



Etablissement Français du Sang

LE LIEN ENTRE LA GÉNÉROSITÉ DES DONNEURS DE SANG ET LES BESOINS DES MALADES



GENOTYPAGE *RHD* FOËTAL NON INVASIF SUR SANG MATERNEL

INDICATIONS ET RETOUR D'EXPERIENCE

Dr Emmanuelle GUINCHARD, EFS Rhône Alpes, Lyon, site du Groupement Hospitalier Est

<http://lbm.efs-rhonealpes.dondusang.net>

HISTORIQUE

- 1991, polymorphisme génétique du gène *RHD* : génotypage *RHD* foetal par amniocentèse
- 1998, Denis Lo, présence d'ADN libre foetal sur plasma maternel, nombreuses applications
génotypage *RHD* foetal **non invasif** sur sang maternel

I-INDICATIONS

Cas n°1

Madame Marie B. 35 ans, G3P3 vient consulter à 16 SA. Elle vous apprend qu'au cours de sa précédente grossesse, elle s'est immunisée contre l'antigène érythrocytaire D (RH1). Son mari est B Rhésus positif (RH:1).

Vous lui proposez d'effectuer un génotypage *RHD* foetal sur plasma maternel.

Vous faites la prescription: que devez vous joindre à l'ordonnance?

Fiche de consentement éclairé: comment l'obtenir? sur le site <http://lbm.efs-rhonealpes.dondusang.net>

Elle vous pose plusieurs questions:

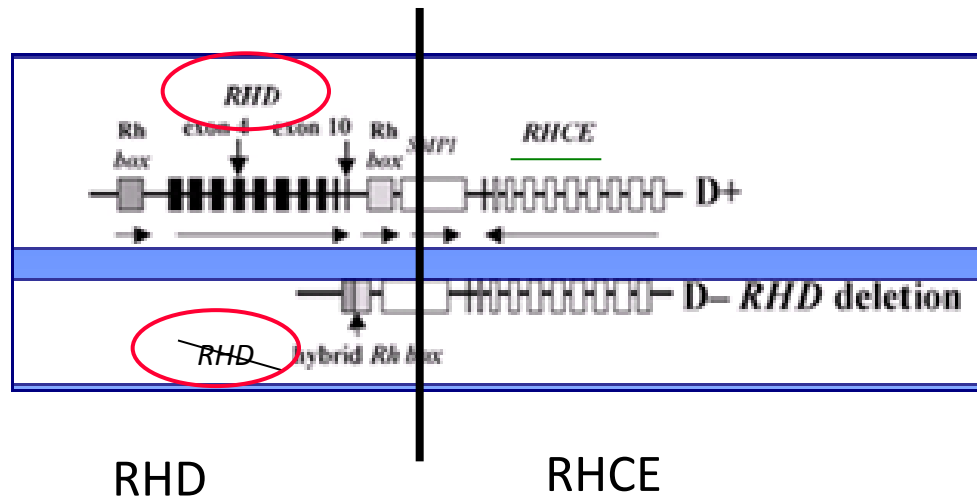
- Quel est cet examen?**
- Quel est l'intérêt de le réaliser?***
- Comment est réalisé le prélèvement?***
- Est-ce un test fiable?***



-Quel est cet examen?

-BUT: « Mettre en évidence un gène en théorie absent chez la mère »

-particularités du gène RHD:



D positif

D négatif



Quel est l'intérêt de réaliser ce test?

Haute Autorité de Santé / Service évaluation des actes professionnels / janvier 2011

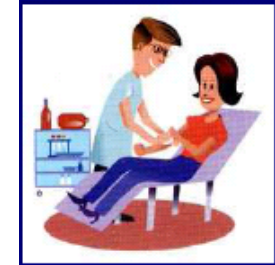
Génotypage *RHD* fœtal: 1ère indication

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.

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 ;

Comment est réalisé le prélèvement?



- réalisé à partir de **12 SA**
- sur simple prélèvement veineux périphérique de la mère
- nécessite 2 tubes EDTA
- à transmettre pour réception dans les 5 jours à température ambiante au laboratoire EFS RA site de LYON GHE
- demande d'examen = ordonnance + formulaire de prescription

Prescription du Génotypage *RHD* fœtal: consentement éclairé, mode d'emploi



ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG – RHONE-ALPES

FORMULAIRE DE PRESCRIPTION POUR GENOTYPAGE RH1 FŒTAL SUR PLASMA MATERNEL

LABORATOIRE DESTINATAIRE

EFS Rhône –Alpes, site du GHE, Laboratoire de biologie moléculaire
28 rue Doyen Leprieux 69677 BRON Cedex
Tél : 04 72 35 70 11 (Interne : 35 70 11)/Fax : 04 78 53 54 00

MEDECIN PRESCRIPTEUR (à remplir par le prescripteur ou par apposition du cachet)

Nom, prénom N° téléphone
Adresse N° fax
ou service hospitalier N° d'identification :
Date de prescription : / /

IDENTIFICATION DE LA PATIENTE (à remplir par le prescripteur)

Nom Nom de jeune fille
Prénom Date de naissance
Origine géographique : patiente procréateur

CONTEXTE DE LA PRESCRIPTION (à remplir par le prescripteur)

Terme de la grossesse : ou DDR :
Patiente allo-immunisée anti-D (RH1) oui non
Amniocentèse ou autre geste invasif prévu Si oui, date :
Autres renseignements grossesse gémellaire ATCD greffe.....
Lieu prévu pour l'accouchement.....

ATTESTATION MEDICALE (à remplir et signer par le prescripteur)

Je soussigné Dr. déclare avoir informé la patiente de l'intérêt de déterminer le génotypage RHD fœtal sur plasma maternel par prélèvement veineux périphérique.
Afin de mettre en évidence une situation d'incompatibilité fœto-maternelle pour la grossesse en cours chez une patiente allo-immunisée anti-D (RH1)
Pour déterminer s'il y a lieu de recourir à une immunoprophylaxie Rh anténatale, la patiente étant Rh négatif (RH :-1) non immunisée
Date : Signature du prescripteur :

CONSENTEMENT ECLAIRE (à remplir et signer par la patiente)

Je soussignée Mme, Mlle
*accepte
- que l'examen proposé soit fait à partir de l'ADN du fœtus, dans un laboratoire autorisé conformément au décret 2006-1661 du 22 décembre 2006 relatif au diagnostic prénatal ;
- qu'une partie du prélèvement soit conservée un an en sérothèque au laboratoire uniquement pour contrôle éventuel de l'examen
*déclare avoir compris :
- que la réalisation de l'examen peut nécessiter un second prélèvement de sang.
- que le résultat me sera communiqué uniquement par le médecin prescripteur identifié ci-dessus
*déclare avoir été informée par mon médecin de l'intérêt de l'examen
*déclare accepter que le coût unitaire de l'examen s'élevant à 81 euros (BHN300) soit à ma charge.
Date : Signature de la patiente :

RAPPEL DES CONDITIONS DE PRELEVEMENT :

Le prélèvement est réalisé sur 2 tubes EDTA de 5 ml, identifiés avec nom patronymique et marital, prénom et date de naissance, envoyés à l'EFS pour réception dans les 5 jours à température ambiante avec ce formulaire, une demande d'examen et une copie de la carte de groupe sanguin de la patiente. Résultats rendus habituellement dans les 15 jours.

Qui doit le remplir?

1

2

3

4

5

Prescripteur

Patiente



Document obligatoire: en son absence, l'examen ne peut pas être réalisé!!

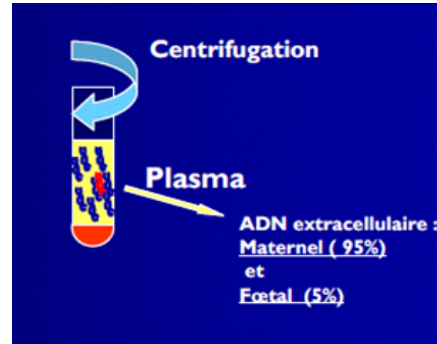
-Est-ce un test fiable?

- **LA TECHNIQUE: DOUBLE ENJEU**

Simple en apparence mais:

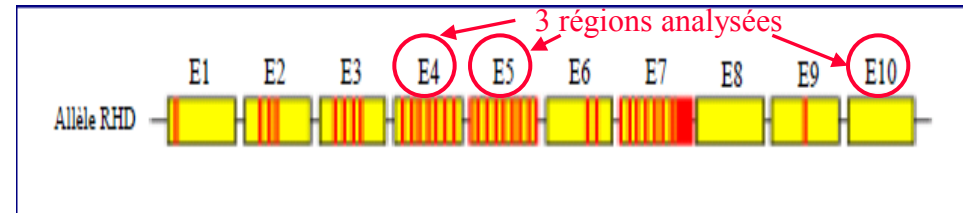
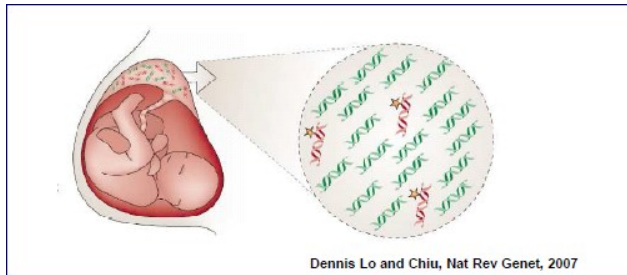
-Mise en évidence sur de petites quantités d'ADN

-Gène parfois présent chez une mère pourtant RH:-1 (D négatif)



petites quantités d'ADN: **test SENSIBLE**

détection du gène *RHD* fœtal : **test SPECIFIQUE**



ADN fœtal = 5% de l'ADN total

Structure du gène *RHD*

La méthode utilisée au laboratoire celle mise au point par J.M.Minon, (Liège, Belgique)

Haute Autorité de Santé / Service évaluation des actes professionnels / janvier 2011

HAUTE AUTORITE DE SANTE
RAPPORT D'EVALUATION TECHNOLOGIQUE
Détermination prénatale du génotype
RHD foetal à partir du sang maternel

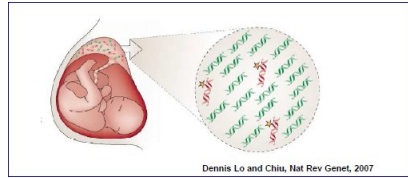
Etude des méthodes disponibles

Minon *et al.* (66) ont indiqué que la détermination du génotype était réalisée en routine depuis 2002 chez les femmes déjà immunisées et à risque d'allo-immunisation. Les modalités de réalisation étaient proches de celles décrites par l'équipe de Finning : PCR en temps réel avec amplification des exons 4, 5 et 10 et utilisation du gène SRY, et CCR5 comme témoins du bon déroulement de la procédure et de l'amplification de matériel foetal pour les foetus masculins.

Les résultats étaient établis si l'amplification concomitante des 3 exons était constatée. Deux cent dix-huit femmes ont été prélevées. La performance du test était de 100 %.

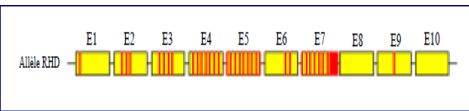
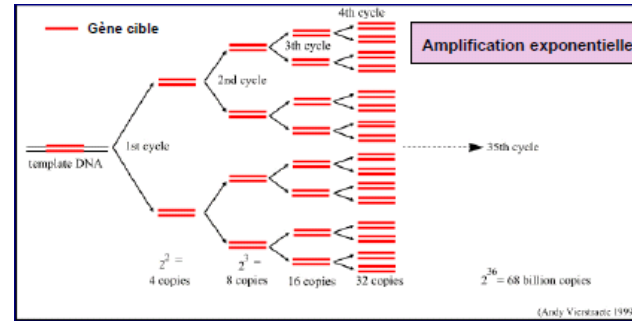
Dricot *et al.* (68), qui appartiennent à la même équipe que Minon, ont publié les résultats de leur série de patientes (il est difficile d'exclure la possibilité que ces

³⁶ le Rhésus D était considéré comme positif si 2 des 4 réplicats des exons 4, 5 et 10 étaient positifs et 3 réplicats additionnels d'un des exons atteignaient des valeurs seuils Ct < 42. Le rhésus était considéré comme négatif si au moins 11 des 12 réplicats n'étaient pas amplifiés et si le SRY était positif (2 sur 4 réplicats) ou le gène RASSF1A était positif (2 sur 3 réplicats).



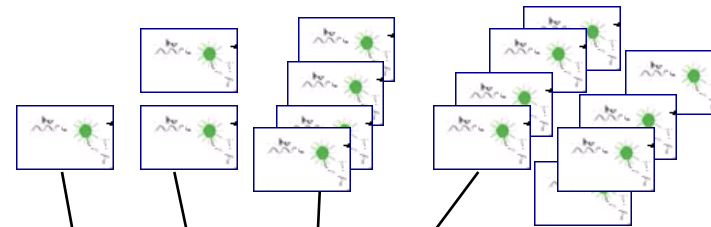
AMPLIFIER L'ADN: PCR quantitative en temps réel

SENSIBILITE

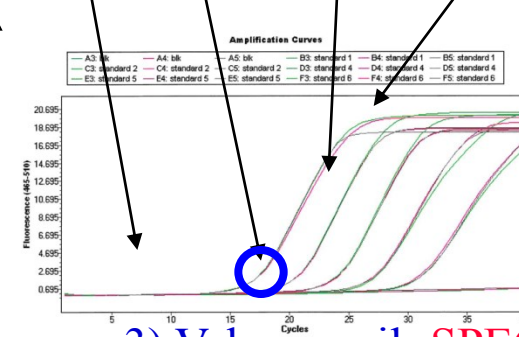


1) 3 régions analysées

SPECIFICITE:
3 niveaux de spécificité



Intensité de fluorescence



3) Valeur seuil = **SPECIFICITE**

Nombre de cycles d'amplification

Exemple de résultat



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 : 35 70 11

Compte rendu d'analyses biologiques de :

Patient 7008744722
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 reçu le 10/01/13 à 11:25

Lyon, le 25/01/13

Génotypage 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 de 3 régions analysées du gène RHD.
Phénotype foetal attendu : RH1 POSITIF (RH1).

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'êtes pas le destinataire.
Toute reproduction partielle de ce document est interdite.

1/1

Résultat

Interprétation

EFS
ETABLISSEMENT 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

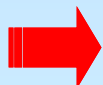
« Rhésus D » du nouveau-né (ou « Rh », « RH1») : Pos Neg

Renvoyer par Fax: 04.78.53.54.00

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

Dr Emmanuelle GUINCHARD

Fiche de suivi
de grossesse



Résultat adressé uniquement au prescripteur

Cas n°2

Madame Colette M. 27 ans de groupe O négatif (D-, RH:-1), G1P1 vient consulter à 22 SA.

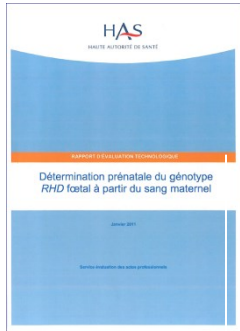
Vous lui parlez de la dose d'immunoglobulines anti-D recommandée à 28 SA par le CNGOF.

Vous lui proposez une alternative: effectuer un génotypage *RHD* fœtal sur plasma maternel.

Sa question est :

-Quel est l'intérêt de réaliser ce test?

Haute Autorité de Santé / Service évaluation des actes professionnels / janvier 2011

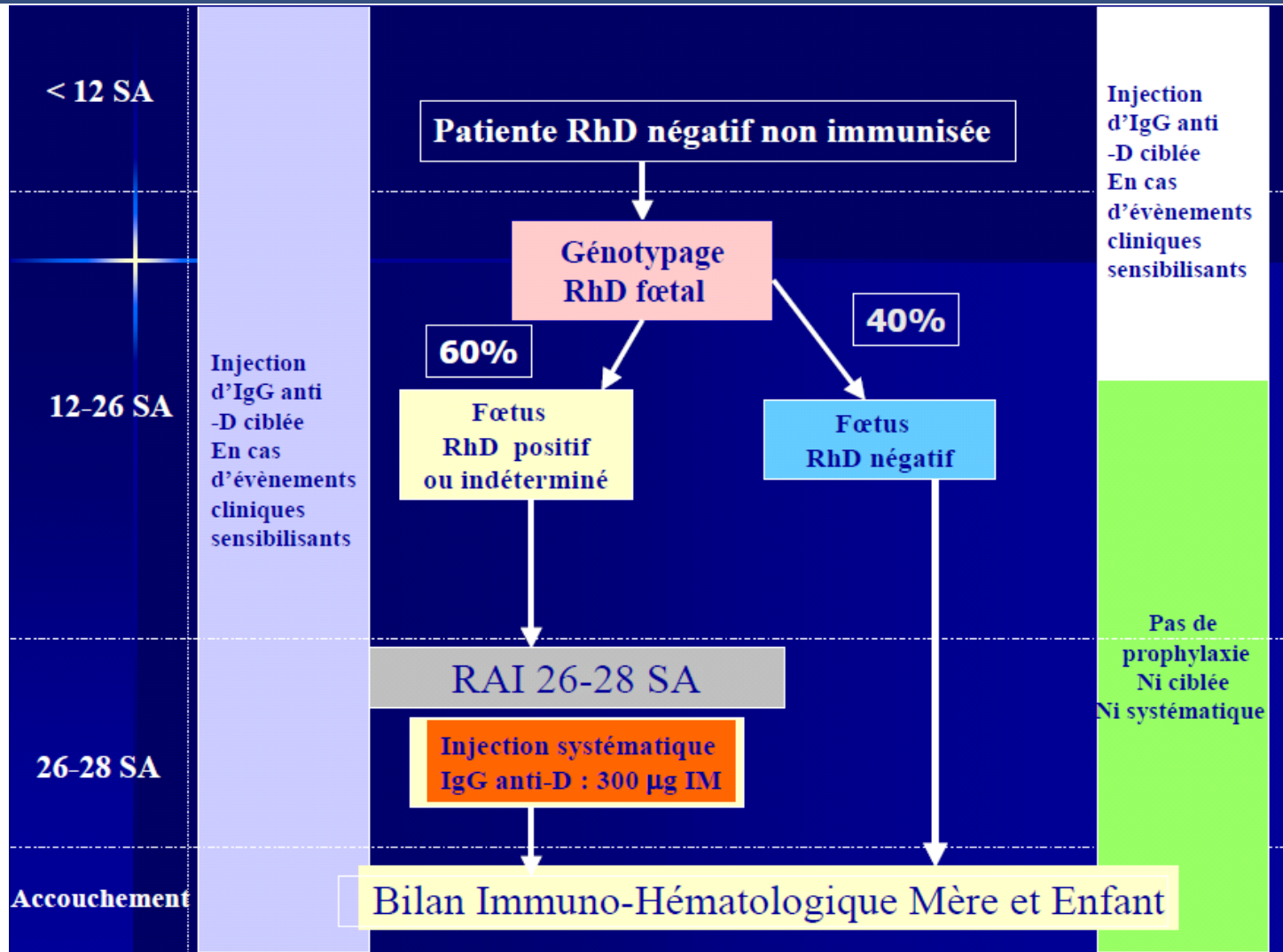


Génotypage *RHD* fœtal: 2ème indication

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.

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.



Cas n°2

**Le résultat de Madame Colette M. vous revient NEGATIF
(confirmé sur un second prélèvement)**

Quelle est votre attitude?

II-RETOUR D'EXPERIENCE

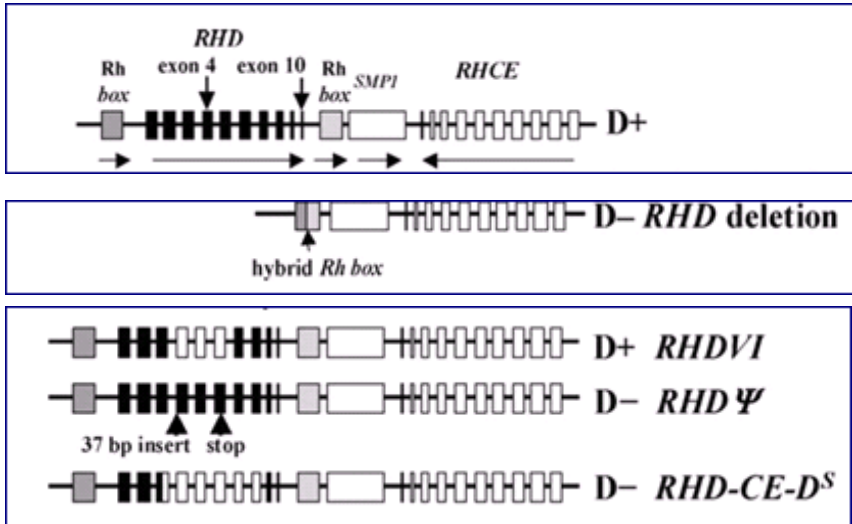
RETOUR D'EXPERIENCE (1)

- **LA TECHNIQUE: DOUBLE ENJEU**

Simple en apparence mais:

- Mise en évidence sur de petites quantités d'ADN
- Gène parfois présent chez une mère pourtant RH:-1 (D négatif)

Du gène RHD...

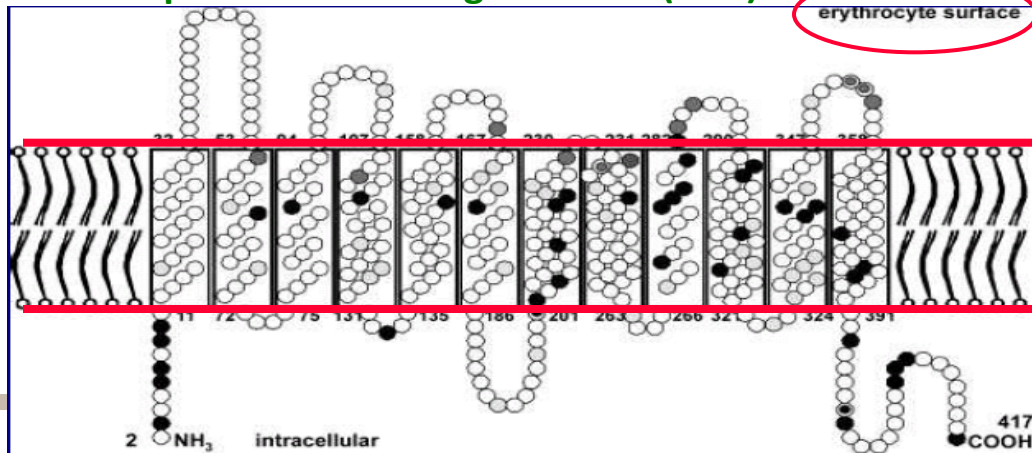


gène RHD présent:
Phénotype attendu: D POSITIF, RH:1

gène RHD absent (dit délété):
Phénotype attendu: D NEGATIF, RH:-1

gène RHD présent mais anormal
(dit variant):
Rendu « Ininterprétable »

...A l'expression de l'antigène « D » (RH1)



Membrane du globule rouge

Etudes de variants à l'EFS RA

EXON4	EXON5	EXON10	CARACTERISTICS	DENOMINATION
-	-	+	P	RH1 partial DVI type2
-	-	+	P	D variant type VI type?
-	-	+	P	African origin pseudo gene ψ or r's?
-	+	-	P	DHAR (*)
-	-	+	P immunogenicity+++	DVI type 3
-	-	+	P?	D partial III type4+ deletion exons 4 to 7
+	+	+	P	DNB(*)
+	+	+	F	D weak type10
+	+	+	F	D weak
+	+	+	F	D weak
+	+	+	F	Initially known as D- then D weak type 1
+	+	+	F	D weak type 5 without allo-immunisation
+	+	+	F	RH1 weak type11
+	+	+	F	D weak type?
+	+	+	F	D weak type?

« Known RHD gene variant forms tested by the method in 2010-2011 in EFS RA », OMIC's 2014, Baltimore

RETOUR D'EXPERIENCE (2)



ACTIVITE

- Examen en routine au laboratoire depuis octobre 2010
- Après obtention des autorisations+agréments
- S'inscrit dans une prise en charge globale de la femme enceinte à l'EFS RA
- Indication: femmes allo-immunisées majoritairement
- Fréquence des formes variantes: 10%
- 1 résultat non rendu pour non conformité en 2013: rare

RETOUR D'EXPERIENCE (3)

EXAMENS DE GENOTYPAGE *RHD* FOETAL

- Revue de contrat: respect du délai d'envoi, fiche de consentement remplie, renseignements cliniques, ***peu de non-conformités***
- Réalisation et interprétation du test: critères d'interprétation, ***cas des échantillons précoces***
- Prestation de conseil: selon l'indication, ***cas des résultats ininterprétables***
- Retour d'information (suivi de grossesse): ***DIFFICILE++++***



RETOUR D'EXPERIENCE (4)

- ACCREDITATION COFRAC DEPUIS 2013



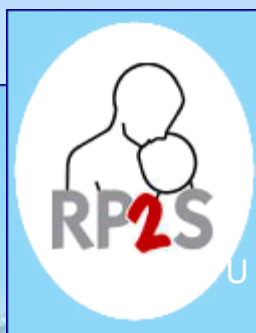
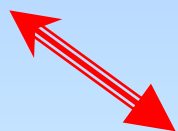
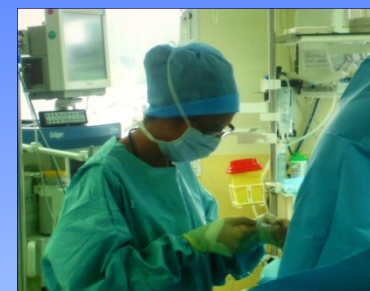
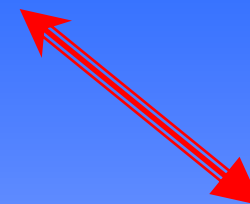
-Maîtrise de la qualité du laboratoire

- EEQ, Comparaisons interlaboratoires-France, Belgique
- Coopération étroite avec les cliniciens: Revues de dossiers (CPDPN)

-Publication: validation de méthode sur 200 échantillons

Transfusion Clinique et Biologique 21 (2014) 1–14

-Maintenance de l'EXPERTISE biologique et technique





MERCI DE VOTRE ATTENTION

DES QUESTIONS?

Dr Emmanuelle GUINCHARD

EFS Rhône Alpes, Lyon, site du Groupement Hospitalier Est

28 rue Doyen Lépine

69689 Bron Cedex

04 27 86 92 83

Emmanuelle.guinchard@efs.sante.fr