



# Place du dosage des fractions de la bilirubine pour la prise en charge néonatale d'un ictère

*Agnès Mailloux*

Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP)  
Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien – AP-HP - Paris

**2<sup>ème</sup> Journée « Yves Brossard »  
d'hémobiologie fœtale et néonatale**

Jeudi 11 janvier 2018  
Auditorium – Hôtel de Ville de Paris

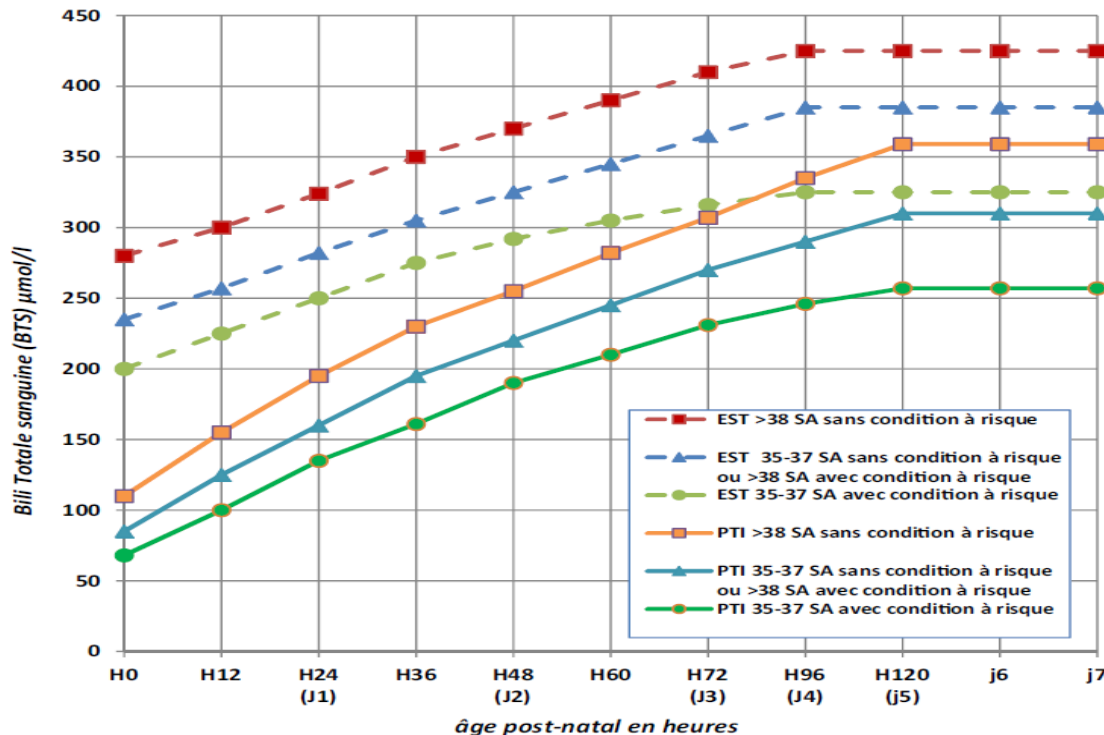
# IMPORTANCE DU DEPISTAGE DE L'ICTERE

- Ictère néonatal : 2/3 des nouveau-nés
- Prévenir hyperbilirubinémie sévère à l'origine de complication neurologique grave : **ictère nucléaire**
- Hyperbilirubinémie : prise en charge sans retard
- **Dosage de bilirubine** : préalable à toute décision thérapeutique quel que soit le mode de dépistage de l'ictère

# DOSAGE DE LA BILIRUBINE TOTALE

## BESOINS CLINIQUES

**Recommandations SFN 2017** sur le dépistage et surveillance de l'ictère, prise en charge et traitement, organisation de la sortie de maternité et suivi.



Une variation de +/- 10 % de valeur de bilirubine totale a des conséquences pour démarrer ou arrêter un traitement

**Indications de photothérapies** données selon le dosage sanguin de bilirubine totale (pondéré par âge postnatal et présence ou non de risque associés)

# EVALUATION NON INVASIVE DE LA BILIRUBINEMIE

## BILIRUMETRE TRANSCUTANE (Btc)

- Moyen le plus rapide de dépistage et de quantification de l'hyperbilirubinémie
- **TROD JORF n°0181 du 5 août 2016 - texte n° 47**  
« Arrêté du 1er août 2016 déterminant la liste des tests, recueils et traitements de signaux biologiques qui ne constituent pas un examen de biologie médicale, les catégories de personnes pouvant les réaliser et les conditions de réalisation de certains de ces tests, recueils et traitements de signaux biologiques »
- corrélation Btc/dosage de bilirubine totale (aide du laboratoire)

# DOSAGE DE LA BILIRUBINE TOTALE

## BESOINS CLINIQUES

### Circonstances imposant un dosage de bilirubine totale

#### En urgence (2 h) :

- absence de résultat affiché du Btc
- ictère précoce
- valeur du Btc dépassant le 95<sup>e</sup> percentile du nomogramme.

#### En 6 h :

- Btc > 250  $\mu\text{mol/L}$
- Btc 75<sup>e</sup> percentile du nomogramme
- Btc avec valeur d'indication de photothérapie
- discordance entre l'évaluation visuelle de l'ictère et le Btc
- contrôle d'efficacité de la photothérapie en cours de séance et dans les 24 h qui suivent.

# DOSAGE DE BILIRUBINE TOTALE

## ROLE DU LABORATOIRE

### Répondre aux besoins cliniques

Fournir un résultat dans un délai compatible avec la prise en charge  
(recours à la biologie délocalisée si besoin)

Fournir une valeur exacte de bilirubine

Avoir un maximum de  $\pm 10\%$  entre les techniques

Nombreuses méthodes disponibles sur un grand nombre  
d'analyseurs

Bonnes Précisions : CV intra-laboratoire 1 à 2 %

### MAIS

Erreurs systématiques dans la mesure avec des CV interlaboratoires  
pouvant atteindre 15 à 20 %

car calibrants fournis par industriels non raccordés au matériel de  
référence (SRM 916 épuisé)

### PROBLEME ACTUEL :

échec de la standardisation du dosage de bilirubine

# DOSAGE DE BILIRUBINE TOTALE

## ESSAIS D'HARMONISATION

### Objectif de l'harmonisation

- Identifier les méthodes non standardisées
- Besoin d'avoir un matériel commutable avec une valeur assignée à l'aide d'une méthode de référence
- Répondre aux besoins cliniques d'avoir une valeur exacte au niveau des seuils de décision thérapeutique

# DOSAGE DE BILIRUBINE TOTALE

## ETUDE DE COMMUTABILITE - HUEP

### Identification d'un calibrant commutable pour réaliser une calibration *in silico*

## ETALON BNL

Reference method value  
Amount of substance concentration of bilirubin

Calibration laboratory  
Material of investigation  
Lot  
Manufacturer  
Customer  
Method  
Period of measurements

Reference laboratory II of the RfB  
Calibrator for bilirubin  
BE1449  
Laboratoire national de métrologie et  
d'essais (LNE)  
LNE  
Proposed IFCC reference method  
15.12.2014 to 18.12.2014

Code no. 1030

Analyte	Reference method value <sup>1</sup>	Uncertainty of measurement <sup>2</sup>	Number of accepted results
Bilirubin	287,4 µmol/L	6,3 µmol/L	4 Series on 2 Days
	16,80 mg/dL	0,37 mg/dL	12 Single values
		2,2 %	

One specimen was thawed on the first measurement day for series 1 and series 2.

One specimen was thawed on the second measurement day for series 3 and one for series 4.

<sup>1</sup> The reference method value is the mean of all single values of all measurement days

<sup>2</sup> The uncertainty of measurement is the combined expanded uncertainty.  
The coverage factor is  $k = 2,0$  Degrees of freedom:  $\nu = >50$

The uncertainty takes into account:  
Standard error of the mean of the means  
Standard uncertainty of the adjustment of the wavelength  
Standard uncertainty of the spectrometric measurement  
Standard uncertainty of the volume fraction of sample  
Standard uncertainty due to the drift of the baseline  
Standard uncertainty due to stray light  
Standard uncertainty due to aging, evaporation and time measurements

The estimation of the uncertainty was performed according to the "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement".

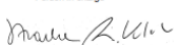
Note: The coefficient of variation (CV) of the combined single values is 1,0 %.

Hannover, 2014-12-18

Head of the calibration laboratory

Person in charge

  
Dr. D. Grote-Koska

  
R. Strache/R. Klauke

Laboratories	SAINT-ANTOINE Hospital
	Lab 1 : CNRHP
	Lab 2 : LBU
	Lab 3 : Biochemistry lab
	TROUSSEAU Hospital
	Lab 4 : Biochemistry lab
TENON Hospital	Lab 5 : Biochemistry lab

Analyzers	Indiko Thermo-scientific
	AU640 Beckman-Coulter
	DCX 800 Beckman-Coulter
	Architect ABBOTT
	Modular Roche

Methods	Method 1: Diazo Beckman / Indiko (Lab 1)
	Method 2: Spectral / Indiko (Lab 1)
	Method 3: Diazo Beckman / DCX 800 (Lab 2)
	Method 4: Spectral / DCX 800 (Lab 2)
	Method 5: Diazo / AU640 (Lab 3)
	Method 6: Diazo Abbott / Architect (Lab 5)
	Method 7: DPD / Roche Modular (Lab 4)
	Method 8: Synermed / Roche Modular (Lab 4)

	BNLSEG	BNLAEG	HANL	HANH	PBQ
Method 1: Diazo Beckman / Indiko (Lab 1)	C	C	C	C	C
Method 2: Spectral / Indiko (Lab 1)	NC	NC	C	C	NC
Method 3: Diazo Beckman / DCX 800 (Lab 2)	C	NC	I	C	NC
Method 4: Spectral / DCX 800 (Lab 2)	NC	C	C	NC	I
Method 5: Diazo / AU640 (Lab 3)	C	C	C	C	NC
Method 6: Diazo Abbott / Architect (Lab 5)	C	C	C	C	NC
Method 7: DPD / Roche Modular (Lab 4)	C	C	C	C	NC
Method 8: Synermed / Roche Modular (Lab 4)	C	C	C	C	NC

### STANDARDIZATION OF SERUM TOTAL BILIRUBIN MEASUREMENT FOR IMPROVED DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF NEONATAL JAUNDICE

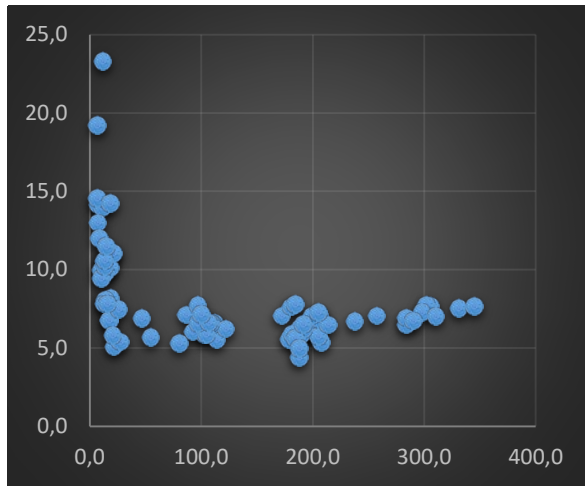
Vincent DELATOUR, Michel VAUBOURDOLLE, Elisabeth LASNIER, Nathalie MARIO,  
Sophie BAILLEUL, Marie-Clotilde HAGUE and Agnès MAILLOUX, EUROMEDLAB, Athènes  
Juin 2017



# DOSAGE DE BILIRUBINE TOTALE

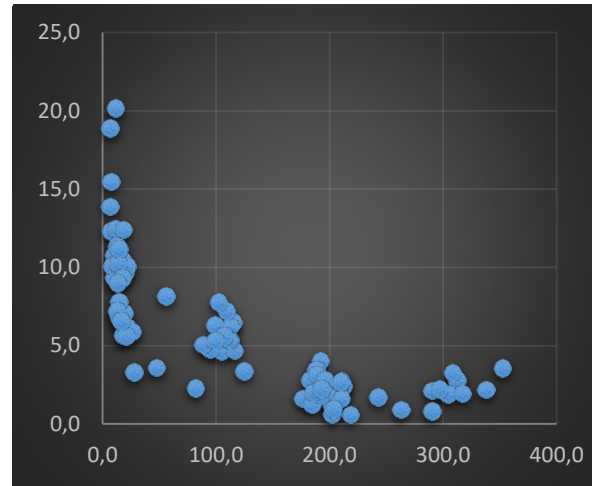
## ETUDE DE COMMUTABILITE - HUEP

Ecart inter-laboratoires –  $CV\% = f(c)$



**CV moyen = 5,5 %**

**Données non corrigées**



**CV moyen = 2,0 %**

**Correction 1 point**

**BNLAEGa 287,4  $\mu\text{mol/L}$**

Réduit les différences inter-laboratoires  
(zones de valeurs moyennes et hautes)

Pas d'effet sur les valeurs basses



# DOSAGE DE BILIRUBINE TOTALE

## GROUPE DE TRAVAIL SFBC



L'objectif du groupe de travail est

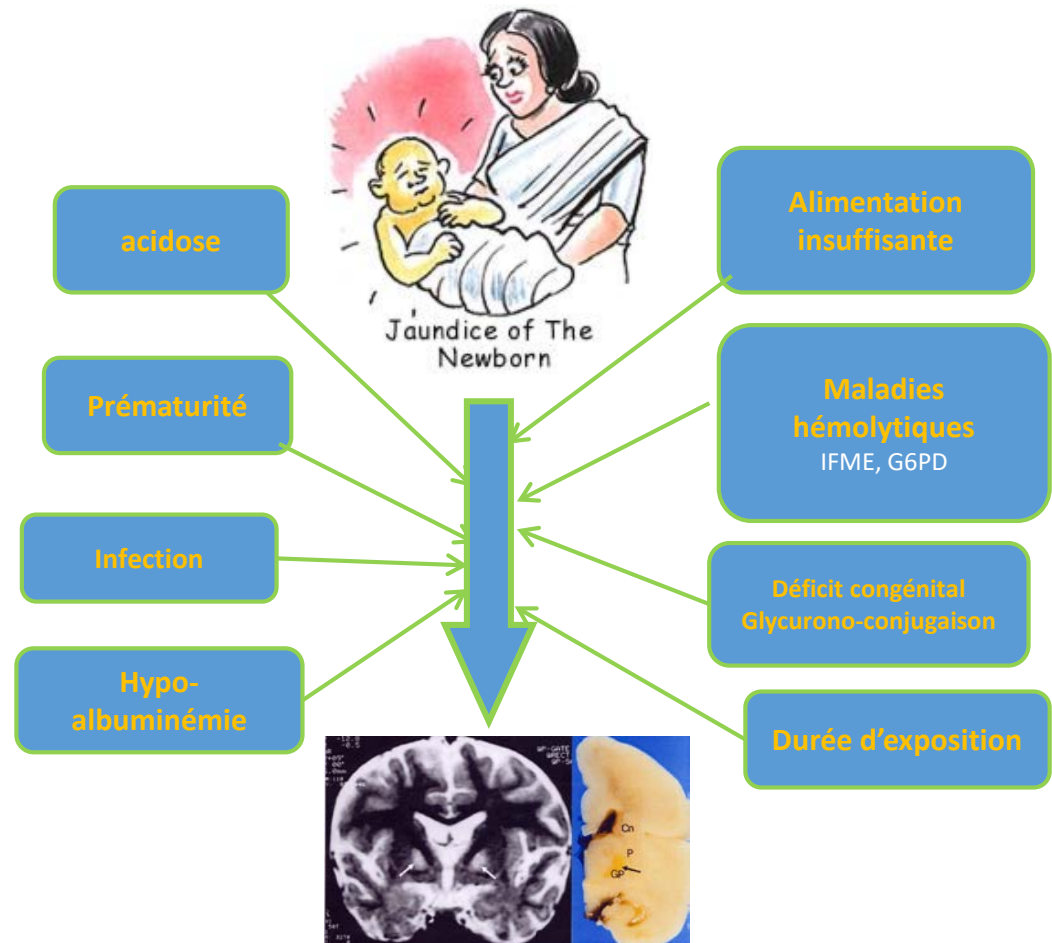
- en réunissant des biologistes médicaux en relation avec des unités de néonatalogie,
- de progresser dans l'harmonisation des méthodes de mesure de la bilirubine totale
- en utilisant un **calibrant raccordé** au matériau de référence international et des **échantillons de contrôle commutables** possédant une valeur assignée.

Une collaboration avec le Laboratoire National d'Essais (LNE) sera nécessaire pour mener ce travail.

# PLACE DU DOSAGE DE LA BILIRUBINE TOTALE DANS LES FORMES SEVERES

**La neuro-toxicité de la bilirubine est majorée dans un certain nombre de conditions**

- Processus hémolytique
  - Age gestationnel 35-37 SA
  - *acidose, hypoxie*
  - *Infection*
  - Trouble de la régulation thermique
  - Hyperexcitabilité, léthargie, refus de boire
- adaptation thérapeutique

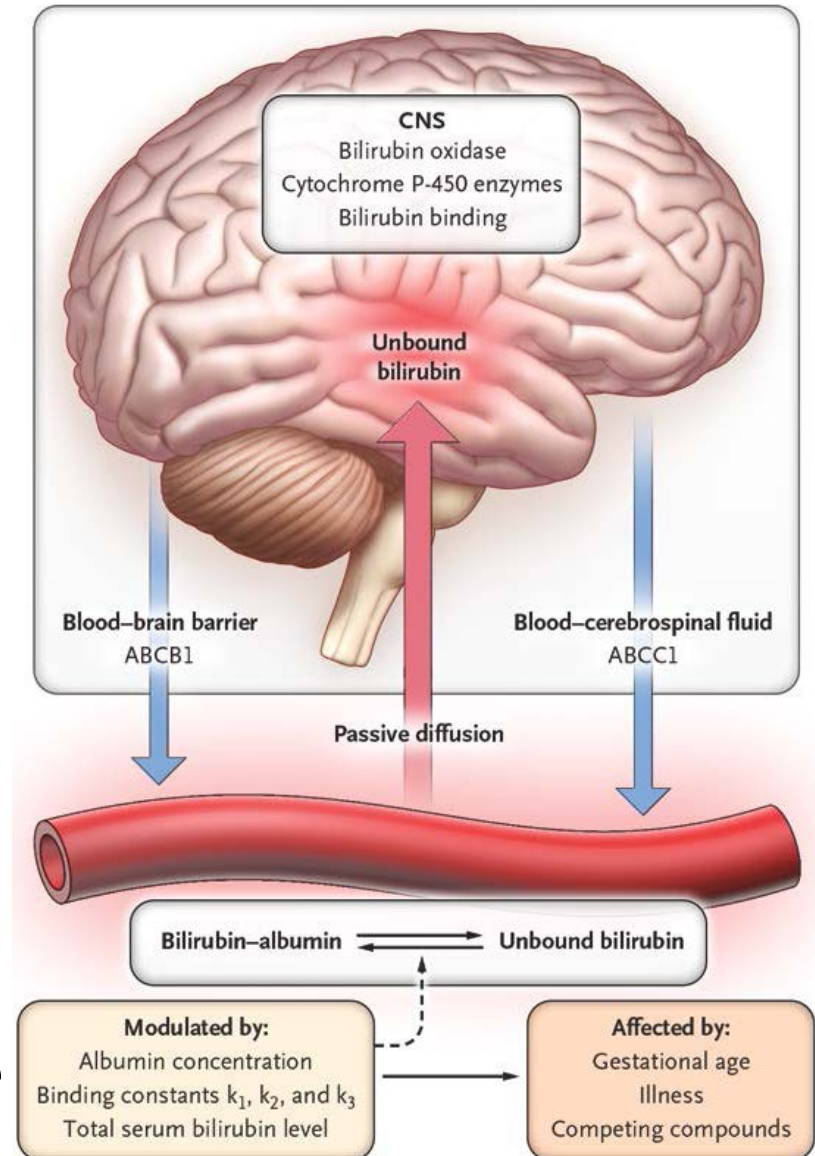


**Risque majoré d'ictère nucléaire**

# HYPERBILIRUBINÉMIE ET NEUROTOXICITÉ

- **Hyperbilirubinémie sévère :**  
bilirubine totale (BTS)  $>340 \mu\text{mol/L}$
- **Mais :**
  - $\frac{3}{4}$  des ictères nucléaires surviennent pour BTS  $>515 \mu\text{mol/L}$
  - Pas de vraie valeur seuil de BTS
  - Mécanismes mal connus
  - Tous les enfants ne sont pas égaux

**Dosage de la bilirubine non liée  
= meilleur marqueur de neuro-toxicité**



Watchko JF, Tiribelli C, NEJM, 2013

# LIAISON BILIRUBINE-ALBUMINE

## CARACTERISTIQUES

Bilirubine NC+ Albumine  $\rightleftharpoons$  Bilirubine NC- Alb



$K = \text{constante de liaison } 10^7 \text{ l.mol}^{-1}$

**BNL = Bilirubine non liée à l'albumine**

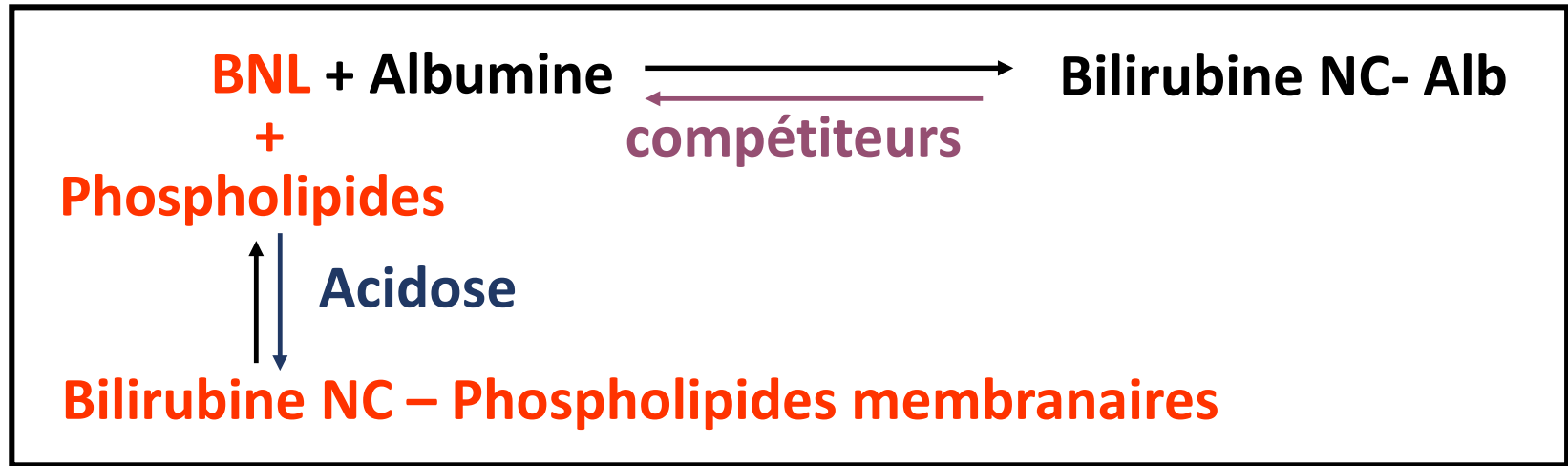
**K très fort : BNL dans le plasma très faible**

**0 – 3  $\mu\text{g/dl}$  ou 0 – 50  $\text{nmol/l}$**

- **1 site principal de fixation** (sites secondaires d'affinité plus faibles)
- **Site non spécifique ouvert à de nombreux compétiteurs endogènes et exogènes** : *in vivo*, BNL ne peut être déduite du rapport Bilirubine NC/Alb

# LIAISON BILIRUBINE-ALBUMINE

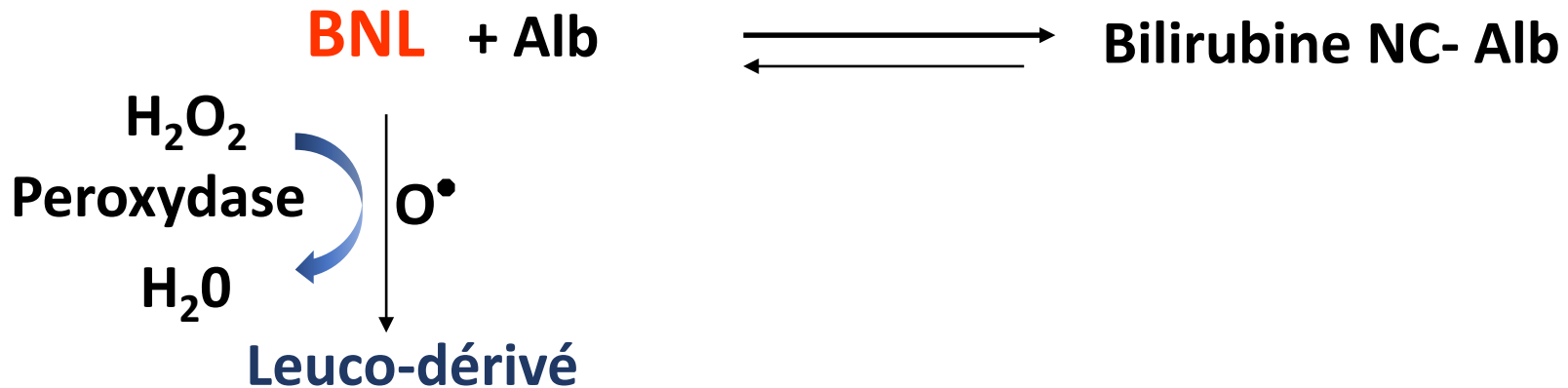
## INTERET DE L'EXPLORATION



- Prend en compte 3 facteurs biologiques de risque d'ictère nucléaire : hyperbilirubinémie, hypoalbuminémie, **compétiteurs**
- Permet donc d'identifier des situations à risque mal appréciées par les dosages individuels de bilirubine et de l'albumine

# DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

## PRINCIPE



**BNL** rapidement dégradée en un leuco-dérivé par l'action d'une peroxydase en présence d'eau oxygénée, source de radicaux peroxydes.

L'étude de la cinétique de la réaction de peroxydation permet, connaissant la constante d'activité de la peroxydase, de calculer la concentration en BNL.

# DOSAGE DE LA BNL PAR PEROXYDATION

## AUTOMATISATION DU DOSAGE

### UB ANALYSER

Arrows, Co, Ltd.

Osaka, Japan

instrument dédié (FDA)

utilisé au CNRHP (1987)



### Transfert sur des analyseurs de biochimie

CX4-CE Beckman Coulter (Novembre 2006)

DxC Beckman Coulter (AACC, Etats-Unis, Juillet **2008**)

Indiko Thermo Fisher (Euromedlab, France, **2015**)



## Examen accrédité selon la norme ISO NF 15189 (2016)



# DOSAGE DE LA BNL PAR PEROXYDATION

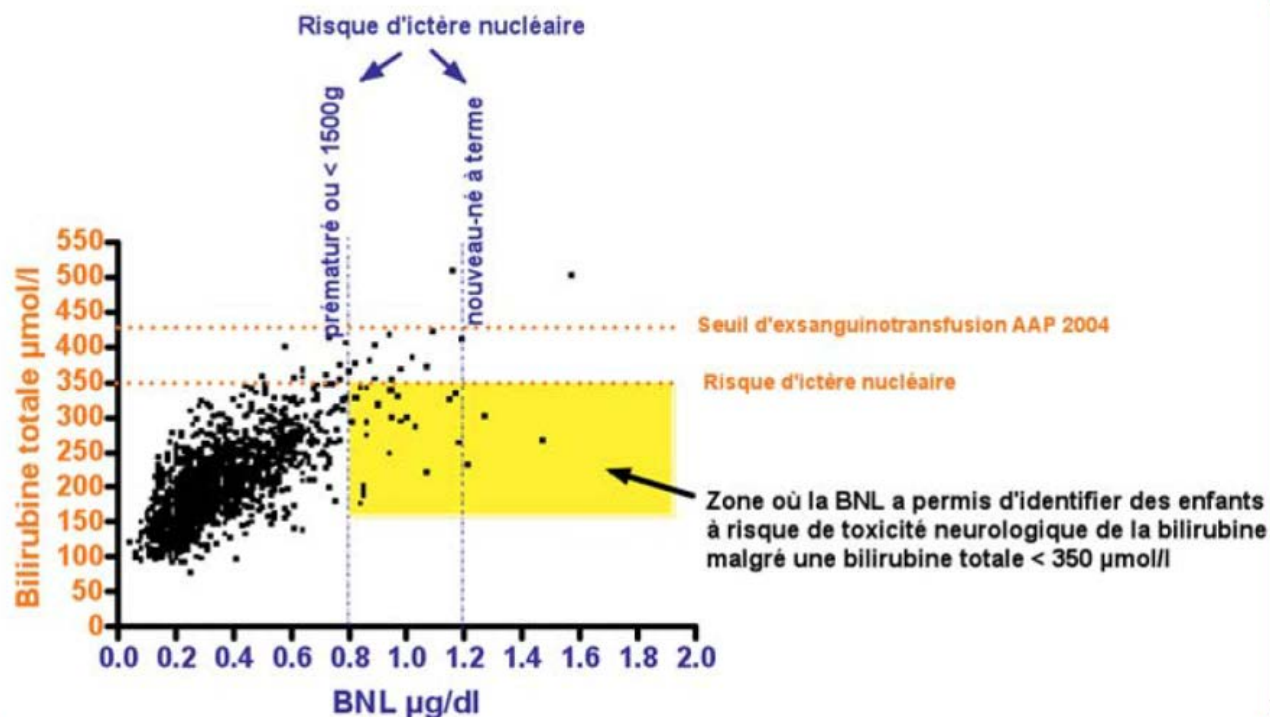
## RELATION BNL / BILIRUBINE TOTALE

Etude CNRHP sur 1424 dosages sur échantillons prélevés chez des nouveau-nés

**Dosages bilirubine totale versus BNL**

Paramètres cliniques étudiés: poids, âge, déshydratation, prise de paracétamol, déficit en G6PD, contexte d'incompatibilité

Traitement : photothérapie, prise d'albumine, exsanguino-transfusion



- valeurs seuils repérage d'enfants à risque de toxicité neurologique malgré une bilirubine totale < 350 µmol/l

- n= 24  
facteurs aggravant de toxicité de bilirubine :  
prématurité,  
déshydratation,  
hypotrophie

# QUALITE DE LA LIAISON BILIRUBINE-ALBUMINE

## PLACE DE LA BILIRUBINE INTRA-ERYTHROCYTAIRE (BIE)

- Dosage de la fraction de bilirubine liée aux phospholipides de la membrane du globule rouge
- Dosage impliquant des étapes manuelles : lavage des GR en NaCl, ajout d'albumine pour l'élution de la bilirubine puis dosage de cette fraction par diazotation
- Importance de ce dosage chez les **nouveau-nés prématurés ou en cas de BNL ininterprétable.**
- Aide pour la **prise en charge de l'hyperbilirubinémie sévère**

# DOSAGE BIE

## INTERET PRATIQUE

### EXEMPLE 1

LE. D. 16/10/2010 Masculin

Date prélèvement	DBIL	TBIL	BLTS	BNL	BIE	
25/10/2010	15	631	534	1,6	11,46	Perf albumine + PTI
26/10/2010	7	274	207	0,43	6	Contrôle à H6 de photothérapie+ alb

Ictère a J9 :

Sur premier taux discutable mais BIE rassurante  
EST différée

### EXEMPLE 2

M. I. 11/10/2010 Féminin

Date pré.	DBIL	TBIL	BLTS	BNL	BIE	
16/10/2010	9	281	275	1,62	insuf. PTI + perf d'albumine	
16/10/2010	8	261	242	1,03	12,2	contrôle avant albumine
17/10/2010	5	151	159	0,39	4,3	

Bébé sous paracétamol

Bébé mis sous PTI

BNL ininterprétable en raison de la prise de paracétamol

# CONCLUSION

- **Rôle critique du laboratoire pour donner une valeur exacte et rapide de valeur de bilirubine**
- **Importance de connaître les limites de cette technique et de proposer des alternatives telles que le dosage de la fraction non liée pour mieux identifier les situations à risque d'ictère nucléaire et une meilleur orientation du traitement**

Dr Yves BROSSARD

**UF biologie CNRHP**

Dr A. MAILLOUX

Dr C. TOLY-NDOUR

Dr H. DELABY

Dr N. BOUTARFA, Dr N. MORENO

Nelly Da-Silva  
Equipe technique

**Pôle biologie médicale et pathologie :**

Dr M. VAUBOURDOLLE



**UF clinique CNRHP**

Dr A. CORTEY

Dr F. PERNOT

Pauline THOMAS

Dr E. MAISONNEUVE, Dr S. FRISZER, Dr L. GUILBAUD, Dr F.DHOMBRES

Pr J.M. JOUANNIC

**Pôle Mère-Enfant :**

Pr J.M. JOUANNIC