

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF SUR PLASMA MATERNEL

9 ans d'expérience à l'EFS AURA site de Lyon-GHE



Dr Emmanuelle GUINCHARD

EFS AURA, Lyon, site du Groupement Hospitalier Est

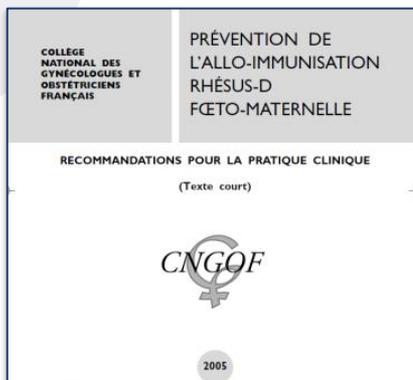
Journées TACT 11/10/19

Historique...

Les étapes, de la découverte du gène jusqu'à nos jours



Décisions
Autorités
sanitaires



2005



2011



13/07/2017



Décembre 2017

1993:
clonage gène

1997:
ADN fœtal libre D.Lo

2000: génotypage RHD
fœtal sur plasma maternel

2008:
Validation
méthode
EFS RA

2010:
démarrage
en routine
EFS RA

2013:
accréditation
du test EFS RA

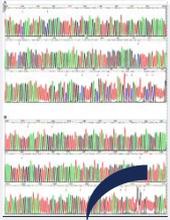
2017: adaptation à
l'augmentation d'activité:
automatisation,
personnel...

DECOUVERTE

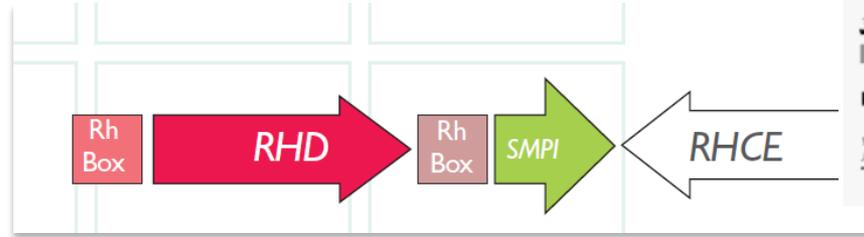
GENOTYPAGE RHD FŒTAL AU GHE

Historique: le début...

1993: **Séquençage** du gène



1997: Découverte **ADN fœtal libre** dans le plasma maternel



1999-2000: génotypage RHD fœtal non invasif sur plasma maternel

Le génotypage RHD fœtal sur sang maternel est un DPNI



Déterminer à partir de 11SA le statut RH1 (« Rhésus » ou D) du fœtus par simple ponction veineuse périphérique maternelle

Dès 2008: Génotypage à l'EFS GHE



Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

TRANSFUSION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE

Transfusion Clinique et Biologique 21 (2014) 1-14

Article original

RHD fœtal sur plasma maternel : validation de méthode sur 200 patientes

Non-invasive fetal RHD genotyping: Validation of the method with 200 patients

E. Guinchard^{a,*}, P. Bricca^a, S. Monnier^a, D. Rigal^b

^a EFS Rhône-Alpes, site de Lyon-GHE, 28, rue Doyen Lépine, 69677 Bron cedex, France

^b EFS Rhône-Alpes, site de Lyon-Gerland, 1, rue du Vercoeur, 69007 Lyon, France

Disponible sur Internet le 20 février 2014



Génotypage RHD fœtal non invasif sur sang maternel au laboratoire IHE de l'EFS Auvergne-Rhône-Alpes, site de LYON-GHE : 9 ans d'expérience et évolutions

E. GUINCHARD, C. CHABRE, S. COLLIARD, S. MONNIER, C. TROTEL, C. MARTHINET, S. GROLLEAU

EFS AURA, site de Lyon-GHE, 28 rue Doyen Lépine, 69677 BRON Cedex

2008: Mise au point

2013: accréditation

2010: passage du test en routine

Indications de la prophylaxie...

⁷ Selon le Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF).

Au premier trimestre : fausses couches spontanées ou menace de fausses couches spontanées, interruption de grossesse, grossesse molaire, grossesses extra-utérine, métrorragies, choriocentèse, amniocentèse, réduction embryonnaire, traumatisme abdominal.

Au 2^e et 3^e trimestre :

risque important : interruption médicale de grossesse, fausse couche spontanée tardive, mort fœtal *in utero*, version par manœuvre externe, traumatisme abdominal ou pelvien, intervention chirurgicale abdominale ou pelvienne, prélèvement ovulaire, accouchement ;

risque modéré : métrorragies, cerclage du col utérin, menace d'accouchement prématuré, nécessitant un traitement (à discuter au cas par cas).

**Dès 2005:
recommandations du
CNGOF...**

...alternative: génotypage

Coût de la prévention

L'administration systématique à 28 SA d'immunoglobulines aux femmes RhD négatif représente un surcoût important par rapport à l'administration uniquement sur signes d'appel. Ce surcoût se justifie par les allo-immunisations évitées et par la diminution attendue des formes graves. Il pourrait être en partie compensé par l'utilisation du génotypage RhD fœtal sur sang maternel; en effet, environ un tiers des femmes RhD négatif étant enceintes d'enfants eux-mêmes RhD négatif, le nombre d'injections d'immunoglobulines pourrait être diminué d'autant.

Le coût global d'un tel protocole dépendrait du coût du génotypage, qui n'est pas encore fixé⁷actuellement (voir perspectives). Indépendamment de l'aspect économique, la généralisation du génotypage fœtal permettrait d'éviter un grand nombre d'administrations de produits dérivés du sang.

COLLEGE NATIONAL DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS

PRÉVENTION DE L'ALLO-IMMUNISATION RHÉSUS-D FŒTO-MATERNELLE

RECOMMANDATIONS POUR LA PRATIQUE CLINIQUE

(Texte court)

CNGOF

2005

Détermination prénatale du génotype *RHD* fœtal à partir du sang maternel – Rapport d'évaluation

1) chez les mères déjà immunisées, d'identifier les grossesses devant faire l'objet d'un suivi spécifique spécialisé lourd si le fœtus est RH:1 (D positif) en raison du risque d'anémie fœtale. Dans le cas contraire : fœtus RH:-1 (D négatif), la grossesse suit le protocole de surveillance habituel ;

Ainsi, dans le cas de mère de phénotype RH:-1 (D négative) et de père de phénotype RH:1 (rhésus D positif), la connaissance du génotype *RHD* (rhésus D) du fœtus permettrait :

1) chez les mères déjà immunisées, d'identifier les grossesses devant faire l'objet d'un suivi spécifique spécialisé lourd si le fœtus est RH:1 (D positif) en raison du risque d'anémie fœtale. Dans le cas contraire : fœtus RH:-1 (D négatif), la grossesse suit le protocole de surveillance habituel ;

2) chez les mères non immunisées, d'identifier les grossesses devant faire l'objet d'une prophylaxie, si le fœtus est RH:1 (D positif) par immunoglobulines anti-RH1 (anti-D), produits dérivés du sang dont la disponibilité est limitée et dont les risques de transmission d'agents infectieux transmissibles par le sang bien que très rares ne peuvent être exclus.

2) chez les mères non immunisées, d'identifier les grossesses devant faire l'objet d'une prophylaxie, si le fœtus est RH:1 (D positif) par immunoglobulines anti-RH1 (anti-D), produits dérivés du sang dont la disponibilité est limitée et dont les risques de transmission d'agents infectieux transmissibles par le sang bien que très rares ne peuvent être exclus.

Avis favorable



Ce qu'il faut retenir ou le génotypage en 6 questions...

- 1-En quoi **consiste** le génotypage *RHD* foetal sur sang maternel?
- 2-Quelles sont les **indications et les résultats obtenus**?
- 3-Pourquoi est-ce une technique **fiable**?
- 4-A partir de quel **terme** ?
- 5-**Documents** à joindre à la demande?
- 6-**Coût** et remboursement?

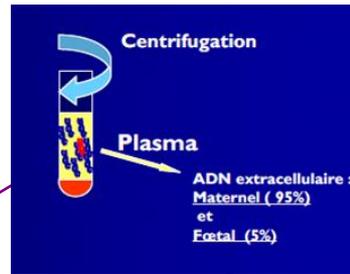
Génotypage RHD fœtal:

Indications à travers 2 situations cliniques

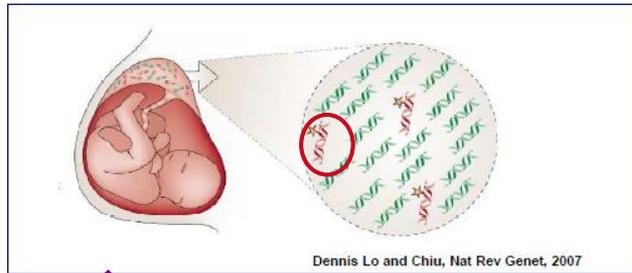
- Cas n°1:** madame Marie B. 35 ans, G3P3 vient consulter à **11 SA**. Elle vous apprend qu'à la fin de sa précédente grossesse, elle a développé une **allo-immunisation anti érythrocytaire anti-RH1 (D)**. Son mari est **Rhésus positif (RH:1)**. Vous lui proposez d'effectuer un **génotypage RHD fœtal sur plasma maternel afin d'évaluer le risque d'incompatibilité fœto-maternelle** chez cette patiente et guider la **surveillance de sa grossesse actuelle**

- Cas n°2:** madame Colette M. 27 ans de phénotype érythrocytaire **D négatif (RH:-1) non allo-immunisée**, G1P1 vient consulter à **24 SA**. Vous lui parlez de la **prévention par immunoglobulines anti-D** recommandée à 28 SA par le CNGOF. Vous lui proposez d'effectuer un **génotypage RHD fœtal sur plasma maternel** pour évaluer **l'intérêt de cette prophylaxie** chez cette patiente

Aspects techniques: éléments de fiabilité du test...

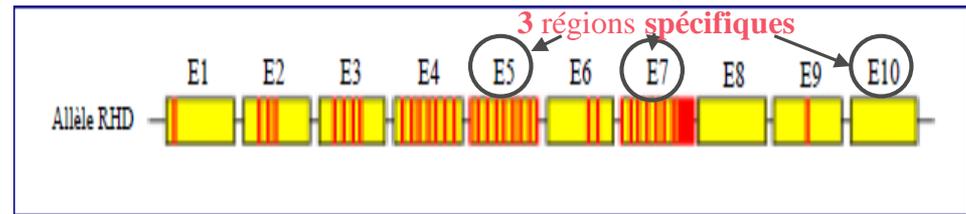


SENSIBLE: faible quantité d'ADN fœtal



Seuil de sensibilité de la méthode

SPECIFIQUE: détection du gène *RHD* fœtal



Gène *RHD*: 10 parties codantes (Exons: E)

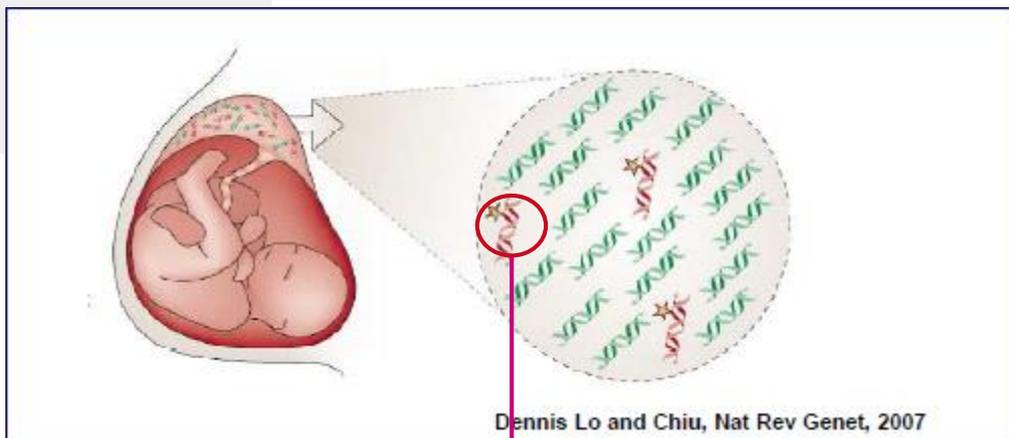
3 niveaux de spécificité

Méthode utilisée au laboratoire: trousse commerciale CE IVD

Génotypage RHD fœtal, 3 niveaux de SPECIFICITE

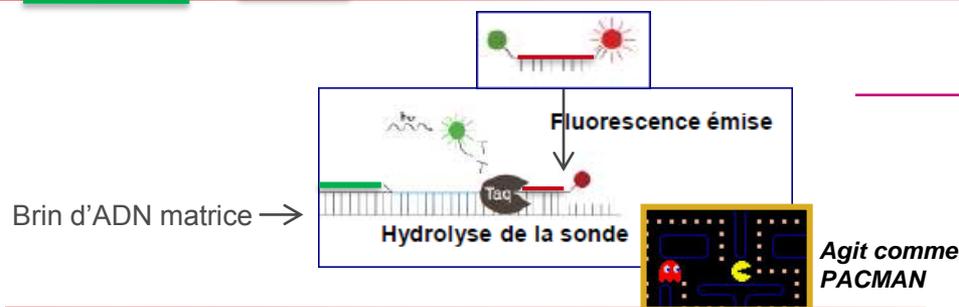


détecter spécifiquement le gène *RHD*

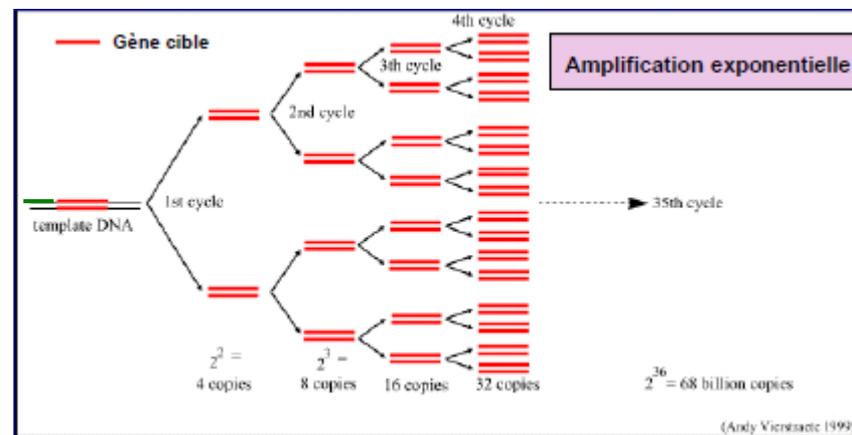


Pour **détecter**: on part d'une faible quantité d'ADN fœtal que l'on va amplifier (« photocopier »)

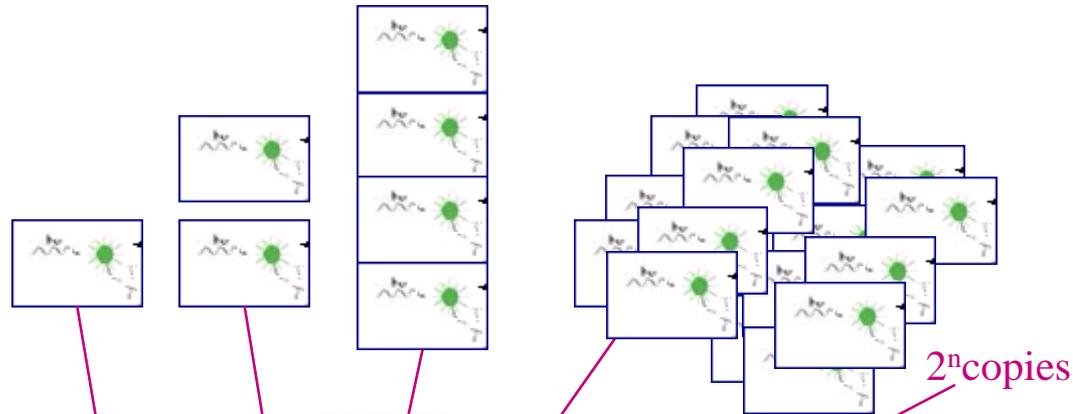
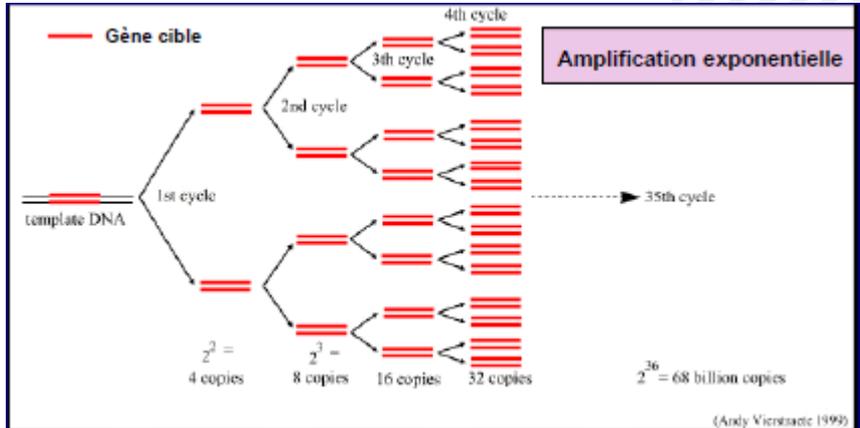
Amorces et sondes SPECIFIQUES du gène *RHD*



Courbe d'amplification = mesure de la fluorescence émise si...

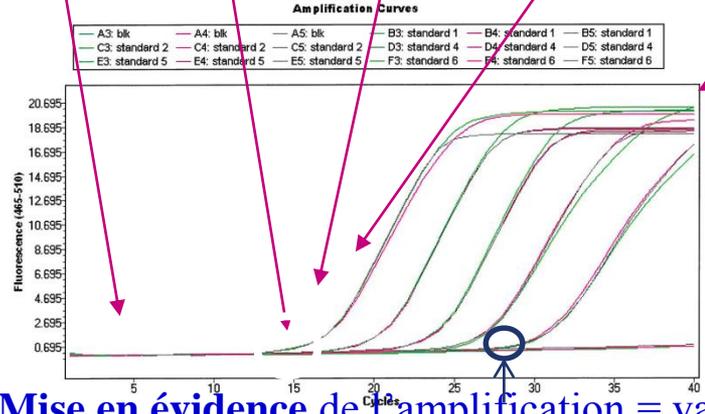


**Génotypage RHD fœtal,
3 niveaux de SPECIFICITE**



Mesure de la fluorescence émise

Mise en évidence d'une courbe d'amplification si quantité suffisante de fluorescence émise

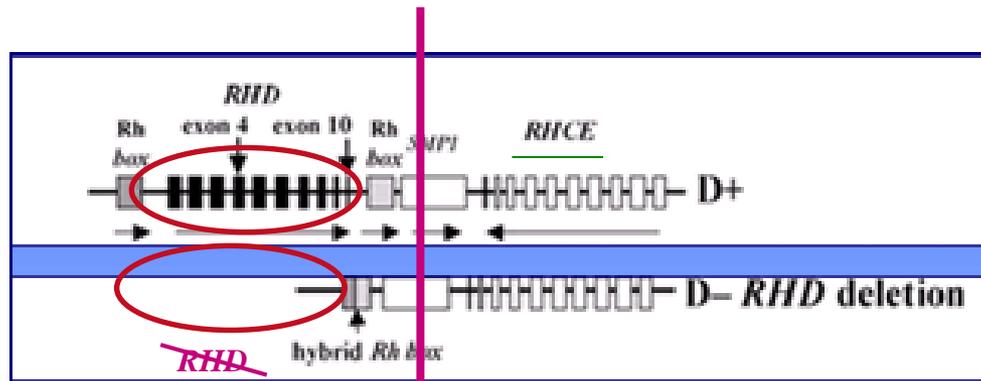


On amplifie (photocopie 2ⁿ fois) les régions spécifiques du gène RHD

Mise en évidence de l'amplification = valeur du signal seuil SPECIFIQUEMENT fœtal



Particularités du gène *RHD*...



Présence gène *RHD*
D positif

Absence gène *RHD*
D négatif

Gène *RHD*
(code pour *D*)

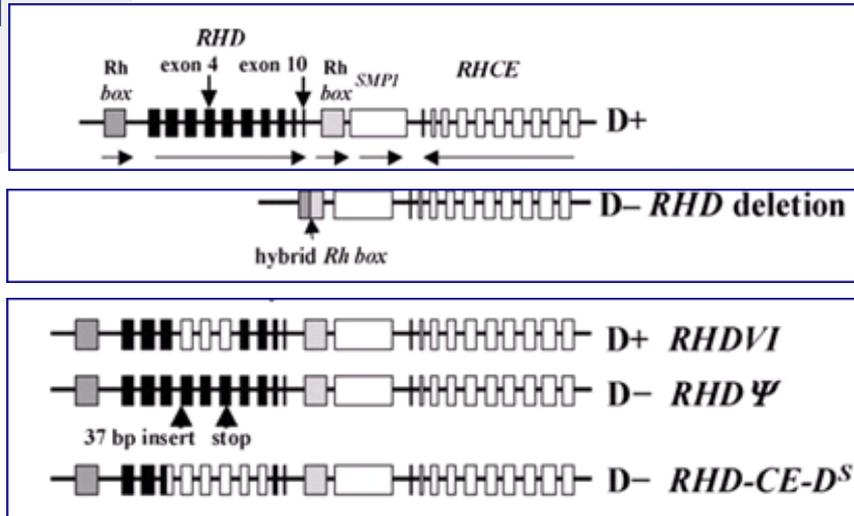
Gène *RHCE*
(code pour *CcEe*)

En théorie, toute personne
« D négatif » (RH:-1) est
dépourvue du gène *RHD*

...D'OÙ REPNSES POSSIBLES



Du gène RHD...

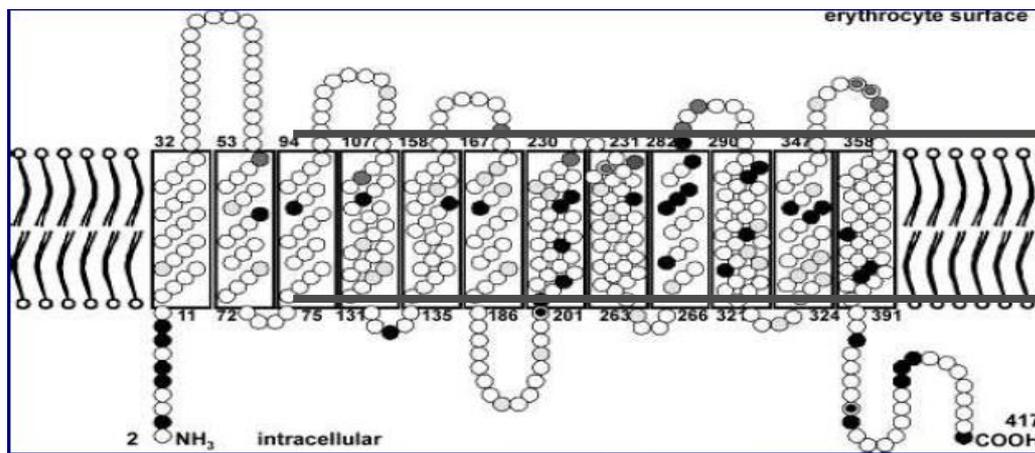


gène RHD présent: amplification homogène
résultat **POSITIF**

gène RHD absent: pas d'amplification
résultat **NEGATIF**

gène RHD présent mais muté
(VARIANT) amplification non homogène
Résultat **ININTERPRÉTABLE**

....A l'expression antigénique du « D » (RH1)



-on ne peut pas toujours rendre un résultat: existence de variants du gène
-certains sont dit « silencieux »:
« Phénotype attendu chez le nouveau-né »

Exemple de résultat...



le groupe du bébé au minimum sur sang de cordon peut toujours être effectué à la naissance

Résultat

**Interprétation +
Prestation de conseil**

EFS ÉTABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG - RHÔNE-ALPES
EFS Rhône-Alpes - Site du Groupement Hospitalier Est
Laboratoire d'Immuno-Hématologie n°69-190
28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Cedex
Biologistes : Pascaline BRICCA - Emmanuelle GUINCHARD
Tél : 04 72 36 70 11
Fax : 04 78 53 54 00
Tél interne HCL : 36 70 11

Compte rendu d'analyses biologiques de :
Patient : 7006744722
CQE13P1LYONGHE Genotypage Rhd Foetal
DDN : (I)
Demande : 1013040430
Votre référence : 13-0101
Dossier enregistré le 23/01/13 09:45 terminé le 25/01/13
Prélèvement de sang du cordon le 10/01/13 à 11:25
Lyon, le 25/01/13

Genotypage RHD foetal sur plasma maternel
Technique : Amplification par PCR temps réel des exons 4, 8 et 10 du gène RHD

Résultat : positif

COMMENTAIRE :
Présence d'une amplification des 3 régions analysées du gène RHD.
Phénotype foetal attendu : RH1 PJSITF (RH:1).

Pour un suivi optimal du dossier, merci de nous renvoyer à la naissance la fiche de suivi de grossesse (ci-jointe) pour nous communiquer le statut RH1 du nouveau-né.
FIN DU COMPTE RENDU

Dr Emmanuelle GUINCHARD

Les informations contenues dans ces documents sont confidentielles et soumises au secret professionnel. Merci de nous contacter si vous n'en êtes pas le destinataire.
Toute reproduction partielle de ce document est interdite.

1/1

EFS ÉTABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG
INFORMATION OBLIGATOIRE POUR L'EFS
(Tel. : 04.72.35.70.11)

IDENTIFICATION DE LA PATIENTE (ou étiquette)
Nom
Nom de jeune fille
Prénom
Date de naissance

IDENTIFICATION DU NOUVEAU-NE (ou étiquette)
Nom
Prénom
Date de naissance
Sexe : M F

« Rhésus D » du nouveau-né (ou « Rh », « RH1») : Pos Neg

Renvoyer par Fax : 04.78.53.54.00

Suite au génotypage RHD foetal réalisé en anténatal
MÉRCI D'AVANCE !

Dr Emmanuelle GUINCHARD

**Fiche de suivi
de grossesse**

Résultat adressé au prescripteur+ copie LBM



...Résultats des tests

-Cas n°1 (**patiente allo-immunisée**): Le résultat de Madame Marie B. vous revient **POSITIF**

Conclusion et attitude: **incompatibilité fœto-maternelle, risque de développement maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né**

-Cas n°2 (**patiente D négatif non allo-immunisée**): Le résultat de Madame Colette M. vous revient **NEGATIF** (confirmé sur un second prélèvement)

Conclusion et attitude: **pas de risque d'allo-immunisation anti-RH1 (D), pas de prophylaxie**

Historique, suite

13 juillet 2017: mise à la nomenclature NABM



Table Nationale de codage de Biologie

Fiche

Code acte : 4085

Désignation : DPN : DÉTERMINATION PRÉNATALE DU GÉNOTYPE RHD F₂TAL À PARTIR DU SANG MATERNEL

Détermination prénatale du génotype RHD f₂tal à partir du sang maternel Par PCR en temps réel utilisant au moins deux exons. L'acte 4085 sera réalisé à partir de la onzième semaine d'aménorrhée. Les renseignements cliniques nécessaires sont les suivants : - date des dernières règles ou date de la grossesse ; - groupe sanguin ABO RH1(D) de la femme enceinte ; - origine géographique de la patiente si possible ; - notion d'allo-immunisation anti-RH1(D) connue ou non. Lorsque le résultat de l'acte 4085 est négatif ou indéterminé, il est nécessaire de réaliser 15 jours après (ou avant ce délai de 15 jours en cas de grossesse de terme avancé), une seconde détermination, soit l'acte 4086. Il ne peut être coté qu'un acte 4085 par patiente et par grossesse. L'indication des examens 4085 et 4086 est la suivante : prise en charge des grossesses de femmes de phénotype RH:-1 (D négatif). Les comptes- rendus des examens 4085 et 4086 devront préciser les différents exons amplifiés pour réaliser les examens.

Table Nationale de codage de Biologie

Recherche par chapitre

Attention : les chapitres peuvent contenir des codes supprimés datant de moins de trois ans.

- ARBORESCENCE NABM
- DIAGNOSTIC PRENATAL
 - ACTE DE GENETIQUE MOLECULAIRE REALISEE SUR L'ADN FOETAL CIRCULANT DANS LE SANG MATERNEL
 - 4085 - DPN : DÉTERMINATION PRÉNATALE DU GÉNOTYPE RHD F₂TAL À PARTIR DU SANG MATERNEL
 - 4084 - DETERMINATION PRÉNATALE DU SEXE FOETAL SANG MATERNEL
 - 4086 - DPN:SECONDE DÉTERMINATION PRÉNAT. DU GÉNOTYPE RHD F₂TAL À PARTIR DU SANG MATE
 - 4087 - DPNI-TRI21-DEPISTAGE TRI21 F₂TALE PAR ANALYSE DE L'ADN LIBRE CIRCULANT DANS LE
 - 4088 - DPNI-TRI21-SECONDE DEPISTAGE TRI21 F₂TALE PAR ANALYSE DE L'ADN LIBRE CIRCULANT
 - 8000 - HEMOCHROMATOSE : RECHERCHE DE LA MUTATION C.282Y DU GENE HFE1

Table Nationale de codage de Biologie

Fiche

Code acte : 4086

Désignation : DPN:SECONDE DÉTERMINATION PRÉNAT. DU GÉNOTYPE RHD F₂TAL À PARTIR DU SANG MATERN

Seconde détermination prénatale du génotype RHD f₂tal à partir du sang maternel Il ne peut être coté qu'un acte 4086 par patiente et par grossesse. L'indication des examens 4085 et 4086 est la suivante : prise en charge des grossesses de femmes de phénotype RH:-1 (D négatif). Les comptes-rendus des examens 4085 et 4086 devront préciser les différents exons amplifiés pour réaliser les examens.

Historique, suite et fin

Décembre 2017: mise à jour des recommandations CNGOF



Prévention de l'allo-immunisation Rhésus D chez les patientes de groupe Rhésus D négatif

Mise à jour de décembre 2017 des RPC du CNGOF de 2005

1. Mesures générales au cours de la grossesse

- Une double détermination de groupe sanguin RhD et une recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) doivent être obtenues dès le premier trimestre de la grossesse chez toutes les femmes.
- Si la femme est RhD négatif :
 - une information doit être délivrée sur l'immunisation anti-RhD : dépistage, suivi, prévention. À cette occasion, le groupe RhD du conjoint est à documenter ;
 - si le conjoint est de groupe Rhésus D positif ou inconnu, un génotypage RhD fœtal sur sang maternel est réalisé **à partir de 11 SA**, que la grossesse soit monofœtale ou multiple.

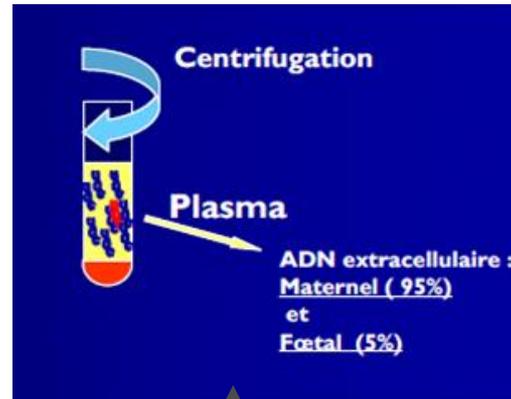
2. Conduite à tenir en cours de grossesse en fonction des résultats du génotypage

- **Si le fœtus a un génotype RhD positif**, la grossesse est incompatible dans le système RhD et donc la femme à risque d'allo-immunisation. L'immunoprophylaxie Rhésus devra être réalisée par injection d'IgRh (prophylaxie ciblée en cas d'événement à risque et systématique à 28 SA).
- **Si le fœtus a un génotype RhD négatif** sur un premier prélèvement, un contrôle devra être effectué sur un second prélèvement réalisé après 15 SA et avec au moins 15 jours de délai par rapport au premier prélèvement. Si le fœtus est confirmé RhD négatif sur le second prélèvement, la prévention de l'allo-immunisation Rhésus en cours de grossesse n'est pas utile.
- **Si le génotype fœtal RhD ne peut être déterminé** sur deux prélèvements, le fœtus devra être considéré comme RhD positif, et la grossesse en situation d'incompatibilité donc à risque d'immunisation. L'immunoprophylaxie Rhésus devra être réalisée par injection d'IgRh ciblée en cas d'événement à risque et systématique à 28 SA.

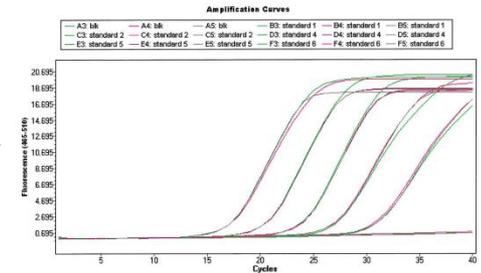
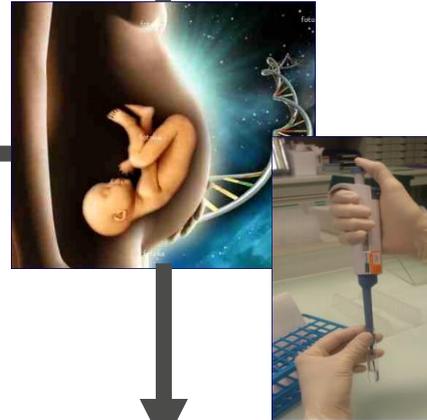
Génotypage RHD fœtal au GHE: en pratique

- ➔ **Remboursé par la sécurité sociale depuis le 13 juillet 2017**
- ❖ Coût du test B260 (70 euros environ)
- ➔ **Réalisable à partir de 11SA**
- ❖ Tout résultat négatif est contrôlé 15 jours après minimum et après 17 SA
- ➔ **Toute demande doit comporter :**
 - ❖ -1 seule fiche de prescription =consentement éclairé + ordonnance complétée et signée!
 - ❖ - une copie de la carte de groupe sanguin de la patiente
 - ❖ -2 tubes EDTA de 5 ml + 1 tube sec de 5 ml avec gel séparateur (le tube sec doit être centrifugé par le laboratoire préleveur 30 minutes après prélèvement, après coagulation complète, 10 minutes à 3000g),
 - ❖ tous identifiés avec noms de naissance et d'usage, prénom, date de naissance ! A adresser par votre EFS de proximité, pour réception dans les 5 jours à température non dirigée,
- ➔ **Délai de rendu des résultats: 7à 10 jours en moyenne, contrôle à la naissance préconisé dans tous les cas**
- ➔ **Le laboratoire:** contraintes règlementaires (2018), adaptation à la demande, maintien d'accréditation

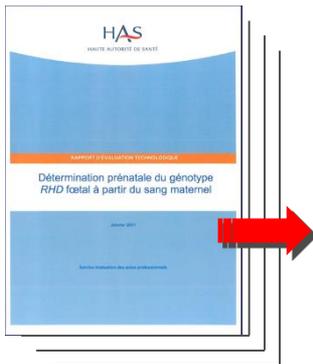
En conclusion...



Trousse commerciale CE IVD



Méthode SENSIBLE
et SPECIFIQUE



III. CONCLUSION

La détermination prénatale du génotype foetal *RHD* à partir du sang maternel présente un intérêt en pratique clinique dans les deux indications suivantes :

- la prise en charge des grossesses de femmes RH:-1 (D négatif), dans le cadre de l'immunoprophylaxie, pour cibler les populations devant bénéficier d'immunoglobulines anti-RH1 ;
- en cas d'immunisation, la sélection des femmes RH:-1 (D négatif) devant bénéficier d'un suivi spécialisé et lourd.



Merci de votre attention

des questions?