

# **Bepaling van vrij bilirubine bij premature neonaten verblijvend op de intensieve neonatologie en het verband met het risico op neurotoxiciteit.**

**Te verdedigen door : Eeckhout Katrien en Liekens Ellen**

**Promotor: Prof. Dr. V. Van Hoof**

**Dr. H. Blom**

**Begeleider: Dr. A. Conesa Botella**

**Masterproef  
ter verkrijging van het diploma van  
master in de geneeskunde  
Academiejaar 2015-2016**

## **Voorwoord**

Allereerst willen wij prof. dr. V. Van Hoof bedanken voor haar enthousiaste ondersteuning bij de verwezenlijking van deze masterproef. We zijn haar erg dankbaar dat we met al onze vragen steeds bij haar terecht konden.

Bovendien willen we dr. Conesa Botella bedanken voor de praktische opstart en begeleiding van de studie en het nalezen van de in te leveren documenten.

Graag willen wij ook Luc Wendelen bedanken om ons ter hulp te schieten bij technische moeilijkheden bij het analyseren van de bloedstalen afkomstig van de NICU neonaten.

Verder willen wij ook de afdeling intensieve neonatale zorgen (NICU) van het UZA bedanken met dr. Blom als onze voornaamste contactpersoon voor de praktische organisatie op hun dienst. We stellen het op prijs dat de implementatie van de zwarte zakjes erg vlot verlopen is.

Tot slot willen wij het labop personeel van het UZA bedanken voor hun ondersteuning bij praktische vragen in verband met het invriezen van de bloedstalen en het bepalen van bijkomende serumparameters op de reststalen van de NICU neonaten.

Wij wensen jullie veel plezier bij het lezen van onze masterproef.

Katrien en Ellen

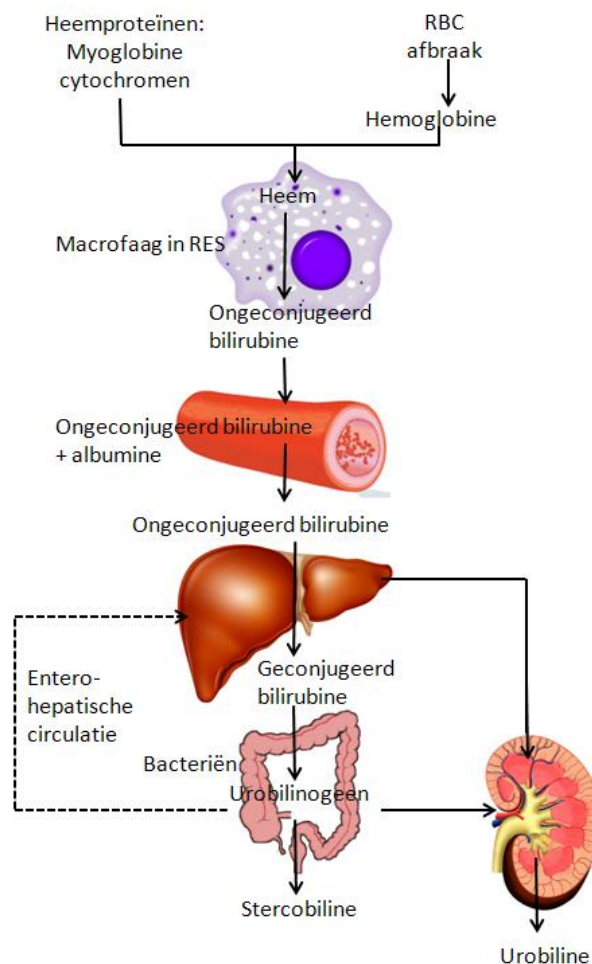
## **Inhoudsopgave**

<b>Voorwoord</b> .....	<b>2</b>
<b>Inhoudsopgave</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Inleiding</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Doelstellingen</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Materiaal en methode – statistiek</b> .....	<b>8</b>
3.1 Studiepopulatie .....	8
3.2 Controlepopulatie .....	8
3.3 Verzamelen en behandeling van de stalen voor het bepalen van het vrij bilirubine	9
3.4 Laboratoriumanalyses .....	9
3.5 Bepaling vrij bilirubine .....	10
3.6 Verzamelen klinische gegevens .....	11
3.7 Gehooronderzoek .....	11
3.8 Statistiek .....	12
<b>4. Resultaten</b> .....	<b>13</b>
4.1 NICU neonaten .....	13
4.1.1 KARAKTERISTIEKEN VAN DE STUDIEPOPULATIE .....	13
4.1.2 SERUMPARAMETERS .....	14
4.1.3 CORRELATIE VRIJ BILIRUBINE MET TOTAAL BILIRUBINE EN ALBUMINE.....	15
4.1.4 CORRELATIE VRIJ BILIRUBINE MET KLINISCHE KENMERKEN IN DE VOLLEDIGE NICU POPULATIE .....	16
4.1.5 LOGISTISCHE REGRESSIE ANALYSE.....	17
4.1.6 AUTOMATIC LINEAR MODELING .....	18
4.1.7 GEHOORTESTEN .....	19
4.2 Vergelijking van vrij bilirubine tussen NICU en terme neonaten .....	19
4.2.1 KARAKTERISTIEKEN VAN DE CONTROLEPOPULATIE .....	20
<b>5. Discussie</b> .....	<b>23</b>
<b>6. English abstract</b> .....	<b>25</b>
<b>Referenties</b> .....	<b>27</b>

## 1. Inleiding

Een benigne transiënte stijging van het totale bilirubine in het bloed, voornamelijk afkomstig van de afbraak van hemoglobine uit de rode bloedcellen, wordt in meer of mindere mate aangetroffen bij gezonde pasgeborenen. De niet-geconjugeerde bilirubinefractie in het bloed is normaal bijna volledig gebonden aan albumine (figuur 1). Enkel het vrij, niet aan albumine gebonden, bilirubine kan doorheen de bloed-hersenbarrière migreren en een bilirubine encefalopathie of ‘Kernicterus’ veroorzaken, met als belangrijkste symptomen: cerebrale paralyse, visusstoornissen en gehoorverlies [1].

*Figuur 1: Metabolisme van bilirubine*



\*RES: reticulo-endotheliaal systeem

Een groot aantal neonaten verblijvend op de intensieve neonatologie (NICU) die een hyperbilirubinemie ontwikkelen, hebben een verhoogd risico op neurotoxische complicaties door vrij bilirubine [2]. Bij pathologische hyperbilirubinemie bestaat de behandeling uit lichttherapie, waarbij het lipofiele toxische vrij bilirubine onder invloed van zichtbaar licht wordt omgezet in een hydrofiel, niet-toxisch foto-isomeer (figuur 2). In zeer ernstige gevallen dient een wisseltransfusie uitgevoerd te worden [3,4,5].

*Figuur 2: Omzetting vrij bilirubine door lichttherapie*



In de richtlijnen voor de behandeling van acute bilirubine encefalopathie wordt gebruik gemaakt van het totaal serum bilirubine, terwijl in voorgaand onderzoek reeds is aangetoond dat het vrij bilirubine een betere indicator is voor potentiële neurotoxiciteit [2,6]. In 1974 werd de peroxidase-oxidase-methode ontwikkeld om het vrij bilirubine te bepalen. Er zijn verscheidene factoren die deze meetmethode negatief beïnvloeden, zoals hemolyse, een geconjugeerde bilirubine  $> 1$  mg/dl en de verdunning van het staal. Maar ook de pH, de temperatuur en de ionensamenstelling van het medium waarin de reactie plaatsvindt, hebben een invloed op de binding van bilirubine aan albumine en vandaar ook op de meting van het vrij bilirubine [7,8].

Omwille van de beperkingen van de peroxidase-oxidase-methode was er nood aan een nieuwe, efficiënte en betrouwbare meetmethode om het vrij bilirubine te bepalen. Deze werd ontwikkeld door de dienst klinische biochemie van het universitair ziekenhuis Antwerpen (UZA) en wordt de “filtratie/centrifugatie methode” genoemd [9]. Tijdens eerder onderzoek werd deze nieuwe methode aangewend voor de bepaling van vrij bilirubine in het serum van gezonde à terme neonaten [6]. Preliminair resultaten bij premature neonaten ( $\leq 35$  zwangerschapsweken) verpleegd op de dienst NICU toonden dat de vrij bilirubinewaarden gemiddeld significant hoger zijn dan deze bij gezonde neonaten en dit bij gemiddeld lagere totale bilirubinewaarden [6]. Tevens volgen de vrije bilirubinewaarden bij de NICU neonaten niet dezelfde kinetiek als bij de gezonde neonaten. Bij gezonde neonaten worden de hoogste totale en vrije bilirubinewaarden bereikt tussen dag 4 en dag 5 na de geboorte, terwijl bij NICU neonaten verder stijgende totale en vrije bilirubinewaarden na deze periode gezien worden [6].

Sommige medicijnen zijn in staat om aan albumine te binden, waardoor er minder bilirubine aan albumine kan gebonden worden. Hierdoor stijgt de concentratie van vrij bilirubine en vergroot de kans op hersenbeschadiging [10]. Medicijnen die vaak gebruikt worden bij premature neonaten en die mogelijk het bilirubinegehalte kunnen beïnvloeden zijn onder andere ibuprofen, fentanyl en diuretica. Verder onderzoek is nodig om een beter inzicht te krijgen in het effect van cafeïne, vitaminen, paracetamol, dobutamine, dopamine, adrenaline, corticoïden, TPN, insuline en bloedproducten op het vrij bilirubinegehalte [11].

## **2. Doelstellingen**

1. De incidentie nagaan van verhoogde vrije bilirubinewaarden (= minstens 1 waarde boven de upper limit of normal (ULN)) van een gezonde referentiepopulatie [12,43 µg/dl]) bij premature neonaten [6].
2. Het verloop in de tijd nagaan van het vrij bilirubine bij premature neonaten.
3. De associatie nagaan van de vrije bilirubinewaarden met: de albuminewaarden, totaal bilirubine, de toegediende medicatie (bilirubine-verplaatsende activiteit), aantal zwangerschapsweken, geboortegewicht, geboortelengte, APGAR-score, borstvoeding, lichttherapie en wisseltransfusie.
4. Het verband nagaan tussen de resultaten van de gehoortest en de vrije bilirubinewaarden.
5. Het verschil in vrije bilirubinewaarden nagaan tussen premature en terme neonaten (uit een vorige studie) [6].

### **3. Materiaal en methode - statistiek:**

#### **3.1 Studiepopulatie**

De studiepoulatie bestond uit premature neonaten die op de NICU van het UZA verbleven tussen 29 maart 2013 en 30 september 2014. We includeerden alle neonaten die geboren werden voor de 37<sup>e</sup> zwangerschapsweek en die vanaf de eerste dag verbleven op de NICU van het UZA. Vervolgens werden neonaten geëxcludeerd waarvan het eerste reststaal verzameld werd > 30 dagen na de geboorte en neonaten waarvan er minder dan 2 stalen beschikbaar waren na de door de arts aangevraagde laboratoriumtesten. Stalen, waarvan het aanwezige serum na de aangevraagde analyses <75µl bedroeg, werden geëxcludeerd.

Van de 197 geïncludeerde neonaten werden de demografische gegevens zoals het geboortegewicht, – lengte, de zwangerschapsduur en APGAR-score (na 10 minuten) verzameld. Tevens werd nagegaan of de neonaten borstvoeding kregen en werden er gegevens verzameld omtrent de gestarte therapie (met bijzondere aandacht voor fototherapie en wisseltransfusie).

In januari 2013 werd het protocol en informed consent van onze studie goedgekeurd door het ethisch comité van het UZA.

#### **3.2 Controlepopulatie**

De eerder bestudeerde controlepopulatie bestond uit 139 terme neonaten op de dienst materniteit van het UZA waarbij bloedstalen afgenomen werden op de 4<sup>e</sup> of 5<sup>e</sup> dag na de geboorte tussen maart 2010 en mei 2011 [6]. Dit bloedstaal werd verkregen door een veneuze bloedafname die tegelijkertijd werd afgenomen met de hielprik.

De exclusiecriteria in deze controlepopulatie waren: de toediening van medicatie, parenterale voeding en risicofactoren voor congenitale doofheid. Tevens werden gegevens verzameld



omtrent geslacht, geboortelengte en -gewicht, de zwangerschapsduur, borstvoeding, APGAR-score (na 10 minuten) en het starten van lichttherapie.

De gegevens van de controlepopulatie terme neonaten werden verzameld na instemming en ondertekening van het voorgelegde informed consent door de ouders. Deze studie werd goedgekeurd door het ethisch comité van het UZA [6].

### 3.3 Verzamelen en behandeling van de stalen voor het bepalen van het vrij bilirubine

Aangezien NICU neonaten zich in een precare situatie bevinden waarbij zo weinig mogelijk bloed mag afgenomen worden, diende het vrij bilirubine bepaald te worden op reststalen van een veneuze bloedafname die op medische indicatie gebeurde. Hierdoor waren de tijdstippen waarop de bloedstalen werden afgenomen variabel. Dit in tegenstelling tot de controlepopulatie.

De bloedstalen afkomstig van de NICU en terme neonaten werden getransporteerd naar het laboratorium klinische chemie in een zwart, voor licht ondoorlaatbaar zakje, vermits gekend is dat het bilirubine afgebroken wordt bij blootstelling aan licht [12]. Vervolgens werden de reststalen gecentrifugeerd (gedurende 15 minuten op 1000 toeren/min) waarna het plasma ingevroren werd op  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bij de minste twijfel over correcte behandeling van de bloedstalen werden deze geëxcludeerd.

Indien er van een patiënt op eenzelfde tijdstip 2 reststalen beschikbaar waren, werden deze stalen samengevoegd.

### 3.4 Laboratoriumanalyses

Totaal bilirubine en albumine werden bij beide populaties bepaald door middel van Dimension Vista 1500 (Siemens Healthcare Laboratory Diagnostic, Beerse, België) met Siemens reagentia. Een laboratoriumbepaling van het albumine en totaal bilirubine werd niet

routinematig aangevraagd door de behandelende arts. Indien er geen totaal bilirubine of albumine aangevraagd was, werd dit indien mogelijk ook op het reststaal bepaald na analyse van het vrij bilirubine. De waarden van het totaal bilirubine werden via verschillende methodes verworven: 584 bepalingen in het laboratorium, 11 via een veneus bloedgas, 21 via een arterieel bloedgas en 95 via een capillair bloedgas (ABL 90, Radiometer, Brønshøj, Denemarken). Het tijdstip van de geïncubeerde bepalingen van het totaal bilirubine diende zo dicht mogelijk aan te leunen bij de bloedafname waarop het vrij bilirubine bepaald werd.

### 3.5 Bepaling vrij bilirubine

Voor de analyse van het vrij bilirubine werden de stalen per patiënt tegelijk ontdooid en geanalyseerd. Tevens werden de stalen gedurende de hele procedure zo laat mogelijk uit de diepvriezer genomen en zo min mogelijk aan licht blootgesteld. De meetmethode bestond uit een voorbereiding van de filters (Micron 10y, Merck Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, Cork IRL), gevolgd door filtratie/centrifugatie en spectrumanalyse. Bij elke lot filters werd een steekproef uitgevoerd om de kwaliteit te bepalen. Hierbij diende minimaal 90% van het vrij bilirubine gefilterd te worden. De filter die gebruikt werd om het vrij bilirubine te scheiden van het gebonden en het geconjugeerde bilirubine diende eerst ontdaan te worden van glycolaten en werd hiervoor in een Eppendorf<sup>®</sup> tube geplaatst waarin 200µL HPLC water werd gepipetteerd. De filter werd gedurende 2 minuten gecentrifugeerd aan 12.000G. Daarna werd de filter omgedraaid in de Eppendorf<sup>®</sup> tube en volgde een 2<sup>de</sup> centrifugatie gedurende 1 minuut aan 6.000G. De filter werd vervolgens in een nieuwe Eppendorf<sup>®</sup> tube geplaatst en werd er minstens 75 µl staal op de filter aangebracht. De stalen in de filters werden gecentrifugeerd gedurende 25 minuten aan 14.500G. Hierna bevatte de filter het aan albumine gebonden bilirubine en het geconjugeerde bilirubine. Het filtraat bevatte het vrij bilirubine en werd gepipetteerd in een microcuvet uit kwarts. Er werd een spectrumanalyse op

het filtraat uitgevoerd tussen 350 en 600nm met behulp van de UV/VIS ultraspec 2000 van Pharmacia Biotec en er werd afgelezen ten opzichte van HPLC water. De hoogte van de piekabsorptie van vrij bilirubine bij 440nm werd gemeten. Hieruit werd, met behulp van een calibratiecurve bekomen uit eerder onderzoek, de vrije bilirubineconcentratie berekend [9]. Indien er beschadiging van de filter optrad bij analyse, werd dit opgemerkt doordat er een afwijkende curve gezien werd na spectrofotometrie. Deze resultaten werden geëxcludeerd.

### 3.6 Verzamelen klinische gegevens

Er werd aan elke patiënt een uniek codenummer toegekend. Er werden per patiënt gegevens verzameld omtrent zwangerschapsduur (in dagen), geslacht, tijdstip bloedafname, geboortelengte, geboortegewicht, APGAR (na 10 minuten), borstvoeding, oorzaak van de hyperbilirubinemie, toediening van SMOF (soybean oil, medium-chain triglycerides, olive oil en fish oil), totale parenterale nutritie (TPN) en antibiotica, toepassing van lichttherapie of wisseltransfusie en het resultaat van de gehoorscreening.

Zowel bij de terme als bij de NICU neonaten werd de geboortedag als dag 1 beschouwd. De bloedafname gebeurde bij de terme neonaten op dag 4 of 5.

### 3.7 Gehoorschouderzoek

Het gehoor van de NICU neonaten werd getest door middel van een automated auditory brainstem response (AABR). Bij het verwerken van de resultaten van de gehoortest werd er aangenomen dat wanneer het kind een afwijkende neonatale gehoorscreening had langs één van beide oren, het kind faalde voor de hele test. Neonaten die een tweede afwijkende AABR hadden, werden nader opgevolgd met een brainstem auditory response audiometry (BERA). Bij de controlegroep gebeurde de gehoorscreening op dezelfde manier, maar werd de eerste AABR uitgevoerd binnen de 24 uur na de bloedafname [6].

### 3.8 Statistiek:

Voor de statistische analyse werd gebruik gemaakt van Medcalc en SPSS. De upper en lower limit of normal (ULN en LLN) voor het serum vrij bilirubine in de referentiepopulatie werden bepaald aan de hand van de niet-parametrische percentiel methode zoals beschreven in het CLSI C28-A3 protocol [13]. Categorische verschillen tussen groepen (vrij bilirubine > of < ULN) werden geanalyseerd met een logistische regressie. Vervolgens werd met behulp van de automatic linear modeling toepassing van SPSS een model opgesteld om de klinische parameters te bepalen die het best de serum vrij bilirubine resultaten bij premature neonaten voorspellen. P-waarden < 0.05 werden beschouwd als statistisch significant.

## **4. Resultaten:**

### 4.1 NICU neonaten

#### 4.1.1 KARAKTERISTIEKEN VAN DE STUDIEPOPULATIE

In de periode tussen 29 maart 2013 en 30 september 2014 werden, na het toepassen van de in- en exclusiecriteria, 1108 stalen verzameld van 197 premature neonaten die op de NICU verbleven. De studiepopulatie bestond uit 100 (50,76%) meisjes en 97 (49,24%) jongens. De overige karakteristieken van deze populatie zijn samengevat in tabel 1.

*Tabel 1: Karakteristieken NICU en terme neonaten*

	Premature, NICU neonaten	Gezonde, terme neonaten [6]
Aantal	197	139
Gemiddelde zwangerschapsduur	30 weken 5 dagen	40 weken
Mediaan zwangerschapsduur	30 weken 2 dagen	39 weken
Minimale zwangerschapsduur	24 weken 2 dagen	37 weken
Maximale zwangerschapsduur	37 weken	43 weken
Mediaan geboortegewicht	1,41 kg	3,408 kg
Gemiddelde geboortegewicht	1,570 kg	3,4 kg
Mediaan geboortelengte	40 cm	50 cm
Gemiddelde geboortelengte	40,15 cm	50,1 cm
Mediaan APGAR score na 10 minuten	9	9
Borstvoeding	163 (82,74%)	130 (93,53%)
TPN	133 (67,51%)	0 (0%)
Lichttherapie	17 (8,63%)	2 (1,44%)

Met behulp van een Shapiro-Wilk test kon geen normaalverdeling weerhouden worden voor geboortelengte ( $p=0,0004$ ) en geboortegewicht ( $p<0,0001$ ).

#### 4.1.2 SERUMPARAMETERS

Er kon op 711 stalen totaal bilirubine bepaald worden. Van 345 stalen was de albuminewaarde gekend. Op 1038 stalen kon het vrij bilirubine bepaald worden. De gemiddelde en mediane waarden van deze parameters afkomstig uit de volledige studiepopulatie kunnen teruggevonden worden in tabel 2a.

In de totale studiepopulatie van 197 NICU-neonaten kon met behulp van een Shapiro-Wilk test geen normaalverdeling weerhouden worden voor vrij bilirubine ( $p < 0,0001$ ), totaal bilirubine ( $p < 0,0001$ ) en albumine ( $p = 0,0006$ ).

*Tabel 2a: Gemiddelde en mediane waarden op alle resultaten van de volledige populaties.*

	Premature, NICU neonaten	Gezonde, terme neonaten [6]
Gemiddelde vrij bilirubine concentratie	5,90 $\mu\text{g/dl}$	2,51 $\mu\text{g/dl}$
Mediaan vrij bilirubine concentratie	2,14 $\mu\text{g/dl}$	2,14 $\mu\text{g/dl}$
Gemiddelde totale bilirubine	5,61 $\text{mg/dl}$	8,75 $\text{mg/dl}$
Mediaan totale bilirubine	5,4 $\text{mg/dl}$	9,10 $\text{mg/dl}$
Gemiddeld albumine	25,32 $\text{g/l}$	31,4 $\text{g/l}$
Mediaan albumine	26 $\text{g/l}$	31,5 $\text{g/l}$

Tabel 2b: Niet-parametrische Mann-Whitney U Test voor de vergelijking van vrij bilirubine tussen premature NICU en terme neonaten.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Vrije_Bilirubine_μg_dl is the same across categories of Prem 0/ term 1.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of Albumin_g_L is the same across categories of Prem 0/ term 1.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.
3	The distribution of Tot_bili_staal_mg_dl is the same across categories of Prem 0/ term 1.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

De distributie van de waarden voor albumine, totaal bilirubine en vrij bilirubine waren significant verschillend tussen de 2 groepen (tabel 2b).

#### 4.1.3 CORRELATIE VRIJ BILIRUBINE MET TOTAAL BILIRUBINE EN ALBUMINE

De gevonden correlatiecoëfficiënten (Pearson's r) en statistische significanties (p-waarde) worden weergegeven in tabel 3.

Tabel 3: Correlaties vrij bilirubine voor de volledige populatie NICU neonaten

	aantal stalen	r	p
Vrij bilirubine met totaal bilirubine	667	0,1603	<0,0001
Vrij bilirubine met albumine	328	-0,2973	<0,0001

Zowel totaal bilirubine als albumine waren significant gecorreleerd met vrij bilirubine. De negatieve correlatie van vrij bilirubine met albumine was sterker dan de positieve correlatie van vrij bilirubine met totaal bilirubine.

Bij de controlepopulatie terme neonaten kon er in voorgaand onderzoek geen statistisch significante correlatie teruggevonden worden van vrij bilirubine met totaal bilirubine ( $p=0,195$  en  $r=0,129$ ), noch met albumine ( $p=0,294$  en  $r=0,105$ ) [6].

#### 4.1.4 CORRELATIE VRIJ BILIRUBINE MET KLINISCHE KENMERKEN IN DE VOLLEDIGE NICU POPULATIE

De gevonden correlatiecoëfficiënten (Pearson's  $r$ ) en statistische significanties ( $p$ -waarde) worden weergegeven in tabel 4.

*Tabel 4: Correlaties vrij bilirubine in functie van klinische kenmerken in de volledige NICU populatie*

	aantal stalen	r	p
Vrij bilirubine met geboortelengte	184	-0,1677	<b>0,0228</b>
Vrij bilirubine met geboortegewicht	184	-0,1123	0,1292
Vrij bilirubine met zwangerschapsduur	185	-0,04046	0,5845
Vrij bilirubine met borstvoeding	182	-0,2667	0,7208
Vrij bilirubine met TPN	181	0,1037	0,1648
Vrij bilirubine met SMOF	184	0,2061	<b>0,005</b>

Er werd een significante correlatie gevonden met geboortelengte en de toediening van SMOF in de volledige populatie.



#### 4.1.5 LOGISTISCHE REGRESSIE ANALYSE

De resultaten voor vrij bilirubine bij de NICU neonaten werden in 2 groepen onderverdeeld; vrij bilirubine > ULN en vrij bilirubine < ULN. De ULN werd bepaald op een eerder bestudeerde populatie volgens het CLSI C28-A3 protocol en bedroeg 12,43µg/dl [6]. 129 (12,43%) stalen van 45 (22,84%) NICU neonaten hadden een vrije bilirubinewaarde boven de ULN. Op deze data werd een logistische regressie toegepast. Hieruit bleek dat totaal bilirubine, albumine, zwangerschapsduur, APGAR score en SMOF de meest significante ( $p < 0,0001$ ) predictieve factoren zijn voor het vrij bilirubine bij premature neonaten. Voor 284 vrije bilirubinewaarden waren alle variabelen (klinische kenmerken, totaal bilirubine en albumine) gekend. Hiervan waren er 37 (13,03%) met een vrij bilirubinewaarde > ULN en 247 (86,97%) < ULN. Er werd een area under the ROC curve (receiver operating characteristic curve) bekomen van 0,823. Hierbij werden 90,14% van de gevallen correct geclassificeerd. De resultaten van de logistische regressie worden in detail beschreven in tabel 5.

*Tabel 5: Logistisch regressie model*

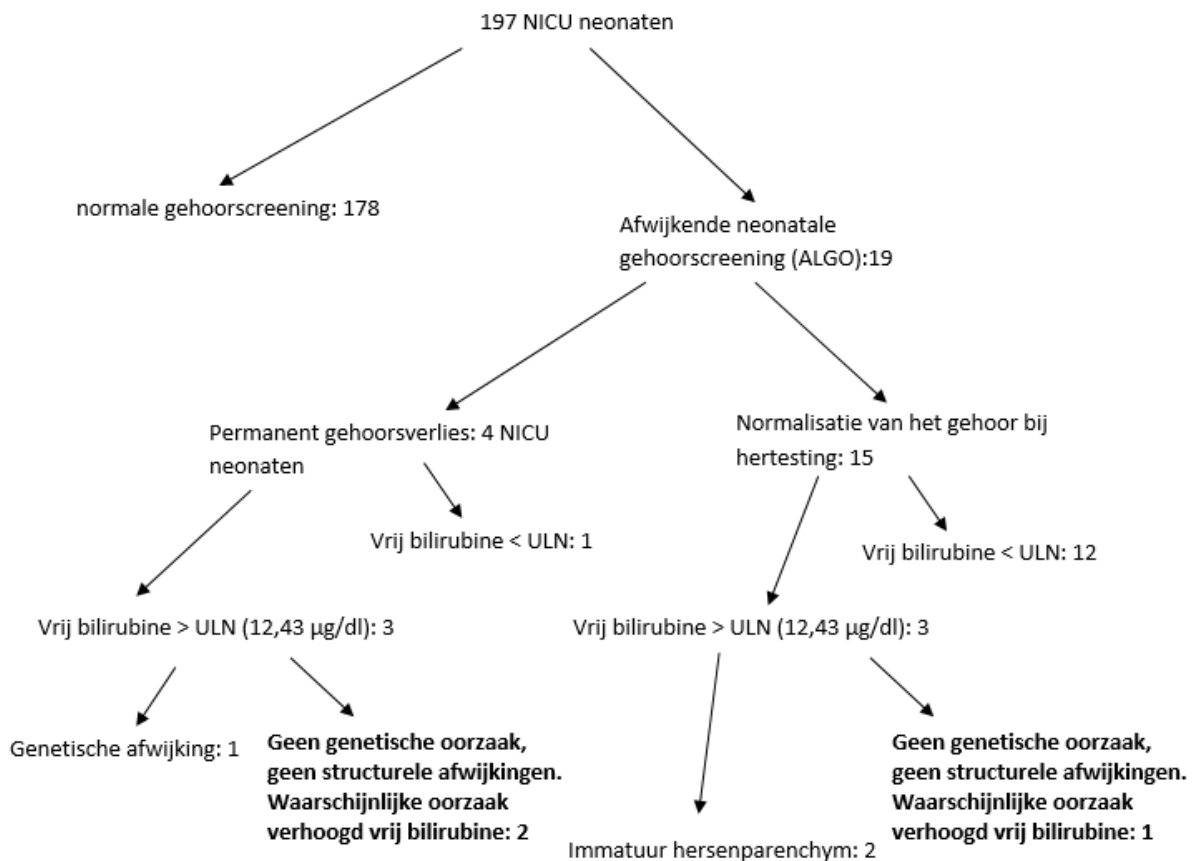
	Coëfficiënt	Standaard deviatie	P-waarde	Odds ratio	95% CI
Totaal bilirubine	0,22079	0,055228	0,0001	1,2471	1,1191 - 1,3896
Albumine	-0,17599	0,044448	0,0001	0,8386	0,7687 - 0,9150
Zwangerschapsduur	-0,027299	0,010662	0,0105	0,9731	0,9529 - 0,9936
APGAR score	-12,38561	5,10929	0,0153	0,0000	$1,87025 \cdot 10^{-10}$ - 0,0934
SMOF	1,46018	0,48644	0,0027	4,3067	1,6599 - 11,1741



#### 4.1.7 GEHOORTESTEN

Aangezien gekend is dat het vrij bilirubine aanleiding kan geven tot gehoorverlies, werden de resultaten van de neonatale gehoorscreening verzameld (figuur 4).

*Figuur 4: resultaten gehoorscreening*



#### 4.2 Vergelijking van vrij bilirubine tussen NICU en terme neonaten

Onder punt 4.1 werden alle resultaten van de volledige populatie NICU neonaten bestudeerd. Om na te gaan of het verloop in de tijd van de vrije bilirubinewaarden vergelijkbaar is met de terme neonaten selecteerden we bij de NICU neonaten een bloedstaal op dag 4 of 5 na de geboorte, wat overeen kwam met hetzelfde tijdstip als de bloedafname bij de terme gezonde neonaten. Indien er meerdere bloedstalen afgenomen werden in deze periode, selecteerden we het resultaat van het eerst afgenomen staal. Op deze manier werden er 65 NICU neonaten weerhouden die vergeleken konden worden met 139 terme neonaten uit een vorige studie [6].

#### 4.2.1 KARAKTERISTIEKEN VAN DE CONTROLEPOPULATIE

Bij de geselecteerde NICU stalen werd er, in tegenstelling tot bij het totaal aantal NICU stalen, wel een normaalverdeling teruggevonden voor het totaal bilirubine en het albumine. Resultaten van de vergelijking van de serumparameters tussen terme en NICU neonaten worden weergegeven in tabel 6.

Het albumine is significant lager bij NICU neonaten in vergelijking met de populatie terme, gezonde neonaten. Op dag 4 of 5 is het vrij bilirubine significant hoger bij de NICU neonaten in vergelijking met de gezonde terme neonaten, doch kon er geen significant verschil aangetoond worden tussen beide populaties voor het totaal bilirubine.

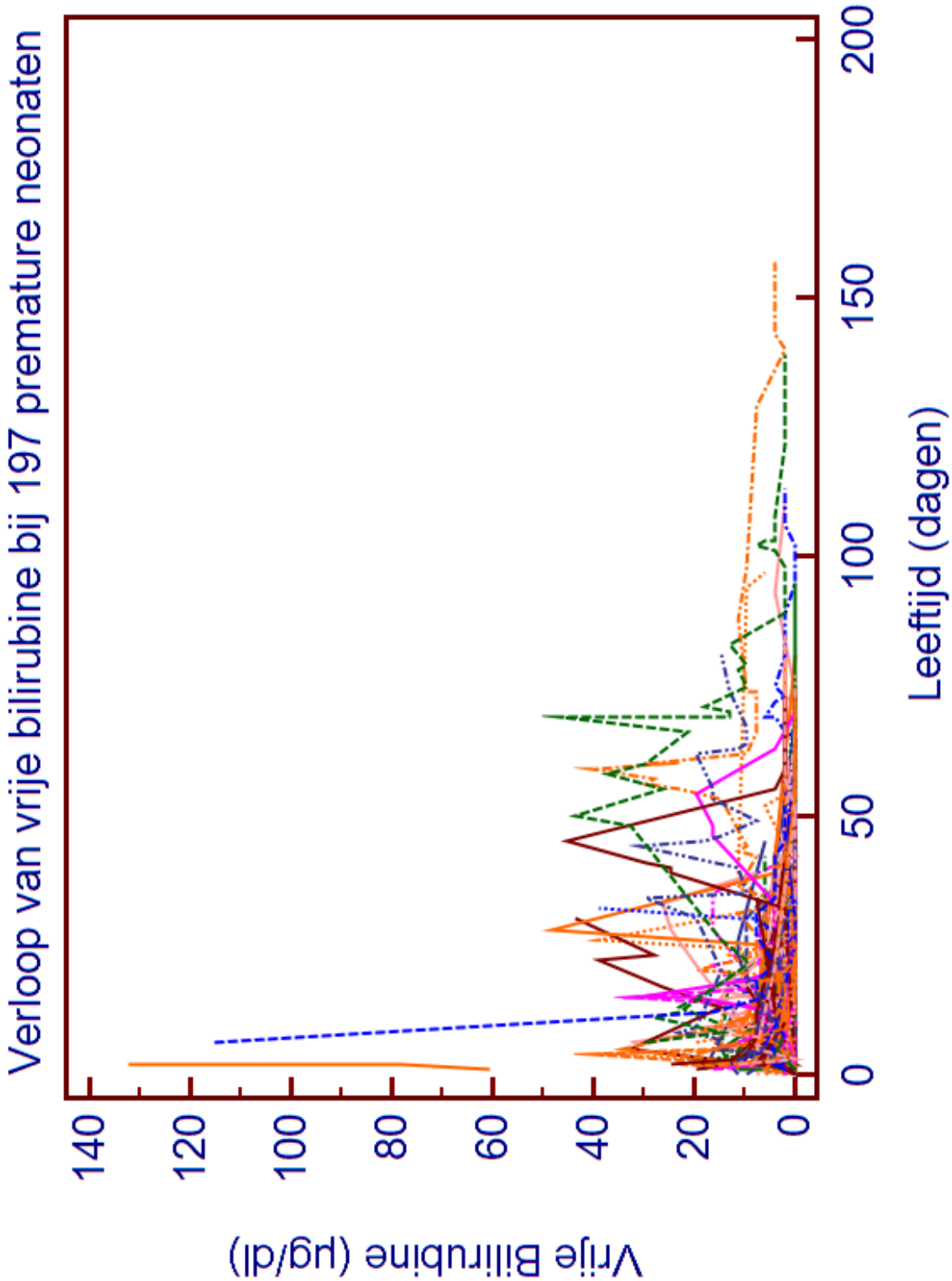
Het verloop van de vrije bilirubinewaarden bij de NICU neonaten wordt weergegeven in figuur 5. In vergelijking met de populatie terme gezonde neonaten, die een piek van het vrij bilirubine vertonen op dag 4 of 5 na de geboorte, piekte het vrij bilirubine pas na dag 4 of 5 in de NICU neonaten.

Logistische regressie (1.5.) en automatic linear modeling (1.6.) toonden dat albumine, totaal bilirubine, geboortelengte, APGAR-score en SMOF een significante invloed hebben op het vrij bilirubine.

Tabel 6: Vergelijking serumparameters terme en NICU neonaten met behulp van de Mann-Whitney U test

		Gezonde, terme neonaten [6]	NICU neonaten (dag 4-5)	p-waarde
Vrij bilirubine (µg/dl)	Normaal verdeeld	Nee	Nee	<b>0,001</b>
	Aantal	134	59	
	Mediaan (min-max)	2,14 (0,00-23,03)	2,14 (0,00 - 40,63)	
	Gemiddelde	2,58 ± 0,29	5,12 ± 0,8716	
Totaal bilirubine (mg/dl)	Normaal verdeeld	Ja	Ja	0,181
	Aantal	109	57	
	Mediaan (min-max)	9,00 (0,76 - 21,00)	9,2 ( 4,1-15,4)	
	Gemiddelde	8,6623 ± 0,38	9,4561 ± 0,36	
Albumine (g/l)	Normaal verdeeld	Ja	Ja	<b>0,000</b>
	Aantal	107	8	
	Mediaan (min-max)	31,2000 (23,60-37,00)	25,5 (16- 30,3)	
	Gemiddelde	31,1972 ± 0,2650	24,6625 ± 4,9451	

Figuur 5: Verloop vrije bilirubinewaarden NICU neonaten



## **5. Discussie**

Bij deze studie werd er gebruik gemaakt van een nieuwe methode ter bepaling van het vrij bilirubine. Deze bleek reeds in voorgaand onderzoek reproduceerbaar, sensitief en specifiek [1,15]. Deze methode is een directe methode, die gebruik maakt van filtratie en spectrofotometrie, dit in tegenstelling tot de peroxidase- oxidatie methode waarbij met een biochemische reactie en een reeks ingewikkelde berekeningen een schatting gemaakt wordt van de vrije bilirubine concentratie [6].

Het tijdsverloop van vrij bilirubine verschilde tussen NICU neonaten (piek na dag 4 of 5) in vergelijking met gezonde terme neonaten (piek op dag 4 of 5).

Er werd aangetoond dat er bij 23% van de premature neonaten minstens 1 vrije bilirubinewaarde werd aangetroffen die hoger was dan de ULN van een gezonde referentiepopulatie (12,43 µg/dl) [6].

Na statistische analyse bleek dat totaal bilirubine, albumine, zwangerschapsduur, APGAR score en SMOF de meest significante predictieve factoren zijn voor het vrij bilirubine bij premature neonaten, waarbij een laag albumine de meest significante predictor was.

Hogere totale bilirubinewaarden geven aanleiding tot hogere vrije bilirubinewaarden.

Factoren die hiertoe bijdragen bij de premature neonaat zijn: verhoogde afbraak van rode bloedcellen en een immature lever waardoor tevens lagere albuminewaarden worden teruggevonden.

Anderzijds kan er een verminderde beschikbaarheid zijn van albumine door toediening van bepaalde bilirubine verplaatsende medicatie (o.a. ceftriaxone, cefmetazole en ibuprofen). Ondanks onze doelstelling om dit te bestuderen, was dit door de polyfarmacie bij de NICU neonaten in de praktijk niet haalbaar binnen deze masterproef, hiervoor is verder onderzoek noodzakelijk.

Hoe korter de zwangerschapsduur en hoe lager de APGAR-score, hoe hoger het te verwachten vrij bilirubine.

De invloed van SMOF kan verklaard worden door de aanwezigheid van vrije vetzuren in dit product. Vrije vetzuren hebben net zoals de hierboven aangehaalde medicatie een bilirubine verplaatsend effect [1,8, 16].

Tijdens de studieperiode kon geen enkele neonat geïncubeerd worden die een wisseltransfusie onderging.

Van de 6 NICU neonaten met een vrij bilirubine > ULN kon bij 3 geen genetische noch een structurele afwijking als oorzaak van de gestoorde gehoortest worden weerhouden, zodat een verhoogd vrij bilirubine de meest waarschijnlijke oorzaak is van het al dan niet permanente gehoorverlies bij deze 3 neonaten.

Bij bijna alle NICU neonaten werd de gehoorscreening uitgevoerd na het pieken van het vrij bilirubine. Als gevolg hiervan weten we niet of er mogelijk een tijdelijke gehoorschade optrad tijdens het pieken van het vrij bilirubine. Er waren te weinig gegevens beschikbaar om een bovengrens van vrij bilirubine te bepalen voor het optreden van neurotoxiciteit.

Ondanks het feit dat totaal bilirubine gecorreleerd is met een hoog vrij bilirubine, is het toch essentieel om op te merken dat de gemiddelde en mediane totale bilirubinewaarden bij premature neonaten niet verschillen van de gemiddelde en mediane totale bilirubinewaarden bij gezonde, terme neonaten. Dit terwijl het vrij bilirubine significant hoger is bij premature NICU neonaten. Hiermee bevestigen we dat voornamelijk bij premature neonaten het vrij bilirubine superieur is ten opzichte van het totaal bilirubine om het risico op neurotoxiciteit te bepalen.



## **6. English abstract**

**Background** Excess circulating free bilirubin (FB) in neonates can cross the blood-brain barrier and cause deafness, and other symptoms known as ‘Kernicterus’[1]. The guidelines for the treatment of acute bilirubin encephalopathy use total bilirubin as an indicator for potential neurotoxicity although earlier studies showed that FB is a better predictor of neurotoxicity [2, 6].

A new method developed in the department of clinical biochemistry at the Antwerp University Hospital (UZA) that measures FB in serum, by ultrafiltration and spectral analysis, enabled us to quickly and precisely evaluate FB in serum of premature newborns. An earlier master thesis performed at the same department showed different FB kinetics between term and premature neonates [6].

**Objective** Our main goal was to determine the incidence of elevated FB ( $>12,43\mu\text{g/dl}$ ) in a large population of premature neonates. A second objective was to evaluate when the FB peaks in premature neonates. A third goal was to study the relationship between FB and biochemical, clinical and demographic data of premature neonates. A fourth objective was to study the correlation between FB and the neonatal hearing test (AABR). Our final objective was to determine whether there is a difference between concentrations of FB in healthy and premature neonates [6].

**Methods** The study population consisted of premature neonates, born in the UZA and treated in the NICU. We included all premature neonates with a gestation age  $<37$  weeks. We used serum leftovers and excluded NICU neonates with a first blood sample  $>30$  days after birth and less than 2 blood samples available. Leftovers containing  $<75\mu\text{l}$  serum were also excluded.

In total we included 1108 blood samples from 197 NICU neonates. The blood samples were transported in a black bag that protected them from daylight. After centrifugation the serum

was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis of FB by ultrafiltration and spectral analysis. Laboratory, clinical and demographic data were collected. Statistical analysis was performed by means of SPSS and MedCalc. Results from this study were also compared with those from an earlier master thesis that studied FB in healthy term neonates [6].

**Results** 23% of the NICU neonates had at least 1 FB  $>12,43\mu\text{g/dl}$ . A significant correlation between FB and total bilirubin ( $p<0,0001$ ) and between FB and albumin ( $p<0,0001$ ) was found in the NICU population. The negative correlation between FB and albumin ( $r= -0,2973$ ) was stronger than the positive correlation between FB and total bilirubin ( $r=0,1603$ ). A significant correlation was also found between FB and birth length ( $p=0,0228$ ) and between FB and administration of SMOF ( $p=0,005$ ). Using automatic linear modeling analysis we found that high total bilirubin, low serum albumin, short gestational age, low APGAR score and administration of SMOF are predictors of high FB in NICU neonates.

For 3 out of 6 NICU neonates with a FB  $>$  ULN and an abnormal hearing test, no genetic nor structural abnormality could be found as a cause of the permanent or transient hearing loss.

There was a significantly lower albumin and higher FB concentration in the 65 NICU neonates as compared to the 139 term neonates. In contrast to healthy term neonates FB peaks after day 4 or 5 after birth in the NICU neonates.

**Conclusion** In this master thesis we can conclude that more than one fifth of the NICU neonates had a FB above the Upper Limit of Normal. Total bilirubin, albumin, gestational age, APGAR score and administration of SMOF were significant predictors of FB in NICU neonates. An abnormal AABR with elevated FB was found in 3 NICU neonates without a clear cause, suggesting that high FB is a probable cause. The time course of FB increase differed in NICU neonates (peak after day 4 or 5) as compared to healthy term neonates (peak between day 4 or 5).

## **Referenties:**

1) Shapiro SM.

Bilirubin toxicity in the developing nervous system.

Pediatr Neurol 2003; 29: 410-421.

2) Amin SB, Lamola AA.

Newborn jaundice Technologies: unbound bilirubin and bilirubin binding capacity in neonates.

Semin Perinatol 2011; 35: 134-140.

3) NICE.

Jaundice in newborn babies under 28 days.

Clinical guideline 2014 NCC-WCH 2014; 1: 1-54.

4) Maisels M, Watchko J.

Treatment of jaundice in low birthweight infants.

Fetal Neonatal 2003; 88: 459-463.

5) NVK.

Conceptrichtlijnen hyperbilirubinemie.

Nederlandse vereniging voor kindergeneeskunde 2007; 1: 1-103.

6) Clukers J, Van Gaal PJ.

Opstellen van neonatale referentiewaarden voor vrij bilirubine, gemeten met een nieuwe methode en correlatie aan automated auditory brainstem response (AABR) en studie van de in vivo verplaatsing van vrij bilirubine in serum, voor en na toediening van ibuprofen, op ingevroren stalen van prematuren 2012.

7) William Oh, Stevenson DK, Tyson JE.

Influence of the clinical status on the association between plasma total and unbound bilirubine and adverse neurodevelopmental outcomes in extremely low birth weight infants.

Acta Paediatr 2010; 99: 673-8.

8) Ahlfors CE.

Measurement of Plasma Unbound Unconjugated Bilirubin.

Analytical Biochemistry 2000; 279: 130–5.

9) Van Hoof, VO.

Development and validation of a new, direct and simple method to quantify free bilirubin, a biomarker of bilirubin induced neurotoxicity.

Clinical Chemistry 2009; 55: A234-A234.

10) Robertson A, Karp W, Brodersen R.

Bilirubin displacing effect of drugs used in neonatology.

Acta Paediatr Scand 1991; 80: 1119-1127.

11) Brodersen R.

Competitive Binding of Bilirubin and Drugs to Human Serum Albumin Studied by Enzymatic Oxidation.

The Journal of Clinical Investigation 1974; 54: 1353-1364.

12) Bertholf RL.

Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline Makes the Task Manageable.

Lab Medicine 2009; 40: 75-76.

13) Amin, A.C.

Effect of storage and freezing unbound bilirubin measurement.

Clinica Chimica Acta 2008; 396: 56-57.

14) Fevery J.

Bilirubin in clinical practice: a review

Liver Int. 2008; 28: 92-605.

15) Van Hoof V, Devos H, Persy B, Naesens R, Wendelen L, Meel M, et al.

Development and validation of a direct and simple method to isolate and quantify Free

Bilirubin, a Biomarker of Bilirubin Induces Neurotoxicity

Clinical Chemistry, 2009; 55: A234.

16) Gray R.

Kinetics and mechanism of bilirubin binding to human serum albumin.

Journal of biological chemistry 1978; 253: 4370-7377.