



Rijnstate



# Scheelzien van het geel zien

## Methodeverschillen bij neonataal bilirubine

Marlies Oostendorp

Gebruikersdag SKML sectie Algemene Chemie, 12 juni 2023

Rijnstate. Voorop in zorg voor jou.

# Disclosure belangen

- Geen (potentiële) belangenverstrengeling

# Inleiding - casus



- Neonaat vanuit 1<sup>e</sup> lijn
- Mogelijke wissel, totaal bili 435  $\mu\text{mol/L}$ , WT-grens 420  $\mu\text{mol/L}$
- Geen plek, doorverwijzing elders, bili 387  $\mu\text{mol/L}$
- Intensieve foterapie en ontslag na 1 dag
- Controle bili Rijnstate: 380  $\mu\text{mol/L}$
- Heropname elders, bili 304  $\mu\text{mol/L}$



Forse discrepanties in totaal bilirubine met gevolgen voor klinisch beleid

# Methodeverschillen

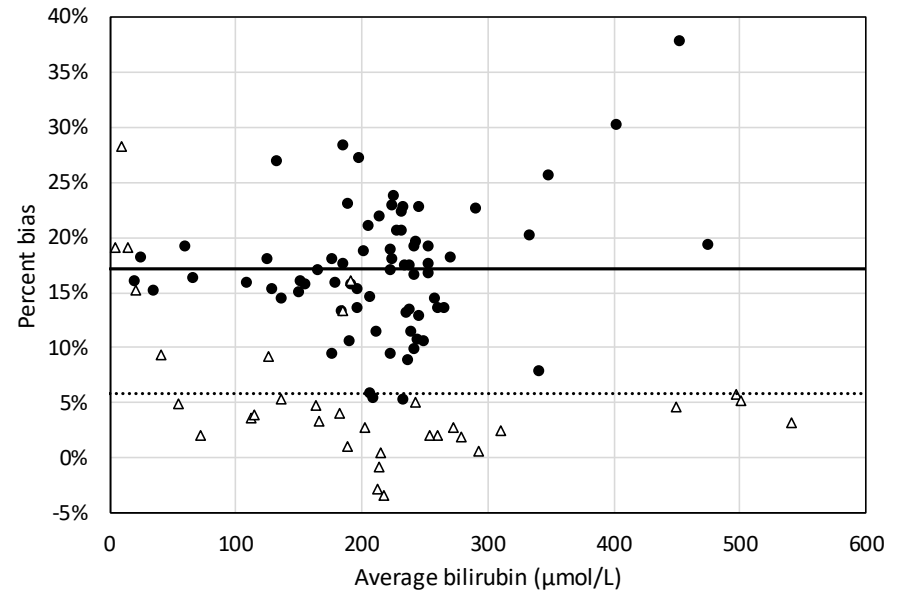
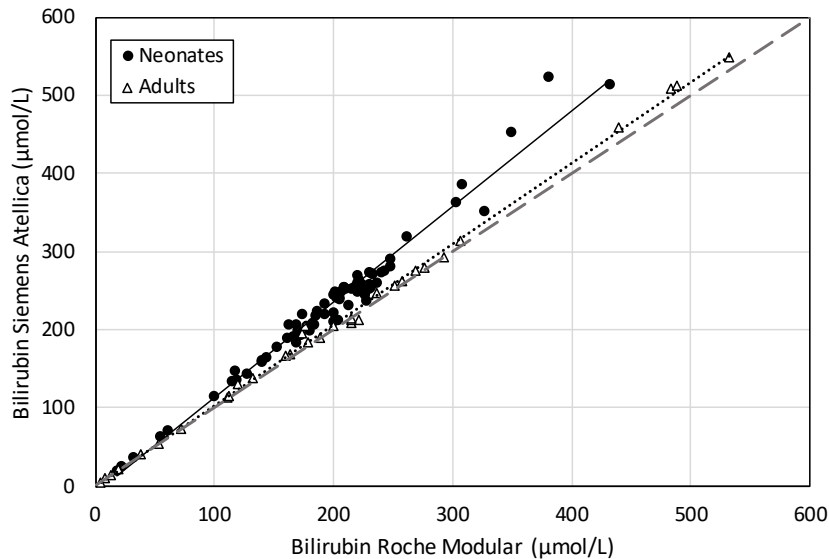
- Roche Cobas vs Siemens Atellica
- Totaal bilirubine: diazo vs vanadaat oxidase assay

Overgang Roche → Siemens in Rijnstate

- Verificatie OK
- Echter, na implementatie:
  - *Neonatalogen: soms alle FT-lampen in gebruik*
  - *Toename onderzoek ABO-antagonisme*
  - *Cases*



# Patiëntenvergelijk

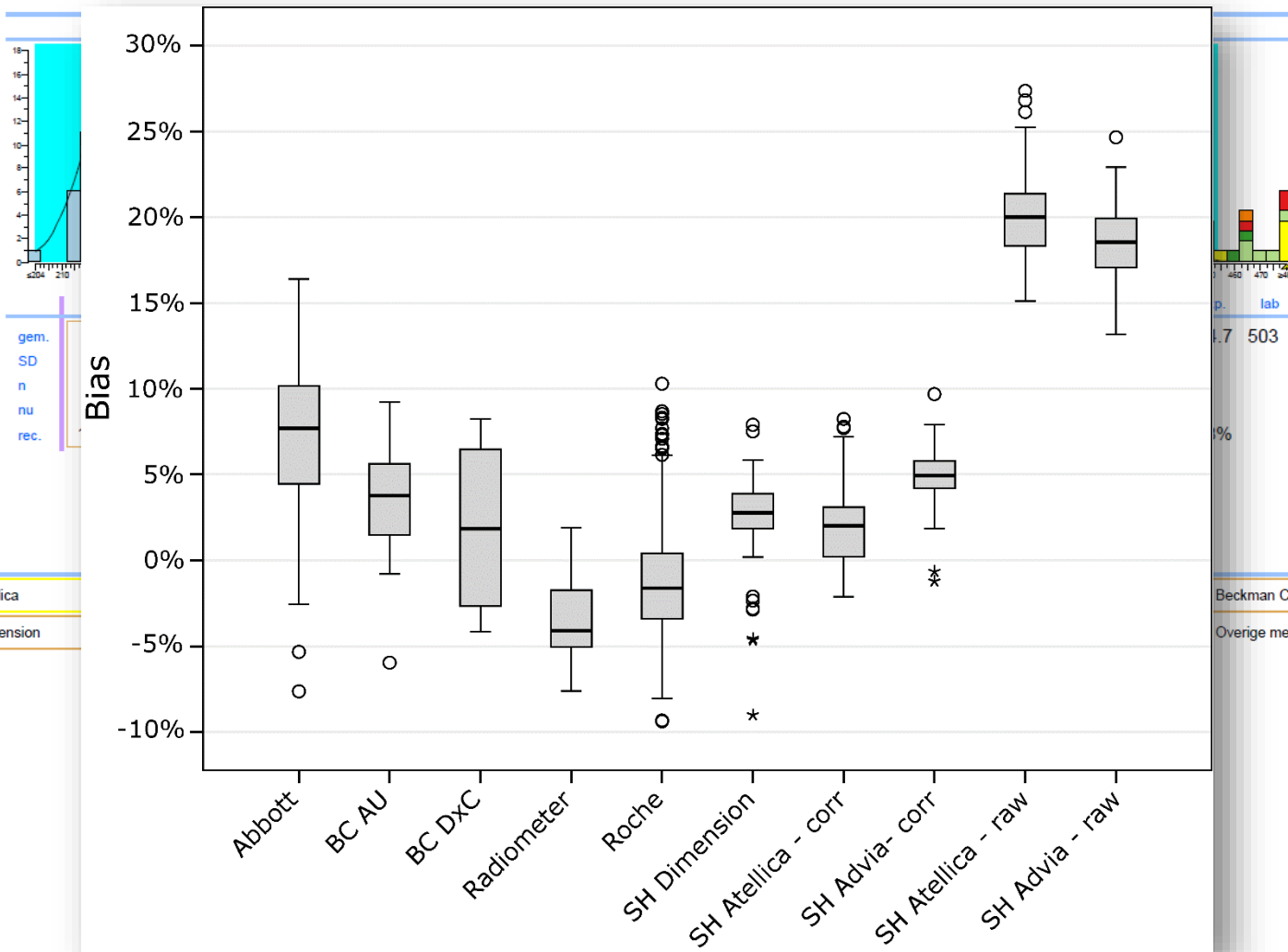


## Gemiddelde bias

Neonaten (n=72): +17,4%

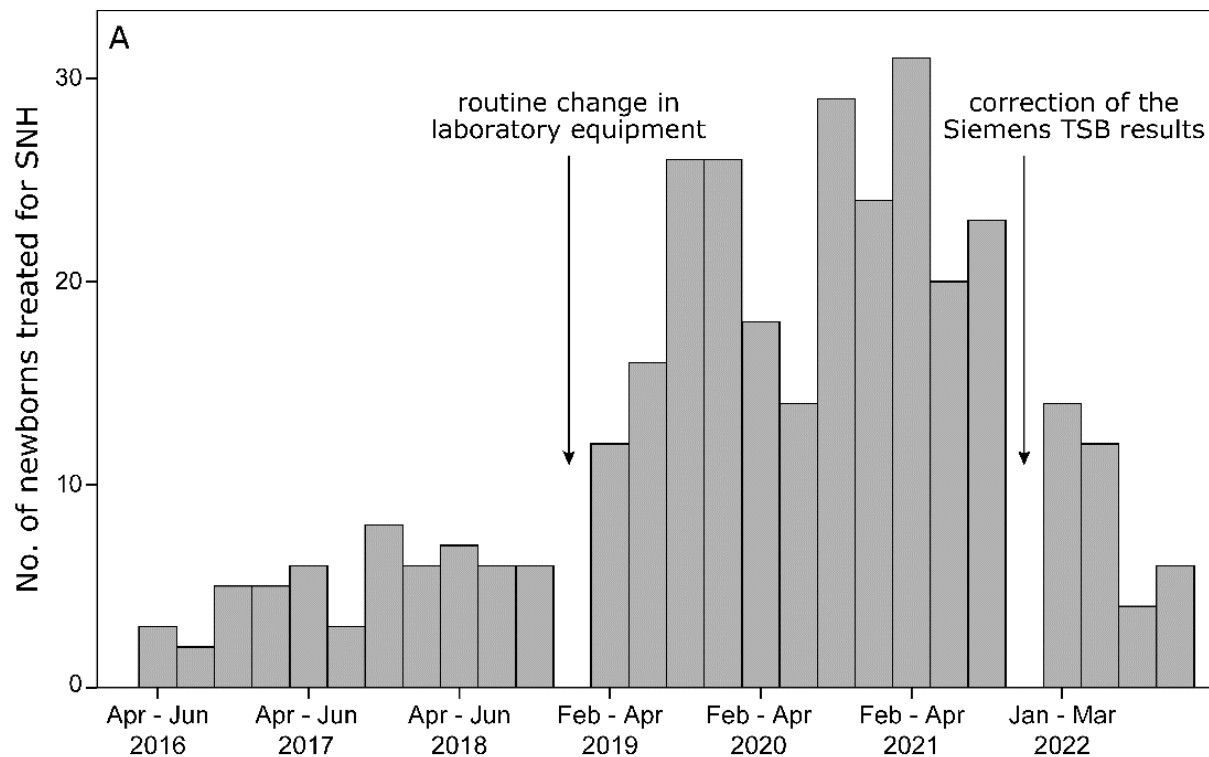
Volwassenen (n=33): +3,7%

# SKML Neonatale bilirubine



# Effect op FT behandeling

- Analyse opname en FT obv HiX data met CTcue software



# Speelt bij meerdere methoden

- Voorbeeld 2

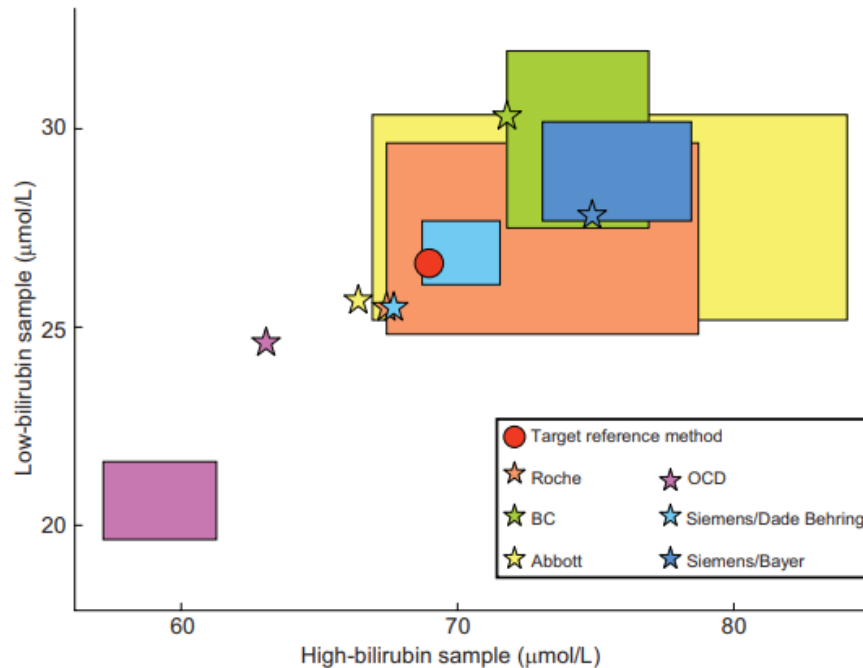
- |                    |                            |              |
|--------------------|----------------------------|--------------|
| • Radiometer ABL   | bili 337 $\mu\text{mol/L}$ | Co-oximetrie |
| • Abbott Architect | bili 407 $\mu\text{mol/L}$ | Diazo        |

- Voorbeeld 3

- |                    |                            |          |
|--------------------|----------------------------|----------|
| • Abbott Architect | bili 360 $\mu\text{mol/L}$ | Diazo    |
| • Roche Cobas      | bili 280 $\mu\text{mol/L}$ | Diazo    |
| • Siemens Atellica | bili 338 $\mu\text{mol/L}$ | Vanadaat |

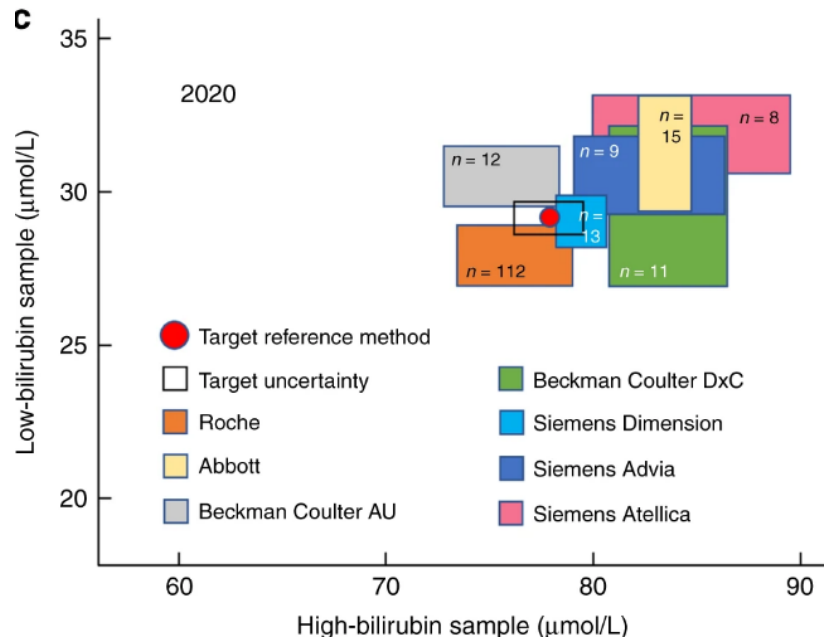
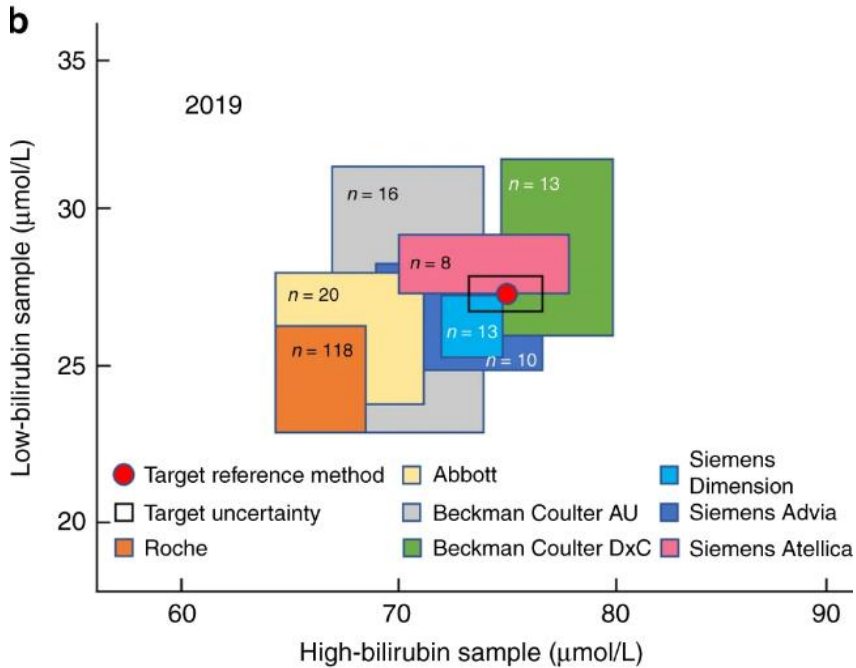


# Historie in NL - 2010



- Geen standaardisatie
- Abbott en Roche grootste interlab CV (mogelijk ivm herstandaardisatie beide methoden)
- Beckman-Coulter en Siemens/Bayer relatief hoog

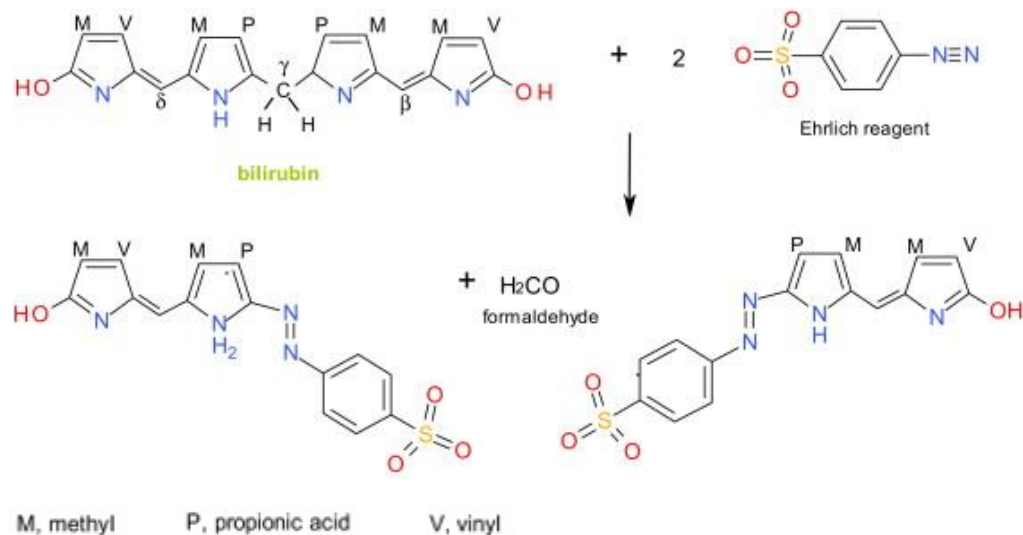
# Historie in NL - 2019 en 2020



- Verbetering interlab CV (overall 3 – 6%)
- Opvallende verschuiving assays tov ref method

# De bilirubine assay - historie

- Diazo reactie van Ehrlich – 1884
- Direct vs totaal bili door Hijmans vd Bergh - 1915



# Beschrijving in NTvG 1901

Hieraan zouden vele andere voorbeelden toegevoegd kunnen worden. Veeleer heb ik er naar gestreefd U te toonen, welk rijke vruchten de toepassing der physische scheikunde reeds heeft afgeworpen, en welke gewichtige diensten zij ons, mits met voorzichtigheid gehanteerd 2), ook in de toekomst zal kunnen bewijzen bij de studie der duistere problemen, die de bioloog dagelijks op zijnen weg ontmoet.

## WETENSCHAPPELIJKE MEDEDEELINGEN.

**Over de diazo-bilirubine-reactie.** — Verricht men met een biliruline-oplossing de diazo-reactie van EHRlich, dan verkrijgt men, als men tevoren wat zuur heeft toegevoegd, een blauwe kleur, die in rood overgaat, als men de vloeistof neutraal maakt en bij toevoeging van meer alkali groen wordt. Indien men daarbij zorgt, dat men bij deze zuur gemaakte oplossing van z. g. „azobilirubine” zeer voorzichtig een verdund alkali voegt, dan ziet men die schakeering in drie prachtig gekleurde ringen. Bij toevoeging van bilirubine bij een normale urine ziet men dat kleurenspeel eveneens, maar in icterische urine schijnt steeds een stof aanwezig te zijn, die met het azobilirubine een bruinroode verkleuring geeft.

Om zijn reactie nu ook voor icterische urine bruikbaar te maken, raadt Dr. F. PRÖSCHER aan, de methode van MÉTU en TRIOLLET te volgen: 10 cM<sup>3</sup> urine worden met ammoniumsulfaat verzadigd. Men filtreert dan en trekt het neerslag met 96 pCt. alcohol uit. Met deze alcoholische oplossing verricht men dan, na toevoeging van wat zuur, de diazo-reactie.

Ook voor het aantoonen van bilirubine in serum is de methode aan te wenden. Men slaat met alcohol het serumalbumine neer, filtreert en past op het zuurgemaakte filtraat de diazo-reactie van EHRlich toe (*Centrallbl. f. inn. Medicin*, n<sup>o</sup>. 7, 1901).

L. C. KERSBERGEN.

# Diazo volgens Doumas

- Gebaseerd op Jendrassik-Gróf principe (1983)
  - Caffeïne-benzoate accelerator
  - Diazo reactie, vorming azobilirubine
  - Alkalische tartraatoplossing
  - Meten bij 598 nm
- NIST SRM 916a als standaard
  - Gebaseerd op specifieke extinctie coëfficiënt ( $\epsilon$ ) van azopigmenten
  - Hog bile bilirubin

# Referentiemethode Hannover

- Doumas methode
- Resultaten gebaseerd op  $\varepsilon$  ipv kalibrator
- Zonder SRM 916a
  - Niet meer beschikbaar
  - Bevat 2 andere isomeren

Reference measurement procedure for total bilirubin in serum re-evaluated and measurement uncertainty determined

Rainer Klauke<sup>a</sup>, Hans-Joachim Kytzia<sup>b</sup>, Friederike Weber<sup>b</sup>, Denis Grote-Koska<sup>a,\*</sup>, Korbinian Brand<sup>a</sup>, Gerhard Schumann<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Medizinische Hochschule Hannover, Institute of Clinical Chemistry, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany

<sup>b</sup> Roche Diagnostics, Nonnenwald 2, 82377 Penzberg, Germany

*Clinica Chimica Acta* 481 (2018) 115–120

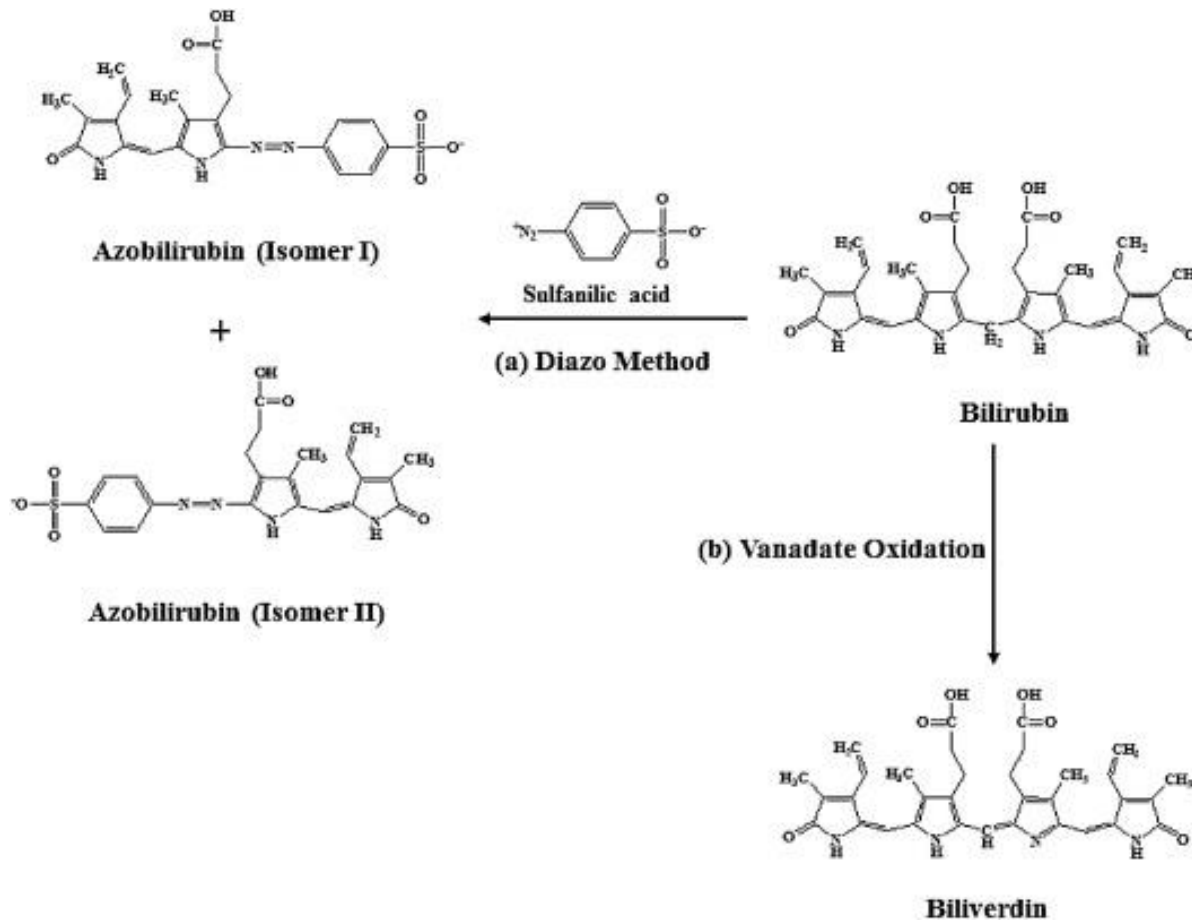


Dicoon



Rijnstate

# Diazo vs vanadaat oxidase

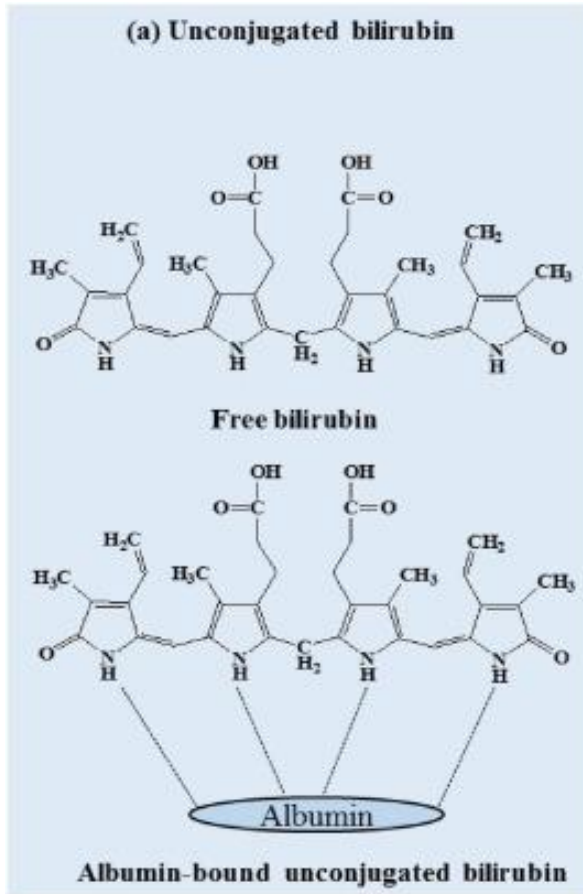


Meting ↑↑  
rode kleur  
azobilirubine

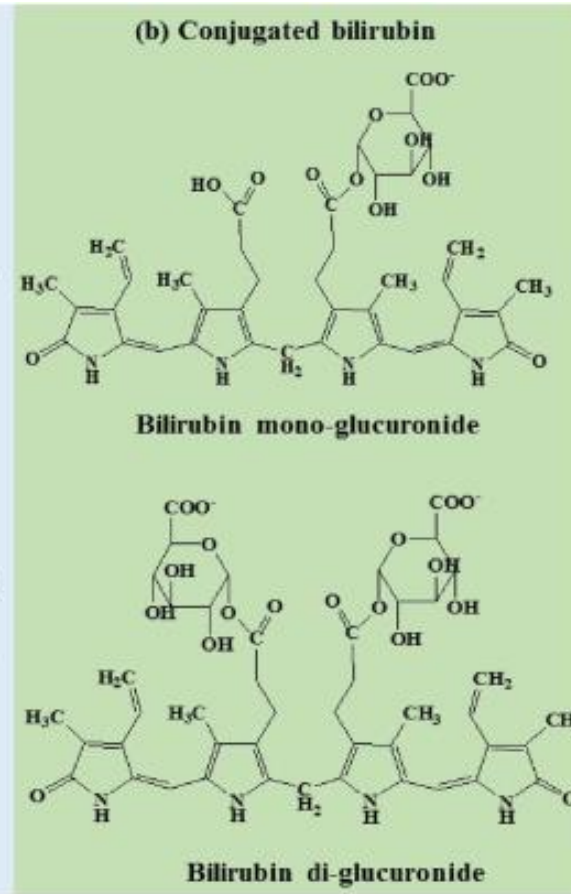
Meting ↓↓  
gele kleur  
bilirubine

# Wat meten we eigenlijk?

$\alpha$



$\delta$

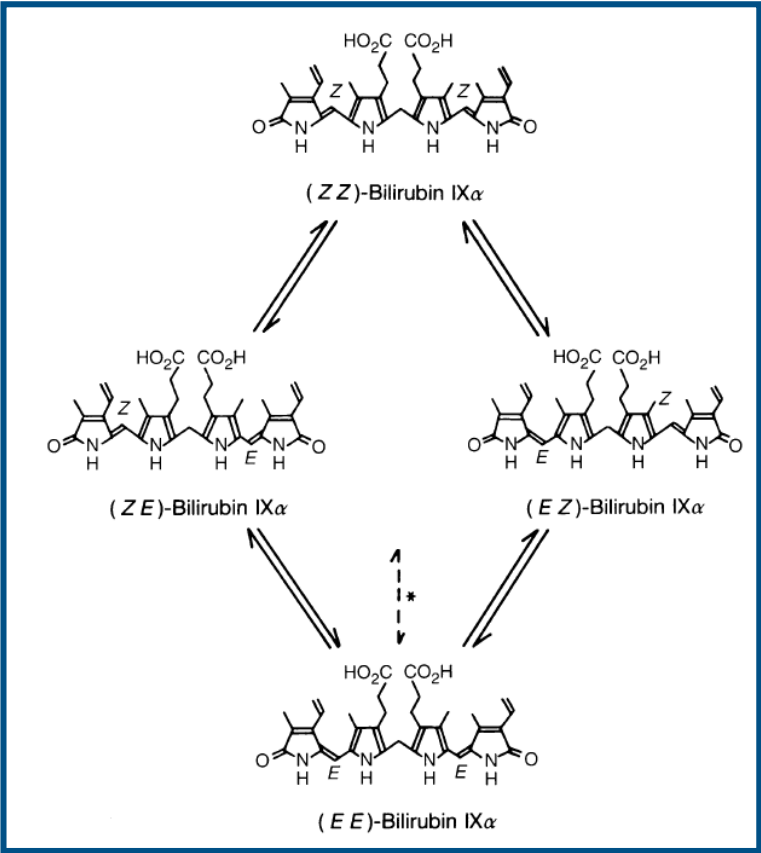


$\beta$

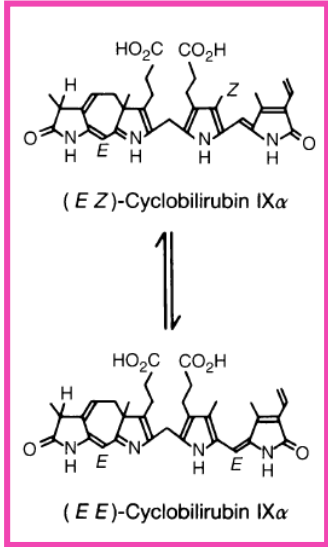
$\gamma$



# Isomeren ongeconjugeerde bili

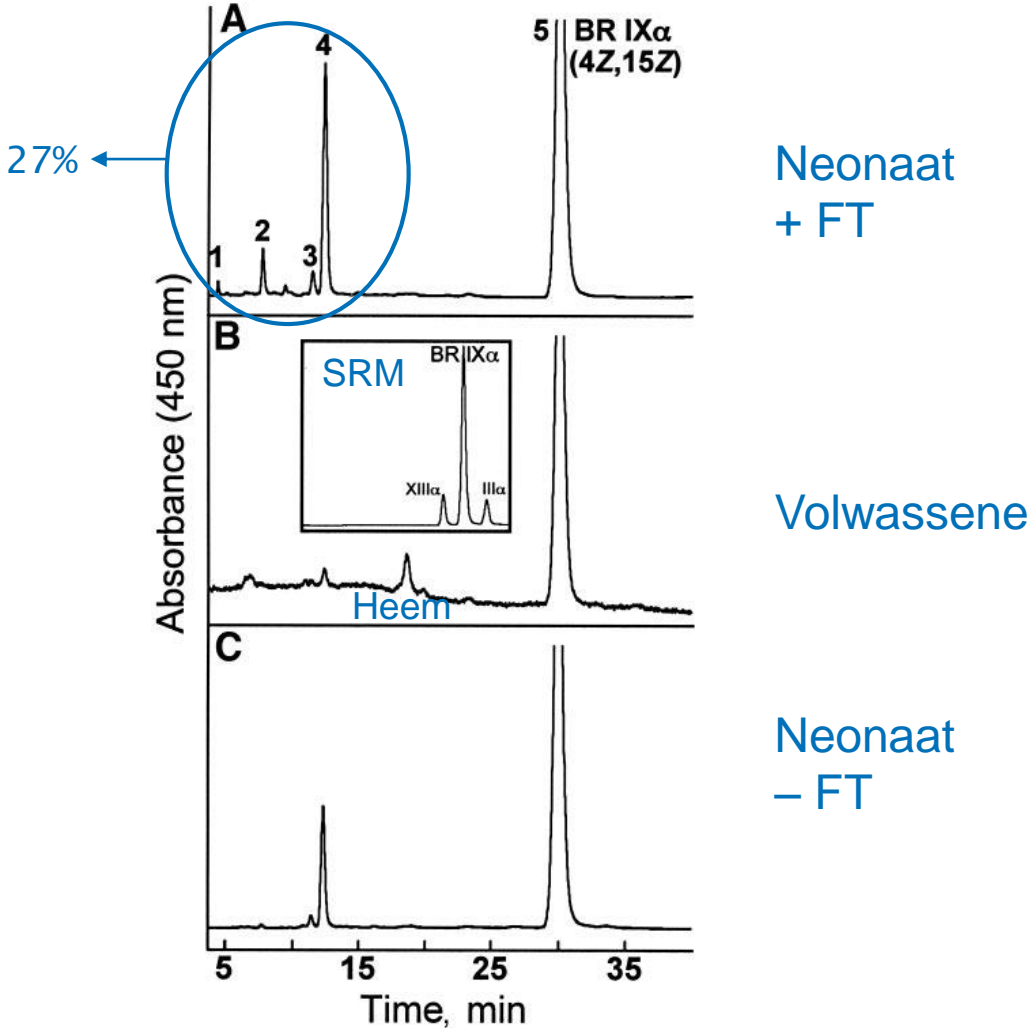


Stereo isomeren



Structurele isomeren  
(lumibilirubines)

# Foto-isomeren bij neonaten



Neonaat  
+ FT

Volwassene

Neonaat  
- FT

**BILI**  
IS LIKE A  
**BOX OF**  
**CHOCOLATE**  
YOU NEVER  
KNOW WHAT  
**YOU'RE**  
**GONNA GET.**



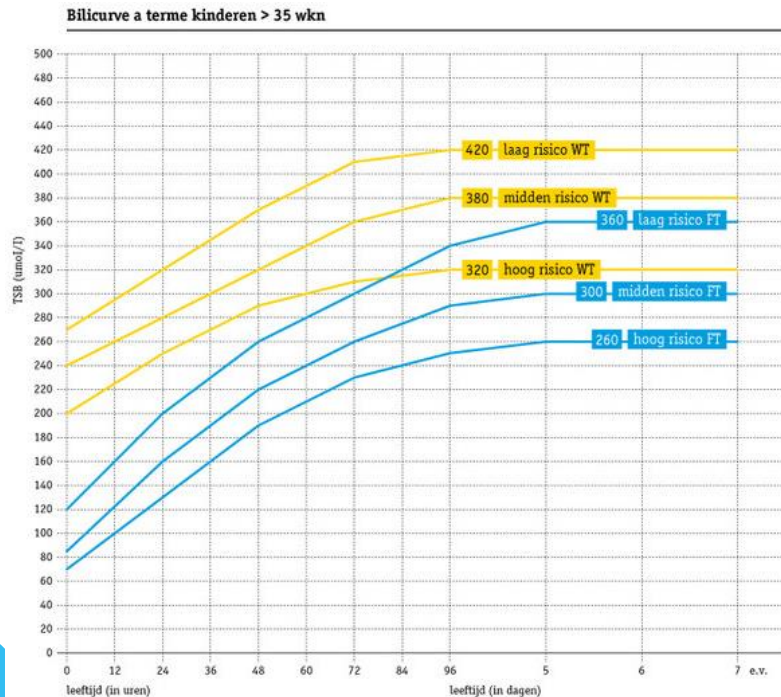
Dicoon



Rijnstate

# Hoe zit het met de FT en WT grenzen?

- AAP richtlijn 2004: Bhutani 1999 + andere studies
- Bhutani: Hitachi 747 analyzer, diazo methode
- Echter, getallen ook al in AAP richtlijn 1994



**Table 2.** Management of Hyperbilirubinemia in the Healthy Term Newborn\*

| Age, hours | TSB Level, mg/dL (µmol/L) |              |   |   |
|------------|---------------------------|--------------|---|---|
|            | Consider Phototherapy†    | Phototherapy | Exchange Transfusion if Intensive Phototherapy Fails‡ | Exchange Transfusion and Intensive Phototherapy |
| ≤24§       | ...                       | ...          | ...   | ...   |
| 25–48      | ≥12 (170)                 | ≥15 (260)    | ≥20 (340)   | ≥25 (430)                                       |
| 49–72      | ≥15 (260)                 | ≥18 (310)    | ≥25 (430)   | ≥30 (510)                                       |
| >72        | ≥17 (290)                 | ≥20 (340)    | ≥25 (430)   | ≥30 (510)                                       |

# AAP Guideline 2022

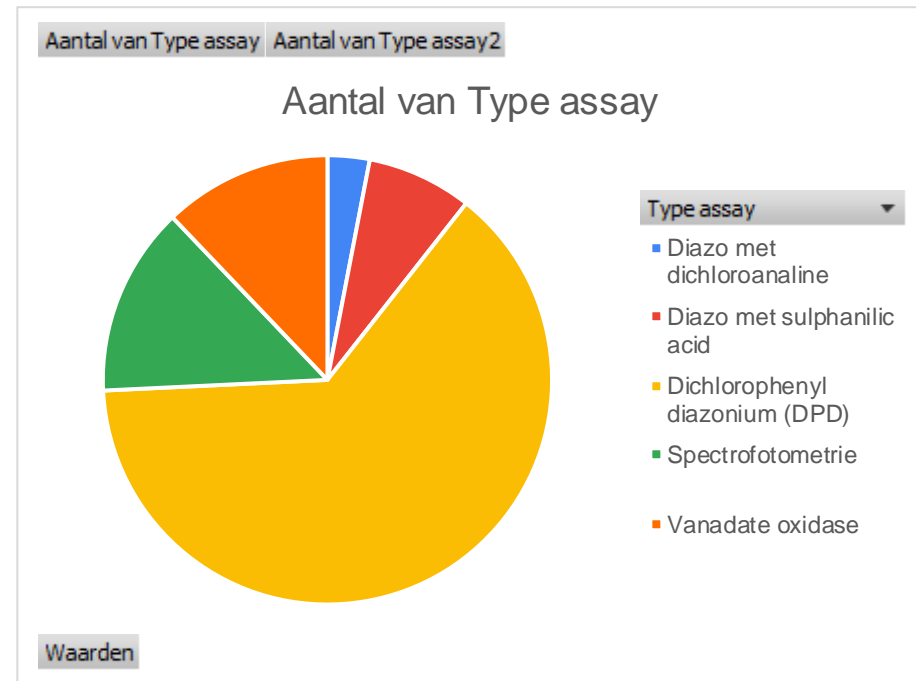
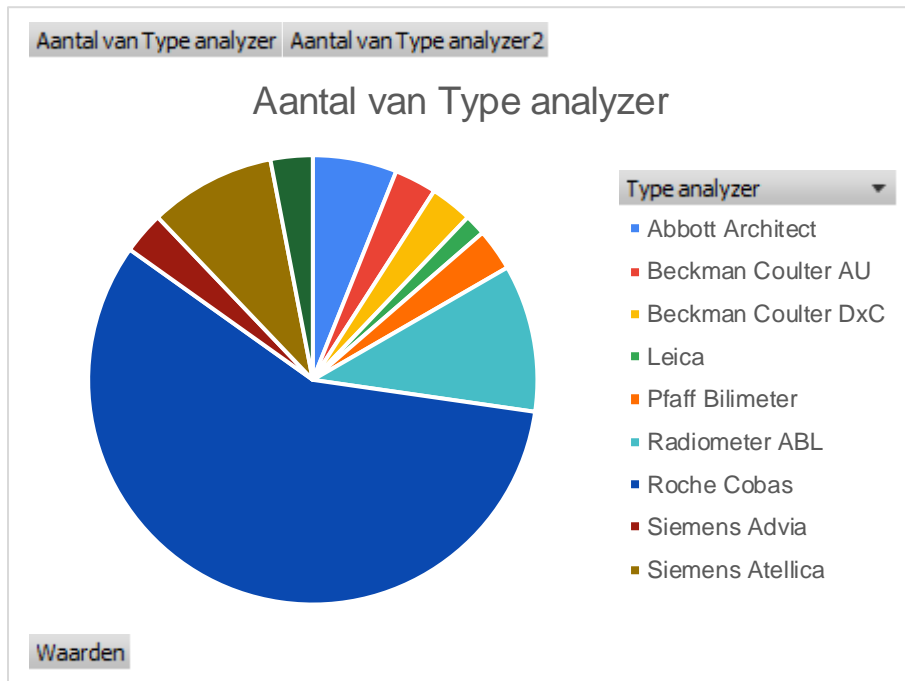
- Grenzen verhoogd met 1 of 2 mg/dL (17 of 34  $\mu\text{mol/L}$ )
- Gebaseerd op andere risico afweging en expert opinion
- Geen info over analytische methoden en verschillen

exchange transfusion. The recommended phototherapy thresholds (Figs 2 and 3; Supplemental Tables 1 and 2; Supplemental Figs 1 and 2) are far below those at which overt acute bilirubin neurotoxicity or kernicterus occurs.<sup>9,26,87-95</sup> Phototherapy

These thresholds, like those in the 2004 guidelines, are based on expert opinion rather than strong evidence that they distinguish between infants in whom the benefits of phototherapy do or do not exceed its risks.

# Bilirubine assays in NL

- Enquête september 2022
- Respons 90%



# Herleidbaarheid kalibrator

Is de assay herleidbaar naar een hogere orde standaard?

| Assay               | Ja        | Nee       |
|---------------------|-----------|-----------|
| Abbott Architect    | 4         |           |
| Beckman Coulter AU  | 2         |           |
| Beckman Coulter DxC |           | 2         |
| Leica               |           | 1         |
| Pfaff Bilimeter     | 2         |           |
| Radiometer ABL      | 3         | 4         |
| Roche Cobas         | 23        | 15        |
| Siemens Advia       | 2         |           |
| Siemens Atellica    | 6         |           |
| Siemens Dimension   | 1         | 1         |
| <b>TOTAAL</b>       | <b>43</b> | <b>23</b> |

Informatie uit IFU mbt herleidbaarheid is vermoedelijk onduidelijk

# Wat staat er in de IFU?

## Roche Cobas

Traceability: The method was standardized against the Doumas method.<sup>4</sup>

## Abbott Architect

### Accuracy

A study was performed to estimate the bias of the Total Bilirubin<sub>2</sub> assay relative to material standardized to the Doumas Total Bilirubin reference method. Testing was conducted using 2 concentrations of

Feb 2023: herstandaardisatie kalibrator met NIST SRM 916b → bias omlaag

## Beckman AU

The calibrator total bilirubin value is traceable to the National Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Material (SRM) 916a.

## Siemens Atellica

### Standardization

The Atellica CH TBil<sub>2</sub> assay is traceable to the American Association for Clinical Chemistry (AACC) reference method, which uses reference materials from the National Institute of Standards and Technology (NIST SRM 916).

## Radiometer ABL90

ctBil

The reference method for total bilirubin is a spectrophotometric method (wet chemistry based on a method from Bayer Healthcare, Tarrytown USA).

The method is traceable to NIST SRM916a Bilirubin.



Dicoon



Rijnstate



# Correctiefactoren

Gebruikt u een correctiefactor?

| Assay               | Ja        | Nee       |
|---------------------|-----------|-----------|
| Abbott Architect    |           | 4         |
| Beckman Coulter AU  |           | 2         |
| Beckman Coulter DxC |           | 2         |
| Leica               | 1         |           |
| Pfaff Bilimeter     |           | 2         |
| Radiometer ABL      | 2         | 5         |
| Roche Cobas         | 3         | 35        |
| Siemens Advia       | 2         |           |
| Siemens Atellica    | 4         | 2         |
| Siemens Dimension   |           | 2         |
| <b>TOTAAL</b>       | <b>12</b> | <b>54</b> |

Gemiddelde factoren (range)

|                  | Helling               | Asafsede |
|------------------|-----------------------|----------|
| Leica            | 0,91                  | -1,8     |
| Radiometer ABL   | 1,04<br>(1,03 - 1,04) | 0        |
| Roche Cobas      | 1,05<br>(1,03 - 1,09) | 0        |
| Siemens Advia    | 0,87<br>(0,85 - 0,88) | 0        |
| Siemens Atellica | 0,85<br>(0,82 - 0,86) | 0        |



# Correctiefactoren

- 18% corrigeert neonatale bili (12/66)
  - 8 deelnemers corrigeren alle resultaten
  - 4 deelnemers corrigeren alleen neonaten
- Hoe is de factor vastgesteld?
  - SKML klinische chemie bloed
  - SKML klinische chemie bloed + interne QC
  - SKML klinische chemie bloed + eigen methodevergelijk
  - SKML neonatale bili
  - SKML neonatale bili + SKML klinische chemie bloed
  - SKML neonatale bili + eigen methodevergelijk



# Hoe nu verder?

- Oprichting landelijke werkgroep
- Doel: harmonisatie totaal bilirubine neonaten



# Acties werkgroep

- Overzicht bilirubine assays in NL → enquête
- Onderzoek assay verschillen met neonataal materiaal
- Analyse SKML data
- Commuteerbaar EQA materiaal ontwikkelen
- Deelname aan IFCC werkgroep (2 leden)



Neonatal Bilirubin (WG-NB) in cooperation with IFCC  
Scientific Division - SD

# Tipje van de sluier

- Natief neonataal materiaal
  - *Voor, tijdens en na FT*
  - *Restmateriaal WT → toekomst als EQA?*
- Pilot rondzending in NL
  - *Alle grote platforms in duplo*
  - *Referentiemethode Hannover*
  - *LC-MSMS en HPLC voor isomeren*
  - *SKML neo bili samples en NIST SRM 916b*



# Samengevat

- Totaal bilirubine assays zijn niet geharmoniseerd
- Onduidelijkheid over
  - *Measurand verschillende assays*
  - *Effect stereo- en foto-isomeren*
  - *Herkomst behandelgrenzen en relatie tot huidige assays*
- Consequenties voor behandeling neonaten
- (Inter)nationale initiatieven voor harmonisatie
- Gebruik neonatale monsters bij verificatie

# Dankwoord

## Werkgroep neonatale bilirubine

Miranda van Berkel

Christian Hulzebos

Marieke Frasa

Jenny Kootstra

Christa Cobbaert

Paul Schenk

Jolande Vis

Andrei Tintu

Christian Schoenmakers

Lauren Westenberg

## MCA lab Winterswijk

Cas Weykamp

Hans vd Vuurst

Marieke te Winkel

Iedereen die de enquête heeft ingevuld

Analisten Radboudumc, UMCG en  
RHMDc (LangeLand) voor verzamelen  
neonatale monsters

Contact:

[moostendorp@rijnstate.nl](mailto:moostendorp@rijnstate.nl)



Dicoon



Rijnstate



Dicoon



Rijnstate



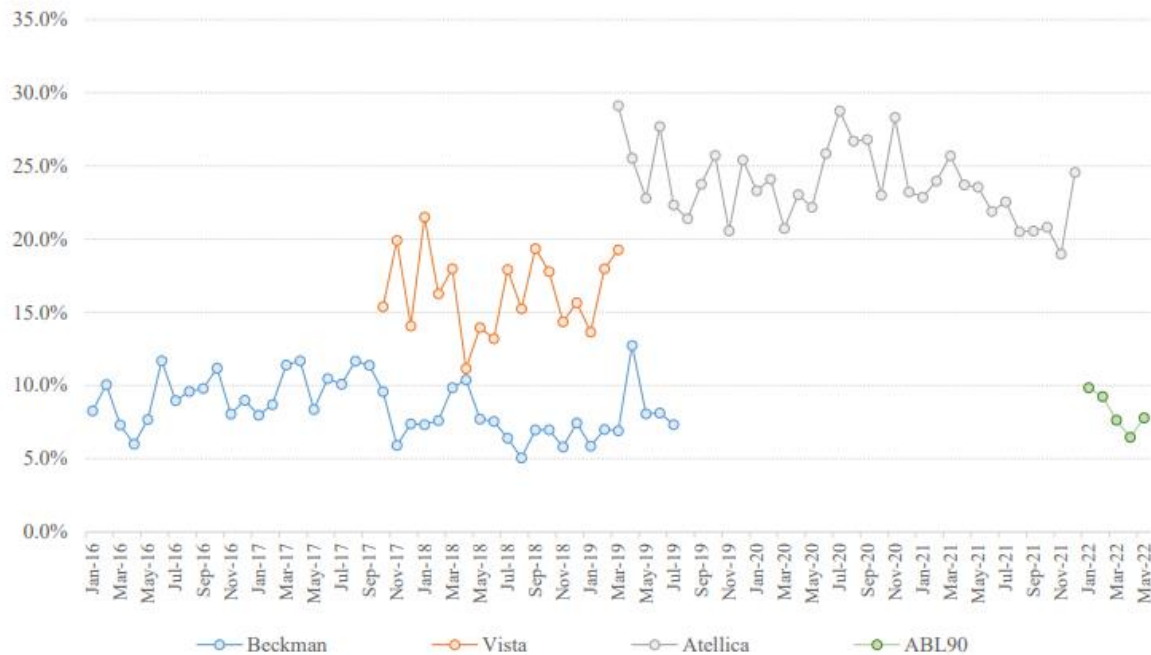


Figure 1: Monthly rates of phototherapy administration.

| Platform   | AU680     | Vista500  | Atellica           | ABL90 FLEX     |
|------------|-----------|-----------|--------------------|----------------|
| Year       | 2016–2019 | 2018–2019 | 2019–2021          | 2022 (5-month) |
| Principle  | Diazo     | Diazo     | Vanadate oxidation | Co-oximetry    |
| Calibrator | 916a      | 916a      | 916a               | 916a           |
| NIST SRM   |           |           |                    |                |

# IIIa, IXa en XIIIa bilirubine

- Van nature komt vooral het IXa isomeer voor
- Andere 2 isomeren ontstaan waarschijnlijk bij isolatie en zuivering van commerciële bilirubine preparaten

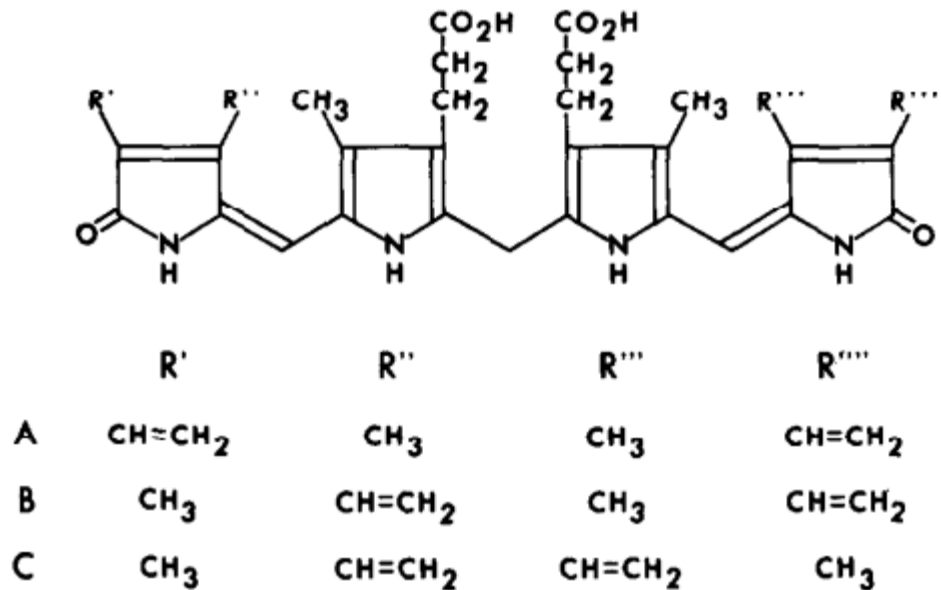


Fig. 1. Structures of bilirubin III- $\alpha$  (A), IX- $\alpha$  (B) and XIII- $\alpha$  (C).

# Verschillen tussen diazo assays

## Roche Cobas

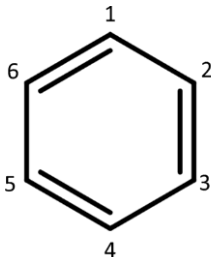
**R1** Phosphate: 50 mmol/L; detergents; stabilizers; pH 1.0

**R3 (STAT R2)** 3,5-dichlorophenyl diazonium salt:  $\geq 1.35$  mmol/L

## Abbott Architect

**R1** Active ingredient: Brij L23 (233.333 mL/L).

**R2** Active ingredients: 2,4-dichlorobenzenediazonium  
1,5-naphthalenedisulfonate hydrate (1845.000 mg/L) and Brij L23  
(100.000 mL/L).



## Beckman AU

Caffeine

3,5 Dichlorophenyl diazonium tetrafluoroborate

Surfactant

## Siemens Dimension

Reagents

| Wells <sup>a</sup> | Form   | Ingredient                                      |
|--------------------|--------|---|
| 1–8                | Liquid | Caffeine<br>Buffer, NaBenzoate<br>DiSodium EDTA |
| 9–10               | Liquid | Sulfanilic acid<br>Hydrochloric acid            |
| 11–12              | Liquid | Sodium nitrite                                  |



ijnstate

## Method

Ehrlich (1883) – Urine bilirubin (sulfanilic acid, sod nitrite)

Meulengracht(1919) - 육안 비색법

Hijmans van den Bergh(1916) - Diazo reagent

Malloy – Evelyn (1937) – Diazo / alcohol(acid)

Jendrassik – Grof (1938) – Diazo/Caffein(alk)

Michaelsson(1965) – dyphyllin / sod acetate(alk)

## JENDRASSIK METHOD

- This reaction is terminated by the addition of ascorbic acid, which destroys the excess diazo reagent.
- A strongly alkaline tartrate solution is then added to convert the purple azobilirubin to blue azobilirubin and the intensity of the color is read at 600 nm.

## Jendrassik-Grof

Measures Total and Conjugated bilirubin –

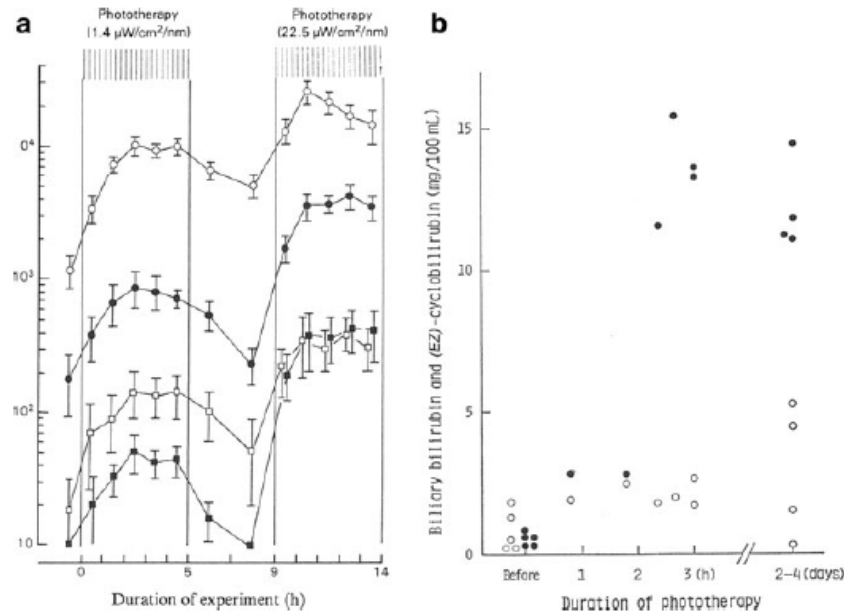
### Principle

- Bilirubin pigments in serum react with a diazo reagent which results in the production of azobilirubin( a purple product).  
Measured at 540 nm.
- Caffeine -benzoate accelerates the coupling of bilirubin with the diazo reagent.
  - Ascorbic acid stops the reaction.
- Alkaline tartrate converts the purple azobilirubin to a blue azobilirubin.
- This product is measured spectrophotometrically @ 600 nm.

## JENDRASSIK METHOD FOR TOTAL AND CONJUGATED BILIRUBIN DETERMINATION

### Principle

- Direct (conjugated) bilirubin reacts with diazotised sulphanilic acid in alkaline medium to form a blue coloured complex.
- Total bilirubin is determined in the presence of o-cresol which releases albumin bound bilirubin, by the reaction with diazotised sulphanilic acid.



**Fig. 6** (a) Pattern of excretion of four bilirubin photoisomers into bile in the Gunn rat ( $n = 5$ ) vs level of illumination: (○) (EZ)-I-(ZE)-bilirubin; (●) (EZ)-cyclobilirubin; (□) (EE)-bilirubin; (■) (EE)-cyclobilirubin. Reproduced with permission from Onishi S, et al. 1984<sup>31</sup> (b) Human newborn infant: effect of phototherapy on (○) (ZZ)-bilirubin and (●) (EZ)-cyclobilirubin-IX $\alpha$  concentration in duodenal aspirate. Reproduced with permission from Onishi et al. 1984<sup>32</sup>

- Measurand: definitie volgens BIPM

quantity intended to be measured

— Notes

NOTE 1 The specification of a measurand requires knowledge of the kind of quantity, description of the state of the phenomenon, body, or substance carrying the quantity, including any relevant component, and the chemical entities involved.

NOTE 4 In chemistry, “analyte”, or the name of a substance or compound, are terms sometimes used for ‘measurand’. This usage is erroneous because these terms do not refer to quantities.



Dicoon



Rijnstate