



De LOTUS-studie: follow-up van rodebloedcelantistoffen bij hemolytische ziekte van de foetus

Auteurs E.P. Verduin, A. Brand en H. Schonewille

Trefwoorden hemolytische ziekte van de foetus en pasgeborene, intra-uteriene transfusie, RBC-antistofvorming

Samenvatting

Tijdens zwangerschap kan een vrouw antistoffen vormen tegen paternale bloedgroepen op foetale erythrocyten wat kan leiden tot hemolytische ziekte en foetale anemie. Bij diepe anemie worden deze foetussen behandeld met intra-uteriene transfusies. Deze behandeling is in meer dan 90% van de gevallen levensreddend, maar leidt bij een kwart van de vrouwen tot nieuwe erythrocyten antistofvorming.

Deze vrouwen vormen, gezien hun hoge antistofrespons, een goede onderzoekspopulatie om inzicht te verkrijgen in mechanismen rondom erythrocytenantistofvorming. De LOTUS-studie onderzoekt onder andere de antistofpersistentie-

ratio bij deze vrouwen in relatie tot de bron van antistofvorming, te weten de foetus of de donor gebruikt voor de transfusie. De eerste, voorlopige resultaten laten zien dat de rodelbloedcelantistoffen verantwoordelijk voor de hemolytische ziekte van de foetus en pasgeborene bijna allemaal persistenten. Van de additioneel gevormde antistoffen persisteert ongeveer 70% van de foetaalgeïnduceerde antistoffen, maar van de intra-uteriene bloedtransfusiedonorgeïnduceerde antistoffen persisteert slechts 6%. De achterliggende mechanismen van dit verschil in persistentie worden in de LOTUS-studie onderzocht.

(Tijdschr Bloedtransfusie 2010;3:104-9)

Inleiding

Immunisatie tegen rode bloedcel (RBC) antigenen kan optreden na een incompatibele bloedtransfusie, transplantatie of zwangerschap door een foetomaternale transfusie (FMT). Indien een zwangere vrouw RBC-antistoffen van het IgG-type heeft, kunnen deze de placenta passeren. Als het kind positief is voor het betreffende antigeen, kan dit leiden tot hemolytische ziekte van de foetus en pasgeborene (HZFP).

Incidentie van hemolytische ziekte van de foetus

De incidentie van maternale alloimmunisatie varieert sterk in de literatuur van 0,15-6,2%.^{1,2} In Nederland zijn jaarlijks ongeveer 200.000 vrouwen zwanger, waarbij tijdens routine screening in 0,6% (n=1.200) RBC-antistoffen gevonden worden. Hiervan is ongeveer 50% gericht tegen het RhD-antigeen en 50% tegen andere RBC-antigenen.³ Antistoffen van het IgG-type kunnen de placenta

passeren en hemolyse van de foetale erythrocyten veroorzaken. Als reactie hierop verhoogt de foetus de aanmaak van erythrocyten om de gevolgen van de hemolyse te beperken (compensatoire erythropoëse). Toch is bij 20-25 gevallen per jaar, ondanks deze compensatoire erythropoëse, de anemie die ontstaat ten gevolge van de hemolyse zo ernstig dat er pre-nataal al tot behandeling met intra-uteriene bloedtransfusie (IUT) moet worden overgegaan. Ernstige HZFP waarvoor IUT nodig is, ontstaat bij ongeveer 85% ten gevolge van anti-RhD, bij 11% door anti-K, bij 4% door anti-Rhc en bij minder dan 1% door andere RBC-antigenen.

Bij het overgrote deel van HZFP betreft het kinderen in tweede of latere zwangerschappen, maar foetomaternale transfusie (FMT) tijdens de eerste zwangerschap kan soms leiden tot zodanig ernstige antistofvorming dat de foetus al behandeld moet worden. In deze gevallen is de moeder meestal al voor de zwangerschap geïmmuniseerd door bijvoorbeeld een

gemiste abortus of incompatibele transfusie. Bij de tweede zwangerschap kan een kleine FMT een secundaire immuunreactie op gang brengen, waardoor snel hoge concentraties antistof aantoonbaar kunnen worden. Kinderen in de tweede en daarop volgende zwangerschappen zijn vaak ernstiger aangedaan.⁴

Preventie

In het begin van de 20^{ste} eeuw was HZFP een belangrijke oorzaak van perinatale sterfte. Door invoering van verschillende maatregelen in preventie, diagnostiek en behandeling is de frequentie en het risico op sterfte drastisch gedaald.⁴

De belangrijkste preventieve maatregel is het toedienen van RhD-immunoglobuline (anti-D-Ig) aan RhD-negatieve vrouwen na de geboorte van een RhD-positief kind. Sinds 1969 is deze maatregel in Nederland ingevoerd, waarna het aantal nieuwe RhD-immunisaties gedaald is van 3,5% tot 0,6% per jaar.⁵ Sinds 1998 wordt in de richtlijnen geadviseerd anti-D-Ig ook routinematig toe te dienen aan RhD-negatieve zwangere vrouwen rond de 30^{ste} week van de zwangerschap, hierdoor is de incidentie van RhD-immunisaties verder gedaald tot 0,3%.⁶ Het restant van de RhD-immunisaties komt waarschijnlijk door het niet (juist) toedienen van anti-D-Ig op de juiste tijden of door een sterke immunisatie door FMT voor de eerste vaccinatie.

Naast RhD-vaccinatie, kunnen non-RhD-antistoffen ook worden voorkomen door het vermijden van incompatibele bloedtransfusies bij vrouwen in de (pre-)vruchtbare leeftijd (<45 jaar). In de CBO-consensus van 2004 werd aangeraden om deze vrouwen K-compatibel te transfunderen, in de nieuwe consensus wordt dit waarschijnlijk uitgebreid met Rhc.

Diagnostiek

Sinds 1998 worden alle zwangere vrouwen in Nederland routinematig in de 12^e week van de zwangerschap gescreend op irregulaire RBC-antistoffen om zo diegene waarvan het kind risico heeft op HZFP, vroeg in de zwangerschap op te sporen en beter te kunnen vervolgen. Waren in het verleden risicovolle invasieve methoden nodig voor HZFP-diagnostiek, tegenwoordig kan de meeste diagnostiek non-invasief gedaan worden.

1. Bepaling RBC-antigenen van de vader en foetus
Wanneer een moeder een bepaalde klinisch relevante antistof bezit, worden de RBC-antigenen van de vader bepaald om het risico op HZFP te bepalen. Als de vader het overeenkomstige antigeen heeft, kan foetaleantigeentypering verricht

worden door het isoleren van vrij foetaal DNA uit maternaal plasma.⁷

2. Antistoftiter en ADCC

De activiteit van een antistof kan bepaald worden door de titer. In principe geldt dat een hoge titer een verhoogde kans geeft op HZFP, maar dit geeft geen 100% betrouwbaarheid. In Nederland wordt de RhD-antistoftiter in combinatie met een hoge 'antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity' (ADCC)-test gebruikt als een maat voor de activiteit van de antistof en het risico op ernstige hemolyse bij de foetus. Alleen voor anti-RhD is deze in-vitro lytische activiteit van een antistof in de ADCC-test gecorreleerd aan de ernst van de hemolyse in de foetus.⁸ Kinderen met HZFP ten gevolge van anti-K kunnen een zeer ernstige anemie hebben zonder dat de moeder een hoge anti-K-titer heeft.⁹ De verklaring hiervoor is dat de K-antistof ook bindt aan het K-antigeen dat tot expressie komt op jonge voorstadia van erythrocyten en zo, naast hemolyse, tevens de (compensatoire) erythrocyten aanmaak verstoort.

3. Bepalen mate van anemie

Sinds de jaren 80 heeft de echoscopie zijn intrede gedaan in de diagnostiek van HZFP. Door middel van echo-Doppler kan de stroomsnelheid van het foetale bloed in de arteria cerebri media gemeten worden. De arteria cerebri media is een slagader in de hersenen die duidelijk in beeld te krijgen is met echo-Doppler. De stroomsnelheid is een goede maat voor de ernst van de anemie, een anemische foetus heeft een hyperdynamische bloedcirculatie door de verlaagde viscositeit van het bloed en de toename van de cardiale output.¹⁰

Behandeling

Bij HZFP met ernstige anemie is intra-uteriene transfusie de behandeling om de foetale anemie te corrigeren. De behandeling werd voor het eerst beschreven door Liley in 1963.¹¹ Sinds 1963 wordt deze behandeling in Nederland centraal uitgevoerd in het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC). De eerste IUTs waren intraperitoneaal, sinds 1987 wordt er, indien mogelijk, intravasculair getransfundeerd onder echogeleide.^{12,13} Intravasculaire transfusie vindt plaats via de navelstreng, in de abdominale vena umbilicalis (intrahepatisch), intracardiaal of een gecombineerde techniek. Bij intrahepatische transfusies wordt naast de intravasculaire transfusie vaak ook een intraperitoneaal depot aangelegd. Tijdens een IUT worden er verse (<3 dagen oud), Parvo B19-veilige, CMV-seronegatieve, bestraalde

**Tabel 1. Antistofpersistentie bij 227 vrouwen 2-22 jaar na laatste intra-uteriene bloedtransfusie (IUT).**

Antistofgroep	Historisch bekend	Persisterend	Percentage persisterend
HZFP	227	225	99
additionele antistoffen voor IUT-behandeling tijdens IUT-behandeling*	151	104	69
totaal	83	33	39
	461	362	79

HZFP=hemolytische ziekte van de foetus en pasgeborene. * Zie Tabel 2 voor specificiteiten.

Tabel 2. Persistentie per antistofspecificiteit en antigeenbron van 45 antistoffen gevormd tijdens intra-uteriene bloedtransfusie (IUT)-behandeling.

Bloedgroep-systeem	Foetusgeïnduceerd		IUT-donorgeïnduceerd		Foetus en donor positief voor antigeen	
	historisch bekend	persisterend (%)	historisch bekend	persisterend (%)	historisch bekend	persisterend (%)
RH en K	19	14 (74)	6	1 (17)	3	2 (67)
FY, JK en MS	1	0	10	0	6	0
totaal	20	14 (70)	16	1 (6)	9	2 (22)

RBCs met een hematocriet (Ht) van 0,8-0,85 l/l getransfundeerd. De donor RBCs zijn negatief voor de antigenen waartegen de moeder antistoffen heeft, compatibel met maternale RH- (C, c, D, E, e) en K-antigenen en gekruist met maternaal serum.

Het IUT-volume is afhankelijk van het bloedvolume van het kind en de gewenste post-transfusie Ht (meestal 0,4-0,5 l/l). Na het aanprikken van de foetale circulatie wordt er 1 à 2 ml bloed afgenomen om het Hb, Ht en mean cell volume te bepalen. Tijdens de transfusie wordt het bloed met een snelheid van 5 à 10 ml per minuut toegediend. De foetale hartactie en bloedstroom worden constant door middel van echo-Doppler in de gaten gehouden.

Het aantal IUTs dat tijdens de zwangerschap gegevens wordt, is onder andere afhankelijk van de zwangerschapsduur ten tijde van de eerste IUT en varieert van 1 tot 8 (mediaan 3).

Additionele antistofvorming bij IUT

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat bij een kwart van de vrouwen na IUT nieuwe antistoffen worden gevormd en dat 70% van de vrouwen, ondanks preventieve RH- en K-compatibiliteit tussen IUT-donor en moeder, multiple antistoffen hebben bij de bevalling.^{14,15} Hiervan was ongeveer 50%

niet gericht tegen foetale maar tegen donorantigenen. Foetale cellen worden waarschijnlijk direct weggevangen door maternale antistoffen, zodat de kans op nieuwe antistofvorming gericht tegen foetale RBC-antigenen klein is. Daarnaast vindt er na 1 à 2 IUTs weinig tot geen foetale rodecelproductie plaats, tijdens FMT komen dan dus uitsluitend donorcellen in de maternale circulatie.¹⁴ Uitgebreide matching van de IUT donor RBCs kan bijdragen tot verdere vermindering van het maternale immunisatierisico.

Persisterende antistoffen

Antistofpersistentiestudies hebben aangetoond dat 25-40% van de RBC-antistoffen na verloop van tijd niet meer serologisch aantoonbaar zijn.¹⁶⁻²⁰ Anti-RhD kan echter jarenlang persisteren.²¹⁻²³ In een retrospectief onderzoek werd gesuggereerd dat RhD-antistoffen gevormd na transfusie minder lang persisterden dan RhD-antistoffen die bij de start van de studie al aantoonbaar waren en mogelijk door zwangerschap waren ontstaan ($p < 0,001$).¹⁸ De achterliggende mechanismen verantwoordelijk voor verschillen in persistentie van verschillende antistofspecificiteiten zijn nog onduidelijk. De wijze van immunisatie, de antigene bron en de sterkte van de betreffende antistof worden onder andere als mogelijke verklaringen genoemd.^{17,18,20}

LOTUS-studie

De onderzoeksvragen van de LOTUS-studie (acroniem voor LOnG Term follow up after intra Uterine transfusionS) betreffen het in kaart brengen van factoren die van invloed kunnen zijn op de hoge RBC-antistofincidentie en -persistentie bij vrouwen waarvan de kinderen IUTs hebben ontvangen.

Specifieke immunologische onderzoeksvragen zijn onder andere:

1. Wat is de RBC-antistofpersistentieratio en zijn er verschillen tussen foetus- en IUT-geïnduceerde antistoffen?
2. Wat is de bron (foetus of IUT-donor) van nieuwe antistoffen die tijdens de IUT-behandeling zijn gevormd?
3. Is antistofpersistentie te verklaren door foetaal microchimerisme?

Samenwerking

De LOTUS-studie wordt uitgevoerd in een consortium van Sanquin Bloedbank regio Zuidwest en de LUMC afdelingen Verloskunde, Neonatologie en Immunohematologie & Bloedtransfusie. Naast de immunologische vraagstukken, onderzoekt de LOTUS-studie ook de psychosociale en cognitieve uitkomsten op lange termijn bij de behandelde kinderen.

Studiepopulatie

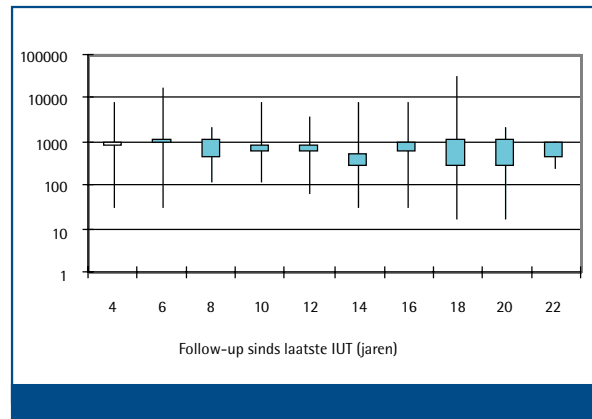
In de periode van 1987 tot 2008 zijn 342 moeders bevallen van 395 kinderen na IUT-behandeling in het LUMC. Deze vrouwen en hun kinderen zijn uitgenodigd om deel te nemen aan het LOTUS-onderzoek.

Studieprocedure

Na informed consent, werden de moeders en kinderen gevraagd vragenlijsten in te vullen en werd bloed of wangslimvlies (bij jonge kinderen) afgenomen. Bij alle moeders vond RBC-antistofonderzoek in de Diamed Liss-techniek plaats om de persistentie van bekende antistoffen te bepalen. Daarnaast werd van de moeders en de kinderen het RBC-antigeenprofiel bepaald en vergeleken met die van de IUT-donoren om de bron van immunisatie te achterhalen. Daarnaast werden ook HLA-antistoffen en -antigenen bepaald en DNA geïsoleerd voor chimerisme onderzoek, maar die resultaten vallen buiten dit artikel.

Eerste resultaten van rodecelantistoffen

Van 227 moeders, mediaan 12,6 jaar (range 2,1-21,6 jaar) na de laatste IUT-zwangerschap zijn



Figuur 1. Correlatie huidige anti-RhD-titer met follow-upduur.

RBC-antistoffen bepaald. Voor de analyse werden de antistoffen in 3 groepen onderverdeeld: 1. antistoffen verantwoordelijk voor de HZFP, 2. additionele antistoffen die reeds aantoonbaar waren voor de eerste IUT en 3. antistoffen die gevormd zijn tijdens de IUT-behandelperiode.

Bij 225 moeders (99%) zijn de antistoffen die verantwoordelijk waren voor de HZFP nog aantoonbaar. Antistoffen die voor de eerste IUT aanwezig waren, maar niet verantwoordelijk voor de HZFP, zijn bij 157 vrouwen (69%) nog aan te tonen. Van de antistoffen die ontstaan waren tijdens de IUT-periode is nog slechts 40% gevonden (zie Tabel 1). Bij 10 vrouwen werden 11 nieuwe antistoffen gevonden die niet aantoonbaar waren bij de laatste IUT. Van de 11 nieuw gevormde antistoffen waren er 5 gericht tegen foetale antigenen en 1 antistof gericht tegen IUT-donorantigenen. Deze laatste antistof, type anti-K, werd gevormd voordat de IUT-eenheden ook gematcht werden voor het K-antigeen. Van 5 antistoffen konden we de antigeenbron niet vaststellen.

Van 45 van de 83 antistoffen die gevormd waren tijdens de IUT-periode is de complete IUT-donor en foetale RBC-typing bekend voor analyse van de antigene bron. Er waren 20 antistoffen gericht tegen foetale antigenen, 16 tegen donorantigenen en bij 9 antistoffen waren zowel de donor als de foetus positief voor het antigeen. In de groep van antistoffen die zijn ontstaan tijdens de IUT-periode persisteert 70% (14/20) van de foetaal geïnduceerde antistoffen en slechts 6% (1/16) van de antistoffen geïnduceerd door de IUT-donor. Van de 9 antistoffen waarvan geen precieze antigene bron vastgesteld kon worden persisteert 22% (2/9) (zie Tabel 2).

De mediane titer van de persistentie anti-RhD bij 205 moeders is 500 (range 4-32.000) en niet gerelateerd aan de follow-upduur sinds de laatste IUT



Aanwijzingen voor de praktijk

1. Antistoffen verantwoordelijk voor ernstige hemolytische ziekte van de foetus en de pasgeborene kunnen bij moeder jarenlang persistenten.
2. Er is een verschil in persistentie tussen antistoffen veroorzaakt voor transfusie en antistoffen veroorzaakt door zwangerschap.
3. Uitgebreide matching van de IUT-donor aan het maternale antigeen-profiel wordt sterk aanbevolen.

en de hoogste IUT-titer tijdens de zwangerschap (zie *Figuur 1* op pagina 107).

Discussie

De eerste resultaten van het LOTUS-onderzoek laten zien dat maternale RBC-antistoffen na IUT-zwangerschap lang kunnen persistenten. Antistoffen die gericht zijn tegen foetale RBC-antigenen blijken langer te persistenten dan antistoffen gericht tegen RBC-antigenen van de IUT-donor. Tijdens iedere zwangerschap vindt er foetomaternale transfusie (FMT) plaats. Tijdens een IUT kan ten gevolge van de procedure extra FMT plaatsvinden, waarbij behalve donorcellen ook foetale cellen de maternale circulatie bereiken en aanleiding kunnen geven tot antistofvorming. Foetale stamcellen aanwezig in de FMT kunnen jaren in de maternale circulatie en/of weefsels persistenten (foetaal chimerisme).²⁴ Omdat IUT-donorbloed naast leukodepletie bestraald wordt voor toediening, is persistentie van donorcellen in de maternale circulatie minder waarschijnlijk. Mogelijk induceren de foetale chimere cellen voortdurende antistofproductie, waardoor de antistoffen na meer dan 20 jaar nog aantoonbaar blijven. Anti-RhD is de meest voorkomende antistof binnen het LOTUS-onderzoek. Aantonen dat de moeder daadwerkelijk chimere is voor het *RhD*-gen, kan voortdurende anti-RhD-vorming getriggered door deze RhD positief chimere cellen mogelijk verklaren en is onderdeel van het LOTUS-onderzoek.

Referenties

1. Gottvall T, Filbey D. Alloimmunization in pregnancy during the years 1992-2005 in the central west region of Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87:843-8.
2. Ameen R, Al-Eyaadi O, Al-Shemmari S, Chowdhury R, Al-Bashir A. Frequency of red blood cell alloantibody in Kuwaiti population. *Med Princ Pract* 2005;14:230-4.
3. Koelewijn JM, Vrijkotte TG, Van der Schoot CE, Bonsel GJ, De Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the foetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion*

2008;48:941-52.

4. Van Kamp IL. *Intrauterine Transfusion for Red Cell Alloimmunization*. Leiden: University Leiden; 2004.
5. Dudok De Wit C, Borst-Eilers E, Van der Weerd CM, Kloosterman GJ. [The prevention of rhesus immunization with anti-rhesus (D) immunoglobulin. Report of a clinical study carried out in Dutch hospitals]. *Ned Tijdschr Geneesk* 1968;112:2345-51.
6. Koelewijn JM, De Haas M, Vrijkotte TG, Van der Schoot CE, Bonsel GJ. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG* 2009;116:1307-14.
7. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LG, De Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006;13:53-7.
8. Oepkes D, Van Kamp I, Simon MJ, Mesman J, Overbeeke MA, Kanhai HH. Clinical value of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assay in the management of Rh D alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1015-20.
9. Moise KJ. Fetal anemia due to non-Rhesus-D red-cell alloimmunization. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:207-14.
10. Oepkes D, Seaward PG, Vandenbussche FP, Windrim R, Kingdom J, Beyene J, et al. Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. *N Engl J Med* 2006;355:156-64.
11. Liley AW. Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. *Br Med J* 1963;2:1107-9.
12. Rodeck CH, Kemp JR, Holman CA, Whitmore DN, Karnicki J, Austin MA. Direct intravascular fetal blood transfusion by fetoscopy in severe Rhesus isoimmunisation. *Lancet* 1981;1:625-7.
13. Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F. A new procedure for fetal blood sampling in utero: preliminary results of fifty-three cases. *Am J Obstet Gynecol* 1983;146:985-7.
14. Schonewille H, Klumper FJ, Van de Watering LM, Kanhai HH, Brand A. High additional maternal red cell alloimmunization after Rhesus- and K-matched intrauterine intravascular transfusions for hemolytic disease of the foetus. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:143-6.
15. Vietor HE, Kanhai HH, Brand A. Induction of additional red cell alloantibodies after intrauterine transfusions. *Transfusion* 1994;34:970-4.

16. Ramsey G, Larson P. Loss of red cell alloantibodies over time. *Transfusion* 1988;28:162-5.
17. Ramsey G, Smietana SJ. Long-term follow-up testing of red cell alloantibodies. *Transfusion* 1994;34:122-4.
18. Schonewille H, Haak HL, Van Zijl AM. RBC antibody persistence. *Transfusion* 2000;40:1127-31.
19. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moohr J, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1990;76:1431-7.
20. Reverberi R. The persistence of red cell alloantibodies. *Blood Transfus* 2008;6:225-34.
21. Owen RD, Wood HR, Foord AG, Sturgeon P, Baldwin LG. Evidence for actively acquired tolerance to Rh antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1954;40:420-4.
22. Hutchison HE, McLennan W. Long persistence of rhesus antibodies. *Vox Sang* 1966;11:517-8.
23. Ward HK, Walsh RJ, Kooptzoff O. Rh antigens and immunological tolerance. *Nature* 1957;179:1352-3.
24. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U*

S A 1996;93:705-8.

Ontvangen 24 augustus 2010, geaccepteerd xx november 2010.

Correspondentieadres

Mw. drs. E.P. Verduin, arts-onderzoeker IO
Mw. prof. dr. A. Brand, afdelingsmanager O&O
Dhr. dr. H. Schonewille, senior-onderzoeker

Plesmanlaan 1a
2333 BZ Leiden
Tel.: 071 568 50 32
E-mailadres: e.verduin@hotmail.com

Correspondentie graag richten aan de eerste auteur.

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.