

Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors-D

Sicherheit durch Rhesus-D-Diagnostik

Klinischer Hintergrund

Die vorgeburtliche Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors-D (RhD) bei RhD-negativen Schwangeren mit einer Einlingsschwangerschaft wird in die Mutterschafts-Richtlinien aufgenommen und damit Bestandteil des Leistungskatalogs der gesetzlichen Krankenkassen.

Der Rhesusfaktor-D, kurz RhD, ist ein Blutgruppenmerkmal, welches bei etwa 17% der Menschen und damit auch der schwangeren Frauen in Europa fehlt. Bei ihnen besteht während der ersten Schwangerschaft oder bei der Geburt des Kindes die Gefahr der RhD-Sensibilisierung (Aufbau einer Immunantwort durch die Bildung von Antikörpern), wenn der Fetus RhD-positiv ist. Die Sensibilisierung wird durch fetale Erythrozyten hervorgerufen, die das RhD-Protein auf ihrer Zelloberfläche tragen (RhD-positiv sind) und Kontakt zum mütterlichen Immunsystem erhalten. Bei diesem als Alloimmunisierung bezeichneten Prozess erkennt das mütterliche Immunsystem das fetale RhD-Antigen als fremd. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass es in mehr als der Hälfte der Schwangerschaften (andere Quellen: in nahezu allen Schwangerschaften) zu einem Kontakt zwischen fetalem Blut und mütterlichem Immunsystem kommt. Als potenziell sensibilisierende Ereignisse in der Schwangerschaft zählen z. B.:

- invasive Pränataldiagnostik,
- Bauchtrauma,
- die Entbindung des Kindes.

Als weitere mögliche Ursachen einer Sensibilisierung kommen eine frühere Bluttransfusion, Abort oder Schwangerschaftsabbruch in Frage.

Der Erstkontakt mit dem RhD-Antigen und die darauf folgende Sensibilisierung sind in der Regel noch ohne klinische Relevanz – die bei der Primärimmunisierung gebildeten IgM-Antikörper haben eine zu geringe Konzentration und sind aufgrund ihrer Größe nicht plazentagängig. Bei jeder weiteren Schwangerschaft mit einem RhD-positiven Kind kann es hingegen zu einer RhD-Inkompatibilität zwischen Mutter und Fetus kommen (Abbildung 1). Der wiederholte Kontakt des mütterlichen (sensibilisierten) Immunsystems mit dem fetalen RhD-Antigen resultiert in einer starken IgG-vermittelten anti-RhD-Immunreaktion (Booster-Effekt). Die IgG-Antikörper sind plazentagängig, gelangen somit in die Zirkulation des Fetus und binden dort an das RhD-Antigen auf den

Das Wichtigste auf einen Blick

Die Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors-D (RhD) aus dem Blut von RhD-negativen Schwangeren ist nun Bestandteil des Leistungskatalogs der gesetzlichen Krankenkassen.

- Einlingsschwangerschaft
- Möglich ab 12. SSW (SSW 11+0)
- Fällt unter das GenDG und erfordert eine schriftliche Einwilligung
- Verhindert eine unnötige Anti-D-Prophylaxe
- Als neuer diagnostischer Test in der Limbach Gruppe mit hoher Spezifität und Sensitivität angeboten

fetalen Erythrozyten, was zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Hämolyse der Erythrozyten führt. Es besteht die Gefahr eines *Morbus haemolyticus fetalis* (MHF) oder eines *Morbus haemolyticus neonatorum* (MHN) mit resultierender Erythroblastose und Anämie des Fetus oder Neugeborenen:

- pränatal: Hyperbilirubinämie, schwerster Verlauf mit Hydrops fetalis und evtl. Fruchttod
- postnatal: Hyperbilirubinämie mit Ikterus oder Kernikterus und in der Folge Hirnschäden

Bislang erhalten mehr als ein Drittel der RhD-negativen Schwangeren in Deutschland eine ungezielte präpartale Anti-D-Prophylaxe, obwohl diese aufgrund des RhD-negativen Status des Kindes klinisch nicht indiziert ist. RhD-negativen Schwangeren wird zwischen der 28. und 30. Schwangerschaftswoche (SSW) und noch einmal nach der Geburt (sofern das Neugeborene RhD-positiv getestet wurde) Anti-D-Immunglobulin gespritzt. Die Prophylaxe verhindert, dass RhD-positive Blutzellen des Fetus während der Schwangerschaft oder in Folge der Geburt des Kindes Kontakt zum mütterlichen Immunsystem erhalten.

Bislang erfolgte die Bestimmung des kindlichen RhD-Merkmals erstmalig nach der Geburt – die präpartale Anti-D-Prophylaxe war bei ca. 40% der RhD-negativen Schwangeren aufgrund des RhD-negativen Status des Fetus klinisch überflüssig. Die pränatale Bestimmung des fetalen RhD-Merkmals erlaubt nunmehr die gezielte Prophylaxe nur bei denjenigen Frauen, deren ungeborenes Kind Träger des RhD-Merkmals ist.

Indikation

Die medizinischen Voraussetzungen für die Untersuchung sind:

- RhD-negative Schwangere mit Einlingsschwangerschaft,
- ab 12. SSW (SSW 11+0); die Sensitivität des Tests steigt mit zunehmender SSW (optimal ab ca. SSW 20).

Da es sich bei der Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors-D um eine vorgeburtliche genetische Untersuchung handelt, sind neben den klinischen Voraussetzungen die Regelungen, die sich aus dem Gendiagnostikgesetz (GenDG) ergeben, zu berücksichtigen. Dafür ist zum einen die informierte, schriftliche Einwilligung der Schwangeren zur humangenetischen Untersuchung notwendig. Für ein entsprechendes Formular kontaktieren Sie bitte Ihr Limbach Labor. Zum anderen gelten der Arztvorbehalt und die ärztlichen Aufklärungs- und Beratungsverpflichtungen entsprechend GenDG.

Labordiagnostik

Methode

Analysiert wird die im Blut der Mutter frei zirkulierende fetale DNA: cffDNA (aus dem Englischen für *cell-free fetal DNA*). Jeder Mensch hat im Blut frei zirkulierende DNA, die auch unter physiologischen Bedingungen aus den Zellen in den Blutkreislauf freigesetzt wird. Im Falle der cffDNA gelangt fetale DNA in die mütterliche Zirkulation. Die Menge an cffDNA nimmt im Verlauf der Schwangerschaft stetig zu.

Fachliche Voraussetzungen zur genetischen Beratung

Die genetische Beratung bei nicht invasiven Pränataltests (NIPT) darf nur durch Gynäkologinnen und Gynäkologen erfolgen, die über eine entsprechende Qualifikation für diese Beratung gemäß GenDG und den Richtlinien der Gendiagnostik-Kommission verfügen. Dafür sind 72 Fortbildungseinheiten und eine dazugehörige praktisch-kommunikative Qualifizierungsmaßnahme erforderlich.

Hiervon unberührt bleiben die bereits vorhandenen Beratungsqualifikationen von folgenden Fachgruppen:

- Fachärztin oder Facharzt für Humangenetik,
- Frauenärztin oder Frauenarzt, die ihre Bescheinigung „fachgebundene genetische Beratung“ beispielsweise im Rahmen einer Übergangsregelung bis zum 10. Juli 2016 erworben haben.

Da lediglich eine Blutentnahme bei der Mutter erforderlich ist (der Fetus selbst muss nicht untersucht werden), spricht man – im Gegensatz zu einer Chorionzottenbiopsie oder einer Fruchtwasseruntersuchung – von einem nicht invasiven Verfahren (NIPT, nicht invasiver Pränataltest, bzw. NIPD, nicht invasive Pränataldiagnostik).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ausprägung einer RhD-Inkompatibilität zwischen Mutter und Fetus.

Die cffDNA wird aus dem Blutplasma gewonnen, der Test auf das Vorliegen der fetalen RhD-DNA, konkret des *RHD*-Gens, erfolgt mittels quantitativer PCR (qPCR, manchmal auch als RT-PCR bezeichnet).

Testgenauigkeit

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der RhD-NIPT ab ca. der 10. bis 12. SSW valide Ergebnisse liefert, wobei die Testgenauigkeit mit höherer SSW zunimmt. Durch den Gemeinsamen Bundesausschuss (G-BA) wurde daher die Mindesttestgüte des RhD-NIPT definiert: Die Sensitivität muss demnach mindestens 99% betragen, die Spezifität des Tests muss bei mindestens 98% liegen. Falsch positive Ergebnisse sind klinisch unbedenklich, da sie die in diesem Fall überflüssige Anti-D-Prophylaxe nach sich ziehen. Falsch negative Ergebnisse hingegen treten beim RhD-NIPT mit vergleichbarer Häufigkeit auf wie bei postnatalen RhD-Tests. Die Gefahr einer immunologischen Abwehrreaktion liegt dann bei 1-2%. Zudem ist in die Risikobetrachtung das mit der Prophylaxe verbundene Restrisiko, das mit der Verabreichung von Blutspendeprodukten verbunden ist, einzubeziehen. Darüber hinaus wird die Limbach Gruppe eine Testroutine umsetzen, bei der eine Rate falsch negativer Befunde < 0,2% zu erwarten ist.

Unabhängig vom Ergebnis des RhD-NIPT ist nach wie vor beim Neugeborenen postnatal die serologische Bestimmung des RhD-Blutgruppenmerkmals vorzunehmen.

Befundbewertung

Der Befund wird in Form eines qualitativen Ergebnisses an die beauftragende Praxis übermittelt (Tabelle 1). Eine Befundübermittlung an die Schwangere ist aufgrund der Regelungen durch das GenDG nicht möglich. Neben der Befundbewertung „RhD-positiv“ oder „RhD-negativ“ kann es in seltenen Fällen zu sogenannten *No-Call*-Ergebnissen kommen, d.h., es kann kein valides Ergebnis mitgeteilt werden. Analytisch kann eine unzureichende Konzentration von cffDNA – besonders am Ende des ersten oder zu Beginn des zweiten Trimenons – in einem nicht validen Ergebnis resultieren. Wenn möglich, sollte dann die Wiederholung des RhD-NIPT zu einem späteren Zeitpunkt in der Schwangerschaft erwogen werden; liegt bis SSW 29+6 kein Untersuchungsergebnis vor, ist die Durchführung der ungezielten Anti-D-Prophylaxe indiziert. Eine weitere Ursache für nicht aussagekräftige Ergebnisse sind seltene Genvarianten und Polymorphismen, wie sie bei allen humanen Genen auftreten. Diese können sowohl die Mutter (die Mutter ist genetisch nicht RhD-negativ, z.B. bei serologisch inaktiven Varianten oder nach früherer Knochenmarksspende) als auch den Fetus betreffen.

Tabelle 1: Übersicht über die möglichen Befundergebnisse

Wert	Bedeutung*
Der Fetus ist RhD-positiv	Eine RhD-Prophylaxe ist einzuleiten. (ca. 60 % der Schwangeren)
Der Fetus ist RhD-negativ	Auf eine RhD-Prophylaxe kann verzichtet werden. (ca. 40 % der Schwangeren)
<i>No-Call</i> -Ergebnis	Eine RhD-Prophylaxe ist einzuleiten. (selten, siehe Text)

* Der Anteil der RhD-positiven und -negativen Feten lässt sich ungefähr vorhersagen, da die statistische Verteilung der *RHD*-positiven und -negativen Allele in der europäischen Bevölkerung bekannt ist.

Präanalytik

Aufgrund der niedrigen Konzentration von cffDNA in maternalem Blut benötigen wir 7,5 oder 9 ml EDTA-Vollblut (EDTA-Monovette oder ggf. Vacutainer > 7,5 ml). Obwohl DNA prinzipiell ein vergleichsweise robuster Analyt ist, sollten mechanische und physikalische Belastungen vermieden werden, um zum einen die Freisetzung maternaler DNA aus den mütterlichen Blutzellen in der Probe und damit ihren Anteil zu minimieren und zum anderen den Abbau der cffDNA zu reduzieren. Die Probe sollte daher weder geschüttelt noch zentrifugiert werden, sie darf keinesfalls eingefroren werden. Auf das Röhrchen dürfen keine weiteren Untersuchungen angefordert werden. Bitte achten Sie auch auf die entsprechenden Herstellerangaben bei Handhabung der Röhrchen.

Ein zügiger Versand an das Labor, der bis zur Analyse der Probe 5 Tage nicht überschreiten sollte, ist erforderlich. Die Bearbeitungszeit zur Bestimmung des fetalen RhD-Merkmals beträgt 2-7 Werktage.

Hinweise zu Präanalytik und Abrechnung (Laborleistung)*

Probenmaterial	7,5 ml EDTA-Vollblut ohne weiteren Untersuchungsauftrag auf diese Probe				
Probentransport	maximal 5 Tage bis zur Analyse; keine sonstigen Erfordernisse (siehe Text)				
Methode	RhD-NIPT (qPCR mit fetalem DNA-Isolat aus maternalem Plasma)				
	EBM		GOÄ	1-fach	1,15-fach
Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors-D aus mütterlichem Blut	01869	905 Punkte / € 100,68	3920 / 3922 / 3 x 3924	€ 134,07	€ 154,18

* GOP ab dem 01.07.2021 extrabudgetär gültig (Anm.: Beratungsleistung entsprechend GenDG und Mu-RL über GOP 01788 abrechenbar).

Autor:

Dr. rer. nat. Jürgen Klammt, Limbach Gruppe

Literatur:

1. Chitty LS, Finning K, Wade A et al.: Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ* (Clinical research ed.) 2014; 349, g5243: 1-7.
2. Gemeinsamer Bundesausschuss. Mutterschafts-Richtlinien: Richtlinien über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung. Letzte Änderung: 20.08.2020, BAnz AT 23.11.2020 B3, www.g-ba.de/richtlinien/19/, abgerufen im Januar 2021.
3. Gemeinsamer Bundesausschuss. Mutterschafts-Richtlinien: Nichtinvasive Pränataldiagnostik zur Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors. Veröffentlicht in: BAnz AT 23.11.2020 B3, www.g-ba.de/beschlusse/4439/, abgerufen im Januar 2021.
4. Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG): Nicht invasive Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors zur Vermeidung einer mütterlichen Rhesussensibilisierung; Abschlussbericht Auftrag D16-01, Stand 15.05.2018. www.iqwig.de/projekte/d16-01.html, abgerufen im Dezember 2020.
5. Kassenärztliche Bundesvereinigung: Praxisnachrichten. Bluttest zur Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors: neue Leistungen im EBM. 20.05.2021, www.kbv.de/html/1150_52399.php, abgerufen im Mai 2021.
6. Legler TJ: Anti-D-Prophylaxe bei RhD-negativen Frauen. *Hämotherapie* 2018; 31: 29-37.
7. Runkel B, Bein G, Sieben W et al.: Targeted antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative pregnant women: a systematic review. *BMC pregnancy and childbirth* 2020; 83: 1-10.
8. Seltam A, Legler TJ, Petershofen EK: Rhesus D-Diagnostik in der Schwangerschaft. *Hämotherapie* 2006; 7: 15-25.
9. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A et al.: Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 2012; 120: 227-234.

Stand: Juni/2021

Ihre Ansprechpartner:
Dr. med. Björn A. Hummel
 FA für Transfusionsmedizin/Hämostaseologie
 FA für Laboratoriumsmedizin
 +49 341 6565 - 763
b.hummel@labor-leipzig.de

Dr. rer. nat. Jürgen Klammt
 Leiter Humangenetisches Labor
 +49 341 6565 - 795
j.klammt@labor-leipzig.de