



GENOTYPAGE *RHD* FOETAL

Dr Agnès Mailloux,

Responsable médical - UF de biologie du CNRHP

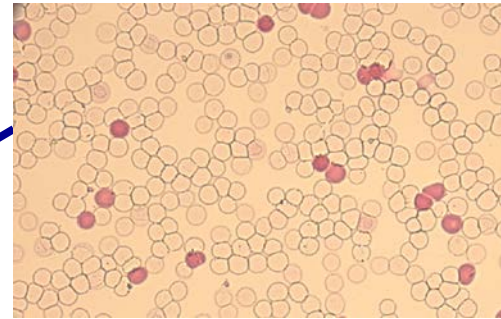
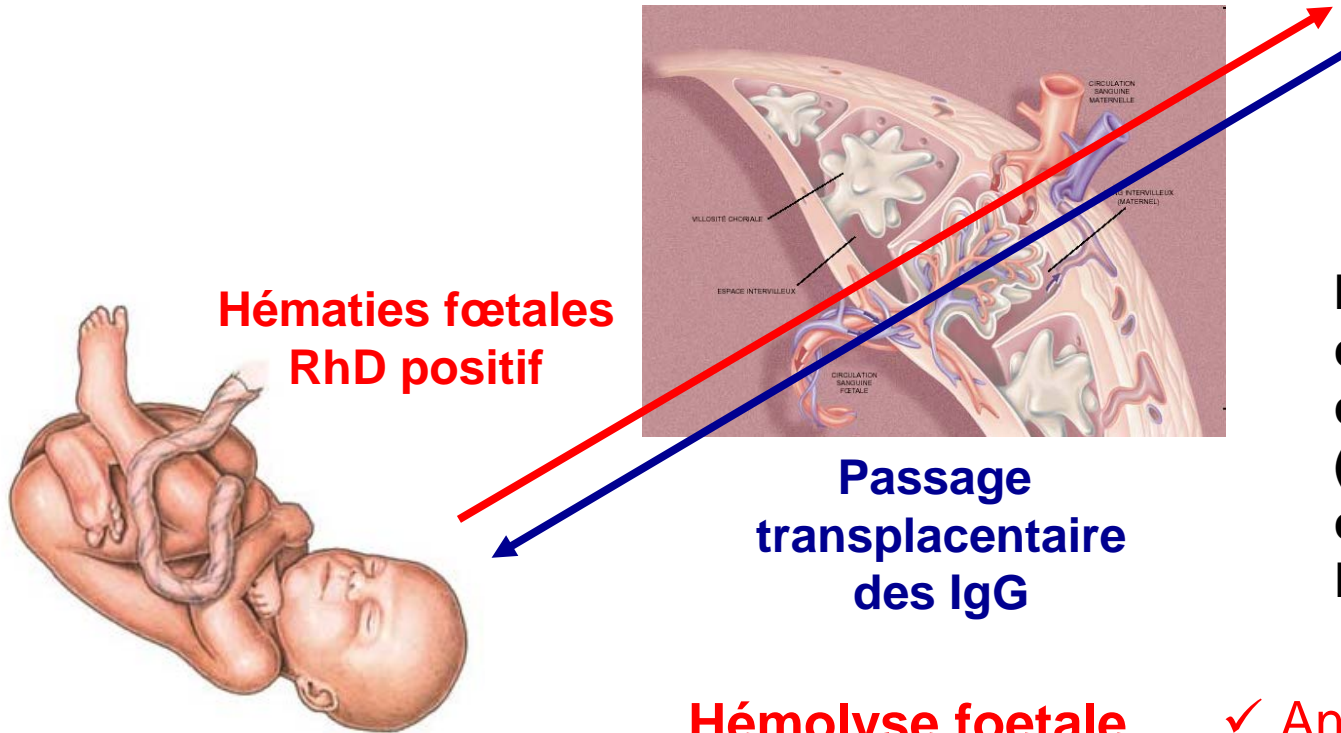
Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale

Pôle de Biologie-Imagerie

Hôpital Saint-Antoine – AP-HP - Paris

ALLO-IMMUNISATION : MECANISME

IFM érythrocytaire : situation obstétricale rare (1 à 2 femmes allo-immunisées sur 1 000 en dehors des IFM ABO)



Immunisation résulte d'un passage, dans la circulation maternelle (RhD négatif), d'hématies fœtales RhD positif (HFM).

Hémolyse foetale

Correspond à la **fixation** d'anticorps maternels circulants sur les antigènes foetaux érythrocytaires correspondants



- ✓ Anémie foetale
- ✓ Anasarque
- ✓ Mort foetale in utero
- ✓ Ictère nucléaire
- ✓ Séquelles neurologiques

ALLO-IMMUNISATION : PREVENTION

Rôle de l'immunoprophylaxie : injection d'IgRH visant à neutraliser les globules rouges fœtaux RhD positif circulants chez la mère.

- Prévention du post-partum dans les 72 heures de l'accouchement
- Prévention ciblée au cours de la grossesse, uniquement dans les situations à risque d'hémorragie foeto-maternelle.
- Prévention systématique du 3^{ème} trimestre pour **couvrir les HFM du troisième trimestre parfaitement inapparentes (responsables du tiers des allo-immunisations)**

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

INDICATIONS

FEMME ENCEINTE RHESUS D NEGATIF

FEMME IMMUNISEE

**PERMET DE LEGITIMER OU
NON UNE SURVEILLANCE
ANTENATALE**

FEMME NON IMMUNISEE

AMNIOCENTESE

SANS AMNIOCENTESE

**PERMET D'EVITER INJECTION
D'IgRH SI LE GENOTYPE *RHD*
FOETAL EST NEGATIF**

**DEVRAIT PERMETTRE D'EVITER
INJECTION D'IgRH SI LE
GENOTYPE *RHD* FOETAL EST
NEGATIF (40%)**

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

ADN fœtal dans le plasma maternel

Suite à la découverte de la présence d'ADN fœtal dans le plasma des femmes enceintes (1 à 6 % d'ADN d'origine fœtale sous forme acellulaire)

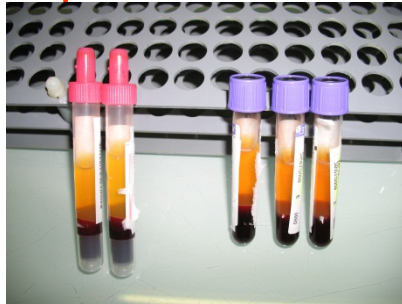
LO Y.M. et al. Am J Hum Genet, 1998, 62 : 768-775.

	Quantité de Génomes (copies par ml de plasma maternel)	Isolement	Persistance <i>in vivo</i>
ADN fœtal dans le plasma	25 (3 à 70) à 15 S.A. 290 (77 à 769) à terme	Rapide, simple	Demi-vie < 1 heure

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL EN PRATIQUE

Sang maternel collecté sur EDTA (5 à 7 ml)

72h max entre prélèvement et réception au laboratoire



1

Centrifugation puis décantation plasma

Extraction de l'ADN plasmatique



2

Amplification en
Duplicate de l'ADN
(3 exons : 5, 7 et 10)
ABI7300 (Applied
Biosystems)



3

CNRHP

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

Kit de 2ème génération

Coopération RECHERCHE –INDUSTRIE

(INSERM – INTS- CNRHP - J.BOY)

Trousse développée depuis 2006

Kit de 2ème génération pour PCR en Temps Réel avec reporter fluorescent. Marquage CE obtenu en 2010

Cibles: exons X, VII et V (amorces CNRHP)Sonde Taqman

ADN marqueur : maïs

Institut de
BIOTECHNOLOGIES
Jacques Boy



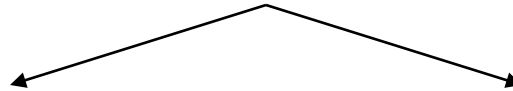
Free DNA Fetal Kit® RhD

Kit de génotypage foetal *RHD* à partir d'ADN foetal libre du sang maternel
(Technique PCR Temps réel)

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

PRINCIPE

Amplification par PCR de séquences du gène *RHD* sur un extrait d'ADN de plasma maternel



Amplification positive
FŒTUS RHESUS D POSITIF
Car : ABSENCE DE
SEQUENCE DU GENE *RHD*
CHEZ LA MERE

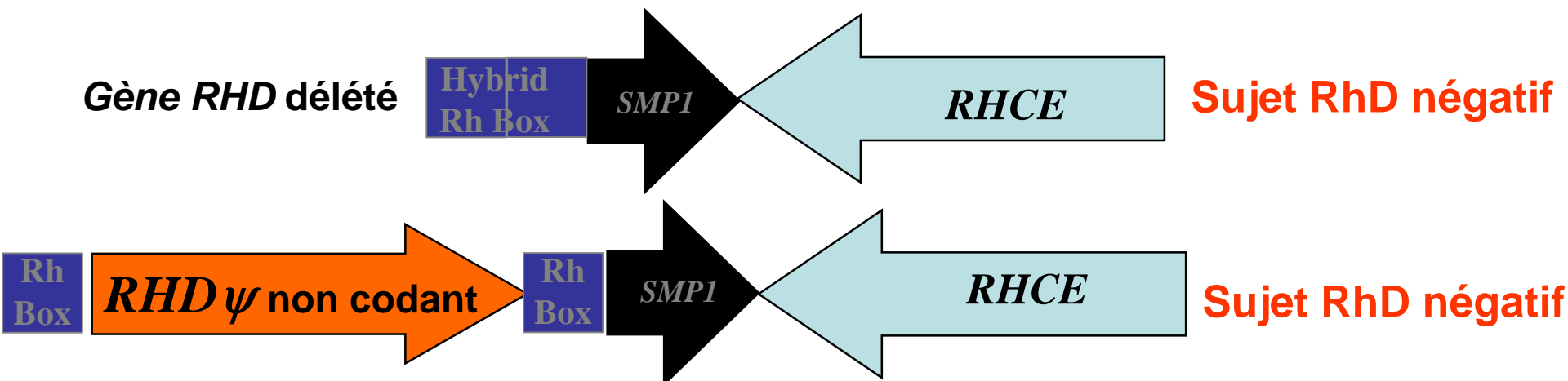
Amplification négative
FŒTUS RHESUS D NEGATIF
(diagnostic par défaut)

Ou concentration très faible
d'ADN foetal
Ou amplification défectueuse

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

FAUX-POSITIFS

Spécificité du test en tant que facteur prédictif du phénotype n'est pas parfaite :
Présence de variants silencieux du gène *RHD* chez la mère et chez le fœtus



Fréquence : 1 % dans la population caucasienne

60 % dans la population Africaine RhD négatif

Solutions : - identifier ces gènes chez la mère

- appliquer des PCR *RHD* ne reconnaissant pas ces gènes
(exemple : PCR exon 5 non Dpsi)

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

FAUX NEGATIFS

2 PROBLEMES

- 1) **Problème d'extraction ou d'inhibition de la PCR :**
solution : inclusion d'un ADN traceur déposé dans le plasma type (témoin d'extraction de l'ADN et de non-inhibition de la PCR).
- 2) **Absence d'ADN fœtal :**
solution : Recherches d'ADN fœtal « témoin ».

DONC POUR ECARTER LE RISQUE DE FAUX NEGATIF

REPETER LE TEST SUR UN SECOND PRELEVEMENT (>> à 12SA)

- 1) **Concentration plus élevée d'ADN fœtal**
- 2) **Rattraper une erreur d'étiquetage**
- 3) **Rattraper un croisement pré ou per- analytique des échantillons**

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL SYSTEMATIQUE ?

ETUDE GENIFERH EN COURS

Projet STIC 2010 : Génotypage *RHD* fœtal non invasif systématique
à l'aide d'un kit marqué CE (Institut Jacques Boy)
Paris / Marseille / Lille / Poissy / Nantes

Objectif principal

Évaluer le rapport coût-efficacité (4000 patientes) de l'application systématique du génotypage *RHD* fœtal non invasif

Objectifs secondaires

Faisabilité de la stratégie de génotypage *RHD* fœtal systématique
Analyser les génotypes « indéterminés » et les discordances génotypes phénotypes
Aide à la décision publique de diffusion du génotypage *RHD* fœtal non invasif au sein du réseau français de soin en obstétrique et du tarif de remboursement du test.

**Mise en place au CNRHP d'un
programme d'évaluation externe de la
qualité avec un contrôle de qualité
externe (CQE) pour le génotypage
RHD foetal**

LES ENJEUX

- un des objectifs de l'étude multicentrique GENIFERH évaluant l'impact médico-économique du génotypage *RHD* foetal non invasif systématique dans le suivi des femmes enceintes RhD-négatif
- perspective prochaine d'une diffusion large du génotypage *RHD* foetal non invasif
- Accréditation du test selon la norme NF ISO 15189

NATURE DU CQE

- **CQE IDEAL :**

- Plasma maternel issu d'une grossesse mono-foetale et contenant une quantité prédéfinie d'ADN foetal d'origine placentaire.
- **COLLECTE IMPOSSIBLE**

- **CQE EN PRATIQUE :**

- Mimer l'amplification d'ADN foetal *RHD* positif minoritaire dans un environnement maternel RH1 négatif
- 1-Mélange de plasmas de donneurs RH:-1 et RH:1 à des concentrations différentes
- 2-Distribution sous forme de plasmas congelés

DIFFERENTES ETAPES

- **FABRICATION**

- 1- Tests génétiques des poches**

- Le plasma RH:-1 correspond moléculairement à une délétion du gène *RHD*
 - Les plasmas RH:1 ne possèdent pas d'allèle *RHD* silencieux de type *Dpsi*.

- 2- Calcul du facteur de dilution avec le Ct moyen de l'exon 7**

DIFFERENTES ETAPES

- **VERIFICATION**

- 2 protocoles différents

- Extraction automatisée (EasyMag), amplification ABI7300

- Extraction manuelle (QIAmp MinElut®Virus), amplification LightCycler 1.0

- Sur les deux techniques, les différences entre les Ct attendus et les Ct mesurés pour chaque CQE sont inférieur à 5%.→CQE OK

- **VALIDATION**

- 2 protocoles différents

- Méthode PCR classique avec électrophorèse (CNRHP)

- Méthode FRET Exon 10 (EFS Lille)

DIFFERENTES ETAPES

- **REDACTION DES DOCUMENTS**

Rédaction des fiches d'envoi

Rédaction des fiches de rendu des résultats

Codification de l'ensemble des méthodes et matériels

**CONTROLE QUALITE EXTERNE POUR LE GENOTYPAGE
RHD FOETAL SUR SANG MATERNEL
EXERCICE 10-06/01**

Date limite d'envoi des résultats 16/07/2010

Contenu de l'envoi :

- Echantillons 10P1, 10P2, 10P3 : 3 plasmas congelés dans de la carboglace pour analyse de génotypage RHD foetal sur plasma maternel (2 aliquots de chaque échantillon)
- 1 formulaire de réponse

Recommandations :

- Dès réception, les échantillons doivent être congelés à -20°C.
- Malgré tout le soin apporté à leur sélection (plasmas testés de donneurs prélevés par l'Etablissement Français du Sang), les échantillons sont des produits biologiques humains et doivent être maniés avec le même soin que les échantillons provenant de patients pour tout ce qui concerne les risques de maladies transmissibles.
- Même si les analyses demandées n'ont pas été effectuées, quelle qu'en soit la cause, il est impératif de nous retourner le bordereau-réponse identifié au nom du laboratoire. Veuillez préciser sur ce même bordereau pour quelle raison les résultats n'ont pas été rendus.
- Pour tout échantillon manquant dans votre colis, n'hésitez pas à nous contacter par téléphone.
- Les tables de codage des réactifs et appareils figurent sur une feuille jointe à cet envoi. En cas d'absence de code correspondant, indiquez en clair les informations sur le réactif utilisé (distributeur, dénomination, référence(s), marquage CE), ou le nom de l'automate et celui de son distributeur. Si possible, joindre la fiche technique (notice) du réactif.
- Afin de mimer l'amplification d'ADN foetal RH1 positif minoritaire dans un environnement d'ADN maternel RH1 négatif majoritaire, ces CQEs sont fabriqués en mélangeant des plasmas non filtrés (filtration de déleucocytation) de donneurs, prélevés par l'Etablissement Français du Sang, RH1 négatif et RH1 positif à des concentrations différentes. Toutefois, ce type de CQE est impropre à la recherche de modifications épigénétiques de l'ADN foetal placentaire ou à la mise en évidence de polymorphisme ADN d'origine paternel. Ces recherches sont parfois utilisées pour attester de la présence d'ADN foetal mais elles ne sont pas indispensables au diagnostic de génotypage RHD foetal.

Envoi des Résultats :

Agnès MAILLOUX
CNRHP
Hôpital St Antoine
184, Rue du Faubourg St Antoine
75571 PARIS CEDEX 12
Tel : 01-71-97-03-24
Fax : 01-71-97-03-29

Toute transmission par télécopie du bordereau de résultat devra être confirmée par un envoi courrier.

0 0 0 5

FORMULAIRE DE RESULTAT 2/3
EXERCICE 10-06/01

Date limite d'envoi des résultats 16/07/2010

Résultats :

Pour chaque échantillon, inscrire dans les tableaux ci-dessous les résultats (+ ou-) et les Ct obtenus pour chaque exon.

Si les PCR sont réalisées en duplicate ou triplicate, inscrire les Ct pour les puits 2 et 3.

Si une cible n'est pas utilisée écrire NA (Non Applicable) dans les cases correspondantes.

Si une cible non mentionnée est amplifiée, écrire les résultats et la cible utilisée dans la case « Autre ».

Dates d'analyse :

10P1

Cibles	Puits1		Puits2		Puits3	
	Résultat (+ou-)	Ct	Résultat (+ou-)	Ct	Résultat (+ou-)	Ct
Exon 10						
Exon 7						
Exon 5						
Maïs						
Autre						

Interprétation
(positif/négatif/ininterprétable)

10P2

Cibles	Puits1		Puits2		Puits3	
	Résultat (+ou-)	Ct	Résultat (+ou-)	Ct	Résultat (+ou-)	Ct
Exon 10						
Exon 7						
Exon 5						
Maïs						
Autre						

Interprétation
(positif/négatif/ininterprétable)

TABLE DE CODAGE DES TECHNIQUES

EXERCICE 10-06/01

Extraction

Extraction manuelle			
Code	Kit	Fournisseur	Mode d'utilisation du Kit
EM01	QIAamp DSP Virus Kit	QIAGEN	Centrifugation
EM02	QIAamp MinElute Virus Vaccum kit	QIAGEN	Vaccum
EM03	QIAamp MinElute Spin Kit	QIAGEN	QIAcube (QIAGEN)
EM04	QIAamp Blood Midi Kit	QIAGEN	miniMAG (BIOMERIEUX)
EM05	QIAamp Blood Mini Kit	QIAGEN	Autre
EM06	Ultrasens Virus Kit	QIAGEN	
EM07	Nuclisens Magnetic Extraction	BIOMERIEUX	
EM07	High Pure PCR Template Préparation Kit	ROCHE	
EM08	CST genomic DNA purification kit	INVITROGEN	
EM09	Autre		

Extraction automate			
Code	Automate	Protocol/Kit	
EAEZ1	BioRobot EZ1 Qiagen	EZ1 DNA Forensic Card	EZ1 DNA Tissue Kit
EAEZ2	BioRobot EZ1 Qiagen	EZ1 DNA Investigator Card	EZ1 DNA Investigator Kit
EAEZ3	BioRobot EZ1 Qiagen	EZ1 Virus Card v2.0	EZ1 Virus Mini Kit
EAEM1	EasyMag, Biomerieux	Generique	Silice pure
EAEM2	EasyMag, Biomerieux	Generique	Silice diluée
EAEM3	EasyMag, Biomerieux	Specific	Silice pure
EAEM4	EasyMag, Biomerieux	Specific	Silice diluée
EAMN1	MagNA Pure Compact, Roche	MagNA Pure Nucleic Acide Isolation Kit	
EAMN2	MagNA Pure LC, Roche	MagNA Pure Nucleic Acide Isolation Kit-large volume	
EAQS1	QIAAsymphony, Qiagen	QIAAsymphony Virus/Bacteria Kit	
EAQS2	QIAAsymphony, Qiagen	QIAAsymphony DNA kit	
EARM1	BioRobot M48, Qiagen	MagAttract Virus M48 kit	
EAMD1	BioRobot MDx, Qiagen	QIAamp Virus MDx	
EAMW1	Maxwell 16, Promega		
EAAT1	Autre		

Amplification

Automate d'amplification en temps réel			
Code	Automate	Code	Automate
AL1	LighCycler 1.0 , Roche	AB4	ABI 7300, Applied Biosystems
AL2	LighCycler 2.0, Roche	AB5	ABI 7000, Applied Biosystems
AL3	LighCycle 480, Roche	AM1	MX-4000, Stratagen
AB1	ABI 7900, Applied	AM2	MX-3000, Stratagen
AB2	ABI 7700, Applied	AR1	Rotor Gene Corbett
AB3	ABI 7500, Applied	AC1	CFX96, Biorad

DIFFERENTES ETAPES

• CONSEILS CLINICO-BIOLOGIQUES

Envoi des échantillons avec un contexte clinique : femme enceinte immunisée ou non avec date de grossesse.

Conseils sous forme d'un QCM à compléter en fonction du résultat du génotypage

Conseils clinico-biologiques (cocher la ou les cases correspondantes)

- Résultat à contrôler sur un nouveau prélèvement
- Résultat à contrôler sur un échantillon de liquide amniotique dans les 72h suivant l'amniocentèse
- Patiente sans risque d'allo-immunisation anti-RH1 pour la grossesse en cours
- Patiente sans risque d'incompatibilité foeto-maternelle RH1 pour la grossesse en cours
- Patiente avec risque d'allo-immunisation anti-RH1 pour la grossesse en cours
- Patiente à traiter par IgRH dans les 72h suivant l'amniocentèse
- Incompatibilité foeto-maternelle RH1 pour la grossesse en cours, risque d'anémie foetale sévère nécessitant une surveillance clinico-biologique appropriée.
- Autre :

DIFFERENTES ETAPES

- ANALYSE INTER-LABORATOIRE

	10P1 Ct=36	10P2 Ct=38	10P3 Ct=0
Positif	5	5	-
Négatif	-	-	5
Ininterprétable	-	-	-
Ct exon10	Moyenne=36.7 CV%=2.8 Effectif : 5	Moyenne=38.1 CV%=6.6 Effectif : 5	Moyenne=0 CV%=0 Effectif : 5
Ct exon7	Moyenne=36.7 CV%=2.4 Effectif : 5	Moyenne=38.4 CV%=2.9 Effectif : 5	Moyenne=0 CV%=0 Effectif : 5
Ct exon5	Moyenne=35.9 CV%=4.4 Effectif : 2	Moyenne=36.7 CV%=2.1 Effectif : 2	Moyenne=0 CV%=0 Effectif : 2
Ct maïs	Moyenne=34.3 CV%=3.6 Effectif : 5	Moyenne=34.3 CV%=3.8 Effectif : 5	Moyenne=33.9 CV%=4.1 Effectif : 5
Evaluation	5 A	5 A	5 A

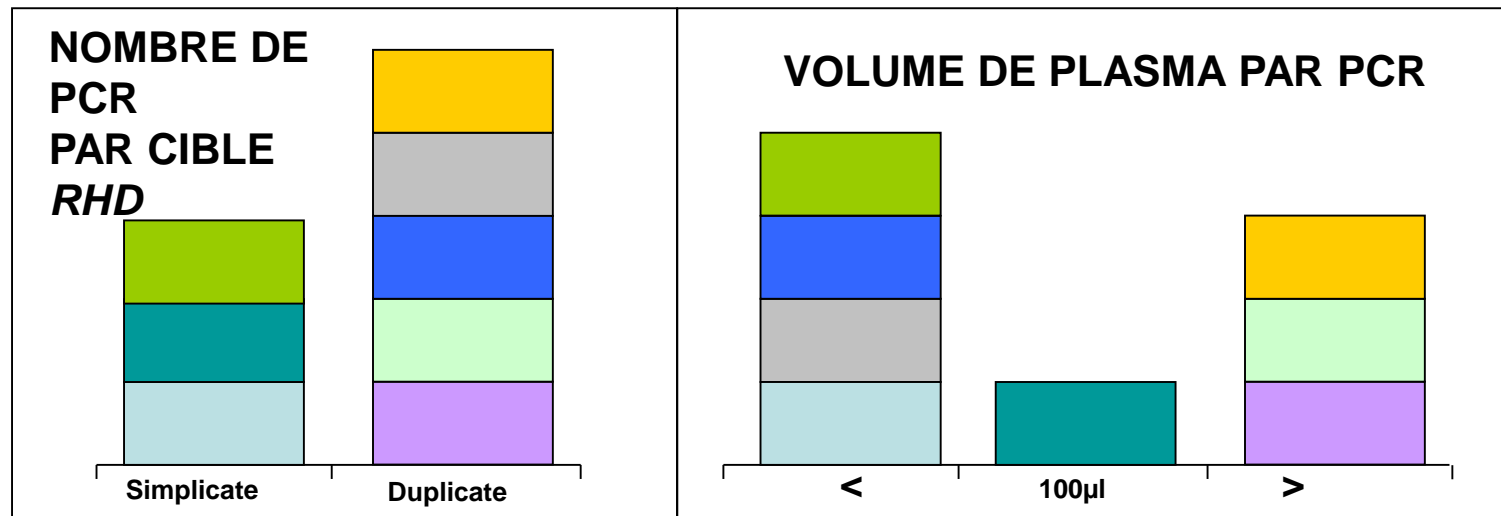
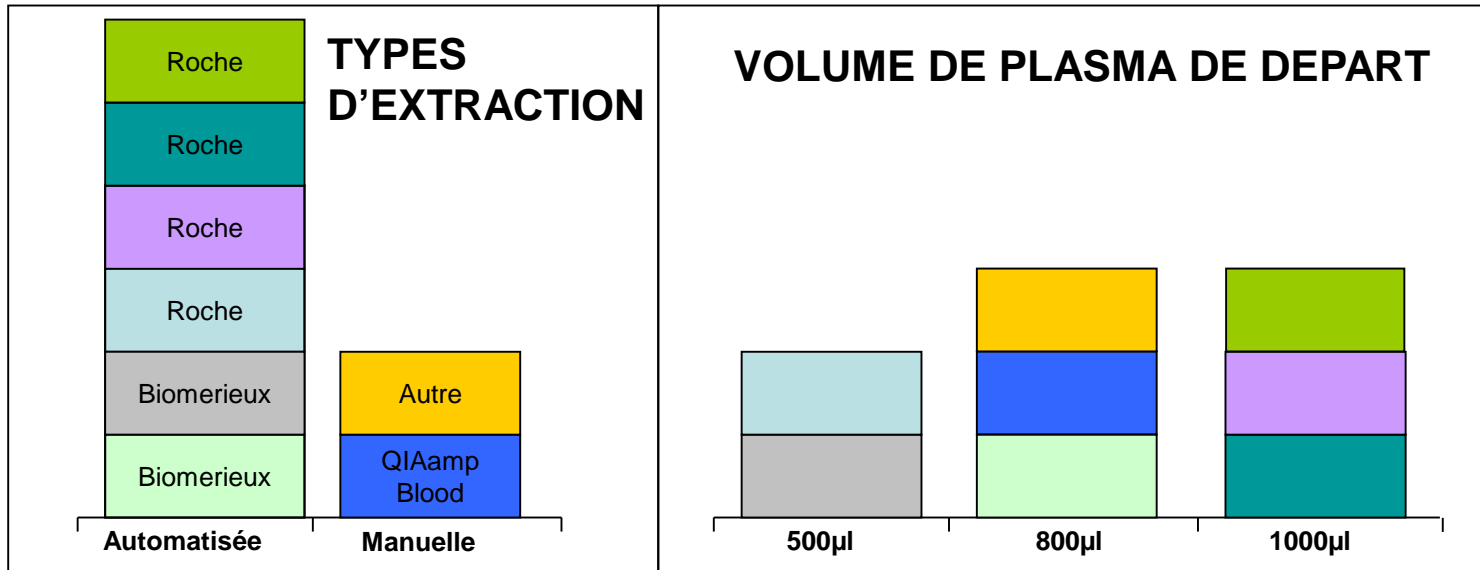
BILAN 2010-2011

ANNEE	2010	2011	
EXERCICE	10-06/01	11-02/01	11-12/02
DATE	16/06/2010	24/02/2011	01/12/2011
NOMBRE DE LABORTATOIRES	5	7	6
ECHANTILLON	10P1 : <i>RHD</i> positif (28SA) 10P2 : <i>RHD</i> positif (18SA) 10P3 : <i>RHD</i> négatif	11P1 : <i>RHD</i> positif (18SA) 11P2 : <i>RHD</i> négatif	11P3 : négatif ou ininterprétable (24SA) 11P4 : négatif ou ininterprétable (26SA)
RESULTAT CORRECT	5/5	7/7	6/6
CONSEIL CLINICO-BIOLOGIQUE CORRECT	-	11P1 : 7/7 11P2 : 5/7	11P3 : 5/6 11P4 : 5/6

BILAN 2012-2013

ANNEE	2012	2013	
EXERCICE	12-06/01	13-01/01	13-06/02
DATE	19/06/2012	09/01/2013	25/06/2013
NOMBRE DE LABORTATOIRES	6	7	8
ECHANTILLON	12P1 : <i>RHD</i> positif (12SA) 12P2 : <i>RHD</i> positif	13P1 : <i>RHD</i> positif	13 P2 : indéterminé 13 P3 : <i>RHD</i> Positif 13 P4 : <i>RHD</i> négatif
RESULTAT CORRECT	12P1 : 4/6 12P2 : 4/6	13P1 : 7/7	13P2 : 7/8 13P3 : 6/8 13P4 : 8/8
CONSEIL CLINICO-BIOLOGIQUE CORRECT	12P1 : 2/6 12P2 : 3/6	4/7	13P2 : 7/8 13P3 : 6/8 13P4 : 8/8

ENSEMBLE DES PROTOCOLES UTILISES PAR LES LABORATOIRES EN 2013



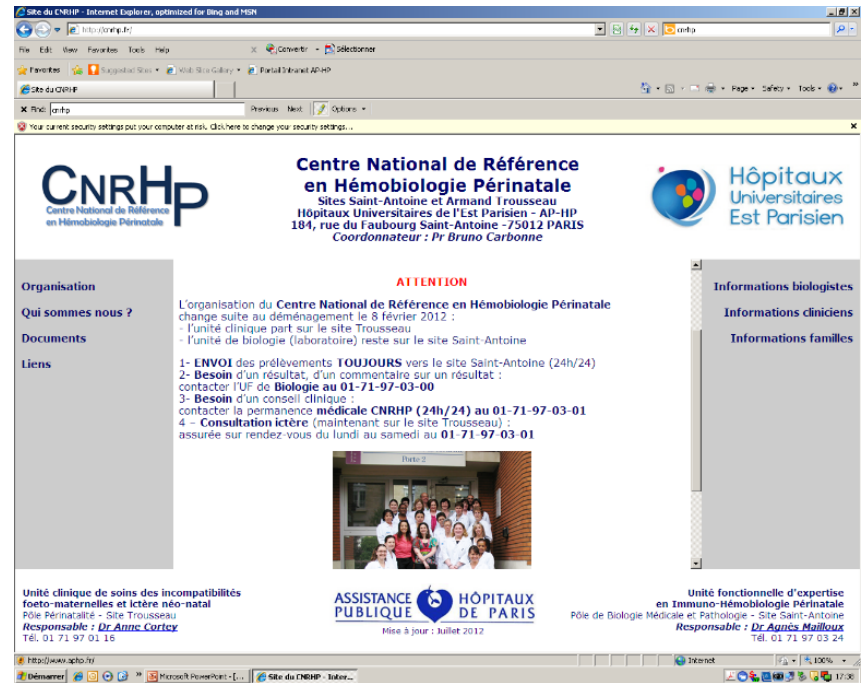
CONCLUSIONS

- **Génotypage *RHD* foetal non invasif : place centrale dans le suivi de la patiente RH1 négatif.**
- **Futur proche : généralisation de ce test**
- **Mission du CNRHP de participer à l'élaboration de contrôle.**
- **Plus de 10 ans d'expérience au CNRHP dans la réalisation de ce test (1500 par an), accrédité selon la norme NF ISO 15189 depuis septembre 2012.**
- **2015 : Transfert de l'organisation du CQE génotypage *RHD* foetal à ASQUALAB**

Travail réalisé par N. Da Silva

Dr S. HUGUET-JACQUOT
Dr C. TOLY-NDOUR

Olivier OUDIN
Priscilla SAULET
Martine OGER



UF biologie CNRHP pôle biologie et pathologie : Dr M VAUBOURDOLLE

Dr A. CORTEY
Pr. B. CARBONNE
UF clinique CNRHP pôle de périnatalité : Pr D. MITANCHEZ

