

Fetale Rhesusfaktor-Bestimmung aus dem Blut der Rhesus-negativen Schwangeren:

# Trendsetter Skandinavien als Vorbild für ein Umdenken in der Schweiz?

In verschiedenen europäischen Ländern, insbesondere in Skandinavien und den Niederlanden, wird das non-invasive prenatal testing auch zur Detektion des fetalen Rhesus-Faktors aus mütterlichem Blut verwendet, um so bereits in der Schwangerschaft zu entscheiden, ob eine Indikation für die Anti-D-Prophylaxe besteht.

**Dans plusieurs pays européens, notamment en Scandinavie et aux Pays Bas, le dépistage prénatal non-invasif (DPNI) est utilisé aussi pour la détection du facteur Rhésus du fœtus dans le sang maternel. Ceci permet déjà pendant la grossesse de déterminer la nécessité d'une prophylaxie anti-D.**

Die nichtinvasive Pränataldiagnostik hat Einzug in den klinischen Alltag der pränatalen Betreuung gehalten. Seit dem Jahr 2012 können Patientinnen in der Schweiz die sogenannte NIPT (non-invasive prenatal testing) in Anspruch nehmen. Dabei wird aus dem mütterlichen Blut fetale und maternale zellfreie DNA isoliert und auf Chromosomenstörungen untersucht. Zu Beginn stand dabei die Detektion von Trisomie 21 im Vordergrund, mittlerweile werden von verschiedenen Anbietern auch weitere Chromosomenstörungen detektiert (1). In anderen europäischen Ländern, insbesondere in Skandinavien und den Niederlanden, wird die NIPT auch zur Detektion des fetalen Rhesus-Faktors aus mütterlichem Blut verwendet, um so bereits in der Schwangerschaft zu entscheiden, ob eine Indikation für die Anti D Prophylaxe besteht (2). Bisher hat sich diese Indikation für die NIPT in der Schweiz jedoch noch nicht etablieren können.

## Molekulargenetische Bestimmung des fetalen RhD-Status aus mütterlichem Blut: Fetale DNA im mütterlichen Blut

Dennis Lo et al. entdeckten bereits 1997, dass zellfreie fetale DNA im Plasma und Serum der Mutter nachgewiesen werden kann (2, 3). Diese DNA-Fragmente werden 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. Somit ist freie fetale DNA im mütterlichen Blut in höherer Konzentration als fetale Zellen nachweisbar. Detektiert wird die fetale DNA mittels Real-Time PCR mit sequenzspezifischen Primern und Sonden anhand spezifischer Nukleinsäurepolymorphismen (4).

Somit wurde es möglich, den fetalen Rhesus Faktor aus mütterlichem Blut zu bestimmen, ohne invasive Methoden wie Amniozentese (AC) oder Chorionzottenbiopsie (CVS) zu verwenden und dadurch das Risiko eines Abortes einzugehen, das je nach Schwangerschaftswoche bis zu 2% betragen kann (3, 5, 6). Freie fetale DNA



**Dr. med.**  
**Anna Seidenfuss**  
Basel

**PD Dr. med.**  
**Olav Lapaire**  
Basel

**Dr. med.**  
**Johanna Büchel**  
Basel

unterliegt im mütterlichen Blut einem raschen Abbauprozess über die Niere und ist wenige Stunden nach der Geburt nicht mehr im mütterlichen Blut nachweisbar. Somit kann man immer sicher gehen, dass die nachgewiesene fetale DNA nicht etwa aus einer vorherigen Schwangerschaft stammt (7). Faas et al. und Lo et al. haben beide fast gleichzeitig 1998 gezeigt, dass die RhD Sequenz verlässlich aus dem Plasma amplifiziert werden kann (3, 5).

Die Konzentration fetaler DNA ist zu Beginn der Schwangerschaft geringer als zum Ende hin, ist aber bereits in der Frühschwangerschaft nachweisbar. Dass zu wenig Material in einer zu frühen Schwangerschaftswoche gewonnen wurde, ist auch die Erklärung für die wenigen Fälle eines falsch-negativen Ergebnisses (8). Die Gruppe um Finning in Bristol zeigte 2002 in einer Studie mit 137 Frauen eine 100%ige Treffsicherheit, den fetalen Rhesusfaktor zu detektieren (9). Gautier et al. konnten 2005 dasselbe Ergebnis zeigen, und kamen bei einer Studie mit 285 Frauen auf eine 100%ige Trefferquote (10). Somit ist die Methode, den Rhesusfaktor im dritten Trimenon zu bestimmen, also zu dem Zeitpunkt, an dem normalerweise die „blinde Gabe“ der Anti-D-Prophylaxe stattfindet, sehr zuverlässig.

Um nachzuweisen, dass fetale DNA im mütterlichen Blut vorhanden ist, wird die SRY Sequenz amplifiziert. Wird Y DNA nachgewiesen, ist klar, dass der Fetus männlich ist. Fehlt dieser Nachweis, wird ein weiblicher Fetus erwartet. Dann wird anhand verschiedener Nukleinsäurepolymorphismen zwischen mütterlicher und kindlicher DNA unterschieden (11). Ein anderer Ansatz ist die Verwendung allel-spezifischer real-time PCR mit 10 verschiedenen Primer-Proben Kombinationen. So sollte in 94% der Fälle eine Unterscheidung zwischen mütterlicher und weiblicher fetaler DNA möglich sein (4).

## Morbus haemolyticus neonatorum (MHN) durch Rhesusinkompatibilität

Ogleich seit Einführung der Anti-D-Prophylaxe Ende der 60er Jahre der Anti-D bedingte Morbus haemolyticus neonatorum 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.

Voraussetzung für eine feto-maternale RhD-Inkompatibilität sind die Immunisierung einer RhD-negativen Mutter, die Bildung und der diaplazentaren Übertritt von Antikörpern (AK) der Klasse IgG und das Vorhandensein des RhD-Antigens auf den kindlichen Erythrozyten vom RhD positiven Vater geerbt (12). Das immunisierende Ereignis ist der transplazentare Übertritt fetalen, RhD positiven Blutes. Dieses wird in knapp 50% der Schwangerschaften bis zum 3. Trimenon idiopathisch beobachtet. Auch Traumata und invasive diagnostische Eingriffe wie CVS und AC können ursächlich sein. Als Folge dieser Einschwemmung mütterlicher Antikörper in den kindlichen Kreislauf kommt es zu einem beschleunigten Abbau der AK-beladenen roten Blutzellen im retikuloendothelialen System (RES), was sich in einem hämolytischen Syndrom mit verkürzter Lebenszeit der kindlichen Erythrozyten manifestiert. Das klinische Bild des MHN ist variabel: In leichten Fällen entwickelt sich lediglich eine frühzeitige Hyperbillirubinämie (Icterus praecox) und eine leichte Anämie, während in schweren Fällen die Bilirubinkonzentration soweit ansteigen kann (Icterus gravis), dass es zu einer irreversiblen Schädigung von Nervenzellen und neurologischen Ausfällen mit gelblicher Anfärbung der Basalganglien des Gehirns (Kernikterus) kommen kann. Die schwerste Form ist der Hydrops fetalis mit Ödemen, Aszites, Pleura- und Perikardergüssen infolge anämischer Hypoxie und Hypalbuminämie.

### Anti-D-Prophylaxe

Gemäss den Schweizer Schwangerschaftsrichtlinien wird bei Rh(D)-negativen Schwangeren in der Frühschwangerschaft ein Antikörpersuchtest mittels indirektem Coombs-Test durchgeführt. Ist dieser unauffällig, erfolgt die standardmässige Gabe der Anti-D Prophylaxe in der 28. bis 30. Schwangerschaftswoche. Bestätigt sich postpartal, dass das Kind RhD-positiv ist, erhält die Mutter eine zweite prophylaktische Gabe, um die Bildung von mütterlichen Antikörpern zu verhindern.

In vielen Fällen bleibt es in der Schwangerschaft nicht bei einer einmaligen Gabe. Bei Abdominaltraumata, vaginaler Blutung, vorzeitiger Wehentätigkeit oder invasiver Diagnostik wie Amniozentese (AC) oder Chorionzottenbiopsie (CVS) muss innerhalb von 72h eine prophylaktische Gabe erfolgen, um die Sensibilisierung der Mutter zu verhindern.

Eine Fertigspritze Rhophylac enthält 300 µg (1500 IE) humanes Anti D Immunglobulin G (IgG). Eine Einzeldosis von 300 µg reicht zur Neutralisierung einer feto-maternalen Transfusion von 15 ml Rh(D)-positiven Erythrozyten. Damit ist der Schutz der überwiegenden Mehrzahl Rh(D)-negativer Frauen gewährleistet (Arzneimittel-Compendium). Hat eine Transfusion von mehr Blut stattgefunden, kann – nach Abschätzung der Menge mittels Kleinhauer Test – eine grössere Menge Rhophylac verabreicht werden.

Rund 15% der Schwangeren in der Schweiz sind Rh(D)-negativ. Ist der Kindsvater heterozygot Rh(D)-positiv, besteht eine 50%ige Chance, dass das Kind Rh(D)-negativ ist. In Schwangerschaften, in denen das Kind also wie die Mutter Rhesus-negativ ist, besteht also keine Indikation für eine Anti-D-Prophylaxe. In Deutschland erhalten jährlich 50000 Schwangere unnötigerweise Anti-D. Dies birgt einerseits das potenzielle Risiko einer Infektion durch das aus menschlichem Plasma gewonnene Anti D Präparat, zum anderen ist auch der finanzielle Aspekt von rund 110 Franken pro Gabe zu bedenken. Bestimmt man, wie in den skandinavischen Ländern Usus, bei Rhesus-negativen Schwangeren den fetalen Rhesus-Faktor aus mütterlichem Blut, so kann auf die Gabe von Anti

D bei Schwangeren mit Rh(D)-negativem Kind verzichtet werden. Dies ist deutlich kostengünstiger als eine flächendeckende Prophylaxe. Betrachtet man die Geburtenzahl von 2014 (n = 83 753) in der Schweiz, dann sind bei 15% Rhesus-negativen Frauen 12 563 Frauen von der Rhesus-Gabe betroffen. Davon ausgehend, dass 40% der Rh(D)-negativen Frauen mit einem Rh(D)-negativem Kind schwanger sind, erhalten rund 5000 Frauen unnötigerweise eine Injektion. Das verursacht Kosten in der Höhe von rund 550 000 Franken.

Die Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors mittels nichtinvasiver Pränataldiagnostik hingegen verursacht in Ländern, in denen der Test bereits routinemässig angeboten wird, Kosten von umgerechnet ca. 15 Franken, exklusive Lohnkosten, pro Probe. Da die Abläufe stark automatisiert sind, sind die Lohnkosten gering (9).

### Ausblick

Das Wissen um die Pathophysiologie des Morbus haemolyticus neonatorum und die Einführung der Routine Anti-D-Prophylaxe im dritten Trimenon der Schwangerschaft konnte die Immunisierung RhD negativer Frauen von ca. 15% auf 0.2–0.5% reduzieren und somit den MHN glücklicherweise zu einer extrem seltenen Komplikation werden lassen (13).

Der nächste Schritt könnte ein weiterer Meilenstein in Richtung personalisierter Medizin sein. Mit den Mitteln, die uns in der Pränataldiagnostik zur Verfügung stehen, sollte es möglich sein, die Anti-D-Prophylaxe wirklich nur dann zu verabreichen, wenn eine nachgewiesene Indikation besteht.

**Dr. med. Anna Seidenfuss**

**PD Dr. med. Olav Lapaire**

**Dr. med. Johanna Büchel**

Frauenklinik, Universitätsspital Basel

Spitalstrasse 21, 4031 Basel

anna.seidenfuss@usb.ch

#### Take-Home Message

- ◆ Die NIPT mittels Detektion von fetaler DNA im mütterlichen Blut ist mittlerweile fester Bestandteil der nicht-invasiven pränatalen Untersuchung hinsichtlich Trisomie 13, 18 und 21.
- ◆ Im Rahmen der Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors aus mütterlichem Blut könnte eine weitere Anwendungsmöglichkeit in der Schweiz etabliert werden
- ◆ Durch die Bestimmung des fetalen Rhesus-Faktors wäre die Anti-D Prophylaxe dann nur noch in den Fällen zu verabreichen, in denen der Fetus einer Rhesus-negativen Mutter Rhesus-positiv ist

#### Messages à retenir

- ◆ Le diagnostic prénatal non-invasif (DPNI) qui permet de détecter l'ADN foetale dans le sang maternel fait actuellement déjà partie des investigations non-invasives concernant les trisomies 13, 18 et 21
- ◆ Considérant la possibilité technique de déterminer le facteur Rhésus foetal à partir d'un échantillon de sang maternel, il est envisageable d'introduire le DPNI aussi en Suisse dans cette indication
- ◆ La détermination du facteur Rhesus foetal dans le sang maternel permettrait de cibler la prophylaxie anti-D et de la limiter aux grossesses chez les femmes Rhésus-négatif

**Literatur:**

1. Manegold-Brauer G et al. The special role of ultrasound for screening, staging and surveillance of malignant ovarian tumors: distinction from other methods of diagnostic imaging. *Arch Gynecol Obstet* 2014;289(3):491-8
2. Lapaire O et al. Impact of fetal-maternal microchimerism on women's health--a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20(1):1-5
3. Lo YM et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485-7
4. Bianchi DW et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal Rhesus D: ready for Prime(r) Time. *Obstet Gynecol* 2005;106(4):841-4
5. Faas BH et al. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998;352(9135):1196
6. Lo YM et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339(24):1734-8
7. Van der Schoot CE et al. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol*. 2006 13(1-2):53-7
8. Van der Schoot CE et al. Prenatal typing of Rh and Kell blood group system antigens: the edge of a watershed. *Transfus Med Rev* 2003;17(1):31-44
9. Finning KM et al. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42(8):1079-85
10. Gautier E et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192(3):666-9
11. Finning K et al. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:119-23
12. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev* 2000;14(1):44-61
13. Turner RM et al. Routine antenatal anti-D prophylaxis in women who are Rh(D) negative: meta-analyses adjusted for differences in study design and quality. *PLoS One*. 2012;7(2):e30711