

NEUTROPENIA INMUNE - ALOINMUNE NEONATAL
IgG SERICA REACTIVA Y FENOTIPO ESPECIFICO DE LOS NEUTROFILOS
EVALUADOS POR CITOMETRIA DE FLUJO

NORMA E. RIERA¹, GUSTAVO L. KANTOR², MARINA KHOURY³, RODRIGO PARIAS NUCCI⁴, MARIA CRISTINA RAPETTI⁵, MONICA AIXALA¹, SOFIA GOLDSZTEIN², GABRIELA FLORES², MARIA M. de E. de BRACCO¹

¹Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina; ²Hematología, Hospital Durand; ³Centro de Estudios Epidemiológicos, Academia Nacional de Medicina; ⁴Sanatorio Mitre, Buenos Aires; ⁵Hospital del Niño de San Justo, Provincia de Buenos Aires

Resumen La neutropenia inmune se diagnostica por la presencia de auto o aloanticuerpos reactivos con los neutrófilos. La neutropenia aloinmune neonatal es consecuencia de la sensibilización materna a los antígenos específicos de los neutrófilos paternos que afectan al neonato al atravesar la barrera placentaria. Se presentan 4 casos de niños, 2 de ellos hermanos consanguíneos con doble vínculo. Se estudiaron los sueros de los pacientes y sus padres. Por citometría de flujo se establecen los valores de referencia de la IgG sérica reactiva con los neutrófilos en voluntarios sanos, para 3 diluciones (1/2, 1/5 y 1/20) en reacción autóloga (suero y células de un mismo individuo) y heteróloga (suero y células de diferentes individuos). Los resultados se expresan por un índice definido como el cociente entre la mediana de la intensidad de fluorescencia media del suero incógnita y la de un suero utilizado como referencia. Por leucoaglutinación se evaluó la dilución del suero 1/20. Se determinó el nivel de complejos inmunes circulantes. Se determinó el fenotipo, para los epitopes HNA-1a, HNA-1b y HNA-2a. En los 4 niños se encontró IgG reactiva y/o factores aglutinantes; 2/3 sueros maternos fueron reactivos con los neutrófilos del cónyuge y de los hijos. Los complejos inmunes circulantes fueron positivos en 2/4 sueros negativos en 3/3 sueros maternos. Se encontró incompatibilidad materno-infantil en los 4 casos. Las 3 madres tenían igual fenotipo: homocigotos NA1/NA1, NB1+. En síntesis, se presenta el hallazgo de 4 casos con neutropenia inmune: 3/4 auto-inmune, 1/3 se asocia a complejos inmunes circulantes y 1/4 con neutropenia neonatal aloinmune.

Palabras clave: neutropenia inmune, anticuerpos anti neutrófilos, leucoaglutinación, citometría de flujo

Abstract *Autoimmune-alloimmune neonatal neutropenia. Serum reactive IgG and neutrophil-specific phenotype detected by flow cytometry.* Auto or alloantibodies reactive with neutrophils define immune neutropenia. Alloimmune neonatal neutropenia is caused by maternal sensitization to paternal neutrophil antigens, resulting in IgG antibodies that are transferred to the fetus through the placenta. We present the studies in 4 children from 3 families with neutropenia of unknown origin (two of them were brothers). They were evaluated by flow cytometry in parallel with leucoagglutination. Reference values were established for serum reactive IgG in healthy volunteers for three dilutions (1/2, 1/5 and 1/20), both for the autologous reaction (serum and cells of the same individual) and for the heterologous reaction (serum and cells of different individuals). Results were expressed by an index defined by the quotient of the mean fluorescence intensity of the patient's serum divided by that of the reference serum. Serum reactive/agglutinant factors and circulating immune complexes were evaluated in patients and parents serum. Neutrophil specific phenotypes were determined for HNA-1a, HNA-1b and HNA-2a. Reactive IgG/agglutinant factors were found in 4 children. Two maternal sera were reactive against paternal and/or children neutrophils. Circulating immune complexes were detected in 2/4 children sera and were negative in 3/3 maternal sera. Maternal/children incompatibility was detected in the four cases. The three mothers had the same phenotype: homozygous NA1/NA1, NB1+.

Key words: immune neutropenia, anti-neutrophil antibodies, leucoagglutination, flow cytometry

La neutropenia (Np) se define como el descenso del número de los neutrófilos circulantes. Es leve cuando el

valor absoluto es menor de 1 500 neutrófilos/ul, moderada entre 500 y 1 000 y severa cuando es menor a 500.

La Np puede asociarse con un mecanismo inmune humoral (NpIH), por la presencia de anticuerpos anti neutrófilos^{1,2} así como puede asociarse con un mecanismo celular en virtud que los neutrófilos expresan altos niveles de Fas y éste es un mediador de la apoptosis³. Los complejos inmunes circulantes (CIC) representan otro

Recibido: 28-XII-2005

Aceptado: 7-VI-2006

Dirección postal: Dra Norma E. Riera, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4803-9475 e-mail: nriera@hematologia.anm.edu.ar

mecanismo humoral asociado con la Np porque pueden inducir también apoptosis³. Los anti-neutrófilos y los CIC se asocian con otras enfermedades como se ha indicado en la bibliografía^{3, 4, 5}.

Hace cuarenta y siete años Payne et al⁶ detectaron en el suero de mujeres múltiparas factores séricos capaces de aglutinar leucocitos de sus hijos neutropénicos, al mismo tiempo que se comprobaba su transferencia pasiva a través de la barrera placentaria⁷, lo cual sugeriría un efecto patogénico de los factores. El pasaje de IgG de la madre al feto es significativamente importante a partir del tercer trimestre de gestación⁸. En la Np neonatal aloinmune (NpNA), descrita por Parviz Lalezari y col⁹, los valores absolutos de los neutrófilos pueden ser inferiores a 500 Ne/ μ l. Si bien la NpNA se resuelve espontáneamente a partir de la 8ª semana de nacidos, en algunos casos puede persistir hasta las 28 semanas¹⁰.

Lalezari y col identificaron a los antígenos específicos que dieron lugar a los sistemas NA, NB de los neutrófilos¹¹. El sistema NA, localizado en el Fc γ receptor IIIb (CD16b), está anclado a la membrana por el glicosil fosfatidil inositol (GPI)¹². La deficiencia del gen del CD16b-fenotipo "null"- puede ser la causa de Np neonatal isoimmune¹³.

A partir de 1999 se oficializó una nueva nomenclatura HNA (*Human Neutrophil Antigen*) que incluye además antígenos no específicos de los neutrófilos^{14, 15}.

Se ha descrito la presencia de anti-HLA y anti-Ne en el suero de pacientes con daño pulmonar agudo posttransfusional y en sus donantes^{16, 17, 18}. Popovsky y col^{19, 20} sugieren la transferencia pasiva de esos anticuerpos. En consecuencia, fue necesario realizar controles de calidad de las técnicas utilizadas para evaluar anticuerpos anti-Ne²¹. Por los resultados obtenidos en el primer control se propuso utilizar en paralelo dos técnicas: la leucoaglutinación (LA), primera técnica descrita²² y con la que comenzamos a evaluar factores séricos en pacientes con Np idiopática²³, y la marcación inmunofluorescente por Citometría de Flujo (CF)²⁴. Hasta la fecha no se dispone de un patrón de referencia internacional, por lo tanto cada laboratorio establece sus propios valores de referencia y las modificaciones técnicas necesarias.

El objetivo de este trabajo es presentar los estudios de tres familias con cuatro pacientes infantiles que fueron derivados por Np de etiología no conocida, y a los que se les diagnosticó NpIH por la presencia de factores séricos reactivos con neutrófilos e incompatibilidad fenotípica materno infantil.

Materiales y métodos

Pacientes A-I): Dos hermanos consanguíneos de doble vínculo, H1: Sexo masculino. Se detectó Np grave (<200 neutrófilos /ml) a los 3 meses de vida, sin antecedentes tóxicos o farmacológicos. Durante 6 semanas se realizaron 3

hemogramas por semana, sin observarse ciclos, a excepción de una sola elevación de neutrófilos durante la intercurencia. En la punción aspiratoria de médula ósea no se observaron elementos ajenos a la misma y se descartaron retinoblastoma y neuroblastoma. Al no encontrarse una causa primaria ni secundaria que justificase la persistencia del estado neutropénico se solicitó, a los 5 meses y 11 días de edad, evaluar anti-neutrófilos. A-II): H2: Sexo femenino, hermana de H1. Sin alteraciones hematológicas periféricas, en ninguno de los controles efectuados desde el inicio. A los 39 días de nacida, ante un episodio de Np febril (390 neutrófilos/ml) se solicitó el estudio de anti-neutrófilos. B) H3: Sexo femenino. A los 7 meses de edad con ectima en piel, presentó síndrome febril y Np grave (<200 neutrófilos/ml), sin infección viral, HVS 1-2- se realizó la evaluación de anti-neutrófilos. Con 15 meses de edad, al persistir la Np se trató con G-CSF durante cuatro meses. C) H4: sexo femenino. A los 9 meses de edad presentó impétigo con lesión en cuero cabelludo con cultivo positivo para *Pseudomona*, mientras cursaba el final del período costroso de varicela. No tenía antecedente de neutropenia hasta 12 días antes de su consulta por la lesión. Se realizó punción aspiratoria y biopsia de médula ósea en la que se observó aumento de la serie granulocítica con elementos en todos los estadios madurativos y presencia de algunas mitosis. Si bien el recuento de leucocitos fue normal, la Np fue grave (<500 neutrófilos /ml) y requirió tratamiento con factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) siendo internada en varias oportunidades por cuadros infecciosos. A las 24 hs de recibir G-CSF (3 a 5 μ cg/kg/dosis) los controles realizados revelaban leucocitosis neutrofilica y Np entre los 3 y 5 días posteriores a la suspensión del tratamiento. Debido a la persistencia de la Np con requerimiento de G-CSF, a los 15 meses de edad se realizó el estudio para determinar la presencia o no de anti-Ne.

Para la realización de todos los estudios se obtuvo el consentimiento de los padres de los pacientes.

Muestras: a. Sangre entera (SaE): La sangre fue obtenida por punción venosa y en EDTA al 5%. Se retiró el plasma rico en plaquetas y se reconstituyó el volumen inicial con solución salina tamponada (SST) pH 7.2 (SaEre).

b. Sueros: Se extrajo sangre por punción venosa en tubo seco. Los sueros fueron separados por centrifugación a 400 g.

Complejos inmunes circulantes (CIC). Se utilizó la técnica de precipitación con polietilenglicol (3.5%) descrita por Creighton WD y col²⁵. Los resultados se expresaron en unidades de densidad óptica (UDO₂₉₀).

Leucocitos totales (LT): Fueron aislados a partir de SaEre por sedimentación con Dextrán 6% (*Dextran 500 Amersham Biosciences*) preparado en SST. Los eritrocitos fueron lisados por shock hipotónico. Se realizó un lavado adicionando 2 ml de SST y por centrifugación (300 g) se obtuvo el sedimento de LT. Las células fueron resuspendidas a una concentración de 5×10^6 neutrófilos/ml, en SST con EDTA 10mM pH 7.5 (SST-EDTA).

Inmunofluorescencia por citometría de flujo (IFCF): La IgG sérica reactiva con Ne evaluada por CF se estudió en tres diluciones de suero en reacciones autólogas (suero y LT del mismo individuo) y en reacciones heterólogas (suero y LT de individuos diferentes). Para ello en cada tubo (*Falcon 352008- BD*) se colocó 50, 20 o 5 μ l de suero incógnita o de un mismo suero humano normal de referencia (SHRef) equivalente a las diluciones 1/2, 1/5 y 1/20 respectivamente. Luego se agregó 50 μ l de la suspensión celular autóloga o heteróloga. Con SST-EDTA se completó el volumen final (100 μ l). Se agitó cada tubo de reacción y se in-

cubó durante 30 minutos en baño de hielo. Después de adicionar 2 ml de SST-EDTA, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. A cada sedimento celular se agregó 10 μ l de una dilución 1/5 de la fracción F (ab')₂ de inmunoglobulinas de cabra, anti fragmento Fc de IgG humana, conjugado con PE de *Immunotech* y 5 μ l de una dilución 1/20 del colorante vital 7-aminoactinomicina D (7-AAD A9400 SIGMA). Después de 20 minutos a 4 °C en oscuridad, se lavó cada sedimento celular y se lo resuspendió en 300 μ l de la solución de lectura (FACSFlow, BD). En un equipo FACScan (BD), con LASER de 488 nm, se adquirieron por lo menos 5000 eventos de la intersección entre las regiones R1 de neutrófilos y R2, que se delimitó sin incluir células contaminantes ni células 7AAD positivas (no viables).

Valores de referencia: Para determinar el rango normal de factores séricos reactivos con neutrófilos, por CF, se estudiaron 30 muestras de donadores voluntarios normales y se procedió como se indicó en el párrafo anterior. En 10 donadores se pudo evaluar la reacción autóloga para dos diluciones: 1/2 y 1/20, y en 30 donadores además la dilución 1/5. En 25 donadores se estudió la reacción heteróloga en las tres diluciones.

Leucoaglutinación (LA): Se realizó con algunas modificaciones²³. Los LT fueron resuspendidos en RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y EDTA 10 mM, pH 7.6 (RPMI-SFB-EDTA). Se estudió sólo la dilución 1/20 de cada suero incógnita. A 100 μ l de la dilución 1/10 de cada suero, preparada en RPMI-SFB-EDTA, se adicionó 100 μ l de la suspensión celular correspondiente (autóloga o heteróloga). Como control positivo se utilizó un suero anti neutrófilos, proveniente de conejo (obtenido en nuestro laboratorio). Como control negativo se evaluó el SHRef. Los tubos de reacción se agitaron e incubaron comenzando con 2 horas a 37 °C y seguidos de 18 horas a 4 °C. Antes de evaluar la actividad aglutinante, cada tubo se agitó fuertemente y se extrajo una alícuota para ser observada al microscopio óptico. Tres fue el número mínimo de Ne en contacto requerido para considerar que los neutrófilos están aglutinados. Los datos se expresaron cualitativamente. Así con 4+ el 75 al 100% de los Ne están aglutinados, con 3+ entre el 50 % y menos del 75%; con 2+ entre 25% y menos del 50%; con 1+ cuando se observa menos del 25%.

Ag específicos de los neutrófilos: Se agregaron diluciones pre-establecidas de Anti NA1 (anti-HNA-1a) (CLBMI 390 *Accurate Chemical*), de anti-NA2 (anti-HNA-1b) o de anti-NB1 (anti-HNA-2a) (*BD Pharmingen*) a 100 μ l de SaER. Se incubaron a temperatura ambiente, 30 minutos, se lavaron y a cada tubo de reacción se le adicionó un volumen del suero anti Ig de ratón, preparado en conejo y conjugado con PE (*Dako RO439*). Después de 30 minutos a temperatura ambiente se agregó 2 ml de una dilución 1/10 de la solución lisante (*FACS™ Lysing Solution de BD*). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó y se centrifugó (300g). A cada sedimento celular se le adicionó un volumen de solución de lectura. Se adquirieron 5000 células de la región de neutrófilos (R1) y los datos se guardaron para el análisis posterior.

Células contaminantes en la región de neutrófilos: Se utilizó el anticuerpo monoclonal dirigido hacia el antígeno CD49d conjugado con FITC (*Immunotech*). Esta integrina α 4 que no está presente en neutrófilos²⁶, se asocia en forma no covalente, con la integrina β 1 para formar el complejo VLA4 –very late antigen4–. Como ha sido publicado²⁷ los eosinófilos, además de los monocitos, pueden contaminar la región de neutrófilos. En este trabajo, a partir de la marcación directa con anti-CD49dFITC/anti-Fc IgG PE/7AAD de LT, de un donador voluntario normal, se detecta la contaminación de eosinófilos en la región R1 de neutrófilos.

Resultados

Células contaminantes en la región de neutrófilos

Se muestra, en LT, Fig. 1-A, la región R1 de neutrófilos, que se dibujó en el gráfico de puntos FSC (tamaño) versus SSC (complejidad). Las células contaminantes en R1 se identificaron a partir de la marcación con anti-CD49dFITC/anti-FcIgG PE/7AAD. Los neutrófilos viables, que no expresan el CD49d, se localizan en el origen de las coordenadas del gráfico anti-CD49dFITC vs 7AAD. Los eosinófilos autofluorescen y expresan CD49d²⁶. Se localizan entre 10¹ y 10² como se indica con la flecha en Fig. 1-B.1 y del gráfico de puntos anti-FcPE vs 7AAD en Figura 1-B.2, los neutrófilos (que expresan el CD16b) se ubican entre 10² y 10³. El receptor Fc γ RIII (CD16), según la bibliografía se encuentra en el citoplasma de los eosinófilos. Estos lo expresan sobre la membrana después de ser activados y luego lo liberan rápidamente al medio²⁸. Se observa en la Fig. 1-B que las células no viables captan el colorante 7AAD y se localizan entre 10³ y 10⁴ sobre el eje de las Y.

La IgG sérica reactiva es revelada por la marcación con anti-Fc IgG-PE sobre Ne viables y en ausencia de células contaminantes. Como se ha indicado en *Materiales y Métodos*, se estudiaron 3 diluciones de cada suero (1/2, 1/5, 1/20) en las reacciones celulares autólogas y heterólogas.

A partir de R1, área de neutrófilos, presentes en LT (Fig. 1-C y D) se dibuja una nueva región de neutrófilos, R2 de células viables que incluye (C.1 y D.1) o excluye (C.2 y D.2) los eosinófilos. Con las herramientas del programa *CellQuest* se define la ventana lógica R1 AND R2 y se grafican los correspondientes histogramas. En D.1 se presenta como una curva bimodal por la presencia de eosinófilos (M2) y la presencia de neutrófilos, con mayor IFM para anti-FcIgG, (M1). En D2, como se han excluido los eosinófilos, se obtiene una curva unimodal que representa sólo a los neutrófilos.

La Fig. 1-C2, y D2 de la Fig. 1, muestran cómo se procede para la adquisición de datos. El mismo esquema se aplica para el posterior análisis de los datos. Se utiliza el valor de la mediana de la IFM, del histograma de la intersección entre R1 y R2 en cada caso que se estudia. Se determina un índice (I) definido como el cociente entre la mediana de la IFM del suero incógnita sobre la del SHRef.

Valores de referencia

Se determinó en 30 donadores voluntarios normales la IgG sérica reactiva con Ne propios y con Ne no propios. Se procedió para la adquisición y el análisis según se

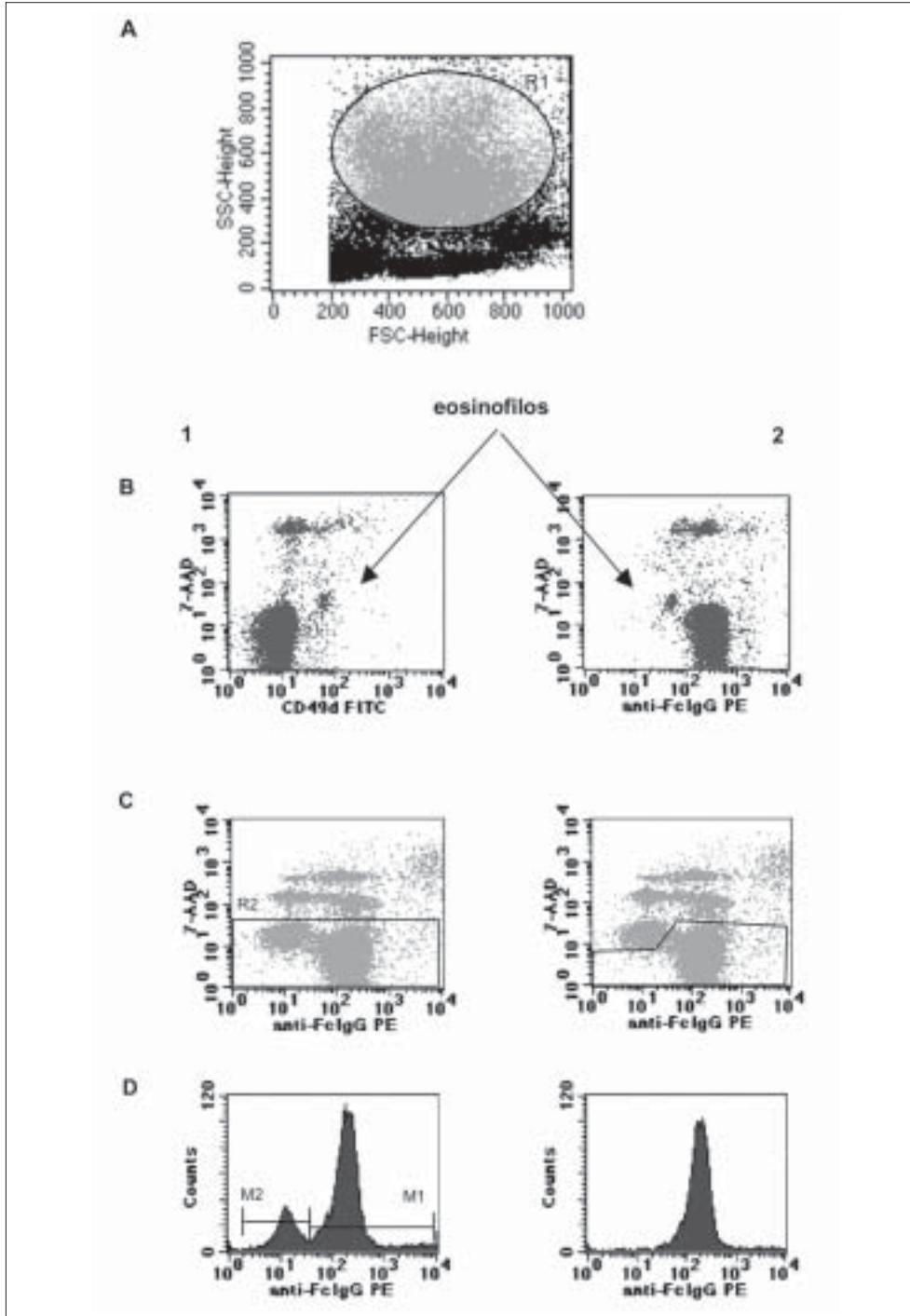


Fig. 1.- A. Muestra pediátrica: Sobre el gráfico FSC (tamaño celular) versus SSC (complejidad celular) de los leucocitos totales de la muestra se delimita la región (R) que contiene los neutrófilos (R1). B. Eosinófilos contaminantes en R1: Los leucocitos totales de dador voluntario normal: se marcaron con CD49dFITC/anti-FcIgG PE/ 7AAD. Sobre el eje X en B1, se muestra la presencia de eosinófilos (flecha) que expresan CD49d, entre 10¹ y 10². Los neutrófilos se localizan en el origen de las coordenadas. Sobre el eje Y, entre 10³ y 10⁴ se detectan las células no viables, positivas para 7AAD. En B2, la marcación con anti- FcIgG PE, permite ubicar a los neutrófilos que expresan el CD16b. Se muestra en el gráfico entre 10² y 10³. Los eosinófilos (flecha) entre 10¹ y 10² como células contaminantes de la R1. C. Eosinófilos en R1 de la muestra pediátrica: Se muestra el gráfico de puntos de R1, sobre el eje X, anti-FcIgG PE, versus 7AAD, sobre el eje de las Y. Luego se dibuja R2 como se observa en C1 se incluyeron los eosinófilos y se excluyeron en C2. D. Intersección de R1y R2: Se define la intersección empleando las herramientas del programa CellQuest como R1 AND R2 y se determinan las coordenadas anti-FcIgG PE sobre el eje X y el número de eventos sobre el eje Y. En D1 se observa un histograma para anti-FcIgG PE bimodal en M1 se identifica a los neutrófilos y en M2 la contaminación de eosinófilos. D2 se observa la curva unimodal que representa los neutrófilos en ausencia de los eosinófilos. Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-neutrófilos se procede como se ha indicado en C2 y en D2.

detalló previamente (Fig. 1-C2 y D2). Para cada una de las combinaciones se obtuvo el valor de la mediana de la IFM, del histograma intersección entre R1 y R2. Se calculó el valor del I medio y su desvío estándar (DE) para cada reacción y para cada dilución de suero. Los valores de referencia se presentan en la Tabla 1. Los sueros incógnitas cuyo I superaba el valor de referencia fueron considerados positivos.

Factores séricos reactivos con neutrófilos

Se encontró en los 4 sueros pediátricos actividad sérica por una o por ambas técnicas (ICFC y LA) y en 2/4 se detectó la presencia de CIC.

IgG sérica reactiva con neutrófilos evaluada por ICFC: Sólo 3/4 sueros fueron positivos: H1, H2 (hermanos, consanguíneos doble vínculo) y H3. En la Fig. 2 se muestran los histogramas de superposición entre el SHRef (línea gruesa) y el suero en estudio (línea débil). No fue posible estudiar la reacción autóloga en H1 pero se detectó positiva la reacción heteróloga en dos diluciones de suero 1/2 y 1/5 (I= 3.72 e I= 3.59 respectivamente) como se muestra en Fig. 2- A1 y B1. Para H2, en la reacción autóloga, el I fue igual a 1.83 y a 2.55 para las diluciones del suero 1/2 y 1/5 respectivamente (Fig. 2

A2 y B2). En H3 la reacción fue también positiva. No se detectó reactividad sérica materna al momento del estudio del paciente H1 pero fue reactiva con los neutrófilos del segundo hijo, H2, I=1.91 en la dilución 1/2 y también con los Ne de su cónyuge, en la dilución 1/5 I= 2.96 (Figura 2 A3 y B3). Se encontró reactividad entre el suero materno de H3 y los neutrófilos de su cónyuge. No se detectó reactividad en el suero materno de H4 con los neutrófilos de su cónyuge.

Factores aglutinantes con neutrófilos estudiados por LA

En el suero de H1 se detectó actividad aglutinante con sus propios neutrófilos indicada como 3+ (aglutinación entre <75% y el 50%). Fue muy débil para H2, + (aglutinación < 25%). En H3 no se evaluó la reacción autóloga, pero se detectó capacidad aglutinante con los neutrófilos maternos 3+. En H4 se encontró capacidad aglutinante con sus propios neutrófilos, 2+. En la Fig. 3 se muestra un ejemplo de cómo se observan las células aglutinadas junto a una célula libre.

Determinación del nivel de CIC

Los niveles de CIC fueron superiores al valor esperado en H1 y H3 (0.39 y 0.29 UDO₂₈₀ respectivamente, Valor de referencia $\bar{X} \pm 2DS = 0.18 \pm 0.05 = 0.23$, n= 165. No se detectó la presencia de CIC en ninguno de los sueros maternos.

Fenotipo específico de los neutrófilos

En la Tabla 2 se ha indicado la nueva nomenclatura oficial para designar los diferentes sistemas antigénicos del neutrófilo: HNA-1, HNA-2, HNA-3, HNA-4 y HNA-5. En este trabajo aún se emplean también los acrónimos (NA1, NA2, NB1).

La expresión fenotípica se determinó por marcación indirecta, en los 4 niños y sus padres. Como se ha indicado en *Materiales y Métodos*, se evaluaron sólo dos de los tres epitopes, el HNA-1a y HNA-1b del Sistema HNA-1 y el NB1 (HNA-2a) del Sistema HNA- 2.

A partir de LT, para cada muestra se dibujó la región de neutrófilos R1 sobre el gráfico de puntos FSC vs SSC y se graficó el histograma de R1. Se encontró que las 3 madres expresaban sobre CD16b (receptor específico del neutrófilos), sólo el epitope HNA-1a -homocigoto y fueron positivas para NB1. Como ejemplo se muestra en la Fig. 4-A el fenotipo de la madre de H1 y H2. En la Fig. 4-B se muestra el fenotipo de los Ne de H1, H2 y del padre. Los neutrófilos de la paciente H3 y los neutrófilos de su padre expresan sólo el HNA-1b (homocigoto). H4 expresa ambos epitopes en tanto que su padre es homocigoto para HNA-1b y todos NB1 positivos.

TABLA 1.- IgG sérica reactiva en dadores voluntarios normales

Diluciones del suero	Valores de referencia	
	Reacción autóloga I= $\bar{X} + 2DE$	Reacción heteróloga I= $\bar{X} + DE$
1/2	0.83+0.69= 1.52 (n=10)	0.68+0.72 = 1.40 (n=25)
1/5	0.95+0.30=1.25 (n=30)	0.95+0.64 = 1.59 (n=25)
1/20	1.02+0.47=1.49 (n=10)	0.92+0.92=1.84 (n=25)

A partir de leucocitos totales de dadores voluntarios normales, se evaluó la reactividad sérica en tres diluciones 1/2, 1/5 y 1/20, con neutrófilos propios (reacción autóloga) y con neutrófilos no propios (reacción heteróloga). Para la adquisición y análisis de los datos se procedió como se indicó en *Materiales y Métodos* y como se detalló en *Figura 1-C2 y D2*. Se definió el Índice como el cociente entre la mediana de intensidad de fluorescencia media (IFM) para el suero incógnita y la mediana de la IFM para el suero de referencia (SHRef). Para cada combinación se determinó la media (\bar{X}) de los índices y el desvío estandar (DE) correspondiente. Con la letra "n" se indica el número de muestras de dadores normales evaluados.

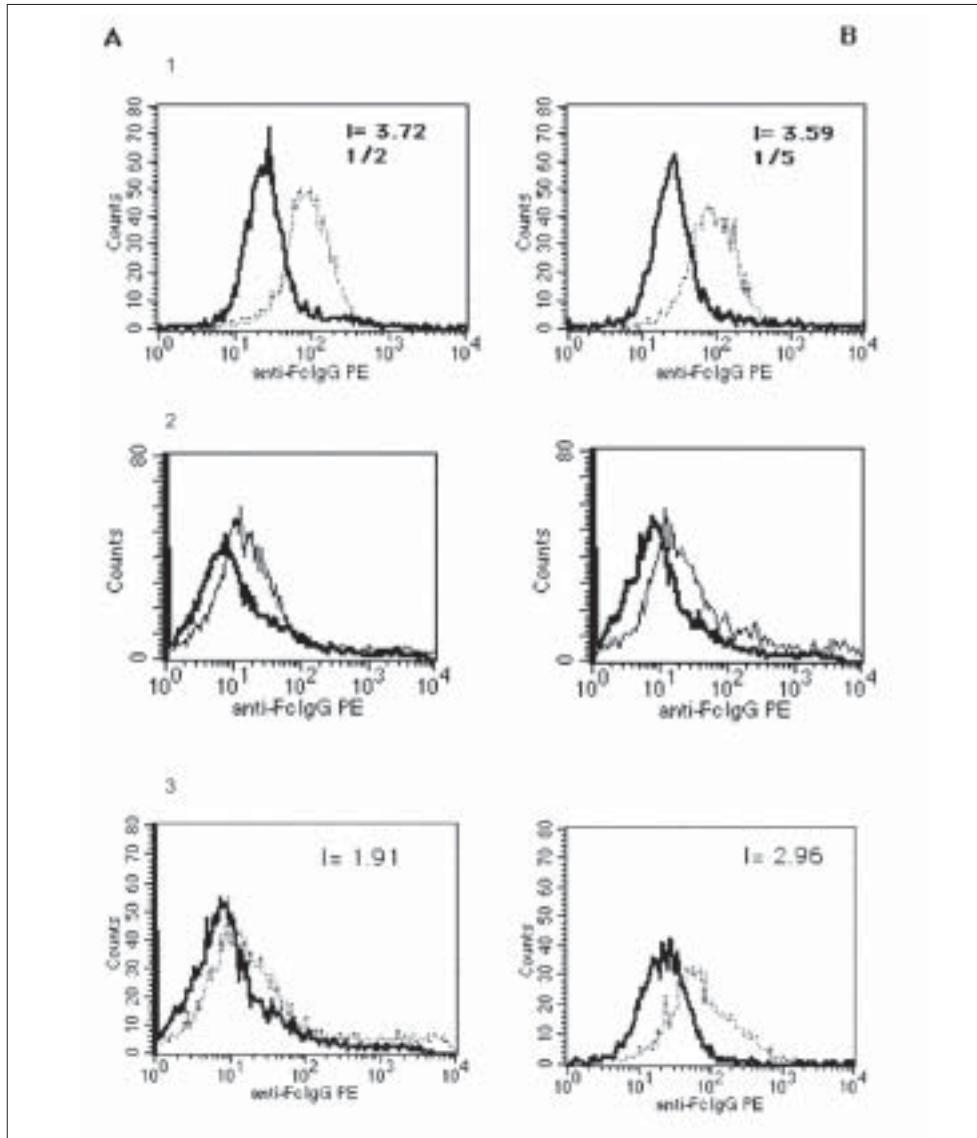


Fig. 2.- Se observan los corrimientos entre el histograma control, con el suero humano normal de referencia -SHRef- (línea gruesa), versus el histograma incógnita con el suero en estudio (línea fina). A. Se dibujaron los histogramas de las reacciones del suero en la dilución 1/2 con neutrófilos propios o no, en la dilución 1/2 del SHRef, superpuesto con los histogramas del suero incógnita. En B se ubicaron los histogramas de las reacciones con dilución de suero 1/5. A1 y B1. Reacción heteróloga del suero del paciente H1 con los neutrófilos paterno. A2 y B2: Reactividad del suero de la paciente H2 con sus propios neutrófilos. A3. - La reactividad del suero materno con los neutrófilos de H2 y en B3 con los neutrófilos de su cónyuge.

Discusión

Las Np pueden clasificarse por alteraciones en las células mieloides o en los progenitores o bien por causas externas²⁹. En este último grupo se encuentran aquellas Np mediadas por anticuerpos, tema que nos ocupa en este artículo.

La Np NA se debe a la producción de anticuerpos maternos contra antígenos de los neutrófilos del feto, en general dirigidos a epitopes que se encuentran en el receptor FcγIII, estos anticuerpos son IgG que cruzan la

barrera placentaria y destruyen los neutrófilos del neonato mientras que la Np neonatal isoimmune se debe a la ausencia del receptor FcγIII (null)¹³. La sensibilización materna se produce en cualquier momento durante la gestación y puede presentarse en el primer embarazo³⁰.

La Np NA generalmente se presenta al nacer, pero puede ser reconocida entre el primer y tercer día. La mayoría de los niños recién nacidos con Np NA son asintomáticos, con Np autolimitadas; algunos presentan onfalitis, desprendimiento tardío del cordón, infecciones dermatológicas moderadas o neumonía en las

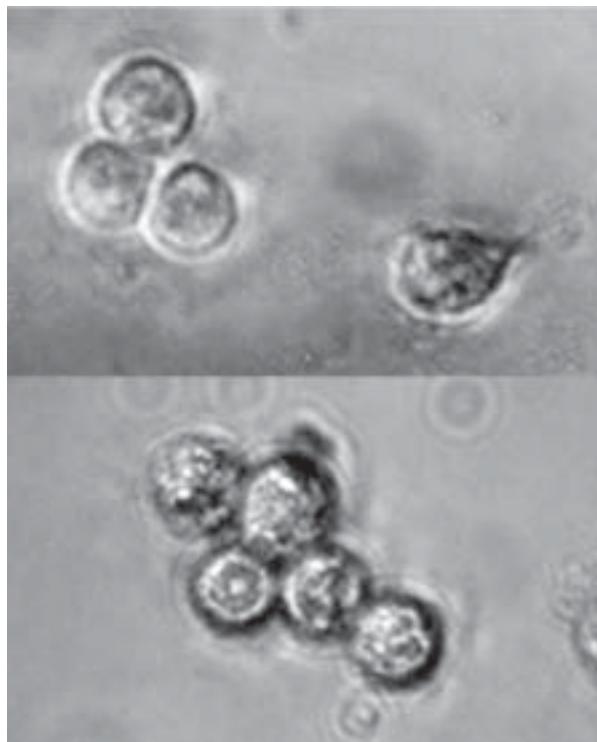


Fig. 3.- Los factores aglutinantes se evaluaron sobre leucocitos totales, resuspendidos en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino y en presencia de EDTA 10mM, ph 7.6 en una concentración de 5×10^6 neutrófilos/ml como se ha indicado en *Materiales y Métodos* la reactividad de cada suero con la combinación de células, autólogas y heterólogas, se evaluó en una dilución 1/20 final de suero. Después de las incubaciones (2 horas a 37 °C y 19 horas a 4 °C) una alícuota se observó al microscopio óptico, después de haber agitado fuertemente las células para limitar la lectura a los aglutinados que resisten la disociación. Aquí se muestran 3 y 5 neutrófilos aglutinados y uno libre (60X).

primeras semanas de vida³¹. El neonato presenta fiebre cuando la Np es severa y las infecciones generalmente son causadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus beta Hemolítico* y/o *Escherichia coli*³⁰.

Desde hace varios años²³ se realizan estudios en pacientes con Np de etiología desconocida a fin de determinar la naturaleza inmune de la misma por la presencia o ausencia de factores séricos (IgG) reactivos y/o aglutinantes.

Por citometría de flujo, la imposibilidad de hallar los anti-neutrófilos puede deberse a un reducido nivel de anticuerpos circulantes al momento de la evaluación, a la baja afinidad anticuerpo-antígeno o bien a razones técnicas. Inicialmente empleábamos sólo una dilución final 1/5 del suero, luego evaluamos dos más (1/2, 1/20). Delimitamos el análisis a la región de neutrófilos

TABLA 2.- Nuevo sistema antigénico del neutrófilo y sus acrónimos

Sistema antigénico	Antígeno	Acrónimo	Localización
HNA-1	HNA-1a	NA1	Receptor IIIb Fcγ
	HNA-1b	NA2	Receptor IIIb Fcγ
	HNA-1c	SH	Receptor IIIb Fcγ
HNA-2	HNA-2a	NB1	Glicoproteína 50-64
HNA-3	HNA-3a	5b	Glicoproteína 70-95
HNA-4	HNA-4a	MART	CD11b
HNA-5	HNA-5	OND	CD11a

Se muestra la nueva nomenclatura para los antígenos de los neutrófilos: HNA (Human Neutrophil Antigen). Antígenos específicos: HNA-1, localizados en el receptor FcγIIIb. HNA-2 y HNA-3 glicoproteínas de la membrana celular. Antígenos no específicos de los neutrófilos: HNA-4 y HNA-5 receptores de membrana CD11b y CD11a.

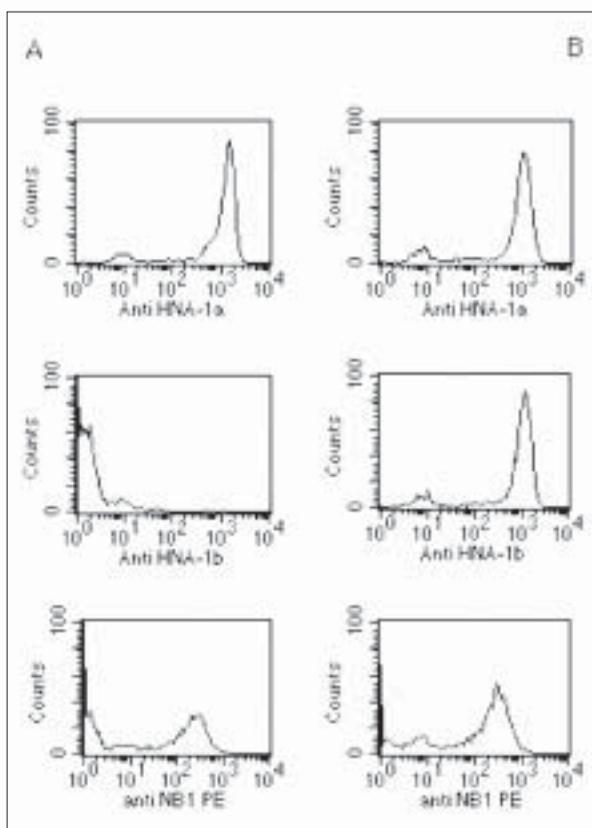


Fig. 4.- Fenotipo específico de los neutrófilos: En esta imagen se muestra el resultado de determinación del fenotipo en el grupo familiar de H1 y H2. A. Fenotipo materno: a partir de la región R1 de neutrófilos en el primer histograma, la intensidad de fluorescencia media aproximadamente de 10^3 , revela la presencia del epítipo HNA-1a. El segundo histograma revela la ausencia del HNA-1b. El tercer histograma muestra la presencia de HNA-2a (NB1). B. Fenotipo de los hijos y del cónyuge: En el primer y segundo histograma de la derecha se confirma la expresión de ambos epítipes, anti- HNA-1a y anti HNA-1b, sobre el receptor específico de los neutrófilos, CD16b. En el tercer histograma se muestra la presencia de HNA-2a (NB1).

libre de células no viables y/o de eosinófilos por la incorporación a la reacción del colorante vital 7AAD, que no ha sido introducido por otros autores. El objetivo de agregar al estudio las distintas diluciones del suero fue para evitar los fenómenos de prozona, y el agregado de EDTA, para que la acción de la vía alterna del complemento no interfiera con la reacción, ya que podría disociar de la membrana celular los complejos anticuerpos-antígeno. Para considerar un resultado positivo de IgG reactiva con los neutrófilos, por lo menos en una de las tres diluciones el índice de la mediana debe ser superior al valor de referencia.

Además de calcular el valor del índice de la mediana, se puede evaluar el índice de la media. También se puede realizar el análisis de los datos considerando el 10% de la población de neutrófilos con mayor IFM de anti-FcIgG-PE y confrontarlo con el histograma del suero incógnita tal como lo indicaron Robinson JP y col³². Mencionamos estas alternativas de análisis porque pueden ser utilizadas para lograr, en una primera evaluación, detectar la presencia o no de los anticuerpos anti-neutrófilos.

Si bien la técnica citométrica, según la bibliografía, es más sensible respecto a la leucoaglutinación, ésta permite detectar anticuerpos que no siempre se logran por IFCF, tal como se ha indicado para el antígeno HNA-3a –acrónimo: 5b–¹⁸. Por tal razón una combinación de IFCF y LA sigue siendo lo más indicado para la detección de anti-neutrófilos²⁰. En consecuencia, un suero será positivo para anti-IgG anti-neutrófilos si por lo menos una de ambas técnicas es positiva. Este resultado no nos indica hacia qué antígeno(s) del neutrófilo están dirigidos.

Uno de los factores humorales en la Np inmune es la presencia de anti-neutrófilos. Un segundo factor es el hallazgo de CIC. Cuando estos últimos están presentes ambas reacciones, la IFCF y la LA, son francamente positivas porque los CIC se unen al RFcγIIIb independientemente del fenotipo de los neutrófilos. Se observa en consecuencia en esos sueros con CIC que el valor de la media y de la mediana de la IFM es muy superior al valor de la media y de la mediana de la IFM del suero humano normal de referencia.

Considerando los resultados presentados aquí, en su conjunto, el índice obtenido por IFCF fue superior al valor de referencia en 3/4 casos y LA en 4/4, pero en H2 la LA fue débil (1+). En 2 pacientes se encontró un nivel de CIC superior al normal.

En particular, en el paciente H1, la Np se presentó a las 12 semanas de nacido, en la proximidad al estado fisiológico, según se lo llama, de la inmunodeficiencia que ocurre aproximadamente en esas 12 semanas posteriores al nacimiento. La reacción autóloga por IFCF, en H1 no se pudo estudiar, pero por LA fue positiva cuando se evaluó con sus neutrófilos. Su suero además fue positivo con los neutrófilos del padre por IFCF y por LA (reacción heteróloga). El suero de H1 fue reactivo,

por IFCF, con neutrófilos de 3 dadores, independientemente del fenotipo de los neutrófilos (datos que no se incluyeron). La presencia de CIC (0.39UDO₂₈₀), detectados en el suero de H1 por precipitación con PEG 6%²⁵ explicaría la reactividad observada porque se unen inespecíficamente al CD16. Esto permite diagnosticar en H1 una Np inmune humoral.

La NpIH en H2, hermana de H1, se asocia con Np neonatal aloinmune, porque fue estudiada a los 39 días de nacida, con incompatibilidad materno-infantil y con reactividad sérica materna positiva, al momento del estudio, con los neutrófilos del cónyuge, a diferencia de lo observado en H1, primogénito del matrimonio. En el suero de la madre, después del segundo embarazo y en el suero del neonato (H2) se detectan anticuerpos anti-neutrófilos que reaccionan con los neutrófilos de H2 y con los del padre, porque ambos expresan un epítipo HNA-1b (Fig. 4 B) que no está presente en los neutrófilos de la madre.

Los resultados de la paciente H3 sugieren que la NpIH se puede asociar con auto-inmune. Fue evaluada a las 44 semanas y 8 días de nacida, se encontró reactividad con sus propios neutrófilos por citometría de flujo. Se observó, por LA, que su suero fue reactivo selectivamente porque sólo aglutinó los neutrófilos de la madre, homocigoto NA1, lo cual indicaría la presencia de anti-NA1; en paralelo, el suero de H3 no aglutinó a los neutrófilos de su padre, homocigoto NA2. En este paciente H3 la Np sería auto-inmune. Considerando que el nivel de CIC detectado fue levemente superior al valor normal (0.28 vs 0.25 UDO₂₈₀) y que el suero no fue reactivo por IFCF con otros neutrófilos, de diferente fenotipo, comportamiento que difiere del observado con el suero de H1, en el que se detectó un nivel de CIC superior.

La NpIH en H4 se puede asociar con Np auto inmune. Fue evaluada a los 15 meses de edad, luego de 6 meses de evolución de su neutropenia y de haber recibido tratamiento durante ese período con G-CSF. Sólo se detectó aglutinación autóloga positiva y CIC negativos. Se ha dicho que la Np autoinmune es la más difícil de evaluar³, porque en general sólo se emplea la reacción heteróloga, es decir suero del paciente y neutrófilos de un dador voluntario. En este trabajo se realizó también la reacción autóloga y ello permitió determinar la presencia de IgG reactiva con sus propios neutrófilos viables, aun cuando no sea fácil determinar hacia qué antígeno está dirigida. El suero materno de H4 fue reactivo con los neutrófilos del cónyuge, que se corresponde porque son de diferente fenotipo. El estudio en cada grupo familiar de los pacientes (H1, H2 y H3) reveló también incompatibilidad materno-infantil. Según consta en la bibliografía, la media de la duración de la Np en estos casos es de alrededor de 8 semanas con un máximo de 6 meses^{33, 34}.

En ninguno de los sueros maternos estudiados en este trabajo se detectó la presencia de CIC. Por lo que se deduce que la reactividad en los sueros maternos de

H2 y H4 se puede asociar con anticuerpos anti-IgG libres. Minchinton y col demuestran que el tratamiento con cloroquina remueve los HLA de Clase I de la membrana de los neutrófilos, sin dañar los antígenos específicos del neutrófilo³⁵. De este modo puede determinar la presencia de anti-neutrófilos específicos aun cuando haya anti-HLA. Hemos probado la técnica, pero no fue aplicada en el estudio de los pacientes que se presentan aquí. Pero se analizó, en forma similar a la indicada para los neutrófilos, la reactividad del suero en la región de linfocitos y en la de monocitos, pero no se detectó en ninguno de ellos la presencia de IgG reactiva con estas poblaciones celulares.

En forma rutinaria no es posible utilizar un panel de neutrófilos con fenotipo conocido, si bien en casos programados se trata de hacerlo. En algunos pacientes, que no se muestran, se pudo evaluar, por LA, la presencia del antígeno 5b; disponemos de un suero patrón por gentileza de Lalezari, pero no disponemos del monoclonal para evaluar el HNA-1c (acrónimo SH). En los pacientes pediátricos estudiados se determinó el fenotipo del grupo familiar.

Zupanska y col³⁶ evaluaron el riesgo de la formación de anticuerpos anti HNA1a y HNA1b durante el embarazo y su relación con la NpNA. Encontraron que en 195 madres con incompatibilidad materno-fetal sólo 9/195 sueros positivos; 6 dirigidos hacia el HNA-1 (4 anti HNA-1a y 2 anti HNA1b) y 3 hacia otros epitopes. En ninguno de los recién nacidos detectaron descenso de neutrófilos ni signos de infección.

Los pacientes que se han presentado en este trabajo, no tienen actualmente ninguna manifestación clínica.

El tratamiento en estos pacientes se realiza con antibióticos para la infección aguda. La profilaxis con cotrimoxazol puede ser una intervención de elección en pacientes con Np crónica³⁷. En los pacientes con Np mediada por anticuerpos la IVIG puede ser utilizada para corregir el número de neutrófilos; por ejemplo, como tratamiento adyuvante en infecciones con riesgo de vida³³ o ante la presencia de infecciones muy recurrentes²⁹.

Las Np autoinmunes, no asociadas a otras enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (LES), se observan frecuentemente en niños y adultos sin etiología conocida asociada con el *Parvovirus B19*³². Las Np autoinmunes secundarias son raras en pediatría y pueden estar asociadas con síndromes autoinmunes linfoproliferativos³. La Np autoinmune en la infancia es la causa más frecuente de Np crónica. La edad media al diagnóstico es de 8 a 11 meses. Pueden presentar infecciones leves (respiratorias, otitis, piel) y ocasionalmente neumonía o sepsis. En el hemograma se detecta Np moderada a grave generalmente con monocitosis o eosinofilia relativas, sin alteración de la serie eritroide ni plaquetaria. La médula ósea presenta celularidad normal o aumentada con disminución de los neutrófilos

maduros y cayados, a veces con arresto madurativo en estadios más tempranos²⁹. Los anticuerpos generalmente son dirigidos contra el sistema HNA, sin embargo su ausencia no excluye el diagnóstico²⁹. Dentro de las enfermedades asociadas con Np autoinmune se debe diferenciar: 1. las enfermedades autoinmunes (Síndrome de Evans, LES, Síndrome de Felty, de Sjögren, esclerodermia y cirrosis biliar primaria). 2. Las Np secundarias a infección (mononucleosis, VIH, otros virus). 3. Asociadas a enfermedades malignas (leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin). 4. Asociada a hipogammaglobulinemias. 5. Enfermedad de Castleman. 6. Asociada a drogas. Estas enfermedades deben diferenciarse además de los defectos intrínsecos de la mielopoiesis (Np congénita grave, Np cíclica, síndrome de Shwachman)²⁹.

Una retrospectiva sobre el total de niños evaluados hasta la fecha, (de 39 días a 22 meses de edad, n=13), permitió diagnosticar neutropenia inmune humoral sólo en estos 4 niños que representan 3 familias y que se presentan en este trabajo. Es de interés considerar que el dato de la incompatibilidad materno-infantil en H1, puso en alerta al pediatra al momento de atender a la paciente H2, segunda hija del mismo matrimonio, lo cual determinó el hallazgo de este caso de NpNA, ya que por la naturaleza de la muestra estudiada en nuestro laboratorio no es posible analizar la incidencia de la NpNA que, según la bibliografía, es inferior a 1/1000^{3,36}. Excepcionalmente, como en este caso, se pueden estudiar los pacientes que presentan neutropenia en las primeras semanas de vida.

En concordancia con lo comunicado por Lalezari, pensamos que hay varias razones por las cuales las NpAN no son inferiores a 1/1 000 nacimientos. Primero, los recuentos hematológicos en neonatos no son hechos rutinariamente; cuando se realizan consideran sólo los recuentos leucocitarios. Si falta el recuento diferencial de leucocitos, un recuento normal puede estar eclipsando un caso de neutropenia con linfocitosis y monocitosis. En consecuencia, los pediatras que no se encuentran familiarizados con esta enfermedad pueden no darse cuenta de la ausencia de neutrófilos cuando el recuento leucocitario es normal. Por ello se sugiere considerar la posibilidad de realizar el estudio en forma temprana al tener la sospecha diagnóstica, ya que el nivel de anticuerpos disminuye en el tiempo y dificulta la interpretación de los resultados.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Dr. Parviz Lalezari por su comentario. Al Dr. Federico Garrido (Granada, España) por el anticuerpo monoclonal GRM1 (anti NA2). A las Dras. Silvina Raiden y Nora Galassi por la lectura crítica del trabajo, a la Bqca. Verónica Galán y a la Sra. Marta Felippo por el apoyo técnico. A la Fundación Alberto J. Roemmers por la contribución económica, y al Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R. Castex-Academia Nacional de Medicina por apoyar el proyecto.

Bibliografía

1. Boxer LA, Greenberg MS, Boxer GJ, Sotssel TP. Autoimmune Neutropenia. *N Engl J Med* 1975; 293: 748-53.
2. Shastri KA, Logue GL. Autoimmune Neutropenia. *Blood* 1993; 81: 1984-95.
3. Berliner N, Horwitz M, Loughran (TP). Congenital and Acquired Neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 63-79.
4. Starkebaum G, Arend WP. Neutrophils-binding immunoglobulins G in systemic Lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1979; 64: 902-12.
5. Riera NE, Galassi N, de la Barrera S, Richard E, Muchnik G, Pérez Bianco R, de Bracco MM. Anti leukocyte antibodies as a consequence of HIV infection in HIV+ individuals. *Immunol Lett* 1992; 33: 99-104.
6. Payne R, and Rolfs M. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest* 1958; 37: 1756-63.
7. Stefanini M, Mele R.H, Skimer D. Transitory congenital neutropenia: A new syndrome, report of two cases. *Am J Med* 1958; 25: 749-58.
8. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003; 21: 3365-9.
9. Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Spaet TH. Neonatal neutropenia due to maternal Isoimmunization. *Blood* 1960; 15: 236-43.
10. Bux J, Jung KD, Kauth T, Mueller-Eckhardt C. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transfus Med* 1992; 2: 143-9.
11. Lalezari P, Murphy GB, Allen FH Jr. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest* 1971; 50: 1108-15.
12. Huizinga TWJ, Kleijer M, Tetteroo PAT, Roos D, von der Borne AEGK. Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phosphoinositol-linked Fcγ receptor III (CD16). *Blood* 1990; 75: 213-7.
13. Huizinga TWJ, Kuijpers RWAM, Kleijer M, et al. Maternal genomic neutrophil FcRIII deficiency Leading to Neonatal isoimmune neutropenia. *Blood* 1990; 76: 1927-32.
14. Bux J. Nomenclature of granulocyte alloantigens. *Transfusion* 1999; 39: 662-3.
15. Lalezari P. Nomenclature for neutrophil-specific antigens. *Transfusion* 2002; 42: 1696-7.
16. Eastlund T, McGrath PC, Britten A, Propp R. Fatal pulmonary transfusion reaction to plasma containing donor HLA antibody. *Vox Sang* 1989; 57: 63-6.
17. Van Buren NL, Stroncek DF, Clay ME, McCullough J, Dalmaso AP. Transfusion-related acute lung injury caused by an NB2 granulocyte-specific antibody in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion* 1990; 30: 42-5.
18. Davoren A, Curtis BR, Shulman LA, et al. TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. *Transfusion* 2003; 43: 641-5.
19. Popovsky MA and Moore SB. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 1985; 25: 573-7.
20. Popovsky MA, Chaplin HC, Moore SB. Transfusion-related acute lung injury: a neglected, serious complication of hemotherapy. *Transfusion*. 1992; 32: 589-92.
21. Bux J, Chapman J. Report on the Second International Granulocyte Serology Workshop. *Transfusion* 1997; 37: 977-83.
22. Lalezari P, Pryce S. Detection of neutrophil and platelet antibodies in immunologically Induced Neutropenia and Thrombocytopenia. Manual of Clinical Immunology-Second Edition Edited by Noel E. Rose-Herman Friedman. 1980; 744-9.
23. Fejes M, Riera N, Palermo M, Mondini NG, Rudoy S, de Bracco MM. Properties of polymorphonuclear leukocytes and serum factors in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Sangre (Barc)* 1983; 28: 563-9.
24. Verheugt FWA, von dem Borne AEGK, Décarý F, Engelfriet CP. The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br J Haematol* 1977; 36: 533-43.
25. Creighton WD, Lambert PH, Miescher PH. Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J Immunol* 1973; 111: 1219-27.
26. Walsh GM, Mermod J, Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ. Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1 stimulated human umbilical vascular endothelial cells in α4β1 (very late antigen-4) dependent. *J Immunol* 1991; 146: 3419-23.
27. Riera N, Canalejo K, Aixalá M, Gaddi E, de E.de Bracco MM, Galassi N. Detection of CD16^{low} Neutrophil subpopulations. *Clinical Cytometry* 2003; 51B: 45-6.
28. Zhu X, Hamann KJ, Muñoz NM, et al. Intracellular Expression of FcγRIII (CD16) and its Mobilization by chemoattractants in human eosinophils. *J Immunol* 1998; 161: 2574-9.
29. Dinauer M. The phagocyte system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. In Nathan & Oski's (eds). Hematology of Infancy and Childhood. 5th ed. W.B. Saunders Company. 1998, p 889-949.
30. Schibler, K. Leukocyte development and disorders during the neonatal period. in Christensen RD (eds). Hematologic Problems of the Neonate. Ed W.B. Saunders Company. 2000, p 311-42.
31. Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. Resistance to recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in neonatal alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen 2a (NB1) antibodies. *Pediatrics* 2002; 109: 64.
32. Robinson JP, Duque RE, Boxer LA, Ward PA, Hudson JL. Measurement of antineutrophil by flow cytometry simultaneous detection of antibodies against monocytes and lymphocytes. *Diagnostic and Clin Immunol* 1987; 5: 163-70.
33. Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol* 2001; 54: 7-19.
34. Papadaki HA, Eliopoulos GD. An overview on the diagnosis, classification and differential diagnosis in chronic neutropenias. *Haema* 2002; 5: 39-49.
35. Minchinton RM and Waters AH. Chloroquine stripping of HLA antigens from neutrophils without removal of neutrophil specific antigens. *British J Haematol* 1984; 57: 703-6.
36. Zupanska B, Uhrzynowska M, Guz K, et al. The risk of antibody formation against HNA1a and HNA1b granulocyte antigens during pregnancy and its relation to neonatal neutropenia. *Transfus Med* 2001; 11: 377-82.
37. Bruin MCA, Kr von dem Borne AEG, Rienk YJ, Tamminga MK, Buddelmeijer L, de Hass M. Neutrophil antibody specificity in different types of childhood autoimmune neutrop. *Blood* 1999; 94: 1797-802.
38. Bux J, Behrens G, Jaeger G, Weite K. Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenias in infancy: Analysis of 240 Cases. *Blood* 1998; 91: 181-6.