

Feto-maternale Inkompatibilität: Bestimmung des fetalen RHD aus mütterlichem Plasma

Zusammenfassung

Die Bestimmung des fetalen RhD-Merkmals ermöglicht das frühzeitige Erkennen einer möglichen Inkompatibilität zwischen einer Schwangeren und dem ungeborenen Kind. Wurde in den letzten 30 Jahren allen RhD-negativen Frauen, unabhängig vom RhD-Merkmal des Kindes, eine Anti-D-Prophylaxe verabreicht, so bietet sich nun mit der Methode einer nicht-invasiven RhD-Bestimmung aus dem mütterlichen Plasma die Möglichkeit einer gezielten Anti-D-Prophylaxe. Basierend auf einer hohen Spezifität und Sensitivität (> 99 %) der nicht-invasiven RhD-Bestimmung wurde eine Empfehlung für diese Untersuchung in die aktuellen Mutterschaftsrichtlinien aufgenommen. Voraussetzung für den Einsatz in der Laborroutine ist eine ausreichende Validierung der gewählten Methode.

Summary

Determination of the fetal RHD genotype offers the opportunity to identify pregnancies at risk for the development of haemolytic disease of the newborn. In the last three decades all RhD-negative women in Germany were treated with anti-D-prophylaxis, independent whether the unborn child was RhD-positive or -negative. The non-invasive fetal RHD-genotyping offers the opportunity to treat only women with anti-D-prophylaxis when the fetus was typed as RhD-positive. Based on the high specificity and sensitivity (> 99 %) of non-invasive prenatal genotyping, the method is recommended to gynecologists as tool for the decision of anti-D-treatment.

EINLEITUNG

Eine Blutgruppenunverträglichkeit zwischen einer Schwangeren und dem ungeborenen Kind kann schwerwiegende oder gar lebensbedrohliche Komplikationen innerhalb der Schwangerschaft auslösen. Treten fetale Zellen in den mütterlichen Kreislauf über, so kann das Immunsystem der Schwangeren gegen kindliche Merkmale, die ihr selber fehlen, sensibilisiert werden und Antikörper bilden. Überwinden die maternalen Antikörper vom IgG-Typ die Plazentaschranke, besteht die Gefahr, dass die mit Antikörpern beladenen fetalen Zellen im retikulo-endothelialen System beschleunigt eliminiert werden. Die klinische Ausprägung einer dadurch entstandenen Alloimmunzytopenie ist im erythrozytären Bereich der Morbus hemolyticus fetalis / neonatorum (MHF / MHN). Der Schweregrad eines MHN kann beträchtlich variieren und reicht von einer leichten Anämie bis zu schweren Verläufen mit Ödemen und Aszitesbildung, sowie Pleura- und Perikardergüssen. Steigt die Bilirubinkonzentration im Blut des Neugeborenen durch eine Hämolyse an, kann die sich erst entwickelnde Kapazität der Leber zur Konjugation des Bilirubins überfordert sein. Bei sehr hohen Konzentrationen im Blut kann sich Bilirubin in Nervenzellen anreichern und sie irreversibel schädigen (Kernikterus). Eine feto-maternale Inkompatibilität ist prinzipiell für jedes Blutgruppenmerkmal denkbar, dennoch gibt es hinsicht-

lich der Häufigkeit von Antikörpern und der Ausprägung eines MHN deutliche Unterschiede (**Tabelle 1**). Während ABO-Unverträglichkeiten überwiegend einen milden Verlauf zeigen, besteht bei Antikörpern aus dem Rhesus- und Kell-Blutgruppensystem ein großes Gefährdungspotential für das ungeborene Kind.

Die Ursachen für diese unterschiedliche Ausprägung sind noch nicht vollständig geklärt. Die verschiedenen Blutgruppensysteme präsentieren eine unterschiedliche Anzahl von Antigenen an der Oberfläche der Erythrozyten. Ein Zusammenhang zwischen der Antigendichte und dem Schweregrad der Inkompatibilität könnte vermutet werden, diese Hypothese hält aber einer genaueren Betrachtung nicht stand. Für die ABO-, Diego- und MN-Merkmale werden ungefähr eine Million Antigene auf einem Erythrozyten angenommen, während Rh- und Kell-Merkmale tragende Strukturen nur mit 30.000 bzw. 17.000 Exemplaren pro Zelle vertreten sind. Bei Vorliegen eines anti-Kell-Antikörpers kann es neben einem beschleunigten Abbau der fetalen Erythrozyten zu einer gestörten Neubildung und dadurch zu einer fulminanten Entwicklung eines MHN kommen². Für die Rh-Merkmale könnten die Topologie des Rhesus-Proteins in der Erythrozytenmembran und das Fehlen eines antithetischen Antigens die Immunogenität des Rhesus-Systems erklären.

Blutgruppensystem	Gen Symbol	Anzahl von Antigenen	Blutgruppensystem	Gen Symbol	Anzahl von Antigenen
MHN mit schweren Verläufen			MHN bisher nicht beschrieben		
Rh	RH	45	P	P1	1
Kell	KEL	26	Lutheran	LU	18
Duffy	FY	6	Lewis	LE	3
Diego	DI	19	Yt	YT	2
Colton	CO	3	Xg	XG	1
MNS	MNS	43	Scianna	SC	3
MHN selten oder eher milde Verläufe			Dombrock	DO	5
ABO	ABO	4	Landsteiner-Wiener	LW	3
Kidd	JK	3	Chido / Rodgers	CH/RG	9
Kx	XK	1	Gerbich	GE	7
Hh	H	1	Cromer	CROM	10
			Knops	KN	5
			Indian	IN	2
			OK	OK	1
			Raph	RAPH	1

Tabelle 1: Blutgruppensysteme und das Risiko zur Ausbildung eines MHN (modifiziert nach Daniels)¹

RH-SYSTEM

Die Antigene des Rh-Systems werden durch zwei homologe Gene kodiert, die auf Chromosom 1 lokalisiert sind³. Die genetische Information für die Rhesus-Merkmale (RhD, C, c, E und e) befindet sich auf dem RHD- bzw. RHCE-Gen. Die molekulare Struktur von RHD und RHCE ist ähnlich, beide Gene verfügen über zehn kodierende Bereiche. In **Abb. 1** sind verschiedene Konstellationen dieser beiden Gene dargestellt.

Die häufigste Ursache für ein RhD-negatives Individuum in einer kaukasischen Population ist die Deletion des kompletten RHD-Gens⁴. Bei phänotypisch RhD-positiven Personen sind entweder ein oder zwei RHD-Gene vorhanden. Demgegenüber ist das RHCE-Gen in der Regel in doppelter Ausführung vorhanden (von jeweils einem Elternteil). Nicht mit den konventionellen serologischen Techniken, sondern nur mit molekulargenetischen Methoden lässt sich die Konstellation der RH-Gene zuverlässig

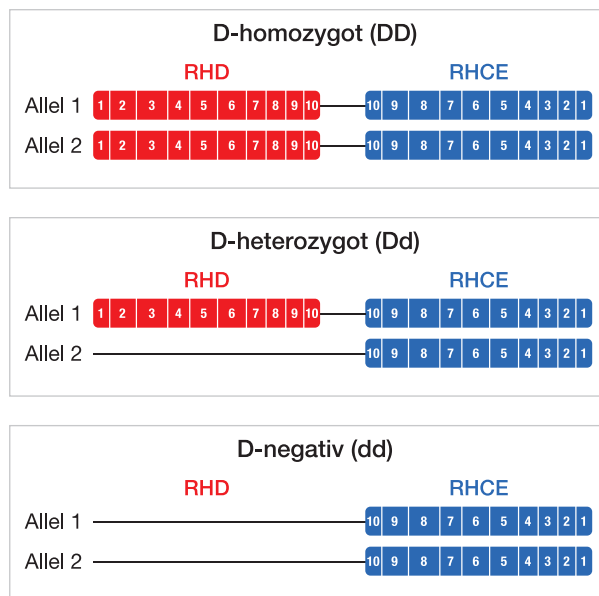


Abbildung 1: Organisation der RH-Gene

bestimmen und für eine Abschätzung der Risikokonstellation in Schwangerschaften nutzen.

BESTIMMUNG DER RISIKOKONSTELLATION FÜR EINE RHD-INKOMPATIBILITÄT

Die Indikation zur Bestimmung der Risikokonstellation besteht bei Schwangerschaften, in denen bereits ein Antikörper gegen das RhD-Antigen nachgewiesen wurde. Mögliche Ursachen für einen bereits vorhandenen Antikörper können vorherige Schwangerschaften mit einem RhD-positivem Kind oder RhD-inkompatible Transfusionen sein, die häufig bei Frauen aus Regionen, in denen die RhD-Verträglichkeit von Erythrozyten bei Transfusionen für Frauen im gebärfähigen Alter nicht berücksichtigt wird, zu beobachten sind. In **Abb. 2** sind die für eine Abschätzung des Risikos möglichen Konstellationen dargestellt: bei einem Kindsvater, der zwei RHD-Gene besitzt (DD), ergibt sich eine hundertprozentige Wahrscheinlichkeit, dass alle Nachkommen ebenfalls RhD-positiv sind. Bei einer hemizygoten Konstellation (Dd) reduziert sich das Risiko eines RhD-positiven Nachkommens auf die Hälfte.

Für den molekulargenetischen Nachweis der RHD-Konstellation eignet sich neben einer klassischen SSP-PCR (Sequenz-Spezifische Primer) die quantitative real-time PCR (qPCR). Hier werden die PCR-Produkte mit einer fluoreszenzmarkierten und targetspezifischen DNA-Sequenz („probe“) nachgewiesen. Eine Weiterentwicklung dieser

Methode stellt die droplet PCR (dPCR) dar. Basierend auf einer Verteilung des Reaktionsgemisches auf eine Vielzahl von Einzeltröpfchen (je nach System 20.000 bis 100.000 droplets) und deren Detektion ist eine direkte Quantifizierung des PCR-Produktes möglich, d. h. Standardkurven als Berechnungsgrundlage sind bei dieser Methode überflüssig. Das Ergebnis einer dPCR wird als Anzahl positiver droplets bzw. Kopienzahl/μl dargestellt und dient als direkte Berechnungsgrundlage für die Konzentration der untersuchten Genbereiche einer DNA-Probe. In **Abb. 3** ist exemplarisch das Ergebnis einer dPCR für jeweils eine DD- und Dd-Probe dargestellt.

Bei einer homozygoten Konstellation der Rh-Gene ergibt sich theoretisch ein Verhältnis von 2:2 (zwei RHD-Gene und zwei RHCE-Gene), entsprechend einem Zahlenwert von 1. Diese Situation ist auf der linken Seite der **Abb. 3** dargestellt: 908 FAM (RHD) positive und 892 VIC (RHCE) positive droplets wurden detektiert und zeigen damit eine gleiche Konzentration von RHD- und RHCE-spezifischen Sequenzen an. Bei der Konstellation von nur einem RHD-Gen und zwei RHCE-Genen (Dd) ist dementsprechend ein Verhältnis von 1:2 der FAM- und VIC-positiven droplets zu erwarten (rechte Seite der **Abb. 3**) und manifestiert sich in dem abgebildeten Beispiel mit einem Zahlenwert von 0.48. Bei der Anwendung dieser Methode muss berücksichtigt werden, dass für das RHD- und RHCE-Gen eine große Zahl von unterschiedlichen Allelen bekannt sind,

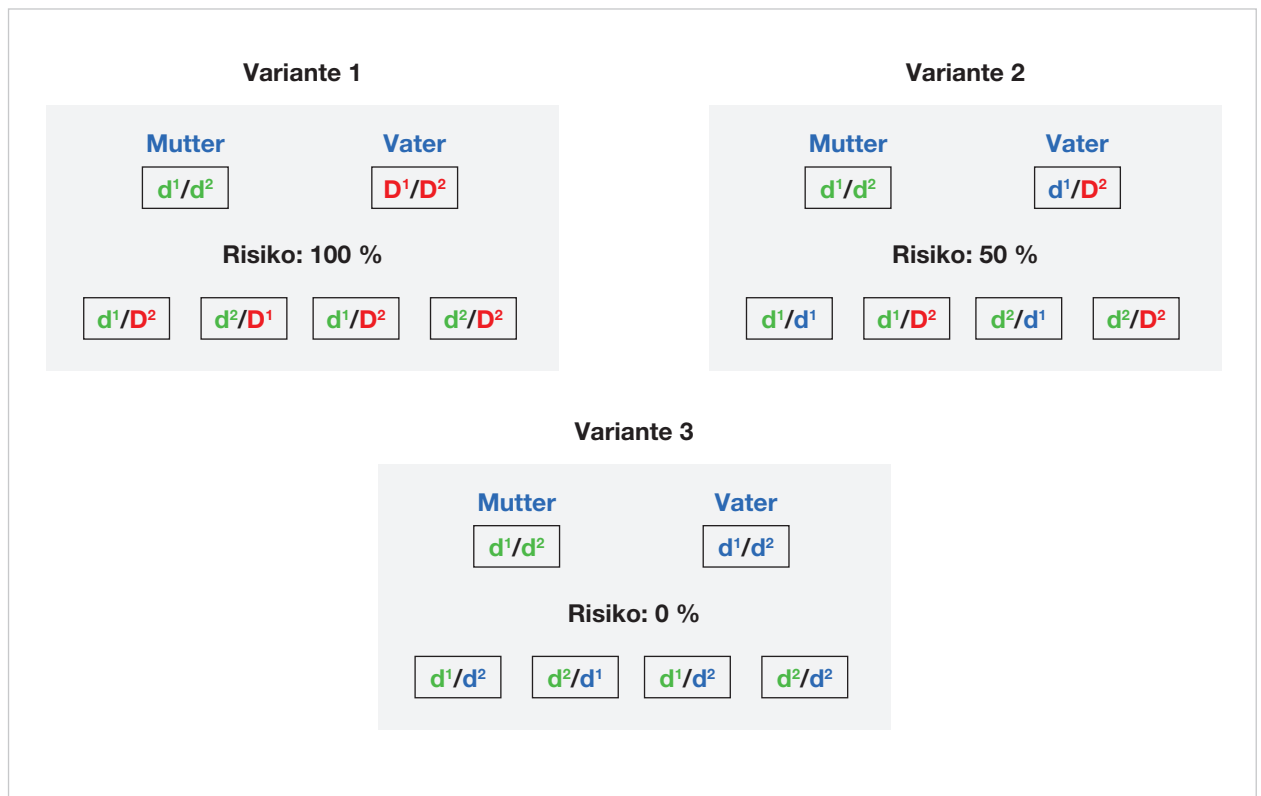


Abbildung 2: Molekulargenetische Bestimmung des Risikos einer kindlichen RhD-Inkompatibilität

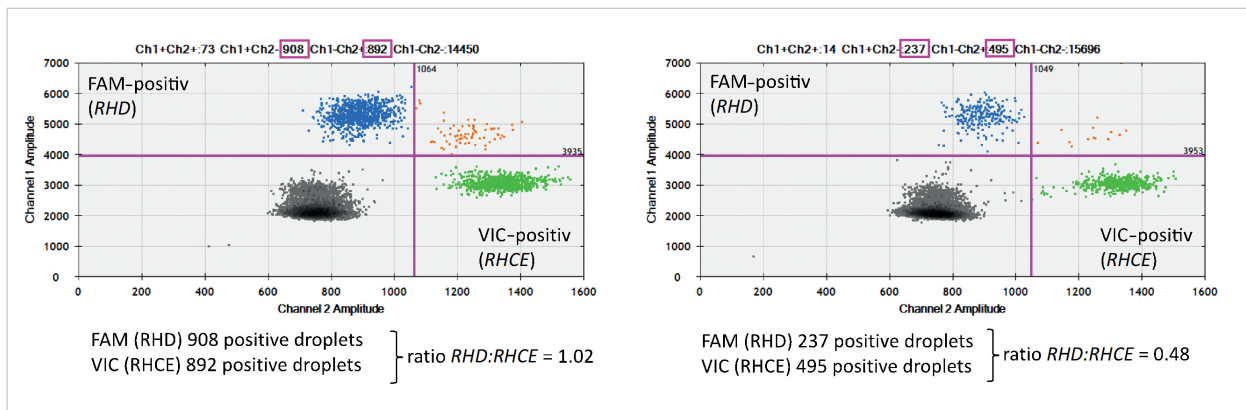


Abbildung 3: Ergebnis einer droplet PCR für die Quantifizierung von Sequenzen des RHD- und RHCE-Gens. Neben den FAM- und VIC-positiven droplets werden auch die negativen (schwarz) und unspezifischen Reaktionen (orange) dargestellt.

die auf Einzel- und Mehrfachmutationen basieren. Sind diese Mutationen in einem Bereich lokalisiert, der für die Quantifizierung der beiden Gene ausgewählt wurde, sind fehlerhafte Ergebnisse zu erwarten. Um dieses Problem zu umgehen, ist es sinnvoll unterschiedliche Regionen der Gene zu untersuchen bzw. bereits bei der Auswahl der PCR-Targets möglichst viele Varianten auszuschließen. Eine sehr gute Übersicht zu den bekannten RHD-Varianten bietet die Datenbank „The Human RhesusBase“⁵.

FETALE RHD-BESTIMMUNG AUS DEM MÜTTERLICHEN BLUT

Das Vorhandensein von Spuren freier fetaler DNA im Plasma bzw. Serum von Schwangeren wurde bereits 1997 von Lo und Mitarbeitern beschrieben⁶. Die Untersuchung

der zellfreien DNA wird in den letzten Jahren zunehmend als nicht-invasive Alternative zu bekannten Techniken wie Chorionzottenbiopsie, Amniozentese oder Cordozentese genutzt. Basierend auf einer großen Anzahl von Studien zur Sensitivität und Spezifität der nicht-invasiven fetalen RHD-Genotypisierung⁷⁻³⁵, soll zukünftig diese Anwendung als begleitendes Instrument für die Gabe einer Anti-D-Prophylaxe bei RhD-negativen Schwangeren eingesetzt werden.

Die Vorgehensweise für diese Anwendung ist recht einfach: Mit einer simplen venösen Blutentnahme der Mutter kann zellfreie DNA isoliert und durch den Einsatz eines PCR-Verfahrens vervielfältigt werden (**Abb. 4**).

Grundsätzlich können nur die in dem mütterlichen Blut genotypisch erfassten Blutgruppenmerkmale dem Kind

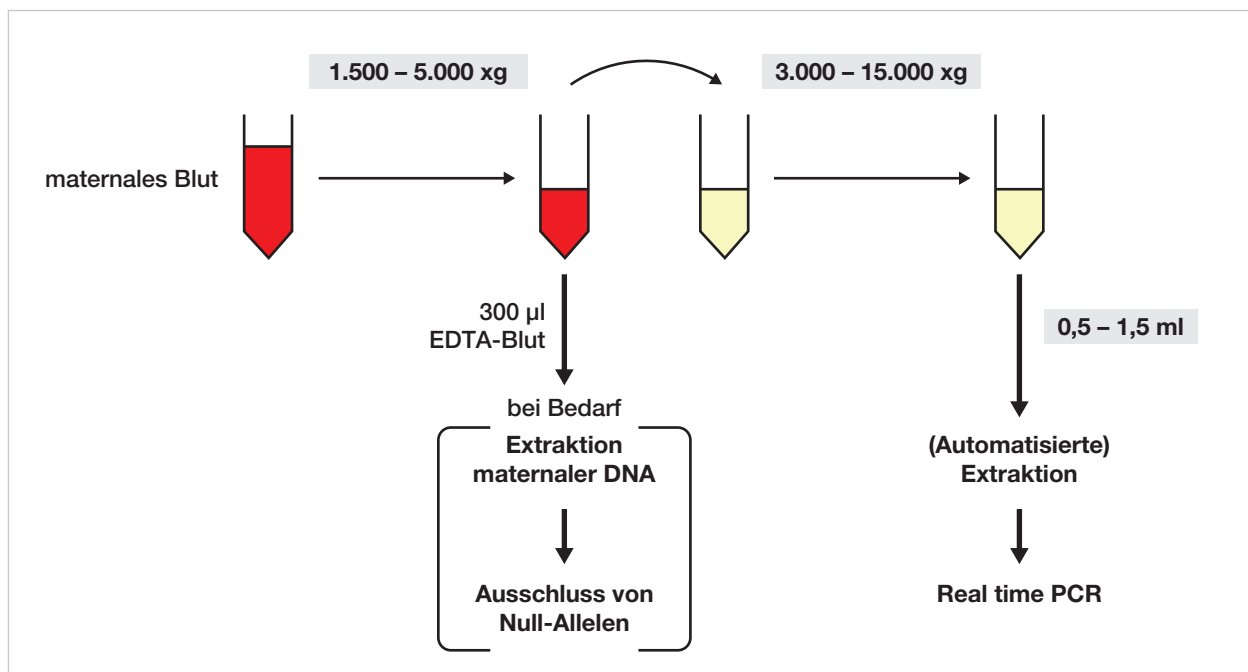


Abbildung 4: Vorgehensweise zur Gewinnung zellfreier DNA

zugeordnet werden, für die die Schwangere selber negativ ist, da die isolierte zellfreie DNA eine Mischung aus mütterlicher und fetaler DNA darstellt. Für die Bestimmung des RHD-Gens bedeutet dies, dass jede RHD-positive Reaktion auf die Blutgruppe des Feten hinweist, da die Mutter RhD-negativ ist.

Aufwändiger ist die Beurteilung der Ergebnisse bei Proben, die bei der Genotypisierung nur die mütterlichen Blutgruppenmerkmale zeigen. In diesen Fällen muss der Nachweis geführt werden, dass genügend fetale DNA isoliert wurde, um die Merkmale des ungeborenen Kindes sicher erfassen zu können. In dieser Situation ist der klinische Kontext für die fetale RHD-Genotypisierung von Interesse (Risikoschwangerschaft oder Anti-D-Prophylaxe), um über das weitere Vorgehen zu entscheiden.

Risikoschwangerschaften: Bei einer mit Antikörpern vorbelasteten Schwangerschaft erfolgt die Blutentnahme möglichst früh (ab der 10. SSW). Untersuchungen haben gezeigt, dass der Anteil der freien fetalen DNA im Blut der Mutter mit zunehmender Schwangerschaftsdauer ansteigt³⁶. In der Umkehrung bedeutet es aber auch, dass bei Untersuchungen in der sehr frühen Schwangerschaft die Konzentration der freien fetalen DNA sehr niedrig ist und bei einem negativen Ergebnis eine Kontrollmöglichkeit für das Vorhandensein fetaler DNA dringend notwendig ist. Für männliche Feten ist die gleichzeitige Vervielfältigung Y-spezifischer DNA-Sequenzen (z. B. Y-AMEL) ausreichend, um mütterliche und fetale DNA zu unterscheiden. Proben, die für Y- und RHD-spezifische Sequenzen negativ sind, können nur durch weiterführende Untersuchungen interpretiert werden. Hier können natürlich vorkommende, individuelle Marker (SNPs: single nucleotide polymorphisms) auf dem menschlichen Erbgut, die einem „genetischen Fingerabdruck“ entsprechen, als interne Kontrolle genutzt werden. Das Muster der mütterlichen Varianten wird mit dem des ungeborenen Kindes verglichen, ohne dass eine väterliche Blutprobe vorhanden sein muss. Jeder Marker für Merkmale aus der PCR der Plasma-DNA, der nur beim Kind, nicht aber bei der Mutter zu finden ist, muss demnach vom Vater herühren und folglich fetalen Ursprungs sein³⁷.

Anti-D-Prophylaxe: Die Entscheidung über die Gabe einer Anti-D-Prophylaxe bei RhD-negativen Schwangeren erfolgt im zweiten Trimenon der Schwangerschaft (20.–25. SSW). Wie die bereits aufgeführten Studien gezeigt haben, ist zu diesem Zeitpunkt eine sichere fetale Genotypisierung möglich. In einem Bericht des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) wurde für die nicht-invasive Bestimmung des fetalen RHD

eine sehr hohe Sensitivität (99,9 %) und Spezifität (99,1 %) bestätigt³⁸. Nach der aktuellen Richtlinie der Bundesärztekammer zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie), ist eine Anti-D-Prophylaxe nicht notwendig, wenn der Fetus mit einem validierten Verfahren RhD-negativ bestimmt wurde³⁹. Die bisher durchgeführte Gabe der Anti-D-Prophylaxe an alle RhD-negativen Schwangeren soll damit durch eine gezielte Prävention ersetzt werden. Die aktuellen Daten des Bundesamtes für Statistik weisen für das Jahr 2019 insgesamt 778.090 Geburten aus. Basierend auf der Annahme, dass 15 % aller Schwangeren RhD-negativ waren, folgt daraus, dass 116.714 RhD-negative Frauen eine Anti-D-Prophylaxe erhalten haben. Statistisch betrachtet wurden aus dieser Gruppe 15 % RhD-negative Kinder geboren, d. h. 17.507 Schwangere erhielten eine nicht notwendige Anti-D-Prophylaxe. Negative Begleiterscheinungen einer ungezielten Anti-D-Prophylaxe können nicht völlig ausgeschlossen werden, wie in 1978 / 79 eine mit Hepatitis-C-Viren kontaminierte Charge gezeigt hat, mit der fast 7.000 Frauen infiziert wurden⁴⁰. Der gemeinsame Bundesausschuss hat im August 2020 beschlossen, die Mutterschafts-Richtlinien dahingehend zu ändern, dass jeder Frau mit Einlingsschwangerschaft die Möglichkeit einer nicht-invasiven fetalen RHD-Genotypisierung angeboten werden soll. Wird dieser Test nicht durchgeführt und / oder liegt bis zur 29.+6 Schwangerschaftswoche kein Ergebnis vor, soll die ungezielte Anti-D-Prophylaxe durchgeführt werden.

VALIDIERUNG DER NICHT-INVASIVEN FETALEN RHD-GENOTYPISIERUNG

Mit der Empfehlung einer nicht-invasiven fetalen RHD-Genotypisierung stellt sich den Laboren die Aufgabe, einen entsprechenden Test zu validieren. Bei einer neuen Methode sollten 1.000 Proben auf ihre diagnostische Sensitivität und Spezifität untersucht werden, bei einem gut publizierten / validierten Verfahren sind 100 Proben ausreichend. Für die zur Validierung eingesetzten Proben gilt der Entnahmezeitraum von der 10.–29. Schwangerschaftswoche. Die analytische Nachweisgrenze, intra- und inter-assay Präzision, Messbereich und Linearität sowie die Robustheit sind weitere Parameter, die für die Validierung als notwendig erachtet werden. Die genaue Vorgehensweise und deren Begründung wurde in einer Empfehlung der DGTI Sektion „Immunhämatologie und Immungenetik“ in Absprache mit dem DGTI-Vorstand beschrieben⁴¹. **Abbildung 5** zeigt ein Beispiel aus der Validierung der nicht-invasiven fetalen RHD-Genotypisierung mit einer phänotypisch bestätigten RhD-positiven

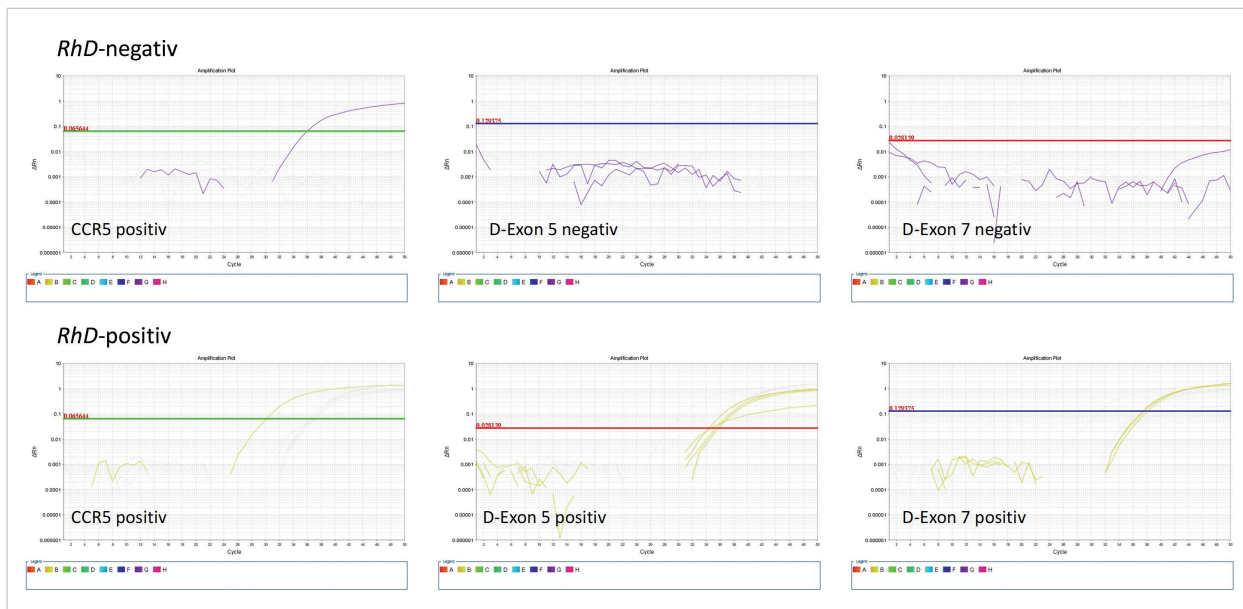


Abbildung 5: Validierung der nicht-invasiven fetalen RhD-Bestimmung: Untersuchung einer (phänotypisch bestätigten) RhD-negativen und -positiven Probe. CCR5 dient als Amplifikationskontrolle, d. h. diese Reaktion muss immer positiv sein.

und -negativen Probe aus der 20. bzw. 15. Schwangerschaftswoche. CCR5 dient bei dieser Methode als interne Amplifikationskontrolle, eine Information zum Vorhandensein fetaler DNA ist darin aber nicht enthalten.

FEHLERMÖGLICHKEITEN BEI DER NICHT-INVASIVEN FETALEN RHD-GENOTYPISIERUNG

Die nicht-invasive Genotypisierung aus freier fetaler DNA setzt voraus, dass ein Merkmal nachgewiesen werden soll, das die Schwangere selber nicht besitzt. In vielen Blutgruppensystemen, so auch im Rh-System, sind Varianten bekannt, die zwar phänotypisch negativ erscheinen, aber einen positiven Genotyp zeigen (sogenannte Null-Allele). Zurzeit sind über 90 verschiedene Null-Allele bekannt, die nach ihrer molekularen Ursache in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden können und exemplarisch in **Tabelle 2** aufgeführt sind. Eigene Unter-

suchungen an über 1.000 Schwangerschaften haben gezeigt, dass in einer überwiegend kaukasischen Population der Anteil von Null-Allelen mit < 1 % angenommen werden kann.

Bei Vorliegen eines nicht-exprimierten RHD-Gens der Schwangeren kann der Ursprung einer positiven Reaktion in der fetalen RhD-Bestimmung nicht eindeutig zugeordnet werden, da das Untersuchungsmaterial ein Gemisch fetaler und maternaler DNA darstellt. Die real-time PCR ist im Unterschied zu Fragmentlängen-Analysen oder Next Generation Sequencing (NGS) eine semiquantitative Methode. Sie zeigt bei Vorliegen eines Null-Allels der Mutter eine überraschend starke positive Reaktion der Plasma-DNA (**Abb. 6**). Tritt dieser seltene Fall bei einer Risikoschwangerschaft auf, kann nur eine engmaschige Kontrolle des Anti-D-Titers empfohlen werden⁴².

Um eine Fehlinterpretation des fetalen Genotyps zu

Molekulare Ursache	Beispiel	Allel
Hybridgene	RHD – RHCE (3–9) – D	RHD * 01N.03
Missense Mutationen	RHD T148R	RHD * 01N.73
Nonsense Mutationen	RHD S256X	RHD * 01N.39
Splice-site Mutationen	IVS 8+1G>A	RHD * 01N.26
Deletionen	RHD del Exon 1	RHD * 01N.67

Tabelle 2: Beispiele für nicht exprimierte RHD-Allele

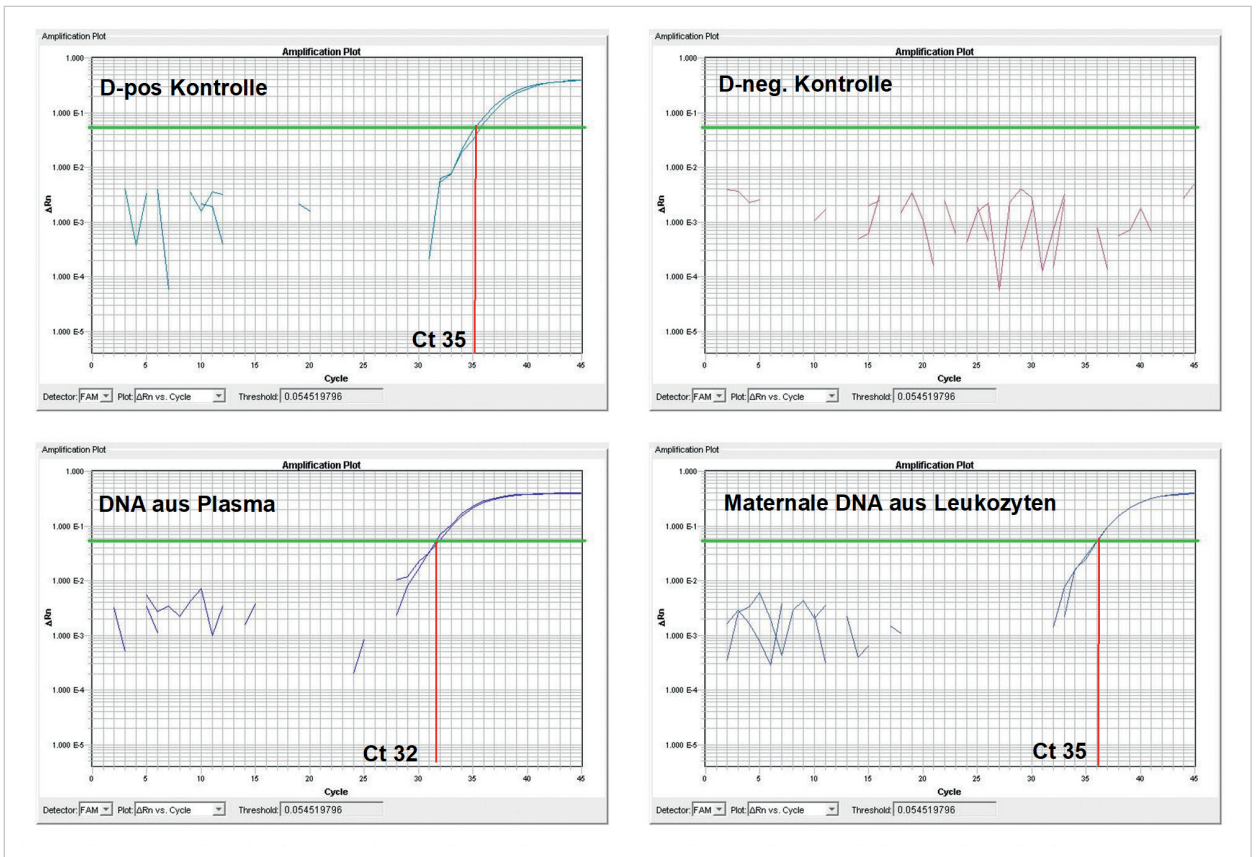


Abbildung 6: Der ermittelte Schnittpunkt der Kurven mit der Null-Linie (Ct-Wert) zeigt bei der Plasma-DNA einen Wert von 32 und damit auffallend niedriger (die Konzentration der DNA entsprechend höher) als bei vergleichbaren Proben.

vermeiden, sollten daher unterschiedliche Bereiche des RHD-Gens untersucht werden. Sind zum Beispiel Sequenzen aus dem RHD-Exon 5 und Exon 7 das Ziel der Amplifikation und zeigt sich entweder die oben beschriebene Verstärkung der Reaktion oder aber der Ausfall einer der beiden Reaktionen, ist eine Untersuchung der mütterlichen DNA aus Leukozyten dringend empfehlenswert. Dieser Weg ist bereits in der Bearbeitung der Blutprobe einer Schwangeren integriert (siehe **Abb. 4:** „bei Bedarf Extraktion der maternalen DNA“), indem eine Probe der mütterlichen Leukozyten zurückgestellt wird.

Die bisherigen Ergebnisse bei Untersuchungen an mehreren hunderttausend Schwangerschaften belegen die Leistungsfähigkeit molekulargenetischer Analytik zur pränatalen Diagnostik des fetalen RhD-Status aus dem mütterlichen Blut. Bei sachgerechter Prä-Analytik und kompetenter Analytik⁴¹ gelingt es, den kindlichen RhD-Status sehr zuverlässig mit einer Sensitivität von 99,9 % und einer Spezifität von 99,1 % vorherzusagen und so die RhD-Prophylaxe auf den notwendigen Einsatz zu begrenzen.

Die Autoren



Dr. rer. nat. Andrea Döscher
Laborleitung Forschung und Entwicklung,
Institut Bremen-Oldenburg,
DRK-Blutspendedienst NSTOB gemeinnützige GmbH
Andrea.Doescher@bsd-nstob.de



Prof. Dr. rer. nat. Thomas Müller
Facharzt für Transfusionsmedizin,
Facharzt für Pharmakologie
thmyorck@gmx.net

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk-haemotherapie.de