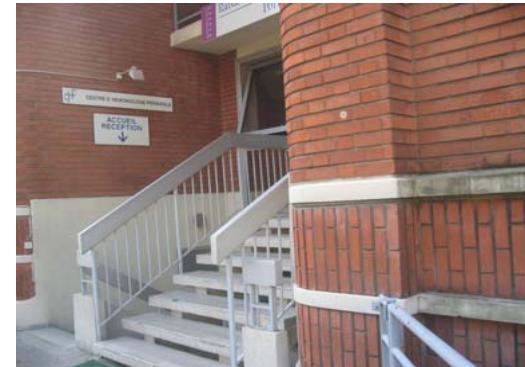


**DOSAGE DE LA BILIRUBINE  
NON LIEE A L'ALBUMINE (BNL)  
CHEZ LES NOUVEAUX-NES  
ICTERIQUES**

**CLUB LX / Dx C 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)

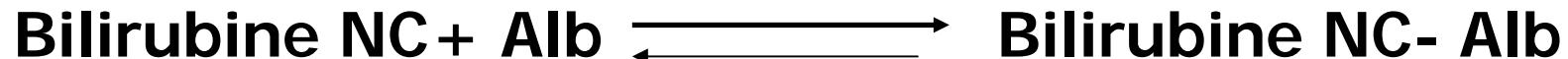
---

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

**Facteurs cliniques** : hémolyse néonatale, prématureté, acidose, souffrance neurologique périnatale

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

## LIAISON BILIRUBINE-ALBUMINE CARACTÉRISTIQUES



$K$  = 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 µg/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**

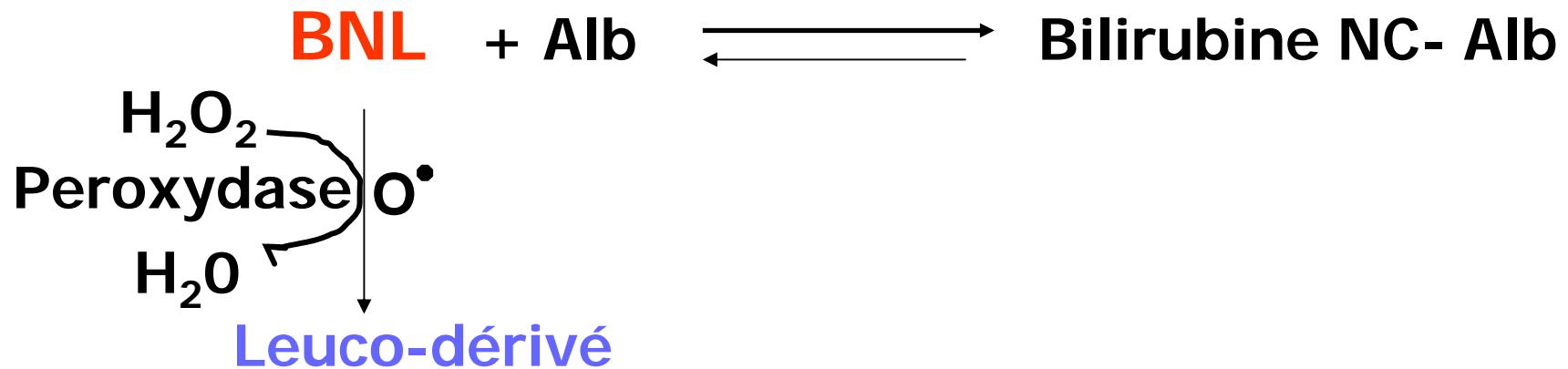
**1967 : Jirsova et al : gel filtration sur Sephadex**

....

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

# DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

## PRINCIPE

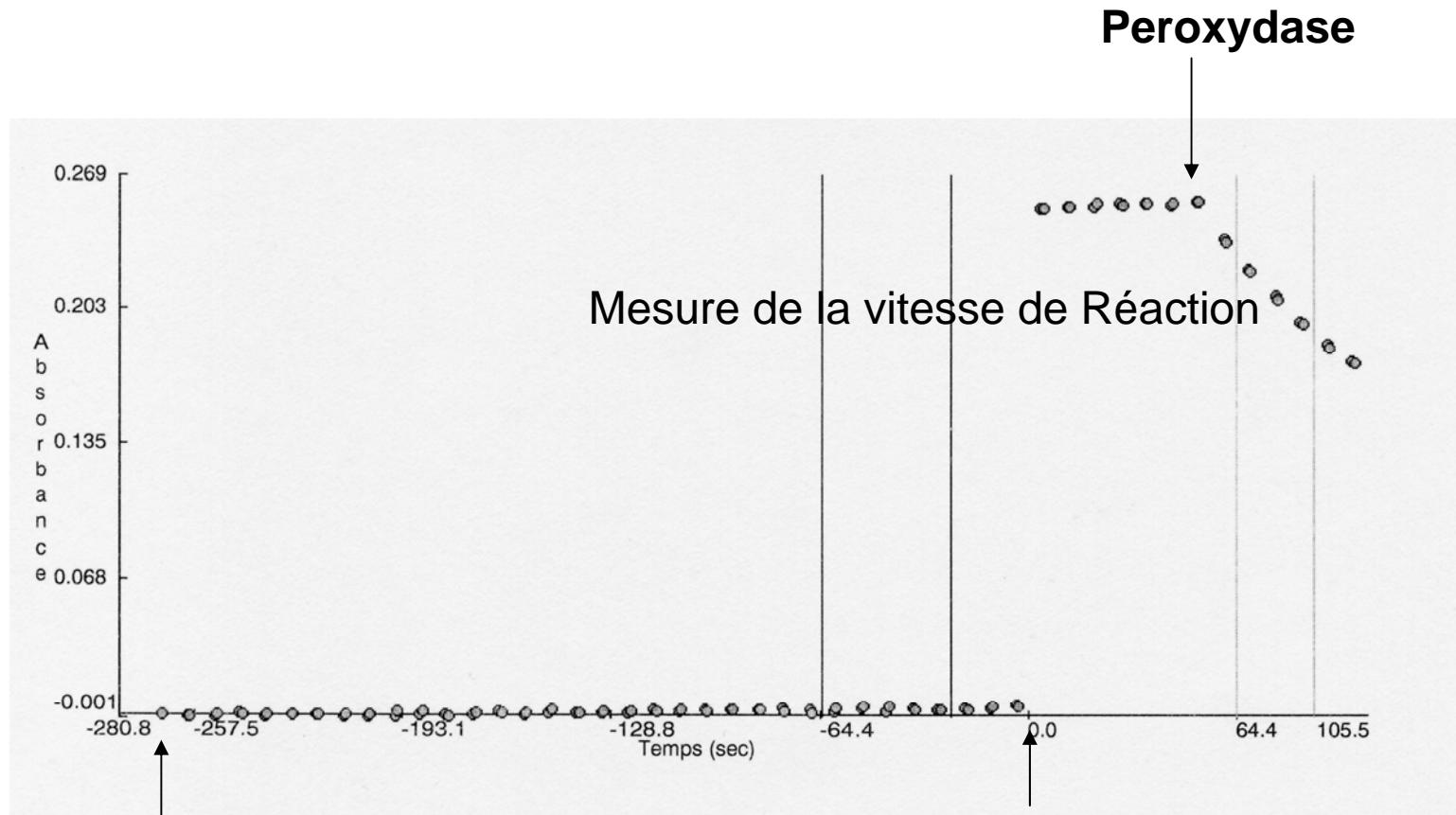


**BNL** rapidement dégradée en un leuco-dérivé par l'action d'une peroxydase en présence d'eau oxygénée, source de radicaux peroxydes.

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



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

# **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

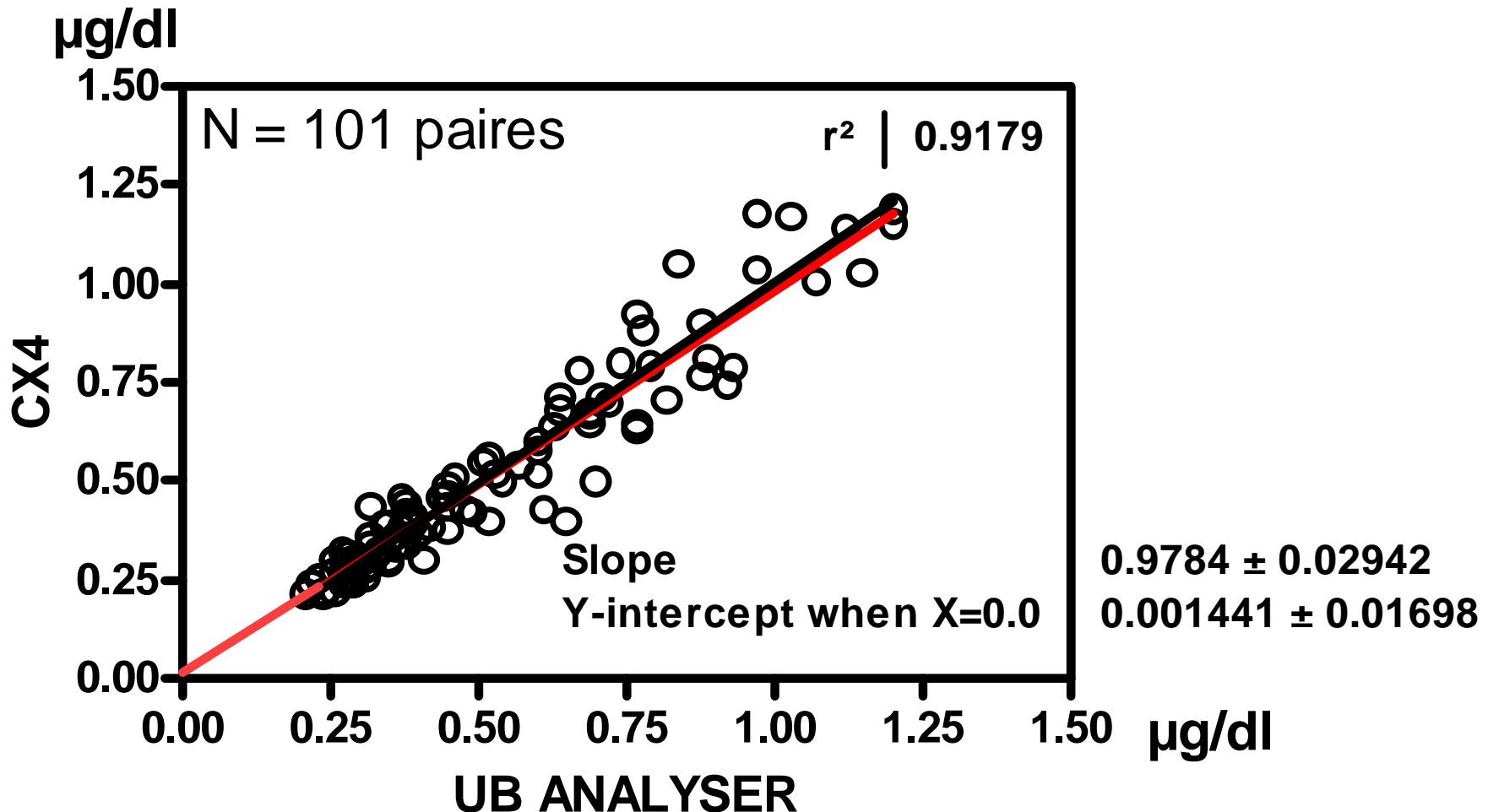
	<b>N</b>	<b>Moyenne µg/dl</b>	<b>Ecart-Type</b>	<b>CV %</b>
<b>NIVEAU 1</b>	<b>20</b>	<b>0.77</b>	<b>0.02</b>	<b>2.78 %</b>
<b>NIVEAU 2</b>	<b>20</b>	<b>1.01</b>	<b>0.02</b>	<b>1.9 %</b>

#### Reproductibilité

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

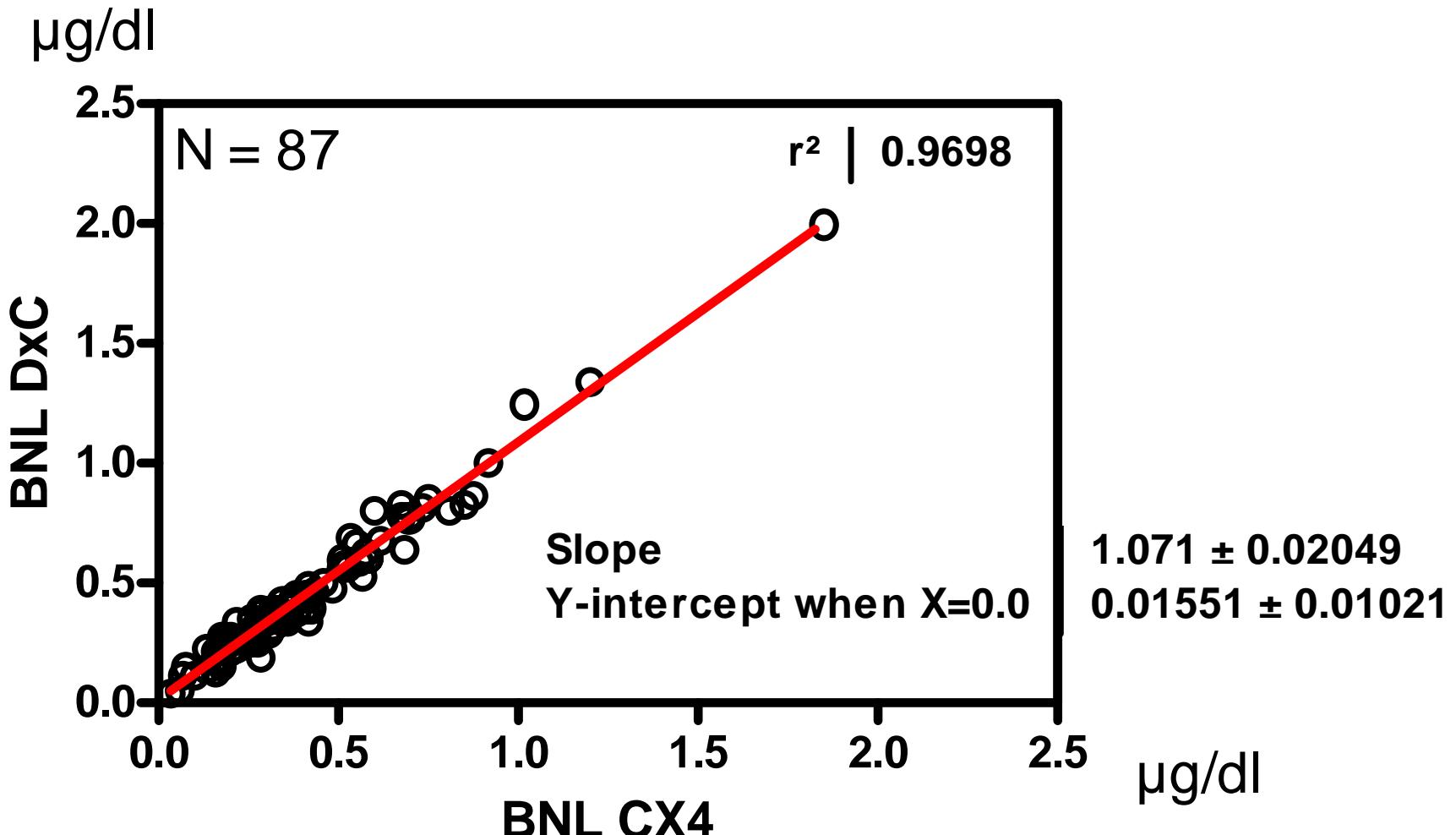
# DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

## CORRELATION BNL UB ANALYSER/ CX4



# DOSAGE BNL PAR METHODE PEROXYDASE

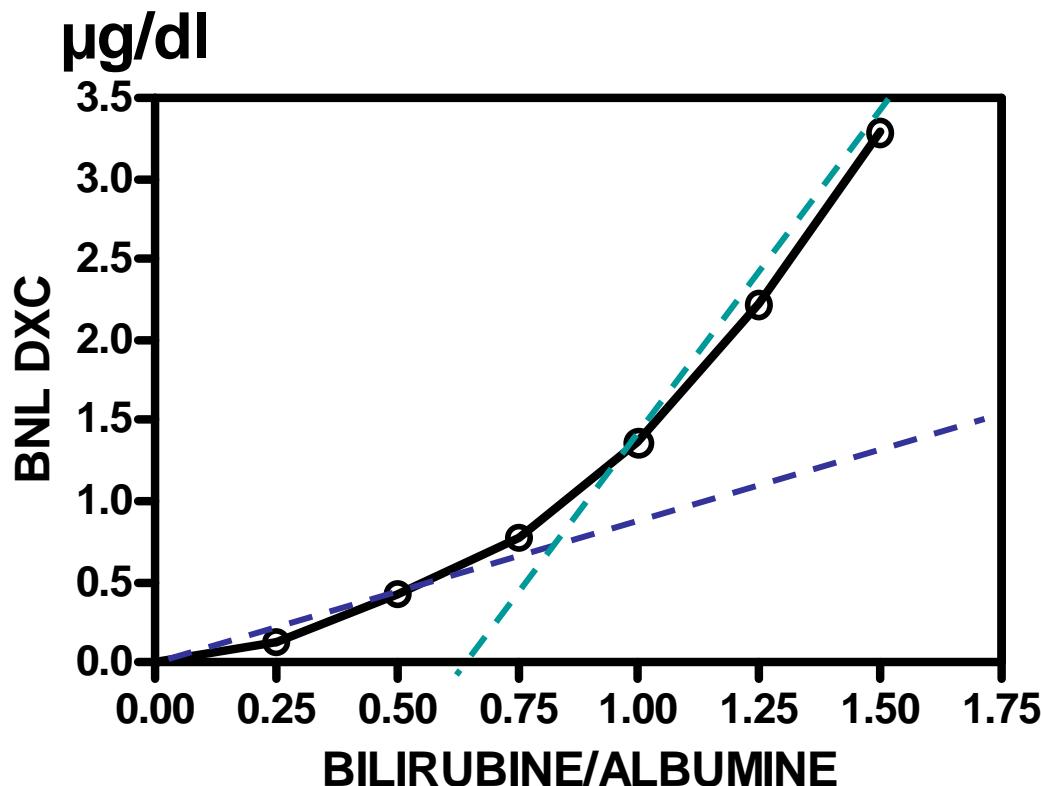
## CORRELATION BNL CX4/ DxC



# 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

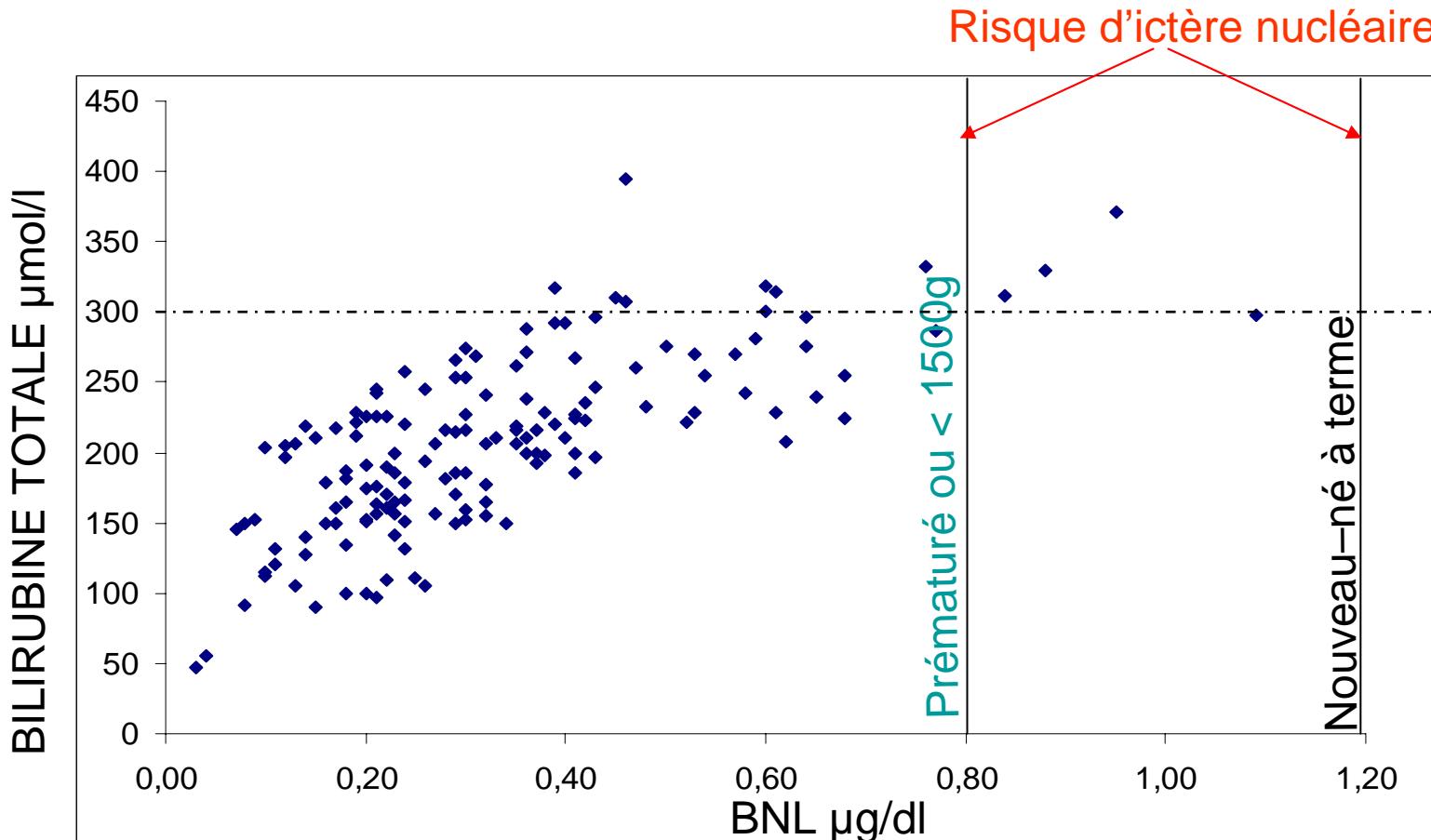


La réponse obtenue est  
conforme à la présence de  
2 sites de fixation  
d'affinité différente

# 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**