



# GENOTYPAGE RHD FOËTAL

## INTERPRETATION

**17 Novembre 2009**



# EXPERIENCE DU CNRHP

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

**2000 - 2004** : 1<sup>ers</sup> 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** (vélocité-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

*Traitement 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

117 SAT

48 ROT 43 RDB

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 Boujjida, sage femme maternité St Antoine*

# CONTEXTE (3)

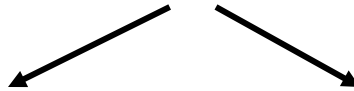
---

## 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*

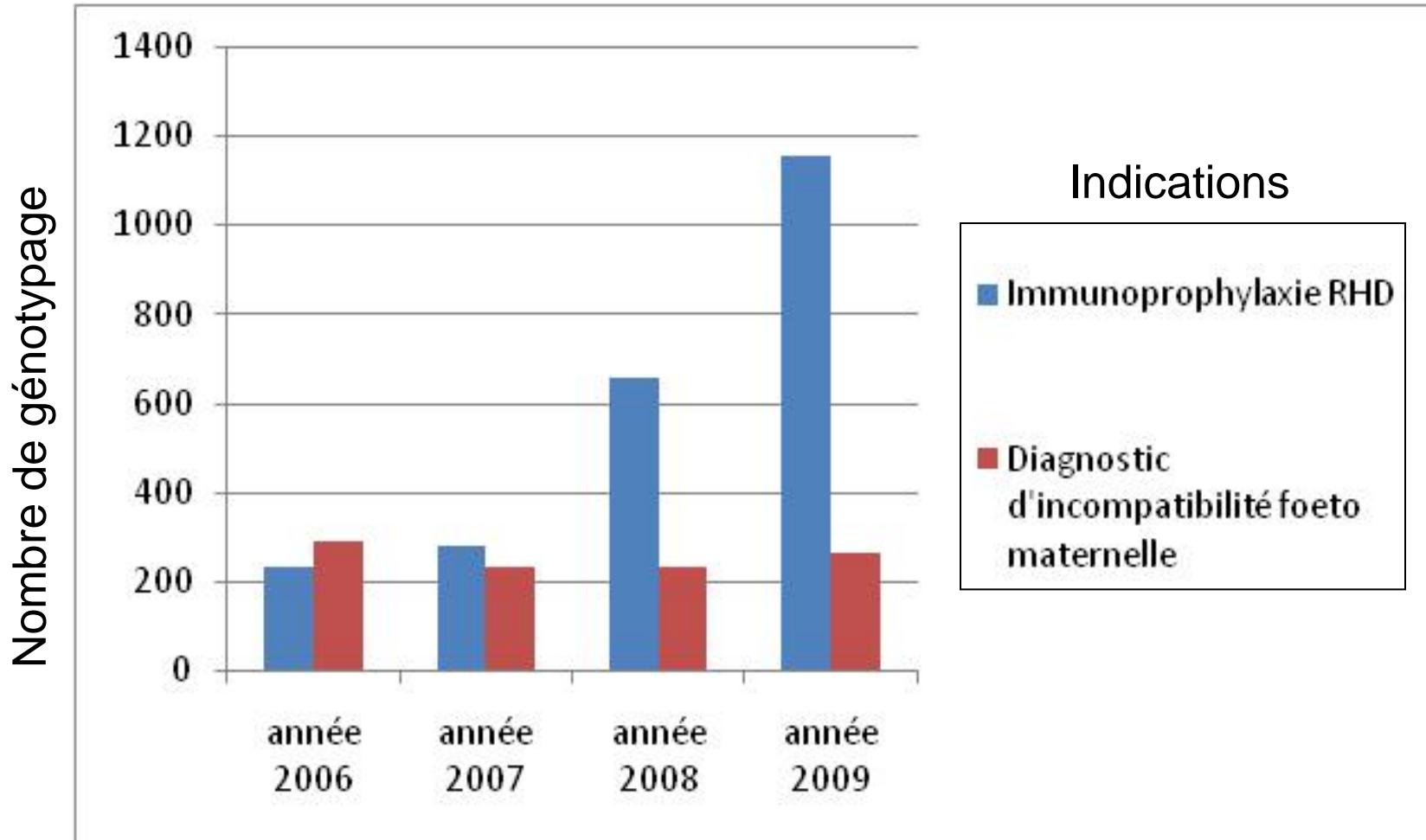
### TEST POSITIF

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 délété



- Applicable dans la population caucasienne : **gène RHD délété 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<sup>ère</sup> génération*

### MAIS

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

# 1er NIVEAU : GENOTYPAGE EXON 7 / EXON 10

1<sup>ère</sup> 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<sup>ème</sup> situation : mère [D-] avec un allèle *RHD* silencieux (Ct<<35)

Au CNRHP D silencieux (4%)

a) D silencieux non identifiable (24%)

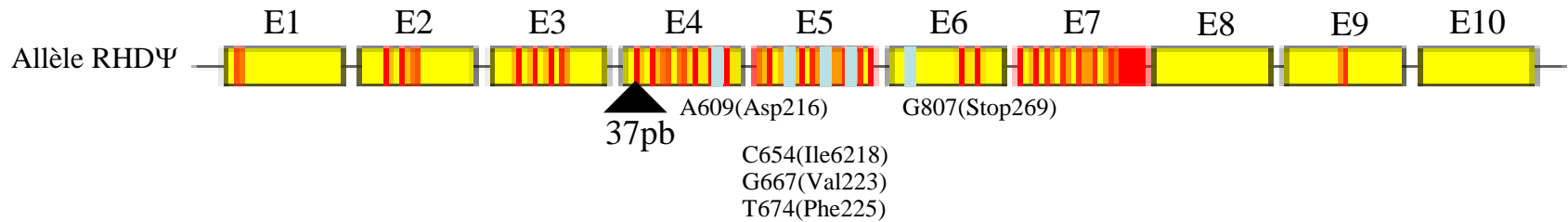
b) D silencieux DΨ (76%)

Rouillac-Le Sciellour et al

⇒ génotype *RHD* foetal ininterprétable

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

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



**gène *Dpsi* : gène *RHD* non exprimé**

**Fréquence : 1 % dans la population caucasienne**

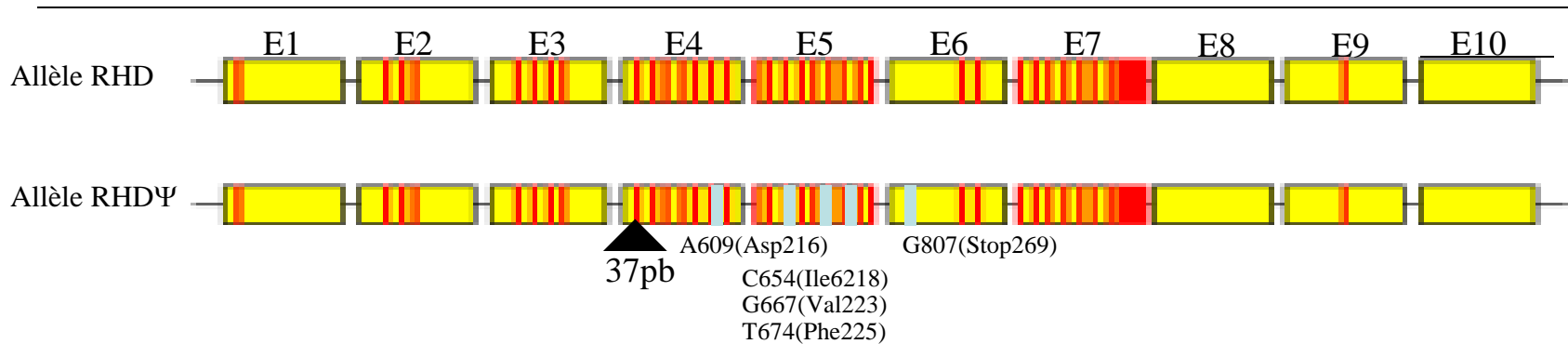
**60 % dans la population Africaine RH1 négatif**

- 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*

SFTS 2009 Nelly Da Silva  
Poster P094

# **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 ≤ 40,44      ⇒ positif**  
**+Signal Fluorescence > 1,5**

**Ct > 40,44      ⇒ négatif**

# INTERPRETATION (1)

## RESULTATS

## CONCLUSION

Exon7 }  
Exon10 } **Négatif** (Ct – ou Ct >40.44)  
Exon5 }

+

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 *DHAR*

# INTERPRETATION (2)

| RESULTATS  | CONCLUSION  |
|--|---|
| <p>Exon7<br/>Exon10<br/>Exon5</p> <p>} Positif (35&lt;Ct &lt;40.44)</p>  | <p><i>RHD</i><br/>positif</p>   |
| <p>Exon7<br/>Exon10</p> <p>} Positif (35&lt;Ct &lt;40.44)</p> <p>Exon5      Négatif (Ct – ou Ct &gt;40.44)</p> | <p>Refaire extraction<br/>et PCRs:</p> <p><i>RHD<math>\Psi</math></i><br/><i>ou</i><br/><i>D partiel: DIIa,</i><br/><i>DV, DVI, DAR,</i><br/><i>DFR</i><br/>ininterprétable (recours au niveau 3)</p> |

## INTERPRETATION (3)

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

## INTERPRETATION (4)

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

# 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



Fœtus D partiel (DV, DVI, DAR, DFR)

# **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

1-226 génotypages réalisés dans le cadre d'un diagnostic d'incompatibilité foeto-maternelle

## RESULTATS

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

15 Mères *Dpsi*

11 foetus *RHD* positif  
3 foetus *RHD* négatif  
1 foetus 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<sup>ème</sup> 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* } Identification des fœtus *Dpsi*  
EXON 6 *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'éluat ...

# LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

## FAUX NEGATIFS

---

### 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**