

Prof. Dr. med. Axel Seltsam

Institut für Transfusionsmedizin,
Medizinische Hochschule Hannover

Prof. Dr. med. Tobias J. Legler

Abteilung Transfusionsmedizin,
Georg-August-Universität – Bereich
Humanmedizin, Göttingen

Dr. rer. nat. Eduard K. Petershofen

Molekulare Diagnostik,
Institut Bremen-Oldenburg,
DRK-Blutspendedienst NSTOB

Auch nach Einführung der generellen Anti-D-Prophylaxe stellt der durch Anti-D-Antikörper bedingte Morbus haemolyticus neonatorum den Prototyp einer durch mütterliche blutgruppenspezifische Alloantikörper verursachten fetomaternalen Inkompatibilität dar. Moderne molekular-genetische Methoden zur Bestimmung der Rhesus D (RhD)-Blutgruppe bieten neue Möglichkeiten in der pränatalen Diagnostik und der Schwangerschaftsvorsorge. So ist es mit der Bestimmung des fötalen RhD-Status aus der mütterlichen Blutprobe möglich geworden, bei RhD-heterozygoten Vätern die nicht gefährdeten Kinder zu identifizieren und eine invasive Diagnostik zu vermeiden. Der frühzeitige Nachweis des kindlichen RhD-Merkmal in der Schwangerschaft eröffnet zudem die Perspektive eines zielgerichteten Einsatzes der präpartalen Anti-D-Prophylaxe. Mit Hilfe der paternalen RHD-Zygotiebestimmungen lässt sich bei Anti-D-immunisierten Frauen mit Kinderwunsch das Risiko des Auftretens einer RhD-Inkompatibilität abschätzen.

In spite of anti-D immunoprophylaxis, hemolytic disease of the fetus and newborn attributed to D alloimmunization occurs. The use of molecular genetic technology for blood group typing has opened new possibilities for RhD typing in prenatal diagnostics and pregnancy precaution. Fetal DNA in maternal plasma can be used for non-invasive determination of the RhD status of fetuses carried by RhD-negative pregnant women. Moreover, the availability of non-invasive diagnostic assays for prenatal RHD typing makes it possible to restrict antenatal prophylaxis to only those women at risk for immunization. Finally, paternal RHD zygosity testing offers the opportunity to assess the risk of RhD incompatibility in D alloimmunized women.

Morbus haemolyticus neonatorum durch Rhesusinkompatibilität

Pathophysiologie und Klinik

Der Morbus haemolyticus neonatorum (MHN) durch Anti-D-Antikörper ist eine schwere hämolytische Anämie des Fötus bzw. des Neugeborenen mit Erythroblastose infolge gesteigerter Erythrozytendegeneration durch diaplazentaren Übertritt maternalen Blutgruppenantikörper gegen kindliche Blutgruppeneigenschaften bei einer Rhesus D (RhD)-inkompatiblen Schwangerschaft (1). Ogleich seit Einführung der Anti-D-Prophylaxe Ende der 60er Jahre der Anti-D-bedingte MHN sehr stark an epidemiologischer Bedeutung verloren hat und heute ein MHN bei ABO-Inkompatibilität am häufigsten vorkommt, besitzt der durch Anti-D induzierte MHN klinisch nach wie vor die größte Bedeutung. Rhesusantikörper anderer Spezifitäten (z. B. Anti-c) oder Antikörper gegen andere Blutgruppenmerkmale (z. B. Anti-K) sind hingegen weniger häufig in einen MHN involviert (1).

Voraussetzungen für eine fetomaternalen RhD-Inkompatibilität sind die Immunisierung einer RhD-

negativen Mutter, die Bildung und der diaplazentare Übertritt von Antikörpern der Klasse IgG und das Vorhandensein des RhD-Antigens auf den kindlichen Erythrozyten (vom RhD-positiven Vater geerbt) (Abbildung 1). Als immunisierende Ereignisse kommen ein transplazentarer Übertritt fötalen, RhD-positiven Blutes, der bis zum 3. Trimenon in knapp der Hälfte aller Schwangerschaften beobachtet wird, sowie Traumata während der Schwangerschaft, Chorionzottenbiopsien, Amnio-

Immunisierung beim Morbus haemolyticus neonatorum

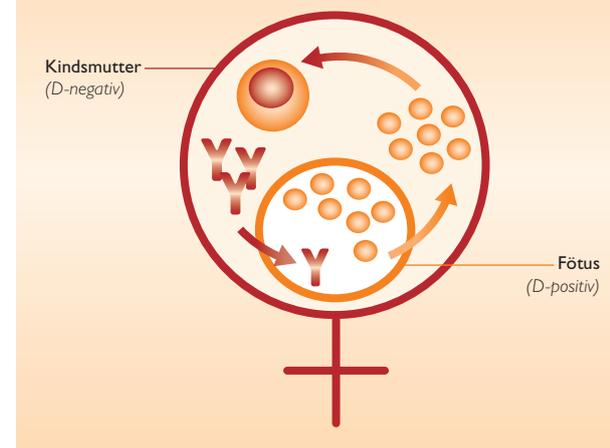


Abbildung 1

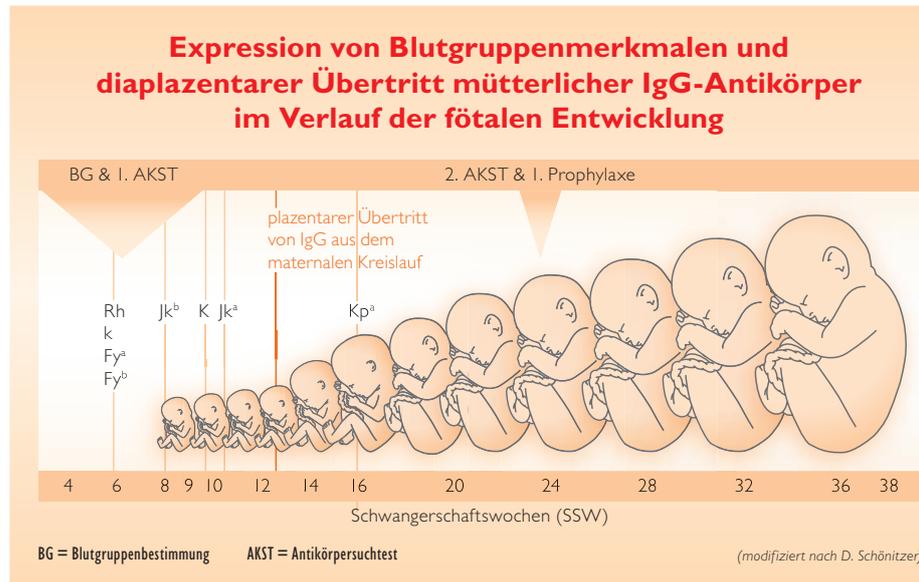
Während der Schwangerschaft, insbesondere im 3. Trimenon, kann es zum Übergang von fötalen Erythrozyten in den mütterlichen Kreislauf kommen. In Abhängigkeit von der Dosis können immunologische Zellen der Kindsmutter erythrozytäre Antigene präsentieren und die Bildung von Antikörper-produzierenden Zellen induzieren. Im Falle einer Vorimmunisierung der Mutter werden vorgebildete Immunzellen geboostert. Die maternalen Antikörper des Isotyps IgG vermögen die Plazenta-Blut-Schranke zu passieren und können dann an die Oberfläche von fötalen Erythrozyten im kindlichen Kreislauf binden (Opsonisierung).



zentesen oder Bluttransfusionen in Frage. Der Schweregrad eines MHN wird aus immunhämatologischer Sicht im Wesentlichen durch die Konzentration der mütterlichen Antikörper, den Anteil der die Plazenta passierenden IgG-Antikörper und ihre Subklassenverteilung sowie die Antigendichte und -verteilung auf dem fötalen Gewebe bestimmt. Das RhD-Antigen gehört zu denjenigen Blutgruppenmerkmalen, die bereits in der Frühschwangerschaft auf den kindlichen Erythrozyten exprimiert sind (**Abbildung 2**).

Als Folge der Einschwemmung mütterlicher Antikörper in den kindlichen Kreislauf kommt es zu einer Beladung der kindlichen Erythrozyten mit diesen Antikörpern und zu einem beschleunigten Abbau der Antikörper-beladenen roten Blutzellen im reticuloendothelialen System (RES), was sich in einem hämolytischen Syndrom mit verkürzter Lebenszeit der kindlichen Erythrozyten manifestiert. Das klinische Bild des durch Anti-D-bedingten MHN ist variabel (**Tabelle 1**) (3).

➤
Tabelle 1



➤
Abbildung 2

In leichten Fällen entwickelt sich lediglich eine frühzeitige Hyperbilirubinämie (Icterus praecox) und eine leichte Anämie, während in schweren Fällen die Bilirubin-konzentration so weit ansteigen kann (Icterus gravis), dass es zu einer irreversiblen Schädigung von Nervenzellen und neurologi-

schen Ausfällen mit gelblicher Anfärbung der Basalganglien des Gehirns (Kernikterus) kommen kann. Als Reaktion auf die hämolytische Anämie lassen sich im Sinne einer übersteigerten Erythrozytenregeneration und -sequestration erhöhte Werte von Retikulozyten und Erythroblasten im peripheren Blut

Klassifikation eines Rhesus D-bedingten Morbus haemolyticus neonatorum (Nach 3)

Schweregrad	Bezeichnung	Klinische Merkmale
Leicht	Anaemia neonatorum	Mäßige Anämie
Mittel	Icterus gravis	Hyperbilirubinämie
Schwer	Anaemia gravis	Schwere Anämie, Hyperbilirubinämie, keine Ödeme
Schwer	Hydrops fetalis	Ödeme, Ascites, Pleura-, Perikarderguss

sowie eine Vergrößerung der extramedullären Blutbildungsorgane Leber und Milz nachweisen. Die schwerste Form des MHN wird als Hydrops fetalis bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine allgemeine Ödemneigung mit Wassereinlagerung in das Gewebe und in die Körperhöhlen infolge anämischer Hypoxie und Hypalbuminämie (**Abbildung 3**). Ein Hydrops fetalis kann unbehandelt innerhalb von Tagen zum Tode führen und abhängig vom Sensibilisierungsgrad der Schwangeren bereits vor der 18. Schwangerschaftswoche (SSW) auftreten.

Vorkommen und Häufigkeit

Vor Einführung der Anti-D-Prophylaxe (Rhesusprophylaxe) lag das Immunisierungsrisiko RhD-negativer Schwangerer bei 7-14%. Zu dieser Zeit fand sich ein MHN durch Anti-D bei 0,6% aller Schwangerschaften, von denen 60% therapiebedürftig waren und 12% tödlich endeten. Während die durch Anti-D verursachten MHNs früher 98% aller Fälle (AB0-MHN ausgenommen) ausmachten, hatte nach Einführung der postpartalen Anti-D-Prophylaxe Ende der 60er Jahre die Häufigkeit des Auftretens eines Anti-D-bedingten MHN um 90% abgenommen. Durch die



◀
Abbildung 3
Hydrops fetalis bei Geburt
Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. P. Baier, Pränataldiagnostik, Universität Heidelberg

präpartale Anti-D-Prophylaxe konnte die Inzidenz nochmals um 90% gesenkt werden (**4**). Die Immunisierungsrate RhD-negativer Schwangerer liegt seitdem nur noch in einem Bereich von 0,2-0,5% (**5,6**). Obgleich die Häufigkeit eines Anti-D-verursachten MHN inzwischen etwa der aller übrigen MHNs zusammen entspricht, ist die Zahl der Kinder mit schweren Verläufen bei einem Anti-D-bedingtem MHN immer noch am größten. Seit Anfang der 90er Jahre lässt sich durch die Zuwanderung aus Ländern mit weniger konsequenter Prophylaxe ein durch Anti-D verursachter MHN im deutschsprachigen Raum wieder häufiger beobachten.

Vorsorge und Anti-D-Prophylaxe

Die zur rechtzeitigen Erkennung, Behandlung und Prophylaxe des Anti-D-bedingten MHN erforderlichen Untersuchungen bei Schwangeren werden durch die

„Mutterschafts-Richtlinien“ und in den „Hämotherapie-Richtlinien“ geregelt (**7,8**). Demnach müssen bei jeder schwangeren Frau zu definierten Zeitpunkten eine Blutgruppenbestimmung und Antikörpersuchtests durchgeführt werden. Deuten die Ergebnisse der Blutgruppenbestimmung auf ein abgeschwächtes oder variantes RhD-Merkmal hin, wird eine weitere Abklärung erforderlich. Ein direkter Coombstest mit den Erythrozyten des Neugeborenen ist durchzuführen, wenn sich der Verdacht eines MHN ergibt oder wenn die nach den „Mutterschafts-Richtlinien“ vorgeschriebenen Antikörpersuchtests nicht durchgeführt wurden. Ein positiver direkter Coombstest muss als möglicher Hinweis auf eine fetomaternalen Inkompatibilität weiter abgeklärt werden.

Mit der Anti-D-Prophylaxe lässt sich bei werdenden Müttern vermeiden, dass sich in ihrem Blut Anti-D-Antikörper gegen die



RhD-positiven Erythrozyten des Kindes bilden. Das geht nur, wenn im Körper der Rhesus-negativen Mutter noch keine Antikörper nachweisbar sind. Dann bekommt die Frau in der 28. - 30. SSW und direkt nach der Geburt (bis max. 72 Stunden post partum) eine Standarddosis Anti-D-Immunglobulin appliziert. Sollte aus technischen Gründen die Zeit einmal nicht eingehalten werden können, empfiehlt es sich trotzdem auch noch am Tag 4, 5 oder 6 die Prophylaxe durchzuführen, da hier immerhin noch mit einer Wahrscheinlichkeit von 20-50 % eine Immunisierung verhindert werden kann. Der Anti-D-Prophylaxe liegt die Vorstellung zugrunde, dass die RhD-positiven Erythrozyten des Kindes, sobald sie in den Blutkreislauf der Mutter gelangen, durch die Anti-D-Antikörper beladen und im RES abgebaut werden, und so der mütterliche

Körper selbst keine Antikörper produziert (**Abbildung 4**). Mit der empfohlenen Dosis von 300 µg können ca. 10 ml Erythrozytensediment neutralisiert werden. Die Anti-D-Prophylaxe kommt auch zum Einsatz bei: Schwangerschaftsabbruch und Abort, Extrauterin-Schwangerschaften, Fruchtwasseruntersuchung oder bei Blutungen in der Schwangerschaft.

Pränatale Diagnostik bei Rhesusinkompatibilität

Serologie

Bei Beginn der Schwangerschaft sollen Frauen entsprechend der Mutterschaftsrichtlinie u. a. auf das Vorliegen irregulärer erythrozytärer Antikörper überprüft werden (7). Bereits existierende Antikörper können durch früheren Fremdantigenkontakt der Schwan-

geren induziert oder durch Behandlung zugeführt worden sein. Die wichtigsten Spezifitäten im Zusammenhang mit einem Morbus haemolyticus neonatorum sind Anti-D, Anti-c und Anti-K. Es können aber auch Antikörper gegen Merkmale auf Thrombozyten, z. B. Anti-HPA-1a oder HLA-Antikörper, induziert werden. Die Präsenz dieser Antikörper im Serum kann je nach Immunsystem unterschiedlich lang sein: einige Antikörper können nach wenigen Wochen bereits nicht mehr nachweisbar sein, andere können über Jahre und Jahrzehnte persistieren (es gibt Beispiele für Allo-Antikörper, die über einen Zeitraum von > 50 Jahren nachweisbar waren). Es gilt jedoch zu beachten, dass einmal induzierte Antikörper innerhalb weniger Tage wieder geboostert werden können.

Bei den therapeutisch zugeführten Antikörpern handelt es sich im Wesentlichen um humanes IgG-Anti-D aus der Prophylaxe. Nach Applikation der vorgegebenen Do-

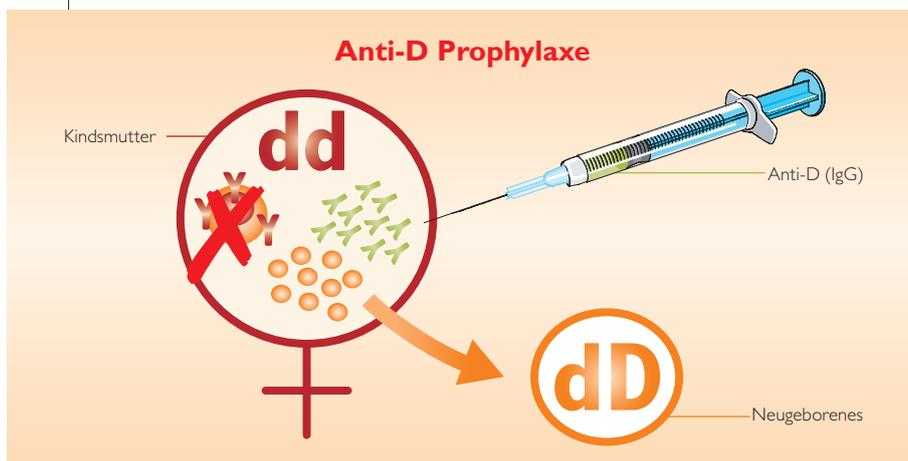


Abbildung 4

Nach Geburt des Kindes (oranger Kreis) wird das Blutgruppenmerkmal Rhesus D, der so genannte Rhesusfaktor, bestimmt. Um eine Immunisierung der Mutter durch in den mütterlichen Kreislauf gelangte kindliche Erythrozyten zu vermeiden, wird nach Geburt Rhesus D-positiver Kinder eine Anti-D-Prophylaxe appliziert. Auf diese Weise werden residuale fötale Erythrozyten im Kreislauf der Mutter mit Antikörpern „maskiert“.

sis zwischen der 25. und 27. SSW werden noch zum Zeitpunkt der Geburt therapeutisch wirksame Antikörpertiter in der Mutter und im Kind gemessen, da die durchschnittliche Halbwertszeit von IgG ca. 20-30 Tage beträgt.

Im Rahmen der Mutterschaftsfürsorge wird in Deutschland heute routinemäßig zwischen der 24. und 26. SSW der Antikörpersuchtest wiederholt. Ist der Antikörpersuchtest negativ, wird die Anti-D-Prophylaxe appliziert; ist er positiv, ist eine exakte Abklärung der Spezifität des Antikörpers erforderlich, inklusive einer quantitativen Bestimmung. Die quantitative Bestimmung kann einerseits durch den Vorgang der Titrierung mit definierten Testzellen bestimmt werden (häufigste Durchführung), andererseits durch Vergleichstestung mit einem quantitativen Standard (seltener Durchführung). Für die Vergleichstestung bietet sich das Präparat der Anti-D Prophylaxe an, da hier exakt definierte Mengen gegeben sind. Ein Vorteil dieser Methode ist die gute Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse; allerdings wird dieses Verfahren nur von wenigen Laboratorien eingesetzt. Vorteil der Technik der Titrierung mit definierten Testzellen ist die ein-

fache und schnelle Handhabung sowie die Übertragbarkeit auf andere Antikörperspezifitäten. Die große technische Variabilität dieses Verfahrens macht jedoch einen Vergleich zwischen verschiedenen Laboratorien kaum sicher möglich. Dies liegt vor allem daran, dass die ermittelten Titerstufen stark in Abhängigkeit verschiedener Testparameter variieren:

- von der eingesetzten Methode (Röhrchen, Gelkarte oder Mikrotiterplatte),
- von der Lösung, mit der verdünnt wurde (NaCl, Plasma oder LISS),
- von den eingesetzten Zellen (homozygot, heterozygot, enzymbehandelt) und
- anderen Testbedingungen

Damit vor Ort eine relativ gute Beurteilung der Antikörpertiterwerte möglich wird, sollte zwischen den Klinikern und dem untersuchenden Labor eine definierte Vorgehensweise festgelegt werden. Aus diesem Grund wird empfohlen, Wiederholungsuntersuchungen möglichst durch das Labor ausführen zu lassen, in dem bereits die Erstuntersuchung stattgefunden hat.

Zur Risikoeinschätzung des Antikörpertiters sind zwei Punkte beachtenswert: erstens, die Höhe

des Titerwertes (quantitative Menge des physiologisch vorliegenden irregulären Antikörpers) und zweitens, die Veränderung des Titerwertes im Verlauf. Titerwerte als solche sagen relativ wenig über die klinische Relevanz verschiedener Antikörper aus. So sind einerseits schwere MHN-Verläufe mit niedrigtiterigem Antikörper bekannt und andererseits Schwangerschaften mit hohen Antikörpertitern ohne klinisch relevante Hämolyse des Kindes. Titerveränderungen werden während der Schwangerschaft zur Verlaufsbeobachtung herangezogen, wobei Veränderungen um zwei oder mehr Verdünnungsstufen im Allgemeinen als ein Indiz für eine gesteigerte immunologische Aktivität gewertet werden können. Häufig gehen Veränderungen im Antikörpertiter den mit technischen Geräten erkennbaren morphologisch-physiologischen Veränderungen eines MHN voraus.

Fötale Sonographie

Für die Untersuchung des ungeborenen Kindes werden heutzutage bevorzugt Ultraschallgeräte eingesetzt (Doppler-Sonographie), da dieses Untersuchungsverfahren nicht-invasiv ist. Im Falle einer stärkergradigen Anämie oder eines



MHN bei einem Föten, verändert sich die Flussgeschwindigkeit in den Kopfarterien, was mit dieser Technik darstellbar ist. Für den Nachweis einer schweren fötalen Anämie lag die Sensitivität der Doppler-Sonographie in einer kürzlich durchgeführten Multicenter-Studie bei 88 %, die Spezifität bei 82 %. Die noch häufig durchgeführte spektrophotometrische Bestimmung der Bilirubinoide im Fruchtwasser (ΔOD_{450}) zeigte dahingegen eine Sensitivität von nur 76 % und eine Spezifität von 77 % (9).

Invasive Diagnostik

Um genauere Kriterien zur Einschätzung der Krankheit und des MHN-Risikos zu erhalten, ist eine Punktion mit Gewebe-/Zellentnahme erforderlich. Technisch stehen dafür heute drei Verfahren zur Verfügung: in frühen Stadien der Schwangerschaft wird versucht, Zellen von den Chorionzotten zu isolieren; in späteren Stadien kommen die Amnionzentese (Punktion der Fruchtblase) und die Kordazentese (Punktion der Plazenta bzw. der Nabelschnur) in Frage. Mit Zellen aus der entnommenen Gewebeprobe des Kindes

kann eine molekulargenetische Bestimmung der Blutgruppengene erfolgen. Das durch die Kordazentese gewonnene Blut ermöglicht zusätzlich die serologische Bestimmung der Blutgruppenantigene auf den fötalen Erythrozyten, den Nachweis irregulärer Antikörper der Mutter im kindlichen Plasma sowie die Bestimmung relevanter Laborparameter, wie den Hämatokrit, die Hämoglobinkonzentration, die Blutzellzahlen, Enzyme, etc..

Da es sich hierbei jedoch um invasive Techniken mit einem nicht unerheblichen Verletzungsrisiko für den Föten handelt, sollte diese Diagnostik in Einrichtungen mit speziellem Therapiespektrum durchgeführt werden. In **Tabelle 2** sind Daten aus Studien wiedergegeben, die Angaben zum relativen Abortrisiko enthalten. Bei der Amnionzentese kam es dabei in 13-62 % der Fälle zu Blutungen, die zwischen ein und drei Minuten dauerten. Das ausgetretene Blut-

volumen betrug zwischen 50 und 680 μ l. Selbst diese kleinen Blutmengen können für die Induktion von irregulären Antikörpern in der Mutter ausreichend sein. Besonders hoch waren die Werte bei der Punktion in oder durch die Plazenta hindurch oder direkt in die Nabelschnur. Gefürchtet sind vor allem Hämatome, die nach der Punktion an der Einstichstelle entstehen und zu einem massiven Blutverlust des Föten führen können.

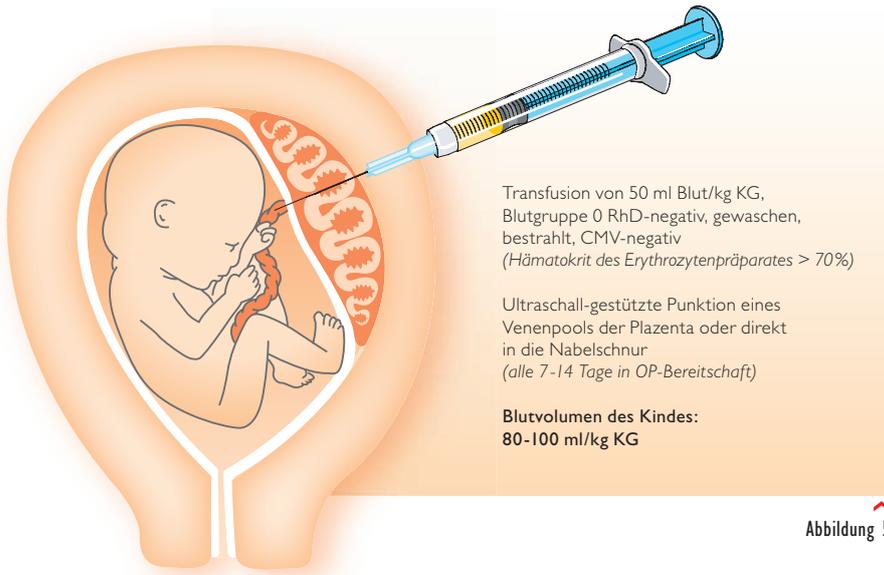
Die Kordazentese ist jedoch nicht nur Mittel zur Diagnostik sondern stellt auch eine sehr gute Möglichkeit zur effektiven Therapie dar. Mit einer gezielten Punktion der Plazenta oder der Nabelschnur ist es in spezialisierten Zentren heute möglich, Föten durch intrauterine Transfusion (IUT) mit kompatiblen Erythrozyten (D-negativen Erythrozyten, Anti-CMV-negativ, bestrahlt) ab der 20. SSW zu behandeln (**Abbildung 5**).

Abortrisiko nach Amnionzentese (23-25)

Amnionzentese	Risiko für Abort
Fötus < 16 SSW	bis 5 - 8 %
Fötus > 20 SSW	ca. 1 %
therapeutische Punktion	bis 14 %
Punktion bei Hydrops fetalis	bis 25 %

>
Tabelle 2

Intrauterine Transfusion



Transfusion von 50 ml Blut/kg KG,
Blutgruppe 0 RhD-negativ, gewaschen,
bestrahlt, CMV-negativ
(Hämatokrit des Erythrozytenpräparates > 70%)

Ultraschall-gestützte Punktion eines
Venenspools der Plazenta oder direkt
in die Nabelschnur
(alle 7-14 Tage in OP-Bereitschaft)

Blutvolumen des Kindes:
80-100 ml/kg KG

Abbildung 5

Postpartal bleiben die Neugeborenen noch für einige Zeit behandlungsbedürftig. Die Fremderythrozyten können einen supprimierenden, aber reversiblen Effekt auf das autologe Knochenmark entfalten. In Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration können die heranreifenden RhD-positiven kindlichen Blutzellen noch für einen gewissen Zeitraum beladen und abgebaut werden. In Einzelfällen kann sich die Transfusionsbedürftigkeit der betroffenen Neugeborenen über bis zu vier Monate hinziehen.

Rhesus-Diagnostik bei aberrantem mütterlichem RhD-Merkmal

Beim Auftreten ungewöhnlicher Befunde im Rahmen der mütterlichen RhD-Bestimmung ist heutzutage eine weitergehende Spezifizierung des RhD-Status anzustreben. Für eine korrekte Versorgung

der Mütter mit einer Anti-D-Prophylaxe ist es erforderlich, Anti-D-immunisierbare RhD-Untergruppen von solchen, die kein Anti-D-Immunsierungsrisiko aufweisen, zu differenzieren. Unter den aberranten RhD-Phänotypen werden grundsätzlich RhD-Blutgruppen mit verminderter Expression (weak D-Typen) von solchen mit qualitativ veränderter Antigen D-Ausprägung (Partial-D's oder D-Kategorien) unterschieden. Die häufigen weak D-Typen, die Typen 1 bis 3, sind nach heutigem Kenntnisstand nicht Anti-D-immunisierbar und sollten daher im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge als RhD-positiv betrachtet werden. Im Gegensatz dazu muss bei Schwangeren mit Partial-D's aufgrund des Fehlens einzelner RhD-Epitope mit einer Allo-Anti-D-Immunsierung gerechnet werden. Das Anti-D-Immunsierungsrisiko der vielen anderen, sehr seltenen weak D-Typen ist zur Zeit nicht abschätzbar. Der

spezifische Nachweis der weak D-Typen und der Partial-D's ist nur mit Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden möglich.

Nach den derzeit gültigen Hämotherapierichtlinien werden zur Bestimmung des Antigens D in der Mutterschaftsvorsorge zwei unterschiedliche monoklonale Anti-D-Antikörper eingesetzt, die mit der in unseren Breiten häufigsten D-Kategorie, der D-Kategorie VI, nicht reagieren. Dieses Verfahren führt dazu, dass Schwangere mit D-Kategorie VI absichtlich als "falsch-negativ" bestimmt werden. Ist der Reaktionsausfall mit beiden Antikörpern positiv, so ist die Schwangere RhD-positiv und benötigt keine Anti-D-Prophylaxe. Ist der Reaktionsausfall negativ, muss die Schwangere eine Prophylaxe erhalten. Liegt ein fraglich positiver serologischer Befund vor, so wird eine weitere Abklärung erforderlich. Die allermeisten der unklaren Blutproben repräsentieren weak D-Typ 1, Typ 2 oder Typ 3, deren spezifischer Nachweis nur mit molekularen Methoden gelingt. Angesichts der Fülle genetischer D-Varianten könnte eine pragmatisch ausgerichtete molekularbiologische RhD-Typisierung so aussehen, dass nur die häufigen weak D-Typen 1 bis 3 identifiziert und alle anderen selteneren weak





D-Typen sowie D-Kategorien nicht erfasst werden. Auf diese Weise bekäme man bei den meisten Schwangeren mit weak D-Typen eine gesicherte Indikation, um auf eine Anti-D-Gabe verzichten zu können. Bei den restlichen Fällen mit aberranten RhD-Phänotypen lieferte dieses Vorgehen eine differenziertere Grundlage für die Anwendung der Anti-D-Prophylaxe.

Molekulargenetische Bestimmung des fötalen RhD-Status aus mütterlichem Blut

Fötale DNA im mütterlichen Blut

In den letzten Jahren konnte im Rahmen von Studien die Bestimmung fötaler Rhesus-Faktoren im mütterlichen Blut etabliert werden. Fötale DNA wird in der Schwangerschaft wahrscheinlich überwiegend aus apoptotischen Synzytiotrophoblastzellkernen freigesetzt. Der Synzytiotrophoblast steht in direktem Kontakt mit dem mütterlichen Kreislauf und apoptotische Zellkerne können beim Umbau der Plazenta in das mütterliche Blut gelangen. Weiterhin werden während der Schwangerschaft Mikrovesikel aus der Plazenta freigesetzt, die

fötale RNA und DNA enthalten und mit einer Halbwertszeit von ca. 15 Minuten aus dem mütterlichen Kreislauf entfernt werden. Am häufigsten wird eine Real-time-PCR mit sequenzspezifischen Primern und Sonden eingesetzt, um fötale Rhesus-Faktoren anhand spezifischer Nukleinsäurepolymorphismen im mütterlichen Blut zu bestimmen. Freie fötale DNA unterliegt im mütterlichen Blut einem raschen Abbauprozess und ist wenige Stunden nach der Geburt nicht mehr im mütterlichen Blut nachweisbar (10). Im Vergleich zur molekulargenetischen Bestimmung aus Chorionzotten, Amnionflüssigkeit oder Nabelschnurblut ist daher nicht in allen Fällen ausreichend freie fötale DNA im mütterlichen Kreislauf nachweisbar. Da die Fragmente freier fötaler DNA zum großen Teil deutlich kürzer sind (< 300 bp), müssen Methoden, die ursprünglich anhand von genomischer DNA aus Amnionzellen oder Chorionzotten etabliert wurden, mit mütterlichem Plasma neu validiert werden.

Aufgrund der vorliegenden physiologischen Erkenntnisse und longitudinaler Untersuchungen ist es verständlich, dass die Konzentration freier fötaler DNA zu Beginn der Schwangerschaft geringer ist

als zum Ende der Schwangerschaft. Es kommt jedoch nicht zu einem linearen Anstieg der Konzentration fötaler DNA im Verlauf der Schwangerschaft, sondern dieser Anstieg verläuft wellenförmig. Die erhebliche biologische Variabilität wurde durch eine Untersuchung in der 30. SSW deutlich, in der zwischen 15 und 708 Genomäquivalente *RHD*-positive DNA pro Milliliter Plasma bei 160 RhD-negativen Schwangeren mit RhD-positiven Föten nachgewiesen wurden (11).

Fötale RhD-Bestimmung bei Anti-D immunisierten Schwangeren

Im Rahmen der Rhesus-Diagnostik in der Schwangerschaft kann die Bestimmung fötaler Rhesus-Faktoren aus mütterlichem Blut wertvoll sein, da dadurch die mit einer invasiven Diagnostik verbundenen Risiken vermieden werden. Diese Diagnostik wird in Deutschland studienbegleitend zur Zeit vom Institut Bremen-Oldenburg des DRK Blutspendedienst NSTOB angeboten; im Ausland haben sich Zentren in Amsterdam und Bristol etabliert (12). Die Grenzen der Methode müssen in die Befundinterpretation immer mit einfließen, um nicht durch Fehlschlüsse zu neuen Risiken für den Föten und die Schwan-

gere zu führen. So sollte z. B. bei einer Schwangeren mit Anti-D und einem, aus mütterlichem Blut bestimmten negativen fötalen RhD-Status sichergestellt werden, dass in der untersuchten Probe ausreichend fötale DNA vorhanden war. Zur Befundsicherung kann der molekulargenetische Nachweis des Y-Chromosoms verwendet werden, wobei jedoch die Methode zum Nachweis des Y-Chromosoms nicht empfindlicher sein sollte als die Methode zum Nachweis des RhD-Faktors. Bei RhD-negativen weiblichen Föten müssen zunächst informative Polymorphismen identifiziert werden, die vom Kindsvater vererbt werden könnten und in mütterlichen Blutlymphozyten nicht vorkommen. Auch bei diesem aufwändigen Vorgehen kommt es vor, dass keine informativen Polymorphismen im mütterlichen Blut identifiziert werden können. Wie bei jeder Blutgruppenbestimmung ist es ratsam, bei Schwangeren mit Anti-D den Genotypisierungsbefund aus mütterlichem Blut durch eine Wiederholungsuntersuchung abzusichern.

Indikationsbezogene Anti-D-Prophylaxe

Die Bestimmung des fötalen RhD-Status aus mütterlichem Blut ist eine nicht-invasive Methode,

die nicht nur dazu beitragen kann, bei Schwangeren mit Anti-D frühzeitig eine fetomaternale RhD-Inkompatibilität zu diagnostizieren, sondern bietet auch die Möglichkeit, den fötalen RhD-Status in der Schwangerschaft bereits vor Gabe der präpartalen Anti-D-Prophylaxe zu bestimmen. Die derzeitigen Regelungen lassen streng genommen keine indikationsbezogene (nur bei RhD-positiven Föten) Anti-D-Prophylaxe nach Untersuchung von fötalem Material zu. Bei 40 % der RhD-negativen Schwangeren besteht eigentlich keine Indikation für eine Anti-D-Prophylaxe, da der Fötus RhD-negativ ist. Damit erhalten jährlich mindestens 50.000 Schwangere in Deutschland unnötigerweise Anti-D-Immunglobulin. Bei Einführung der Anti-D-Prophylaxe war ein indikationsbezogenes Vorgehen während der Schwangerschaft nicht möglich, da keine Testverfahren zur Bestimmung der fötalen RhD-Eigenschaft zur Verfügung standen. In den letzten Jahren sind jedoch zahlreiche Studien publiziert worden, die die Zuverlässigkeit einer molekulargenetischen *RHD*-Bestimmung aus Fruchtwasser oder auch mütterlichem Blut belegen (10,12-18). Daher wird derzeit diskutiert, ob eine generelle präpartale Anti-D-Prophylaxe unter medizinischen Gesichtspunkten noch zu rechtfertigen ist, zumal das Restrisiko einer Infektion durch das aus menschlichem Plasma gewonnene Anti-D-Präparat besteht. In den Niederlanden steht eine indikationsbezogene Anti-D-Prophylaxe bereits kurz vor der landesweiten Einführung.

tigen ist, zumal das Restrisiko einer Infektion durch das aus menschlichem Plasma gewonnene Anti-D-Präparat besteht. In den Niederlanden steht eine indikationsbezogene Anti-D-Prophylaxe bereits kurz vor der landesweiten Einführung.

EU-Exzellenznetzwerk SAFE

Die diagnostische Genauigkeit der präpartalen RhD-Bestimmung aus mütterlichem Plasma lag in der bisher größten Studie mit 1.257 Bestimmungen in der 30. SSW bei 99,4 % (19). In dieser Studie wurden drei falsch negative und fünf falsch positive Ergebnisse beobachtet. Falsch positive Ergebnisse werden z. B. beobachtet, wenn *RHD*-Gen-Varianten mit RhD-negativem Phänotyp mit den molekulargenetischen Methoden als RhD-positiv bestimmt werden. Diese Konstellation ist jedoch in der deutschsprachigen Bevölkerung sehr selten und hätte lediglich eine nicht-indizierte Anti-D-Prophylaxe zur Folge. Derzeit besteht im Rahmen eines mit insgesamt 12 Mio € für 53 Arbeitsgruppen über fünf Jahre seit 2004 geförderten EU-Projekts (Exzellenznetzwerk SAFE) (20) die Möglichkeit, an einer Studie der Abteilung Transfusionsmedizin an der Universität Göttingen teilzunehmen, um die diagnos-



Organisation des Rhesus-Genkomplexes und der *Rhesus boxen*

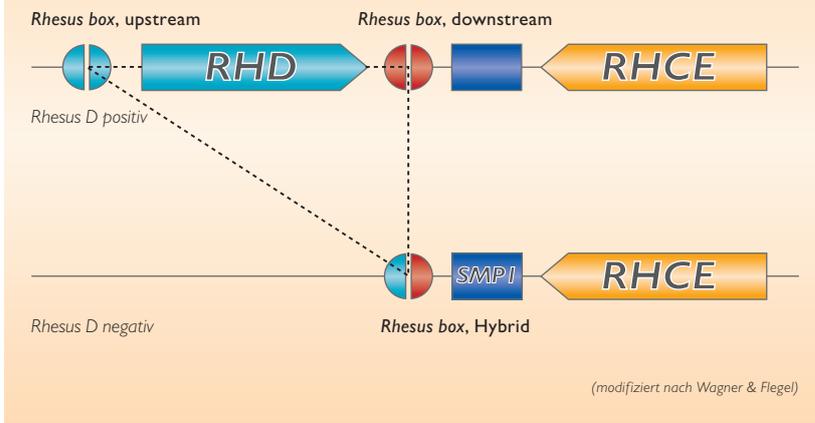


Abbildung 6

tische Genauigkeit mit den modernsten Verfahren zu ermitteln. Zur Optimierung der Testverfahren finden innerhalb des EU-Netzwerks Workshops und Standardisierungskonferenzen statt. Jährliche internationale Ringversuche wurden bereits implementiert. Ein internationales Konsensusprotokoll für die fötale RhD-Bestimmung aus mütterlichem Blut wird für 2007 erwartet.

Paternale RhD-Diagnostik bei Kinderwunsch

Wird bei einer schwangeren Frau ein irregulärer Anti-D Antikörper identifiziert, besteht häufig die Frage nach dem MHN-Risiko bei weiteren Schwangerschaften. Aus epidemiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass ein MHN meistens erst bei einer Zweit- oder Drittschwangerschaft eintritt.

Ob ein Kindsvater für das Merkmal RhD homozygot ist, kann mit serologischen Techniken nicht bestimmt werden, da über die Antigenreaktion keine Aussage gemacht werden kann, ob hier ein *RHD*-Gen oder zwei *RHD*-Gene vorliegen. Aus diesem Grund wird in serologischen Befunden bei RhD-positiven Personen ein Punkt gesetzt (D.).

Die Kenntnis über die genomische Organisation des Rhesuskomplexes ermöglicht seit wenigen Jahren die Zygoteabklärung mit molekulargenetischen Techniken (**Abbildung 6**) (21). Der Rhesuskomplex besteht aus den beiden Genen für Rhesus D (*RHD*) und Rhesus CcEe (*RHCE*). Diese bestehen jeweils aus zehn Exonen und sind in umgekehrter Orientierung auf dem Chromosom angeordnet. Zwischen beiden Genen liegt das *SMP1*-Gen, dessen Funktion bis heute nicht geklärt ist. Vor

und hinter dem *RHD*-Gen liegen zwei sehr ähnliche Bereiche, die so genannten *Rhesus boxen*, die sich aber auf der Ebene der DNA-Sequenz unterscheiden lassen. Aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Sequenzen kann es in diesem Bereich zu einer Rekombination kommen, die eine Eliminierung des *RHD*-Gens zur Folge hat (**angedeutet mit gestrichelten Linien in **Abbildung 6****). Die *Rhesus box*, die dabei entsteht, ist dann zusammengesetzt aus der upstream- und der downstream-*Rhesus box*. Bei Verwendung geeigneter Amplifikationsprimer können diese Bereiche durch PCR vermehrt und differenziert werden. Das Fehlen einer hybrid *Rhesus box* bedeutet, dass der Proband homozygot für das *RHD*-Gen ist und damit RhD-positiv ist. Der Nachweis einer hybrid *Rhesus box* hingegen bedeutet, dass der Proband entweder heterozygot für das *RHD*-Gen ist oder kein *RHD*-Gen besitzt. In Zusammenschau mit dem serologischen RhD-Status des Probanden kann dann auf eine *RHD*-Heterozygotie oder ein Fehlen des *RHD*-Gens zurückgeschlossen werden.

Alternativ kann die Homozygotie des *RHD*-Gens auch über die quantitative Messung und den Vergleich einzelner Exone bestimmt werden (**Abbildungen 7a**



Quantitative Bestimmung der RHD-Zygotie

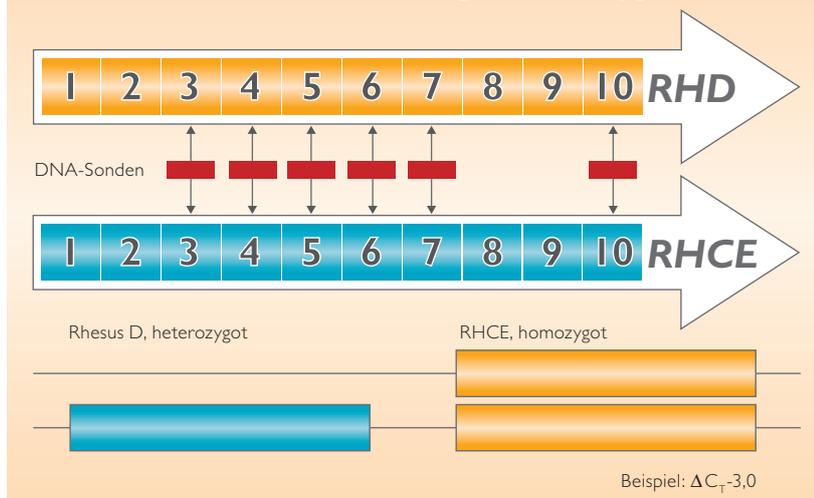


Abbildung 7a

Bei der quantitativen Bestimmung werden die Verhältnisse bestimmter Exone zueinander gemessen. In der Abbildung ist die Lage der Sonden im Bereich der Exons 3, 4, 5, 6, 7 und 10 dargestellt.

und 7b) (21). Dafür benutzt man z. B. als Kontrolle das *RHCE*-Gen, das in der Regel immer zweimal vorkommt. Wenn nun die Genkopien der Exone drei der *RHD*- und *RHCE*-Gene quantifiziert werden und das Mengenverhältnis 1:1 beträgt, liegt eine *RHD*-homozygoter Proband vor; ist das Verhältnis der Genkopienzahl 1:2, ist der Proband folglich heterozygot für das *RHD*-Gen. In **Abbildung 7a** ist die Lage verschiedener fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden wiedergegeben, mit denen eine solche Messung durchgeführt werden kann. Bedingt durch die hohe Anzahl von varianten *RHD*-Allelen gibt es leider *RHD*-Varianten, bei denen einzelne Exons fehlen können. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, die Untersuchung an zwei unterschiedlichen Exons durchzuführen. In **Abbildung 7b** ist die Auswertung innerhalb einer Probandenstudie in Form einer Skizze wiedergegeben. Die blauen Kreuze symbolisieren dabei DNA-Proben von heterozygoten RhD-positiven Kindern von RhD-negativen Müttern. Aufgrund der hohen Allelvariabilität im Rhesuskomplex – zur Zeit sind über 150

Auswertetabelle für die RHD-Zygotie

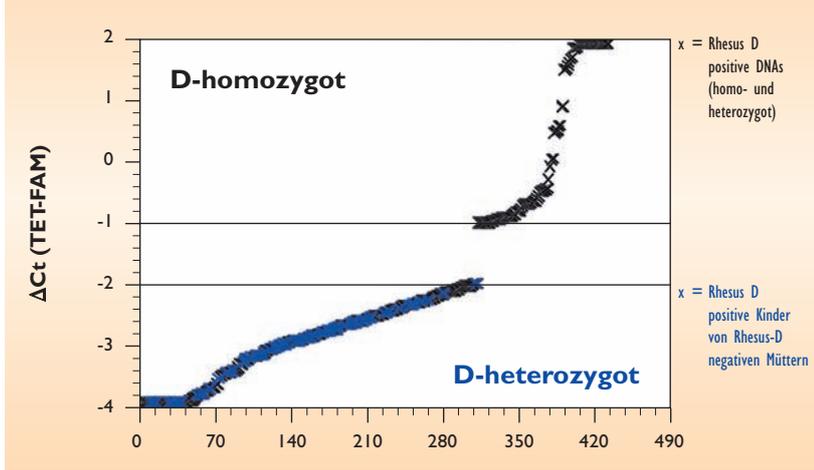


Abbildung 7b

Bei Verwendung der Real-Time-PCR wird gemessen, bei welchem PCR-Zyklus das Amplifikat sicher nachgewiesen werden kann. Je mehr Ausgangsmaterial vorhanden ist, desto früher ist ein Signal (CT) messbar. Aus den Unterschieden zwischen den Signalen (ΔCT) lässt sich bestimmen, ob die DNA für ein definiertes Exon einfach oder doppelt vorkommt.

Homozygote Probanden zeigen (ΔCT) Messwerte zwischen +2 und -1.

Heterozygote Probanden zeigen (ΔCT) Messwerte zwischen -2 und -4.

Die Rhesus D-positiven Kinder von Rhesus D-negativen Müttern sind *RHD*-heterozygot. Die blauen Kreuze liegen alle in der unteren Hälfte der Auswertetabelle.

Varianten bekannt – kann eine exakte Bestimmung der Zygotie des *RHD*-Gens, insbesondere bei Proben mit afrikanischem Ursprung, sehr komplex werden. Die Ergebnisse laufender internationalen Studien werden zeigen, welche der

beiden genannten Methoden in praxi die sichersten Ergebnisse liefert.

Die Literaturhinweise finden Sie im Internet zum Download www.drk.de/blutspende