

PLACE DU LABORATOIRE DANS LA SURVEILLANCE DE L'ALLO-IMMUNISATION FOETOMATERNELLE : QUAND EST-IL EN 2014 ?

N.Benseffaj

Service de transfusion sanguine et d'hémovigilance

HER Rabat





INTRODUCTION

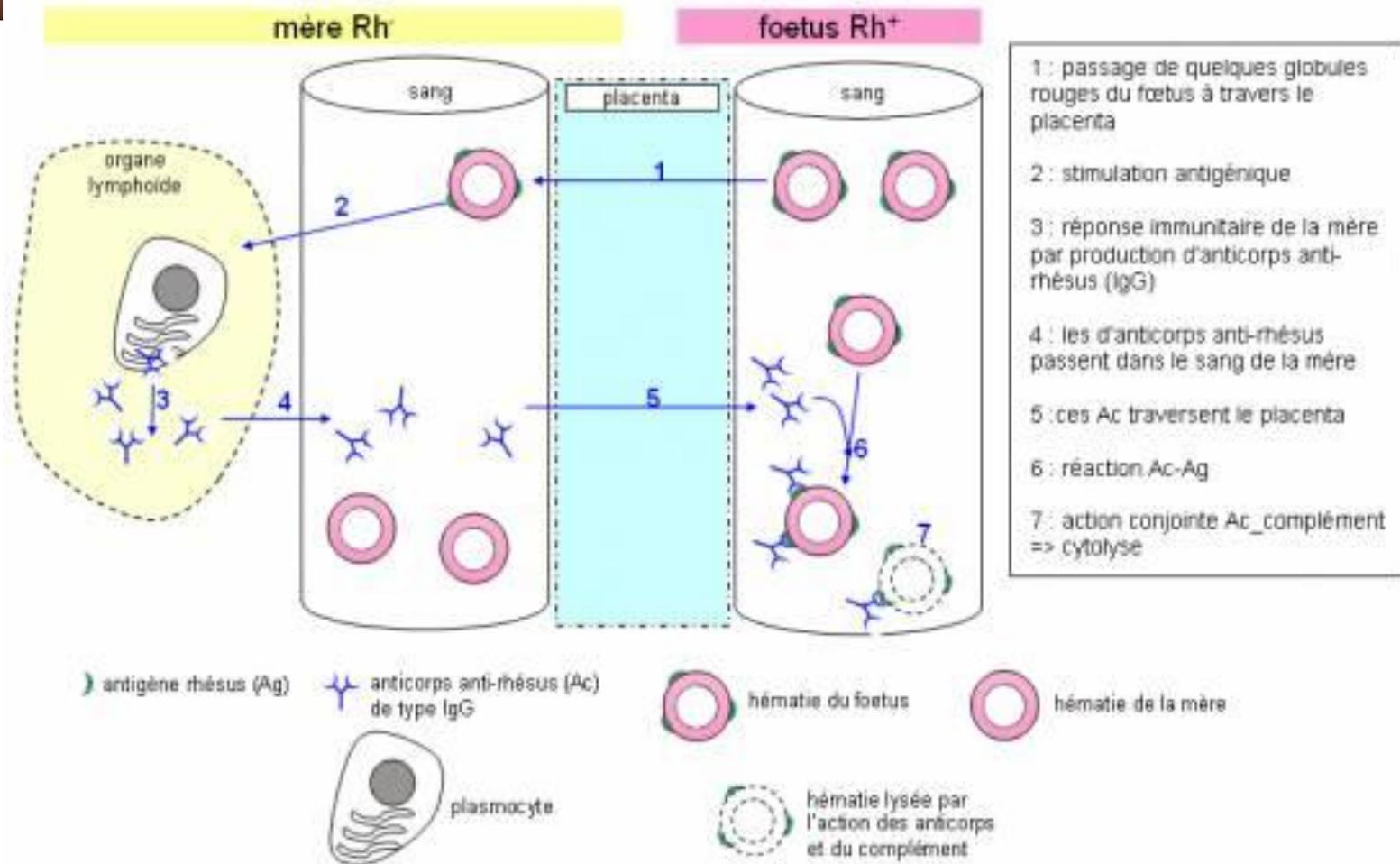
- ❑ Objectif de la prise en charge des allo-immunisations fœto-maternelles érythrocytaires:
 - dépister et surveiller l'allo-immunisation maternelle
 - apprécier le retentissement fœtal ou néonatal
 - mettre en place le traitement le plus adapté
 - surveillance post natale soigneuse en raison de l'anémie néonatale pouvant être prolongée et de la résurgence de cas d'ictères néonataux
 - prévention de l'allo-immunisation (en particulier RH1) devrait bénéficier de l'évolution des techniques biologiques afin de mieux cibler les femmes concernées

- ❑ Depuis quelques années de nouvelles techniques non invasives de surveillance prénatale ont permis de s'affranchir de la ponction du liquide amniotique :

- ❑ Prévention et prise en charge des mères RhD négatives:
 - nette diminution de l'incidence des allo-immunisation RH1 (RHD)
 - Actuellement: augmentation de l'incidence des autres allo-immunisations



Incompatibilité érythrocytaire materno-foetale





DEPISTAGE ET SURVEILLANCE DE L'ALLO-IMMUNISATION MATERNELLE

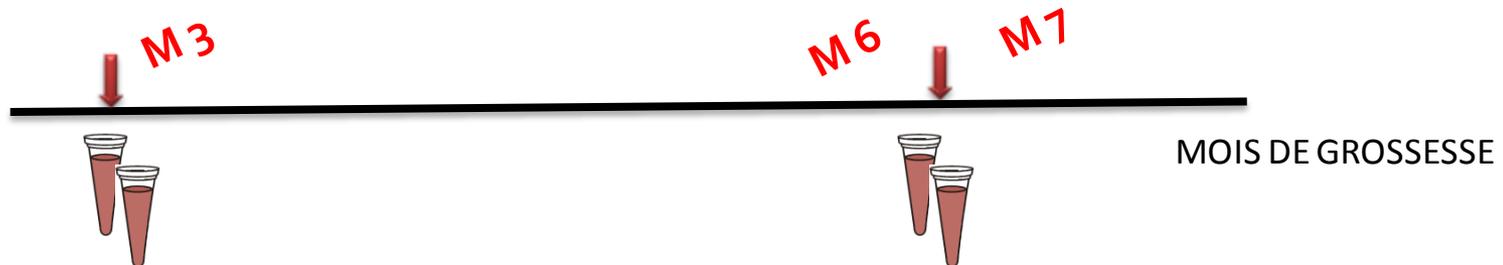


Détermination du groupe sanguin ABO-RH1 et du phénotype RH-KEL1

- ❑ Automatisation de la phase analytique et post analytique
- ❑ Transfert et impression directe des résultats à partir du système informatique:

- 1 seule détermination = 1 seule réalisation
- 1 réalisation = 2 épreuves (S et BV)
- 2 prélèvements différents à 2 moments différents

Loi française

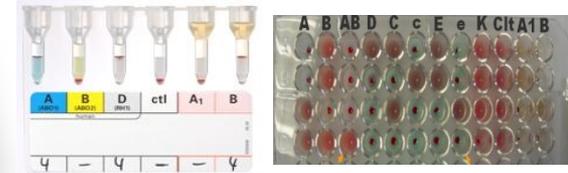




Techniques de groupage

Plaque d'opaline / Tubes à hémolyse

Microplaque / Colonnes de filtration



D faible+++

Biologie Moléculaire



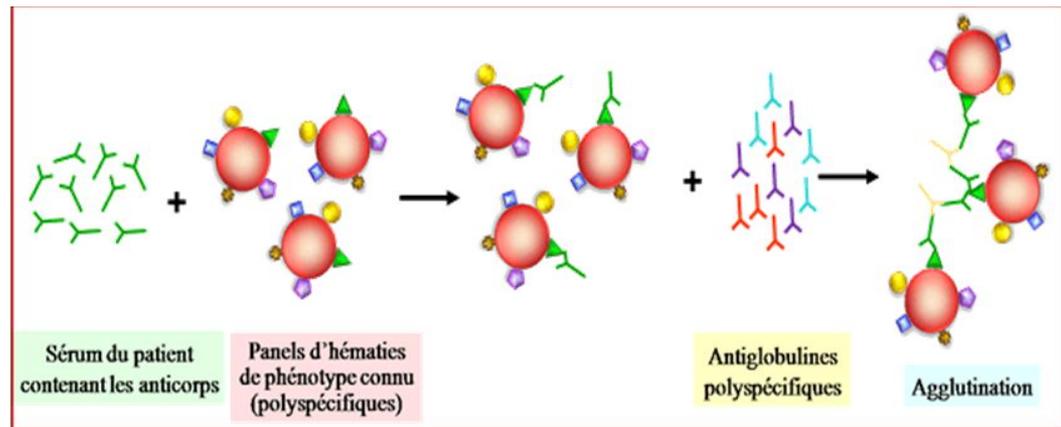


RAI: dépistage de l'allo-immunisation

- Test à l'antiglobuline humaine:

- Procédé de filtration++:

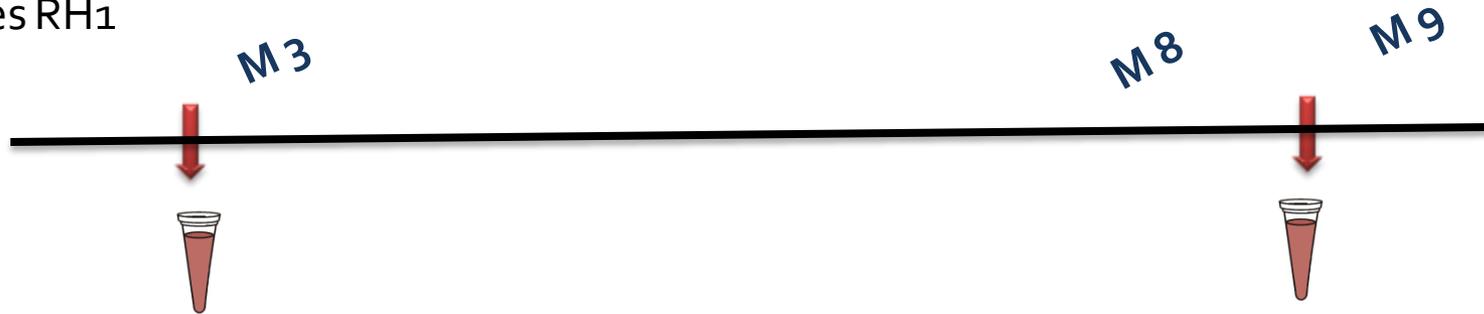
- seuil de sensibilité augmenté
 - archivage (intérêt ML)
 - maintien de la technique enzymatique n'est plus justifié: faux positif



Calendrier des RAI

MOIS DE GROSSESSE

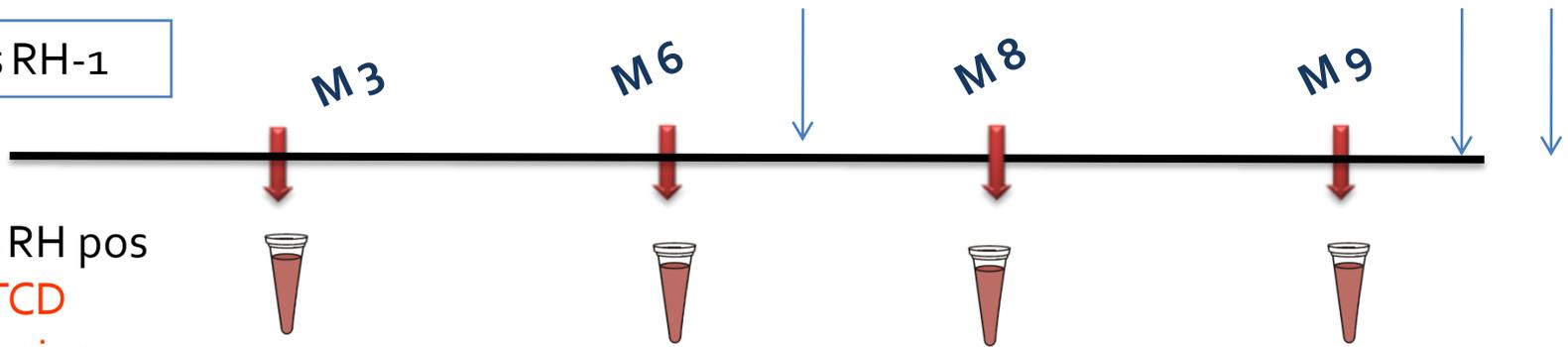
Femmes RH1



En cas d'injection d'Ig anti-D:

- 7 jours < l'injection systématique de la 28^{ème} semaine
- à l'accouchement: < l' injection et dans les 8 semaines > l'injection

Femmes RH-1



Femmes RH pos
si ATCD
transfusion



Identification des Ac

- Déterminer la spécificité des Ac immuns présents si RAI positive :
 - En cas d'identification d'Ac susceptibles d'entraîner des accidents d'IFM : surveiller l'évolution des Ac maternels

[P.Bricca et all., 2011]

Anticorps avec risque d'anémie sévère in utero	Anticorps avec risque limité à une maladie hémolytique postnatale	Anticorps sans risque de maladie hémolytique
Anti- D (+ C ou + E)	Anti- Fya, Fyb	Anti- Lea, Leb
Anti- c (c+ E)	Anti- Jka, Jkb	Anti- P 1
Anti- Kell	Anti- S,s, M	Anti- H, HI
	Anti- E	
	Anti- C	
	Anti- e	



Surveillance de l'évolution des Ac maternels

- Titrage des Ac :
 - Inutile si allo-immunisation anti-KEL1 (physiopath≠) : surveillance clinique du fœtus

 - Test indirect à l'antiglobuline humaine sur des dilutions géométriques de raison 2 du sérum maternel en solution saline 0,15 M
 - Titrage comparatif reprenant le sérum antérieur (peu reproductible)
 - **Technique en tube+++** car risque d'un taux > artificiellement et de façon aléatoire
 - Titre =inverse de la dernière dilution donnant une réaction positive



Surveillance de l'évolution des Ac maternels

- Dosage pondéral des Ac
 - pour les Ac RH uniquement, (RH1 si titre >8)
 - technique d'agglutination automatisée : **microfiltration**
 - reproductible

**Concentration d'anti-D
inférieure à :**

3 µg/ml

2 µg/ml

1 µg/ml

0,7 µg/ml

**Absence de risque d'anémie majeure avant le
terme de :**

24 semaines d'aménorrhée

28 semaines d'aménorrhée

35 semaines d'aménorrhée

40 semaines d'aménorrhée



Surveillance de l'évolution des Ac maternels

- Corrélation entre le titre des Ac et le dosage pondéral:
 - Dès le début de la grossesse, tous les mois jusqu'à 20 SA puis tous les 15 jours voir toutes les semaines si immunisation sévère
 - permet une bonne appréciation du risque d'anémie fœtale
 - Augmentation importante : situation d'IFM avec risque d'atteinte fœtale
 - Attention : fin de grossesse diminution peut correspondre à une consommation des Ac avec atteinte hémolytique grave



Distinguer entre Ac passifs (injection d'Ig anti-D) et allo Ac

- ❑ Femme enceinte RH-1 présentant un Ac RH1, en l'absence d'information concernant l'injection potentielle d'Ig anti-D

- ❑ Technique basée sur un test indirect à l'antiglobuline
 - Echantillon prélevé 48h > injection d'Ig anti-D pour différencier entre allo-Ac et Ac passif
 - Se référer aux concentrations attendues estimées par la formule de décroissance des IgG anti-D
 - Technique simple, rapide



Microtitrage

(1/2 vie des IgG = 21 jours environs, il reste en théorie >injection d'Ig anti-D :
50% à 3 semaines, 25% à 6 semaines et 12,5% à 12 semaines

Décroissance de la concentration sérique des anti-D après injection d'anti-D
(une unité CHP d'anti-D = 4 nanogrammes d'anti-D)

Delai après injection	Concentration sérique (en nanogramme d'anti-D/ml et Unité CHP) après l'injection de :			
	200 µg d'anti-D		300 µg d'anti-D	
	ng/ml	Unité CHP/ml	ng/ml	Unité CHP/ml
48 heures	30	7,5	45	11,25
1 semaine	24	6	36	9
3 semaines	15	3,75	22,5	5,625
6 semaines	7,6	1,9	11,4	2,85
9 semaines	3,8	0,95	5,7	1,425
12 semaines	1,8	0,45	2,7	0,675
15 semaines	0,9	0,225	1,35	0,3375



EVALUATION DU RISQUE DE L'ATTEINTE FOETAL



Détermination du génotype fœtal

- Génotype fœtal sur liquide amniotique
 - Autres Ag impliqués dans la MHNN
(réactifs pas toujours disponibles)
 - Amniocentèse invasive
 - Risque de potentialisation ou réactivation de l'allo-immunisation



Détermination du génotype foetal

□ Génotypage RHD dans le plasma maternel+++

- Présence d'ADN foetal libre dans le plasma maternel (présent dès le début de la grossesse, augmente progressivement, disparaît quelques mn > accouchement)
- Femmes RH-1 avec Ac anti-RH1 : à partir de la 10-12^{ème} SA
 - Résultat + : surveillance accentuée de la grossesse et de l'état foetal
 - Pour éviter les faux négatifs: réaliser une 2^{ème} PCR de confirmation 2 à 4 semaines plus tard



Détermination du génotype foetal

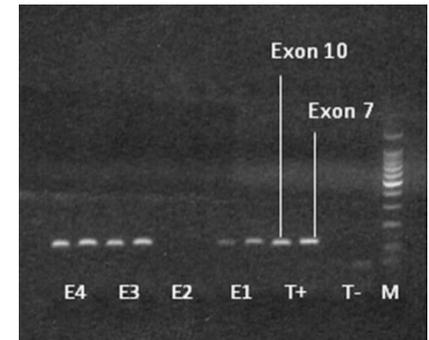
□ Génotypage RHD dans le plasma maternel

- Technique non invasive : PCR en temps réel, sensible et spécifique
 - Utilisation de primers spécifiques au niveau de 2 loci ≠ : éviter les erreurs
 - Amplification d'exons spécifiques du gène RHD, identifie aussi les variants géniques silencieux (pseudogène : Africains++)

Exons 7 et 10 [*Rouillac-Le Sciellour 2007*]

Exons 5 ++ et 7 [*Daniels 2007*]

Exons 4, 5 et 10 [*Guinchard et Al. 2014*]



- Excellente corrélation entre génotypage foetal et phénotype à la naissance



Détermination du phénotype paternel

- Recherche des Ag paternel correspondants aux Ac maternels



EVALUATION DU RETENTISSEMENT FŒTAL

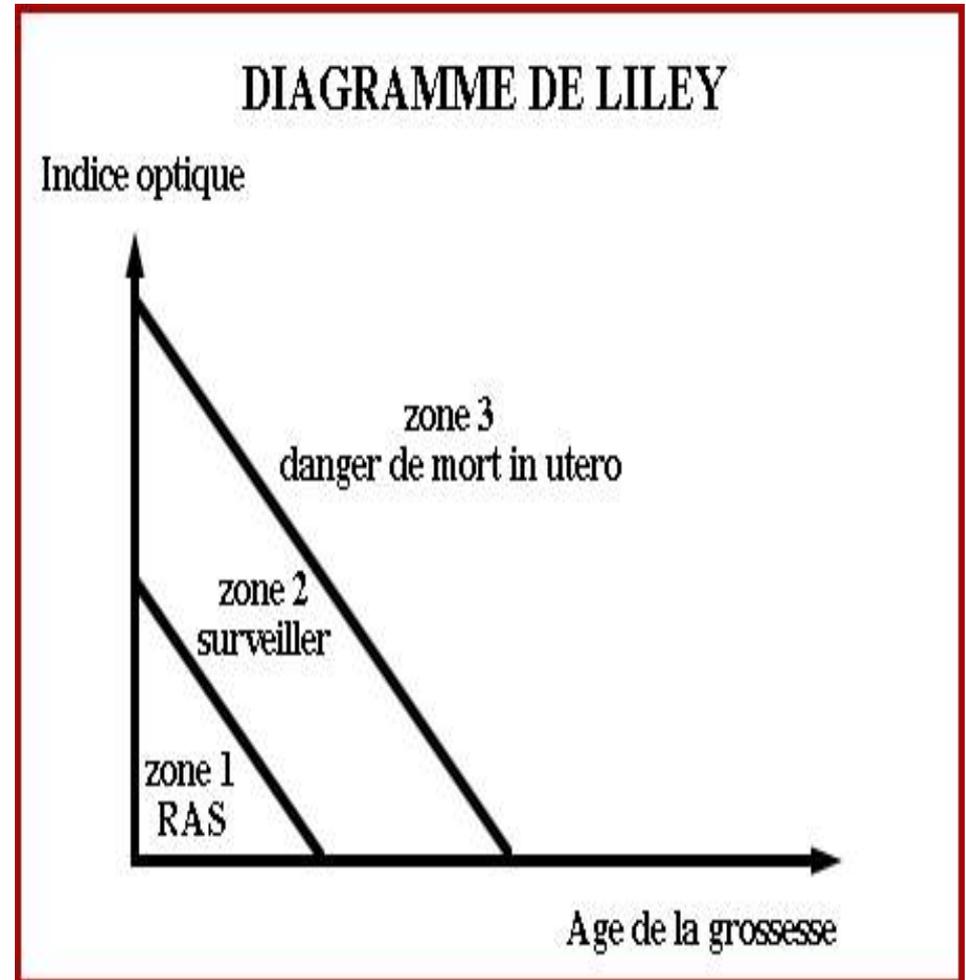
L'utilisation de la biologie a diminué au profit de techniques moins invasives de surveillance clinique et échographiques



Evaluation de l'anémie foetale

❑ Dosage de la bilirubine dans le liquide amniotique (indice de Liley) : historique

- Dosage par spectrophotométrie
- Diagramme de Liley permet une prédiction de l'anémie foetale





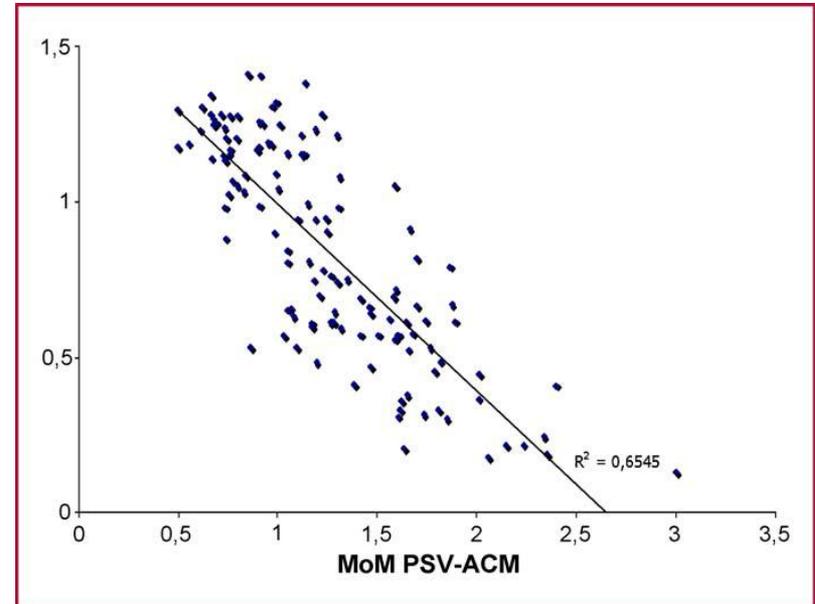
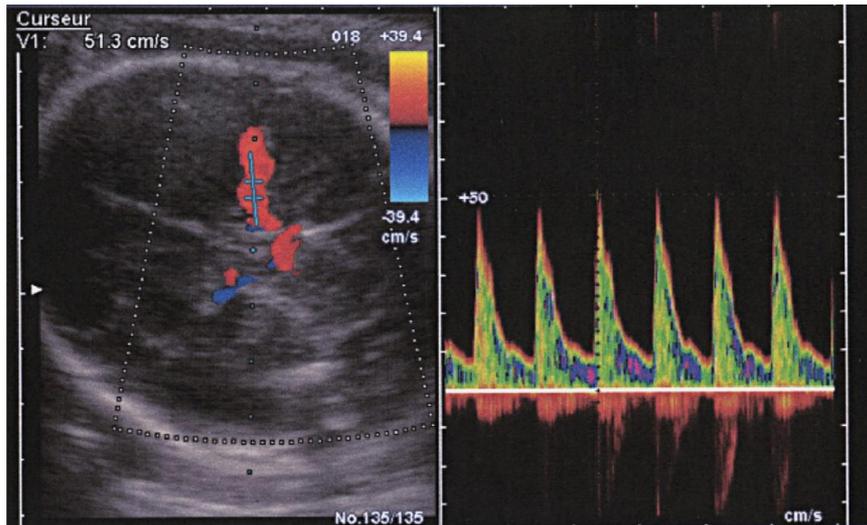
Evaluation de l'anémie fœtale

- ❑ Mesure du taux d'hémoglobine fœtal sur prélèvement de sang fœtal
 - Ponction de sang cordonal échoguidée
 - Invasif, risque de réactivation de l'immunisation
 - Contrôle de l'origine du sang fœtal par groupage I/i ou test de Kleihauer

- ❑ Mesure du pic systolique du flux sanguin de l'artère cérébrale moyenne+++
 - Doppler
 - Entre 16 et 35 SA, répéter plusieurs fois
 - suivi du retentissement hémolytique de l'IFM
 - repérer l'anémie chez le fœtus : $>1,5$ MoM =anémie dans 86% des cas.



Etude: 500 mesures sur 46 femmes enceintes ayant une allo-immunisation érythrocytaire CNRHP (centre national français de recherche en hémobiologie périnatale)



Excellente corrélation entre le pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne et le taux d'hémoglobine foetale, tous deux exprimés en MoM ($R^2 = 0,6545$; $p < 0,001$)



Evaluation de l'anémie foetale

□ Surveillance permet:

- Identifier l'anémie avant la survenue d'une anasarque
- Mee d'une anémie foetale sévère peut conduire à
 - Transfusion intrapéritonéal à un gestationnel très précoce (<20 SA)
 - Transfusion foetale intravasculaire en cas de terme précoce et/ ou d'anasarque
 - Extraction foetale lorsque l'âge gestationnel est avancé

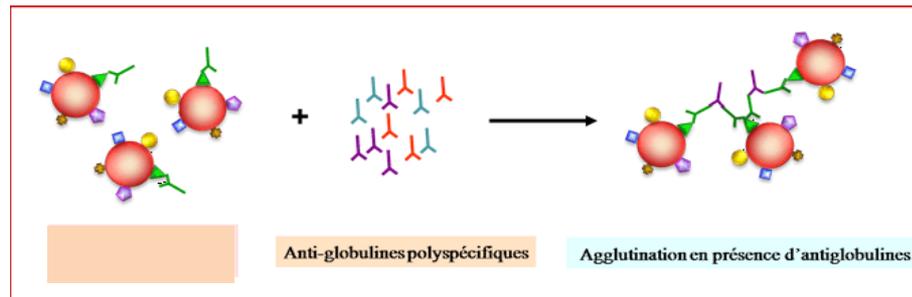


EXAMENS BIOLOGIQUES DU NOUVEAU NE



Dc positif de l'IFM à la naissance

- Test direct à l'antiglobuline (Coombs direct)
 - Positif= fixation d'Ac IgG sur les GR du Nné
 - Faiblement+ : si immunoprophylaxie au cours de la grossesse

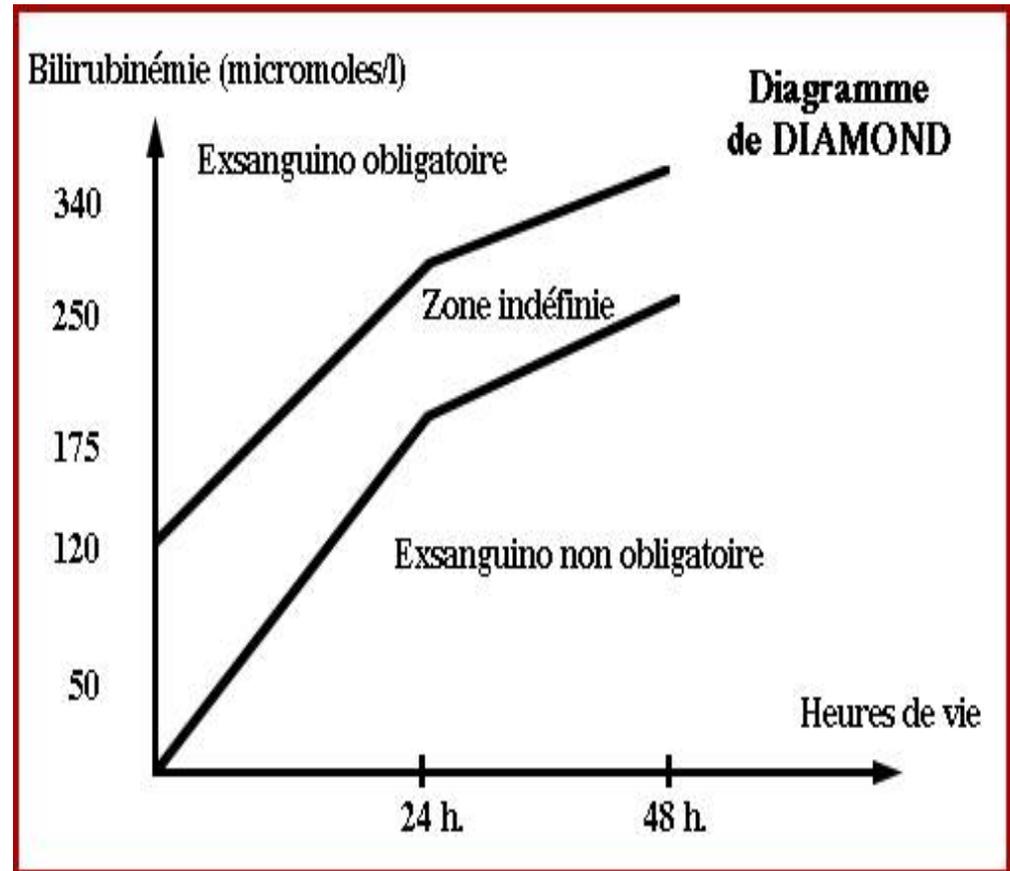


- Identification des spécificités après élution
- Phénotypage du Nné sur sang périphérique
 - Parfois difficile si Ac maternels fixés sur les GR qui cachent les sites Ag



Surveillance biologique de l'anémie et de l'hyperbilirubinémie néonatales

- ☐ Surveillance des Nnés régulière et prolongée pendant les premières semaines de vie





PREVENTION DE L'ALLOIMMUNISATION FOETO- MATERNELLE



Injection d'Ig anti-D chez toutes les femmes RH-1 :

- systématique à 28 SA pour les femmes non immunisées
- A l'accouchement d'un enfant RH1
- Pendant la grossesse lors de situations à risque d'hémorragies fœto-maternelle

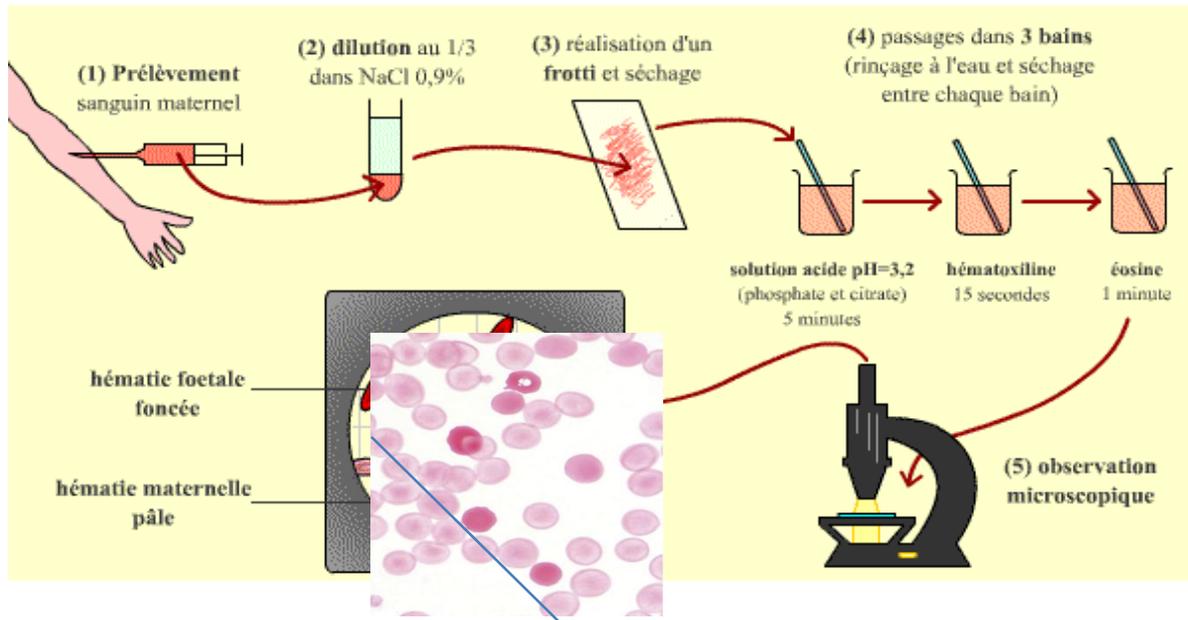
Actuellement:

Génotypage chez toutes les femmes enceinte de groupe sanguin RH-1 (RHD négatif), afin d'éviter des traitements prénatals anti-IgD inutiles pour 40% des femmes enceintes RH-1 portant un fœtus RH-1

Tests biologiques afin de mieux cibler la prévention :

■ Test de Kleihauer

- Recherche la présence d'hématies fœtales dans le sang maternel et quantifie ce passage sanguin
- Permet d'adapter la posologie des Ig anti-D
- Lecture délicate, interprétation subjective (pathologie de l'Hb)





KLEIHAUER (HF / 10.000 HA)	Dose de 100 µg*		Dose de 200 µg*		Dose de 300 µg		Voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	Doses	µg	
0-4	1	100	1	200	1	300	IV directe
5-24	2	200	1	200	1	300	
25-44	3	300	2	400	1	300	
45-64	4	400	2	400	2	600	
65-84	5	500	3	600	2	600	PERFUSION sur 4 heures Dilué dans 250 ml de NaCl à 9 pour mille
85-104	6	600	3	600	2	600	
105-124	7	700	4	800	3	900	
125-144	8	800	4	800	3	900	
145-164	9	900	5	1000	3	900	
165-184	10	1000	5	1000	4	1200	
185-204	11	1100	6	1200	4	1200	
205-224	12	1200	6	1200	4	1200	
225-244	13	1300	7	1400	5	1500	
245-264	14	1400	7	1400	5	1500	
265-284	15	1500	8	1600	5	1500	
285-304	16	1600	8	1600	6	1800	

* La dose la plus basse actuellement commercialisée en France est de 200 mg. Dans les cas où une dose de 100 mg serait suffisante, il est recommandé de ne pas fractionner les doses.

HF : hématies foetales ; HA : hématies adultes



Tests biologiques afin de mieux cibler la prévention :

- Cytométrie en flux anti-HbF
 - Marquage intracellulaire par anti-HbF
 - Double marquage par anhydrase carbonique des GR adulte : meilleure distinction des GR F
- Cytométrie anti-RH1
 - Identifier les hématies RH1 dans le sang maternel RH-1
 - Femmes RH-1 en cas de passage foeto-maternel au cours de la grossesse : injection ciblée d'Ig anti-D
- Génotypage RHD foetal sur plasma maternel
 - Femmes RH-1 , conjoint RH1 : identifier fœtus RH-1 (30-40% cas)
 - Eviter les injections prophylactiques d'Ig anti-D et donc l'exposition à un produit dérivé du sang
 - Impact économique ?





Quand est-il au Maroc?

□ Nombre de grossesses de femmes RH-1:

- Estimée à 128 000/an (total de 800 000 grossesses)
- 73% portent un enfant RH1

□ Suivi des femmes enceintes

- Grossesses non suivies dans 35% cas
- Grossesses suivies: pas de groupage ABO RH dans 30% cas
- Morbidité de la MHNF est aggravée par:
 - indisponibilité fréquente de l'anti-IgD
 - Délai de 72h pour l'injection après accouchement non respecté
 - Inadéquation de la dose administrée: 15% d'échec de la prévention

□ Génotypage (CNTS et CRTS de Rabat)

- Entre 10 et 34 SA
 - Technique de PCR conventionnelle
 - exon 7 et exon 10: recherche le gène RHD



AUTRES ALLOIMMUNISATIONS
ERYTHROCYTAIRES FOETO-MATERNELLES
et ALLOIMMUNISATIONS
PLAQUETTAIRES



Incompatibilité Fœto-Maternelle ABO

- De loin la plus fréquente
 - 2/1000 naissance (France)
 - 60 % des nouveaux nés A ou B de mère O
 -
- Protection contre l'immunisation antiRH-1 (RH4 et autres Ag érythrocytaires):
 - Séquestration splénique des hématies fœtales ABO incompatibles opsonisées par les Ac naturels ABO éviterait le contact de l'Ag RH1 avec les cellules du SI
- De gravité moindre
 - Atteinte hémolytique in utéro: rare
 - MHNN nécessitant un traitement transfusionnel à la naissance

❑ Pas de surveillance particulière pendant la grossesse



Allo-immunisation foeto-maternelle rhésus anti-RH3, 4 (anti-E et anti-c):

- Immunoprophylaxie préventive anti-RH1 (anti-D):
 - Diminution de la fréquence de la MHNN par allo-immunisation anti-RH1
 - Augmentation des cas d'allo-immunisation anti-RH4 (anti-c), anti-RH3 (anti-E) et anti-KEL1 (anti-kell)

□ Importance des RAI chez la femme enceinte même RH1 positive

- Si RAI+: identification et titrage (pas de titrage si anti-KEL1)
- Génotypage du groupe sanguin foetal
- Surveillance non invasive de l'anémie foétale

□ Bilan minimal à la naissance:

- Phénotypage érythrocytaire
- Coombs direct: test directe à l'antiglobuline humaine
- Recherche d'Ac par élution chez le Nné



Allo-immunisation plaquettaire fœto-maternelle :

- ❑ Numération plaquettaire:
 - ponction de sang fœtal en fin de grossesse/ Nné:
 - Thrombopénie si < 150 Giga/l
 - Thrombopénie sévère si < 50 Giga/l

- ❑ Thrombopénies fœtales et néonatales allo-immunes:
 - Sévère: risque d'hémorragie intracrânienne
 - Mee jeu du pronostic vital ou séquelles neurologiques

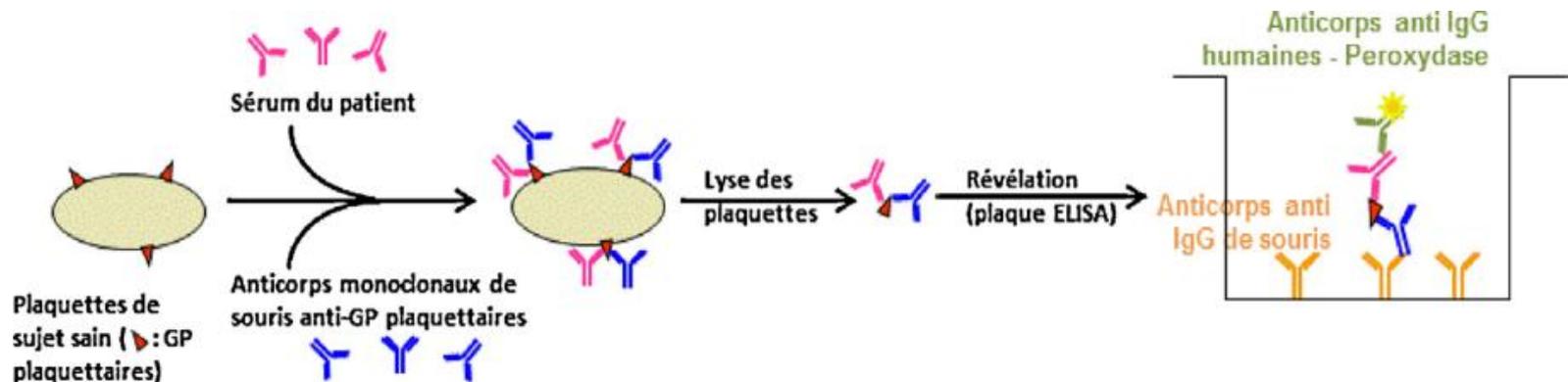
- ❑ Développement des techniques de biologie sensibles et fiables:
 - Prise en charge thérapeutique et surveillance des grossesses futures
 - Transfusions in utéro
 - Traitement maternel Ig Iv et corticoïdes



Allo-immunisation plaquettaire foeto-maternelle :

□ Détection et identification des Ac anti-plaquettes sur sérum maternel:

- ELISA capture: MAIPA (**M**onoclonal antibody-specific **I**mmobilization of **P**latelet **A**ntigen)
- Sérum maternel testé sur un panel de PQ génotypées de groupe O et des plaquettes paternelles
- Sensible et spécifique pour les allo-Ac les + fréquents





Détection et identification des Ac anti-plaquettes sur sérum maternel:

- ELISA alternative: MACE (modified antigen-capture Elisa)
 - Fixation de GP plaquettaire sur microplaque sans étape de lyse
- Mixed Passive Haemagglutination (MPHA)
 - Incubation du sérum avec PQ intactes, détection sans étape de lyse
 - Pas de quantification des Ac
- Luminex:
 - Dépistage des allo-Ac antiplaquettaires





Allo-immunisation plaquettaire fœto-maternelle :

☐ Typage plaquettaire:

- Phénotypage
 - Mais antisérums de référence rares, taux de PQ bas (thrombopénies)

- Génotypage par PCR
 - Fiable, rapide
 - avant: PCR-RFLP, actuellement: PCR-SSP la plus utilisée, récemment: PCR en temps réel

- Génotypage par Luminex
 - Génotypage simultané de 11 systèmes antigénique

- Puces à billes « Beadchip bioarray solution »
 - PCR multiplexe: amplification de plusieurs séquences nucléotidiques portant sur le polymorphisme PQ
 - Identification des polymorphismes par des billes de couleurs portant des sondes nucléotidiques
 - Interprétation de la fluorescence par un logiciel



CONCLUSION

- Evolution des techniques parallèlement aux progrès dans la prévention (Anti-IgD) : nouvelles approches
- Innovations techniques : ont permis de limiter les gestes agressifs de diagnostic et de surveillance au profit de méthodes non invasives.
- Génotypage : ≈ 600 DH / Ig antiD ≈ 700 DH dose : systématiser le génotypage?
 - Eviter injection de produit dérivé du sang, suivi plus rapproché des femmes à risque



MERCJ