu (tvö eða fleiri skilmerki til staðar), kemur í ljós að aðeins hjá lífeindafræðing A er ≥ 2 af skilmerkjum í „sepsis syndrome“ hópnum til staðar bæði í Cellavision og í smásjá (mynd 14). Verður því að telja að Manroe neonatal sepsis-scoring system hjálpi ekki til við greiningu á „sepsis syndrome“.

5.10 Kynjahlutfall á milli „sepsis syndrome“ og heilbrigðra nýbura

Þegar tekið er saman hlutfall kynjanna í „sepsis syndrome“ hópnum kemur í ljós að meirihlutinn eru strákar eða 22 af 35 eða 63% og er sá munur marktækur ($P = 0,012$). Gæti það skýrst af því að genin sem stjórna mótefnaframleiðslunni eru staðsett á X-litningi, en stúlkur hafa tvo X-litninga en strákar aðeins einn (1, 6). Hugsanlega þyrfti að gera stærri rannsókn á þessu meðal fleiri nýbura samt sem áður þar sem aðeins 35 nýburar eru í „sepsis syndrome“ hópnum.

5.11 Takmarkanir og næstu skref

Takmarkanir á rannsókninni voru nokkrar. Marktækur munur gæti sést ef þýðið væri stærra en 50 nýburar. Eins voru aðeins fjórir nýburar í rannsókninni með „jákvæða“ blóðræktun (kóagúlasa neikvæða stafýlókokka) sem mjög líklega er mengun (12). Var þess vegna aðeins skilgreindur „sepsis syndrome“ hópur þ.e. klínískt blóðsýktur þar sem blóðræktanir voru teknar. Vegna þess hve sjaldgæft er að fá jákvæða blóðræktun hjá nýburum þyrfti því að gera aðra mun stærri framsýna rannsókn og safna sýnum yfir lengra tímabil. Yrði sú rannsókn sennilega að standa yfir í tvö ár til að fá 16 nýbura með jákvæða blóðræktun þar sem aðeins tvö af hverjum 1000 lifandi fæddum börnum á Íslandi eru með staðfesta blóðsýkingu (4000 börn fæðast á ári á LSH) (4).

Einnig þyrfti rannsóknin að ná til fleiri lífeindafræðinga til að finna rétt „cut-off value“ í t.d. I:T stuðlinum sem gæti hugsanlega hjálpað til við greiningu á blóðsýkingu í nýburum. Einungis þrír lífeindafræðingar tóku þátt í rannsókninni, þar af tveir reyndir og einn óreyndur.

Rannsóknin leiddi í ljós greinilegan mun á mati forstiga daufkyrninga á milli lífeindafræðinga og þarf að skilgreina betur forstig daufkyrninga og þá sérstaklega stafatalningu. Cellavision notkun hjálpar vonandi til við þá vinnu og samræmir talningu á rannsóknarstofu í Blóðmeinafræðideild LSH. Hugsanlega ætti að fella stafatalningu inn í heildar daufkyrningatalninguna og gefa út samtölu þroskaðra daufkyrninga líkt og blóðhagstækin gera.

Vegna hins mikla munar á greiningu og talningu forstiga daufkyrninga hjá mismunandi lífeindafræðingum er erfitt að réttlæta mikla túlkun á „toxískri“ blóðmynd til greiningar klínískrar blóðsýkingar hjá nýburum. Gæti það beinlínis verið hættulegt ef sú skoðun ætti að ráða meðferð fársjúkra nýbura þar sem fjöldi forstiga fer mikið eftir því hvaða lífeindafræðingur smásjárskoðar sýnið. Óvissan stafar fyrst og fremst af vandamálum við sundurgreiningu þroskaðra daufkyrninga og stafa. Ennþá meiri breytileiki gæti sést þegar óreyndir lífeindafræðingar eru að smásjárskoða sýni utan dagvinnutíma. Hugsanlega ætti því að hætta smásjárskoðun blóðsýna frá nýburum utan dagvinnutíma. Myndi það einnig vera talsverður vinnu og tímasparnaður fyrir starfsemi Blóðmeinafræðideildar LSH.

6 Ályktanir

Þessi rannsókn á 50 blóðsýnum frá nýburum leiðir í ljós að smásjárskoðun hjálpar ekki til við greiningu á klínískt greindu „sepsis syndrome“ þar sem munurinn á greiningu forstiga daufkyrninga er svo mikill milli lífeindafræðinga. Má því álykta að óþarfi sé að smásjárskoða blóðsýni frá nýburum frá vökudeild utan dagvinnutíma. Intra-observer variability er gott hjá þeim lífeindafræðingum sem rannsóknin náði til sem segir okkur að ekki er munur á því að skoða sýnin í Cellavision eða smásjá. Setja þarf hins vegar skýrari reglur um mat á forstigum daufkyrninga á Blóðmeinafræðideild LSH, að líkindum einkum aðgreiningu þroskaðra daufkyrninga og stafa -og jafnvel að íhuga að hætta að sundurgreina þroskaða daufkyrninga og stafi því aðgreiningin reynist vera svo erfið í raun. CRP mælingar og mælingar á blóðhag hjálpa ekki við greiningu á klínísku „sepsis syndrome“ nýbura.

7 Heimildaskrá

1. Gomella TL, Cunningham MD, Eyal FG, Zenk KE, editors. Neonatology: Management , Procedures, On-Call Problems, Diseases, and Drugs. 4th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 1999.
2. Greenberg DN, Yoder BA. Changes in the differential white blood cell count in screening for group B streptococcal sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 1990 Dec;9(12):886-9.
3. Manucha V, Rusia U, Sikka M, Faridi MM, Madan N. Utility of haematological parameters and C-reactive protein in the detection of neonatal sepsis. *J Paediatr Child Health.* 2002 Oct;38(5):459-64.
4. Pálsson G, Dagbjartsson A, Jónsdóttir KE, Bergsteinsson H, Friðgeirsson G, Biering G. Breytingar á faraldsfræði alvarlegra nýburasýkinga á Íslandi 1976-1995. *Læknablaðið.* 1996;82(fylgirit 34):52-3.
5. Chiesa C, Panero A, Osborn JF, Simonetti AF, Pacifico L. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. *Clin Chem.* 2004 Feb;50(2):279-87.
6. Dagbjartsson A. Um bakteríusýkingar hjá nýburum. *Læknaneminn.* 1976;29(4):20-5.
7. Taeusch HW, Ballard RA. Avery's diseases of the newborn seventh edition ed. Cole FS, editor. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998.
8. Þórkelsson T, Dagbjartsson A. Endurlífgun nýbura, klínískar leiðbeiningar. *Læknablaðið* 2006;92:859-65.
9. Merenstein GB, Gardner SL. Handbook of Neonatal Intensive Care. 6th ed. Niermeyer S, Clarke SB, editors. St. Louis: Mosby; 2006.
10. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics.* 1998 Oct;102(4):E41.
11. Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics.* 2008 Jan;121(1):129-34.
12. Arnason S, Thors VS, Gudnason T, Kristinsson KG, Haraldsson A. [Bacteraemia in children in Iceland 1994-2005]. *Laeknabladid.* 2008 Jul;94(7-8):523-9.
13. Rodwell RL, Taylor KM, Tudehope DI, Gray PH. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. *Pediatr Infect Dis J.* 1993 May;12(5):372-6.
14. Ghosh S, Mittal M, Jaganathan G. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematological scoring system. *Indian J Med Sci.* 2001 Sep;55(9):495-500.
15. Harmening DM. Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. 4th ed. Wyrick-Glatzel J, Hughes VC, editors. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2002.
16. Harmening DM. Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. 4th ed. Parsons DD, Marty J, Strauss RG, editors. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2002.
17. Óttarsdóttir A. Myndir úr Cellavision. In: Myndir, editor. Cellavision2010.
18. Philip AGS, Hewitt JR. Early Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Pediatrics.* 1980 May 1, 1980;65(5):1036-41.

19. Ottolini MC, Lundgren K, Mirkinson LJ, Cason S, Ottolini MG. Utility of complete blood count and blood culture screening to diagnose neonatal sepsis in the asymptomatic at risk newborn. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 May;22(5):430-4.
20. Christensen RD, Rothstein G, Hill HR, Hall RT. Fatal early onset group B streptococcal sepsis with normal leukocyte counts. *Pediatr Infect Dis*. 1985 May-Jun;4(3):242-5.
21. Macintyre SS, Schultz D, Kushner I. Biosynthesis of C-reactive protein. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;389:76-87.
22. Morley JJ, Kushner I. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;389:406-18.
23. Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavaraja V, et al. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system. *Int J Lab Hematol*. 2009 Feb;31(1):48-60.
24. Kratz A, Bengtsson HI, Casey JE, Keefe JM, Beatrice GH, Grzybek DY, et al. Performance evaluation of the CellaVision DM96 system: WBC differentials by automated digital image analysis supported by an artificial neural network. *Am J Clin Pathol*. 2005 Nov;124(5):770-81.
25. Halldórsdóttir B, Önundarson PT, Claessen S. Námskeið í smásjárskoðun á blóði og merg fyrir 4.árs læknanema. In: *Læknadeild HÍ*, editor. Reykjavík2008.
26. Kondo S, Yamaguchi N, Imanishi T, Sakota H, Jokei Y, Mituda A. [Laboratory evaluation of the Sysmex NE-7000 flagging system; a tool for the recognition of abnormal cells in white cell differentials]. *Rinsho Byori*. 1991 Jun;39(6):615-22.
27. Moreau E, Philippe J, Kint J, Benoit Y, Leroux-Roels G. Performance of the Coulter STKS and the Sysmex NE-1500 in a paediatric population. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1994 Jul;32(7):563-6.
28. Sireci A, Schlaberg R, Kratz A. Optimization Of Flagging Criteria On The Sysmex XE-2100. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2009;31(s1):48-111.
29. Thalhammer-Scherrer R, Knobl P, Korninger L, Schwarzinger I. Automated five-part white blood cell differential counts. Efficiency of software-generated white blood cell suspect flags of the hematology analyzers Sysmex SE-9000, Sysmex NE-8000, and Coulter STKS. *Arch Pathol Lab Med*. 1997 Jun;121(6):573-7.
30. CellaVision. HemaPrep-Automated blood smearing instrument. Lund: CellaVision AB; 2003.
31. Háskólasjúkrahús L. May-Grunwald-Giemsa-litun. Reykjavík: Rannsóknarstofnun LSH-blóðmeinafræðideild.
32. Jónsdóttir RB. Blóðstrok. 2007.
33. Háskólasjúkrahús L. Hvít blóðkorn. In: HBK V, editor. Reykjavík2010.
34. Cellavision. CellaVision DM Software V2.0 with CellaVision Body Fluid Application. CellaVision, editor. Lund: CellaVision AB; 2008.
35. S-C-Reaktíft prótein (CRP) [database on the Internet]. Landspítalinn. 2004.
36. B-almenn blóðrannsókn, blóðhagur [database on the Internet]. Landspítalinn. 2006.
37. Viðmiðunarmörk blóðhags [database on the Internet]. Landspítalinn. 2006.

Fylgiskjöl

Fylgiskjal 1

Smásjárskoðun blóðstroks nýbura með jákvæða blóðræktun, "sepsis syndrome" og kontról

Sýnanúmer.

Systemex:

HBK:		10 ⁹ /L	Hb:		g/L	Blf:		10 ⁹ /L
------	--	--------------------	-----	--	-----	------	--	--------------------

ANC:		ALC:		AMC:		AEC:		ABC:	
------	--	------	--	------	--	------	--	------	--

Flögg:

Cellavision:

	band	segm	eosinop	basop	lymphoc	monoc	metamyelo	myeloc	Athugasemdir
FlexLab									
Nemi									
A									
B									

Smásjárskoðun:

	band	segm	eosinop	basop	lymphoc	monoc	metamyelo	myeloc	Athugasemdir
FlexLab									
Nemi									
A									
B									

CRP mg/L:

Fylgiskjal 2



Reykjavík, 24. mars 2010
KS/JS

Brynjar Viðarsson læknir
Rannsóknarstofa í Blóðmeinafræði
2K Hringbraut.

Varðar erindi 19/2010 "Getur smásjárskoðun hvítra blóðkorna hjá nýburum sagt til um blóðsýkingu."

Ágæti Brynjar,

Við höfum móttækið svar þitt dagsett 24. mars 2010 ásamt fylgigögnum og svarar það athugasemdum nefndarinnar með fullnægjandi hætti.

Endanlegt samþykki siðanefndar Landspítala fyrir ofangreinda rannsókn er hér með veitt.

Siðanefnd LSH bendir rannsakendum á að birta siðanefndarmúmer rannsóknarinnar þar sem vitnað er í leyfi nefndarinnar í birtum greinum um rannsóknina. Jafnframt fer Siðanefnd LSH fram á að fá send afrit af birtum greinum um rannsóknina.

Gangi þér vel við rannsóknarstörfin.

Virðingarfyllt fyrir hönd siðanefndar Landspítala,

Jónína Sigurðardóttir, forstöðumaður.

Siðanefnd Landspítala
Vísinda-, mennta og gæðarviði
C13 Fossvogi
108 Reykjavík

Formaður: Kristján Steinsson
Forstöðumaður: Jónína Sigurðardóttir
Tölvupóstur: siðanefnd@landspitali.is

Fylgiskjal 3



Brynjar Viðarsson
sérfræðilæknir
blóðfræðideild
Landspítala v. Hringbraut

17.03.2010

Tilv. 16
HÍ/01

Efni: Rannsóknin: Getur smásjárskoðun hvítu blóðkorna hjá nýburum sagt til um blóðsýkingu?

Ágætt Brynjar,

Vísað er til bréfs þíns til framkvæmdastjóra lækninga, dags. 10.03.2010 þar sem þú óskar heimildar til að gera ofangreinda rannsókn á Landspítala. Fram kemur að þú ert ábyrgðarmaður rannsóknarinnar en aðrir umsækjendur eru Páll Torfi Ónundarson, yfirlæknir, rannsóknarstofu í blóðmeinafræði, Karl G. Kristinsson, yfirlæknir sýklafraeðideild, Þórður Þórkelsson, yfirlæknir vökudeild, Rósa B. Jónsdóttir, lífeindafræðingur, rannsóknarstofu í blóðmeinafræði, öll starfsmenn LSH og Ama Óttarsdóttir, nemandi í lífeindafræði við Háskóla Íslands.

Hér með er veitt heimild til að ofangreind rannsókn fari fram á Landspítala undir þinni stjórn. Jafnframt er veittur aðgangur að sjúkráskrár sem tengjast kunna rannsókninni. Leyfi þetta er háð því að fyrir liggja samþykki síðarnefndar LSH en einnig þarf leyfi Persónuverndar að liggja fyrir ef gögn úr sjúkráskrár eru notuð við rannsóknina. Rétt er að taka fram að niðurstöður lífeindafræðirannsókna teljast til sjúkráskrár.

Með kveðju og ósk um gott rannsóknargengi,

Þórður Harðarson
prófessor, yfirlæknir

Ólafur Baldursson
framkvæmdastjóri lækninga

Afrít:

Krisajón Steiðsson, forsáður síðarnefndar Landspítala
Sigrún Jóhannesdóttir, forstjóri Persónuverndar

SKRIFSTOFA FRAMKVÆMDASTJÓRA LÆKNINGA

Einkagötu 3 • 101 Reykjavík • Sími 543 1103 • Fax 543 1112 • Netfang olafur@landspitali.is • www.landspitali.is

Fylgiskjal 4

Flöggin í Sysmex fyrir WBC IP Message(s) eru eftirfarandi:

WBC Abn Scattergram
NRBC Abn Scattergram
Lymphocytosis
Monocytosis
Leukocytosis
Basophilia
Neutropenia
NRBC Present
IG Present
Blasts?
Immature Gran?
Left Shift?
Abn Lympho/L_Blasts?

Sýnin fjögur sem voru með jákvæða blóðræktun flögguðu:

187- Monocytosis, Leukocytosis, NRBC present, IG present
232- Engin flögg
275- NRBC present
283- NRBC abn scattergram, neutrophilia, lymphocytosis, monocytosis, leukocytosis, NRBC present, left shift?, blasts?, immature gran?

Sýnin 31 sem voru með „Sepsis syndrome“ flögguðu:

75- Lymphocytosis, NRBC present, IG present, Left shift?
81- NRBC present, IG present
113- Lymphocytosis, NRBC present, IG present
123- Lymphocytosis, NRBC present, IG present, Left shift?, Blasts?
126- Lymphocytosis, NRBC present, IG present, Left shift?
136- Lymphocytosis, NRBC present, IG present, Left shift?, Blasts?
138- Lymphocytosis, NRBC present, IG present, Blasts?
143- Neutropenia, NRBC present
156- NRBC present
168- Monocytosis, NRBC present
170- Lymphocytosis, Monocytosis, NRBC present, Basophilia, IG present, Blasts?, Left shift?
178- NRBC present, IG present, Blasts?
179- Monocytosis, IG present, Left shift?
230- Monocytosis, NRBC present, IG present, Blasts?, Left shift?
233- NRBC present
256- NRBC present, IG present, Blasts?

- 257- Lymphocytosis, Monocytosis, IG present, Left shift?, Abn lympho/L_blasts?
- 259- NRBC abn scattergram, basophilia, NRBC present, blasts?, immature gran?, left shift?
- 265- WBC abn scattergram, NRBC present, blasts?, immature gran?
- 268- Monocytosis, IG present, NRBC present, left shift?
- 269- NRBC abn scattergram, neutrophilia, monocytosis, leukocytosis, NRBC present, left shift?, immature gran?
- 276- WBC abn scattergram, NRBC present, left shift?, immature gran?
- 277- Neutrophilia, leukocytosis, monocytosis, IG present, NRBC present, left shift?, blasts?
- 278- WBC abn scattergram, NRBC abn scattergram, basophilia, leukocytosis, NRBC present, left shift?, blasts?, immature gran?
- 280- NRBC present, left shift?, blasts?
- 281- WBC abn scattergram, NRBC abn scattergram, basophilia, NRBC present, immature gran?
- 282- NRBC abn scattergram, monocytosis
- 284- Monocytosis, NRBC present, IG present, blasts?
- 285- WBC abn scattergram, NRBC present, immature gran?
- 287- Lymphocytosis, NRBC present, IG present, left shift?, blasts?
- 288- NRBC abn scattergram, lymphocytosis, NRBC present, left shift?, blasts?, immature gran?

Sýnin 15 sem voru kontról eða heilbrigðir nýburar flögguðu:

- 258- IG present, NRBC present, left shift?
- 260- NRBC abn scattergram, NRBC present, immature gran?
- 261- IG present
- 262- WBC abn scattergram, NRBC present, immature gran?, abn lympho/L_blasts?
- 263- IG present, NRBC present
- 264- Engin flögg
- 266- IG present, NRBC present, lymphocytosis
- 267- IG present, NRBC present, neutropenia
- 270- WBC abn scattergram, basophilia, leukocytosis, NRBC present, left shift?, blasts?, immature gran?
- 271- Monocytosis, IG present, NRBC present
- 272- Engin flögg
- 273- IG present
- 274- WBC abn scattergram, basophilia, NRBC present, left shift?, immature gran?, abn lympho/L_blasts?
- 279- NRBC abn scattergram, lymphocytosis, monocytosis, basophilia, leukocytosis, NRBC present, left shift?, blasts?, immature gran?
- 286- Lymphocytosis, monocytosis, leukocytosis, NRBC present, IG present, blasts?