



# Neutropenia aloimune neonatal em gêmeas idênticas

## *Neonatal alloimmune neutropenia in identical twins*

Mariana Jobim<sup>1</sup>, Elyse Moritz<sup>2</sup>, Ana Cristina Arend<sup>1</sup>, Iara Santos Fagundes<sup>1</sup>,  
Beatriz Chamun Gil<sup>1</sup>, Joice Merzoni Lunardi<sup>1</sup>, Renato Procianoy<sup>3</sup>, Luiz Jobim<sup>1,4</sup>

### RESUMO

A neutropenia aloimune neonatal (NAN) é uma patologia causada pelo antagonismo imunológico, como a doença hemolítica do recém-nascido ou a trombocitopenia aloimune neonatal, mas relacionada aos neutrófilos, em vez de glóbulos vermelhos ou plaquetas. Descreveremos um caso clínico de duas gêmeas idênticas nascidas a termo, com Apgar de 8 e 9, sendo que após algumas horas do nascimento apresentaram febre. Um exame de sangue revelou neutropenia grave que resultou em sepse. O diagnóstico da NAN foi realizado clinicamente e por testes de histocompatibilidade. A prova cruzada por citometria de fluxo foi positiva, usando soro da mãe e suspensões celulares (granulócitos e linfócitos) das gêmeas e do pai. Este teste não fornece informações sobre para qual sistema genético os anticorpos foram positivos, se contra os antígenos específicos de neutrófilos humanos (HNA) ou contra os antígenos leucocitários humanos (HLA). Para o esclarecimento, realizamos o teste de aglutinação de granulócitos (GAT) com um painel de doadores fidelizados e com antígenos HNA1-5 conhecidos, utilizando o soro materno como reagente. Foi também realizada a pesquisa de anticorpos anti-HLA e anti-HNA no soro materno. Os genótipos HLA e HNA foram identificados, permitindo conhecer as especificidades dos anticorpos maternos contra os antígenos dos neutrófilos do marido e das filhas. O diagnóstico de NAN não é realizado na maioria dos hospitais de nosso país e do exterior, devido à dificuldade de execução dos testes de histocompatibilidade, no entanto a prova cruzada por citometria de fluxo pode facilmente ser implantada nos laboratórios clínicos, sendo que está descrita detalhadamente nesse caso clínico.

**Descritores:** Antígenos de neutrófilos humanos, antígenos HLA, infecção do neonato.

### ABSTRACT

Neonatal alloimmune neutropenia (NAN) is a disease caused by immunological antagonism, such as hemolytic disease of the newborn or neonatal alloimmune thrombocytopenia, but related to neutrophils rather than to red blood cells or platelets. We will describe a clinical case of two identical twins born with Apgar 8 and 9 that started with fever few hours after delivery. A blood test revealed severe neutropenia, which was followed by sepsis. The diagnosis of NAN was done clinically and by histocompatibility testing. Flow cytometry crossmatch was positive, using mother serum and cell suspensions (granulocytes and lymphocytes) from the twin girls and from the father. This test did not provide information about the genetic system for which the antibodies are positive, if against human neutrophil antigens (HNA) or human leucocyte antigens (HLA). To clear this, the granulocyte agglutination test (GAT) was performed with a panel of control donors with known HNA1-5 antigens, using the maternal serum as a reagent. We did also a Luminex screening assay for detection of anti-HLA and anti-HNA antibodies in the mother serum. The HLA and HNA genotypes were identified, which allowed to define specificities in mother's antibodies against the neutrophil surface antigens from her husband and from the twins. The diagnosis of NAN diagnose is not done in most hospitals worldwide, mainly by the difficulty in executing the histocompatibility test. However, the crossmatch by flow cytometry could be easily done in clinical laboratories following the method described in this article.

**Keywords:** HLA antigens, neonatal sepsis, neutropenia.

1. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Alergia e Imunologia - Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Disciplina de Hematologia e Hemoterapia - São Paulo, SP, Brasil.
3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Pediatria - Porto Alegre, RS, Brasil.
4. UFRGS, Departamento de Medicina Interna - Porto Alegre, RS, Brasil.

Submetido em: 25/03/2020, aceito em: 13/05/2020.

Arq Asma Alerg Imunol. 2020;4(2):219-24.

## Introdução

Lalezari e cols. descreveram em 1960 um caso clínico onde a presença de anticorpos maternos foi responsável por severa neutropenia e quadro clínico infeccioso em 3 de 4 irmãos recém-nascidos. Denominou essa doença de Neutropenia Isoimune Neonatal (NIN). Nesse relato, a primeira criança faleceu de pneumonia, a segunda não foi afetada, a terceira apresentou infecção severa do escalo e sepse no oitavo dia pós-parto. Essa foi tratada com antibióticos e a contagem de neutrófilos normalizou após 70 dias. A última criança teve onfalite no oitavo dia pós-parto. Nos casos acima, a contagem de neutrófilos não responderam aos corticosteroides, normalizando após 71 dias, sendo interessante que a monocitose compensou a neutropenia. O fato do pai ser heterozigoto para o antígeno responsável pelo estímulo à produção de anticorpos explica geneticamente o segundo filho não afetado<sup>1</sup>. A seguir, diversos artigos confirmaram a presença desses anticorpos anti-neutrófilos, relacionando-os definitivamente com infecções que acometem os recém-nascidos<sup>2,3</sup>.

A neutropenia aloimune neonatal (NAN) acontece em 0,1% a 0,8% dos nascimentos, sendo caracterizada por neutropenia com cerca de 500 células por microlitro de sangue<sup>4</sup>. Essa condição é resolvida espontaneamente em 8 semanas após o nascimento, podendo persistir por 28 semanas. O limite inferior do número de neutrófilos no sangue de recém-nascidos saudáveis de duas semanas até um ano de idade é de 1.000/ $\mu$ L.

O sistema genético próprio da superfície dos neutrófilos é conhecido como HNA (*human neutrophil antigens*). O sistema HNA apresenta os seguintes epítomos: HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c, HNA-1d; HNA-2, HNA-3a, HNA-3b; HNA-4a, HNA-4b; HNA-5a; HNA-5b<sup>5,6</sup>. O sistema HLA (*human leucocyte antigens*) também está presente nessas células, assim como nos linfócitos, plaquetas e outras células nucleadas. O HLA está dividido em genes de classe I (locos A, B e C) e genes de classe II (locos DR, DQ e DP), sendo que a expressão nos neutrófilos acontece especialmente com os antígenos HLA de classe I<sup>7</sup>.

O antígeno HNA que mais ocasiona casos de NAN é o HNA-1a, seguido de outros<sup>8-11</sup>. Casos de anticorpos anti-HLA de classe I foram também responsabilizados pela trombocitopenia e neutropenia neonatal<sup>12,13</sup>, embora sejam pouco relacionados com essa última patologia.

Os anticorpos anti-HNA e anti-HLA podem resultar da sensibilização materna contra antígenos HNA e HLA paternos presentes nos fetos e ausentes na mãe. Esses anticorpos IgG ultrapassam a barreira placentária, destruindo as células maduras e inibindo a granulocitopoiese. Casos de NAN podem ocorrer já na primeira gestação.

A frequência da aloimunização materna contra antígenos HNA é 4,3%, e de 42,3% contra HLA. No entanto, se houver concomitantemente aloimunização contra antígenos de grupos sanguíneos, a frequência de anti-HNA chega a 7,5% e anti-HLA a 50,3%. O antígeno HNA-1a aparentemente é mais imunogênico, embora não seja o mais frequente<sup>14</sup>.

## Descrição do caso

No presente caso, gêmeas idênticas nasceram por cesárea, com 35 semanas, peso gemelar 1 (G1) 2.125 g e gemelar 2 (G2) 1.605 g, escore de Apgar 8 e 9 nos primeiro e quinto minutos de vida, respectivamente. Posteriormente apresentaram discreta hipertermia e um hemograma evidenciou neutropenia (G1 = 113  $\text{mm}^3$  e G2 = 93  $\text{mm}^3$ ). Foram repetidos os exames com piora da neutropenia (G1 = 80  $\text{mm}^3$  e G2 = 54  $\text{mm}^3$ ), tendo sido iniciada Filgrastim (Granulokine<sup>®</sup>) com melhora da neutropenia (G1 = 1.190  $\text{mm}^3$  e G2 = 1.543  $\text{mm}^3$ ). Essa foi a segunda gestação dessa mãe. A neutropenia é considerada grave em recém-nascidos quando houver redução do número de neutrófilos abaixo de 500 neutrófilos/ $\text{mm}^3$  de sangue<sup>15</sup>.

Três dias após, a G1 evoluiu com sintomatologia gastrointestinal, distensão abdominal e vômitos, associadas à leucopenia e neutropenia (910 neutrófilos/ $\text{mm}^3$ ). Não foi observada linfopenia ou trombocitopenia. Considerando a neutropenia e as manifestações intestinais, antibioticoterapia foi iniciada, associada a nova dose de Filgrastim. Dois dias após a evolução de sepse da G1, a G2 evoluiu com os mesmos sintomas e alterações laboratoriais (392 neutrófilos/ $\text{mm}^3$ ), sendo realizada a mesma conduta terapêutica. As duas evoluíram bem, houve aumento de peso e normalização dos neutrófilos. As opções terapêuticas, além dos antibióticos são os corticosteroides, imunoglobulina endovenosa e especialmente o fator estimulador de colônias de granulócitos (Granulokine<sup>®</sup>).

## Discussão

A investigação do caso incluiu testes sorológicos e moleculares voltados à detecção de antígenos e anticorpos anti-HNA e HLA.

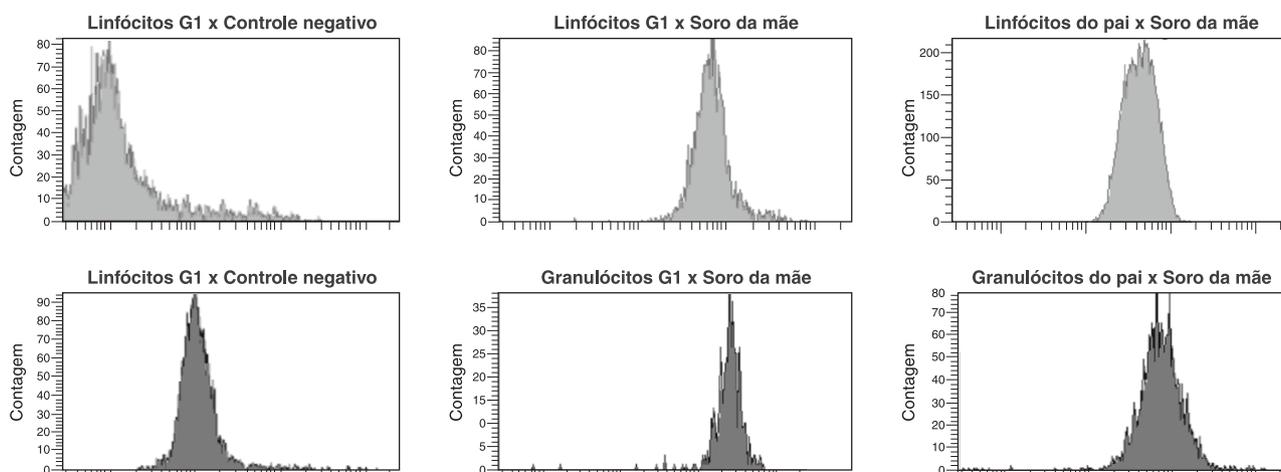
### Prova cruzada por citometria de fluxo

O diagnóstico é fundamental para uma boa avaliação e terapêutica adequada. A prova cruzada por citometria de fluxo, também conhecida por teste de imunofluorescência de granulócitos (GIFT) permite a detecção de anticorpos anti-neutrófilos, anti-linfocitários e anti-plaquetas num mesmo procedimento. O soro materno é incubado com o sangue do recém-nascido e/ou de seu pai, com o objetivo de detectar ou não a reação com os antígenos HNA ou HLA existentes na superfície das células. Anticorpos fluorescentes anti-IgG humana de origem caprina são adicionados posteriormente, permitindo que o laser do citômetro de fluxo identifique as células positivas (fluorescentes), ou seja, que apresentam IgG materna sensibilizando os granulócitos, plaquetas ou linfócitos. Como a forma e a granularidade dessas células são diferentes, é possível distinguir as mesmas pelo citômetro de fluxo, assim como identifica a intensidade média de fluorescência por canal de fluorescência (MCF) em cada tipo celular<sup>16</sup>.

Resumidamente, os granulócitos e linfócitos foram isolados do plasma por gradiente de densidade com Ficoll. Após a lise dos eritrócitos com o tampão (BD Pharm Lyse-Becton/Dickinson, São José, CA, USA), a suspensão celular foi lavada duas vezes com PBS

buffer e as células ajustadas para  $5-10 \times 10^3/\text{mm}^3$ . A suspensão de 25  $\mu\text{L}$  de leucócitos foi incubada com 50  $\mu\text{L}$  do soro materno por 15 minutos na temperatura ambiente. Após 4 lavagens com PBS contendo soro fetal bovino a 2%, as células foram incubadas com o reagente fluorescente (FITC), anti-human IgG (fragment F(ab')<sub>2</sub> (Jackson Immuno Research, USA) na diluição recomendada. Após 10 minutos na temperatura ambiente, as células foram resuspensas em PBS com soro fetal bovino no volume final de 200  $\mu\text{L}$ . As análises foram realizadas no instrumento FACS Canto II (Becton-Dickson, San Jose, CA, USA), utilizando-se o software FACS DIVA v. 6.1.3. Granulócitos e linfócitos foram analisados separadamente, considerando suas características de tamanho e complexidade. A fluorescência mediana por canal (MCF) anti-IgG FITC do soro teste materno foi subtraída do valor da fluorescência do soro controle negativo, obtendo-se o desvio médio de canal (MCS). Em nosso laboratório o *cutoff* do MCS é  $\geq 63$  canais.

Os resultados da prova cruzada foram positivos para as filhas G1 e G2, tanto nos granulócitos (MCS = 361 e 372), quanto nos linfócitos (MCS = 491 e 496). Em relação às células do marido, também se observou prova cruzada positiva para granulócitos (MCS = 327) e linfócitos (MCS = 378) (Figura 1).



**Figura 1**

Prova cruzada por citometria de fluxo entre o soro da mãe e as células de uma das gêmeas (G1) e do pai. As imagens superiores mostram os linfócitos e as inferiores os granulócitos. Os histogramas que demonstram a ausência de anticorpos no controle negativo estão à esquerda. O deslocamento da curva para a direita (maior fluorescência) nas outras imagens mostra que o soro da mãe tem anticorpos contra os linfócitos e granulócitos da filha e do pai, respectivamente. O resultado está expresso em MCS (*median channel shift*)

### Teste de aglutinação de granulócitos (GAT)

Realizamos também o teste de aglutinação de granulócitos (GAT), utilizando-se o soro materno e os granulócitos de doadores fidelizados e com seus antígenos HNA1-5 conhecidos. O GAT foi realizado de acordo com protocolo descrito anteriormente com mínimas modificações<sup>17</sup>. Resumidamente, os neutrófilos foram isolados com dextran, sendo que 2 µL da suspensão de  $5 \times 10^3$  neutrófilos/µL foram incubados em placas de Terasaki com 6 µL de soro da mãe, além de soro controle negativo e positivo, durante 2 horas a 37 °C. O teste foi realizado em duplicata com 3 doadores de neutrófilos, previamente genotipados para o sistema HNA. Os resultados foram considerados positivos na presença de aglutinação avaliada por microscopia invertida. O soro materno foi positivo com os três doadores que compunham o painel de granulócitos e com uma positividade de 3 e 4+ (Tabela 1).

### Anticorpos anti-HLA e anti-HPA

A pesquisa de anticorpos, utilizando microesferas sensibilizadas com antígenos HLA e HNA recombinantes, foi realizada por intermédio do instrumento Luminex® 100, utilizando reagentes LABScreen Multi e LabScreen Single Antigen (One Lambda Inc), conforme orientação do fabricante. Os testes permitem identificar qualitativa e quantitativamente a reatividade do soro materno contra os antígenos HNA e HLA. A análise dos resultados foi realizada pelo *software* Fusion 4.2 TM (One Lambda, Inc.).

Os resultados são oferecidos em MFI ou intensidade média de fluorescência. Foram observados 76% de anticorpos contra o painel de antígenos de classe I, e 99% contra o painel de classe II.

Os seguintes anticorpos anti-HLA de classe I foram detectados no soro materno (intensidade de fluorescência maior de 2.000): A1, A24, A25, A32, A80, B13, **B15(63)**, B27, B35, B46, B50, B49, B53, B56, B57, B58, B62, B71, B76, **Cw5**, Cw8. O soro materno também apresentou anticorpos fortemente reativos contra o antígeno HNA-1a.

### Genotipagem HLA de classe I

Foi utilizado o método de *Sequence-specific Oligonucleotide* (SSO) com o *kit* LabType, (One Lambda, Inc.) para tipagem HLA da mãe, do pai e dos recém-nascidos. Analisamos os resultados pelo *software* Fusion 4.2 TM (One Lambda, Inc.).

Mãe: HLA-A2, A68; HLA-B7, B51; HLA-Cw7.

Pai: HLA-A23, A29; HLA-B8, **B15 (63)**; HLA-Cw5, Cw7.

Filhas: HLA-A23, A68; HLA-B15 (**B63**); B51; **HLA-Cw5**.

Os alelos **HLA-B15(63)** e **CW5** foram herdados pelas filhas, gêmeas idênticas, do seu pai biológico. Como eles não existem na mãe, foram responsáveis pelo estímulo à produção dos anticorpos existentes, talvez desde a primeira gestação.

**Tabela 1**

Painel de doadores utilizado para o teste de aglutinação de granulócitos (GAT) e resultado da intensidade da reação do soro materno com os granulócitos do painel

Doador	ABO/Rh	HNA-1			HNA-2	HNA-3		HNA-4		HNA-5		Resultados
		-1a	-1b	-1c	(%)	-3a	-3b	-4a	-4b	-5a	-5b	
JM	O+	+	-	-	62	+	-	+	+	+	+	3/4+
TCS	O+	+	+	-	74	-	+	+	+	+	+	4/4+
SSM	O+	+	+	+	50	-	+	+	-	+	-	3/4+

O soro materno foi positivo contra o antígeno HNA-1a nos três doadores com positividade de 3 a 4+, confirmando o resultado anterior.

## Genotipagem HNA

A genotipagem HNA foi realizada pelo método de PCR-SSP (*sequence specific primers*) para os sistemas HNA-1 e 4<sup>18</sup>, e pelo método PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para os sistemas HNA-3 e 5<sup>19</sup>. A eletroforese dos produtos de PCR for realizada em gel de agarose corado com GelRedTM (*GelRed Nucleic Acid Stain*, Biotium) com a adição de marcador de peso molecular (DNA Ladder, Invitrogen E-Gel). A leitura foi realizada como sistema de documentação de gel DocTMEZ Images, (Bio-Rad).

A expressão do HNA-2 for determinada por citometria de fluxo, usando o anticorpo monoclonal MEM166, conjugado a ficoeritrina (PE). O anticorpo IgG1 de camundongo foi usado com controle isotípico (Abcam, Cambridge, UK). Os dados foram analisados no programa CellQuest® (Becton Dickinson). Indivíduos foram considerados negativos se menos de 5% de seus neutrófilos reagiram com os anticorpos monoclonais<sup>20</sup>.

Os resultados da genotipagem mostram que há incompatibilidade materno-fetal para o sistema HNA-A1, sendo que a mãe apresenta apenas o antígeno HNA-1b, e o pai e filhas o antígeno HNA-1a, além do HNA1b, o que justifica a imunização materna.

Mãe: HNA-1b e HNA-4a;

Pai: HNA-1a, HNA-1b e HNA-4a;

Filhas: HNA-1a, HNA-1b.

No presente caso, identificamos anticorpos maternos contra antígenos HNA e HLA de origem paterna, presentes nas filhas. Acredita-se que a sensibilização anti-HNA seja mais importante do que a HLA nos casos de NAN, tendo em vista que os antígenos HLA expressam-se em todas as células nucleadas do organismo, enquanto os HNA são restritos aos neutrófilos. Sendo assim, os anticorpos anti-HNA por serem mais específicos contra essas células, possivelmente tenham poder de destruição maior. A imunização HLA das múltiplas é comum (42,3%) e menor com HNA (4,3%), sendo um contraste os casos de NAN acontecerem em menos de 1% dos nascimentos.

Como não se realiza hemograma em recém-nascidos normais, entendemos que a patologia possa ser subdiagnosticada pela falta de sintomas no período neonatal. Os recém-nascidos com essa neutropenia silenciosa recuperam-se, mas alguns voltam posteriormente ao hospital, infectados nos primeiros meses de vida.

A citometria de fluxo realizada com o soro da mãe e os neutrófilos dos filhos é o teste mais rápido e preciso no diagnóstico precoce e tardio de NAN, entretanto não é disponível na maioria dos grandes centros no Brasil. No estado do Rio Grande do Sul, o caso relatado foi o primeiro avaliado com a metodologia adequada, sendo que se pode dizer que o diagnóstico de NAN não era realizado, acontecendo provavelmente o mesmo no resto do país e do mundo. No caso de considerarmos que o NAN acontece em 0,1% dos nascimentos<sup>4</sup>, possivelmente existem cerca de 140 casos/ano não diagnosticados em nosso estado. Para melhorar esta situação, devemos incentivar os laboratórios que dispõem de citômetro de fluxo para iniciarem com o teste mais simples, que é a prova cruzada contra neutrófilos. Para os que já se dedicam ao estudo de histocompatibilidade para transplantes, e que têm a prova cruzada e outros métodos em sua rotina, será muito fácil analisar esses casos de NAN, mesmo os com profunda neutropenia.

## Referências

- Lalezari P, Theodore M, Spaet H. Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. *Blood*. 1960;(15):236-43.
- Lalezari P. Neutrophil-specific antigens, immunobiology, and implications in transfusion medicine and blood disorders. *Transfusion*. 2017;57(9):2066-73.
- Tae HH, Chey MJ, Kyou SH. Granulocyte antibodies in Korean neonates with neutropenia. *J Korean Med Sci*. 2006;21(4):627-32.
- Williams BA, Fung YL. Alloimmune neonatal neutropenia: Can we afford the consequences of a missed diagnosis? *J Paediatr Child Health*. 2006;42(1-2):59-61.
- Flesch BK, Reil A. Molecular Genetics of the Human Neutrophil Antigens. *Transfus Med Hemotherapy*. 2018;45(5):300-9.
- Flesch BK, Curtis BR, De Haas M, Lucas G, Sachs UJ. Update on the nomenclature of human neutrophil antigens and alleles. *Transfusion*. 2016;56(6):1477-9.
- Torres M, Moraes M. Nomenclatura dos fatores do sistema HLA. *Einstein*. 2011;9(11):249-51.
- Marín L, Torío A, Muro M, Fernandez-Parra R, Minguela A, Bosch V, et al. Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16(3):279-82.
- Lopes LB, Abbas SA, Moritz E, Martins JO, Chiba AK, Langhi DM, et al. Antibodies to human neutrophil antigen HNA-3b implicated in cases of neonatal alloimmune neutropenia. *Transfusion*. 2018;58(5):1264-70.
- Tomicic M, Starcevic M, Zach V, Hundric-Haspl Z. Alloimmune Neonatal Neutropenia Due to Anti-HNA-2a Alloimmunization with Severe and Prolonged Neutropenia but Mild Clinical Course: Two Case Reports. *Arch Med Res*. 2007;(38)7:792-6.
- Fung YL, Pitcher LA, Willett JE, Reed C, Mison L, Bux J, et al. Alloimmune neonatal neutropenia linked to anti-HNA-4a. *Transfus Med*. 2003;13(1):49-52.
- Hagimoto R, Koike K, Sakashita K, Ishida T, Nakazawa Y, Kurokawa Y, et al. A possible role for maternal HLA antibody in a case of alloimmune neonatal neutropenia. *Transfusion*. 2001;41:615-20.

13. Gramatges MM, Fani P, Nadeau K, Pereira S, Jeng MR. Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(1):97-9.
14. Martins JO, Moritz E, Abbas S, Lopes L, Langhy D, Chiba AK, et al. HLA and HNA antibodies are more prevalent in multiparous women with red blood cell alloimmunization. *Blood*. 2017;130(1):3731.
15. Errante PR, Frazão JB, Condino Neto A. Neutropenia congênita. *Braz J Allergy Immunol*. 2013;1(1):23-38.
16. Nguyen XD, Flesch B, Sachs UJ, Kroll H, Klüter H, Müller-Steinhardt M. Rapid screening of granulocyte antibodies with a novel assay: Flow cytometric granulocyte immunofluorescence test. *Transfusion*. 2009;49(12):2700-8.
17. Jiang AF, Lalezari P. A micro-technique for detection of leukocyte agglutinins. *J Immunol Methods*. 1975;7(1):103-8.
18. Bux J, Stein EL, Santoso, Mueller-Eckhardt C. NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion*. 1995;35(1):54-7.
19. Cardone JDB, Bordin JO, Chiba AK, Norcia AMMI, Vieira-Filho JPB. Gene frequencies of the HNA-4a and -5a neutrophil antigens in Brazilian persons and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-5a genotyping. *Transfusion*. 2006;46(9):1515-20.
20. Moritz E, Chiba AK, Kimura EY, Albuquerque D, Guirãõ FP, Yamamoto M, et al. Molecular studies reveal that A134T, G156A and G1333A SNPs in the CD177 gene are associated with atypical expression of human neutrophil antigen-2. *Vox Sang*. 2010;98(2):160-6.

---

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Correspondência:  
Luiz Jobim  
E-mail: ljobim@hcpa.edu.br