

CAT
CRITICALLY APPRAISED TOPIC

Titel: “Implementatie van foetale RhD-genotypering op materneel plasma”

Author: Amber Cousse

Supervisor: Dr. Simon Degandt, Dr. Henk Louagie

Datum: 18/06/2024

CLINICAL BOTTOMLINE

Objectives: Implementation of a non-invasive fetal RhD genotyping in maternal plasma without previous DNA extraction in the molecular laboratory of AZ Sint-Lucas Ghent, Belgium.

Background: Non-invasive fetal rhesus D (RhD) genotyping is widely implemented in different countries, mostly performed with a previous DNA extraction step. Since it is not possible to perform a previous DNA extraction in our routine workflow, we aimed to validate a fetal RhD genotyping kit without previous DNA extraction.

Methods: Plasma samples were collected by routine venipuncture from RhD negative pregnant women who underwent a glucose challenge test (GCT) and/or oral glucose tolerance test (OGTT). The Cell3™ Direct Rhesus D Fetal Blood Group Genotyping (Nonacus, Birmingham, UK) was used without previous DNA extraction. The PCR reactions were performed using the Bio-Rad CFX96 PCR detection cyclers (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA), and data was analyzed using the Bio-Rad CFX Manager software and custom analysis template. A method optimization was conducted, and a flowchart for result interpretation was developed specifically for our laboratory.

Results: A total of 36 samples from pregnant RhD negative women, between 19 until 36 weeks gestational age, were analyzed over 10 runs. The first five first runs were used to optimize the procedure, during which contamination was encountered. From the fifth run, data were considered reliable, allowing the development of the interpretation flowchart. Using this flowchart, all 36 samples were correctly identified for RhD genotyping.

Conclusion: Non-invasive fetal RhD genotyping in maternal plasma without previous DNA-extraction is possible in our laboratory if our developed flowchart is used for definitive result interpretation and adhering to strict hygiene measures.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO (max 1000 woorden)

Sinds de jaren 1960 worden routinematig anti-D immuunglobulinen (Ig) toegediend aan Rhesus D (RhD) negatieve zwangere vrouwen om de kans op hemolytische ziekte van de foetus en/of pasgeborene (HZFP) bij een volgende zwangerschap te verkleinen (1–3).

Indien een RhD-negatieve vrouw zwanger is van een RhD-positieve foetus kunnen er na foetomaternaal bloedcontact RhD-antistoffen worden aangemaakt bij de zwangere vrouw (= RhD allo-immunisatie). Wanneer bij een volgende zwangerschap de foetus opnieuw RhD-positief is, kunnen deze antistoffen via placentaire overdracht HZFP veroorzaken (1–5). HZFP kan eerder mild (vb. anemie, hyperbilirubinemie) tot mogelijks fataal (intra-uteriene of neonatale sterfte) verlopen (3,6). De aanmaak van deze RhD-alloantistoffen is ongeveer in 1,6% tot 15% van de zwangerschappen beschreven en is de meest frequente oorzaak van HZFP (2).

Om de incidentie op HZFP te doen dalen, wordt tot op heden aan elke RhD-negatieve zwangere vrouw anti-D Ig's toegediend op 28 weken zwangerschap, wat ook wel de "routine antenatale anti-D profylaxe" (RAADP) wordt genoemd. Daarnaast worden ook in gevallen van mogelijk sensitiserende events (vb. na val, invasieve procedures ...) en binnen de 72 uur postpartum indien serologisch RhD-positiviteit op navelstrengbloed wordt aangetoond, anti-D Ig's toegediend (1,3,4,6–8). Anti-D Ig's verhinderen allo-immunisatie doordat ze op foetale rode bloedcellen in de maternale circulatie binden waardoor geen RhD-antistoffen kunnen worden gevormd (5). In België wordt telkens een standaarddosis van 300 µg anti-D Ig's (commercieel beschikbaar als RhoGAM®) intramusculair toegediend (5,6,9). Echter, ongeveer 40% van de RhD-negatieve zwangere vrouwen is drager van een RhD-negatieve foetus waardoor zij onnodig aan dit bloedproduct worden blootgesteld (7). Een optimaler gebruik van anti-D Ig's zou niet enkel het risico op mogelijke sensitisatie verlagen, maar blijkt ook kosteneffectief te zijn (1,7,10,11).

Sinds 1997 heeft men methodes ontwikkeld om op celvrij foetaal DNA (cffDNA) een moleculaire genotypering uit te voeren van het RhD-gen. Op die manier kan de RhD-bloedgroep van de foetus op een niet-invasieve manier bepaald worden (1,4,12). In Nederland, Denemarken, VK, Zweden en Frankrijk wordt bij elke RhD-negatieve zwangere vrouw een foetale RhD-genotypering uitgevoerd (1,3,4,8). Zo wordt in Nederland en Denemarken deze test standaard samen met een antistofscreening op 27 weken bepaald. Indien de foetus dan RhD-positief blijkt te zijn, serologisch getest op navelstrengbloed, wordt op 30 weken zwangerschap RAADP toegediend, alsook postpartum (7,13). Tot op heden is er in België geen uniforme richtlijn over de foetale genotypering van RhD en wordt dit slechts in bepaalde gevallen terugbetaald (2,6,14).

Moleculaire RhD-genotypering op circulerend cffDNA in maternale plasma kan door middel van een geoptimaliseerde polymerase chain reactie (PCR) worden uitgevoerd (3,4,15,16). RhD wordt gecodeerd door het RhD-gen gelegen op chromosoom 1 en is de meest polymorfe bloedgroep van het humane bloedgroepsysteem, bestaande uit minstens 45 onafhankelijke antigenen. Omdat een RhD-negatieve moeder geen amplificeerbare RhD-gensequentie heeft, is het mogelijk om met een eenvoudige PCR-test RhD-positieve foetussen op te sporen (10,12). Belangrijk bij het testen van RhD-positiviteit op cffDNA is de tijdstip van afname tijdens de zwangerschap. Zo neemt de hoeveelheid circulerend cffDNA in het maternale plasma toe met de zwangerschapsleeftijd (3,4,10,15,16). Verschillende studies rapporteren dan ook de hoogste accuraatheid bij stalen afgenomen in het tweede of derde trimester van de zwangerschap, maar in principe zou dit mogelijk zijn vanaf een zwangerschapsleeftijd van 11 weken (4,5,17,18). Daarnaast kunnen RhD-negatieve vrouwen en/of foetussen drager zijn van het "RhD-pseudogen", een niet actief RhD-gen, dat frequenter voorkomt in de Afrikaanse populatie. Dit zou vals positieve resultaten in deze moleculaire PCR kunnen veroorzaken. Daarom wordt aangeraden om een multiplex PCR uit te voeren waarbij minstens 2 exonen van het RhD-gen worden getarget (10,12). Reeds verschillende studies uit Nederland, VK, Frankrijk en Denemarken toonden een hoge accuraatheid voor het opsporen van RhD-positieve foetussen met zowel uniplex- als multiplex-PCR assays aan indien afgenomen op een zwangerschapsleeftijd van minstens 25 weken (3,7,10,12).

Wat de mogelijke impact zou kunnen zijn van foetale RhD-genotypering in het laboratorium van het AZ Sint-Lucas Gent in de klinische praktijk en hoe dit geïmplementeerd kan worden, zal aan de hand van onderstaande onderzoeksvragen verder worden uitgediept.

QUESTION(S)

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?**

SEARCH TERMS

1. *MeSH Database (PubMed): “(blood group system, rhesus) AND (neonate) AND (expression)” [MeSH Terms]; “(Rhesus D expression) AND (neonates)” [MeSH Terms]; “(serology) AND (rhesus D)) AND (expression)” [MeSH Terms]; “(immuunfenotypering) AND (rhesus)) AND (newborn)” [MeSH Terms]*
2. *PubMed (Medline, from 1966): “Rhesus-D-genotyping”*
3. *International Organizations: Sanquin, RIVM, Nonacus*
4. *National Organizations: RIZIV, VVOG, BCFI*

ABBREVIATIONS

cffDNA	celvrij foetaal DNA
GCT	Glucose Challenge Test
HZFP	hemolytische ziekte van de foetus en/of pasgeborene
Ig	immuunglobulinen
NHS	National Health System
NIPT	Niet-Invasieve Prenatale Test
NTC	No Template Control
OGTT	Orale Glucose Tolerantietest
PCR	Polymerase Chain Reactie
PSIE	Prenatale Screening Infectieziekten en Erytrocytenimmunisatie
RAADP	Routine Antenatale Anti-D Profylaxe
RhD	Rhesus D
RIVIZ	Rijksinstituut voor Ziekte- en Invaliditeitsverzekering
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
VK	Verenigd Koninkrijk
VVOG	Vlaamse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie

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

In België zijn ongeveer 15% van alle zwangere vrouwen RhD negatief, waarvan gemiddeld 2 op 3 zwanger zijn van een RhD-positieve foetus (19). Anti-D Ig's zijn in België beschikbaar als een standaarddosis van 300 µg (RhoGAM®) met een kostprijs van €42,18 euro per spuit. Dit wordt niet aangerekend aan de patiënt en valt volledig ten laste van het RIZIV (Rijksinstituut voor Ziekte- en Invaliditeitsverzekering) (categorie a) (5,8,14).

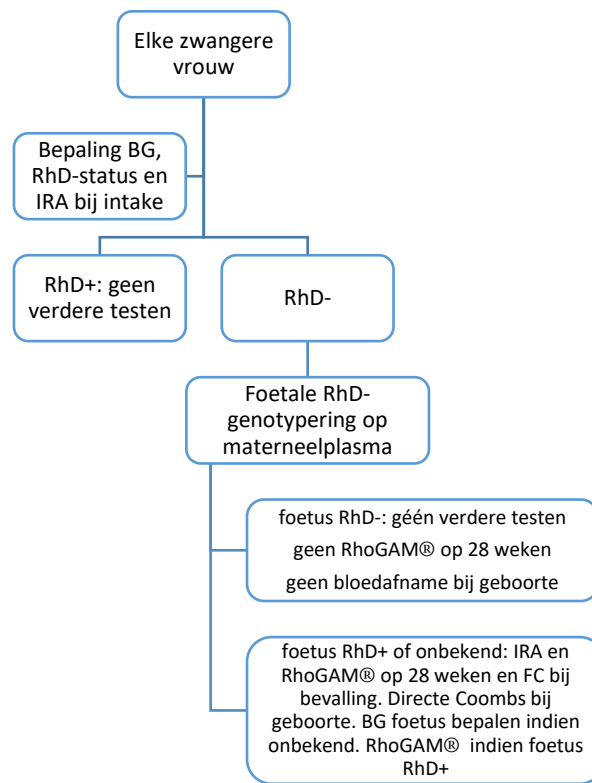
Een masterthesis uitgevoerd aan AZ Sint-Jan Brugge/UZ Gent heeft een kosten-batenanalyse uitgevoerd waaruit blijkt dat, wanneer systematisch foetale RhD-genotypering bij RhD-negatieve zwangere vrouwen in België zou worden uitgevoerd, dit kostenbesparend kan zijn voor het RIZIV indien er geen wijziging zou zijn in de huidige terugbetalingsregels (11). De kost voor de foetale RhD-genotypering zou dus voorlopig volledig ten laste van de patiënt vallen en bedraagt 35 à 50 euro, afhankelijk van het uitvoerende laboratorium (5,11). Men berekende dat indien deze analyse uitgevoerd zou worden op het extract van de niet-invasieve prenatale testen (NIPT), dit bedrag verlaagd kan worden tot ongeveer 11 euro (11). Daarnaast konden verschillende internationale studies reeds kosteneffectiviteit voor deze aanpak aantonen (1,7,10,11). Zo heeft een studie uitgevoerd in Canada aan de hand van een theoretisch model de kosteneffectiviteit berekend voor foetale RhD-genotypering op 25 weken zwangerschap tegenover het huidige RAADP-beleid. Men kon aantonen dat dit kostenbesparend kan zijn indien op een gestandaardiseerde manier de foetale RhD-genotypering wordt geïmplementeerd, zelfs indien men de (frequent) inconclusieve testresultaten en daarbij blijvend postpartum serologisch testen van de bloedgroep op navelstrengbloed wordt meegeteld. Hoe vroeger de test kan worden aangeboden tijdens de zwangerschap, hoe groter de kosteneffectiviteit aangezien er meer mogelijke toedieningen van RhD-Ig's zouden kunnen worden uitgespaard (6). Daarnaast heeft een studie uitgevoerd door het National Health System (NHS) in Bristol (VK) kunnen aantonen dat er kosteneffectiviteit is wanneer men systematisch RhD-genotypering implementeert bij zwangere RhD-negatieve vrouwen. Men zou gemiddeld 100 dosissen anti-D Ig's per maand uitsparen, waarbij zowel de kost van het product als de personeelskost voor toediening wordt uitgespaard (17). Uit de literatuur is echter gebleken dat er ook soms geen kosteneffectiviteit kan worden aangetoond, zoals in een oudere studie uitgevoerd in Engeland (20). Daarom is het belangrijk om meer duidelijkheid te kunnen schetsen over mogelijke kosteneffectiviteit van deze aanpak in België door een grootschalige studie hierover op te zetten, waaruit dan eventueel besloten kan worden tot terugbetaling van deze test (11). Tot op heden wordt slechts in bepaalde gevallen terugbetaling voorzien in België:

- 1) Indien de zwangere vrouw geïmmuniseerd is met anti-RhD antistoffen.
- 2) Indien bij een RhD-negatieve zwangere vrouw een invasieve actie dient te gebeuren (14)

Naast de relatief hoge kostprijs die de toediening van anti-D Ig's met zich meebrengt, is er ook een ethische discussie ontstaan omtrent het onnodig toedienen van een bloedafgeleid product (1,17,19). Deze ethische discussie gaat enerzijds over het feit dat men mannelijke vrijwilligers opzettelijk gaat immuniseren om het bloedproduct te verkrijgen. Anderzijds kan hier de vraag gesteld worden hoe ethisch het is om een bloedproduct aan een zwangere RhD-negatieve vrouw toe te dienen die eigenlijk de bloedgroep van de foetus niet kent. Toediening van dit product heeft in principe geen direct voordeel voor de zwangere en haar foetus, maar beschermt enkel de foetus bij een volgende zwangerschap. Zo stelt Kent et al. dat de introductie van foetale RhD-genotypering meer in overeenstemming zou zijn met de richtlijn om zo weinig mogelijk bloedproducten te verspillen waarbij dan ook het juiste product aan de juiste patiënt kan worden toegediend. Op deze manier zal een patiënt ook beter geïnformeerd zijn en mee kunnen deelnemen in het beslissingsproces om al dan niet anti-D Ig's toegediend te krijgen (1). Daarnaast brengt het toedienen van bloedproducten ook steeds een mogelijk risico van transmissie op ernstige ziekten met zich mee, hoewel in de praktijk dit risico toch laag blijkt (1,5,6). Ook treden vaak beschikbaarheidsproblemen van dit bloedproduct op (19).

Zoals vermeld in de inleiding, is er tot op vandaag in België geen uniforme richtlijn over de foetale RhD-genotypering ter beschikking (2,5). Recent heeft de Vlaamse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie (VVOG) een richtlijn uitgeschreven met een hoge aanbeveling voor het routinematig aanbieden van foetale RhD-genotypering aan RhD-negatieve zwangere vrouwen. Enerzijds op basis van aangetoonde kosteneffectiviteit

indien de prijs van de test laag genoeg is, en anderzijds de hoge accuraatheid van de test zoals aangetoond in verschillende studies. Men benadrukt steeds een goede counseling over de voor- en nadelen van deze typering en de kosten die hier voor de patiënt aan verbonden zijn (19). In Figuur 1 wordt een door het VVOG vooropgestelde flow voorgesteld voor RhD-negatieve zwangere vrouwen.



Figuur 1: Flowchart VVOG RhD bij zwangere vrouwen (BG = bloedgroep; RhD= Rhesus D; IRA = Ireguliere Antistoffen; FR = foetale cellen)

Omdat inconclusieve resultaten vaak optreden en een vals negatief resultaat van deze test niet uitgesloten is, heeft men in Zweden een grootschalige prospectieve observationele studie uitgevoerd om mogelijke RhD-immunisatie na implementatie van deze test in de praktijk te bepalen. Daarin heeft men kunnen aantonen dat indien enkel RhD-profylaxe wordt gegeven aan RhD-negatieve zwangere vrouwen die zwanger zijn van een RhD-positieve foetus na moleculaire genotypering, dit ook significant de incidentie op RhD-immunisatie bij deze zwangere vrouwen vermindert (21). Ook Teitelbaum et al. beschrijft dat deze aanpak niet zou leiden tot meer RhD-sensitisaties bij deze zwangere vrouwen (7).

Conclusie: Een meerwaarde voor foetale genotypering kan zeker worden aangetoond aangezien we op die manier minder zwangere vrouwen onnodig moeten blootstellen aan anti-D Ig's en omdat bijkomend in de meeste gevallen kosteneffectiviteit beschreven is indien deze test routinematig geïmplementeerd zou worden. Echter zal, zo lang er geen terugbetaling is, de kost van deze analyse ten laste van de patiënt vallen.

2. Is het haalbaar om foetale RhD genotypering op materneel plasma in het laboratorium van het AZ Sint-Lucas te implementeren?

Het doel is om een foetale RhD-genotypering op materneel plasma uit te voeren zonder voorafgaande extractie bij RhD-negatieve zwangere vrouwen aan een prijs van €37. Verschillende laboratoria voeren deze genotypering gelijktijdig op het bekomen extract van de NIPT uit (2,19). Aangezien in ons laboratorium de NIPT met een commerciële test (VeriSeq™ NIPT Solution, Illumina Inc., San Diego, Verenigde Staten) wordt uitgevoerd, waarbij er 1 Streck Cell-free DNA BCT® tube (Streck, Nebraska, Verenigde Staten) wordt afgenomen, blijft er onvoldoende extract over om hierop ook een RhD-genotypering uit te voeren (22). Indien we toch het extract van de NIPT zouden willen gebruiken, zou er een extra, duurdere, Streck Cell-free DNA BCT® tube (Streck, Nebraska, Verenigde Staten) moeten worden afgenomen waardoor het niet mogelijk zou zijn om de test uit te voeren aan een prijs van €37. Daarom werd de Cell3™ Direct Rhesus D Fetal Blood Group Genotyping van de firma Nonacus (Birmingham, VK) aangekocht en gevalideerd. Genotypering zou volgens de bijsluiter mogelijk zijn vanaf 11 weken zwangerschap, maar validatie-experimenten van de firma zijn uitgevoerd op stalen van RhD-negatieve vrouwen met een zwangerschapsleeftijd van 24 t.e.m. 26 weken. Daarom werden als een eerste fase stalen vanaf ongeveer 22 weken zwangerschapsleeftijd geanalyseerd. Hierdoor is er ook een hogere accuraatheid omdat de hoeveelheid circulerend cffDNA toeneemt met de zwangerschapsleeftijd en het gewicht van de vrouw (3,4,10,15,16). De kit spoort meerdere exonen op (exon 5, 7 en 10). Exon 5 is FAM gelabeld, exonen 7 en 10 zijn HEX gelabeld. Exon 7 is het meest specifiek voor de opsporing van het RhD-gen, exonen 5 en 7 dragen bij aan het opsporen van mogelijke varianten van het RhD-gen, vb. het “RhD-pseudogen” (10,12,23,24). Daarnaast wordt steeds ook het CCR5-gen opgespoord in het HEX-kanaal, dewelke dient als interne controle (23).

Vanaf eind december 2023 t.e.m. eind februari 2024 werden 39 EDTA-stalen van RhD-negatieve zwangere vrouwen verzameld afgenomen tijdens de glucose challenge test (GCT) en/of orale glucose tolerantietest (OGTT). Stalen werden volgens het eigen laboratorium protocol gecentrifugeerd en plasma werd diepgevroren (-80°C) bewaard tot analyse van het staal. Stalen werden geanalyseerd volgens het analyseprotocol vooropgesteld door de firma Nonacus op de Bio-Rad CFX96 PCR detection cyclers (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, Verenigde Staten van Amerika). In elke run werd een no template control (NTC) en een positieve en negatieve controle meegenomen. Stalen werden steeds in zes replicaten in het FAM-kanaal en vijf replicaten in het HEX-kanaal geanalyseerd. Interpretatie van de resultaten gebeurde doormiddel van de Bio-Rad CFX Manager software en analysetemplate van de firma Nonacus. Bekomen resultaten worden vergeleken met de serologische bloedgroepbepaling op navelstrengbloed uitgevoerd met het ORTHO BioVue® System kolom agglutinatie reagens op de ORTHO VISION™ Analyzer (Ortho-Clinical Diagnostics, San Diego, USA). Bloedgroepbepalingen op navelstrengbloed worden door de gynaecologen standaard aangevraagd bij postpartum RhD-negatieve vrouwen en postpartum vrouwen met bloedgroep O (zowel RhD-positief als -negatief) en konden zo vergeleken worden. Er werd ook een kort reproduceerbaarheidsexperiment (within-run) opgezet waarbij 1 foetaal RhD-negatief en 1 foetaal RhD-positief staal 3 keer in eenzelfde run werden geanalyseerd.

Er werden in totaal tien runs ingezet met telkens een NTC en een positieve en negatieve controle. Runs nul t.e.m. vier dienden vooral voor optimalisatie van “wet-lab” methode. Het gaat namelijk om een zeer gevoelige PCR-analyse, waarbij de minste blootstelling aan het RhD-gen (vals) positiviteit van de reactie kan veroorzaken. In de eerste runs (run één en twee) werden enkele stalen van RhD-positieve zwangere vrouwen meegenomen als positieve controle. Daarbij vertoonde de NTC positiviteit en de negatieve controle een inconclusief resultaat. In runs nul, drie en vier werden deze stalen niet meegenomen, maar werd er toch ook positiviteit van de NTC's en negatieve controles bekomen. Vermoedelijk was dit ten gevolge van contaminatie van aanwezigheid van RhD-gen in het PCR-lokaal en/of doordat de operator RhD-positief was. Na run drie werd een overleg met de firma ingepland die de gevoeligheid van test benadrukte en het belang van strikte hygiënemaatregelen. Vanaf run vijf werd de test ingezet door een RhD-negatieve operator waarbij handschoenen tussen elke centrifugestap werden gewisseld, voor, tijdens en na analyse gebeurde een extra decontaminatiestap met javel, de airco werd uitgezet, RhD-positieve medewerkers aanwezig in het PCR-lokaal tijdens het inzetten van de stalen droegen ook een mondkapje en bij elke run werden een nieuwe doos pipetten, nieuw PCR-water (Qiagen, Venlo, Nederland), nieuwe PCR-platen en nieuwe seals gebruikt. Daarnaast werden run vijf en zes door de operator ingezet met een

mondmasker. Omdat run zeven werd ingezet zonder mondmasker en de NTC en/of negatieve controles geen positiviteit vertoonden, werden de daaropvolgende runs ook zonder mondmasker ingezet.

Runs vijf t.e.m. negen werden gebruikt voor het opstellen van een eigen protocol voor interpretatie van de resultaten. Deze werd als een flowchart opgesteld (Figuur 2; Attachments 1.). De flowchart is opgesteld op basis van 54 analyses die in de vijf runs werden geanalyseerd, waarvan 39 unieke stalen en 12 herhalingen. De firma stelt een baseline threshold van 200 voorop voor zowel het FAM- als HEX-kanaal. Er waren echter meer inconclusieve resultaten (15) indien deze threshold werd ingesteld in tegenstelling tot de autocalculated threshold (10) en een threshold ingesteld op 500 (10) voor beide kanalen. In elke run voldeden de Ct-waarden voor het CCR5-gen van zowel de positieve als negatieve controle aan het vooropgestelde interval van de firma (Ct-waarde = 28-31), waardoor we deze kunnen behouden. Indien hieraan wordt voldaan, kan de run als valide worden beschouwd. Daarna worden stalen één voor één geëvalueerd. Te beginnen met de Ct-waarde van het CCR5-gen. Richtlijnen voor deze Ct-waarden voor het CCR5-gen zijn bepaald op basis van het 99%-betrouwbaarheidsinterval berekend op alle stalen. Indien een Ct-waarde < 37 voor het CCR5-gen wordt bekomen voor een staal, kan een resultaat als positief worden beschouwd indien minstens 3/11 reacties positief zijn en negatief indien 0/11 reacties positief zijn. Een inconclusief resultaat wordt bekomen indien 1/11 of 2/11 reacties positief zijn, maar dan kan er rekening worden gehouden met de bekomen Ct-waardes in het respectievelijke kanaal. Deze Ct-waardes werden geëvalueerd op basis van het 99%-betrouwbaarheidsinterval berekend op alle inconclusieve stalen per kanaal. Indien de Ct-waarde in het FAM-kanaal > 38 en/of Ct-waarde in HEX-kanaal > 39 is, kan dit resultaat als negatief worden doorgegeven. Indien kleiner dan de vooropgestelde Ct-waarden dient de analyse van het staal te worden herhaald. Indien een Ct-waarde tussen 37 en 38 voor het CCR5-gen wordt bekomen, kunnen positieve resultaten worden aanvaard indien minstens 3/11 reacties positief zijn en dienen negatieve resultaten opnieuw te worden geanalyseerd. De interpretatie van negatieve resultaten in geval van een Ct-waarde tussen 37 en 38 voor het CCR5-gen zal in een volgend validatie-experiment verder worden geëvalueerd. Indien een Ct-waarde > 39 voor het CCR5-gen wordt bekomen, kunnen positieve resultaten worden aanvaard indien minstens 3/11 reacties positief zijn en dienen negatieve resultaten opnieuw te worden geanalyseerd.

In Figuur 3 (Attachments 2.) wordt de verdeling van de zwangerschapsleeftijd in aantal weken van de geanalyseerde stalen weergegeven. Twee stalen zijn geanalyseerd geweest bij vrouwen op een zwangerschapsleeftijd beneden de 22 weken, maar dit had geen invloed op de resultaten. Ongeveer 42% (15/36) van deze stalen waren RhD-negatieve foetussen, wat overeenkomt met de bevindingen uit de literatuur (19).

Resultaten van het reproduceerbaarheidsexperiment na analyse volgens de eigen vooropgestelde flowchart zijn weergegeven in Tabel 1 (Attachment 3.). Indien de resultaten geïnterpreteerd werden zoals voorgeschreven door de firma, vertoonde het negatieve staal twee van de drie keer een inconclusief resultaat. Doordat voor het ene staal een Ct-waarde van 41,49 (HEX-kanaal) en voor het andere een Ct-waarde van 37,18 (FAM-kanaal) wordt bekomen, kunnen we op basis van onze vooropgestelde flowchart het eerste staal toch als negatief beschouwen. Er zou dan nog één van de drie stalen een inconclusief resultaat vertonen, met slechts 1/11 positieve reacties. Dit resultaat beschouwen we voorlopig toch als geslaagd. De resultaten voor het positieve staal vertoonden voor elke herhaling een positief resultaat met 9/11, 11/11 en 10/11 positieve reacties, wat we als een goede herhaalbaarheid beschouwen.

Voor verdere interpretatie van de resultaten werden slechts 36 van de 39 stalen in rekening gebracht. In run 6 was er namelijk een technische (pipetteer) fout gebeurd, waardoor het CCR5-gen in drie stalen niet opkwam. De analyses van deze drie stalen konden echter niet herhaald worden omwille van onvoldoende staalvolume. Omdat er een duidelijke oorzaak was voor deze inconclusieve resultaten, konden deze drie resultaten worden weglaten uit de eindbeoordeling. Indien de resultaten dan geïnterpreteerd zouden worden volgens het protocol van de firma, zouden er in totaal 32 stalen correct zijn gegenotypeerd en vertoonden vier stalen een inconclusief resultaat (1/11 of 2/11 positieve reacties). Na grondige heranalyse volgens de opgemaakte flowchart was er voor de 36 stalen een correct resultaat en werd er geen enkel resultaat nog als inconclusief beschouwd. Een overzicht van alle resultaten, inclusief de drie verworpen stalen, staan weergegeven in Tabel 2 (Attachments 4.).

Het lijkt haalbaar om een foetale RhD-genotypering op materneel plasma zonder voorafgaande DNA-extractie uit te voeren in het moleculair laboratorium van het AZ Sint-Lucas Gent, mits een verdere oppuntstelling van het protocol voor zowel het inzetten als aflezen van resultaten. Analytisch zal het vooral belangrijk zijn om strikte hygiënemaatregelen te nemen. Er dient daarbij overwogen te worden of deze test enkel door een RhD-negatieve operator zal worden ingezet of dat er bijkomende maatregelen zullen worden genomen om ook het inzetten door een RhD-positieve operator te laten gebeuren (vb. aankoop van een “dead air box”). Daarnaast is een overleg met de dienst gynaecologie belangrijk om onze manier van werken toe te lichten zodat patiënten correct geïnformeerd kunnen worden. Voorlopig zou een analyse vanaf 22 weken zwangerschap mogelijk zijn, waarbij idealiter een extra EDTA-staal wordt afgenomen bij de GCT. We mikken op een tweewekelijks inzetten van de stalen. Resultaten zouden dan tijdig gekend zijn om een eerste toediening van RhD-Ig's in geval van RhD-negatieve foetussen te verhinderen op 28 weken zwangerschap. Indien geen of een inconclusief resultaat zou worden bekomen, is er dan nog steeds voldoende tijd om een nieuw staal te vragen. In een volgende fase kan overwogen worden om een protocol op te stellen voor de analyse vanaf 12 weken zwangerschap na een uitgebreide validatie.

TO DO/ACTIONS

Vooreerst dienen we verder de methode analytisch te optimaliseren. Een verdere oppuntstelling van de manier van inzetten en aflezen van de runs is noodzakelijk om deze test in routine te kunnen implementeren. Daarnaast wordt er ook vooropgesteld om nog EQC-materiaal te analyseren en een between-run reproduceerbaarheidsexperiment uit te voeren.

Daarnaast is ook overleg met de dienst gynaecologie in verband met implementatie van deze test vereist, waarbij een consensus moet worden bekomen over het moment van staalafname, de kostprijs en de interpretatie van de resultaten.

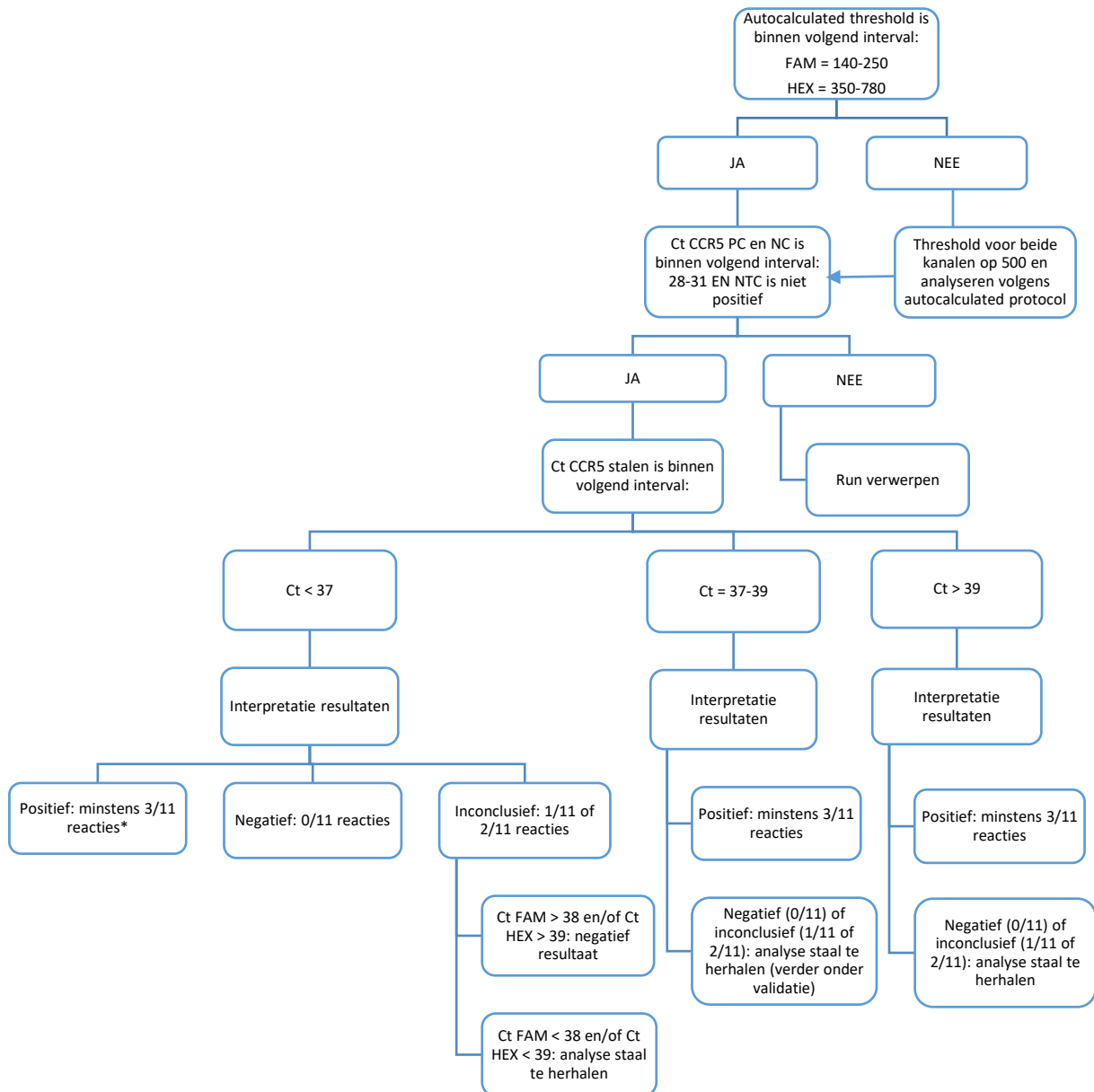
RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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 Geneesk*. 2023;(1).
6. Dekker N, Goemaes R, Neirinckx J, Seuntjens L, Smets K. Richtlijn: Zwangerschapsbegeleiding. *Domus Medica*. 2015;6.
7. 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.
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.
9. Belgisch Centrum voor Farmacotherapeutische Informatie (BCFI). Anti-D immuunglobulinen [Internet].

10. 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.
11. Van Haver A. Validatie van een eerste trimester niet- invasieve foetale RhD-genotypering voor een gerichte prenatale anti-d profylaxe (masterthesis UZ Gent). 2018.
12. 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.
13. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Beleid bij bloedgroep Rhesus (D)-negatief.
14. RIZIV. Nomenclatuur artikel 33 Genetische onderzoeken. In 2023. p. 1–9.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Veeken 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.
20. 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.
21. 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).
22. Illumina. VeriSeq NIPT Solution v2. 2022.
23. Nonacus. Cell3™ Direct : Rhesus D Fetal Blood Group Genotyping. 2023.
24. Wagner FF, Flegel WA. Review: The molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology.* 2004;20(1):23–36.

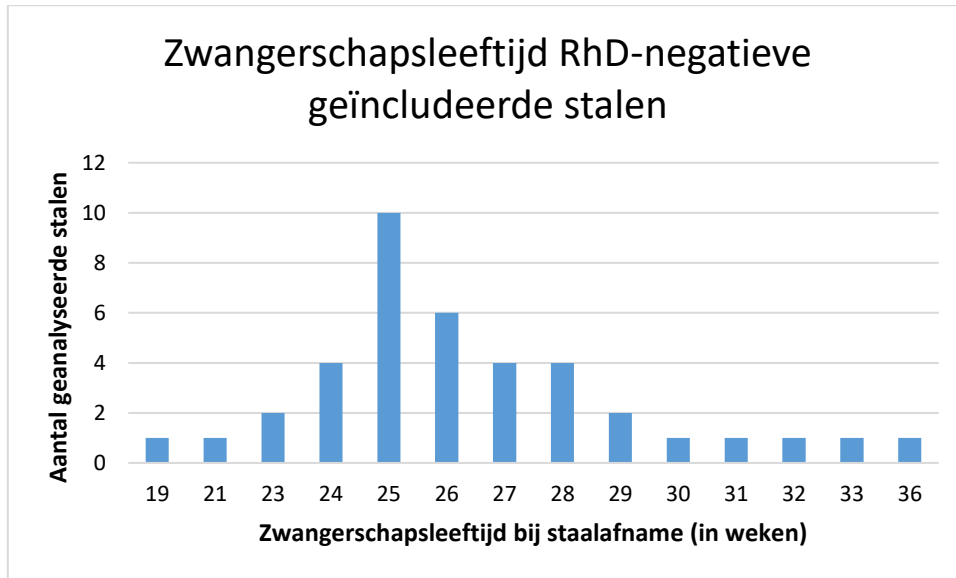
ATTACHMENTS

1. Flowchart voor interpretatie foetale RhD-genotypering in het AZ Sint-Lucas Gent



*Figuur 2: Flowchart voor interpretatie foetale RhD-genotypering in het AZ Sint-Lucas Gent (PC = positieve controle; NC = negatieve controle) (*Varianten kunnen eventueel worden opgespoord: indien geen enkele reactie opkomt in het FAM-kanaal, maar wel in het HEX-kanaal kan dit wijzen op de aanwezigheid van het "RhD-pseudogen". Dit gen komt niet tot expressie waardoor deze patiënten eigenlijk als vals RhD-positief worden beschouwd. Gedurende de validatieperiode werd geen zo'n staa geanalyseerd. Er wordt geopteerd om in het geval van zo'n resultaat dit toch als "RhD-positief" te rapporteren naar de kliniek.)*

2. Figuur zwangerschapsleeftijd van de geanalyseerde stalen



Figuur 3: Zwangerschapsleeftijd bij afname van de geïncludeerde RhD-negatieve zwangere vrouwen.

3. Tabel met resultaten reproduceerbaarheidsexperiment

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	1/11	1/11	0/11

4. Tabel met resultaten stalenanalyse

Tabel 2: Tabel met resultaten stalenanalyse voor en na implementatie van de eigen opgestelde flowchart. Resultaten in het **vet*** zijn resultaten die gewijzigd zijn na interpretatie met behulp van de flowchart.

Staalnummer	Aantal weken zwangerschap	Analyse run	Rhesus D navelstrengbloed	RhD- genotypering analyse volgens protocol firma	RhD- genotypering analyse volgens eigen flowchart
2312-27872	27	9	Positief	Negatief (CCR5 niet opgekomen)	Geen resultaat (CCR5 niet opgekomen)
2401-07818	28	6	Positief	Negatief (CCR5 niet opgekomen)	Geen resultaat (CCR5 niet opgekomen)
2401-08939	25	9	Negatief	Inconclusief (2/11)	Negatief*
2401-09490	25	6	Positief	Positief (7/11)	Positief (7/11)
NM	30	8	Negatief	Negatief	Negatief
2401-17756	23	6	Positief	Positief (6/11)	Positief (6/11)
2401-17666	27	6	Positief	Positief (9/11)	Positief (9/11)
2401-17898	27	6	Positief	Positief (11/11)	Positief (11/11)
2402-22617	32	5	Positief	Positief (11/11)	Positief (11/11)
2401-17867	26	6	Positief	Positief (9/11)	Positief (9/11)
2402-09259	29	5	Positief	Positief (11/11)	Positief (11/11)
2401-26235	27	6	Positief	Positief (10/11)	Positief (10/11)
2401-26569	31	5	Positief	Positief (11/11)	Positief (11/11)
2401-31299	36	9	Negatief	Inconclusief (1/11)	Negatief*
2401-32375	25	6	Negatief	Negatief	Negatief
2402-06584	26	8	Negatief	Inconclusief (2/11)	Negatief*
2402-20297	33	5	Negatief	Negatief	Negatief
2401-07395	24	6	Negatief	Negatief (CCR5 niet opgekomen)	Geen resultaat (CCR5 niet opgekomen)
2401-08945	24	6	Positief	Positief (9/11)	Positief (9/11)
2401-22433	24	6	Positief	Positief (7/11)	Positief (7/11)
2402-09316	28	9	Negatief	Negatief	Negatief
2401-19769	25	8	Negatief	Inconclusief (2/11)	Negatief*
2401-25429	25	9	Positief	Positief (10/11)	Positief (10/11)
2402-04202	26	8	Negatief	Negatief	Negatief
2402-15281	28	8	Negatief	Negatief	Negatief
2402-07593	19	7	Positief	Positief (6/11)	Positief (6/11)
2402-21410	21	9	Positief	Positief (10/11)	Positief (10/11)
2402-14325	25	7	Positief	Positief (8/11)	Positief (8/11)
2402-08806	24	9	Negatief	Negatief	Negatief
2402-08766	26	9	Negatief	Negatief	Negatief
2402-26139	29	9	Negatief	Negatief	Negatief
2402-05533	23	9	Positief	Positief (7/11)	Positief (7/11)
2402-14558	25	9	Positief	Positief (4/11)	Positief (4/11)
2402-15931	28	7	Positief	Positief (11/11)	Positief (11/11)
2402-20501	25	7	Positief	Positief (9/11)	Positief (9/11)
2402-21395	25	7	Positief	Positief (10/11)	Positief (10/11)
2402-23712	26	7	Negatief	Negatief	Negatief (7)

2402-23788	26	9	Positief	Positief (10/11)	Positief (10/11)
2402-27359	25	9	Positief	Positief (10/11)	Positief (10/11)