



GENOTYPAGE RHD FŒTAL

INTERPRETATION

17 Novembre 2009



EXPERIENCE DU CNRHP

1998 - 2000 : Mise au point du génotypage RHD fœtal sur plasma maternel à partir des acquis du génotypage RHD fœtal sur liquide amniotique

2000 - 2004 : 1^{ers} essais de diagnostic clinique

C. Rouillac- Le Sciellour et col. Large-Scale-pre diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-Negative pregnant Women, Mol Diagn 2004

2004 - 2007 : Transfert d'expérience et mise au point d'un kit diagnostique de génotypage par l'institut Jacques Boy

A partir de 2008 : Diffusion de la technique avec le kit Jacques Boy marqué CE dans le cadre de l'étude STIC GENIFERH

Evolution des demandes de génotypage :

De 2004 à 2008 : environ 750 tests / an

2008 : 1200 tests

2009 : 2000 tests en prévision (depuis septembre 50 tests / semaine)

IMPORTANCE DU CONTEXTE CLINIQUE

Exigences différentes selon le contexte

1- FEMME IMMUNISEE ANTI- D

2- IMMUNOPROPHYLAXIE RH ANTENATALE CIBLEE

3- IMMUNOPROPHYLAXIE RH ANTENATALE SYSTEMATIQUE

CONTEXTE (1)

FEMME RHD – IMMUNISEE AVEC ANTI- D EXIGENCES

Valeur prédictive par rapport au phénotype RHD de l'enfant

100 % si test négatif

Proche de 100 % si test positif

Diagnostic précoce (à partir de 12 SA)



TEST NEGATIF

1- Fœtus à considérer *RHD* positif dans l'attente d'une confirmation sur un second prélèvement (>15SA)

2- Après confirmation :

Fœtus *RHD* négatif

Pas de surveillance spécifique

**PAS DE SITUATION
D'INCOMPATIBILITE**

TEST POSITIF

Fœtus *RHD* positif ou RH indéterminé

**RISQUE CERTAIN OU PROBABLE
D'INCOMPATIBILITE FOETO-MATERNELLE**

Mise en place d'une surveillance anténatale :

BIOLOGIQUE (dosage pondéral)

OBSTETRICALE (vitesse-doppler à l'artère cérébrale moyenne du fœtus)

CONTEXTE (2)

IMMUNOPROPHYLAXIE RH ANTENATALE CIBLEE

Amniocentèse

EXIGENCES

Valeur prédictive par rapport au phénotype RHD de l'enfant

100 % si test négatif

A réaliser 1 à 2 semaines avant amniocentèse



TEST NEGATIF

Fœtus à considérer *RHD* négatif sous réserve de confirmation sur liquide amniotique dans les 72 h suivant le geste

Abstention de traitement par IgRH

TEST POSITIF

Fœtus *RHD* positif ou RH indéterminé

Traitemennt de la patiente au décours immédiat de l'amniocentèse

**386 dossiers de femmes RHD-
candidates à une amniocentèse
Etude sur 3 maternités**

342 dossiers étudiés ▶ 32 exclus car refus PLA ou urgent

310

SANS GENOTYPAGE NON INVASIF

102



100 % traitées

AVEC GENOTYPAGE NON INVASIF

208

48 ROT 43 RDB

117 SAT

55,5 % RHD+ → 100 % traitées
39,3 % RHD- → 12,5 % traitées
1,71 % Indéterminé
3,42 % Ininterprétable

**Réception résultat en moyenne 7 jours après
Concordance génotypage LA/ sang maternel : 99.5 %**

1 faux neg

Etude Siham Boujida, sage femme maternité St Antoine

CONTEXTE (3)

IMMUNOPROPHYLAXIE RH ANTENATALE SYSTEMATIQUE

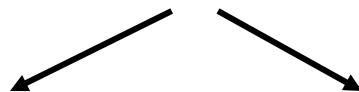
Injection d'IgRH à 28 SA +/- 2

EXIGENCES

Valeur prédictive par rapport au phénotype RHD de l'enfant

100 % si test négatif

A réaliser avant 26 SA



TEST NEGATIF

1- Fœtus à considérer *RHD* positif
dans l'attente d'une confirmation
sur un second prélèvement

2- Après confirmation :

Fœtus *RHD* négatif

*Pas de d'immunoprophylaxie RH
anténatale*

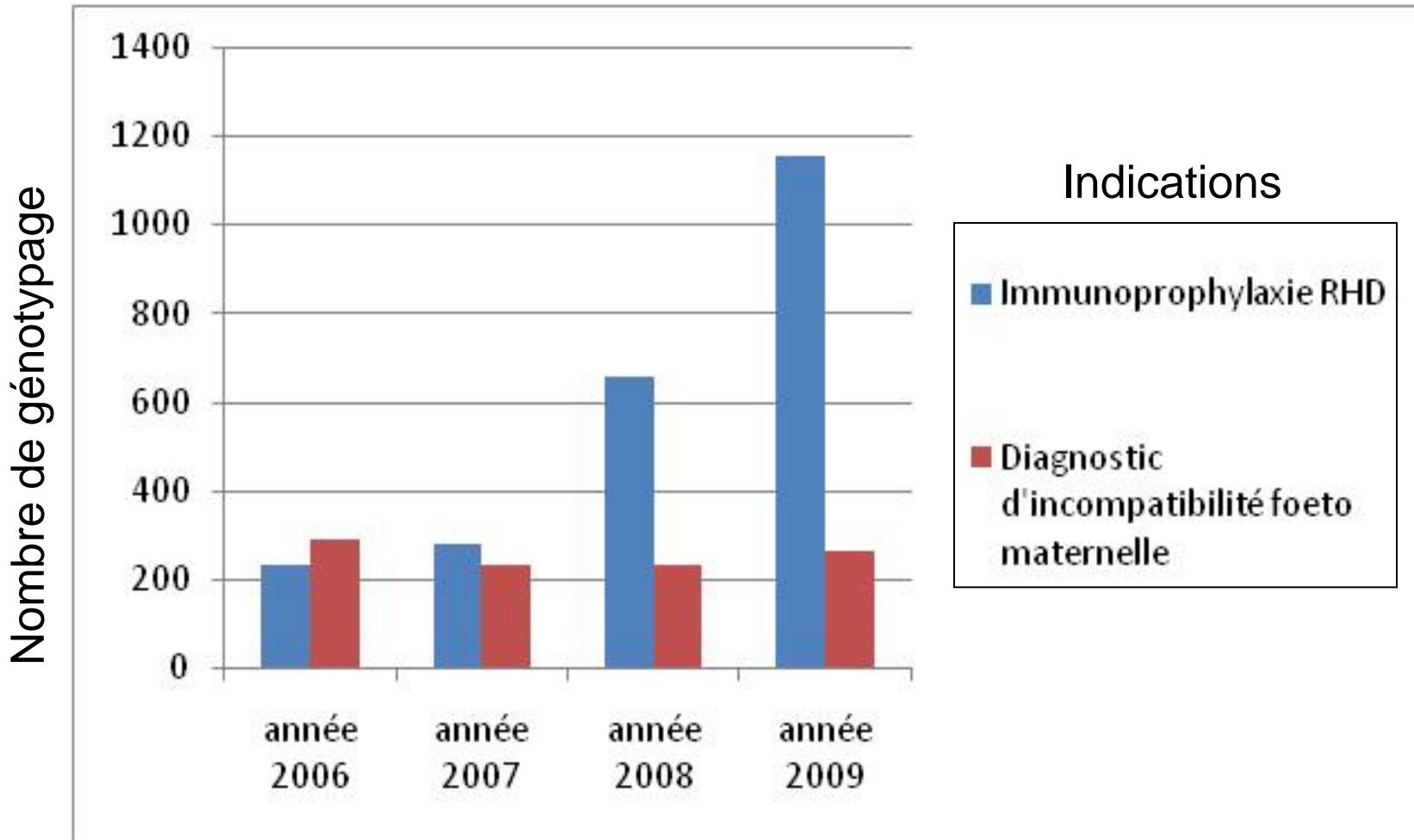
TEST POSITIF

Fœtus *RHD* positif ou RH indéterminé

*Indication d'immunoprophylaxie RH
anténatale*

LE GENOTYPAGE RHD FŒTAL NI

Bilan CNRHP 4 dernières années



3 NIVEAUX DE SPECIFICITE/SENSIBILITE

Selon le contexte

- 1- Génotypage à 2 exons (1ère génération)**
- 2- Génotypage à 3 exons (2ème génération)**
- 3- Génotypage chez les femmes porteuses de gène D silencieux**

1er NIVEAU : GENOTYPAGE EXON 7 / EXON 10

Profil initial applicable chez la femme RH- avec gène RHD déléte



- Applicable dans la population caucasienne : **gène RHD déléte dans 99 % des cas**
- Sensibilité maximum (tolérance 0 pour les faux négatif)
- Limiter la lourdeur technique (diminution du coût)
- Moins bonne spécificité tolérable (traitement par défaut)

Kit Jacques Boy 1^{ère} génération

MAIS

- exclusion population non caucasienne
- Pas de possibilité d'identification de variants

1er NIVEAU : GENOTYPAGE EXON 7 / EXON 10

1^{ère} situation : mère [D-] avec délétion du gène *RHD*

test négatif ⇒ Fœtus D négatif ou DHAR

test positif (Ct>35) ⇒ 1) Fœtus D positif, D partiel, Du
 2) Fœtus D silencieux
 a) D silencieux non identifiable
 b) D silencieux DΨ

2^{ème} situation : mère [D-] avec un allèle *RHD* silencieux (Ct<<35)

Au CNRHP D silencieux (4%)

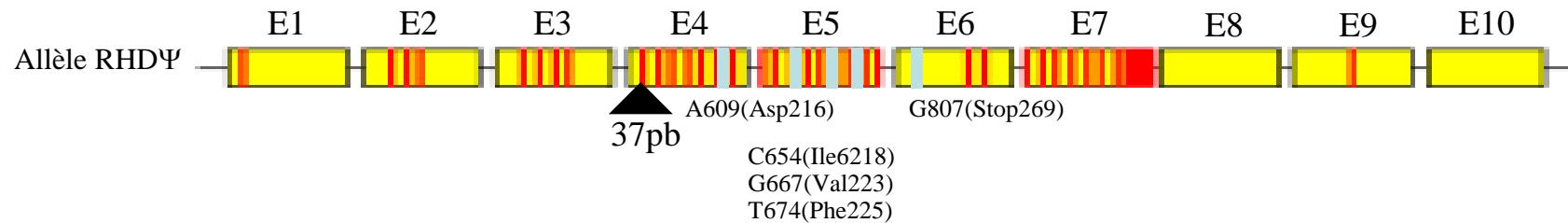
a) D silencieux non identifiable (24%)
b) D silencieux DΨ (76%)

Rouillac-Le Sciellour et al

⇒ génotype RHD fœtal ininterprétable

2ème NIVEAU : GENOTYPAGE EXON 7 / EXON 10 / EXON 5

Profil applicable chez la femme RH- avec gène *RHD* déléte ou gène *Dpsi*



gène *Dpsi* : gène *RHD* non exprimé

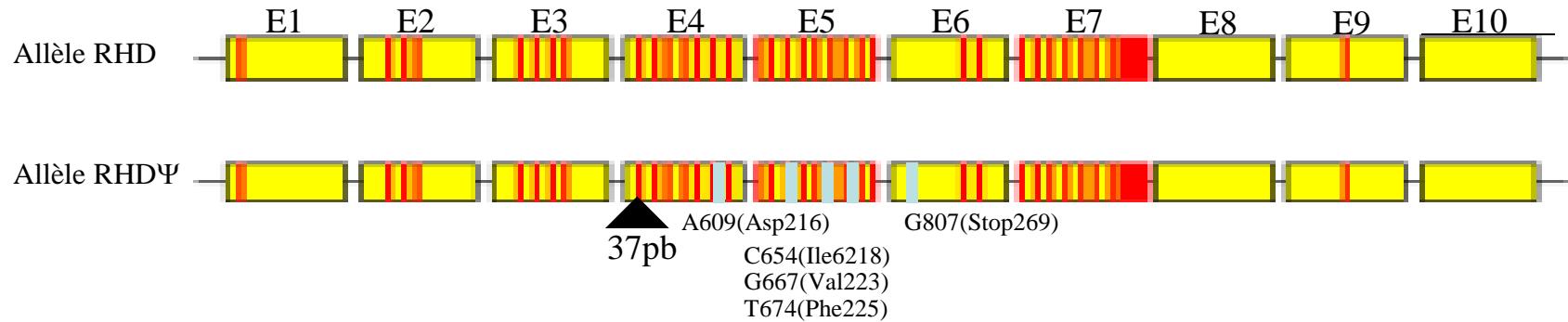
Fréquence : 1 % dans la population caucasienne

60 % dans la population Africaine RH1 négatif

- Permet d'amorcer un diagnostic chez des femmes porteuses d'un gène *Dpsi* (exon 5 non Dpsi)
- Identification de variants du gène D phénotypiquement exprimés
- Les 3 amplifications distinctes permettent d'augmenter la sensibilité du test

*Kit Jacques Boy seconde génération
C. Rouillac-Le Sciellour SFTS 2009 S-18-5*

3ème niveau : Génotypage chez les femmes porteuses de gène D silencieux *D psi*



1- Identification du gène *Dpsi* sur cellules maternelles par PCR intron4, insertion *Dpsi*, exon6 *Dpsi*

Importance +++ chez femmes *Dpsi* allo-immunisées

2- Application de PCR *RHD* supplémentaires ne reconnaissant pas le gène maternel *Dpsi*

- EXON 5 non *Dpsi*
- EXON 6 non *Dpsi*

MODALITES EXPERIMENTALES DE LA STRATEGIE APPLIQUEE AU CNRHP

MODALITES :

- Utilisation de la trousse *Jacques Boy* complétée de techniques maison pour l'amplification de l'exon 5 de façon systématique et pour l'exon 6 chez les patientes *Dpsi*
- Amplification **unique** des exons 10, 7 et 5 en **simplex**.
- Extraction à l'aide de l'automate EasyMag *Biomerieux* par série de 12 ou 20 patients plus 1 témoin négatif, 2 témoins positifs et 1 blanc.
- Toute amplification discordante par rapport aux deux autres est ré-amplifiée à partir du même extrait d'ADN plasmatique (*LightCycler Roche*)

INTERPRETATION DES RESULTATS

EXON 10, EXON 7, EXON 5

ANALYSE INTERPRETABLE SI :

- Absence d'amplification du témoin « **control RHD négatif** » de la trousse et du témoin Blanc
- Amplification du témoin « **control RHD positif** » de la trousse à un Ct constant aux alentours de 35 cycles
 - + amplification d'un témoin faiblement positif fabriqué au CNRHP avec un Ct plus proche des échantillons cliniques (37- 38 cycles en moyenne)
- Amplification de **l'ADN de maïs** avec Ct inférieur à 35 cycles : validation de la phase d'extraction + absence d'inhibiteurs de PCR
- **Résultat**
Pour chaque exon
 - Ct \leq 40,44 \Rightarrow positif
+ Signal Fluorescence > 1,5
 - Ct > 40,44 \Rightarrow négatif

INTERPRETATION (1)

RESULTATS	CONCLUSION
Exon7 Exon10 Exon5 } Négatif (Ct – ou Ct >40.44) + Maïs Positif (Ct<35.00)	Fœtus RHD négatif à vérifier sur un nouveau prélèvement
Exon7 Exon10 } Négatif (Ct – ou Ct >40.44) Exon5 Positif (35<Ct <40.44)	Refaire extraction et PCRs: Fœtus <i>DHAR</i>

INTERPRETATION (2)

RESULTATS	CONCLUSION
Exon7 Exon10 } Exon5 }	Positif ($35 < Ct < 40.44$) <i>RHD</i> positif
Exon7 Exon10 }	Positif ($35 < Ct < 40.44$) Refaire extraction et PCRs:
Exon5	Négatif ($Ct -$ ou $Ct > 40.44$) <i>RHD</i> Ψ ou <i>D partiel</i> : DIIIa, DV, DVI, DAR, DFR ininterprétable (recours au niveau 3)

INTERPRETATION (3)

RESULTATS		CONCLUSION
Exon7 Exon5	} Positif (35< Ct <40.44)	Refaire extraction et PCRs:
Exon10	Négatif (Ct – ou Ct >40.44)	D partiel
Exon7	Positif (35< Ct <40.44)	Refaire extraction et PCRs:
Exon 5 Exon10	} Négatif (Ct – ou Ct >40.44)	Ininterprétable (variant non répertorié)

INTERPRETATION (4)

RESULTATS		CONCLUSION
Exon10 Exon 5	} Positif ($35 < Ct < 40.44$)	Refaire extraction et PCRs: DIV
Exon7	Négatif ($Ct -$ ou $Ct > 40.44$)	
Exon10	Positif ($35 < Ct < 40.44$)	Refaire extraction et PCRs:
Exon 5 Exon 7	} Négatif ($Ct -$ ou $Ct > 40.44$)	(C)ce ^s ou DBT

INTERPRETATION (5)

EXON 7 et EXON 10 POSITIF Ct<35

Mère porteuse d'un allèle silencieux RHD

dont le type est déterminé par PCRs sur cellules maternelles

Nelly DA SILVA

Exon5 positif Ct<35

1-mère avec allèle silencieux RHD non $D\Psi$

2-fœtus indéterminé



Fœtus indéterminé

Exon5 positif 35< Ct<40.44)

1-mère avec allèle silencieux $D\Psi$

2-fœtus probablement positif



refaire extraction et PCRs
exon10, exon5 et exon6



exon5 positif exon6 positif **exon5 positif exon6 négatif**



Fœtus RHD positif **Fœtus D partiel (DIV, DHAR)**

Exon5 négatif Ct – ou >40.44)

1-mère avec allèle silencieux $D\Psi$

2-fœtus probablement négatif



refaire extraction et PCRs
exon10, exon5 et exon6



exon5 négatif exon6 négatif



exon5 négatif exon6 positif



Fœtus négatif ou D partiel (DVI, DBT) à vérifier sur un nouveau prélèvement

BILAN D'UNE ANNEE DE GENOTYPAGE

Utilisation du kit au CNRHP

1377 génotypages réalisés avec le kit Jacques Boy depuis
août 2008

40 % entre 12 et 18 SA
44 % entre 18 et 26 SA
14 % entre 26 et 35 SA

I-226 génotypages réalisés dans le cadre d'un diagnostic
d'incompatibilité foeto-maternelle

RESULTATS

162 fœtus *RHD* positif
44 fœtus *RHD* négatif
2 faux positif
3 indéterminés

15 Mères Dpsi **11 fœtus *RHD* positif**
 3 fœtus *RHD* négatif
 1 fœtus indéterminé

II-1151 génotypages réalisés dans le cadre d'une demande de prévention par IgRH

RESULTATS

801 fœtus *RHD* positif

323 fœtus *RHD* négatif

2 faux positif

3 « faux négatif » sur premier prélèvement

12 indéterminés

15 Mères *Dpsi*

8 fœtus *RHD* positif

2 fœtus *RHD* négatif

ANALYSE DES FAUX POSITIFS

4 faux positifs rapportés sur 1377 génotypages réalisés

GUI 25 SA

	Extraction P1 10/11/2008	Extraction P1 27/03/2009	P1 01/04/09
Exon10	39.03	38.7	-
Exon7	39.98	> 42	-
Exon5	38.55	40.2	-

ROS 20 SA

	Extraction P1 8/12/2008	P1 01/04/2009
Exon10	-/39.45	-
Exon7	39.47	-
Exon5	38.48	39.2/-

DEL 23 SA

	Extraction P1 26/01/2009	P1 28/01/2009	P1 29/01/2009	P1 18/05/2009
Exon 10	-	38.82	38.78	-
Exon7	-	-/-	39.75	-
Exon5	38.8	37.50	-/+39.17	-

ANALYSE D'UN FAUX POSITIF PARTICULIER

- Prélèvement 1 (P1): *Fœtus RHD négatif*
- 2 semaines plus tard Prélèvement 2 (P2): *Fœtus RHD positif*
- Reprise en parallèle de P1 et P2 dans une même série :
- Confirmation P1 ; *Fœtus RHD négatif*
- Confirmation P2 ; *Fœtus RHD positif*
- Demande d'un 3^{ème} prélèvement (P3) : *Fœtus RHD négatif*
- Problème d'identification de P2 : réalisation d'un test de Simonin sur les 3 prélèvements
 - P1, P3 : simonin de groupe 0
 - P2 : simonin de groupe A
- Demande d'un second prélèvement pour les patients ayant été reçus le même jour que P2 (2 patients concernés)
inversion faite par le technicien lors de la décantation

Problème d'identification du prélèvement lors de la décantation du prélèvement

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL FAUX POSITIFS

I- Présence de variants silencieux du gène *RHD* chez le fœtus

EXON 5 *Dpsi*
EXON 6 *Dpsi*

} Identification des fœtus *Dpsi*
En cours de validation

II- Interférence des contaminations par augmentation de la sensibilité

de la technique : contamination par aérosol lors du prélèvement, lors de la décantation du plasma, lors de l'extraction, lors de la manipulation de l'eluat ...

2 PROBLEMES

- 1) Problème d'extraction ou d'inhibition de la PCR :
Inclusion d'un ADN traceur déposé dans le plasma (témoin d'extraction de l'ADN et de non-inhibition de la PCR).
- 2) Absence d'ADN fœtal :
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