



Foetale RHD genotypering op matернаal plasma

Dr. Katinka De Vreese

13/3/2012

Paraat. Altijd, overal.

Foetale RHD genotypering op matернаal plasma

- Inleiding – situering probleem
- Genetische basis
- Clinical/diagnostic scenario
- Vraagstelling
- Appraisal
- Conclusie
- To do's



■ Zwangerschap bij RhD-negatieve vrouw

- 60% draagt RhD-positieve foetus
- Risico op vorming allo-anti-D
 - 1^e kind: geen probleem
 - Foetomaternele transfusie tijdens ZS/bevalling
 - Anti-D
 - > IgG
 - > Gaat transplacentair
 - > Kan HDFN veroorzaken bij volgende ZS



Foto Dan Cueller



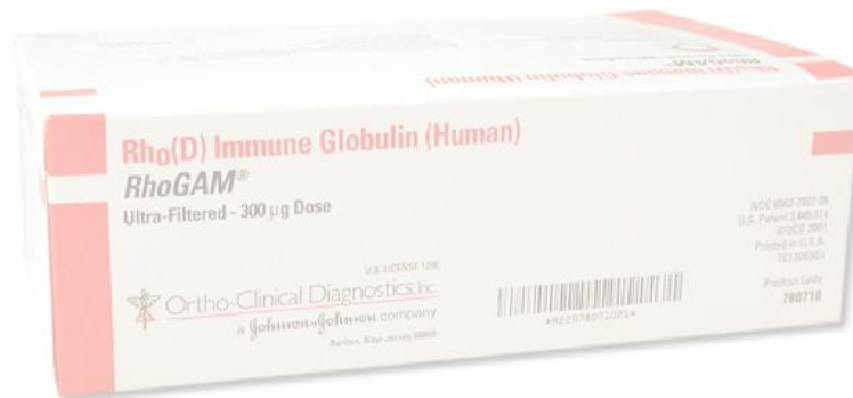
Inleiding

- Hemolytische ziekte van de foetus/pasgeborene (HDFN)
 - destructie van RBC door maternale antistoffen gericht tegen paternaal overgeërfde antigenen
 - Foetaal:
 - Anemie
 - Toename intra-/extramedullaire erythropoïese
 - Hydrops foetalis
 - > Ascites
 - > Gegeneraliseerd oedeem
 - > Cardiomegalie, hartfalen
 - > Fatale afloop
 - Ernstig verloop mogelijk vanaf 18W ZS
 - Neonataal:
 - (Kern)icterus
 - Progressieve anemie



Inleiding

- Preventie anti-D alloimmunisatie: Rhogam®
 - Sensitiserisico zonder profylaxe = 13%
 - Sensitiserisico met profylaxe (anti-D immunoglobuline, Rhogam®)
 - Enkel toediening postnataal = 1.2%
 - Toediening prenataal (RAADP op 28-32W) en postnataal = 0.3%



- Preventie anti-D alloimmunisatie: Rhogam®
 - **Internationale aanbevelingen:** Anti-D Ig is aanbevolen bij niet-geïmmuniseerde zwangere vrouwen
 - Na een potentieel sensitiserend event én
 - Op 28W zwangerschap (RAADP) én
 - Binnen de 72u na bevalling van een RhD-positief kind

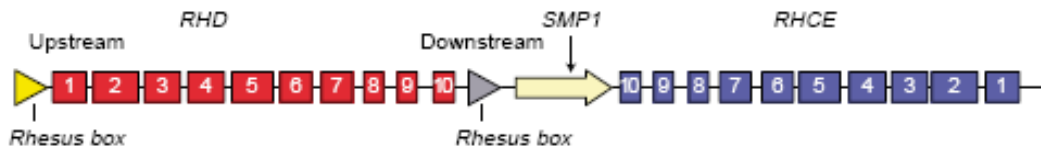
NICE, 2008 (National Institute for Health and Clinical Excellence)
BCSH, 2008 (British Committee for Standards in Hematology)
ICSI, 2010 (Institute for Clinical Systems Improvement)

- **België:**
 - Geen uniform nationaal beleid
 - Aanbevelingen KCE (2004), VVOG (2007): cfr internationale guidelines
 - UZ Leuven: andere strategie sinds zomer 2009:
 - » Stockbreuk → geen RAADP
 - » Prenataal enkel toediening bij potentieel sensitiserend event
 - » Postnatale toediening van Rhogam in geval van RhD-positieve baby



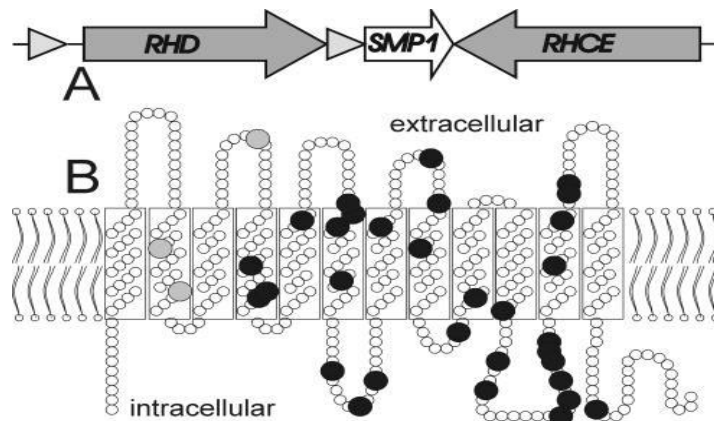
Genetische basis

- Rhesus bloedgroepen systeem
 - 2 genen (chromosoom 1): RHD en RHCE



Elk 10 exonen

Grote homologie ($\pm 95\%$ identiek – slechts 32-35/417 AZ verschillend afhankelijk van de allelen)



Coderen voor eiwit (RhD en RhC/c E/e) met 12 transmembranaire domeinen met 6 extracellulaire loops

Zwarte en grijze cirkels: AZ verschillen tussen RhD en RhCE

Clin. Lab. 2002;48:53-59



- Rhesus D systeem: fenotypes
 - RhD positief
 - RhD negatief
 - Zeer polymorf
 - Varianten: tgv duplicaties, puntmutaties, hybride genen,...
 - Gevolg:
 - > afunctioneel gen: RHD ψ , RHD-CE-D^S
 - > zwakke D (missense mutaties in IC/TM deel)
 - > partiële D (hybride genen (RHD-CE-D) of missense mutaties in EC deel)



Genetische basis

- Rhesus D negatief: frequentste genotypes
 - Blanke populatie: 15-17%
 - Homozygote deletie van RHD gen
 - Zwarte populatie: 3-5%
 - 67%: RHD pseudogen ($RHD\psi$)
 - > Bevat alle 10 de exonen
 - > Inactief door 2 mutaties
 - » 37 bp duplicatie in exon 4
 - » Nonsense mutatie in exon 6
 - 15%: inactief hybride $RHD-CE-D^S$ gen
 - > Exon 1 en 2, 5' uiteinde van exon 3 en exon 9 en 10 van RHD
 - > 3' uiteinde van exon 3 en exon 4-8 van RHCE
 - 18%: homozygote deletie



Clinical/Diagnostic scenario

■ Foetale RHD genotypering

– Hoe?

- 1) Invasief: VWP/CVS
- 2) Niet invasief: foetale RHD genotypering op matернаal plasma

– Wanneer?

- 1) Bij gesensitiseerde zwangere
 - Geruststelling bij RHD negatieve foetus
 - Plannen van intensieve FU/therapie bij RHD positieve foetus
- 2) Bij niet-gesensitiseerde zwangere
 - Antenatale/peripartale toediening van Rhogam
 - Invasieve procedure nvt (risico's!)



Vraagstelling

- 1) Wat is de huidige kennis over foetale RHD genotypering op maternaal plasma?
- 2) Is het zinvol om deze test te implementeren in de routine klinische praktijkvoering?



■ Huidige kennis

- 1997: ontdekking cell-free fetal DNA (cffDNA)
 - Dennis Lo en collega's (Oxford University, UK)
 - > 1997: Y sequenties aanwezig in plasma en serum van vrouwen die zwanger waren van een mannelijke foetus
 - > 1998: Kwantificatie van foetaal DNA
 - » 3,4% van totaal plasma DNA vroeg in de zwangerschap
 - » 6,2% van totaal plasma DNA laat in de zwangerschap
 - Apoptotische syncytiotrofoblast
 - Detecteerbaar vanaf de 5^e zwangerschapsweek
 - Geklaard uit de maternale circulatie binnen enkele uren na de bevalling
 - Maakt niet-invasieve prenatale diagnostiek (NIPD) mogelijk



■ Huidige kennis

- Foetale RHD genotypering dmv cffDNA: vereisten



1) Gevoelige detectiemethode

> PCR

- » Meestal RT Taqman PCR
- » Verschillende in-huis ontwikkelde methodes
- » Commerciële kit: L'Institut Jacques Boy, Reims, Frankrijk

> MALDI-TOF MS: Sequenom

- » SensiGene™ Fetal RHD genotyping test
- » Te gebruiken op commercieel beschikbare MassARRAY Genetic Analysis System



■ Huidige kennis

- Foetale RHD genotypering dmv cffDNA: vereisten



2) Goede primerkeuze

- > Vals positief resultaat door inactieve maternale/foetale D-varianten voorkomen
 - » RHD ψ en hybride RHD-CE-D^S gen
 - RhD fenotype negatief; worden echter wel geamplificeerd → vals positief
 - Daarom meerdere exonen targetten met minstens inclusie van een RHD-specifieke PCR die negatief is voor het RHD pseudogen
- > Verschillende combinaties gebruikt



Group	Targeted exons	Detailed information	References
International Blood Group Reference Laboratory (IBGRL), Bristol, UK	4, 5, 10	Primers of exons 4 and 5 are designed to amplify only the <i>RHD</i> gene, not <i>RHDψ</i> and <i>RHD-CE-D^s</i>	13,30,35
	5, 7	Evaluated for large-scale testing purposes. Exon 5 amplifies <i>RHD</i> only, exon 7 amplifies <i>RHD</i> and the inactive <i>RHDψ</i> gene	23,27
Minon et al., Liege, Belgium	4, 5, 10	Primers of exons 4 and 5 are designed to amplify only the <i>RHD</i> gene, not <i>RHDψ</i> and <i>RHD-CE-D^s</i>	26
Rouillac-Le Sciellour et al., France	5, 7, 10	Initially only two exons (7 and 10) but false positive results due to <i>RHDψ</i> ; Added an additional <i>RHD</i> exon 5 PCR which amplifies a 82 bp fragment of <i>RHD</i> but not <i>RHDψ</i>	29,34
SAFE network (The Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network of Excellence)	5, 7	No product of <i>RHD</i> exon 5 is generated when a nonfunctional <i>RHD</i> pseudogene or a <i>RHD-CE-D^s</i> gene is present	15
Sanquin Diagnostic Services, The Netherlands	5, 7	No product of <i>RHD</i> exon 5 is generated when a nonfunctional <i>RHD</i> pseudogene or a <i>RHD-CE-D^s</i> gene is present	21
Bombard et al., USA	4, 5, 7	Added an additional PCR for a 37-base pair insertion found in exon 4 which is indicative of the presence of <i>RHDψ</i>	22



■ Huidige kennis

- Foetale RHD genotypering dmv cffDNA: vereisten



3) Universele foetus-specifieke markers

- > Positieve controle voor aanwezigheid van cffDNA bij negatief resultaat
- > Vals negatief resultaat door lage hoeveelheid foetaal DNA voorkomen
- > Opties
 - » Y sequenties
 - » Detectie van paternaal-overgeërfde insertie/deletie polymorfismes
 - » RASSF1A hypermethylatie
 - » SNP detectie dmv Maldi-TOF MS



Control	Detailed information	Function/technique	Remarks	Reference
CCR5	Ubiquitous gene, which is amplified from maternal and fetal DNA.	<ul style="list-style-type: none"> - Confirmation of successful DNA extraction - Quantification of total plasma DNA - Control for the quantity of maternal DNA 		11,13,30,35
SRY	Y chromosome sequences		Only applicable in case of a male fetus	13,16,19,23,26,29,30,34,35
biallelic insertion/deletion polymorphisms	Allow the detection of fetal-derived, paternally-inherited polymorphisms.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Testing of maternal buffy coat for polymorphism 2. Maternal plasma is then tested for those polymorphisms that were absent from the maternal genome 	<ul style="list-style-type: none"> - Increased complexity of the diagnostic assay - Time-consuming - Labor-intensive - Not informative in 4% of cases 	11,16,21,23,35
RASSF1A hypermethylation	RASSF1A is a promoter region of the tumor suppressor gene Ras association domain family 1A gene. RASSF1A gene is hypermethylated in placental cells and hypomethylated in maternal blood cells.	Methylation analysis is performed using methylation-sensitive endonucleases, thus cutting hypomethylated RASSF1A background sequences from maternal origin, while leaving hypermethylated placental RASSF1A sequences intact for amplification.	<ul style="list-style-type: none"> - Aberrant RASSF1A methylation in malignancies → not useful if history of cancer - Methylation-specific PCR assays are difficult to design and time-consuming to optimize - Mass spectrometry-based methods for methylation analysis have been described. 	16,21,26,29,30,32
Other blood group antigen	RT PCR for other paternally derived blood group antigens (C/c; E/e, K)	Implies serological testing of both parents for D, C/c, E/e and K/k to identify paternal blood group antigens that could serve as a genetic control marker to confirm the presence of fetal DNA		21
Single Nucleotide Polymorphism (SNP)	Detection of fetal alleles of SNPs in maternal plasma to detect difference between the minority fetal and the majority maternal DNA molecules	Uses special primer extension method (SABER, single allele base extension reaction) followed by analysis by Maldi-TOF MS.	<ul style="list-style-type: none"> - Amenable for multiplexing - Expensive mass spectrometry equipment 	16



■ Huidige kennis

- Foetale RHD genotypering dmv cffDNA: vereisten



4) Reproduceerbaar resultaat

- > Per exon vaak 3-4 PCRs
- > Minon et al: 21.4% minstens 1 negatieve PCR



■ Huidige kennis

- Foetale RHD genotypering dmv cffDNA: diagnostische performantie
 - PCR
 - > Verschillende studies met "in-huis" ontwikkelde PCRs
 - » Weinig standardisatie (extractiemethode, primerkeuze, PCR condities,...)
 - » Grote verschillen in diagnostische performantie
 - » Gerapporteerde diagnostische accuraatheid: 97.5% (range 80.8-100%)
 - > Commerciële kit: "Free DNA Fetal Kit® RhD" (L'Institut de Biotechnologies Jacques Boy)
 - » Correlatiestudie met in-huis ontwikkelde PCR (300 stalen): 100% concordantie (Rouillac-Le Sciellour, 2007)



■ Huidige kennis

- Foetale RHD genotypering dmv cffDNA: diagnostische performantie
 - MALDI-TOF MS
 - > Vergelijking met serologisch bepaald RhD fenotype
 - » Diagnostische accuraatheid 97.1%
 - > Vergelijking met PCR-bepaald RHD genotype
 - » Diagnostische accuraatheid 99.5%
 - > Sequenom:
 - » Klinische trial lopende voor de evaluatie van de performantie van deze noninvasieve test
 - » Geschatte datum van voltooiing trial: maart 2012



■ Huidige kennis

- Foetale RHD genotypering dmv cffDNA: diagnostische performantie
 - Opmerkingen:
 - > Gebrek aan standardisatie
 - > Meer vals-negatieve bij vroege staalname
 - > Meestal kleinere studies; slechts 1 grote studie (1869 ptn)
 - » Accuraatheid 95.7%; sensitiviteit 96.7%
 - > **Systematische exclusie van inconclusieve of niet interpreteerbare resultaten (onvoldoende foetaal materiaal/aanwezigheid inactief maternaal gen)**
 - » Van belang bij grootschalige implementatie!



Table: published studies on RhD genotyping from fetal plasma in maternal plasma (partially adapted from (20))

References	Gestation (weeks)	Methods	RhD	No. Tested	No. Included	# correct	Accuracy	Total accuracy	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Lo et al, 1998	7-41	Real-time PCR	exon 10	57	57	55	96,5%	96,5%	94,9%	100,0%	100,0%	90,0%
Faas et al, 1998	16-17	PCR	exon 7	31	31	31	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Zhang et al, 2000	All trimesters	Real-time PCR	exon 7	58	58	57	98,3%	98,3%	96,9%	100,0%	100,0%	96,3%
Nelson et al, 2001	9-34	PCR	exon 10	26	26	26	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Finning et al, 2002	8-42	Real-time PCR	exons 4,5,6,10	158	137	137	100,0%	86,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Costa et al, 2002	8-14	Real-time PCR	exon 10	102	102	102	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Legler et al, 2002	11-38	Real-time PCR	exons 4,7	28	27	26	96,3%	92,9%	93,0%	100,0%	100,0%	92,3%
Turner et al, 2003	6-20	Real-time PCR	exon 10	31	31	28	90,3%	90,3%	82,4%	100,0%	100,0%	82,4%
Siva et al, 2003	15-17	PCR	exons 7,10	28	26	21	80,8%	75,0%	85,0%	66,7%	89,5%	57,1%
Rijnders et al, 2004	11-19	Real-time PCR	exon 7	72	71	71	98,6%	98,6%	100,0%	96,6%		
Rouillac et al, 2004	7-36	Real-time PCR	exons 7,10	893	851	842	98,9%	94,3%	99,4%	97,5%	99,2%	98,0%
Finning et al, 2004	All trimesters	Real-time PCR	exons 4,5,10	233	226	223	98,7%	95,7%	100,0%	96,2%	98,0%	100,0%
Clausen et al, 2005	15-16	Real-time PCR	exons 7,10	59	59	58	98,3%	98,3%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Zhou et al, 2005	14-42	Real-time PCR	exons 4,5,10	98	96	92	95,8%	93,9%	94,4%	100,0%	100,0%	85,7%
Gautier et al, 2005	8-35	Real-time PCR	exon 10	274	272	272	100,0%	99,3%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Gonzalez et al, 2005	11-16	Real-time PCR	exon 7	20	20	20	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Brojer et al, 2005	All trimesters	Real-time PCR	exons 7,10; intron 4	255	230	229	99,6%	89,8%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Rouillac et al, 2007	10-34	Real-time PCR		300	300	298	99,3%	99,3%	100,0%	97,5%	99,1%	100,0%
Minon et al, 2008	10-38	Real-time PCR	exons 4,5,10	563	545	544	99,8%	96,6%	100,0%	99,5%	99,7%	100,0%
Finning et al, 2008	8-38 (92% between 26-30 W)	Real-time PCR	exons 5,7	1869	1869	1788	95,7%	95,7%	96,7%	94,0%	98,8%	99,5%
Bombard et al, 2011	11-13	Maldi-TOF MS	exons 4,5,7	236	207	201	97,1%	85,2%	97,2%	96,9%	98,6%	94,0%
Bombard et al, 2011	6-30	Maldi-TOF MS	exons 4,5,7	205	199	198	99,5%	96,6%	100,0%	98,3%	99,3%	100,0%
Akolekar et al, 2011	11-14	Real-time PCR	exons 5,7	591	502	496	98,8%	83,9%	98,2%	100,0%	100,0%	96,5%
Scheffer et al, 2011	7-38	Real-time PCR	exons 5,7	140	133	133	100,0%	95,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
OVERALL				6349	6075	5948	97,9%	93,7%				

*: total number in which serology was available + results inconclusive

Discordance reported accuracy - total accuracy



■ Implementatie in routine klinische praktijkvoering

- Klinisch/diagnostische impact
 - Gesensitiseerde vrouwen
 - > Vermijden van invasieve procedures om foetaal DNA te bekomen
 - > Foetus RHD positief: verwijzing naar tertiair centrum voor intensieve antenatale opvolging
 - > Foetus RHD negatief: geruststelling; opvolging door eigen gynaecoloog
 - » Cave interpretatie negatief resultaat zolang geen controle voor aanwezigheid van cffDNA
 - Niet-gesensitiseerde vrouwen:
RAADP: 40% krijgt onnodig Rhogam
 - > Kostprijs
 - > Biologisch product (bloedderivaat, verkregen door immunisatie van RhD negatieve mannelijke vrijwilligers → theoretisch risico op overdracht van (niet herkende) virussen en prionen).
 - > Lage voorraad
 - > Allergische reacties na toediening van RAADP zijn beschreven



■ Implementatie in routine klinische praktijkvoering

– Intellectuele eigendomsrechten

• Gepatenteerd

- > Uitvinders: Dennis Lo, James Wainscoat (Oxford University)
- > Europees patent EP 0994963B1 en US patent 6,258,540, eigendom van ISIS Innovations Ltd (Oxford University)
- > Alle detectiemethodes uitgevoerd op matернаal serum/plasma waarbij de aanwezigheid van een nucleïnezuur van foetale origine wordt gedetecteerd.

• Licenties toegekend door ISIS Innovations Ltd:

- > Sequenom® Inc (US): exclusieve licentie voor de technologie beschreven in beide patenten, met uitzondering van het gebruik van PCR voor noninvasieve RHD typering in Europa
- > Institut de Biotechnologies Jacques-Boy, Reims, Frankrijk: licentie voor noninvasieve foetale RHD typering door PCR in Europa
 - » Commerciële kit op de markt, ook aangeboden door BioRad/DiaMed
- Zolang gebruikt voor research: geen inbreuk op patent
- Commercialiseren van de technologie → inbreuk op patent indien geen licentie.



- **Implementatie in routine klinische praktijkvoering**
 - Kosten-effectiviteit
 - Grootschalige implementatie van de test:
 - > Szczepura et al. (2011): economische evaluatie van massatesten voor foetaal RHD genotype op maternaal bloed in Engeland en Wales:
 - » Evaluatie van kosten van in-huis test én van commerciële test ivm anti-D profylaxe
 - » Commerciële kit: zowiezo duurder
 - » In-huis kit: besparing van 0.46-1.6% zolang er geen royalty fee moet betaald worden
Indien wel → NIPD niet langer kosteneffectief
 - > Nederland: blijkbaar wel kosteneffectief



Conclusies

- **Foetale RHD genotypering op maternel plasma dmv cffDNA:**
 - Veelbelovende techniek
 - ook voor andere paterneel overgeërfde aandoeningen
 - Diagnostische setting
 - België: terugbetaling bij anti-D alloïmmunisatie of in geval van invasieve procedure bij een RhD-negatieve zwangere
 - Aangeboden door CME
 - In-huis ontwikkelde RT PCR voor exon 10
 - Ongeveer 10-15 analyses/jaar
 - Grootschalige implementatie in België:
 - UZ Leuven: geen RAADP
 - Vereist een accurate, zeer sensitieve high-throughput methode
 - Kosteneffectiviteit?
 - > Onvoldoende data over kosteneffectiviteit van grootschalige implementatie
 - > Inconclusieve of niet-interpreteerbare resultaten moeten als RHD positief beschouwd worden.
 - > Verschillende PCRs/exon nodig om accuraatheid en sensitiviteit te verhogen → toename kosten
 - > Nog geen interne controle voor aanwezigheid van foetaal DNA → negatief resultaat moet steeds met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden.



To do's

- Opvolgen resultaten Nederlandse pilootstudie
- Opvolgen clinical trial Sequenom

