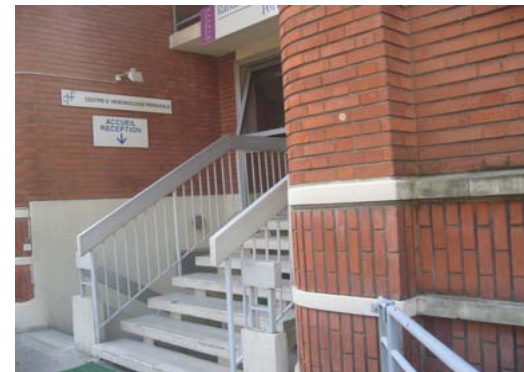


DOSAGE DE LA BILIRUBINE NON LIEE A L'ALBUMINE (BNL) CHEZ LES NOUVEAUX-NES ICTERIQUES

**CLUB LX / DxC Beckman Coulter
Mardi 12 Juin 2007**



ICTERE NEONATAL (1)

- **Ictère à Bilirubine non conjuguée (NC) avec risque d'encéphalopathie hyperbilirubinémique séquellaire : « Ictère nucléaire »**
- **Toxicité de la Bilirubine NC:**
 - **poison métabolique : chaîne respiratoire, glycolyse....**
 - **passage de la BHE, fixation phospholipides membranaires, noyaux gris centraux**

ICTERE NEONATAL (2)

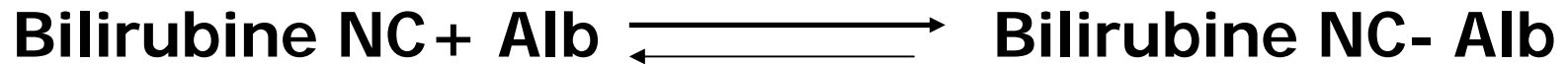
- **Facteurs de risque d'Ictère nucléaire :**

Facteurs cliniques : hémolyse néonatale, prématurité, acidose, souffrance neurologique périnatale

Facteurs biologiques : Hyperbilirubinémie, hypoalbuminémie, compétiteurs de la liaison bilirubine-albumine

LIAISON BILIRUBINE-ALBUMINE

CARACTERISTIQUES



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



BNL = Bilirubine non liée à l'albumine

K très fort : BNL dans le plasma très faible

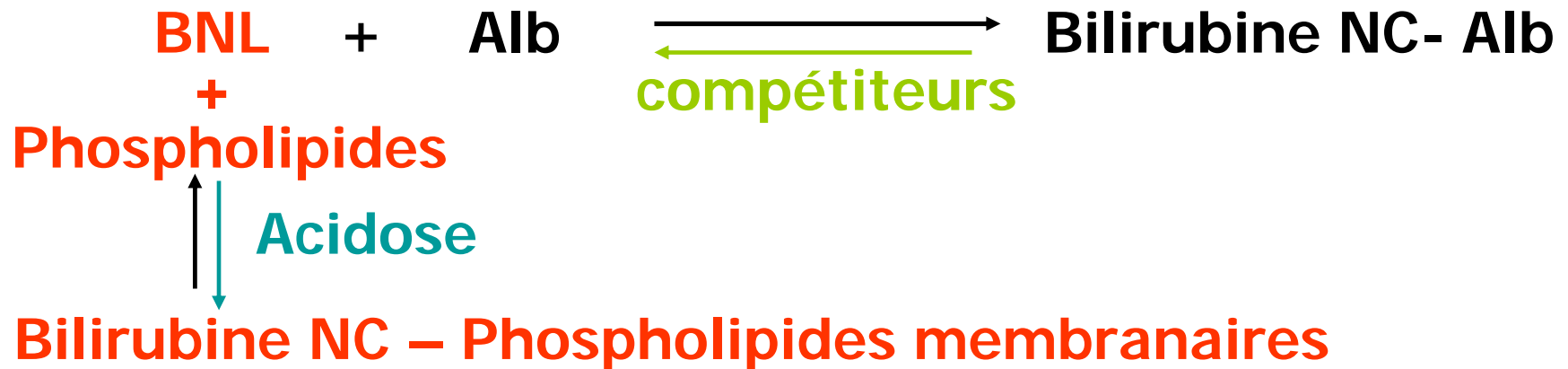
0 – 3 $\mu\text{g/dl}$ ou 0 – 50 nmol/l

- **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

LIAISON BILIRUBINE-ALBUMINE

TECHNIQUES D'EXPLORATION

1969 : Odell et al : Salicylate Index

1966 : Porter et al : capacité résiduelle de liaison à l'albumine par le colorant HBABA

1967 : Kaufmann et al : Bilirubine intra érythrocytaire

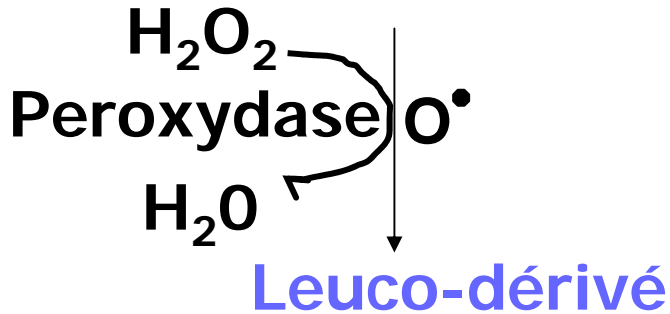
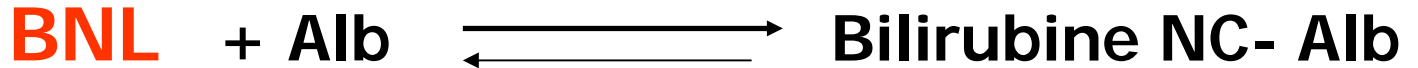
1967 : Jirsova et al : gel filtration sur Sephadex

....

1974 : Jacobsen et al : **Méthode à la peroxydase**

DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

PRINCIPE

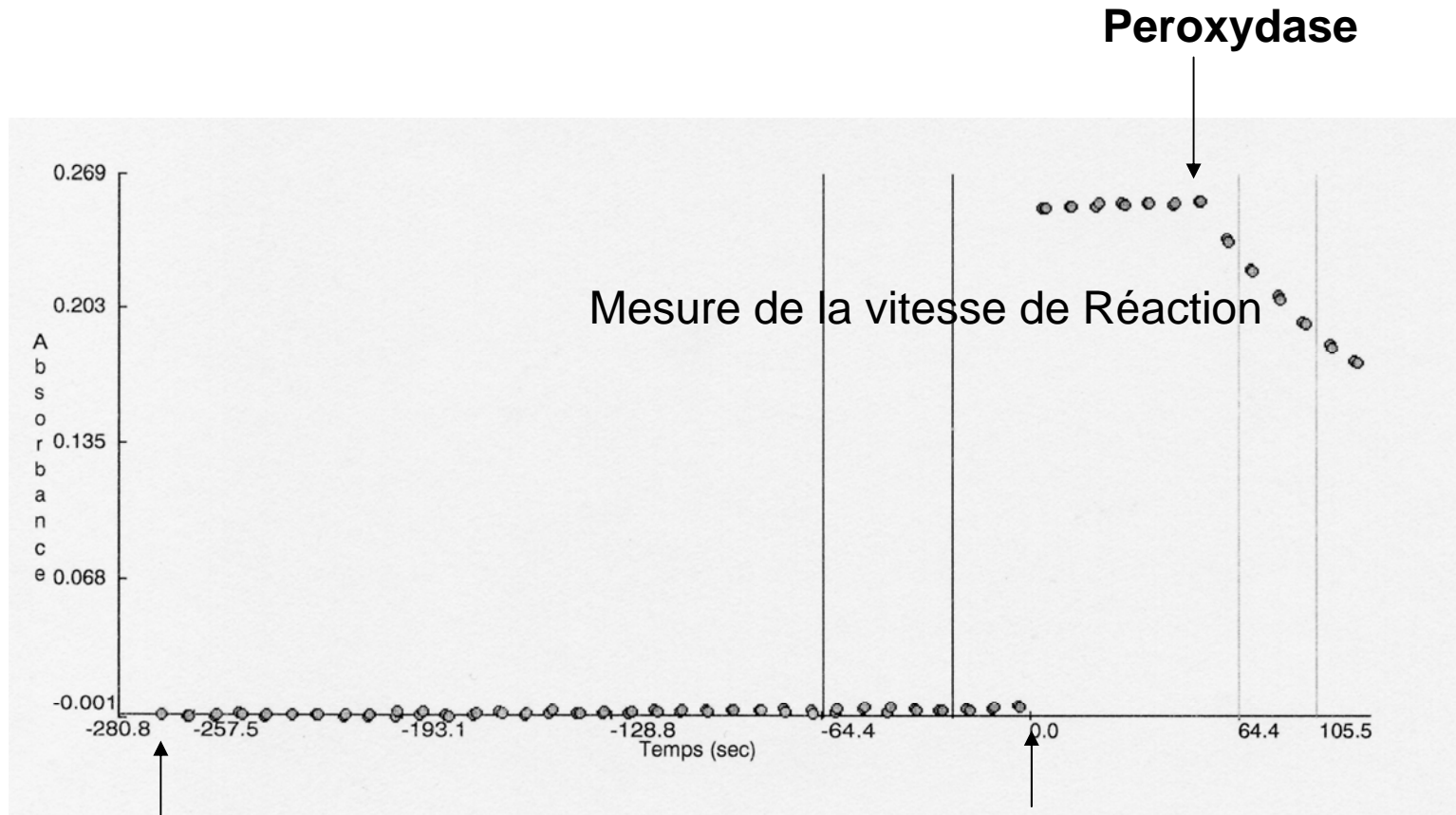


BNL rapidement dégradée en un leuco-dérivé par l'action d'une peroxydase en présence d'eau oxygénée, source de radicaux peroxydes.

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 BNL PAR METHODE PEROXYDASE

CINETIQUE DE LA REACTION



Tampon Phosphate + H₂O₂

Echantillon

DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE INSTRUMENTATION

UB ANALYSER, Arrows, Co, Ltd, Osaka, Japon

Instrument dédié (approuvé par la FDA)

Utilisé au CNRHP (décembre 1987)



➡ Adaptation sur des automates ouverts de Biochimie :
CX4-CE Beckman Coulter (Novembre 2006)
DxC Beckman Coulter (Avril 2007)

DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

REACTIFS ET PARAMETRES

	UB analyser	CX4-CE	DxC
Echantillon plasma	25 µl	7 µl	7 µl
Tampon Phosphate pH 7,4 + H2O2	1 ml	200 µl	200 µl
Peroxydase	25 µl	6 µl	6 µl
Type de réaction		CINET1 décroissant	CINET1 décroissant
Longueur d'onde primaire	460 nm	470 nm	470 nm
Longueur d'onde secondaire		650 nm	650 nm
Température réaction	37°C	37°C	37°C
Durée incubation tampon+échantillon	variable	48 s	48 s
Lecture du blanc	Boîte noire	50 s	40s
Début lecture après ajout peroxydase	Boîte noire	3 s	10 s
Durée lecture		30s ,16points	30s

DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

REACTIFS ET PARAMETRES

Calibrage : 2 points

Point 0 : eau distillée

Point 1 : Etalon BNL préparé au CNRHP pour une valeur cible de BNL de 0.70 µg/dl

Contrôles de qualité :

Précibil (niveau moyen)

Biorad (niveau élevé)

Stabilité des réactifs :

1 journée à 4 °C sur l'appareil

DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

PERFORMANCES ANALYTIQUES DxC

IMPRECISION

Répétabilité

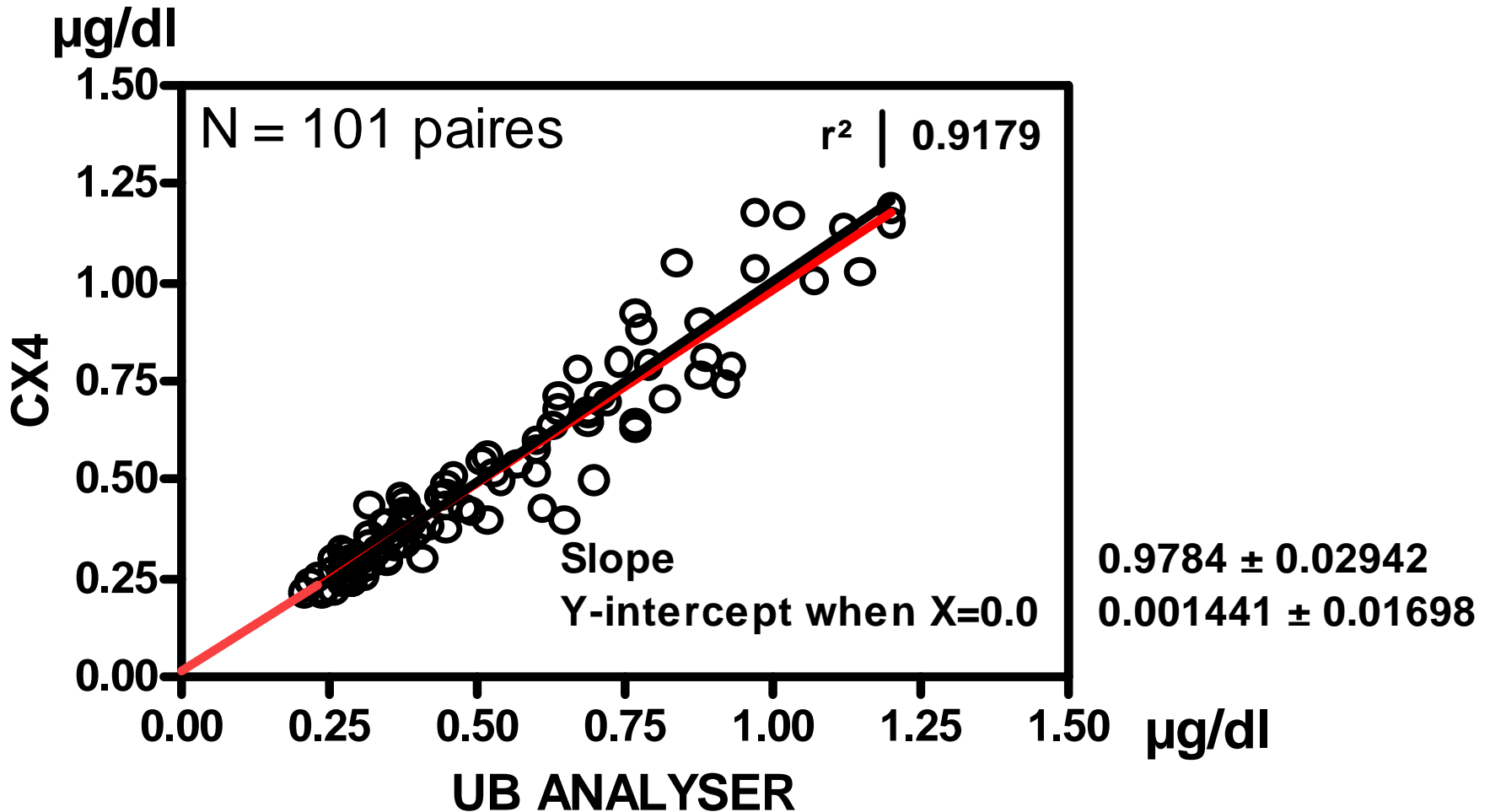
	N	Moyenne µg/dl	Ecart-Type	CV %
NIVEAU 1	20	0.77	0.02	2.78 %
NIVEAU 2	20	1.01	0.02	1.9 %

Reproductibilité

	N	Moyenne µg/dl	Ecart-Type	CV %
NIVEAU 1	20	0.76	0.02	3.19 %
NIVEAU 2	20	1.00	0.03	2.15 %

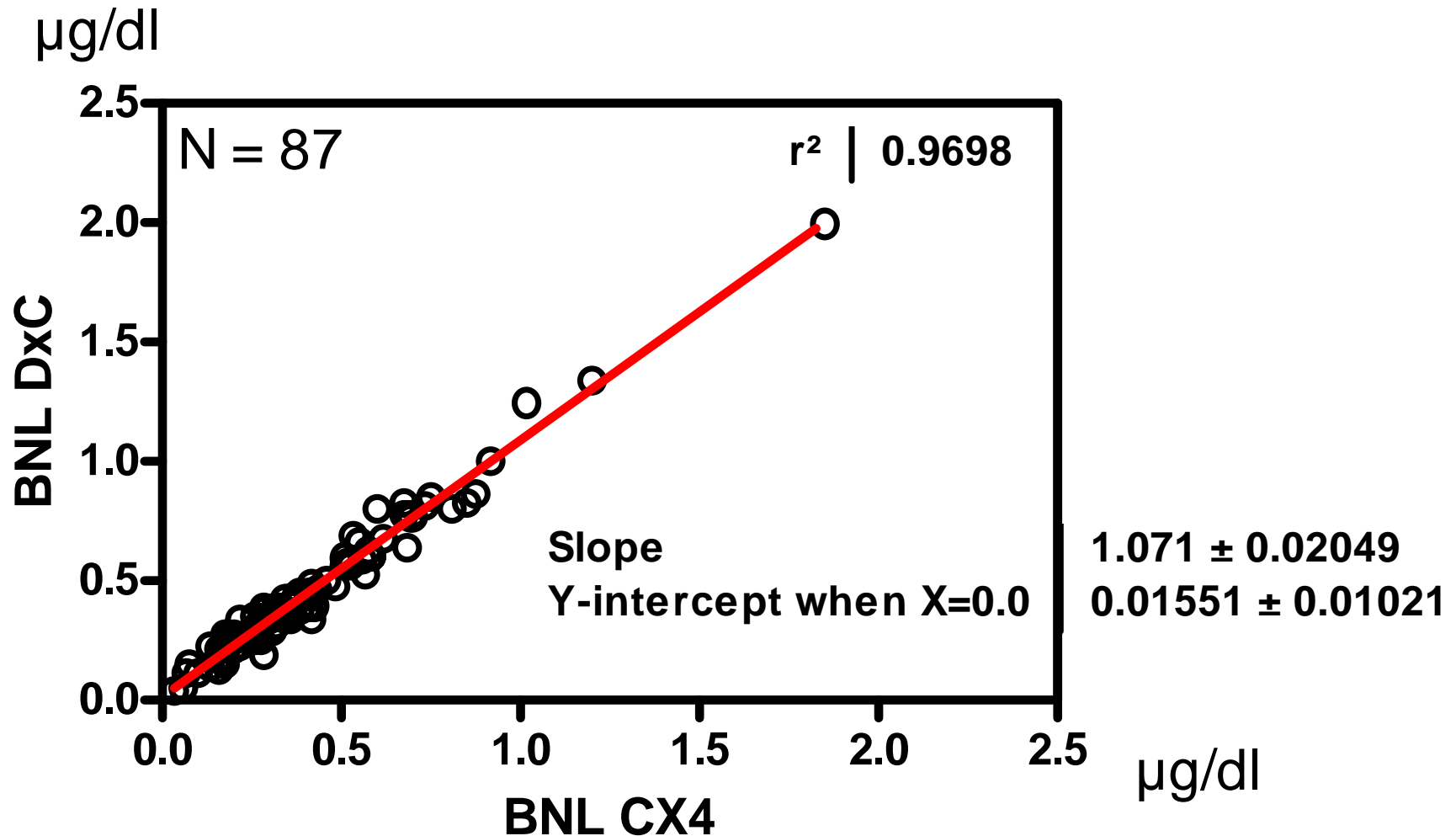
DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

CORRELATION BNL UB ANALYSER/ CX4



DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

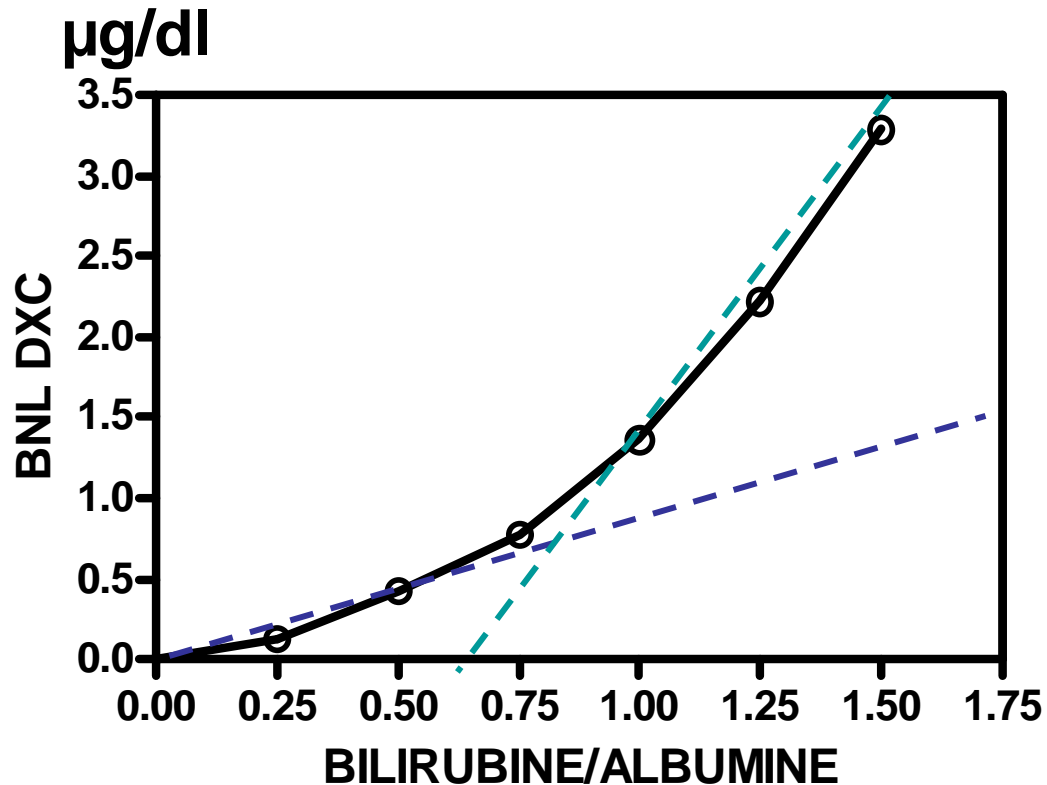
CORRELATION BNL CX4/ DxC



DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

RELATION BNL ET BILI NC/Alb

Pool de sérum humain normal enrichi en BILI NC
rapports BILI NC /Alb croissants

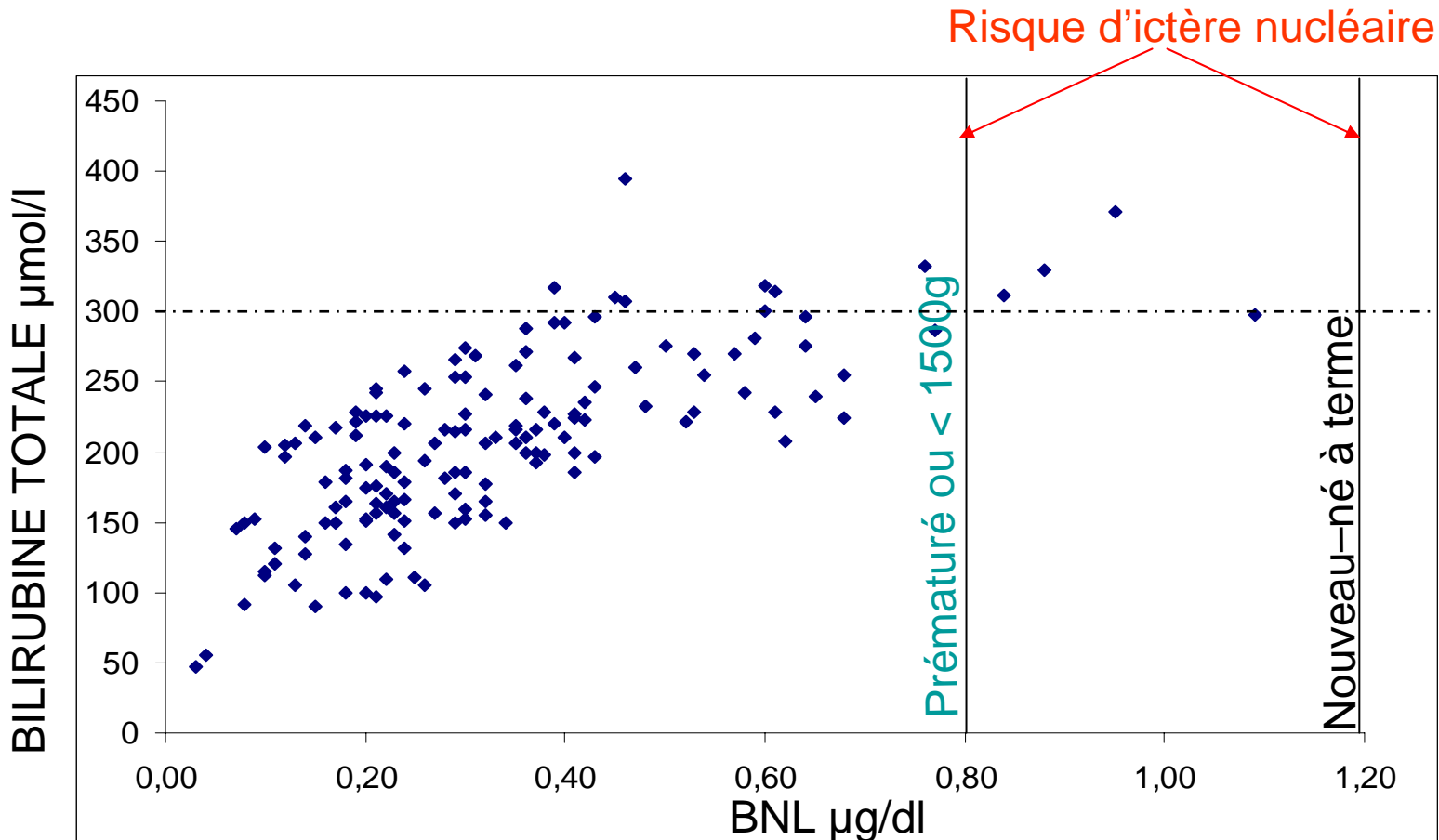


La réponse obtenue est conforme à la présence de 2 sites de fixation d'affinité différente

DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

RELATION BNL BILIRUBINE TOTALE

673 Echantillons cliniques de nouveaux-nés ictériques



CONCLUSION

**Travail Réalisé par Drs Agnès Mailloux, Yves Brossard, Marc Larsen
CNRHP, Hôpital Saint-Antoine
184 Rue du faubourg St-Antoine
75012 PARIS**

Remerciements

Bertrand Crayon : Beckman-Coulter

Dr Michel Vaubourdolle : Service de Biochimie A, Hôpital St Antoine