



Il Counselling nell'era di cffDNA:
obblighi e doveri dell'operatore sanitario
Trieste, 08/09/2017

Screening di *RHD* fetale tramite cffDNA

Donatella Londero

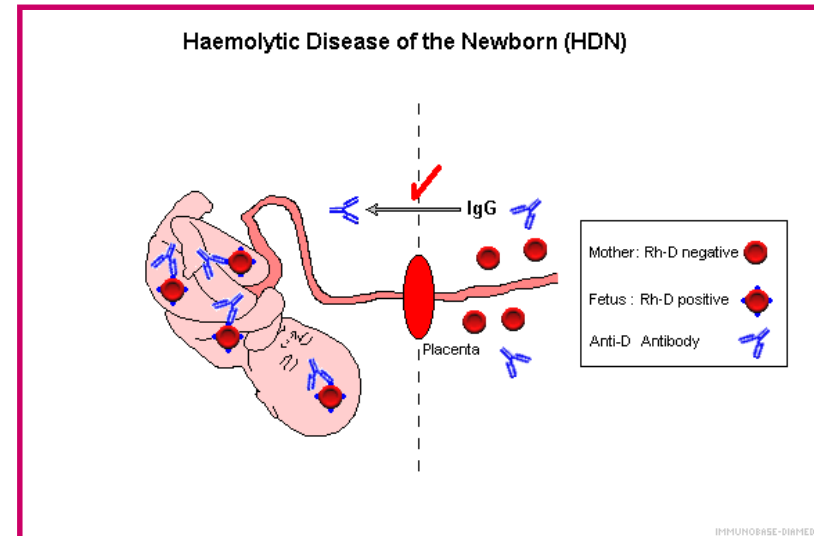
Dipartimento di Medicina Trasfusionale

Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine

S.O.C. Medicina Trasfusionale di Udine

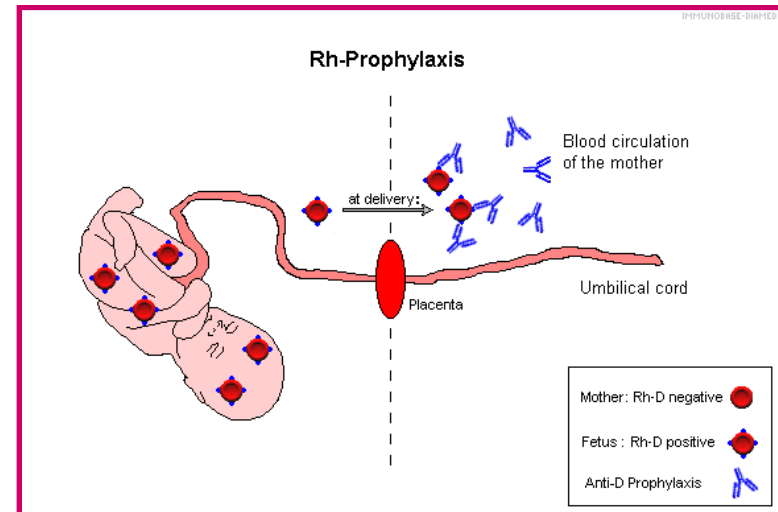
Malattia emolitica del feto e del neonato (HDFN)

- Manifestazione clinica di alloimmunizzazione materno-fetale verso Ag eritrocitari del feto
- Stimolo per la produzione anticorpale sono le emorragie feto-materne (FMH) ▲ dopo 26a e al parto; eventi sensibilizzanti
- Rara alla prima gravidanza
- Prima causa di HDFN: Ab anti-D (forte immunogeno + elevata frequenza: 85% Caucasici; 93-99% Africani-Est Asiatici)
- In ordine decrescente per gravità, Ab verso altri Ag eritrocitari e MEFN da anti-A/B



Immuno Profilassi anti-D

- Somministrazione profilassi anti-D al parto alle madri Rh negative con figli Rh positivi ha ridotto ma non eliminato il rischio (13% → 1-2%)
- Profilassi ante-natale nel terzo trimestre (28a) riduce ulteriormente il rischio allo 0.2%
- Quantità di profilassi si basa sull'entità di FMH (100mg neutralizzano 4-5ml emazie Rh+)
- Fattori di rischio indipendenti (parto non spontaneo, post-termine, età materna, trasfusioni)





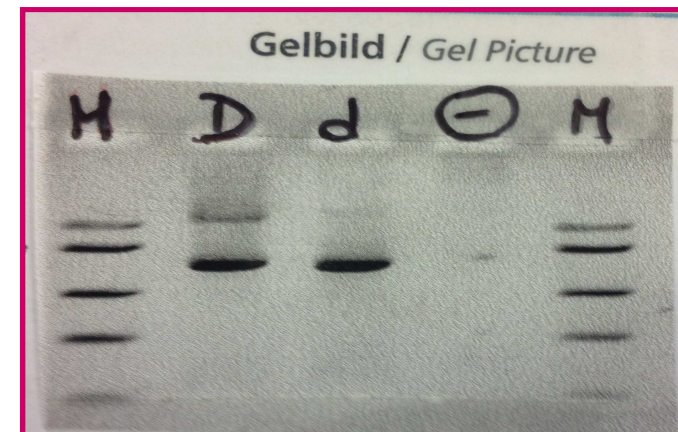
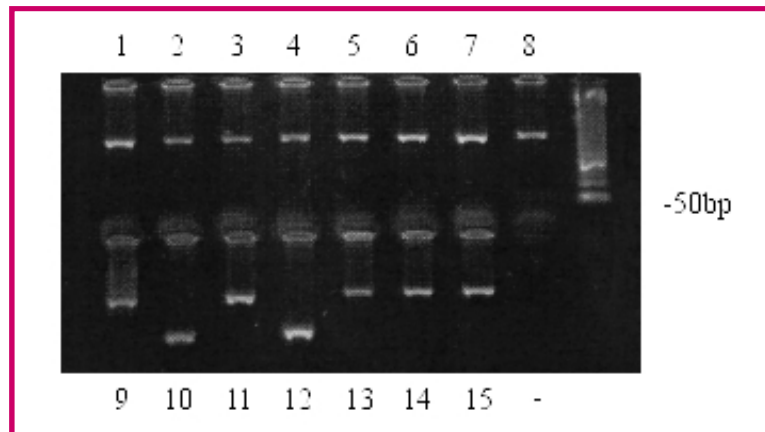
40% Rh- portano feti RH-

Prima applicazione clinica di genotipizzazione Rh (Bennet, 1993)

Materiale invasivo (amniociti, villi coriali)

Metodi home-made o commerciali (PCR-SSP)

Determinazione genotipo paterno e distinzione tra omozigoti ed eterozigoti (DD, Dd)



Determinazione non-invasiva del genotipo *RHD* fetale

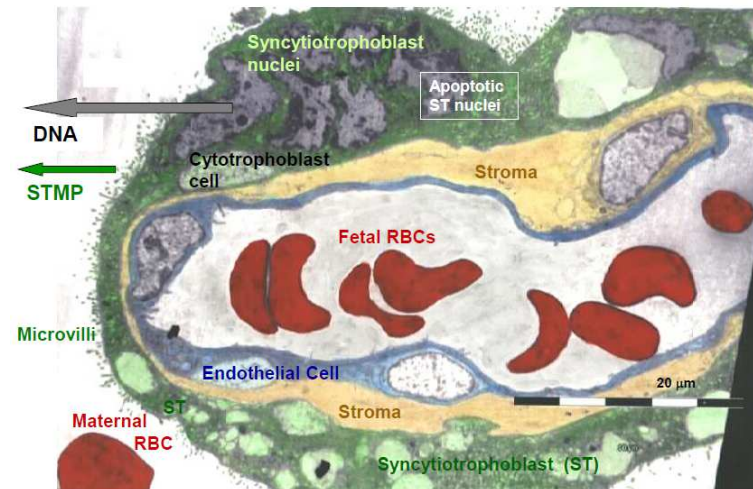
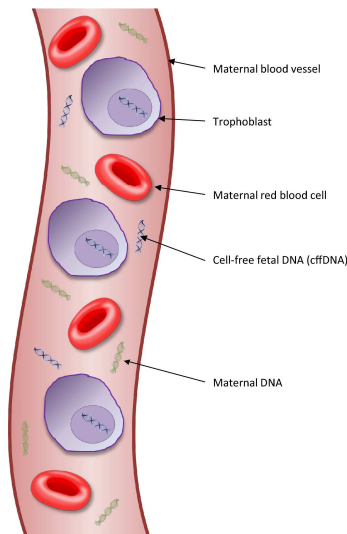


- Costituisce il principale avanzamento nella storia della HDFN dall'introduzione della immunoprofilassi
- Permette di guidare l'appropriatezza della somministrazione di RhIg (profilassi mirata)
- Permette di valutare il rischio e monitorare la gravidanza in età gestazionale precoce nelle donne Rh-negative immunizzate all'anti-D (classificazione precoce della gravidanza)



CffDNA

- Rilasciato nel circolo materno da vescicole apoptotiche della placenta
- Altamente frammentato (80% <150 bp)
- Quantità limitate che aumentano in corso di gravidanza: 3-6% nel primo trimestre $\Rightarrow$ 20% a fine gravidanza
- Rilevabile già dalla 4^a/5^a settimana, utilizzabile dalla 10^a/11^a settimana
- Scompare rapidamente alla nascita (poche ore dal parto)
- Concentrazione influenzata da trasporto, processazione, centrifugazione e stoccaggio
- Necessita di metodi di estrazione molto efficienti e di sistemi di rilevazione molto sensibili



NEJM 1998
**PRENATAL DIAGNOSIS OF FETAL RhD STATUS BY MOLECULAR ANALYSIS
OF MATERNAL PLASMA**

Y.M. DENNIS LO, M.R.C.P., N. MAGNUS HJELM, F.R.C.PATH., CARRIE FIDLER, PH.D., IAN L. SARGENT, PH.D.,
MICHAEL F. MURPHY, F.R.C.PATH., PAUL F. CHAMBERLAIN, M.D., PRISCILLA M.K. POON, PH.D.,
CHRISTOPHER W.G. REDMAN, F.R.C.P., AND JAMES S. WAINSCOT, F.R.C.PATH.



**A Clinical Service in the UK to Predict Fetal
Rh (Rhesus) D Blood Group Using Free Fetal
DNA in Maternal Plasma**

Ann NY Acad Sci 2004

KIRSTIN FINNING, PETER MARTIN, AND GEOFF DANIELS

Transfusion 2012

**Report of the first nationally implemented clinical routine
screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the
requirement for antenatal RhD prophylaxis**

*Frederik Banch Clausen, Mette Christiansen, Rudi Steffensen, Steffen Jørgensen, Christian Nielsen,
Marianne Antonius Jakobsen, Rikke Dyhrberg Madsen, Karina Jensen, Grethe Risum Krog,
Klaus Rieneck, Ulrik Sprogøe, Keld Mikkelsen Homburg, Niels Grønnet,
and Morten Hanefeld Dziegiel*

**Noninvasive Fetal RhD Status
Determination in Early Pregnancy**

Fetal Diagn Ther 2014

Sebastian Manzanares^a Carmen Entrala^a Mar Sánchez-Gila^a
Francisco Fernández-Rosado^b Davinia Cobo^a Esther Martínez^b Luis Molina^b
Rosa Reche^a Alicia Pineda^a José Luis Gallo^a

**Sensitivity of fetal RHD screening for safe guidance of targeted
anti-D immunoglobulin prophylaxis: prospective cohort study
of a nationwide programme in the Netherlands**

BMJ 2016

Masja de Haas,^{1,2,3} Florentine F Thuriq,^{1,4} Catharina P B van der Ploeg,⁵ Barbera Veldhuisen,^{1,3}
Hoang Hirschberg,⁶ Aicha Ait Soussan,¹ Heleen Woortmeijer,³ Frithjofna Abbink,⁷
Godelieve C M L Page-Christiaens,⁴ Peter G Scheffer,⁴ C Ellen van der Schoot¹

Screening a livello regionale:

Belgio
Svezia
Francia
Gran Bretagna
Spagna
Italia

Screening a livello nazionale:

Danimarca
Olanda
Finlandia

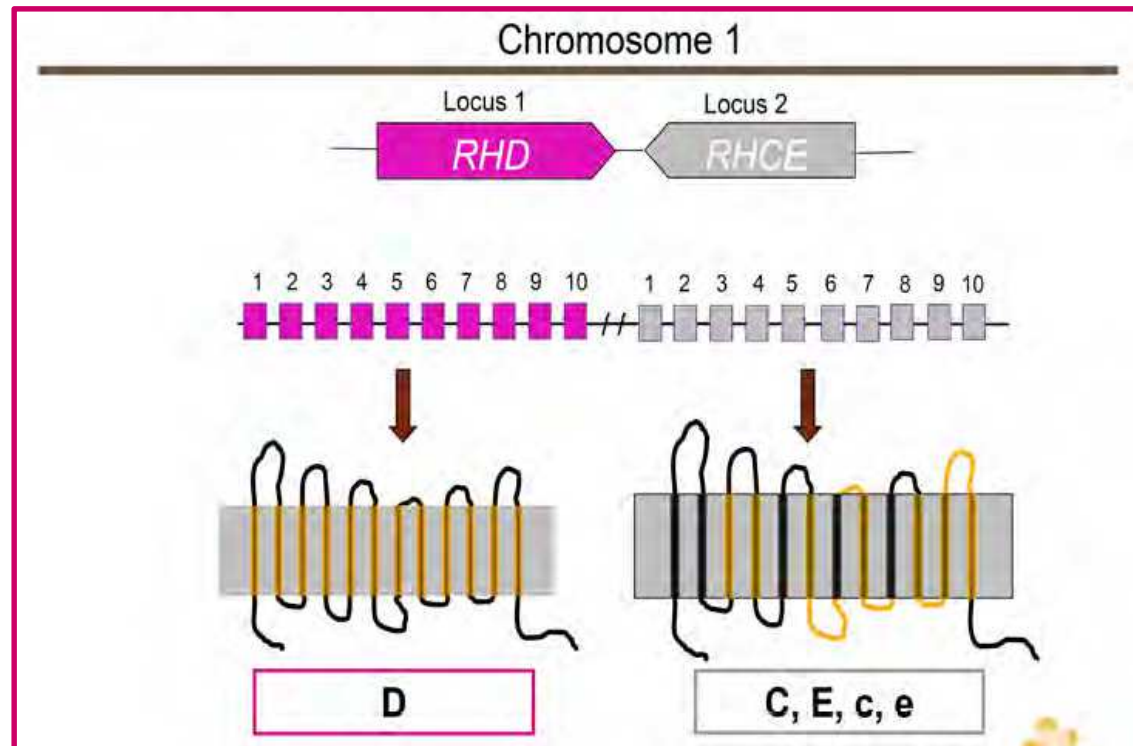
Genetica del Sistema Rh

Geni: *RHD* (1p36.11), *RHCE* (1p36.11)

***RHD* ed *RHCE*:** 10 esoni (75 kb); omologia di sequenza del 93,8%

Prodotti genici: proteine palmitolate di 417aa che attraversano 12 volte la membrana eritrocitaria;

- Proteina RhD esprime l'antigene D;
- Proteina RhCE esprime gli antigeni C, c, E, e.



Classificazione fenotipica

D positivi (gene *RHD* funzionale)

D deboli, D parziali, DEL

D negativi

D varianti
1-2%

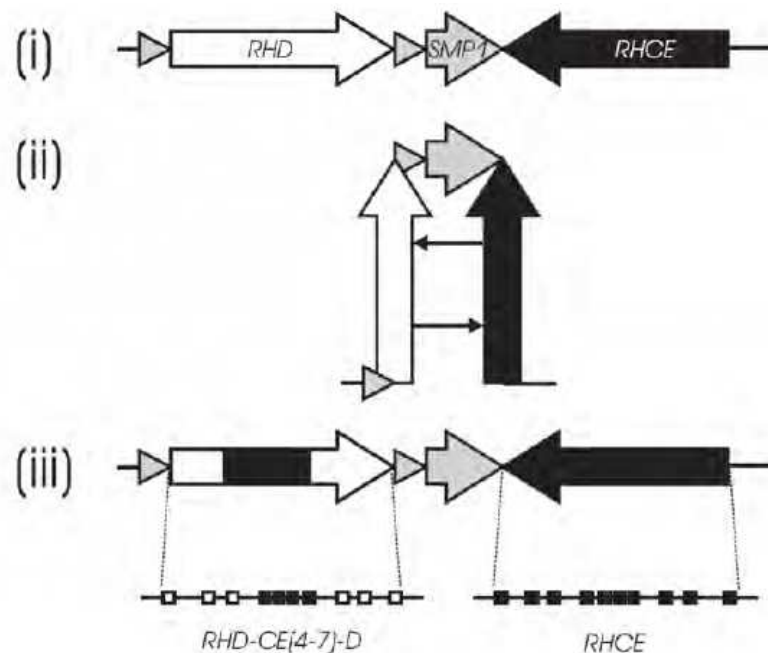
Basi molecolari varianti alleliche

Oltre 280 alleli *RHD*:

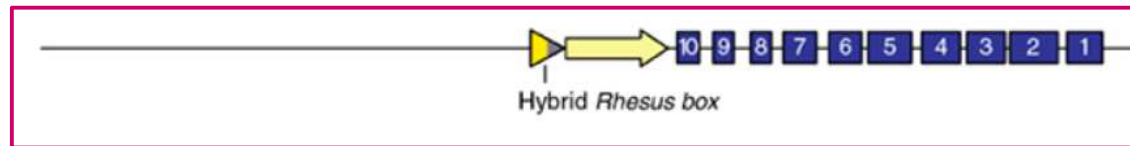
SNPs (single nucleotide polymorphisms)

Alleli ibridi *RHD/RHCE*

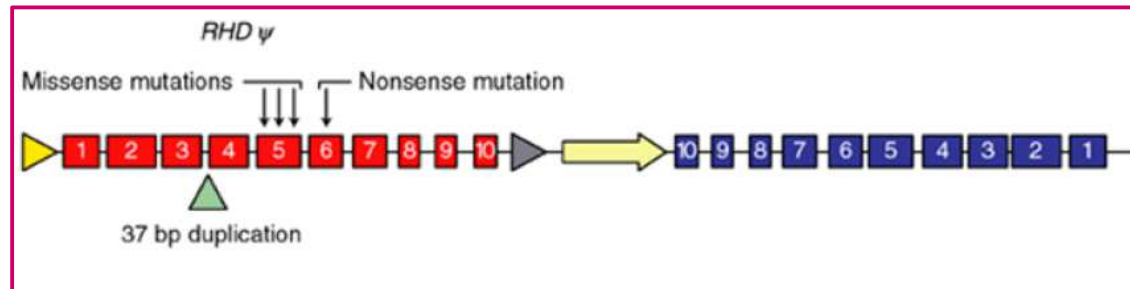
Delezioni



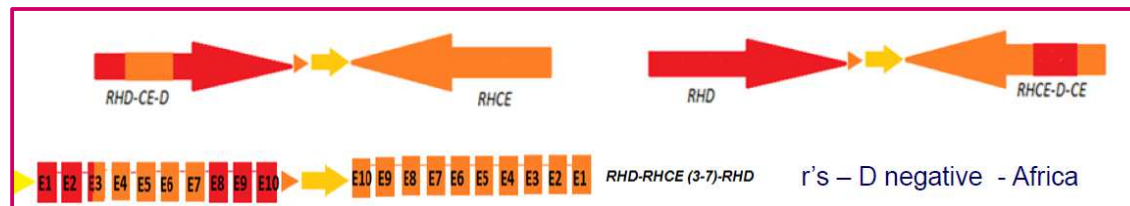
Basi molecolari fenotipo D negativo



Nei Caucasici
Gene deleto

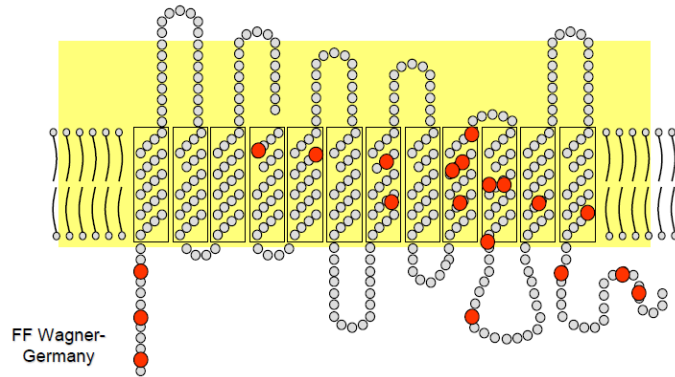


67% Africani
*RHD*ψ*



15% Africani
RHD-CE-D^S
RHCE-D-CE

D deboli (D Weak)



0,2-1% Caucasici hanno fenotipo sierologico D debole
95% ha genotipo *RHD* debole tipo 1, 2, 3

Non si immunizzano

NO PROFILASSI



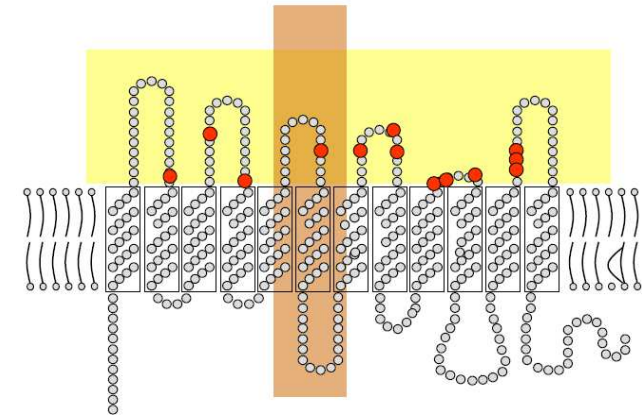
D parziali

Sostituzioni aminoacidiche nella porzione extra-membrana

Mancanza di uno o più epitopi (**alloimmunizzazione**)

Distribuzione geografica

SI' PROFILASSI



DEL

Europa
Weak D type
1, 2, 3, 4.0/4.1
Partial DVI
DBT
DHM
Dhar
DFR



Africa
Weak D type
4.2/DAR
DAU
DOL



Asia
Del

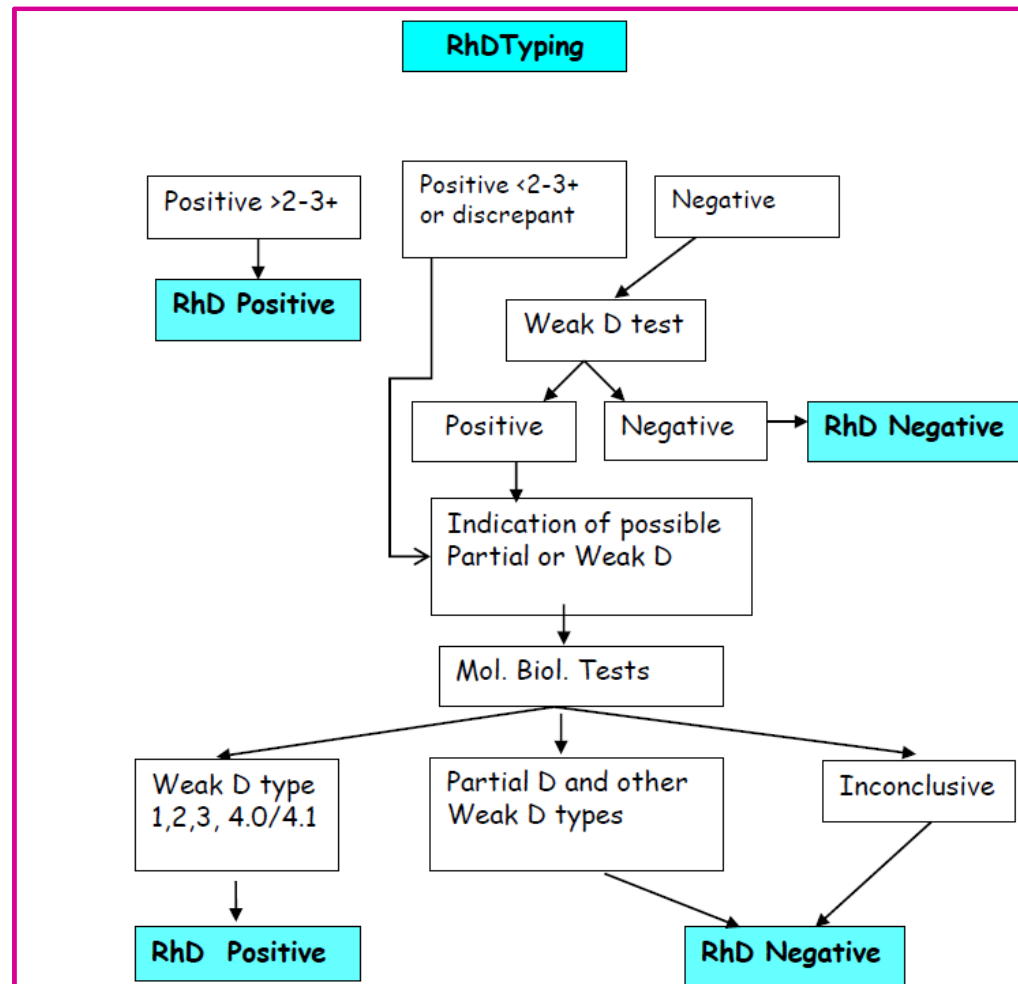
Varianti molto deboli
Presente in >30% della popolazione asiatica D-

Rischio Alloimmunizzazione

SI' PROFILASSI



Protocollo di Tipizzazione Rh nelle donne in gravidanza

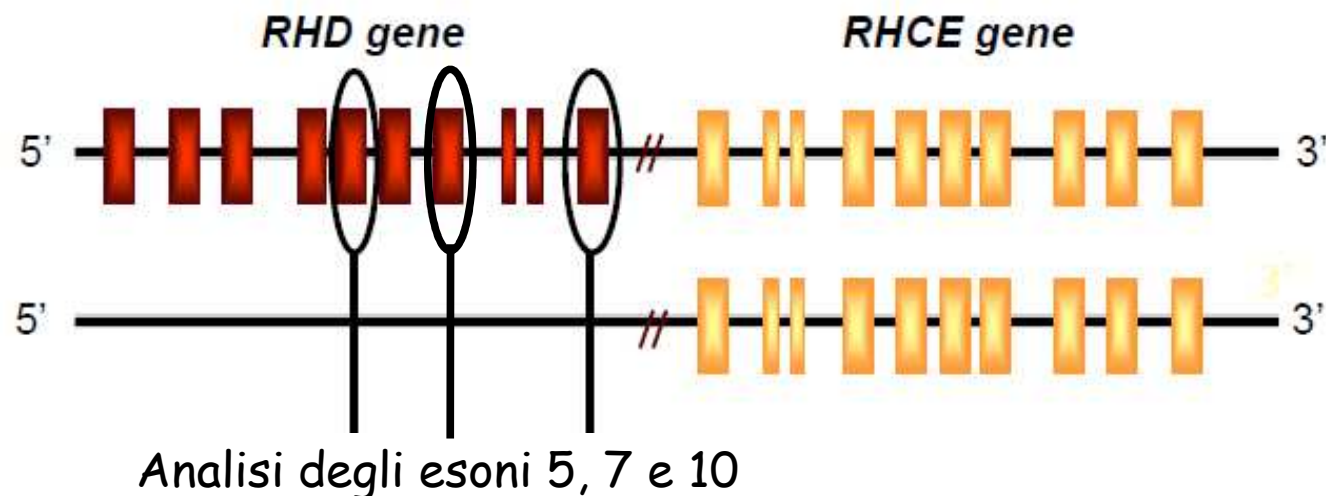


In assenza di conferme in biologia molecolare, le donne in gravidanza con tipizzazione dubbia devono essere considerate Rh negative

Caratteristiche del test per genotipo *RHD* fetale

Non individua direttamente il fenotipo D- fetale ma lo presume in base al risultato negativo ottenuto a seguito dell'amplificazione specifica di parti del gene

- **Efficienza** di estrazione: automazione e presenza di CQ interno
- **Specificità**: deve distinguere *RHD* da *RHCE*
- **Precisione**: amplificazione mirata di regioni del gene (5,7,10)
- **Sensibilità**: capacità di rilevazione in relazione alla SG



Fasi del test di genotipizzazione

Raccolta
Campioni
in EDTA

Separazione
plasma per
Centrifugazione

Estrazione
DNA

RT-PCR ed
Interpretazione
dei Risultati
(Cq)

Accuratezza: Automazione e Standardizzazione dei Metodi (convalide)



Accuratezza Diagnostica

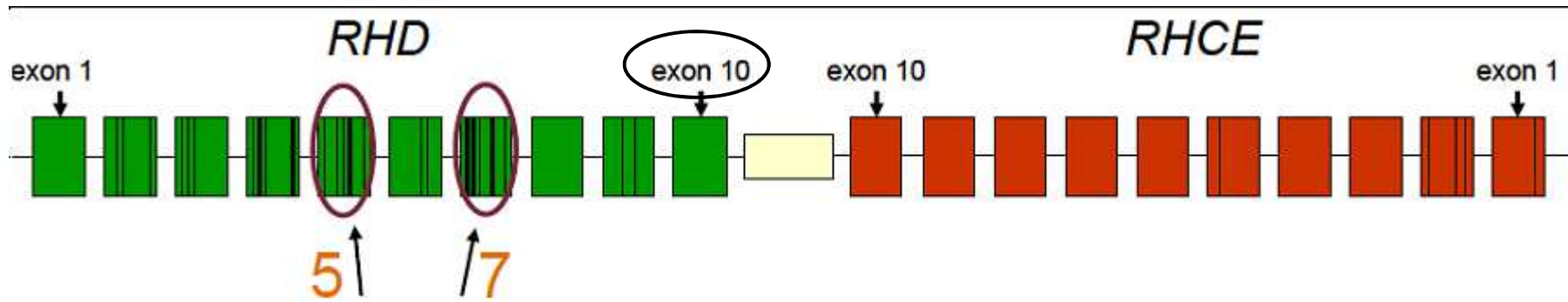


Specificità=% dei veri negativi correttamente identificati
(veri negativi/veri negativi+falsi positivi)

Sensibilità=% dei veri positivi correttamente identificati
(veri positivi/veri positivi+falsi negativi)

Confronto tra dati prenatali e dati sierologici postnatali

Specificità



Esone 5 non viene amplificato nella maggior parte delle varianti *RHD*:

-Nei Caucasici *RHD**DVI

-Negli Africani: *RHD** Ψ , *RHD**01.N06, *RHD**03N.01 (*r*'s)

Esone 7 è invece presente in molte varianti e assente negli ibridi

Esone 10 è sempre presente

	Exon			<i>RHD</i> Genotype
	7	10	5	
Cq > 35 (fetus)	+	+	+	Positive
	+	+	-	DΨ, DV, DBS, DVI
	-	-	-	Negative (always control on a 2nd blood sample)
	-	-	+	Negative (DHAR)
	-	+	+	Positive (DIV)
	-	+	-	dCe ^s , DBT
	+	+	+	<i>RHD</i> silent maternal gene (ser. neg)
Cq ≤ 35 (mother)	+	+	+	Positive
	+	+	-	DΨ, DV, DBS, DVI
	-	+	+	Positive (DIV)
	-	+	-	dCe ^s , DBT

Sensibilità

Country	Samples tested	Gestational week	N° of replicates	Sensitivity (%)	False negatives
Netherlands Van der Schoot, 2006	1257	30	3	99.6	3
United Kingdom Finning, 2008	1869	8-38	3	99.7	3
Germany Müller, 2008	1022	6-32	2	99.7	2
Denmark Clausen, 2012	2312	25	3-4	99.9	2
Sweden Wikman, 2012	3652	22-40	3	100	0
United Kingdom Daniels, 2012	956	11-13	3	99.8	1
Netherlands De Haas, 2012	6941	27	3	>99.6	NR

Controllo Interno DNA fetale (SRY,RASSF1A)
Ripetizione del test (diversa sg)

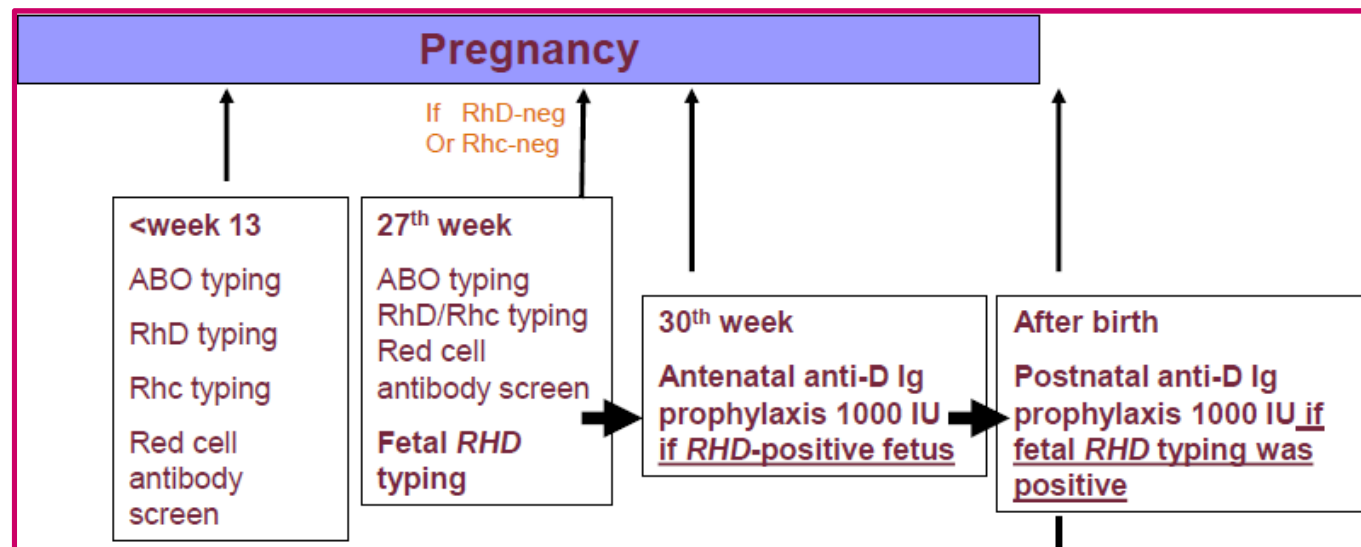
M.De Haas (BMJ 2016)

Fetal RHD test result (index test)	Cord blood serology result (reference standard)		Total No
	No positive	No negative	
Positive	15 816	225	16 041
Negative	9	97 39	9748
Total	15 825	9964	25 789

27^a sg

Sensibilità=99.94%

Specificità=97.74%



Dal Gennaio 2013 in Olanda non viene più eseguita la tipizzazione del neonato su campione cordonale

Studio Pilota in Spagna Screening *RHD* fetale nel 1° trimestre

Newborn RhD phenotype	Fetal <i>RHD</i> genotype		
	<i>RHD</i> positive	<i>RHD</i> negative	Total
RhD Positive	107	0	107
RhD Negative	1	67	68
Total	108	67	175

N. Nogues (2016)

Sensibilità: $107/107 = 100\%$

Specificità: $67/68 = 98.53\%$

Presenza di controllo interno fetale (*SRY*, *RASSF1A*) o ripetizione del test



- Attività Istituzionali nei Laboratori di Immunoematologia avanzata dei SIT (Milano, Roma, **Bologna: Progetto Regionale**)
- Linee Guida SIMTI (2018)

Genotipizzazione prenatale da amniociti/villociti in casi di alloimmunizzazione

AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA
"S.M. DELLA MISERICORDIA"
UDINE

DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASFUSIONALE DI AREA VASTA
Direttore: Dott. V. de Angelis
Laboratorio di Immunoematologia (tel.0432/552955)
Resp. Dott.ssa D. Londero

Cognome e Nome: [REDACTED]
Test prenatale su amniociti

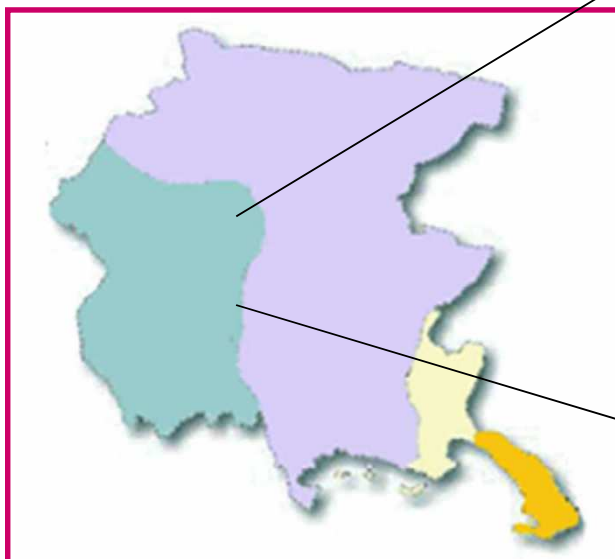
Reparto: IRCCS BURLO GAROFALO - TRIESTE
S.C.O. PATOLOGIA OSPETRICA
Dott. Gianpaolo Maso

TIPIZZAZIONE GENOMICA - KKD TYPE
Tecnica usata: PCR-SSP
Prelievo del: 05/04/2016

Genotipo	KEL*1, KEL*2	Fenotipo	Kk
Genotipo	JK*A, JK*B	Fenotipo	Jk (a+b+)
Genotipo	FY*B	Fenotipo	Fy(a-b+)

Udine, 26/04/2016

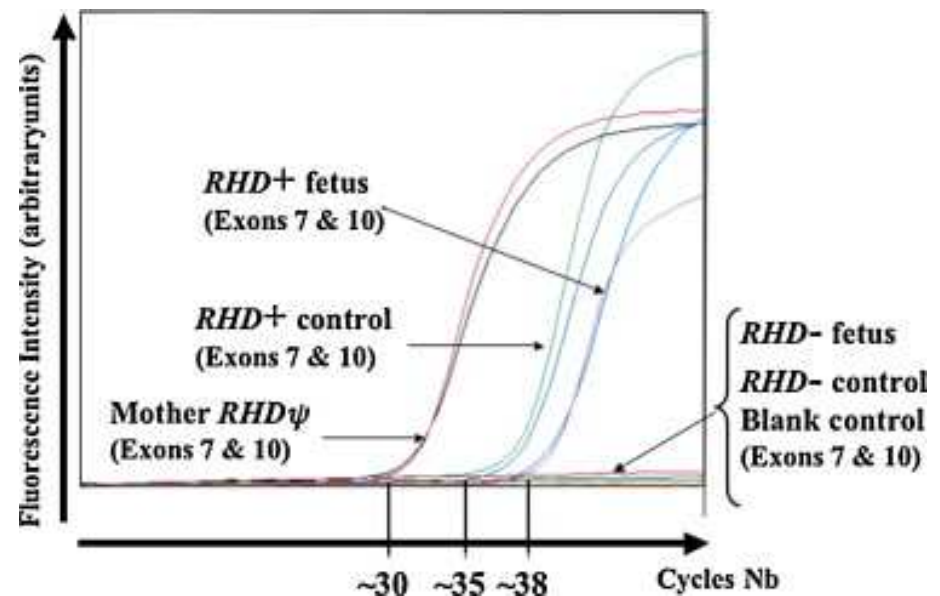
Il Responsabile
(Dott.ssa D. Londero)

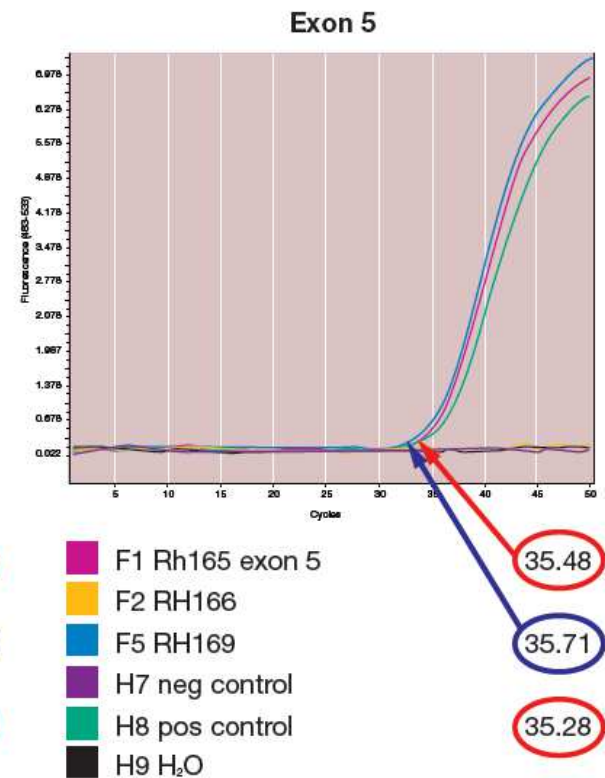
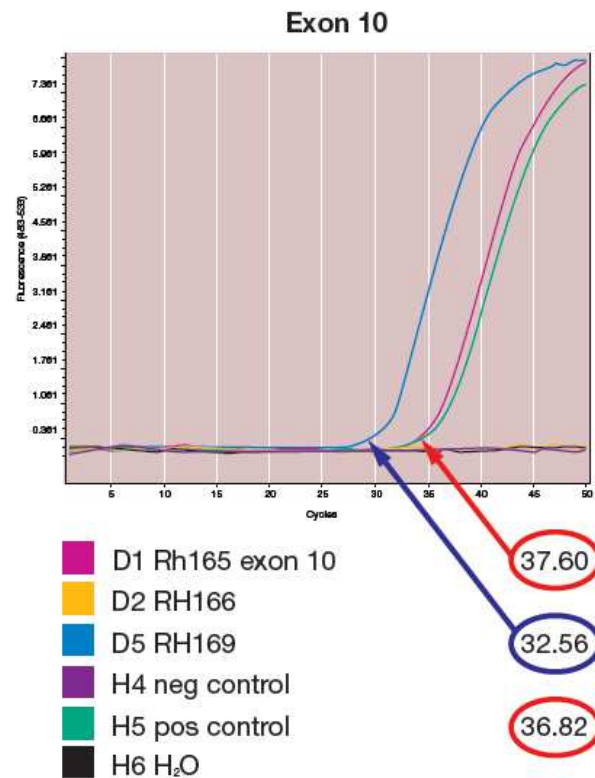
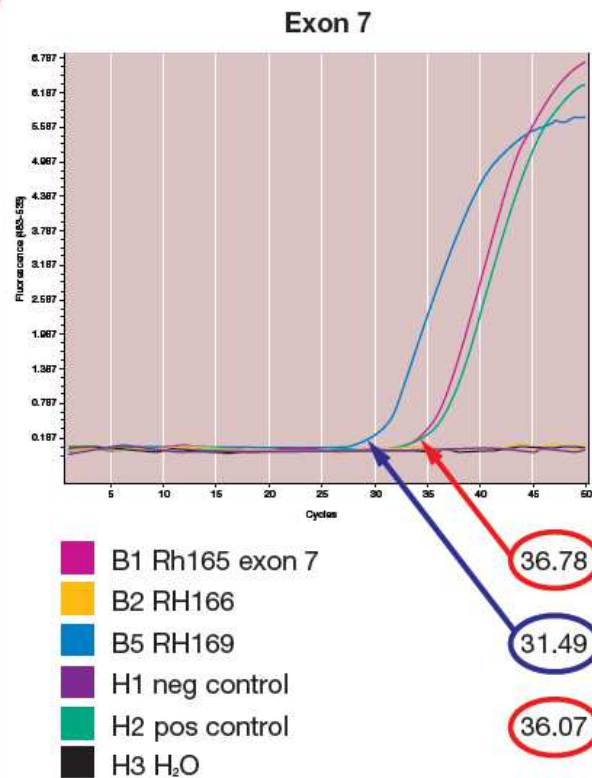


STUDIO GENIC
Genotipizzazione RHD fetale su cffDNA da plasma materno

GENIC: Convalida Metodica

- Estrazione cffDNA da plasma materno a partire dalla 12° (18°) con **estrattore automatico QiaSymphony** in presenza di Controllo neg, Controllo pos, e Controllo interno di amplificazione (DNA di mais)
- Rilevazione mediante PCR Real Time mirata su esoni 5, 7 e 10 gene *RHD* con Kit **Free DNA Fetal Kit® RhD**





Genotype Conclusion : RH165: positive
 RH166: negative
 RH169: positive (mat.Dψ)

Screening prenatale *RHD* fetale Regione Friuli Venezia Giulia

- Guidare l'appropriatezza nella somministrazione della profilassi anti-D
- Ridurre consumo emoderivati
- Guidare appropriato monitoraggio e trattamento alloimmunizzate



- **Determinazione genotipo fetale non-invasivo per altri Sistemi gruppo-ematici**
- **Ricerca HPA-1a nella prevenzione NAITP**

Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing

Sandra Wienzek-Lischka,¹ Annika Krautwurst,¹ Vanessa Fröhner,¹ Holger Hackstein,¹ Stefan Gattenlöhner,² Andreas Bräuninger,² Roland Axt-Fliedner,³ Jan Degenhardt,³ Christina Deisting,³ Sentot Santos,¹ Ulrich J. Sachs,¹ and Gregor Bein¹

TRANSFUSION 2015;55:1538-1544

Rieneck K. et al. **Next-generation sequencing: Proof of concept for antenatal prediction of the fetal Kell blood group phenotype from cell-free fetal DNA in maternal plasma** *Transfusion* (2013), 53: 2892-2898.

Studio collaborativo



“La possibilità di condividere conoscenze ed esperienze tra professionisti diversi usando nuove tecnologie rappresenta una grande opportunità per migliorare la qualità nella prevenzione e nella clinica a beneficio del paziente”