

Implementatie van foetale RhD- genotypering op maternel plasma

Amber Coussee

ApSO klinische biologie AZ Sint-Lucas Gent

Supervisoren: dr. Simon Degandt, dr. Henk Louagie

18/06/2024



Inleiding



Onderzoeksvragen



Conclusie

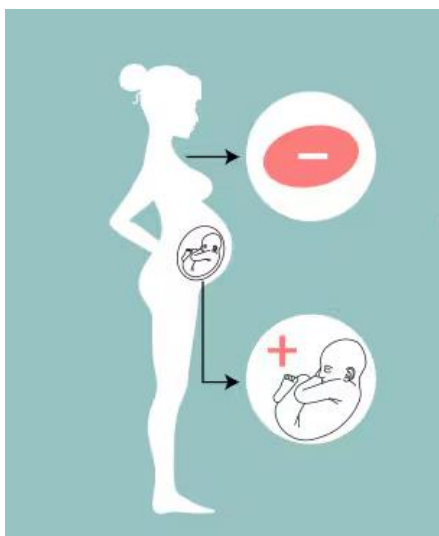


To do / actions

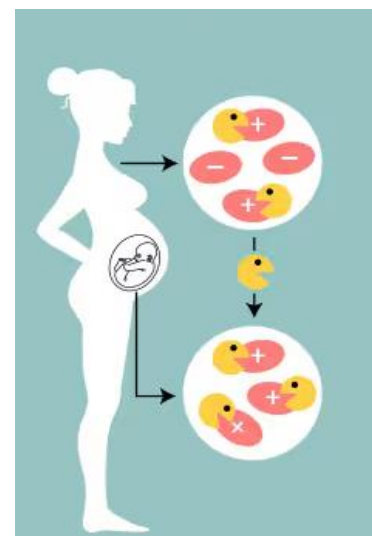


Inleiding

Rhesus D (RhD) bij zwangerschap



↓
Foetomaterneel bloedcontact:
RhD allo-immunisatie mogelijk



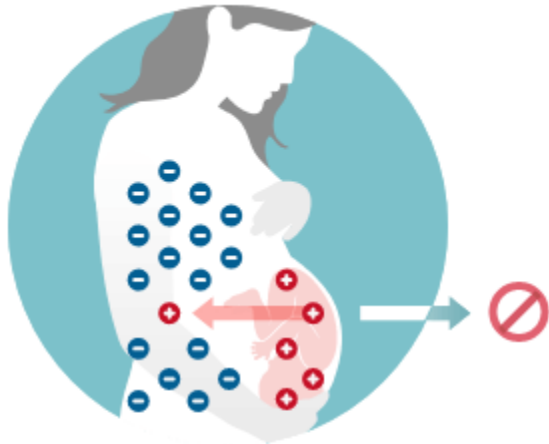
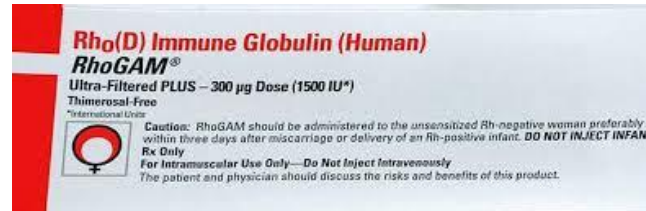
Mogelijk transplacentaire overdracht anti-RhD Ig's
bij volgende zwangerschap

→ risico op HDFN indien opnieuw RhD+ foetus

- Mild: anemie, hyperbilirubinemie
- Fataal: intra-uteriene / neonatale sterfte



Inleiding



RhoGAM prevents the Rh-negative expectant mother from making antibodies during pregnancy that could cause HDFN in future pregnancies



As long as the Rh-negative mother receives RhoGAM appropriately during every pregnancy, her babies are at very low risk of developing HDFN

Toedienen van RhoGAM (IM)

- 28e zwangerschapsweek (= RAADP)
- Mogelijk sensitiserende events
- < 72 uur postpartum indien serologisch RhD+ op navelstrengbloed aangetoond

MAAR: 40% RhD- zwangere vrouwen zijn zwanger van RhD- foetus

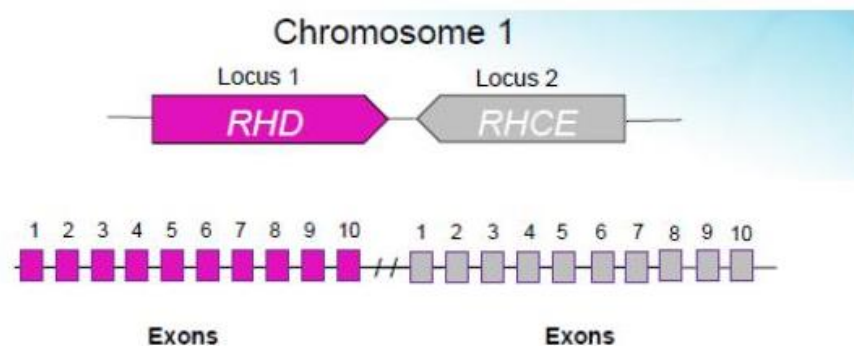
Onnodige toediening

Optimaler gebruik?



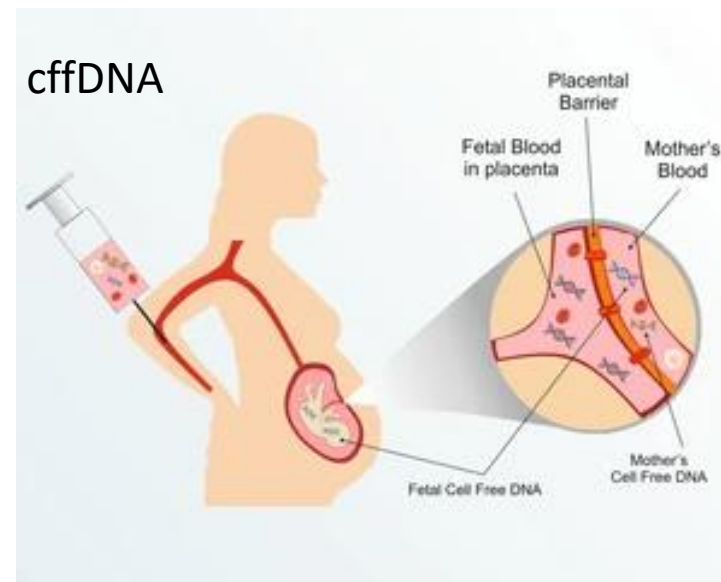
Inleiding

- Sinds 1997: foetale RhD-genotypering



Locus 1 - presence of *RHD* codes for the presence of D or no D. Differs from *RhCE* by 34 to 37 amino acids (C or c)

Locus 2 - presence of *RHCE* codes for Ce, CE, cE, ce.

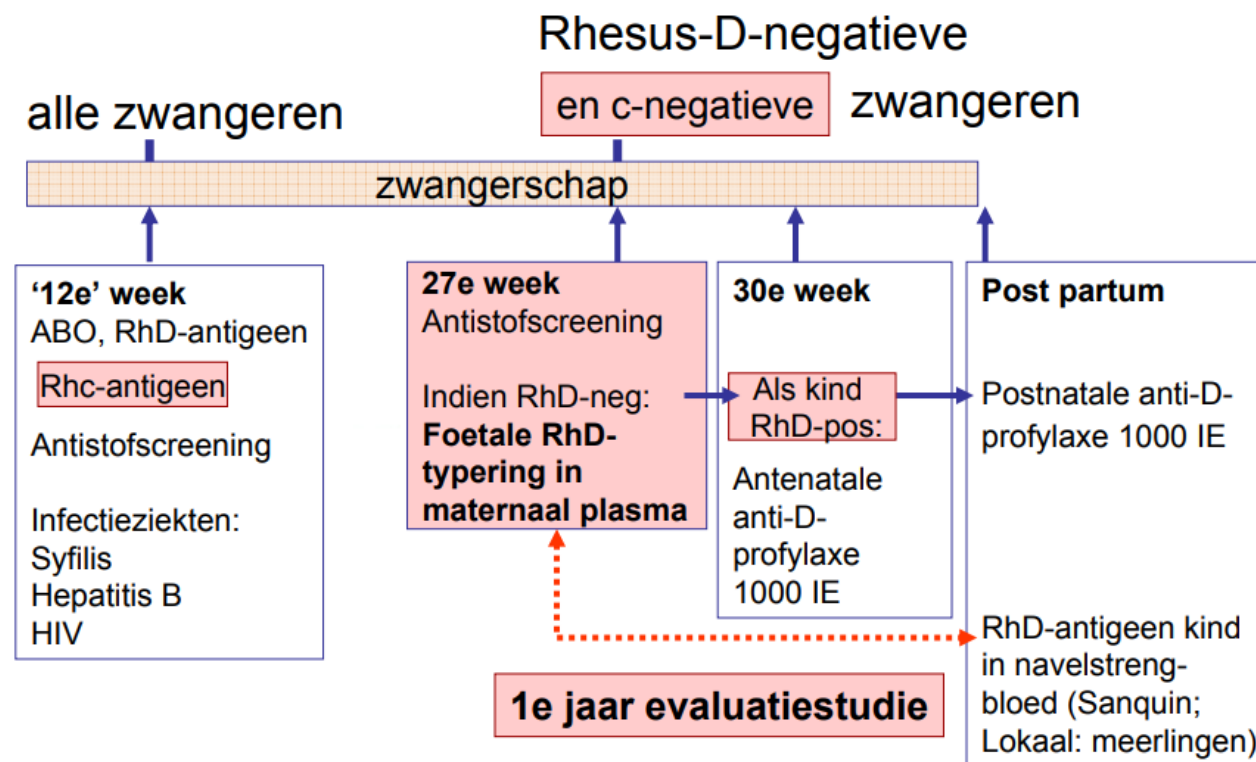


- Uniplex/multiplex PCR
- Vanaf 12 weken zwangerschap (NIPT)
- Hoogste accuraatheid vanaf 25 weken



Inleiding

- Foetale RhD-genotypering al in verschillende Europese landen geïmplementeerd in screeningsprogramma's van zwangere RhD-vrouwen



Figuur: Bevolkingsonderzoek Prenatale Screening Infectieziekten en Erythrocytenimmunisatie (PSIE) programma vanaf 1 juli 2011 Nederland



Inleiding

- Tot op heden geen uniforme richtlijn in België
- Vraag vanuit gynaecologie o.b.v. aanbeveling VVOG

Gynaikologia Vol 28 nr 6 • 2023

VVOG



Clinical guidance paper VVOG

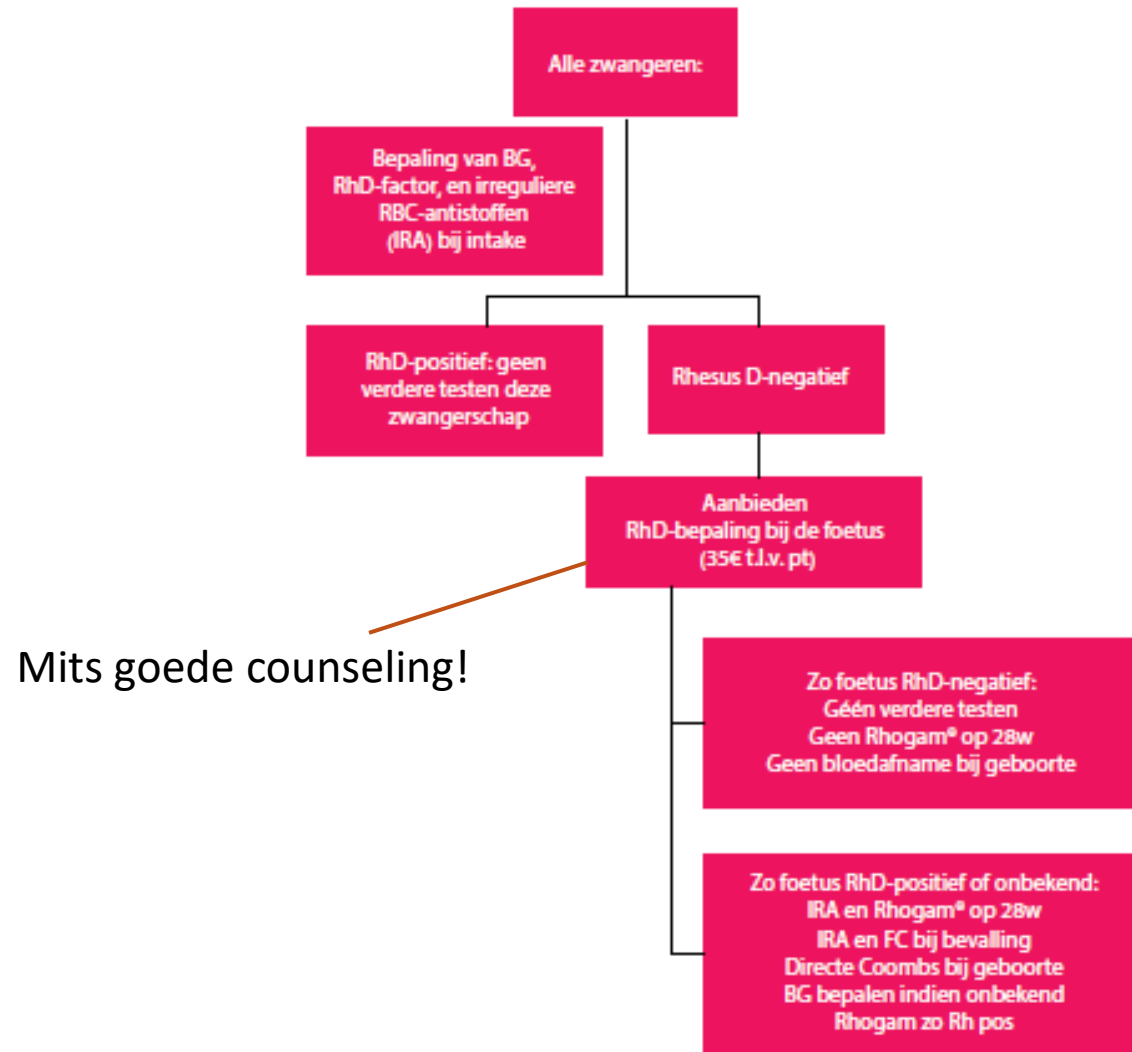
Preventie en behandeling van allo-immunisatie van erythrocyten

Lennart Van der Veecken, Liesbeth Lewi, Charon Ver Eecke, Eva Simoens,
Sophie Pommé, Magali Verheecke, Roland Devlieger



Inleiding

- Voorstel VVOG





Onderzoeksvragen

- 1) Wat is de waarde van foetale RhD-genotypering in de praktijk?
- 2) Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in het laboratorium van het AZ Sint-Lucas te implementeren?



Wat is de waarde van foetale RhD-genotypering in de praktijk?

- **Kosteneffectiviteit?**

- Aangetoond in verschillende internationale studies¹⁻⁴
↔ soms ook tegenstrijdigheden⁵

1 Kent J., Farrell A.-M., Soothill P. Routine administration of Anti-D: The ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. BMC Pregnancy Childbirth. 2014;14:4–7.

2 Teitelbaum L. et al. Costs and benefits of non-invasive fetal RhD determination. Ultrasound Obstet Gynecol. 2015;45(1):84–8.

3 Bianchi DW, Maron JL, Johnson KL. Insights into fetal and neonatal development through analysis of cell-free RNA in body fluids. Early Hum Dev. 2010;86(11):747–52.

4 Van Haver A. Validatie van een eerste trimester niet- invasieve foetale RhD-genotypering voor een gerichte prenatale anti-d profylaxe (masterthesis UZ Gent). 2018.

5 Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: Costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. BMC Pregnancy Childbirth. 2011;11(1):5.



Wat is de waarde van foetale RhD-genotypering in de praktijk?

- **Kosteneffectiviteit?**

Kostprijs RhoGAM[®] = ten laste van het RIZIV

Huidige terugbetaling in België foetale RhD-genotypering¹

- Zwangere vrouw is geïmmuniseerd met anti-RhD antistoffen
- Indien RhD- zwangere vrouw een invasieve ingreep dient te ondergaan



Indien geen wijzigingen in huidige terugbetaling bij implementatie²

- Kostenbesparend voor RIZIV
- Kost test ten laste van patiënt

¹ RIZIV. Nomenclatuur artikel 33 Genetische onderzoeken. In 2023. p. 1–9.

² Van Haver A. Validatie van een eerste trimester niet- invasieve foetale RhD-genotypering voor een gerichte prenatale anti-d profylaxe (masterthesis UZ Gent). 2018.



Wat is de waarde van foetale RhD-genotypering in de praktijk?

- **Ethische kwestie¹**

- Bloedafgeleid product
- Toedienen van het juiste product aan de juiste patiënt

- **Frequent beschikbaarheidsproblemen²**

- **Conclusie**

- Kostenbesparend voor het RIZIV indien routinematig geïmplementeerd, **MAAR** (voorlopig) kosten nog ten laste van de patiënt (toekomst terugbetaling?)
- Optimaler gebruik van RhoGAM[®]

¹ Kent J., Farrell A.-M., Soothill P. Routine administration of Anti-D: The ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. BMC Pregnancy Childbirth. 2014;14:4–7.

² Veecken L Van Der, Lewi L, Eecke C Ver, Simoens E. Clinical guidance paper VVOG Preventie en behandeling van allo-immunisatie van erythrocyten. 2023;28(6):29–36.



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Doel: ZONDER voorafgaande extractie



➔ Cell3™ Direct Rhesus D Fetal Blood Group Genotyping

- Exonen 5, 7 en 10
 - Exon 5 = FAM gelabeled (6 replicaten)
 - Exon 7 en 10 = HEX gelabeled (5 replicaten)
- CCR5 als huishoudgen (interne controle; HEX gelabeled)
- Elke run: NTC, positieve & negatieve controle
- Validatie-experimenten 24-26 w zwangerschap



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Validatieopzet:

- 39 EDTA-plasmastalen van RhD- zwangere vrouwen afgenomen tijdens GCT/OGTT
- Analyse volgens protocol firma
- PCR cycler: Bio-Rad CFX96



- Reproduceerbaarheidsexperiment
- Resultaten vergelijken met serologische bloedgroepbepaling navelstrengbloed



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op
materneel plasma in routine te implementeren?

- Resultaten

- 10 runs (“run 0 t.e.m. 9”)
 - Runs 0 t.e.m. 4 = methode-optimalisatie
 - Runs 5 t.e.m. 9 = opstellen protocol voor interpretatie



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Resultaten

- 10 runs (“run 0 t.e.m. 9”)

- Runs 0 t.e.m. 4 = methode-optimalisatie (“wet-lab”)

- ➔ Vooral probleem van contaminatie!

- Gebruik van RhD-positieve stalen als controle

- RhD-positieve operator?

- ➔ strikte hygiënemaatregelen + RhD-negatieve operator vanaf run 5

Goede resultaten





Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Resultaten

- 10 runs (“run 0 t.e.m. 9”)

- Runs 5 t.e.m. 9 = opstellen protocol voor interpretatie

- In totaal 54 analyses, waarvan 36 unieke stalen en 12 herhalingen

- ➔ Ct-waarden gecorreleerd met de kliniek

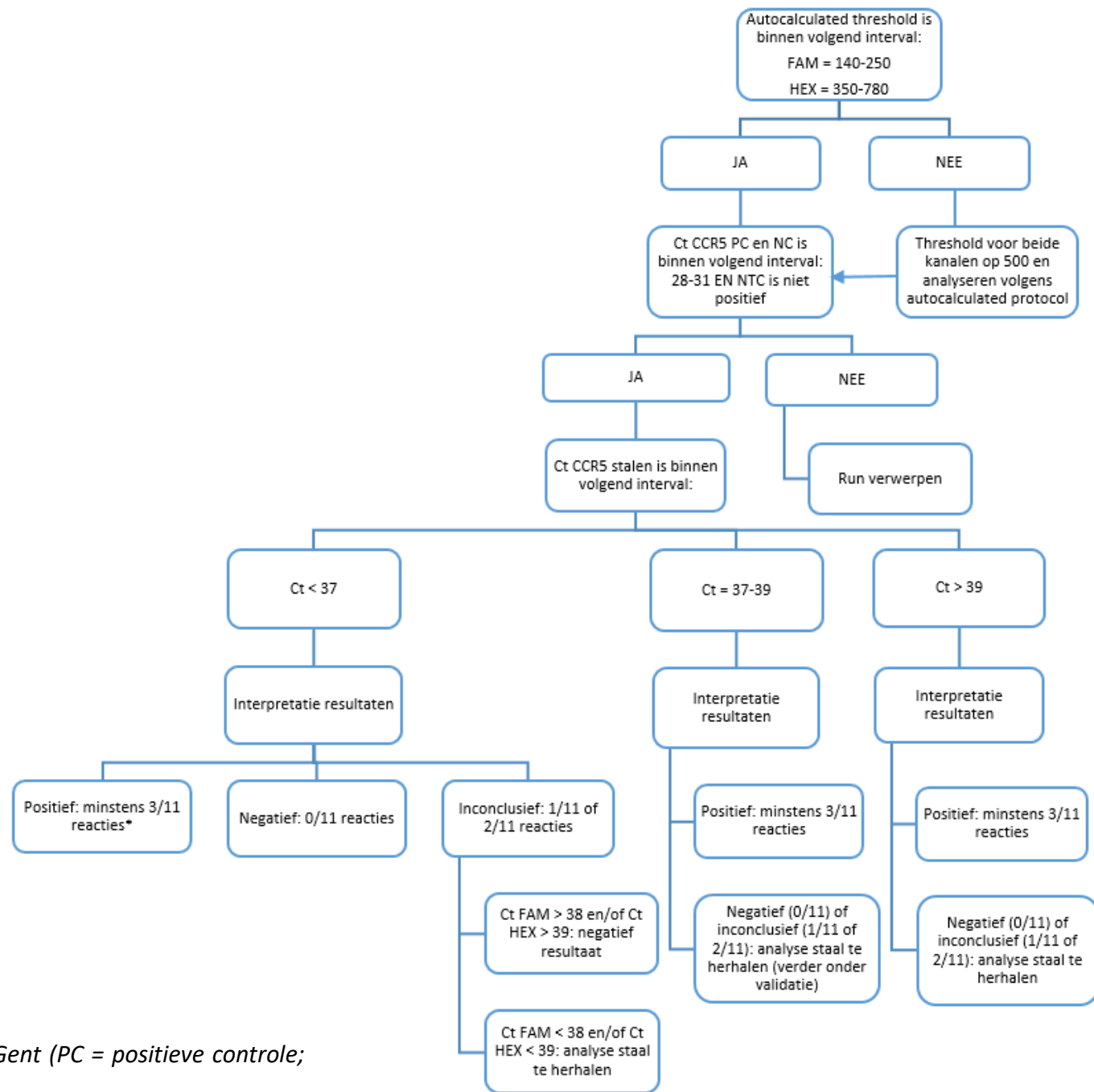


opstellen flowchart



Is het haalbaar materneel plas

- Flowchart

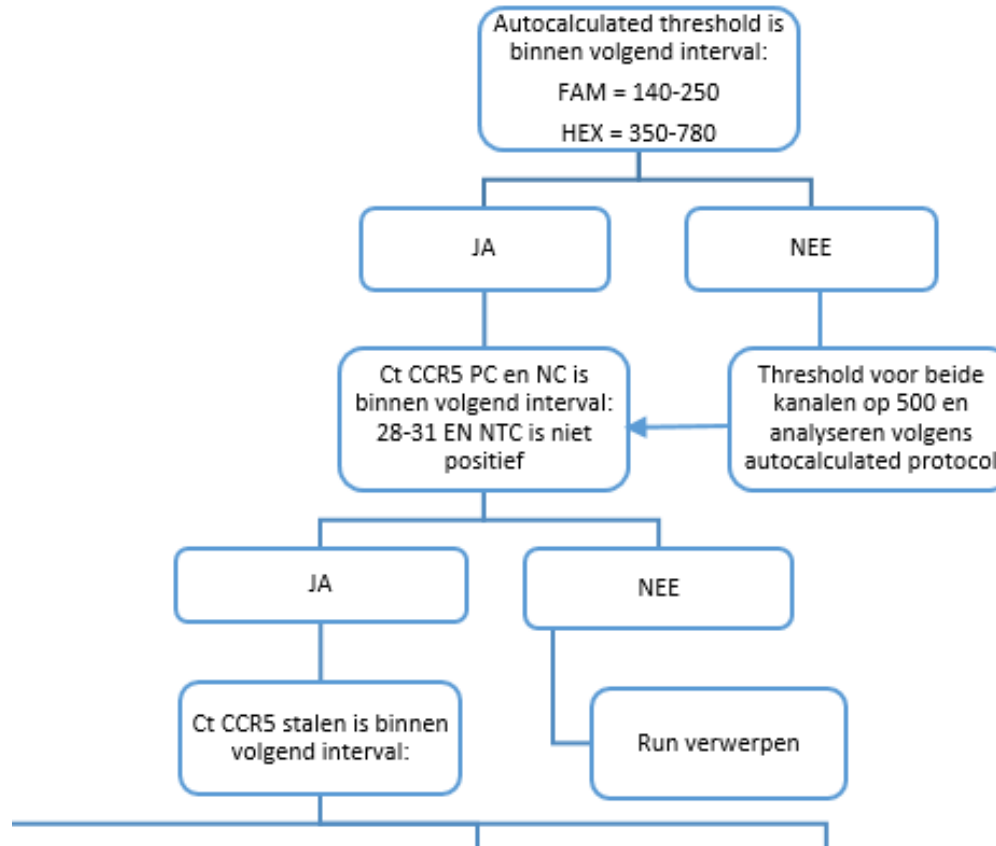


Figuur: Flowchart voor interpretatie foetale RhD-genotypering in het AZ Sint-Lucas Gent (PC = positieve controle; NC = negatieve controle)



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Flowchart

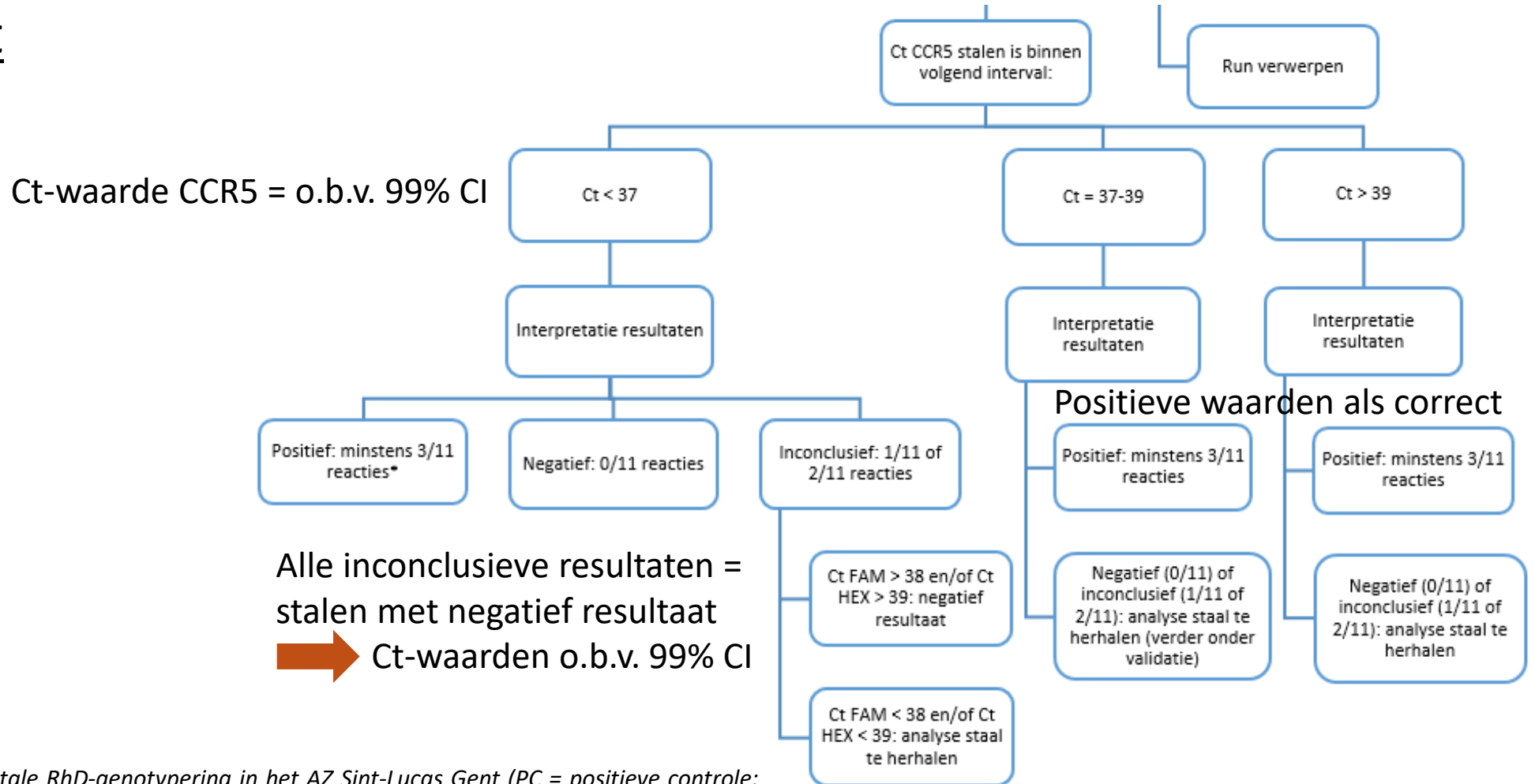


Figuur: Flowchart voor interpretatie foetale RhD-genotypering in het AZ Sint-Lucas Gent (PC = positieve controle; NC = negatieve controle)



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Flowchart

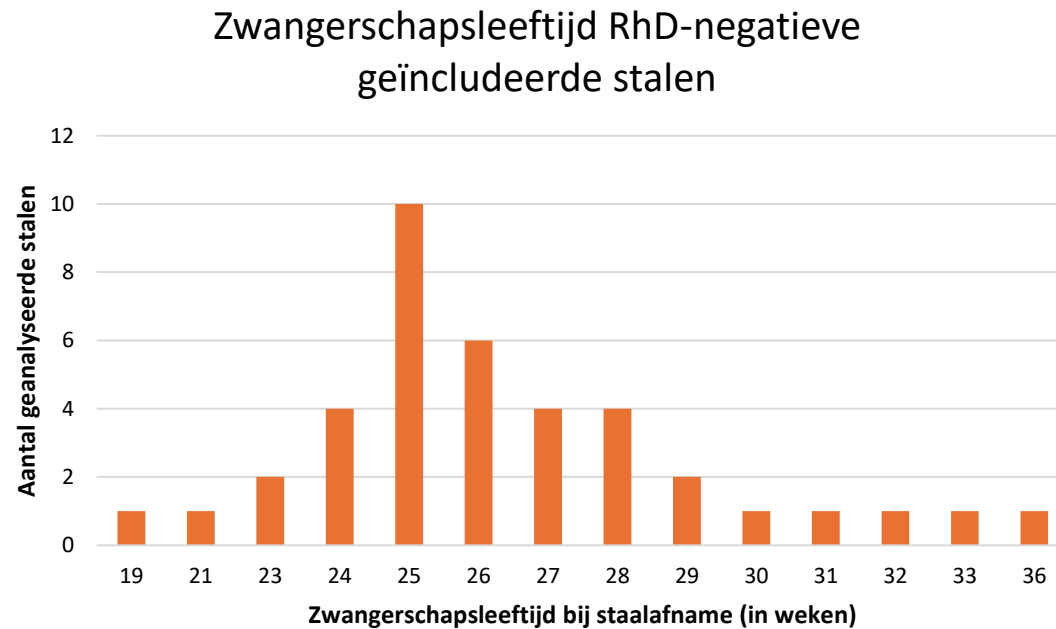


Figuur: Flowchart voor interpretatie foetale RhD-genotypering in het AZ Sint-Lucas Gent (PC = positieve controle; NC = negatieve controle)



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Zwangerschapsleeftijd geanalyseerde stalen



Figuur: Zwangerschapsleeftijd bij afname van de geïnccludeerde RhD-negatieve zwangere vrouwen



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Reproduceerbaarheid

Tabel 1: Resultaten reproduceerbaarheidsexperiment foetale RhD-genotypering

	2401- 25429/1	2401- 25429/2	2401- 25429/3	2402- 04202/1	2402- 04202/2	2402- 04202/3
FAM		38,20	37,26			
		36,78	38,39			
	37,84	36,27	37,46			
	35,86	38,47	36,23			
	35,30	37,53				
	36,44	35,06	38,20		37,18	
HEX	37,90	37,23	39,72			
	37,11	38,47	38,51			
	37,59	38,13	39,39	41,49		
	37,25	38,38	37,82			
	38,07	37,47	39,52			
CCR5	35,67	37,00	36,06	35,59	35,45	36,01
Aantal positieve reacties	9/11	11/11	10/11	0/11	1/11	0/11





Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op
materneel plasma in routine te implementeren?

- Resultaten klinische stalen
 - 15/36 stalen RhD-negatief (navelstrengbloed) = 42%



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?

- Resultaten klinische stalen

- 15/36 stalen RhD-negatief (navelstrengbloed) = 42%

	Analyse volgens protocol firma	Analyse volgens eigen flowchart
Correct resultaat	32 (89%)	36 (100%)
Inconclusief resultaat	4 (11%)	0 (0%)



Geen inconclusieve resultaten meer



Is het haalbaar om foetale RhD-genotypering op materneel plasma in routine te implementeren?



- **Conclusie**

Foetale RhD-genotypering lijkt haalbaar ZONDER voorafgaande extractie, mits verdere oppuntstelling analyse- en interpretatieprotocol

- **!** Enkel door RhD-negatieve operator? Aankoop “dead air box”?



To do / actions

- Verdere optimalisatie van de methode 
- Overleg met dienst gynaecologie: 
 - Informeren van patiënten (kostprijs?)
 - Moment van staalafname?
 - Interpretatie van resultaten



Bedankt voor jullie aandacht!





Referenties (1)

- Kent J., Farrell A.-M., Soothill P. Routine administration of Anti-D: The ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14:4–7.
- Blomme S, Nollet F, Rosseel W, Bogaard N, Devos H, Emmerechts J, et al. Routine noninvasive prenatal screening for fetal Rh D in maternal plasma—A 2-year experience from a single center in Belgium. *Transfusion*. 2022;62(5):1103–9.
- Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Saramago P, Griffin S, et al. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: A systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2019;17(1):1–10.
- Niguse B, Ermias M, Berhanu S, Abayneh L, Chakiso B, Rather RA. RHD exon 5, 7 and 10 targeted non-invasive prenatal screening of fetal Rhesus-D (RhD) in selected RhD negative pregnant women in Ethiopia. *PLoS One*. 2022;17(3 March):1–9.
- Depaepe Y, van Oostrum N, Roets E, Roelens K. Internationale richtlijnen voor het gebruik van Rhesus D immunoglobuline: een vergelijkend onderzoek en de plaats van foetale Rhesus D genotypering. *Tijdschr Geneeskd*. 2023;(1).
- Dekker N, Goemaes R, Neirinckx J, Seuntjens L, Smets K. Richtlijn: Zwangerschapsbegeleiding. *Domus Medica*. 2015;6.
- Teitelbaum L, Metcalfe A, Clarke G, Parboosingh JS, Wilson RD, Johnson JM. Costs and benefits of non-invasive fetal RhD determination. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45(1):84–8.
- Uzunel M, Tiblad E, Mörtberg A, Wikman A. Single-exon approach to non-invasive fetal RHD screening in early pregnancy: An update after 10 years' experience. *Vox Sang*. 2022;117(11):1296–301.
- Belgisch Centrum voor Farmacotherapeutische Informatie (BCFI). Anti-D immuunglobulinen [Internet].
- Bianchi DW, Maron JL, Johnson KL. Insights into fetal and neonatal development through analysis of cell-free RNA in body fluids. *Early Hum Dev*. 2010;86(11):747–52.
- Van Haver A. Validatie van een eerste trimester niet- invasieve foetale RhD-genotypering voor een gerichte prenatale anti-d profylaxe (masterthesis UZ Gent). 2018.
- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Kulovany E, et al. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther*. 2005;20(4):275–80.



Referenties (2)

- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Beleid bij bloedgroep Rhesus (D)-negatief.
- RIZIV. Nomenclatuur artikel 33 Genetische onderzoeken. In 2023. p. 1–9.
- Hyland CA, O'Brien H, McGowan EC, Perros AJ, Flower RL, Lopez GH, et al. The power of digital PCR in fetal blood group genotyping: a review. *Ann Blood*. 2023;8:4–11.
- Bohmova J, Lubusky M, Holuskova I, Studnickova M, Kratochvilova R, Krejcirikova E, et al. Two reliable methodical approaches for non-invasive RHD genotyping of a fetus from maternal plasma. *Diagnostics*. 2020;10(8):1–15.
- Soothill PW, Finning K, Latham T, Wreford-Bush T, Ford J, Daniels G. Use of cffDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: Implementation in the NHS. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2015;122(12):1682–6.
- Rather RA, Dhawan V, Saha SC. Non-invasive prenatal rhesus D genotyping using cell-free foetal DNA. *Indian J Med Res*. 2019;(July):62–6.
- Veecken L Van Der, Lewi L, Eecke C Ver, Simoens E. Clinical guidance paper VVOG Preventie en behandeling van allo-immunisatie van erythrocyten. 2023;28(6):29–36.
- Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: Costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2011;11(1):5.
- Tiblad E, Taune Wikman A, Ajne G, Blanck A, Jansson Y, Karlsson A, et al. Targeted Routine Antenatal Anti-D Prophylaxis in the Prevention of RhD Immunisation - Outcome of a New Antenatal Screening and Prevention Program. *PLoS One*. 2013;8(8).
- Illumina. VeriSeq NIPT Solution v2. 2022.
- Nonacus. Cell3™ Direct : Rhesus D Fetal Blood Group Genotyping. 2023.
- Wagner FF, Flegel WA. Review: The molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*. 2004;20(1):23–36.