

## **Samenvatting en aanbevelingen werkgroep “microscopische differentiatie”.**

### **Inleiding:**

Op verzoek van de ledenvergadering van de VHL (Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek) werd een werkgroep geformeerd met de opdracht een discussienota voor te bereiden rond het thema:

### **Indicaties voor het verrichten van een microscopische differentiatie: een afweging van theoretische en praktische argumenten.**

De werkgroep bestond uit:

- Dr Hans Haak (Leyenburg ziekenhuis Den Haag),
- Dr Rob Hoorn (Diaconessenhuis, Meppel)
- Dr Wouter van Solinge (UMC Utrecht) en
- Dr Warry van Gelder (Albert Schweitzer ziekenhuis, Dordrecht).

De nota werd gepresenteerd en bediscussieerd op de algemene ledenvergadering van de VHL dd. 11 oktober 2000 te Utrecht. De commentaren zijn verwerkt in onderstaande versie.

### **Probleemstelling**

De microscopische beoordeling van het perifere bloeduitstrijkje (= microscopische differentiatie) is al sinds vele jaren een van de hoekstenen van de basale (cito)diagnostiek. Maar in de afgelopen jaren verschenen er in de internationale literatuur een aantal publicaties die de meerwaarde van dit onderzoek voor een aantal specifieke indicaties ter discussie stelt. Samengevat komen de commentaren erop neer dat de sensitiviteit en specificiteit van deze bepaling voor het vaststellen van met name ernstige infecties relatief laag uitvallen. De statistische betrouwbaarheid van de uitkomst van een microscopische differentiatie is beperkt doordat slechts een gering aantal cellen wordt beoordeeld (hooguit een paar honderd). Bovendien ontstaat door variatie in het morfologisch spectrum van de diverse celtypen ruimte voor verschil in interpretatie, waardoor (soms grote) verschillen in de gerapporteerde resultaten kunnen ontstaan.

Hier tegenover staat de voortschrijdende ontwikkeling van analysers die volledig geautomatiseerd en zeer snel een 3-part of 5-part differentiatie kunnen uitvoeren en daarnaast tegelijkertijd een groot aantal celindices kunnen bepalen (zie ref. 55). Deze apparatuur - die inmiddels op zeer grote schaal in de laboratoria is ingevoerd - heeft ervoor gezorgd dat het werkaanbod (i.c. het aantal bloeduitstrijkjes dat handmatig moet worden beoordeeld) zienderogen is afgenomen. Door dit verminderde aanbod wordt het ook steeds moeilijker om een grote groep analisten voldoende expertise te laten behouden in het uitvoeren van een microscopische differentiatie.

Een en ander heeft tot gevolg dat het voor een laboratorium met name buiten kantooruren een probleem kan zijn om over een analist te kunnen beschikken die voldoende ervaring heeft met de microscopische differentiatie. In principe is dit een logistiek probleem waar wel oplossingen voor te vinden zijn (bijv. extra scholing), maar de vraag is of dit – gezien de discussie over een aantal indicaties voor microscopische differentiatie – wel zo zinvol is.

Dient elke analist een microscopische differentiatie te kunnen uitvoeren, of moet dit – gezien bovenstaande kanttekeningen – beperkt worden tot een kleinere groep? Deze vraag kan naar de mening van de werkgroep niet direct beantwoord worden. Allereerst dienen een aantal onderliggende vragen te worden beantwoord. Omwille van de overzichtelijkheid heeft de werkgroep zich hierbij beperkt tot cito-aanvragen voor een microscopische differentiatie buiten kantooruren, omdat zich met name dan problemen zullen voordoen.



**Vragen t.a.v. de indicaties en bruikbaarheid/effectiviteit van de microscopische differentiatie.**

1. Welke indicaties bestaan er tot het cito - dwz zonder uitstel - uitvoeren van een microscopische differentiatie van een perifere bloeduitstrijk?
2. Indien er indicaties zijn tot het cito uitvoeren van een microscopische differentiatie, welke vragen dienen dan te worden beantwoord bij het beoordelen van deze perifere bloeduitstrijk? Kunnen deze vragen door de gemiddelde – dienstdoende – analist worden beantwoord?
3. Is – op grond van wetenschappelijk onderbouwd onderzoek – de microscopische differentiatie het meest effectieve instrument bij het stellen c.q. uitsluiten van die diagnoses, of zijn er alternatieven die kwalitatief vergelijkbare (of zelfs bruikbaarder) informatie opleveren?

## Inventarisatie

### Vraag –1-

De vraag welke indicaties er bestaan tot het cito uitvoeren van een microscopische differentiatie is uitgebreid binnen de werkgroep besproken en daarnaast ook voorgelegd aan een aantal externe deskundigen, waaronder een internist/opleider, een kinderarts en een internist-intensivist. Al met al leverde deze inventarisatie slechts een beperkt aantal indicaties op:

- Verdenking neonatale sepsis (bij kind tot 2 maanden)
- Verdenking leukemie met zeer hoge celaantallen (indicatie tot spoed cytaferese)
- Onderscheid trombopenie vs pseudotrombopenie (klontering etc)
- Verdenking trombotische trombocytopenische purpura (schizocyten)
- Hemodynamisch instabiele oudere patiënt met normaal aantal leucocyten en verdenking sepsis

Daarnaast is ook een aantal keren op internet in diverse literatuurbestanden gezocht (met name in PubMed van het National Institute of Health) op o.a. de trefwoorden: WBC, (neonatal) sepsis en differential count. Dit leverde een groot aantal artikelen en verwijzingen op, maar slechts enkele publicaties bevatten andere indicaties voor een cito microscopische differentiatie (zie artikel 6) dan de verdenking op neonatale sepsis. In feite lijkt bovenstaande lijst hiermee redelijk compleet.

Bij een aantal van de hierboven genoemde indicaties zijn tijdens de presentatie in de VHL-vergadering wel kanttekeningen geplaatst.

- De grens van 2 maanden voor de diagnose neonatale sepsis is niet geheel arbitrair. Bij (met name premature) neonaten kan een stijging van het aantal leucocyten tijdens een infectie uitblijven. Om die reden werd bij verdenking sepsis in deze leeftijdscategorie de voorkeur gegeven aan de uitslag van de microscopische differentiatie boven het absolute aantal leucocyten.
- Het onderscheid tussen pseudo- en echte trombopenie is in feite een technisch probleem. Sommige celltellers zijn niet in staat om trombocytentrombocytopenie te detecteren en rapporteren dan - ten onrechte - een te laag getal. Dit laat o.i. overigens onverlet dat bij een lage trombocytenuitslag er zonder uitstel een adequate uitslag moet worden doorgegeven aan de behandelaar (zie onder -2-).
- Bij een aantal collegae bestaat de indruk dat de uitkomst van de microscopische differentiatie het behandelingsbeleid t.a.v. een hemodynamisch instabiele oudere patiënt niet zal beïnvloeden. (Deze indicatie werd overigens ingebracht door de internist-intensivist!).
- De indicatie “de ongeruste dokter” is niet in de lijst van indicaties opgenomen, omdat zonder een adequate vraagstelling een microscopische differentiatie een weinig effectief instrument is.

### Vraag –2-

Wat een analist dient te kunnen onderscheiden bij een microscopische differentiatie is op grond van bovenstaande indicaties redelijk aan te geven.

- Uitgerijpte vs jongere neutrofiële granulocyten (segmentkernig vs staaf, meta- en myelocyt)
- Blasten (in feite “pluis/niet pluis” bij zeer hoge celaantallen)
- Trombocytenuitslag en trombopenie
- Schizocyten

Hierbij dient zich uiteraard de vraag aan of de gemiddelde analist dit wel kan. Het onderscheid tussen uitgerijpte en jongere neutrofiële granulocyten lijkt op het eerste gezicht niet al te ingewikkeld, maar (zie artikel 20 t/m 24) dit blijkt in de praktijk flink tegen te vallen. Onervarenheid met “niet-alledaagse” cellen, relatief kleine aantallen cellen die worden geteld (grote statistische variatie; zie Rumke) en kwalitatief steeds betere – geautomatiseerde – hematologie analysers lijken de pleit niet in het voordeel van de manuele microscopische differentiatie te beslechten (zie ook artikel 25).

Het herkennen van trombocyten-aggregaten en onderscheid met een echte trombopenie zal doorgaans niet veel problemen opleveren, of dit nu met behulp van een telkamer of in een microscopische differentiatie wordt beoordeeld. Zoals al onder –1- aangegeven is het al dan niet aanwezig zijn van trombocyten aggregaten (en de detectie hiervan) een technisch probleem waarvoor het laboratorium zelf een oplossing moet bedenken, om vervolgens de aanvrager van correcte informatie te voorzien. Een echte (en niet eerder gerapporteerde) trombopenie is een uitslag die onverwijld doorgegeven moet worden. Soms zal het hierbij noodzakelijk zijn een microscopische beoordeling (in telkamer of bloeduitstrijk) uit te voeren en – hoe eenvoudig ook – deze kennis zal 24 uur per dag beschikbaar moeten zijn.

Voor de diagnose TTP (trombotische trombocytopenische purpura) en HUS (hemolytisch uremisch syndroom) is het van groot belang te weten of er schizocyten aanwezig zijn. Deze morfologisch afwijkende erythrocyten (-fragmenten) zijn - zeker voor het minder geoefende oog - lastig te herkennen en beoordeling vraagt dus voldoende ervaring in microscopische differentiatie. Ofschoon door verruiming van de diagnostische criteria de diagnose TTP tegenwoordig vaker wordt gesteld, blijft het een aandoening met een lage incidentie en zal de vraag naar de aanwezigheid van schizocyten zeker niet dagelijks worden gesteld.

De vraagstelling leukemie is in het algemeen geen indicatie voor een cito microscopische differentiatie. Uitzondering hierop vormen de zeer hoge celaantallen die soms in het perifere bloed worden gemeten. Hierbij is een “pluis / niet-pluis” onderscheid, d.w.z. reactief versus anderszins, doorgaans voldoende. Er kan redelijkerwijs niet worden verwacht dat elke analist in staat is blasten te herkennen, maar wel dient deze adequate ondersteuning in te roepen bij de conclusie “niet-pluis”. Die ondersteuning dient dan uiteraard wel gewaarborgd te zijn!

Beoordeling van liquorpreparaten op het voorkomen van de leucocyten en de globale differentiatie van deze preparaten bij de vraagstelling meningitis hoort in principe geen probleem te zijn. Elke analist mag in staat worden geacht onderscheid te kunnen maken tussen lymfo- en monocytenerzijds en granulocyten anderzijds. Problemen bij deze vraagstelling vloeien eerder voort uit relatieve onbekendheid met het type materiaal en het vervaardigen van (cytopspin)preparaten.

Een eenduidige conclusie ligt hier niet voor de hand: een deel van de afwijkingen is vrij eenvoudig vast te stellen, zelfs door analisten met weinig ervaring in microscopische differentiaties. Maar dat geldt zeker niet voor alle afwijkingen! Een adequate “back-up” om in geval van twijfel op terug te kunnen vallen is dan ook beslist noodzakelijk. Dit geldt in ieder geval in die situaties waarin alle dienstdoende analisten in staat moeten zijn microscopische differentiaties dienen uit te kunnen voeren tijdens de dienst.

### Vraag –3-

Is op grond van wetenschappelijk onderbouwd onderzoek de microscopische differentiatie het meest effectieve instrument bij het stellen c.q. uitsluiten van die diagnoses, of zijn er alternatieven die kwalitatief vergelijkbare (of bruikbaarere) informatie opleveren?

Een eenduidig standpunt is uit de hieronder geciteerde artikelen niet te destilleren. Wat bij de diverse searches in de literatuurbestanden opvalt is dat in publicaties van meer dan 5-10 jaar geleden aan de microscopische differentiatie een doorslaggevend belang werd toegekend, maar dit in recentere artikelen (zie categorie **contra**) veelal niet meer zo is.

Deze verschuiving in opvatting valt onder andere op bij de diagnose neonatale sepsis. Dit is een van de weinige indicaties waar de communis opinio gold dat altijd een microscopische differentiatie moest worden verricht omdat dit de meest betrouwbare en relevante informatie biedt om de diagnose te kunnen stellen c.q. uitsluiten. In de literatuurlijst zijn een tweetal meta-analyses en een literatuurstudie 1966 tot 1994 (artikelen 52-54) over dit onderwerp opgenomen. Deze publicaties schetsen een somber beeld over de kwaliteit van de microscopische differentiatie (en ook CRP) bij het vaststellen van sepsis bij neonaten. De auteurs van deze artikelen stellen: methodologische verschillen tussen diverse artikelen maken conclusies vrijwel onmogelijk en de conclusies die getrokken kunnen worden

wijzen uit dat geen enkele parameter echt bruikbaar is, althans statistisch voldoende significante informatie biedt.

Toch laten de meeste artikelen zien dat de microscopische differentiatie nog steeds tot het standaard screeningspakket hoort bij verdenking (neonatale) sepsis, ofschoon de sensitiviteit, specificiteit, etc. bij vergelijkend onderzoek niet echt indrukwekkend zijn. De artikelen in de eerste paragraaf (1 t/m 32) geven het scala aan uitkomsten (varierend van “geen extra informatie biedend” tot “goede voorspellende waarde”) goed weer.

Zijn er dan geen alternatieven? Zeker wel, maar ook hier geldt dat de meningen verdeeld zijn en bovendien bieden deze nieuwere technieken slechts een oplossing voor een deel van het probleem.

### **Neonatale sepsis**

Bij verdenking (neonatale) sepsis kan de (laboratorium)specialist tegenwoordig kiezen uit een scala van bepalingen die – in meer of mindere mate – geautomatiseerd kunnen worden uitgevoerd en geïnterpreteerd. De belangrijkste bepaling uit deze groep is het CRP.

### **CRP**

Ofschoon de vroegste publicaties met betrekking tot CRP nog sceptisch tegenover deze bepaling stonden en de voorkeur aan de microscopische differentiatie gaven, veranderde deze opvatting in de loop der jaren geleidelijk in een meer positief oordeel. De meer recente publicaties (zie lijst) laten een voorkeur voor CRP als indicator voor neonatale sepsis zien. Een aantal auteurs geeft aan dat de combinatie met een totale leucocytentelling (al dan niet met dif) de PPV (positive predictive value) verder kan verhogen, maar anderen spreken dit weer tegen. Wel blijken er bij hetzelfde type aandoening individuele verschillen in de regulatie van de acute fase respons te bestaan en zal het CRP niet altijd stijgen (57). Ook kan bij neonaten de lever soms nog niet in staat zijn om op sepsis te reageren met de synthese van CRP.

Het grote voordeel van de CRP bepaling is dat deze inmiddels vrijwel overal in den lande volledig geautomatiseerd (op routine chemie apparatuur) en dus ook zonder al te veel problemen buiten de kantooruren kan worden uitgevoerd.

### **IL-1beta, IL-6, IL-8, TNF-alfa, procalcitonine**

De afgelopen jaren verschenen talloze artikelen over de rol van interleukines in het ontstekingsproces. Inmiddels is van een aantal van deze interleukines de concentratie met relatief eenvoudige middelen vast te stellen, ofschoon deze technieken zich doorgaans niet voor een “cito-pakket” lenen. Procalcitonine kan inmiddels via een eenvoudige test semi-kwantitatief worden bepaald.

Wederom geldt dat de meningen niet eensluidend zijn, ofschoon procalcitonine, IL-1beta, IL-8 en IL-6 in combinatie met CRP of TNF-alfa gevoelige parameters zijn.

### **Trombopenie, leukemie, TTP.**

Alle nieuwere testen ten spijt blijven er een aantal indicaties (trombopenie, acute leukemie, TTP, HUS) over die zich niet zo eenvoudig laten testen en waarbij de microscopische differentiatie toch uitkomst zal moeten bieden. Weliswaar zijn de nieuwste hematologie analysers steeds beter in staat de diverse cellulaire componenten binnen het perifere bloed van elkaar te onderscheiden en te benoemen, maar vooralsnog blijven er voor dit soort apparatuur een aantal “blinde vlekken” (o.a. trombocyten klontjes) die additionele beoordeling noodzakelijk maken.

## **Samenvatting en conclusies**

De meerwaarde van de microscopische differentiatie wordt de laatste jaren voor een aantal indicaties steeds vaker ter discussie gesteld. Een van de gedoodverfde indicaties voor het uitvoeren van een microscopische differentiatie - verdenking neonatale sepsis – lijkt gezien de meer recente publicaties op dit terrein toch niet te kunnen worden gehandhaafd. Recente publicaties – waaronder twee meta-analyses – plaatsen toch de nodige kanttekeningen bij de diagnostische meerwaarde van de differentiatie.

De overige indicaties blijven gehandhaafd met dien verstande dat er een continue ontwikkeling is op het gebied van hematologie analysers en er op dat terrein ongetwijfeld nog de nodige ontwikkelingen te verwachten zijn.

Terug naar de vraag of elke analist een microscopische differentiatie uit moet kunnen voeren, of dat dit beperkt dient te worden/blijven tot een beperkte groep.

Op grond van bovenstaande afwegingen lijkt de conclusie gerechtvaardigd dat de microscopische differentiatie tot een beperkte groep analisten beperkt moet worden/blijven. Enerzijds is op grond van de beschikbare gegevens een reductie van het aantal aanvragen voor microscopische differentiatie mogelijk/wenselijk/reëel; anderzijds is in die gevallen waarin een microscopische differentiatie wel noodzakelijk is, de vraagstelling dermate complex dat dit niet tot het ervaringsdomein van de gemiddelde analist kan worden gerekend.

## **Aanbevelingen**

De werkgroep stelt de volgende aanbevelingen voor:

1. Streef naar een beperkt aantal – duidelijke omschreven - indicaties voor een microscopische differentiatie in de diensten. Spreek deze indicaties door met de betrokken aanvragend specialisten (en arts-assistenten).
  - Verdenking leukemie met zeer hoge celaantallen (indicatie tot spoed cytaferese)
  - Verdenking trombotische trombocytopenische purpura of HUS (schizocyten)
  - Hemodynamisch instabiele oudere patiënt met normaal aantal leucocyten en verdenking sepsis.

Hierbij wel de kanttekening dat ofschoon de vraag trombopenie of pseudo-trombopenie op zichzelf geen indicatie is, analisten dit onderscheid wel moeten kunnen maken.

2. Beperk het aantal analisten dat zelfstandig een microscopische differentiatie uit moet kunnen voeren, maar voer een actief beleid om het kennisniveau van deze groep op voldoende niveau te houden.
  - Deelname aan bijscholingen / cursussen
  - Deelname aan kwaliteitsronzendingen morfologie (en evt. immunologie)
3. Onderzoek de haalbaarheid van de bepaling van alternatieve markers ter bevestiging c.q. uitsluiting van sepsis.
  - CRP (hoort eigenlijk al in het pakket te zitten)
  - Procalcitonine
  - IL-6 (wanneer hiervoor eenvoudige tests op de markt komen)
4. Stel een bereikbaarheids- / achterwachtdienst in voor complexe vraagstelling microscopische differentiatie.
  - Beperk het aantal indicaties (schizocyten, blasten, linksverschuiving)

- Zorg voor een adequate overlegmogelijkheid met de achterwacht van het lab (klinisch chemicus / arts klinische chemie / hematoloog).
- Een mogelijkheid is om in diensten microscopische differentiatie aanvragen naar één regionaal centrum te sturen.



## Bijlage

Synopsis internet-searches op indicatiestelling (cito) microscopische differentiatie

### Artikelen waarin de waarde van leuco-telling en leuco dif wordt beoordeeld.

#### Pro-

1. Barbara Snapp, An overview of sepsis in the newborn. WBC met dif kan diagnose sepsis wel ondersteunen en eventueel verduidelijken, maar is op zichzelf niet diagnostisch.
2. Christensen et al. The leucocyte left shift in clinical and experimental neonatal sepsis. J Pediatr. 1981, 98, 101-105. I/T ratio neutrofielen geeft een goede indruk van eventuele depletie beenmerg voor neutro's en dood door sepsis. Percentage staven was een minder goede maat.
3. Conclusie idem in Rodwell et al Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic newborns. Pediatr Infect Dis J 1993, 12, 372-376
4. Rodwell et al. J Pediatr 1988; 112(5): 761-767. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. Bij 298 neonaten met verdenking sepsis werd een scoringsstelsel van 7 parameters gebruikt waaronder aantal leuco's, aantal neutro's, onrijp/rijp granulo ratio. De meeste neonaten met een sepsis scoorden  $\geq 3$  op deze 7 testen. De likelihood voor afwezigheid van sepsis was 99% bij een score van kleiner of gelijk aan 2.
5. Misra et al. Indian Pediatr. 1989; 26(2): 156-160. Simple hematological tests for diagnosis of neonatal sepsis. De auteurs concluderen dat een combinatie van band/tot neutro's, leucopenie en BSE de beste combinatie was om neonatale sepsis aan te tonen.
6. Clodfelter. Emerg Med Clin North Am 1986; 4; 59-74. The peripheral smear. Geeft aan dat de dif in cito situaties nodig kan zijn bij : bloedingsstoornissen, anemie, infectieziekten, en verdenking leukemie.
7. Wasserman et al. J.Am Geriatr Soc 1989;37:537-543. Utility of fever, WBC, and differential count in predicting bacterial infections in the elderly. Conclusie: bij ouderen met plotselinge verandering in gezondheidstoestand met of zonder koorts kan toch een infectie oorzaak zijn en dient WBC + dif te worden overwogen.
8. Zelada Blood cell count in neonatal bacterial infections. Rev Chil Pediatr 1989, 60, 142-147. I/T ratio  $> 0,2$  meest frequente afwijking bij neonaat in vroege stadium van infectie.
9. Rodwell et al. Pediatr Infect Dis J 1993. 12(5): 372-376. Hematologic scoring system in early diagnosis of sepsis in neutropenic patients. Bij 1000 pasgeborenen werd prospectief gekeken naar het ontstaan van neutropenie en mogelijk ontstaan van sepsis. Een combinatie van de mate van neutropenie + verhouding rijpe vs immature granulocyten bleek waardevolle prognostische informatie te geven.

#### Intermediair standpunt

10. Gombos et al: The absolute neutrophil count: is it the best indicator for occult bacteremia in infants? Am J Clin Pathol 1998, 109: 221-225. Conclusies: WBC count is een goede indicator voor een occulte bacteriaemie, het absoluut aantal neutro's is net zo sensitief, maar waarschijnlijk meer specifiek dan WBC count, absoluut aantal neutro's machinaal geteld zijn vergelijkbaar met manuele tellingen en telling van staven is ongevoelig en voegt niets toe aan de PPV.
11. Tollner et al: Septicemie in the newborn due to gram-neg bacilli. Risk factors, clinical symptoms and hematological changes. EUR. J Pediatr 1976, 123, 243-254. Leucocount (mn daling) en % staven veranderen met name bij begin infectie.
12. Alexejew et al. The significance of various hematological parameters for the early diagnosis of bacterial infection in premature and full-term neonates..... Pediatr Grenzgeb. 1990, 29, 433-442. 12 uur na geboorte piek in WBC en totaal neutro-aantal, daarna daling. Fysiologische linksverschuiving gedurende eerste levensdagen. Na vijf dagen meer lymfo's dan neutro's.
13. Gombos et al. Am J Clin Pathol 1998. 109. 221-225. The absolute neutrophil count. Is it the best indicator for occult bacteriaemia in infants. WBC is een goede indicator voor occulte bacteriaemie; telling van het absoluut aantal neutrofielen is net zo gevoelig als de WBC en

mogelijk iets meer specifiek; geautomatiseerde telling van neutrofielen is net zo bruikbaar als manuele telling van neutrofielen; telling van staven is een ongevoelige indicator en draagt niet bij aan diagnose.

### Contra

14. Oberhoffer et al: Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. Clin Chem Lab med 1999; 37(3) 363-368. Leucotelling heeft laagste PPV, sensitiviteit en AUC (area under curve bij ROC curve) als marker bij vaststellen van een sepsis.
15. Chang et al. Prognostic significance of marked leucocytosis in hospitalized patients. J Gen Intern Med 1991, 6, 199-203. "marked neutrophil leucocytosis" bepaling draagt niet significant bij tot vaststelling ernst ziekte en prognose hiervan. WBC piek wel goede maat.
16. Karitzky et al: Neonatal septicaemia and bacterial neonatal infection: Manifestation and course in early antibiotic therapy. Geburtshilfe Frauenheilkd 1986, 46, 37-42. Huidverkleuring, resp stoornissen, koorts, linksverschuiving en anemie met name nuttig bij diagnose sepsis bij neonaten.
17. Squire et al. Diagnosis of neonatal bacterial infection: hematologic and pathologic findings in fatal and nonfatal cases. Pediatrics 1979, 64, 60-64. WBC afwijkingen, dif afwijkingen en afwijkingen in trombotellingen zijn niet altijd bij bacteriële infecties aanwezig en normale counts sluiten dan ook geen sepsis uit.
18. Vergelijkbaar idee als voorgaand: Maszkiewicz et al. Results of histological examinations of afterbirth and other factors of infection risk in high-risk newborns. Bij leucoinfiltratie in placenta kwamen bij de neonat vaker een bacteriëmie, linksverschuiving en verlaagd aantal trombo's voor.
19. Idem verhaal van Maszkiewicz in Mater Med Pol 1991, 23, 111-116.
20. Koepke et al. A critical evaluation of the manual/visual differential leucocyte counting method. Blood Cells 1985, 11, 173-186. Leuco-dif onder 73 analisten in 5 ziekenhuizen ging goed. Schatting percentage staven leverde al meer problemen op. Range sensitiviteit van deze methode 34 – 100% afhankelijk van type afwijking.
21. Rumke Imprecision of ratio-derived differential leucocyte counts. Blood Cells 1985, 11, 311-314. Dif telling is zeer onnauwkeurig gezien het kleine aantal cellen dat geteld wordt.
22. Vergelijkbaar verhaal met pleidooi voor machinale telling in Bentley. Automated differential white cell counts: a critical appraisal. Ballieres Clin Hematol 1990, 3, 851-869.
23. Vergelijkbaar pleidooi met nadruk op kosten effectiviteit en minder fouten bij telling in analyser. Krause. Automated differentials in the hematology laboratory. Am J Clin Pathol 1990, 93, S11-16.
24. Idem verhaal door Pierre. The routine differential leucocyte count vs automated differential counts. Blood Cells 1985, 11, 11-23.
25. Procop et al. Am J. Clin Pathol 1997; 107; 114-121. Laboratory tests in evaluation of acute febrile illness in pediatric emergency room patients. Bij 155 kinderen < 15 jaar met WBC en 838 kinderen zonder WBC werd gekeken naar sensitiviteit, specificiteit, NPV en PPV bij WBC en infecties. Hierbij bleek dat de manuele dif slecht scoorde, de machinetelling had een veel betere performance. Overigens was bij een leuco aantal van > 15 de PPV voor antibiotische therapie ca. 94%!!! Conclusie: klinisch beeld biedt meer info.
26. Kramer et al. J Clin Epidemiol. 1993; 46; 349-357. Studie bij 2492 kinderen waarbij een volledige dif werd gedaan bleek het totale leucocyten aantal een redelijke LR ratio te hebben in het voorspellen van UWI, pneumonie, meningitis. Ook bleek dat het totaal aantal granulocyten en het aantal staven geen significante additionele bijdrage aan deze info toevoegden.
27. Wenz et al. Am J Clin Pathol 1986; 86; 298-303. The clinical utility of the leucocyte differential in emergency medicine. Conclusie: de meeste diffen leveren geen additionele info op t.o.v. info uit klinisch beeld, lichamenlijk onderzoek en totaal aantal leuco's.
28. Callahan. Ann Emerg Med 1986; 15; 774-781. Inaccuracy and expense of the leucocyte count in making urgent clinical decisions. De WBC biedt doorgaans op zichzelf geen betrouwbare schatting van de ernst van of oorzaak van ziekte en dient dus minder te worden aangevraagd.
29. Kupperman et al. Immature neutrophils in the blood smears of young febrile children. Arch Pediatr Adolesc Med 1999. 153. 261-266. Noch de absolute noch de relatieve telling van staven noch de ratio staven; segmentkernigen kan een significant onderscheid maken tussen virale luchtweginfecties en bacteriële infecties bij jonge kinderen.
30. Korppi et al. Eur Respi J 1997; 10; 1125-1129. WBC, CRP and ESR in pneumococcal pneumonia in children. Uit deze studie blijkt dat CRP in beperkte mate onderscheid kan maken tussen wel of geen pneumococcale pneumonie. De dif droeg hier niet toe bij.

31. Ardron et al. Band neutrophil counts are unnecessary for the diagnosis of infection in patients with normal leucocyte counts. *Am J Clin Pathol* 1994. 102. 646-649. Bij een 500 cel dif blijkt de absolute telling van neutrofielen en van cellen jonger dan staven wel van belang bij onderscheid wel/niet infectie. Telling van het aantal staven (absoluut/relatief) biedt geen extra info. De auteur heeft ook de literatuur nagezocht op het eventuele belang van tellen van staven en komt hierbij tot dezelfde conclusie als in zijn onderzoek: klinische beoordeling + machinale hematologische parameterbeoordeling biedt voldoende info.
32. Kramer et al. Role of the complete blood count in detecting occult focal bacterial infection in the young febrile child. *J Clin Epidemiol* 1993. 46. 349-357. Bij jonge kinderen met een hoge WBC heeft noch een verhoogde neutro-count, noch een verhoogd aantal staven een significante verhoging in de LR-ratio voor een occulte pneumonie of bovenste luchtweginfectie tot gevolg. Deze resultaten werden in een multiple regressie logistische analyse bevestigd.

### **Vergelijk CRP en leuco(diff)**

33. Mathers et al: Diagnostic audit of CRP in neonatal infection. *EUR J Pediatr* 1987, 146: 147-151. I/T (immature/totaal leuco's) eerder positief dan CRP. CRP meer ter bevestiging van infectie en niet bij vroeg diagnostiek.
34. Chan et al. Usefulness of C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. *Singapore Med J* 1997. 38(6). 252-255. Een CRP > 7 mg/L en afwijkende trombotellingen zijn gevoelige parameters bij vroege diagnostiek sepsis in neonaten. Afwijkende leucotelling evenals het absoluut aantal granulocyten hebben slechts een lage sensitiviteit en specificiteit.
35. Krediet et al. *J. Perinat Med* 1992, 20 (6): 479-485. The predictive value of CRP and I/T ratio in neonatal infection. Bij onderzoek onder 185 neonaten naar de bruikbaarheid van CRP en I/T ratio bij early-onset en late-onset bleek de PPV gering. De negatieve voorspellende waarde was wel hoog, maar de kans op sepsis was ook klein. Ergo: weinig bruikbare tests voor neonatale sepsis.
36. Berger et al. *Eur J Pediatr*: 1995: 154(2):138-144. Comparison of CRP and WBC with differential in neonates at risk for septicaemia. Bij 195 preterme en a terme ernstig zieke neonaten werden CRP en WBC resultaten getest. In de eerste drie dagen na de geboorte zijn CRP, leucopenie en neutropenie de beste markers, na drie dagen is CRP de beste enkelvoudige test. De I/T ratio, staven, etc kwamen er minder goed uit.
37. Speer et al. *Monatsschr Kinderheilkd* 1985: 133: 665-668. Early diagnosis of neonatal infection. Hier blijkt de I/T ratio van neutrofiële granulocyten in combinatie met CRP gevoelig en bruikbaar bij detectie sepsis.
38. Mathers et al. *Eur J Pediatr* 1987: 146(2): 147-151. Diagnostic audit of CRP in neonatal infection. Vinden dat CRP pas 24 uur na begin klinische verdenking op sepsis positief wordt.
39. Russell et al *Arch Dis Child* 1992: 67(7): 808-812. ROC-curves for comparison of serial neutrophil band forms and CRP in neonates at risk of infection. Conclusies: CRP scoorde goed, de I/T ratio en percentage staven scoorden minder goed op onderdelen (specificiteit en sensitiviteit).
40. Ang et al. *J Singapore Paediatr Soc* 1990;32;159-163. The usefulness of CRP and I/T ratio in early diagnosis of infections in Asian newborns. Conclusie: CRP komt er beter uit. De combinatie CRP en I/T verhoogt wel de specificiteit maar niet de sensitiviteit.
41. Philip *JAMA* 1982;22-29;247; 489-492. Detection of neonatal sepsis of late onset. Combinatie van 5 testen (CRP, BSE, tot leuco's, I/T ratio en BSE) werd getoetst als sepsis screen en bleek goed te voldoen als diagnostisch instrument voor sepsis voor en na eerste week.
42. Chan et al *Singapore Med J* 1997; 38; 252-255. Usefulness of CRP in the diagnosis of neonatal sepsis. Bij een vergelijk met abnormale leucodif en afwijkend aantal neutro's is CRP een veel betere maat voor de screening op neonatale sepsis.
43. Anwer et al. *JPM J Pak Med Assoc* 2000; 50; 94-98. Rapid identification of neonatal sepsis. De auteurs hebben een aantal parameters vergeleken (aantal leuco's, aantal neutro's, I/T ratio neutro's, aantal trombo's en CRP) voor snelle diagnose neonatale sepsis en concluderen dat geen van de testen separaat echt betrouwbaar was, maar de combinatie wel kan helpen de diagnose binnen enkele uren te stellen.

### **Nieuwe markers voor sepsis**

44. Buck et al: IL-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* 1994, 93: 54-58. IL-6 in combinatie met CRP als sensitieve screen op neonatale infecties.
45. Doellner et al. Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis, *J Pediatr* 1998, 132, 295-299 Ook hier scoort IL-6 goed als marker voor neonatale sepsis.
46. Doelnerr et al. Increased serum concentration of soluble tumor necrosis factor receptors p55 en p75 in early onset neonatal sepsis. *Early Hum Dev.* 1998. 52. 251-261. TNF receptors zijn diagnostisch minder goede parameters dan CRP bij begin neonatale sepsis.
47. Proefschrift Eveline de Bont: Inflammation and Cancer –related cytokine production in immunocompromised hosts. 1999. Hierin worden IL-6 en IL-8 genoemd als mogelijke prognostische factoren die een indicatie geven welke oncologische patiënten wel en welke niet adequaat op een infectie zullen reageren. Tevens concludeert de auteur dat de combinatie van IL-6 en TNF-alfa mogelijk een sepsis bij pasgeborenen kunnen voorspellen en stelt voor deze markers voor de detectie van neonatale sepsis verder uit te testen.
48. Franz et al. *Pediatr Inf Dis J* 1999, 18(8): 666-671. Comparison of pro-calcitonin with IL-8, CRP and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants. Bij 197 neonaten werd bij eerste verdenking op sepsis het in de titel vermelde pakket bepaald. Hieruit bleek dat de combinatie van IL-8 en CRP een sensitiviteit van 91% en specificiteit van 73% gaven bij detectie van een infectie. Procalcitonine bleek geen goede maat.
49. Chiesa et al *Clin Infet Dis* 1998;26;664-672. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. In dit artikel wordt procalcitonine als een bruikbare marker voor de diagnose van vroege- en late onset sepsis in neonaten bevonden.
50. Doellner et al. *J Pediatr* 1998;132(2); 295-299. IL-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. IL-6 heeft een redelijke sensitiviteit en specificiteit in diagnostiek van sepsis bij neonaat. Maar de combinatie met CRP verhoogt dit nog aanzienlijk (sens 96% en spec 74%, PPV 49%).
51. Silveira et al. *Acta Paediatr* 1999; 88 (6); 647-650. Evaluation of IL-6, TNF-alpha and IL-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis. Conclusie: combinatie van IL-6 en TNF-alfa is een zeer sensitieve markercombinatie for de detectie van sepsis direct postnataal.

### **Meta-analyses en literatuuroverzicht**

52. Orlando da Silva et al. *Pediatr Infect Dis J* 1995. 14.362-366. Accuracy of leucocytic indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. Meta-analyse van het nut van CRP en leuco-indices bij vermoeden sepsis in neonaten. Conclusie: zowel CRP als leuco-indices zijn op zichzelf geen betrouwbare parameters bij vaststellen sepsis gegeven het feit dat de resultaten sterk afhankelijk zijn van de methode en doelgroep.
53. Fowlie et al. *Arch Dis Fetal Neonatal Ed* 1998. 78. F92-F98. Een vergelijkbaar verhaal met een nog somberder conclusie: 670 artikelen onderzocht: methodologische kwaliteit van deze artikelen beneden peil en er sprong geen duidelijke indicator uit die bruikbaar was in het voorspellen van bacteriele infectie.
54. Da Silva et al. *Pediatr Infect Dis J.* 1995;14(5): 362-366. Accuracy of leucocyte indices and CRP for the diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. Een database search vanaf 1966 tot 1994 over de bruikbaarheid van leucodif en CRP bij neonaten verdacht van sepsis liet een gigantische heterogeniteit in methoden, vraagstellingen etc zien. Data konden derhalve niet gepooled worden en werden alleen als ranges weergegeven.

### **Diversen**

55. Ward. *Clin Chem* 2000: 46(8); 1215-1220. The CBC at the turn of the millenium: an overview. In deze review wordt in het kort de ontwikkeling, huidige voor- en nadelen van automatische hematologie analysers geschetst. Conclusie luidt dat microscopische differentiatie vooralsnog onmisbaar is bij een afwijkingen in het bloed (blasten, schizocyten, etc).
56. Haem 1999. 21. 365-368. Early diagnosis of septicaemia in preterm infants from examination of peripheral blood films. In dit report een beschrijving van vier gevallen van sepsis bij pre-terme

kinderen waarbij in de granulocyten bacterien konden worden gezien, vermoedelijk tgv verminderde bactericide mechanismen van de granulocyten bij te vroeg geboren.

57. Gabay et al. NEJM 1999: 340: 448-453. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. Een kort overzicht van het mechanisme van acute fase reacties. Hierin wordt aangegeven dat regulering van de acute fase respons tussen individuen bij een zelfde type infectie niet gelijk hoeft te zijn en er dus variaties in de concentratie van acute fase eiwitten op kan treden.

Het bovenstaande is een selectie uit een schier eindeloze reeks artikelen op het gebied dat de termen "Sepsis, WBC, differential en diagnosis" omvat. Elke afzonderlijke search leverde telkens een nieuwe reeks artikelen op met min of meer dezelfde strekking.