

Recommandations analytiques et cliniques pour l'utilisation de la bilirubinémie en néonatalogie

Analytical and clinical guidelines on neonatal bilirubinemia

Agnès Mailloux¹
Anne Cortey²
Vincent Delatour³
Carole Poupon⁴
Michèle Rota⁵
François Schmitt⁶
Michel Vaubourdolle⁷
Groupe de travail
SFBC-CNBH-CNRHP
« Bilirubine néonatale »

¹ Unité fonctionnelle d'expertise en immuno-hémobiologie périnatale, Centre national de référence en hémobiologie périnatale (CNRHP), DMU BioGeM-Site Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, Paris, France

² Unité clinique de soins des incompatibilités foeto-maternelles et ictère néo-natal, Centre national de référence en hémobiologie périnatale (CNRHP) DMU OriGyn -Site Armand Trousseau, AP-HP, Sorbonne Université, AP-HP

³ Laboratoire national de métrologie et d'essais, Paris, France

⁴ Laboratoire de biologie médicale, Centre hospitalier de Gonesse, France

⁵ Laboratoire de biologie médicale, Centre hospitalier intercommunal de Créteil, France

⁶ Laboratoire de biologie médicale, Groupe hospitalier Bretagne Sud, France

⁷ Département de biochimie, hormonologie et suivi thérapeutique DMU BioGeM-Site Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, France

Article reçu le 25 mai 2020,
accepté le 26 mai 2020

Correspondance : A. Mailloux
<agnes.mailloux@aphp.fr>

Résumé. Le groupe de travail « Bilirubine néonatale » a réuni des membres de la SFBC, du CNBH et du CNRHP pour réaliser une étude biologique et clinique sur l'utilisation de la bilirubinémie néonatale dans le cadre du diagnostic et de la surveillance de l'ictère du nouveau-né. Un résumé des conclusions d'un sondage national sur les pratiques analytiques et biologiques est fait pour une évaluation de l'état des lieux en France. Les recommandations de la Société française de néonatalogie (SFN) sont fondées notamment sur une détermination fiable de la bilirubinémie totale faite au laboratoire comme indication de la mise sous photothérapie. Des abaques avec des seuils précis sont proposés, en fonction du nombre d'heures de vie du nouveau-né. Or, des études montrent des défauts de standardisation de cette technique en particulier d'un fournisseur à l'autre, avec des conséquences probables sur l'interprétation clinique des résultats. Nous présentons dans cet article les résultats d'une étude nationale multicentrique d'harmonisation de la bilirubine néonatale réalisée pour progresser sur cette question. Au-delà des aspects analytiques, les conséquences cliniques des défauts d'harmonisation observés sont évaluées. Des recommandations pour les laboratoires de biologie médicale sont enfin proposées, à adapter dans le cadre local.

Mots clés : bilirubine totale, nouveau-né, harmonisation, standardisation, recommandations, impact clinique

Abstract. The SFBC-CNBH-CNRHP "Neonatal bilirubin" working group performed a biological and clinical study on bilirubin use in neonates for reliable diagnosis and appropriate management of neonatal jaundice. A brief report of a national survey on analytical and biological practices in France is shown. The guidelines of the French Society of Neonatology (SFN) founded the decision of phototherapy set up upon an accurate lab measurement of total serum bilirubin. An abacus is proposed with defined thresholds, as a function of neonate lifetime in hours. However, several studies evidenced poor comparability of results obtained with the different available methods. This situation is partly due to the lack of reference materials, especially for high bilirubin concentrations. Clinical consequences might be observed. We present in this paper the results of a national harmonization study to progress on this issue. Beyond the analytical aspects, the clinical consequences of harmonization defects were investigated. Finally, guidelines for clinical laboratories are proposed, to be locally adapted.

Key words: total bilirubin, neonates, harmonization, standardization, guidelines, clinical impact

Contexte

Besoins cliniques

L'ictère néonatal constitue un problème quotidien du pédiatre en maternité chez près de deux tiers des nouveau-nés : il est visuellement décelable sur les peaux claires si la concentration sérique de bilirubine totale est supérieure à 80 $\mu\text{mol/L}$. Cette bilirubinémie, témoin de l'intensité de l'ictère, est quantifiable à l'aide de dispositifs de mesure soit de façon non invasive (bilirubinomètre transcutané - BTc), soit de façon invasive par un dosage sanguin de bilirubine (*gold standard*).

Chez le nouveau-né, dans 99 % des cas, il s'agit d'une hyperbilirubinémie non conjuguée, du fait de l'adaptation post-natale du métabolisme de la bilirubine. Celle-ci évolue le plus souvent favorablement avec une régression spontanée en 10 à 15 jours. Rarement, l'hyperbilirubinémie continue sa progression vers la sévérité : dans ce cas, la toxicité de la bilirubine non conjuguée s'exprime par une encéphalopathie aiguë puis chronique, encore appelée ictère nucléaire [1, 2].

La survenue de ce type de complications reste rare mais n'a pas disparu [3, 4]. La prévention des hyperbilirubinémies sévères est l'objectif de toute la prise en charge des ictères du nouveau-né depuis le dépistage organisé de l'ictère en maternité, jusqu'à l'organisation personnalisée de la sortie de maternité et du suivi post-sortie, en passant par le traitement optimal de l'hyperbilirubinémie [5, 6].

A l'instar d'autres pays, la Société française de néonatalogie (SFN) a émis des recommandations « Ictère » [7] en proposant des valeurs de référence de bilirubinémie (nomogramme) et des courbes d'indication thérapeutique (photothérapie et exsanguino-transfusion) basées sur le dosage sanguin de la bilirubine totale (BTS). Celles-ci sont elles-mêmes fondées sur des recommandations de l'*American academy of pediatrics* (AAP), publiées en 2004 et revues en 2009 [8]. La SFN a également publié des clefs pour l'articulation dans la pratique entre les valeurs de bilirubine transcutanée - BTc (quantification non invasive) et les valeurs de bilirubine totale sérique - BTS (quantification de référence invasive) par dosage sanguin de bilirubine totale (figure 1).

Les indications thérapeutiques de l'ictère (photothérapie et exsanguino-transfusion) sont fondées sur le dosage sanguin de bilirubine totale (BTS), interprété selon l'âge gestationnel, l'âge post-natal en heures et les conditions de vulnérabilité à la toxicité de la bilirubine (figure 2).

Contexte analytique et défauts d'harmonisation

Pour recenser les pratiques analytiques dans les LBM français, le groupe de travail a organisé entre janvier et mai 2019 un sondage en ligne. Soixante-trois réponses ont été

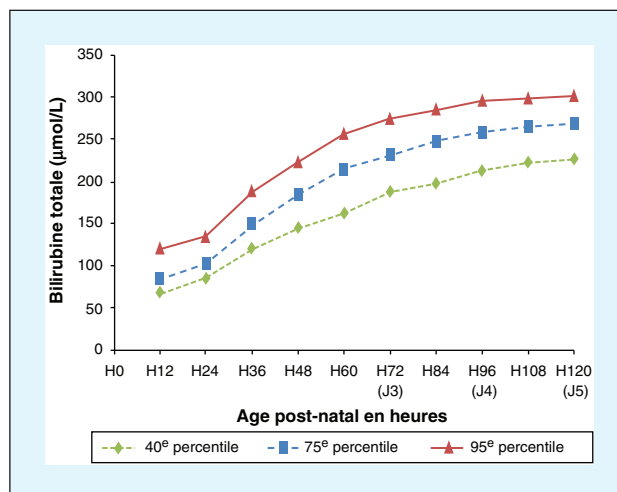


Figure 1. Recommandations de la Société française de néonatalogie (SFN) pour la surveillance quotidienne de l'ictère à l'aide du bilirubinomètre (Btc ou flash). Référentiel des bilirubinémies « normales » pour le nouveau-né ≥ 35 SA classées en percentile. Nomogramme d'après Bhutani VK, *et al. Pediatrics* 1999 ; 103(1) : 6-14. La réalisation d'un prélèvement invasif pour mesurer la bilirubinémie est indiquée si Btc $> 250 \mu\text{mol/L}$ et/ou si Btc $\geq 75^{\text{e}}$ percentile. Il est réalisé en urgence si Btc $\geq 95^{\text{e}}$ percentile.

obtenues avec la répartition suivante : LBM de centre hospitalier ou ESPIC 47 %, LBM de CHU 29 %, LBM du secteur libéral 24 %. Les automates utilisés étaient fournis par : Roche (49 %), Siemens (19 %), Abbott (16 %), Beckman (9 %), Ortho (7 %). Les techniques utilisées sont majoritairement fondées sur la diazotation avec des formulations hétérogènes (7 techniques recensées). Concernant les processus et pratiques analytiques, les réponses des LBM sont résumées dans le *tableau 1*, associées aux risques potentiels en néonatalogie. Il convient de noter une hétérogénéité importante des pratiques des LBM sur les trois sous-processus préanalytique, analytique et postanalytique, une prise en compte insuffisante des spécificités de la néonatalogie (valeurs physiopathologiques $> 100 \mu\text{mol/L}$, zones de décision clinique $> 250 \mu\text{mol/L}$) dans la formulation des réactifs (nombre et niveaux des étalons ne couvrant pas toujours la zone, raccordement non actualisé, 1 seul point de calibration souvent trop bas, blanc non systématique, prise d'essai parfois importante pour les nouveau-nés) et dans les stratégies CQI-EEQ des LBM (suivi des performances au-delà de $150 \mu\text{mol/L}$).

En réponse à ces pratiques et devant les besoins cliniques, les LBM doivent désormais faire face à un problème analytique important [9] : les difficultés de standardisation de la mesure de la bilirubine totale par un raccordement au matériau de référence NIST SRM 916 (aujourd'hui indisponible pour l'étalonnage de la méthode de référence de Doumas) s'accompagnent de différences inter techniques importantes [10, 11]. Celles-ci peuvent aussi être constatées

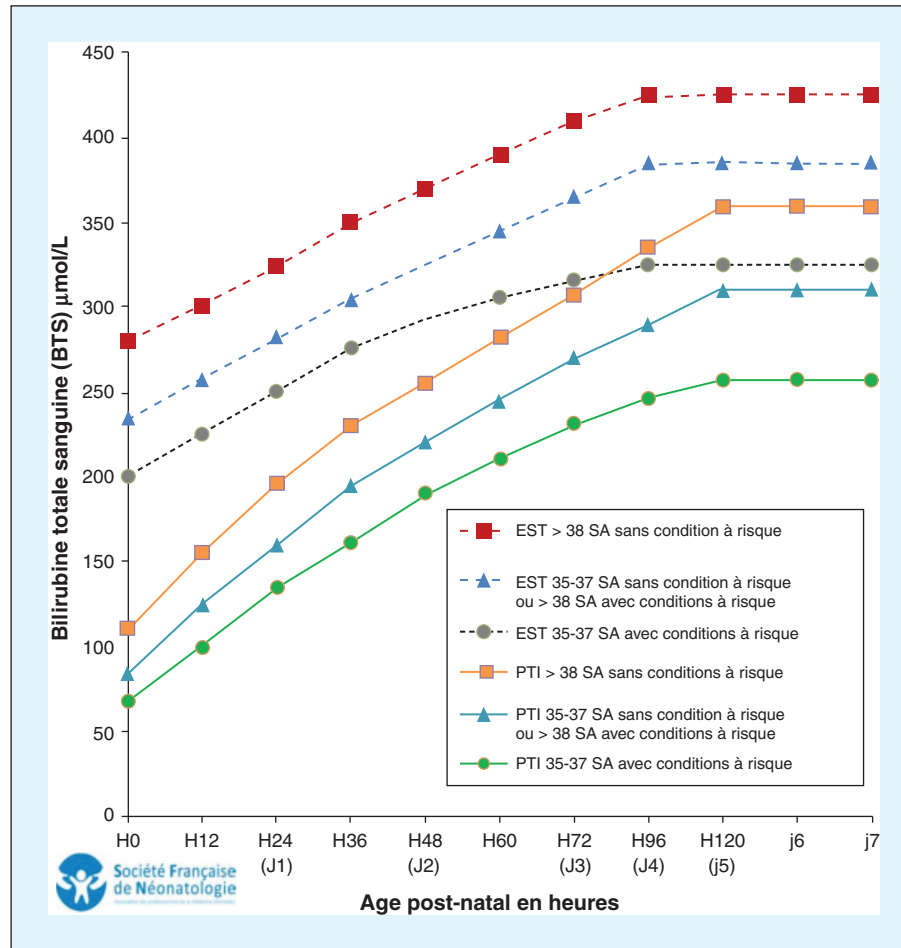


Figure 2. Recommandations de la Société française de néonatalogie (SFN) concernant les indications de photothérapie intensive (PTI) et d'exsanguino-transfusion (EST) pour le nouveau-né de 35 SA et plus (d'après [8]). Indications selon le dosage sanguin de bilirubine totale ou BTS (sans soustraction de la bilirubine conjuguée) exprimée en $\mu\text{mol/L}$ pondérée par l'âge post-natal et la présence ou non de conditions à risque aggravées de neuro-toxicité de la bilirubine. Précisions sur <http://www.cnrhp.fr/docs/Arbres-outils-decisionnels-icterenouveaune-CNRHPv0319.pdf>.

dans les études statistiques (données non montrées) produites par les organismes de comparaison inter laboratoires (OCIL) en France et particulièrement marquées dans les zones de concentrations élevées correspondant aux seuils de décision clinique en néonatalogie.

Réponse biologique et interprétation/conseil

Concernant les prestations d'interprétation/conseil des LBM, des lacunes sont mises en évidence lors du sondage réalisé par le groupe (*tableau 1*) : connaissance encore insuffisante des recommandations cliniques pour l'interprétation des résultats, décision clinique de mise sous photothérapie non concertée avec le LBM, pas de continuité ni de coordination des pratiques en néonatalogie entre les TROD (Btc), les EBMD (BT) et les dosages de laboratoire (BT), confirmation des TROD avant décision

thérapeutique non réalisée ou non connue, comparabilité Btc-BT non évaluée.

Objectifs du groupe de travail

Le groupe de travail, composé de biologistes représentant les différentes disciplines et les différents modes d'exercice, privés et publics, a permis de réunir des biologistes médicaux en relation avec des unités de néonatalogie. La représentation des sociétés savantes (SFBC, CNBH, SFN) et des laboratoires de référence (CNRHP, LNE) a été assurée pour un recueil d'avis pertinents.

Les objectifs de ce travail sont les suivants :

- progresser dans l'harmonisation des méthodes de mesure de la bilirubine totale en utilisant un étalon dont la valeur assignée est raccordée au matériau de référence internatio-

Tableau 1. Bilirubinémie et pratiques analytiques en France : risques en néonatalogie – Sondage Groupe SFBC-CNBH-CNRHP 2019.

Processus ou pratique	Item	Pratique majoritaire	Risque en néonatalogie
Préanalytique	Type d'échantillon	Plasma – héparine Li (2/3) Sérum (1/3)	
Analytique	Prise d'essai	2-200 μ L (2-50 μ L le plus souvent)	Prélèvement invasif chez le nouveau-né
	Calibration	En 2 points (81 %), en 1 point (19 %) Avec blanc échantillon (80 %), sans (20 %) Valeur point haut < 80 μ mol/L (54 %), > 150 μ mol/L (33 %)	Quantification incorrecte dans les valeurs > 150 μ mol/L (seuils de décisions en néonatalogie)
	Domaine de mesure	> 400 μ mol/L (95 %)	Performances de la méthode non adaptées aux besoins en néonatalogie
	Contrôle qualité interne (CQI)	2 niveaux (54 %), 3 niveaux ou + (46 %) Niveau haut < 80 μ mol/L (76 %), > 150 μ mol/L (24 %)	Suivi des performances (imprécision) de la méthode non réalisé au niveau des seuils de décision en néonatalogie
	Evaluation externe de la qualité (EEQ)	Nombre d'échantillons testés : 12 – 40 Cible bilirubine > 100 μ mol/L : 4 (45 %)	Suivi des performances (inexactitude) de la méthode non réalisé au niveau des seuils de décision en néonatalogie
Postanalytique	Valeurs de référence en néonatalogie	Connaissance : - de l'existence de valeurs de référence spécifiques pour les nouveau-nés 73 % - de ces dernières en fonction de l'âge en jours 65 % - de ces dernières en fonction de l'âge en heures 10 % - des recommandations de la SFN 10 %	Interprétation des résultats et alertes par le LBM ne prenant pas en compte les besoins cliniques en néonatalogie
	Indications thérapeutiques	Connaissance : - des seuils de mise sous photothérapie 30 % - des recommandations des sociétés savantes 20 %	Prestations de conseils par le LBM ne prenant pas en compte les besoins cliniques en néonatalogie
TROD - EBMD	Bilirubine transcutanée (Btc) - TROD	Connaissance : - de l'utilisation d'un dispositif de mesure de la Btc 30 % - de la nécessité de confirmation par le LBM d'une valeur d'alerte avant décision thérapeutique 20 % - de la comparabilité des résultats locaux Btc-BT 10 %	Partenariat clinicobiologique ne répondant pas aux besoins cliniques en néonatalogie
	Bilirubine totale - EBMD	Pas de dispositif connu 75 % Implantation en projet 3 % Dispositif suivi en néonatalogie (salle travail, réa,...) 16 %	Partenariat clinicobiologique ne répondant pas aux besoins cliniques en néonatalogie

nal et des échantillons de contrôle commutables possédant une valeur assignée ;

– évaluer l'incidence clinique des différences analytiques observées et proposer des recommandations aux biologistes médicaux pour une interprétation optimisée des résultats et une prestation de conseil adaptée auprès des prescripteurs.

Matériels et méthodes

L'étude expérimentale a été conduite entre janvier et juillet 2019.

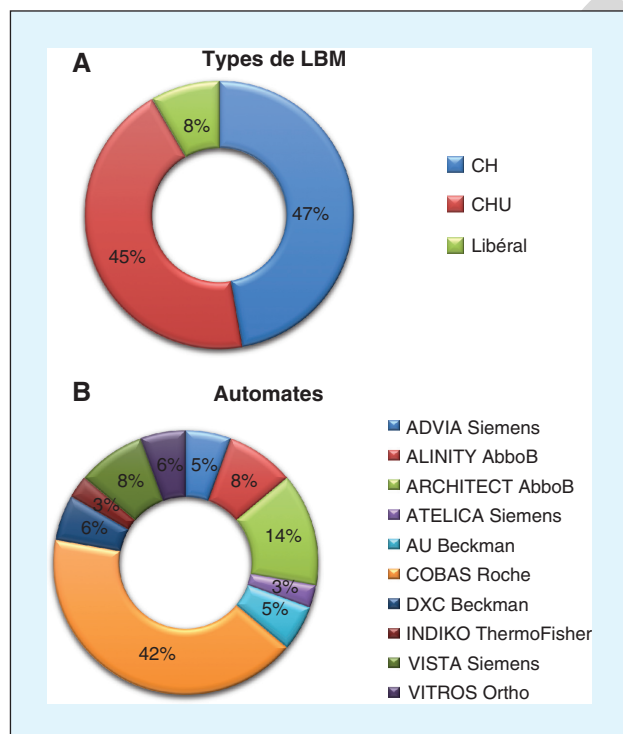
Laboratoires participant à l'étude et automates utilisés

Trente-six laboratoires de biologie médicale (LBM) se sont portés volontaires à la suite du sondage en ligne précédemment décrit, correspondant à 39 couples automate/technique. La liste des laboratoires participants est présentée dans le *tableau 2*. Dans 92 % des cas, les LBM font partie de structures hospitalières publiques (CH ou CH à quasi égalité) (*figure 3A*).

Les automates utilisés sont représentatifs du marché actuel (*tableau 2 et figure 3B*) ; une importante représentation de la société Roche (automates Cobas) est retrouvée (15 LBM sur 36), en accord avec les données issues des OCIL.

Tableau 2. Liste des laboratoires participants.

Code LBM	Type de LBM	Libellé LBM	Code LBM	Type de LBM	Libellé LBM
001	CH	LBM CH Saint-Denis	026	CHU	LBM CNRHP - AP-HP
002	CH	LBM CH Montluçon	027	CHU	LBM CHU Beaujon - AP-HP
005	CH	LBM CH Tahiti	028	CHU	LBM CHU Bicêtre - AP-HP
006	CH	LBM CH Aix-en-Provence	029	CHU	LBM CHU Tenon - AP-HP
008	CH	LBM CH Saintes	030	CHU	LBM CHU Biologie Est - HCL
010	CH	LBM CHI Créteil	031	CHU	LBM CHU Biochimie - AP-HP
011	CH	LBM CHI Aulnay-sous-Bois	032	CHU	LBM CHU Nice
012	CH	LBM CHR Metz	033	CHU	LBM CHU Strasbourg
013	CH	LBM CHU Toulouse	034	CHU	LBM CHU Nîmes
014	CH	LBM CHU Rennes	036	CHU	LBM CHU Brest
015	CH	LBM CH Bourgoin-Jallieu	037	CHU	LBM CHU Bécélère - AP-HP
016	CH	LBM Saint-Joseph Marseille	039	CHU	LBM CHU Trousseau - AP-HP
017	CH	LBM CHU Bichat - AP-HP	049	CHU	LBM CHU Nancy
018	CH	LBM CH Valence	050	CHU	LBM CHU Saint Antoine
019	CH	LBM CH Gonesse	042	Libéral	LBM CBM - Besançon
021	CH	LBM CH Bourg-en-Bresse	043	Libéral	LBM Cerballiance - Dijon
024	CHU	LBM Conception - AP-HM	045	Libéral	LBM CEDIBIO Unilabs - Toulouse
025	CHU	LBM CHU Necker - AP-HP	051	CHU	LBM CH Lorient

**Figure 3.** Répartition des LBM participant à l'étude d'harmonisation, par type de LBM (A) et par automates utilisés (B).

Raccordement, étalons et échantillons de contrôle

Etude préliminaire

Cette étude [12] a permis de vérifier la commutabilité d'un étalon primaire fabriqué par le laboratoire du CNRHP, initialement pour le dosage de la bilirubine non liée (BNL) et d'un matériau de contrôle fourni par le Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE) pour 8 couples automates/réactifs utilisés en pratique courante. Ce travail a également permis d'assigner une valeur à l'étalon CNRHP par raccordement réalisé par le laboratoire de référence d'Hanovre, en association avec le LNE. La méthode utilisée par ce laboratoire de référence est candidate au référencement JCTLM [13].

Etalons et échantillons de contrôles

Lors de notre étude, sont transmis aux LBM participants pour dosage dans leurs conditions :

- des échantillons de contrôle commutables avec valeurs assignées lors de l'étude préliminaire ($25,9 \pm 0,6 \mu\text{mol/L}$ « C1 », $254,9 \pm 5,6 \mu\text{mol/L}$ « C2 ») ;
- un étalon secondaire raccordé (étalon CNRHP lot BE1805 - date de fabrication le 30/01/2018, conservation à -20°C durant 2 ans, concentration en bilirubine : $270,6 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$).

Echantillons de patients

Trente *pools* de plasmas de patients congelés, provenant de nouveau-nés ou de patients adultes, permettant de couvrir l'ensemble des concentrations physiologiques et pathologiques ont été préparés par le laboratoire du CNRHP.

Tableau 3. Répartition des automates utilisés dans l'étude d'harmonisation.

Fournisseur	Automate	Méthode	LBM	Effectif
Abbott	Alinity	Autres diazoïques	1-6-30-42	4
	Architect	Dichloraniline + solubilisant	8	5
Beckman	AU	Diphényldiazonium (DPD) + solubilisant	31	3
	DXc	Autres diazoïques	21	1
Ortho	Vitros TBIL	Réfectométrie	37, 51	2
	Vitros BuBc	Réfectométrie	37	1
Roche	Cobas	Diphényldiazonium (DPD) + solubilisant	2-10-11-12-13-14-15-16-18-24-28-32-34-39-43	15
Siemens	Advia	Vanadate oxydation	5-36	2
	Atellica	Autres diazoïques	49-50	2
	Vista	Acide sulfanilique + caféine-benzoate "rose"	17-19-33	3
ThermoFisher	Indiko	Autres diazoïques	26	1

Pour les nouveau-nés, 15 *pools* de plasmas de nouveau-nés (PP), correspondant à 3 niveaux de concentration de bilirubine totale, sont utilisés : PPB < 150 µmol/L, PPM 150-250 µmol/L, PPH > 250 µmol/L. Chaque *pool* est dosé au CNRHP (LBM 026 – cf. *tableaux 2 et 3* pour réactifs/automate) puis réparti en 50 fractions aliquotes de 150 µL congelées à -20 °C.

Pour les adultes, 15 *pools* d'échantillons provenant de patients adultes avec une bilirubinémie < 50 µmol/L sont préparés à partir d'échantillons provenant du laboratoire de biochimie de l'hôpital Saint-Antoine. Chaque *pool* est dosé au CNRHP puis réparti en 50 fractions aliquotes de 400 µL congelées à -20 °C.

Dans tous les cas, ces *pools* ont été constitués à partir d'échantillons de patients pour lesquels des examens avaient été prescrits dans le cadre des soins pratiqués (« fonds de tubes »). Aucun prélèvement supplémentaire n'a été réalisé, en accord avec les dispositions réglementaires en vigueur.

Protocole expérimental

Les échantillons sont préparés par le CNRHP en amont de l'étude et envoyés un jour donné sous forme de cryoboîtes conservés dans la carboglace durant le transport (société TMS).

Début juillet 2019, chaque laboratoire participant a reçu dans la matinée 1 cryoboîte contenant :

- 30 *pools* de plasmas congelés (PP) : libellés « PP1 » à « PP30 » sur les cryotubes ;
- 2 échantillons de contrôle de sérum congelé avec concentrations basse et haute : « EC1 » et « EC2 » ;
- 1 étalon CNRHP : « BE1805 ».

Les cryotubes sont numérotés selon la nomenclature prévue dans le bordereau de réponse (*figure 4*) et positionnés dans la boîte dans l'ordre de passage requis sur l'automate. Les dosages doivent donc être réalisés en respectant la séquence de travail du document joint. Si les analyses ne

peuvent pas être toutes exécutées immédiatement, un stockage de la boîte à -20 °C est prévu. Un formulaire de traçabilité de réception des échantillons joint avec la boîte est à compléter et à envoyer par courriel au laboratoire du CNRHP qui centralise l'étude. Avant dosage, une homogénéisation des cryotubes puis une centrifugation (1 500 g - 10 min) est requise. Les dosages de bilirubine sont réalisés en simple en respectant l'ordre de passage prévu dans le bordereau de réponse (*figure 4*). Le laboratoire doit veiller à encadrer la série de dosages de bilirubine avec ses propres CIQ. Il était également demandé aux LBM de renseigner les résultats de leur dernier EEQ. Le rapport des résultats sur le bordereau de réponse est fait avant fin juillet 2019.

Détermination des valeurs attendues

Nous utiliserons le terme de « valeurs attendues » et non de « valeurs de référence ». En effet, la méthode utilisée par le laboratoire de référence d'Hanovre, mandaté pour nous par le LNE et utilisée pour l'assignation des valeurs de l'étalon bilirubine utilisé lors de l'étude, est une méthode candidate [13] à devenir une méthode de référence, alternative à la méthode de Doumas. Toutefois, cette méthode ne figure pas encore sur la liste officielle des méthodes référencées dans la base JCTLM.

La valeur raccordée de l'étalon CNRHP BE1805 et celles des échantillons de contrôles C1 et C2 transmis aux LBM ont été déterminées par le laboratoire du CNRHP après 12 mesures par la technique Diazo Beckman sur automate Indiko et étalonnage avec l'étalon BE1449 (valeur assignée : 287,4 ± 6,3 µmol/L – cf. certificat laboratoire de référence - *figure 5*) préalablement raccordé lors de l'étude préliminaire par le LNE.

Les valeurs raccordées pour les 30 *pools* de patients ont été estimées par le laboratoire du CNRHP comme la moyenne de 3 déterminations par la technique Diazo Beckman/Indiko après un étalonnage avec l'étalon BE1449 (cf. ci-dessus).

Nomenclature			
Code	Description	Matrice	Nb ech
PP1 à	Pool de plasmas	pool congelé	
BE180	Etalon CNRHP	liquide congelé	
EC1	Echantillon de contrôle niveau bas	pool congelé	
EC2	Echantillon de contrôle niveau haut	pool congelé	

Merci de compléter les données LBM dans les cases bleues ci-dessous et de compléter les résultats des 3 séquences de test dans les cases vertes à droite

Libellé	Code
Laboratoire	CNRHP
Automate	Indiko
Technique	diazotation

Données étalonnage		
Etalon utilisé par le LBM (ref.)	Synchron 465915	
Valeur assignée (µmol/L)	155,3	
Incertitude sur l'étalonnage (%)	1,115 µmol/l	

Résultats CQI encadrant la série de l'étude		
	Avant	Après
Valeur mesurée niveau 1 (µmol/L)	16,5	16,9
Valeur cible attendue LBM niveau 1 (µmol/L)	18,1	
CV long terme LBM niveau 1 (%)	6%	

Valeur mesurée niveau 2 (µmol/L)	302,2	305
Valeur cible attendue LBM niveau 2 (µmol/L)	311,2	
CV long terme LBM niveau 2 (%)	7%	

Résultats EEQ le plus proche de la série de l'étude		
Date EEQ	13/06/2019	
Valeur mesurée (µmol/L)	275	
Valeur cible attendue groupe pairs (µmol/L)	260	
Biais absolu (µmol/L)		

Séquence de travail		
Position	Echantillon	Valeur µmol/L
1	PP1	7,9
2	PP2	7,5
3	PP3	8,9
4	PP4	8,8
5	PP5	8,8
6	BE1805	283,1
7	EC1	25,0
8	PP6	8,8
9	PP7	9,3
10	PP8	9,8
11	PP9	10,6
12	PP10	10,6
13	EC1	25,3
14	PP11	10,9
15	PP12	12,8
16	PP13	20,8
17	PP14	28,3
18	PP15	67,7
19	BE1805	283,5
20	EC1	25,0
21	PP16	73,3
22	PP17	86,1
23	PP18	87,3
24	PP19	91,2
25	PP20	105,8
26	EC2	261,5
27	PP21	190,2
28	PP22	197,3
29	PP23	204,0
30	PP24	192,9
31	PP25	217,0
32	EC2	261,9
33	PP26	242,0
34	PP27	270,1
35	PP28	291,0
36	PP29	306,2
37	PP30	315,1
38	BE1805	283,5
39	EC2	260,9

Figure 4. Etude d'harmonisation des dosages de bilirubine totale – Exemple de bordereau de réponse des LBM et séquence de travail.

Résultats

Résultats globaux

La figure 6 représente l'ensemble des résultats obtenus par les laboratoires participants pour tous les échantillons testés, sous forme de médianes et valeurs extrêmes. L'échantillonnage des pools de patients s'avère conforme aux valeurs attendues et aux besoins de l'étude. En fonction des seuils de décision en néonatalogie, situés au-delà de 150 µmol/L, deux zones de concentrations sont définies pour la suite de l'étude : zone verte < 150 µmol/L et zone rose > 150 µmol/L.

Etude de fidélité

Définitions des limites d'acceptabilité

Les limites d'acceptabilité « répétabilité » (variations intra-série) choisies [14] sont les suivantes : 5,1 % (C1) et 3,2 % (C2). Pour les limites d'acceptabilité inter laboratoires par automate/technique, les limites précédemment proposées pour la fidélité intermédiaire ou « reproductibilité » (variations inter-séries) [14] ont été adoptées : 6,8 % (C1) et 4,2 % (C2). Nous n'avons pas défini d'objectif analy-

tique pour la variabilité inter laboratoires toutes techniques confondues : toutefois, dans l'optique d'une décision clinique en néonatalogie, un CV limite de 10 % est proposé pour les valeurs supérieures à 150 µmol/L.

Sur échantillons de contrôle

La figure 7 (A,B,C) montre les résultats des études de fidélité sur les échantillons de contrôle C1 et C2. Dans tous les cas, dans les zones de décisions cliniques en néonatalogie, les résultats sont acceptables pour 92 % des LBM participants (répétabilité), pour 90 % des automates/techniques étudiés et pour le niveau haut de contrôle (C2) pour la variabilité toutes techniques confondues.

Sur échantillons de patients

La figure 7D présente un profil de précision sur les pools d'échantillons de patients qui montre pour des concentrations en bilirubine supérieures à 150 µmol/L des coefficients de variation acceptables (inférieurs à 8 %).

Etude de l'inexactitude

Définitions des limites d'acceptabilité

Les données de la littérature sont les suivantes :

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 ¹	Uncertainty of measurement ²	Number of accepted results
Bilirubin	287,4 µmol/L	6,3 µmol/L 0,37 mg/dL	4 Series on 2 Days
	16,80 mg/dL	2,2 %.	12 Single values

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.


¹⁾ The reference method value is the mean of all single values of all measurement days

²⁾ 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 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


 Dr. D. Grote-Koska

Head of the calibration laboratory



 R. Strache/R. Klauke

Figure 5. Certificat LNE assignant une valeur de concentration de bilirubine totale à l'étalon primaire BE1449 préparé par le laboratoire du CNRHP par une méthode raccordée à la méthode de référence (IFCC).

– la limite d'acceptabilité (état de l'art analytique) pour l'inexactitude proposée par Vassault *et al.* [14] est de 11,2 % pour les valeurs hautes, correspondant à 22,4 µmol/L à un niveau de décision clinique de 200 µmol/L.

L'erreur totale acceptable est de 15 % (30 µmol/L à 200 µmol/L) ;

– la limite d'acceptabilité (variations biologiques) pour l'inexactitude proposée par Ricos *et al.* [15] est de 8,9 %,

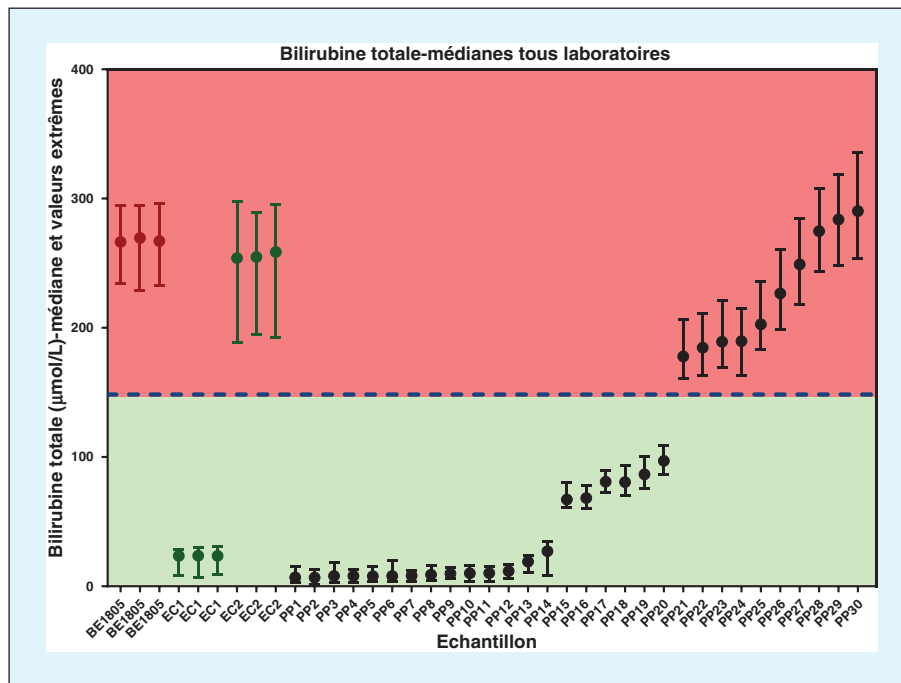


Figure 6. Médiane et intervalle des valeurs des concentrations en bilirubine totale obtenues pour l'ensemble des LBM participant à l'étude. BE1805 : étalon CNRHP, EC1-EC2 : contrôles LNE, PP1 à PP30 : pools de plasmas de patients adultes et nouveau-nés. Zone verte : bilirubinémie < 150 $\mu\text{mol/L}$, zone rose : bilirubinémie > 150 $\mu\text{mol/L}$.

correspondant à 17,8 $\mu\text{mol/L}$ à 200 $\mu\text{mol/L}$. L'erreur totale acceptable est de 26,94 %, soit 53,9 $\mu\text{mol/L}$ à 200 $\mu\text{mol/L}$. Pour notre part, sur un critère de décision clinique, nous avons défini pour notre étude une limite d'acceptabilité à 10 % au-delà de 150 $\mu\text{mol/L}$, soit 15 $\mu\text{mol/L}$ à 150 $\mu\text{mol/L}$ et 25 $\mu\text{mol/L}$ à 250 $\mu\text{mol/L}$. Ceci est fondé sur l'interprétation des résultats en fonction des recommandations de la SFN déjà présentées dans un contexte de décision de mise sous photothérapie.

De plus, il est important de considérer qu'une inexactitude par défaut peut être source de préjudice pour le patient en raison d'un possible retard à la mise sous photothérapie, à la différence d'une erreur par excès qui n'aura en règle générale pas de conséquence.

Evaluation des biais par fournisseur

Les figures 8 et 9 présentent, pour chaque couple automate/technique étudié, les valeurs des biais absolus, c'est-à-dire les différences entre les valeurs mesurées par les LBM participants, pour les échantillons de contrôles et les pools d'échantillons de patients, et les valeurs attendues établies par le laboratoire du CNRHP (cf. infra), en fonction de la valeur attendue.

Une synthèse des résultats obtenus est présentée dans le tableau 4. Ils sont globalement acceptables par rapport à nos critères cliniques d'acceptabilité précédemment définis, notamment pour les pools d'échantillons de patients.

Toutefois, les résultats obtenus avec l'automate Cobas (Roche) montrent une erreur proportionnelle par défaut sur l'ensemble des 15 LBM de l'étude utilisant cette technique (figure 8). Dans le but de tester la possibilité d'une correction *in silico* des valeurs obtenues, nous avons calculé un facteur de correction fondé sur le rapport entre la valeur obtenue par le LBM pour l'étalon commutable BE1805 et celle mesurée par le laboratoire du CNRHP (figure 10). Les valeurs corrigées sont également présentées dans la figure 10.

Discussion

Aspects analytiques

Fidélité

Les performances des LBM en matière de répétabilité et de variations inter laboratoires (même couple automate/technique) sont acceptables.

Les variations inter techniques sont acceptables pour des valeurs de bilirubinémie supérieures à 150 $\mu\text{mol/L}$ (7 à 8 % sur échantillons de contrôle et de patients) mais la prédominance des LBM utilisant la technique Roche (15/36), très reproductible, n'a pas été prise en compte.

L'imprécision des méthodes employées dans l'échantillon de LBM étudié est globalement acceptable y compris dans les zones de décision clinique en néonatalogie.

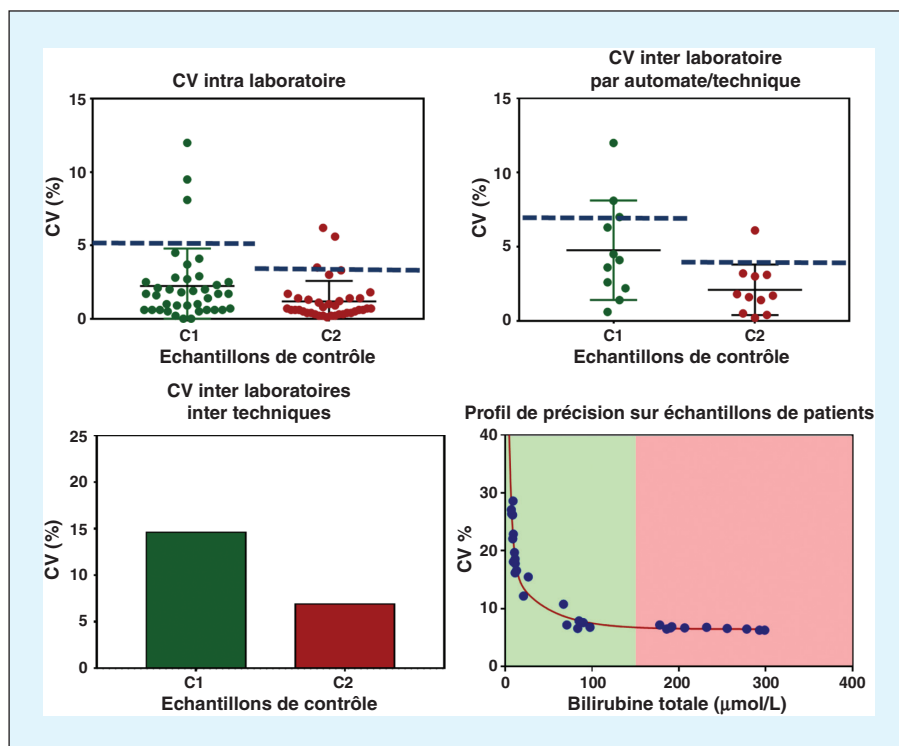


Figure 7. Etude de fidélité sur échantillons de contrôle (A, B, C) et de patients (D). A : coefficients de variation intra laboratoire, B : coefficients de variation inter laboratoires par automate/technique, C : coefficients de variation inter laboratoires toutes techniques, D : coefficients de variation inter laboratoires pour chaque *pool* de plasmas. Les lignes pointillées indiquent les objectifs analytiques choisis.

Exactitude

L'exactitude des résultats de bilirubine a été évaluée par rapport aux valeurs de référence sur des échantillons de contrôle et sur des pools de patients congelés provenant d'adultes et de nouveau-nés. Le comportement des échantillons de contrôle est le plus souvent comparable aux résultats sur pools de patients, ce qui constitue une indication de la bonne commutabilité des échantillons de contrôle comme déjà montré dans l'étude préliminaire et étendue. Une étude de commutabilité est toutefois à finaliser pour les techniques Beckman Au et DXc.

Les biais retrouvés pour certains couples automate/méthode sont le plus souvent acceptables avec des valeurs parfois légèrement surestimées sans conséquence sur la décision clinique de mise sous photothérapie.

Dans un cas (automate Cobas - Roche), une erreur proportionnelle par défaut est retrouvée dans les 15 LBM utilisant cette technique avec des biais pouvant excéder fréquemment les 10 % dans les valeurs $> 150 \mu\text{mol/L}$ avec des potentielles conséquences sur la prise en charge rapide des nouveaux nés.

Dans ce cas, un recalage de la valeur de l'étalon par rapport à l'étalon CNRHP raccordé ou bien une correction de +10 % environ permet de corriger cette erreur. Il est important de considérer que cette technique est majoritaire

en France au vu de notre effectif mais aussi en regard des données des OCIL. Une prise en compte de ce biais proportionnel par défaut par les LBM utilisant cette technique est donc requise : correction des valeurs, déciblage de l'étalon ou bien interprétation/conseil spécifique pour le contexte néonatal.

Conséquences cliniques

Les possibles conséquences cliniques d'un biais par défaut supérieur à 10 % pour des valeurs supérieures à $150 \mu\text{mol/L}$ peuvent être illustrées à l'aide du cas clinique suivant observé en 2019 sur le site de l'hôpital Armand Trousseau (*encadré*).

Une étude clinique rétrospective plus complète sera entreprise pour simuler sur des cas réels une sous-estimation de plus de 10 % de la bilirubine totale de confirmation. L'impact sur les décisions prises et la fréquence de ces situations sera également évaluée.

Recommandations

Le groupe de travail, au vu des résultats des études et sondages réalisés préconise, pour accroître et fiabiliser le rôle critique du laboratoire en néonatalogie et pour donner une

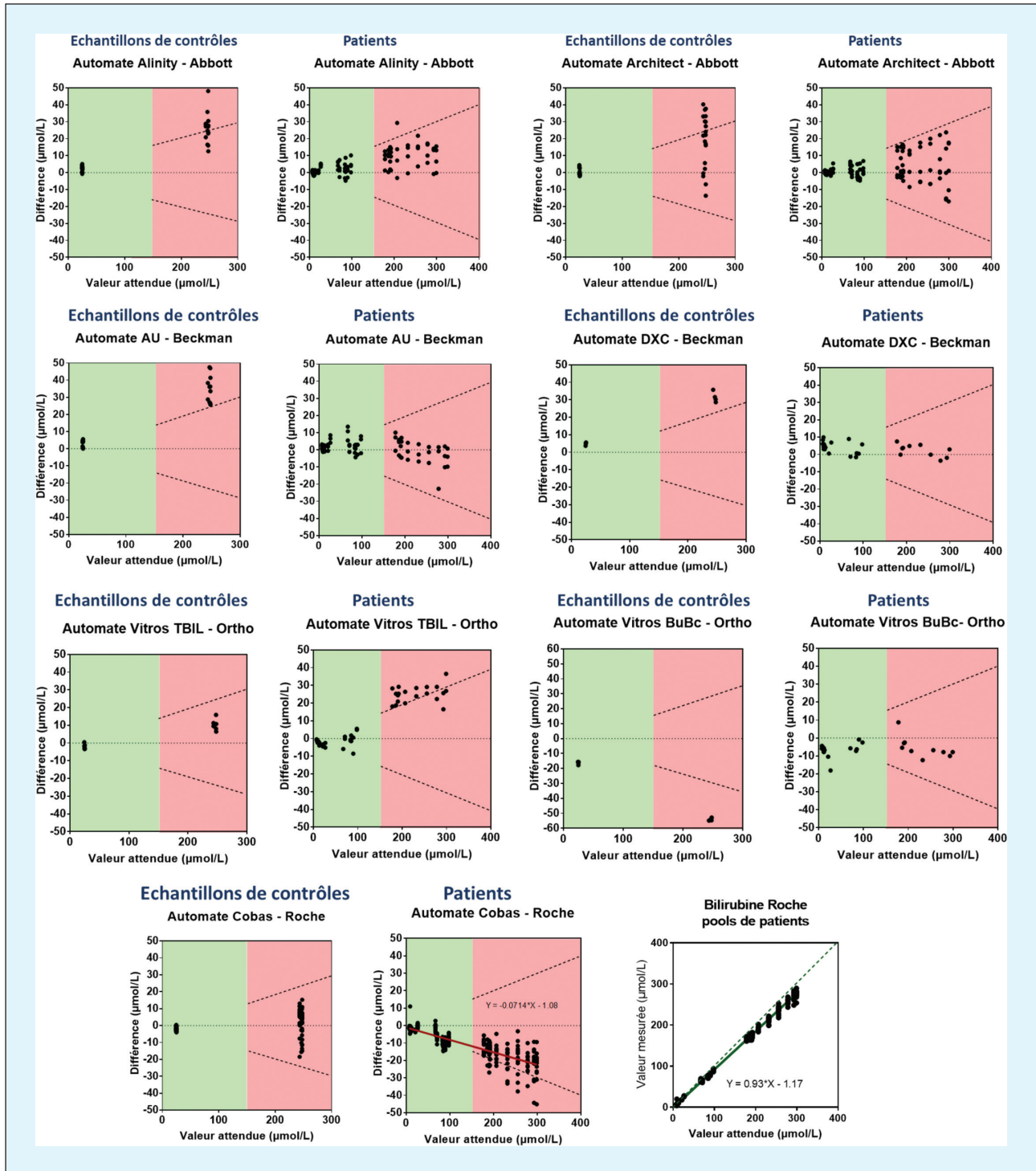


Figure 8. Etude d'inexactitude sur échantillons de contrôles et de patients. Les diagrammes représentent les valeurs des biais absolus (différence entre valeur mesurée et valeur attendue) en fonction de la valeur attendue pour chaque automate/technique évalué. Pour l'automate Roche Cobas, la comparaison valeurs mesurées - valeurs attendues est également présentée avec l'équation de la droite de Deming correspondante.

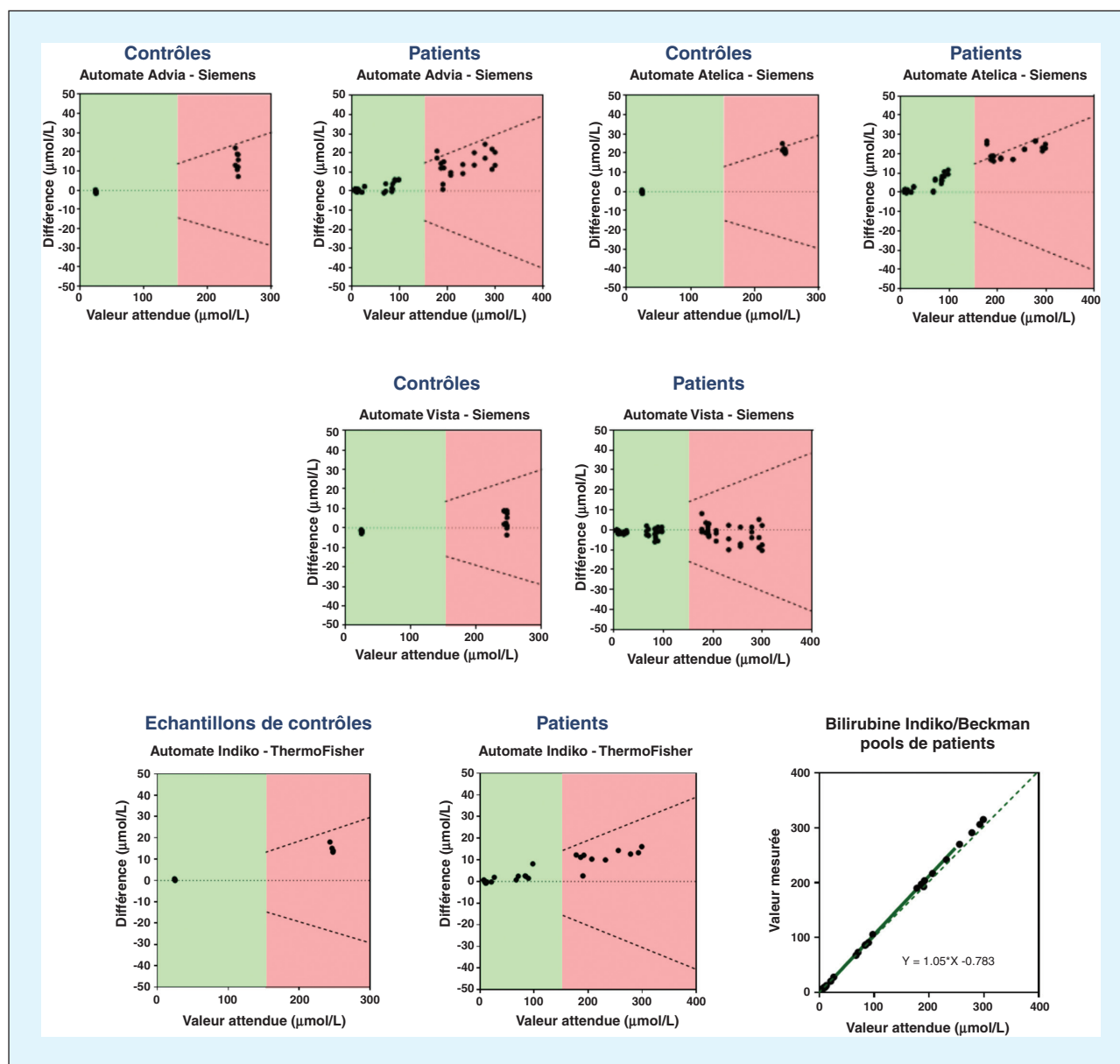


Figure 9. Etude d'inexactitude sur échantillons de contrôles et de patients. Les diagrammes représentent les valeurs des biais absolus (différence entre valeur mesurée et valeur attendue) en fonction de la valeur attendue pour chaque automate/technique évalué. Pour l'automate Indiko/technique Beckman, la comparaison valeurs mesurées – valeurs attendues est également présentée avec l'équation de la droite de Deming correspondante.

valeur exacte et rapide de bilirubine, les actions suivantes à réaliser par le LBM en charge des examens prescrits en néonatalogie.

Sur le plan analytique

Bien connaître, par une vérification pertinente des méthodes employées et un suivi adapté de leurs performances au cours du temps, les limites de cette technique afin d'accompagner rapidement les résultats par une interprétation et une prescription de conseil auprès des prescripteurs

Faire des choix analytiques pertinents concernant les réactifs et méthodes utilisées, ainsi que les stratégies CQI/EEQ conformes aux besoins cliniques (précision et exactitude dans les valeurs > 150 µmol/L).

Remonter auprès des fournisseurs d'automates et de réactifs les problèmes analytiques observés pour contribuer progressivement à l'harmonisation des techniques de mesure de la bilirubinémie, en particulier pour les applications en néonatalogie.

Tableau 4. Synthèse des résultats de l'évaluation de l'inexactitude.

Fournisseur	Automate	Contrôle C1	Contrôle C2	Patients < 150 µmol/L	Patients > 150 µmol/L
Abbott	Alinity	A	R+ 25	A	A+ 10
	Architect	A	R+ 20	A	A+ 20 (dispersion)
Beckman	AU	A	R+ 35	A	A
	DXc	A	R+ 30	A	A+ 5
Ortho	Vitros TBIL	A	A+ 10	A	R+ 30 (pas d'incidence clinique)
	Vitros BuBc	A	R-35	A	A- 10
Roche	Cobas	A	A	A	R- 25 (correction possible)
Siemens	Advia	A	A+ 15	A	A+ 15
	Atellica	A	A+ 20	A	A+ 20
	Vista	A	A+ 5	A	A+ 5
ThermoFisher	Indiko	A	A+ 15	A	A+ 10

A : accepté, R : rejeté, vs objectifs analytiques - + ou – XX : biais moyen en µmol/L.

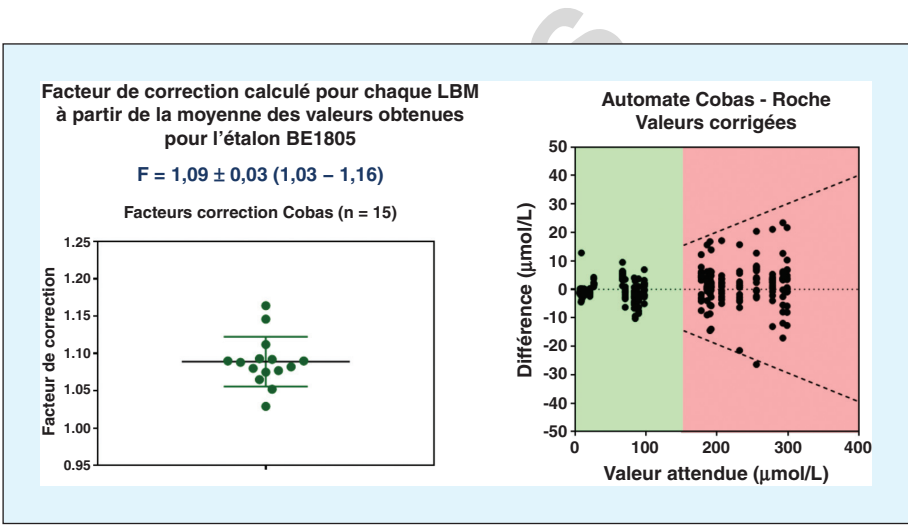


Figure 10. Correction *in silico* des valeurs obtenues sur l'automate Cobas Roche. Le diagramme de gauche présente les valeurs individuelles du facteur de correction calculé pour chacun des 15 LBM utilisant l'automate Cobas Roche, établi à partir de la moyenne des valeurs obtenues pour l'étalon BE1805 lors de l'étude. Le diagramme de droite montre les biais absolus calculés à partir des résultats corrigés en fonction des valeurs attendues.

Pouvoir proposer des alternatives telles que le dosage de la fraction non liée pour mieux identifier les situations à risque d'ictère nucléaire et une meilleure orientation du traitement dans les cas difficiles.

Sur le plan clinicobiologique

S'informer et intégrer dans le système qualité du LBM les recommandations SFN-CNRHP sur le diagnostic et la surveillance thérapeutique de l'ictère néonatal : critères de mises sous photothérapie.

Prendre en compte plus largement le contexte néonatal dans les listes d'examens réputés urgents et en instaurant une continuité et une maîtrise de la chaîne TROD - EBMD - examens urgents du LBM - examens transmis à des LBM spécialisés.

Valoriser l'expertise du biologiste médical dans la continuité de l'utilisation de la Btc (TROD) et de la bilirubine totale faite au laboratoire en développant un partenariat clinicobiologique : comparabilité locale des résultats Btc-BT, information qualité auprès des sages-femmes pour l'utilisation des TROD, formalisation d'un circuit de confirmation des résultats alarmants.

Possibilité en fonction du contexte d'implanter sous le contrôle du LBM un dispositif de mesure délocalisé (EBMD) de la bilirubine totale (CO oxymétrie par exemple) en salle de naissance, couplé ou non avec un analyseur de gaz du sang/lactates utilisable pour l'évaluation de l'hypoxie néonatale.

Extension EBMD ou TROD à évaluer en termes de ratio cout/bénéfice et maîtrise de la qualité sur les cabinets de sages-femmes en ville par le déploiement de dispositifs de

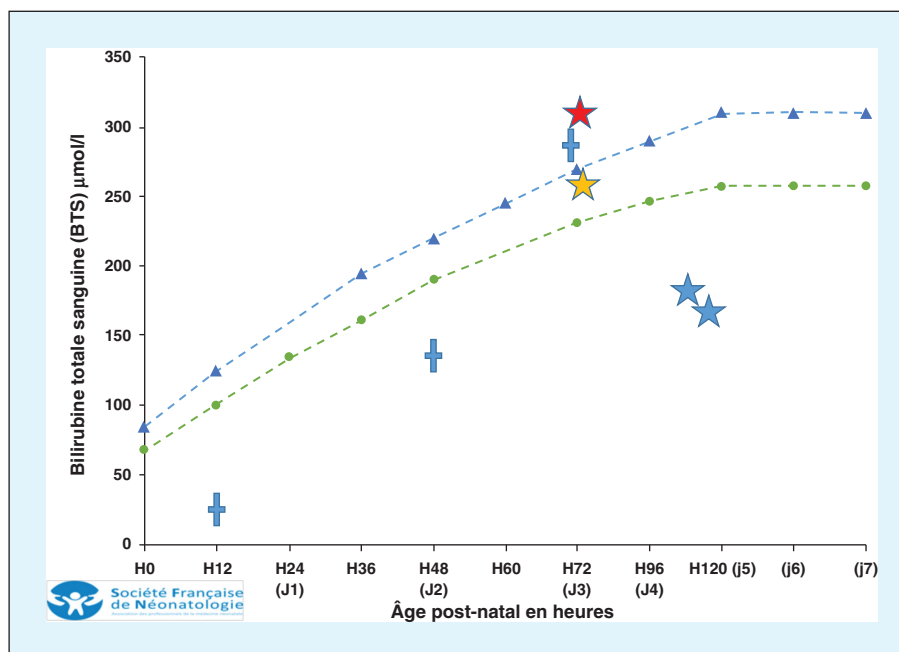


Figure 11. Evolution de la bilirubinémie chez l'enfant N. Les lignes pointillées vertes (avec conditions à risque) et bleues (sans conditions à risque) indiquent les seuils de mise sous photothérapie recommandés par la SFN. Les croix bleues indiquent les valeurs obtenues chez l'enfant N. par mesure transcutanée. Les étoiles montrent les valeurs obtenues au laboratoire sur un automate Roche (jaune) ou Indiko-Beckman (rouge). Les étoiles bleues figurent les valeurs obtenues après une photothérapie efficace.

mesure de bilirubine sur sang total (EBMD) grâce à la dérégulation en 2020 des lieux d'utilisation des EBMD (LFSS 2020). Ce type d'évolution pourrait constituer la base d'un travail futur.

Conclusion

Cette étude analytique d'harmonisation multicentrique a permis de mieux préciser la nature et l'intensité des variations inter techniques pour la mesure des concentrations de bilirubine totale en néonatalogie, de proposer des mesures simples pour corriger ou interpréter les résultats lorsque des conséquences sur la décision clinique peuvent survenir. Une bonne connaissance par le biologiste médical des critères d'interprétation et de décision thérapeutique recommandés par la SFN et le CNRHP [16] ainsi qu'un partenariat clinico-biologique étroit sont indispensables pour une efficacité optimale de la prise en charge rapide d'un ictère néonatal. Une étude clinique complémentaire est également en cours au sein de l'unité clinique du CNRHP pour analyser plus précisément les répercussions des variations analytiques observées sur la prise de décision clinique face à la survenue d'un ictère néonatal.

Les propositions SFBC-CNBH-CNRHP pour la prise en charge en urgence des bilirubinémies néonatales constituent des recommandations qui doivent être mises en perspective

en fonction des organisations et besoins de chaque LBM. Elles sont une base de travail pour engager les discussions et concertations avec les prescripteurs et entre laboratoires afin de définir les stratégies partagées de prise en charge optimale des patients et de réponse aux besoins des cliniciens.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Remerciements. Les membres du groupe SFBC-CNBH tiennent ici à remercier l'ensemble des collègues biologistes médicaux qui ont accepté de prendre en charge le protocole expérimental dans leur laboratoire avec compétence et professionnalisme. Ce sont elles et eux qui ont permis d'obtenir des résultats homogènes et interprétables.

Nous remercions plus particulièrement : Alcaraz Stéphanie (034), Andansson-Macchi Magali (002), Bailleul Sophie (029), Blondé-Cynober Françoise (028), Buffat Christophe (024), Capaldo Clément (036), Cartier Régine (030), Caussanel Arnaud (045), Cognée Anne-Sophie (008), Dauvergne Agnès (027), Desmurs Laurent (030), Gladys Ludovic (033), Haguët Marie-Clotilde (039), Hennequin Carole (025), Kalloumeh Antoine (017), Lanneluc Hortense (001), Lasnier Elisabeth (050), Le Bricon Thierry (018), Leprince Cécile (011), Leroy Aline (021), Mameri Hélène (037), Nassar Bertrand (013), Nesrine Hakima (012), Orlowski Sophie (049), Outreville Jonathan (005),

Cas clinique – Enfant N. Hôpital Armand Trousseau - 2019

Née à 37 SA, eutrophe par voie basse d'une maman primigeste de groupe sanguin A RhD positif et RAI négative. Bonne adaptation. Allaitement maternel exclusif avec difficulté de mise en route. Perte de poids à H72 de 12 %.

Pas d'ictère précoce mais ictère franc à H72 avec bilirubine transcutanée (Btc) à 270 $\mu\text{mol/L}$ motivant une bilirubine totale au laboratoire faite à l'hôpital Armand Trousseau (automate Roche Cobas) à 264 $\mu\text{mol/L}$ et simultanément de façon imprévue au CNRHP (automate Indiko/Beckman) à 302 $\mu\text{mol/L}$. L'évolution des bilirubinémies est résumée sur la *figure 11*. Sur la base du résultat du CNRHP, une photothérapie efficace est immédiatement initiée et une diminution rapide de la Btc est observée.

Ce cas illustre l'impact direct de différence inter techniques dépassant 10 % sur la conduite à tenir en urgence pour la prise en charge pédiatrique. Dans ce contexte sans conditions à risque, la survenue d'un ictère grave à H72 doit s'accompagner d'une décision thérapeutique la plus rapide possible. Un résultat par défaut peut entraîner un retard dans la mise sous photothérapie de plusieurs heures.

La cinétique de la bilirubinémie et le contexte clinique (conditions à risque aggravé de neuro-toxicité : déshydratation, prématurité, hypotrophie...) sont également à prendre en compte dans cette décision.

Pawlowski Maxime (014), Poupon Carole (019), Raffort Juliette (032), Robert-Mercier Tiphaine (017), Rota Michèle (010), Rouville Martine (015), Rousset Arnaud (042), Roux Thierry (043), Schmitt Francois (051), Serru Valérie (006), Taibi Ludmia (031), Yerokine Pierre (016).

Références

- Mollison PL, Walker W. Controlled trials of the treatment of hemolytic disease of the newborn. *Lancet* 1952 ; 1(9) : 429-33.
- Hsia DY, Allen Jr FH, Gellis SS, Diamond LK. Erythroblastosis fetalis VIII: studies of serum bilirubin in relation to kernicterus. *N Engl J Med* 1952 ; 247 : 668-71.
- Cortey A. Kernicterus: the comeback. *Arch Pediatr* 2012 ; 19(9) : 897-9.
- Ebbesen F. Recurrence of kernicterus in term and near-term infants in Denmark. *Acta Paediatr* 2000 ; 89 : 1213-7.
- Maisels MJ, Bhutani VK, Bogen D, Newman TB, Stark AR, Watchko JF. Hyperbilirubinemia in the newborn infant ≥ 35 weeks' gestation: an update with clarifications. *Pediatrics* 2009 ; 124 : 1193-8.
- Bhutani VK, Johnson L. A proposal to prevent severe neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus. *J Perinatol* 2009 ; 29(Suppl. 1) : S61-7.
- Cortey A, Tourneux P, Bedu A, Renesme L, Raignoux J, Casper C, et al. Management of jaundice in the newborn ≥ 35 GW: from screening to follow-after discharge. Guidelines for clinical practice - management and treatments after diagnosis. *Recommendation SFN* 2017 ; 24(2) : 192-203.
- American Academy of Pediatrics, Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004 ; 114 : 297-316. Erratum in *Pediatrics* 2004 ; 114 : 1138.
- Mailloux A. What to expect from a bilirubin analysis for management of Jaundiced Newborns? *Clin Biochem* 2014 ; 47 : 751-2.
- Lo SF, Jendrzyszczak B, Doumas BT, College of American Pathologists. Laboratory performance in neonatal bilirubin testing using commutable specimens. A progress report on a College of American Pathologists Study. *Arch Pathol Lab Med* 2008 ; 132 : 1781-5.
- Cobbaert C, Weykamp C, Hulzebos CV. Bilirubin standardization in the Netherlands: alignment within and between manufacturers. *Clin Chem* 2010 ; 56(5) : 872-3.
- Delatour V, Vaubourdolle M, Lasnier E, Mario N, Bailleur S, Haguet MC, et al. Standardization of serum total bilirubin measurement for improved diagnosis and management of neonatal jaundice. Euromedlab, Athènes, juin 2017.
- Klauke R, Kytzia HJ, Weber F, Grote-Koska D, Brand K, Schumann G. Reference measurement procedure for total bilirubin in serum re-evaluated and measurement uncertainty determined. *Clin Chim Acta* 2018 ; 481 : 115-20.
- Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Quality specifications and allowable standards for validation of methods used in clinical biochemistry. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999 ; 57 : 685-95.
- Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variations: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999 ; 59 : 491-500, <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
- Cortey A. Ictère et hyperbilirubinémie non conjuguée du nouveau-né : arbres décisionnels, courbes d'indication et principes thérapeutiques. <http://www.cnrhp.fr/docs/Arbres-outils-decisionnels-icterenouveaune-CNRHPv0319.pdf>.