

R. Buznego Sánchez*, J.E. Viñuela Roldán**, M.L. Couce Pico*, M.J. Saavedra Pereira**, J.R. Fernández Lorenzo*, J.M. Fraga Bermúdez*

An Esp Pediatr 1996;44:176-178.

Introducción

La neutropenia neonatal aloinmune es un cuadro análogo a la anemia hemolítica por incompatibilidad Rh, debido a sensibilización materna por antígenos de los polimorfonucleares neutrófilos del feto durante la gestación, lo que origina la respuesta de IgG específica que atraviesa la placenta y produce la destrucción selectiva de los neutrófilos fetales⁽¹⁾.

La detección de anticuerpos antineutrófilos ha sido particularmente complicada por las características propias del granulocito, agregabilidad, modulación de membrana y escasez de células. El empleo de la citometría de flujo ha simplificado en gran parte estas dificultades, permitiendo el estudio de pacientes con neutropenia^(2,3). Hay pocos casos descritos en la literatura, aunque probablemente no sea tan infrecuente como se piensa⁽⁴⁾, pues la benignidad de la evolución de la mayoría de los pacientes, unido a la dificultad para el trabajo en el laboratorio con estas células hace que muchos casos queden sin diagnosticar⁽⁵⁾.

Presentamos aquí el caso clínico de un neonato con neutropenia aloinmune en el que se identificó un anticuerpo con especificidad anti-NA1 en el suero de la madre.

Material y métodos

Caso clínico

Varón recién nacido, fruto de segundo embarazo de madre sana de 37 años, bien controlado, sin antecedentes de ingesta de fármacos. Amenorrea de 39 semanas. Peso al nacer, 2.430 g, Apgar, 9-10-10.

Al ingreso presentaba aspecto pletórico, datos somatométricos por debajo de P10, siendo el resto de la exploración física normal.

En el hemograma se observó leucopenia con neutropenia (5.200 leuc/mm^3 , 260 neutrof/mm^3) y policitemia (Hgb = 22,5 g%, Hto = 70,7%), por lo que se realizó exanguinotransfusión parcial. Posteriores análisis confirmaron la existencia de neutropenia mientras que las cifras de Hgb y Hcto. se normalizaron.

No presentó datos clínicos de infección en ningún momento, siendo los cultivos realizados negativos. El examen de mé-

Neutropenia neonatal aloinmune por anticuerpos anti-NA1

dula ósea mostró hiperplasia de la serie blanca con predominio de las formas inmaduras, sin interrupción en el gradiente madurativo. La evolución fue favorable normalizándose progresivamente la cifra de neutrófilos a partir de la 3ª semana de vida.

Determinación de anticuerpos antineutrófilos por inmunofluorescencia directa y citometría de flujo

Los neutrófilos se obtuvieron de muestras de sangre completa anticoagulada (EDTA), de la que se eliminaron los hematíes mediante el preparador de muestra Q-prep (Coulter Científica, S.A.). Se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 5 minutos. Posteriormente, tras dos lavados con PBS-albúmina, se ajustaron a $10 \times 10^6/\text{ml}$. Se dispensaron 100 μl de la suspensión celular por tubo y se añadieron 100 μl de antiinmunoglobulinas humanas (G, A, M) fragmento F(ab)'2 conjugado con fluoresceína hecho en cabra, dilución final 1/60. Se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 22°C. Se lavaron tres veces con PBS-albúmina y se analizaron en un citómetro de flujo EPICS-profile II (Coulter Científica, S.A.). Se considera una prueba positiva cuando el canal medio de fluorescencia de una población supera en al menos dos desviaciones estándar el canal medio de la población control.

Determinación de anticuerpos antineutrófilos en el suero por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo

Se incubaron diluciones seriadas del suero durante 30 minutos con granulocitos neutrófilos de los componentes de la familia, así como frente a neutrófilos de fenotipo conocido. Se lavaron con PBS-albúmina como se comentó antes y los siguientes pasos se realizaron de forma similar a la detección de anticuerpos directos. Estas pruebas cruzadas, así como el inmunofenotipaje de los granulocitos de los miembros de la familia fueron realizadas en el Laboratorio de Inmunología Leucoplaquetar del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana (Dra. N. Puig).

Resultados

La evolución de los valores leucocitarios, recogidos en la tabla I, muestra que la recuperación de los neutrófilos se produce a partir de la tercera semana de vida, manteniéndose posteriormente en cifras normales tras el aclaramiento de los anticuerpos maternos. Es de destacar la presencia de una discreta

*Departamento de Pediatría. **Sección de Inmunología. Hospital General de Galicia. Clínico Universitario, SERGAS. Santiago de Compostela.

Correspondencia: M.ª Luz Couce Pico.

C/ Fernando III el Santo, 41, 1º A, 15701 Santiago de Compostela.

Recibido: Mayo 1994

Aceptado: Enero 1995

Tabla I Evolución de los valores de leucocitos en sangre periférica (expresados por mm³)

Día	Leucocitos	Monocitos	Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos
0	5.200	520	260	4.212	104
7	7.650	1.683	275	4.972	76
21	11.460	1.375	1.840	6.761	962
30	14.910	1.461	4.380	7.231	1.058

Tabla III Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en la madre y niño neutropénico por citometría de flujo (*)

	CD2	CD3	CD4	CD8	CD20	CD57	CD16
Madre	87	82	51	28	10	21	9
Hijo	82	80	56	26	14	1	3

(*) Se expresan los porcentajes relativos de cada antígeno de superficie en los linfocitos.

monocitosis que también se describe en alguno de los casos citados en la literatura⁽⁶⁾.

Detección de anticuerpos antigranulocíticos en neutrófilos del neonato así como en el suero materno

Se detectaron anticuerpos en los granulocitos del neonato en la primera muestra recibida, aproximadamente a los 20 días de evolución, en un 20% de los granulocitos, por inmunofluorescencia directa y análisis por citometría (en este análisis la cifra de PMN era 1.840/ μ l). Posteriormente se realizó una nueva determinación en el día 30 de evolución, con resultado negativo (la cifra de PMN en ese momento estaba en 4.348/ μ l) (tabla I). Asimismo se demostraron anticuerpos antigranulocíticos en el suero de la madre en prueba cruzada frente a granulocitos del padre y del hijo, así como a granulocitos de un panel de donantes con fenotipo conocido, mostrando reactividad NA1. El suero materno tituló hasta 1/16 con fenómeno prozona en las primeras diluciones. El tipaje de los granulocitos de los miembros de la familia se recoge en la tabla II, junto a las pruebas cruzadas. No se detectaron anticuerpos frente a antígenos HLA en el suero materno, en ensayos de microlinfocitotoxicidad ni por inmunofluorescencia. Tampoco se evidenciaron anticuerpos anti-NA1 en el suero del neonato, que fue recogido en la tercera semana de vida.

Evaluación de subpoblaciones linfocitarias en la madre y en recién nacido

Se realizó el estudio de subpoblaciones linfocitarias por medio de una batería de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína o ficoeritrina representativos de los diferentes CDs encontrados en linfocitos de sangre periférica. Los resultados en

Tabla II Pruebas cruzadas y fenotipaje de granulocitos

Suero	Fenotipo	Reactividad cruzada con granulocitos de:			
		Madre	Padre	Hijo	NA1+
Madre	NA2/NA2	-	+	+	+
Padre	NA1/NA1	-	-	-	-
Hijo	NA1/NA2	-	-(1)	-	-

(1) No se detectó reactividad frente a granulocitos del padre

porcentaje se muestran en la tabla III. No hay alteraciones dignas de comentario en este aspecto, solamente decir que el anticuerpo monoclonal anti-CD16 (Leu 11c, Becton-Dickinson) no reacciona prácticamente con los neutrófilos, siendo muy específico de linfocitos NK; se detectó tanto en la madre como en el recién nacido, aunque en este último en un bajo porcentaje (2-3%).

Discusión

La neutropenia neonatal aloinmune se caracteriza por presentar intensa neutropenia en el nacimiento y durante las primeras semanas de vida. Clínicamente pueden aparecer infecciones cutáneas y menos frecuentemente respiratorias, urinarias o sepsis. El diagnóstico se realiza por la detección de anticuerpos antigranulocíticos identificados en el suero materno o en los propios granulocitos del paciente. Describimos un caso de NNA por paso transplacentario de anticuerpos maternos contra neutrófilos del hijo que expresaban el antígeno NA1 heredado del padre.

El estudio de antígenos granulocíticos está últimamente cobrando importancia, sobre todo los clasificados dentro de las distintas variantes del antígeno CD16, receptor para IgG de baja afinidad (FcRIII). Se han descrito dos formas con diferente anclaje a la membrana celular: FcRIII-1 ligado al fosfatidil-inositol^(7,8), y que se expresa principalmente por los polimorfonucleares neutrófilos, con dos variantes alélicas que constituyen los antígenos NA1 y NA2⁽⁹⁾; y el antígeno FcRIII-2 como proteína transmembrana y con un diferente patrón de glicosilación⁽⁸⁾ expresado fundamentalmente por células NK y monocito-macrófago, pero no por los polinucleares⁽¹⁰⁾. Existen distintos anticuerpos monoclonales en el mercado que discriminan entre las formas del CD16 asociado a PMN y el CD16 específico de la población NK. Nosotros disponemos del Leu-11c, específico de células NK, que fue testado frente a linfocitos de la madre y el hijo, presentando en ambos casos, como era de esperar, cifras porcentuales en límites de normalidad. En una reciente publicación se describe un caso de ausencia de FcRIII-1 en los granulocitos de una madre (NA1-negativa, NA2-negativa) que desarrolló durante el embarazo anticuerpos frente a las regiones no polimórficas de la molécula CD16, pero que no reaccionaba con

linfocitos NK⁽¹¹⁾.

En nuestro caso, pudo evidenciarse la presencia de anticuerpos antineutrófilo en los granulocitos del niño afecto, así como en el suero de la madre frente a granulocitos del hijo y del padre y de aquellos de fenotipo conocido NA1⁺. Paradójicamente, no pudieron detectarse estos anticuerpos en el suero del niño, probablemente debido a la plasmaféresis realizada en los primeros días de vida que eliminaría la mayor parte de los anticuerpos maternos circulantes.

El pronóstico de la NNA es generalmente bueno aunque se han descrito algunos casos de exitus⁽⁴⁾. Nuestro paciente no presentó, en ningún momento, signos de infección aunque recibió los primeros días cobertura antibiótica por canalización umbilical. Hasta el momento han sido muy pocos los casos de NNA con identificación del anticuerpo implicado comunicados en nuestro país^(5,10). Consideramos de interés la detección y diagnóstico etiológico de la NNA por su distinto significado clínico.

Agradecimientos:

Agradecemos a la Dra. N. Puig de la Sección de Inmunología Leucoplaquetar del C.T. de la Comunidad Valenciana su desinteresada cooperación en la detección de anticuerpos anti-granulocíticos en el suero de la madre e inmunofenotipaje de los PMNs.

Bibliografía

- 1 Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Spaet TH. Neonatal neutropenia due to a maternal immunization. *Blood* 1960;**15**:236-243.
- 2 Verheugt FWA, Von Dem Borne AEGKr, Noord-Bokhorst JCV, Engelfriet CP. Autoimmune granulocytopenia. The detection of granulocyte autoantibodies with the immunofluorescence test. *Br J Haematol* 1978;**39**:339-350.
- 3 Shastri KA, Logue GL. Autoimmune Neutropenia. Review Article. *Blood* 1993;**81**:8, 1984-1995.
- 4 Madyastha PR, Glassman MD. Neutrophil Antigens and antibodies in the diagnosis of immune neutropenia. *Ann Clin Lab Sci* 1989;**19**:146-154.
- 5 Puig N, Montoro JA, Villalba JL, Gimeno M, Ample I, Nudina J, Sagasetta M, Asensio A. Neutropenia neonatal aloimmune: estudio por citometría de flujo del primer caso descrito en España con identificación de un anti-NA1. *Sangre* 1993;**38**:235-238.
- 6 Fernández de Castro Pombo M, García Sánchez P, Vilorio Vicente A, Larrocha Rabanal C, De la Oliva P, Jiménez Herraes MC, Quero Jiménez J. Neutropenia neonatal isoimmune. A propósito de un caso. *An Esp Pediatr* 1988;**29**:320-323.
- 7 Huizinga TWJ, Van der Schoot E, Jost C, Klaassen R, Kleijer M, Von dem Borne AEGKr, Roos D, Tetteroo PAT. The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulations of neutrophils. *Nature* 1988;**333**:667.
- 8 Scallon BJ, Scigliano E, Freedman VH, Miedel MC, Pan YCE, Unkeless JC, Cochen JP. A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide anchored and phosphatidylinositol-glycan anchored forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:5079.
- 9 Huizinga TWJ, Kleijer M, Tetteroo PAT, Roos D, Von dem Borne AEGKr. The bi-allelic neutrophil NA-antigen system is associated with a polymorphism on the phosphoinositol-linked FcRIII (CD16). *Blood* 1990;**75**:213-217.
- 10 Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 1989;**170**:481-497.
- 11 Cartron J, Celton JM, Gane P, Astier A, Fridman WH, Boissinot G, Carton JP. Iso-immune neonatal neutropenia due to anti-Fc receptor III (CD16) antibody. *Eur J Pediatr* 1992;**151**:438-441.