



Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Fernandes Figueira

Pós-graduação em Saúde da Criança e da Mulher

**REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA SOBRE QUANTIFICAÇÃO DE
SUBCLASSES DE IgG EM CRIANÇAS PARA
DETECÇÃO DE IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS COM DEFEITO NA
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS**

Karen Helene Asch

Rio de Janeiro

Outubro 2011



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Fernandes Figueira
Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher

**REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA SOBRE QUANTIFICAÇÃO DE
SUBCLASSES DE IgG EM CRIANÇAS PARA
DETECÇÃO DE IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS COM DEFEITO NA
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS**

Karen Helene Asch

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Maria Ignez Capella Gaspar Elsas

**Rio de Janeiro
Outubro, 2011**

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu filho Armando, que está começando a trilhar o caminho do conhecimento científico, em sua área tecnológica e que sempre me apoiou com carinho, em todos os momentos. Ao meu marido Antonio, por sua paciência, carinho e compreensão nestes anos de convivência. A minha família e amigos pelos conselhos e incentivos.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria Ignez Gaspar Elsas pesquisadora da FIOCRUZ-IFF, do Departamento de Fisiopatologia, pela sua competente orientação e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Elsas pesquisador da UFRJ, pela grande colaboração na execução do trabalho.

Ao Laboratório de Fisiopatologia, especialmente ao Dr. Tulio, Dr. Ricardo e Doutoranda Bianca pelo apoio na execução da impressão gráfica e demais auxílios.

Ao Laboratório de Patologia Clínica, especialmente ao Chefe do Departamento Janio Cordeiro, pelo incentivo e compreensão.

Aos meus pais, meu filho, meu marido e todos de minha família por todo carinho ao longo desses anos.

A todas as demais pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho.

Resumo:

O presente estudo visa, através de uma revisão sistemática da literatura científica, verificar qual das metodologias utilizadas para quantificação de subclasses de IgG, como teste de triagem para Imunodeficiência Primária com Predominância de Defeito de Anticorpos (IDPDA) é a mais adequada para a rede SUS, num contexto de um sistema de referência. Para tanto, a literatura científica recuperada através da busca direcionada foi analisada, verificando não somente as diferentes indicações diagnósticas e os aspectos técnicos próprios de cada estudo, mas recuperando, sempre que possível os dados originais, que possam subsidiar futuros estudos comparativos entre os vários métodos descritos. Considerando que as metodologias são dispendiosas, mas diferem nos detalhes das suas execuções, o presente estudo propõe uma recuperação, análise, avaliação e comparação da literatura científica, referente a esses diferentes métodos de dosagem laboratorial, tais como; Nefelometria, ELISA e Imunodifusão radial e contribuindo para fundamentar essa discussão. A portaria número 495, 09/2007, do MS aprovou o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas (PCDT) da IDPDA, que correspondem a 50% de todas as IDPs, apresentando critérios de inclusão e exclusão, para regulamentar a distribuição de Ig humanas aos pacientes portadores de IDP, os quais destacam que as subclasses de IgG devem ser dosadas quando há indicação clínica. O objetivo geral deste estudo foi realizar uma revisão sistemática para: identificar, selecionar, recuperar e analisar a literatura científica internacional sobre padronização de métodos laboratoriais de determinação das Subclasses de IgG, no contexto da triagem de pacientes com IDPDA. Especificamente procuramos: a) identificar, com base nesta análise, o(s) método(s) laboratorial(is) mais adequados para a utilização, em nossas condições institucionais, com a finalidade de quantificação de subclasses de IgG, nas IDPDA; b) Recuperar da literatura analisada, sempre que possível, os dados necessários, para definir os intervalos de referência, baseados nos diferentes métodos laboratoriais, em uso, para a quantificação de subclasses de IgG, nos indivíduos saudáveis, visando o diagnóstico das deficiências de subclasses de IgG. Para isso fizemos levantamento de artigos científicos nas bases de dados Pubmed, MEDLINE-Bireme, EMBASE - BIOMEDICAL ANSWERS, Cochrane Library, SciELO, LILACS, Banco de Tese da CAPES, Biblioteca Digital da Universidade de São Paulo (USP), e o Portal de Teses e Dissertações em Saúde Pública da FIOCRUZ. Na base Pubmed a busca foi referente aos anos de 1980 a 2011. Os documentos identificados tiveram seus títulos e resumos avaliados por dois revisores independentemente, aplicando como critério de inclusão estudos que avaliassem as quantidades das subclasses de IgG em indivíduos saudáveis, de seis meses a 18 anos, utilizando qualquer metodologia, com qualquer tipo de desenho de estudo e que permitissem definir as faixas de valores de referência para as populações estudadas. A análise dos estudos selecionados mostrou variações importantes entre os estudos, mesmo quando comparamos a mesma faixa etária e a mesma metodologia. As variações têm maiores conseqüências para a interpretação dos exames quando se trata de IgG3 e IgG4, cujas concentrações séricas são menores, especialmente pela proximidade entre o valor inferior da normalidade e o limite da sensibilidade dos métodos empregados. A análise também ressalta a relativa carência de estudos de padronização na população brasileira, especialmente aqueles que utilizem metodologias e padrões adotados correntemente nos centros de referência internacionais.

Palavras-chaves: Imunoglobulina G, Nefelometria e turbidimetria/métodos, Deficiência de IgG, ELISA, Imunodifusão, Valores de referência, Síndromes de imunodeficiência.

Abstract:

The goal of this study was to define, through a systematic search of the scientific literature, which of the methodologies currently used to quantify IgG subclasses was most appropriate as a screening test for Primary Immune Deficiency (PID) with predominance of antibody defects (PIDPAD) to be enforced by the public health system in the context of a reference laboratory. To this aim, the scientific references recovered from a targeted search were analysed, as to the different diagnoses and the technical variables included in individual studies, and extracted whenever possible with respect to the original data, for comparing the performance of different methods. As these different methodologies are usually expensive, and differ considerably in the operation details, this study proposes to recover analysis and compare the scientific references concerning these different laboratory methods (Nephelometry, ELISA, and Radial immunodiffusion), thereby contributing to a discussion based on objective evidence. Through its regulation number 495, dated September 2007, the Brazilian Ministry of Health approved a clinical protocol for therapy of PIDPAD, which amount to one-half of all PID, presenting criteria for inclusion and exclusion that allow regulation of human Ig dispensation to PID patients, for which IgG subclass quantification must accompany clinical indication. Our general goal was to perform a systematic review to: identify, select and analyse the international scientific literature on standardization of laboratory methods for IgG subclass quantitation, in the context of PIDPAD investigation. Specifically, we: a) identified the laboratory methods most adequate for use in our institutional setting, for IgG subclass quantitation; b) recovered from the references analyzed, whenever possible, the original data that could be used to define reference values in healthy subjects, and therefore identify patients with IgG subclass deficiency. To this end, we searched the following databases: Pubmed, MEDLINE-Bireme, EMBASE - BIOMEDICAL ANSWERS, Cochrane Library, SciELO, LILACS, Banco de Tese da CAPES, Biblioteca Digital da Universidade de São Paulo (USP), and Portal de Teses e Dissertações em Saúde Pública da FIOCRUZ. At Pubmed, the search covered the period 1980-2011. The retrieved references were examined by two independent reviewers, for application of the following inclusion criteria: studies that evaluated IgG subclass levels in healthy subjects, aged 6 months to 18 years, through any of the available methodologies, with any of the current study designs, so as to define reference values for the populations studied. The analysis of the selected references unveiled important variations among studies, even when the same age ranges and the same methods were compared. These variations had important implications for the interpretation of laboratory tests, in the case of IgG3 and IgG4, which have lower serum levels, especially because a narrow window was observed between the lower limit of the normal range and the lower limit of detection of the assays. Our analysis also highlighted the scarcity of standardization studies concerning the Brazilian population, especially those using the methods and standards currently adopted at reference centers abroad.

Key words: Primary immunodeficiency, IgG subclasses, Nephelometry, ELISA, Radial immunodiffusion, reference values.

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Justificativa	13
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. Referencial Teórico	18
4.1. Evolução histórica do conhecimento e classificação das imunodeficiências primárias	18
4.2. As imunodeficiências primárias como problema de saúde coletiva	20
4.3. Classificação das Imunodeficiências Primárias	25
4.3.1. Imunodeficiências Combinadas de células T e B	25
4.3.2. Outras Síndromes bem definidas	26
4.3.3. Doenças de Desregulação Imunológica	28
4.3.4. Defeitos Congênitos no Número ou Função de Fagócitos	29
4.3.5. Defeitos na Imunidade Inata	31
4.3.6. Doenças Auto-inflamatórias	32
4.3.7. Deficiências do Complemento	33
4.3.8. Imunodeficiências Predominantemente de Anticorpos	34
4.3.8.1. Redução grave em todos os isotipos de imunoglobulinas do soro com profunda redução ou ausência de células	35
4.3.8.2. Intensa redução de mínimo 2 ou mais isotipos de imunoglobulinas no soro, com número normal ou baixo de células B	36
4.3.8.3. Grave redução de IgG e IgA no soro, com níveis altos ou normais de IgM e número normal de células B	37
4.3.8.4. Deficiências de subclasses (IgG ou IgA) ou de cadeia leve, com número normal de células B	37
4.3.8.5. Deficiência específica de anticorpos com concentrações normais de IgG e números normais de células B	39
4.3.8.6. Hipogamaglobulinemia Transitória da Infância (HTI) com número de células B normais	40
4.4. IgG e suas subclasses	41
4.5. Evolução do padrão de proteínas plasmáticas	43
4.6. Metodologias de quantificação das imunoglobulinas	46
4.6.1. Nefelometria	46
4.6.2. Turbidimetria	49

4.6.3. Imunodifusão radial	50
4.6.4. Imunoenzimático	52
5. Metodologia	55
5.1. Estudo de revisão sistemática conduzido de outubro de 2010 a agosto de 2011	55
5.2. Seleção dos Estudos	56
5.2.1. Avaliação dos resumos e critérios de inclusão	56
5.2.2. Critérios de inclusão e exclusão	56
5.3. Coleta de dados	56
6. Resultados	58
6.1. Busca, identificação, recuperação e análise da literatura científica internacional, sobre a quantificação de Subclasses de Ig G por vários métodos laboratoriais	58
6.1.1. Nefelometria e Turbidimetria	58
6.1.1.1. Busca Inicial	58
6.1.1.2. Novos Ciclos de busca	59
6.1.1.3. Busca Ampliada	59
6.1.1.4. Consolidação da busca com as Metodologias de Nefelometria e Turbidimetria	60
6.1.2. ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	64
6.1.2.1. Busca Inicial	64
6.1.2.2. Novos Ciclos de Busca	64
6.1.2.3. Busca Ampliada	65
6.1.2.4. Consolidação da busca com a Metodologia de ELISA	65
6.1.3. Imunodifusão radial	68
6.1.3.1. Busca Inicial	68
6.1.3.2. Novos Ciclos de Busca	68
6.1.3.3. Consolidação da busca com a Metodologia de Imunodifusão radial	69
6.1.4. Subclasse de Ig G e concentração em crianças, independente da metodologia	72
6.1.4.1. Busca Inicial	72
6.1.4.2. Novos Ciclos de Busca	72
6.1.4.3. Consolidação das buscas de subclasse de IgG e concentração em crianças, independente da metodologia	74
6.1.5. Buscas complementares nas Bases eletrônicas Scielo, LILACS e MEDILINE	79
6.1.6. Busca complementar na Base eletrônica <i>Cochrane Library</i>	79
6.1.7. Busca complementar na Base eletrônica <i>EMBASE-Biomedical Answers</i>	80

6.1.8. Busca complementar no Banco de Teses	82
6.1.9. Análise da data e da origem dos estudos selecionados	83
6.2. Análise integral dos artigos selecionados	84
6.3. Análise dos dados extraíveis por Metodologia	89
6.3.1. Dados extraídos dos artigos de Nefelometria	89
6.3.2. Dados extraídos dos artigos de ELISA	90
6.3.3. Dados extraídos dos artigos de Imunodifusão radial	93
6.4. Análise total dos dados extraídos	95
7. Discussão	107
8. Conclusão	119
9. Referências Bibliográficas	120
10. Anexos	144

1- INTRODUÇÃO

O Instituto Fernandes Figueira (IFF), unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), hospital terciário da rede pública e atual Centro de Referência para Imunodeficiências Primárias, visa aprimorar o diagnóstico destas doenças através da implantação de protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas. Para tanto, necessitará implantar rotinas diagnósticas laboratoriais, como uma das ferramentas para a viabilização desta proposta. A padronização de critérios laboratoriais de identificação de Imunodeficiência Primária (IDP) é particularmente importante no caso das deficiências de produção de anticorpos, que representam justamente a categoria mais frequente de IDP. Esta padronização é o foco do interesse do presente estudo.

Através do Setor de Imunologia, do Laboratório do Departamento de Patologia Clínica do IFF, a implementação das quantificações de subclasses de IgG aparece como uma opção de exame de triagem para o diagnóstico destas doenças, qualificando este Centro de Referência para assistência a pacientes com IDP e ampliando a cobertura da rede, através da disponibilização do exame para outras unidades do Sistema Único de Saúde (SUS), com possível replicação de assessoria e perspectivas futuras de um modelo alternativo de capacitação, baseado na educação à distância. Por outro lado, prover a rede do IFF de informações sobre os diagnósticos laboratoriais de imunodeficiências primárias através do banco de dados informatizado auxiliará a integrar os dados das avaliações clínico-laboratoriais.

A escolha de determinados métodos laboratoriais depende de vários fatores, tais como: impacto orçamentário; adequação da rede de serviços de saúde, aspectos estruturais, mão de obra especializada, disponibilidade no

mercado de empresas representantes do setor de materiais médico-hospitalares/laboratoriais, que proporcionem boa assistência técnica e tenham licenciamento e aprovação (licenciamento, regulamentação, validação) pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), dentre outros (1).

Os métodos de Imunodifusão Radial, de Imunoensaio como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), Turbidimetria e de Nefelometria são aqueles mais utilizados para a determinação das subclasses de Imunoglobulinas G nas últimas décadas, estando amplamente estabelecidos e utilizados no nosso meio de medicina laboratorial e com registro na ANVISA (2). A Nefelometria, especificamente, é utilizada para quantificações de diversos compostos do sangue humano, tais como Proteína C reativa (marcador inflamatório e de infecção), Transferrina (anemias), C3/C4 (componentes do sistema complemento), ASO (anti-estreptolisina O) (3). Muitos laboratórios da rede pública e privada se valem de equipamentos com essa metodologia, demonstrando que ela já é largamente difundida no meio laboratorial, inclusive no SUS e provavelmente não causaria um grande impacto financeiro, com aquisição deste teste para quantificações mais específicas, como as das subclasses de IgG. A Nefelometria, no entanto, não é a única metodologia disponível no mercado. Por esta razão é importante avaliar, sempre que houver dados suficientes na literatura examinada, a acurácia, razão de verossimilhança, sensibilidade e especificidade deste teste diagnóstico, nas suas diversas formas, em comparação com as outras metodologias disponíveis.

O presente estudo visa, através de uma revisão sistemática da literatura científica, verificar qual das metodologias utilizadas para quantificação de subclasses de IgG, como teste auxiliar ao diagnóstico de Imunodeficiência Primária com Predominância de Defeito de Anticorpos (IDPDA) é a mais adequada para a rede SUS, num contexto de um sistema de referência. Para tanto, a literatura científica recuperada, através da busca direcionada será analisada, verificando não somente as diferentes indicações diagnósticas e os aspectos técnicos próprios de cada estudo, mas recuperando, sempre que possível os dados originais, que possam subsidiar futuros estudos comparativos entre os vários métodos descritos.

2-JUSTIFICATIVA

Observa-se, na literatura mundial atual, uma maior tendência de utilização da Nefelometria como método laboratorial para a quantificação das subclasses de IgG. Grandes projetos de padronização dos valores em pacientes pediátricos estão utilizando esta metodologia para a determinação dos intervalos de referência deste teste. (4) (5). Por outro lado, vários trabalhos anteriores utilizaram outras metodologias com o mesmo propósito (6) (7) (8).

Considerando que as metodologias são dispendiosas e elas diferem nos detalhes das suas execuções, o presente estudo propõe uma recuperação, análise, avaliação e comparação da literatura científica, referente a esses diferentes métodos de dosagem laboratorial, contribuindo para fundamentar essa discussão.

Os métodos de Imunodifusão Radial, e de Imunoensaio como ELISA, Turbimetria e de Nefelometria, são aqueles mais utilizados para a determinação das subclasses de Imunoglobulinas G (IgGs) em trabalhos publicados nas últimas décadas e serão, então, as metodologias-alvo deste estudo. Devido à variedade de métodos utilizados e de padrões de referência, a padronização de intervalos de referência para este exame sofre variações, gerando com isso a necessidade de uma análise mais refinada, através de uma revisão sistemática da literatura referente à aplicação destes métodos para a quantificação das IgGs (9) (10).

Este tema foi escolhido pelo fato de, até o momento, essas metodologias para quantificação de subclasses não terem sido avaliadas por revisões sistemáticas, como mostrou uma primeira busca nas bases de dados, como por exemplo, na Biblioteca *Cochrane* (11). Encontra-se nesta base de dados

apenas um trabalho da década de 90, referente à comparação de metodologias para a quantificação de subclasses de IgG, mas comparando um método de Imunoensaio com Imunodifusão Radial (12), sem fazer uma análise de acurácia, pois utilizava uma amostra populacional de crianças saudáveis.

Sob a ótica da Saúde Coletiva, o Ministério da Saúde (MS), em 2005, estabeleceu o IFF, unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz, como Centro de Referência Nacional das Imunodeficiências Primárias, na Área da Saúde da Mulher, Criança e Adolescente. Tem esta iniciativa, como objetivo, a articulação e assessoria à rede nacional de saúde, para o cuidado dos pacientes com imunodeficiência primária, através da portaria número 745 (13).

Com a portaria número 495, de setembro de 2007, o MS aprovou o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas (PCDT) da imunodeficiência primária, com predominância de defeitos de anticorpos, apresentando os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes com IDP, para administração de imunoglobulinas humanas, visando regulamentar a distribuição de imunoglobulinas humanas aos pacientes portadores desta doença. Os medicamentos devem ser dispensados para os pacientes que se enquadrarem nos critérios estabelecidos no respectivo PCDT, de forma racionalizada e estabelecendo mecanismos de acompanhamento de uso e de avaliação de resultados, garantindo assim a prescrição segura e eficaz (14).

Aparece neste protocolo, como um dos exames laboratoriais para auxiliar no diagnóstico de imunodeficiências primárias humorais, a quantificação de subclasses de IgG, para casos específicos. Este protocolo clínico e de diretriz terapêutica, que passou recentemente (2009) por um

processo de revisão, está submetido ao protocolo número 375, de 10 de novembro de 2009, que institui o roteiro a ser utilizado na elaboração de Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas, seguindo os princípios da Medicina Baseada em Evidências e formulados com base na revisão criteriosa da literatura e na melhor evidência científica disponível (15).

Neste protocolo revisado, constam as entradas do CID-10 (Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde da Organização Mundial de Saúde(OMS)) de relevância para o protocolo, entre as quais figura a Deficiência Seletiva de Subclasses de Imunoglobulina G (D80.3).

Dentro dos critérios de inclusão de pacientes no tratamento com imunoglobulinas humanas, no sumário das avaliações necessárias para sua utilização, aparece indicado, como um teste diagnóstico específico, a dosagem da concentração sérica das subclasses de imunoglobulinas G. Deste modo evidencia-se uma preocupação em ampliar a assistência na rede SUS, a doenças mais raras, que antes não tinham essa cobertura.

Com a participação do Setor de Imunologia, do Laboratório do Departamento de Patologia Clínica do IFF, a implementação das quantificações de subclasses de IgG poderá auxiliar no diagnóstico das diversas imunodeficiências primárias existentes, qualificando este Centro de Referência para assistência de pacientes com defeitos congênitos e ampliando a cobertura da rede, disponibilizando o exame para outras unidades do SUS .

Por outro lado, já são tratados e acompanhados no IFF, mais de 100 pacientes com IDP, que não tiveram acesso a exames laboratoriais complementares, como as dosagens das subclasses de IgG, por não estarem

nem disponíveis, até bem pouco tempo, no próprio Centro de Referência, ainda que sejam exames de grande importância para a avaliação de tratamento com infusão de imunoglobulinas G (16) (17) (18) (19) .

Uma revisão sistemática da melhor metodologia a ser aplicada para a quantificação das subclasses de IgG traria subsídios importantes para a questão nesta Instituição, que é uma prestadora de serviços da rede SUS.

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

➤ Realizar uma revisão sistemática para: identificar, selecionar, recuperar e analisar a literatura científica internacional sobre padronização de métodos laboratoriais de determinação das Subclasses de Imunoglobulinas G, no contexto da triagem de pacientes com Imunodeficiência Primária com Predominância de Defeito de Anticorpos.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Identificar, com base nesta análise, o(s) método(s) laboratorial (is) mais adequados para a utilização em nossas condições institucionais, com a finalidade de quantificação de subclasses de IgG, nas Imunodeficiências Primárias com Predominância de Defeito de Anticorpos.

➤ Recuperar da literatura analisada, sempre que possível, os dados necessários, para definir os intervalos de referência, baseados nos diferentes métodos laboratoriais, em uso, para a quantificação de subclasses de IgG, nos indivíduos sadios, visando o diagnóstico das deficiências de subclasses de IgG.

4- REFERENCIAL TEÓRICO

As imunodeficiências primárias ou congênitas são doenças imunológicas provocadas por defeitos gênicos, que causam aumento da susceptibilidade às infecções (20) comumente manifestada na primeira infância e propensão a certas neoplasias e doenças autoimunes.

4.1 Evolução histórica do conhecimento e classificação das imunodeficiências primárias.

Desde a descoberta, em 1952, por Ogden Bruton, da agamaglobulinemia ligada ao X (21), em que descreveu o primeiro paciente com redução da fração gamaglobulina na eletroforese de proteínas e infecções de repetição e a se beneficiar da reposição de imunoglobulinas, mais de 140 genes expressando 200 IDP já foram descritas, contribuindo muito para o conhecimento do sistema imunológico (22).

O Comitê de Especialistas da Imunodeficiência Primária foi originalmente criado sob o apoio da Organização Mundial da Saúde, em 1973, para descrever e classificar os tipos de defeitos primários imunes que afetam seres humanos. Esta classificação das doenças reconhecidas na época foi publicada em um relatório (23), sendo revisada posteriormente a cada dois anos, para incorporar as novas formas de imunodeficiência primária que foram descritas. No entanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tomou a decisão política de concentrar-se em doenças mais prevalentes e o IUIS (*International Union of Immunological Societies*) (24) concordou em assumir o mandato desta comissão, que foi formalizada na 54^a reunião do Conselho da

IUIS em Taipei em 2008. O processo de análise dos relatórios de novas imunodeficiências primárias (PID, do inglês *Primary Immune Deficiency*), a fim de classificá-los adequadamente, continua em reuniões bienais realizadas em diferentes continentes. Um relatório atualizado sobre a lista crescente das imunodeficiências primárias é produzido em cada reunião e publicada em uma revista de Imunologia indexada para o acesso mundial. A mais recente reunião foi realizada em 2009, em Dublin, na Irlanda e atualizou, mais uma vez, as classificações e divulgou as frequências relativas (25).

Desde que já existem mais de 200 imunodeficiências primárias catalogadas, e que surgem cerca de 20 novos tipos por ano, o relatório apresenta definições importantes para o manejo clínico e para uma investigação padronizada, bem como informações relevantes para os pacientes. Os leitores do relatório incluem os médicos que usam este documento na sua prática diária e outros profissionais de saúde, nacionais e internacionais, que utilizam o documento para suas diretrizes de diagnóstico e base para terapias.

O Grupo Latino-Americano de Imunodeficiência (LAGID) teve seu primeiro encontro em 1993 no Chile. Nesta época, apenas quatro países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile e Colômbia), faziam parte deste Grupo. O LAGID, em 1997, já contava com oito países e, atualmente, quase todos os países da América Latina participam deste Grupo de trabalho (26). Em 2002 houve um consenso entre os imunologistas do LAGID da necessidade de divulgação de informações sobre as Imunodeficiências Primárias (IDP) entre os profissionais de saúde. Programas de Educação em IDP foram criados a partir desse consenso. E a partir destes programas surgiu o Grupo Brasileiro de

Imunodeficiência (BRAGID). Imunologistas Clínicos de diversas regiões do país estão associados ao BRAGID, contribuindo para a divulgação das atualizações desta doença (27). Nesta época foi criado o endereço eletrônico, www.imunopediatria.org.br, que tem funcionado como uma excelente ferramenta para auxílio no diagnóstico das IPD, assim como para a divulgação de assuntos de interesse da especialidade. O último encontro do LAGID foi em São Paulo, em 2007, onde também se realizou o primeiro encontro nacional do BRAGID.

4.2- As imunodeficiências primárias como problema de saúde coletiva.

Em vários países, a casuística demonstra que as imunodeficiências humorais são as mais frequentes, sendo responsáveis por aproximadamente metade dos casos (28). Há uma preponderância no sexo masculino (5:1), já que numerosas IDPs são ligadas a defeitos genéticos mapeados no cromossomo X. Estima-se a incidência de um caso em 10000 aproximadamente, podendo variar de 1 para 25000, como no caso da Imunodeficiência Comum Variável (CVID). Já para deficiências de IgA, há estimativas de 1:2000 na literatura mundial (29) e de 1:1000 no Brasil (30). Tais estimativas as colocam como tão freqüentes quanto outras doenças cujo diagnóstico já é realizado por triagem neonatal, como fenilcetonúria, 1:15000 (31), hipotireoidismo, 1:2500 (32) e fibrose cística 1:7.000 (33).

No tocante à prevalência e distribuição das IDPs, grandes variações geográficas e raciais já foram demonstradas em vários estudos

epidemiológicos (34) (35) (36) (37), sendo que muitos países desenvolvidos apresentam casuísticas bem definidas. Em alguns países da Europa essas incidências também variam. No último levantamento realizado pelo ESID (*European Society for Immunodeficiencies*), no período de 2006 a 2008, constatou-se que países como a França (que registraram mais adequadamente no sistema informatizado em rede da ESID) obtiveram estimativas de prevalência das IDPs de 3.72 por 100.000 habitantes (28) Essas discrepâncias entre estudos realizados em diferentes populações podem estar relacionadas a características genéticas de cada população, assim como diferenças no acesso a recursos laboratoriais diagnósticos, especialmente de métodos de identificação molecular e a diferenças sócio-econômicas. (38) (39).

De acordo com Conley e Stiehm, na faixa etária pediátrica, aproximadamente metade dos pacientes com infecções respiratórias recorrentes são saudáveis, 30% têm alergia, 10% possuem doenças crônicas e 10% podem ter imunodeficiência (40). O diagnóstico adequado e precoce das imunodeficiências primárias representa um grande desafio a ser vencido pelo nosso sistema público de saúde. Estas doenças são reconhecíveis através do aumento da suscetibilidade às infecções (41) (42) (43) (44) (45), e os pacientes apresentam, na maioria dos casos, uma história de múltiplas infecções e internações, antes que um diagnóstico preciso seja feito.

Vários trabalhos constataam uma considerável demora no diagnóstico das IDPs humorais. Como exemplo, no Reino Unido verificou-se um atraso médio de 2,5 anos em crianças, desde os primeiros sintomas até o diagnóstico final (46). Nas formas mais graves, como as Imunodeficiências Combinadas Graves, a doença pode evoluir para a morte ainda na infância, caso não seja

corrigido o defeito de desenvolvimento do sistema imune (41) (42) (47). Em todos os outros casos, a prevenção de complicações graves e de sequelas requer um diagnóstico preciso e a atenção de profissionais especializados, organizados como equipe multidisciplinar de saúde.

O diagnóstico laboratorial preciso, reprodutível e confiável para as Imunodeficiências Primárias é extremamente importante para auxiliar no diagnóstico clínico destas doenças. Já existem painéis de triagem propostos para esse fim (48,14), que já são utilizados e adaptados para a realidade de cada instituição.

A portaria do MS Portaria nº 495 de 11 de setembro de 2007 aprovou, na forma do Anexo, o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – Imunodeficiência Primária com predominância de defeitos de Anticorpos – Imunoglobulina Humana, que definiu os testes essenciais para a avaliação da imunidade humoral em indivíduos com suspeita clínica de imunodeficiência primária (figura 1).

Figura 1

-
- Dosagem de imunoglobulinas (soro): IgG total, IgA, IgM;
 - Avaliação da síntese ativa de anticorpos (uma das três):
1. dosagem das isohemaglutininas anti-A e anti-B,
 2. dosagem dos anticorpos pós-vacinais (anti-tétano, anti-difteria), anti-rubéola, anti-hepatite B, anti-sarampo
 3. dosagem de anticorpos anti-polissacárides do pneumococo (pré e pós-vacinais).
-

Figura 1: Quadro III: testes essenciais para a avaliação da imunidade humoral (ref.14)

Esta portaria é dedicada a definir quais os critérios que qualificam um paciente receber a terapia de imunoglobulina venosa. Nos critérios de inclusão é destacado que a quantificação das subclasses de IgG devem ser dosadas quando com indicação clínica, caracterizada pelas infecções de repetição, uma das principais suspeitas para IDP (20) e quando a concentração sérica de Imunoglobulina G estiver dentro do intervalo de referência ou abaixo, e/ou apresentar deficiência de Imunoglobulina A .

- concentração sérica das imunoglobulinas (IgG total, IgA, IgM);
- avaliação da síntese ativa de anticorpos;
- laudos médicos/exames que comprovem a ocorrência de infecções típicas de IP com predominância de defeitos de anticorpos;
- *concentração sérica das subclasses de IgG (quando indicado).*”

Fonte: Ministério da Saúde.

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt2007_imunodeficiencia_primaria.pdf (ref.14)

Como as Imunodeficiências Primárias Humorais correspondem a mais de 50% dos casos, a triagem inicial englobaria testes que são direcionados para essa doença, como a dosagem sérica de Imunoglobulinas G, A, M e Subclasses de Imunoglobulinas G (G1, G2, G3, G4). Estas devem ser quantificadas conjuntamente, para uma análise adequada, pois o somatório das quantificações de subclasses de IgG, em valores referenciais normais, deve corresponder aproximadamente ao valor de 80% a 120%, quantificado da Imunoglobulina G total (49) (50) (51).

4.3- Classificação das Imunodeficiências Primárias.

As imunodeficiências primárias são divididas geralmente em cinco grandes grupos, conforme o defeito seja predominantemente em Anticorpos (Humorais), Celular, ou Combinada (Humorais e Celulares), ou ainda na função ou número das Células Fagocitárias, ou no Sistema Complemento. A mais recente (25) divide em oito grupos as IDPs conforme o componente do sistema imunológico predominantemente comprometido na doença. São eles: imunodeficiências combinadas de células T e B, outras síndromes bem definidas, doenças de desregulação imune, defeitos congênitos do número e/ou função de fagócitos, defeitos na imunidade inata, doenças auto-inflamatórias, deficiências de complemento e deficiências predominantemente de anticorpos.

4.3.1- Imunodeficiências Combinadas de Células T e B.

Constituem um grupo de IDPs muito heterogêneo nas suas manifestações clínicas e na sua patogênese, tendo como característica definidora um ou mais defeitos na funcionalidade e/ou desenvolvimento de células T, com associação variável do desenvolvimento anormal de outras linhagens celulares do sistema imunológico, tais como linfócitos B e células NK. Sua prevalência global é estimada em 1:50.000, e neste grupo estão contidas as mais graves formas de IDPs. Tal gravidade clínica se explica pelo importante papel que desempenham os linfócitos T na indução e modulação das respostas imunes específicas (52). A Imunodeficiência Combinada Grave

(SCID) é a principal doença deste grupo, evoluindo de forma geralmente fatal ainda no primeiro ano de vida, se não for realizado transplante de células progenitoras hematopoiéticas (53) Os principais sintomas clínicos observados são diarreias prolongadas, pneumonia intersticial, candidíase persistente, todas estas manifestações interferindo com o desenvolvimento normal da criança. Os achados laboratoriais incluem panhipogamaglobulinemia, linfopenia ou linfocitose, assim como ausência de função celular imunológica, determinada por testes de estimulação *in vitro* (54). Tratamentos iniciais com antibióticos e imunoglobulina intravenosa são usuais, mas evidentemente só podem beneficiar o paciente em alguns aspectos, mas o transplante de medula óssea ou com células progenitoras frequentemente resultam em permanente cura (+90%) se um doador familiar idêntico for utilizado (22) (52) (55) (56).

4.3.2- Outras Síndromes bem definidas.

A síndrome de *Wiskott-Aldrich* é uma doença rara, com padrão de herança ligada ao cromossomo X, que apresenta alterações como trombocitopenia (contagem baixa de plaquetas), eczema, infecções recorrentes e uma alta incidência de co-morbidades, especialmente doenças autoimunes e neoplasias concomitantes à imunodeficiência propriamente dita. Linfomas de células B relacionadas com infecção pelo vírus EBV (*Epstein-Barr Vírus*) e infecções oportunistas por PCP (*Pneumocystis jirovecii*) também são observados (57). As imunoglobulinas estão alteradas, sendo que em geral há um decréscimo das IgGs e IgMs, um aumento de IgA e IgE e diminuição da quantidade de anticorpos contra polissacarídeos (Deficiência de IgG2) (25).

Esta complexa apresentação clínica resulta de mutações do gene que codifica a proteína WASP, que é a chave reguladora da polimerização da actina nas células hematopoiéticas, a qual, dentre muitas funções distintas, desempenha um papel essencial na estruturação das sinapses imunológicas (58).

Também dentro desta categoria encontra-se a Ataxia-telangiectasia, com alterações neurológicas, endócrinas, hepáticas e cutâneas, associadas ao déficit imunológico. As anomalias no cerebelo, uma parte do encéfalo que desempenha papel central na coordenação dos movimentos, causam o aparecimento de movimentos descoordenados (ataxia); por outro lado, dilatações dos capilares (telangiectasias), que são muito evidentes na pele, olhos, orelhas, asas do nariz e nos braços, desenvolvem-se entre 1 e 6 anos de idade. Doenças sino-pulmonares decorrentes de infecções bacterianas recorrentes, grande susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer e deficiência da imunidade humoral e celular, com acometimento de gravidade variável, são achados comuns nesta doença. A ataxia-telangiectasia geralmente progride até causar debilidade muscular progressiva, paralisia, demência e morte (59) (60). As opções de tratamento atuais incluem o uso profilático de antibióticos e a reposição de imunoglobulinas intravenosas (61). Deficiência seletiva de IgA está presente em 50 a 80 % dos pacientes de ataxia-telangiectasia, e IgG total, IgG2 ou outras subclasses de IgG podem também estar diminuídas. Testes de função in vitro dos linfócitos mostram uma moderada depressão na proliferação celular (57).

4.3.3- Doenças de Desregulação Imunológica.

Esta categoria inclui doenças caracterizadas pela desregulação da homeostase imunológica, levando ao acúmulo anormal de linfócitos, autoimunidade pela falha de remoção de linfócitos auto-reativos e aumento na ocorrência de linfomas, pela sobrevivência inapropriada de linfócitos transformados (62). Essas manifestações autoimunes pode ser representada pela Síndrome Linfoproliferativa Autoimune, uma doença cujos sintomas aparecem por volta dos 2 anos de idade, apresentando linfadenomegalia e/ou esplenomegalia. Dados laboratoriais indicam linfocitose T e B, eosinofilia e/ou monocitose, presença de auto-anticorpos, como os anti-cardiolipina. Linfócitos T periféricos que não expressam moléculas de superfície CD4 e CD8 são observados em grande número (63). Na maioria das formas desta síndrome linfoproliferativa não se observam alterações nos níveis de imunoglobulinas no soro; contudo, nas formas chamadas XLP1 e XLP2, em alguns casos os níveis das imunoglobulinas séricas estão diminuídas (25).

A síndrome de *Chédiak-Higashi* é outra doença rara deste grupo que se manifesta na infância como desordem autossômica recessiva, que afeta vários sistemas do corpo. Pacientes com síndrome de *Chédiak-Higashi* apresentam hipopigmentação da pele, olhos e cabelos; tempo de sangramento prolongado; hematomas, infecções recorrentes, função anormal das células Natural Killer, e neuropatia periférica (64).

A apresentação clínica pode incluir uma alta frequência de infecções bacterianas, ou uma linfoproliferação generalizada, sendo esta apresentação (fase acelerada) fatal, a menos que seja tratada com transplante de células

hematopoiéticas (65) (66). Entre os achados laboratoriais característicos, figuram os grânulos gigantes em neutrófilos, eosinófilos e granulócitos, observados no esfregaço de sangue periférico. Grânulos gigantes são observados ainda nas células precursoras de leucócitos da medula óssea destes pacientes (67). Os pacientes costumam apresentar também neutropenia no sangue periférico e hipergamaglobulinemia, mas os níveis de imunoglobulinas podem estar normais em alguns casos (68). Os relatórios clínicos da síndrome de *Chediak-Higashi* identificaram diferentes mutações ao longo do gene CHS1/LYST, que têm valor preditivo para a gravidade da doença (69).

4.3.4- Defeitos Congênitos de Número e/ou Função dos Fagócitos.

Nesta categoria, enquadram-se doenças extremamente raras, como a neutropenia congênita que foi descrita originalmente, na década de 50, pelo pediatra Rolf Kostmann, como um defeito inato da imunidade em pacientes consaguíneos do norte da Suécia (70). Desde então, outros defeitos congênitos de número e/ou função de fagócitos foram descritos, e sua base genética foi investigada. São doenças geneticamente heterogêneas e com diferentes padrões de herança, tais como: autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao X ou esporádica (71).

Pacientes com neutropenia congênita são propensos a graves infecções bacterianas recorrentes, incluindo otite média, bronquite, pneumonia, osteomielite ou celulite, recorrentes estomatites orais, assim como a infecções fúngicas (72). Uma característica destas infecções é a ausência de pus, que se

explica pela ausência de neutrófilos. Muitos pacientes sofrem de gengivite crônica e cáries. Além disso, há uma diminuição da densidade mineral óssea, levando à osteopenia ou osteoporose, com aumento da propensão a fraturas (73).

A fisiopatologia das neutropenias congênitas graves pode ser tão heterogênea quanto os defeitos genéticos subjacentes. O denominador comum a muitas variantes desta doença, como as que se devem a mutações dos genes ELA2, HAX1, GFI1, WS, SLC37A4, e G6PC3, é o aumento da susceptibilidade dos neutrófilos e seus precursores a apoptose (morte celular programada) (74) (75) (76). O tratamento é baseado na reconstituição das defesas do paciente com G-CSF recombinante humano, administrado por via subcutânea, que induz a diferenciação dos neutrófilos e reduz a taxa de apoptose (77). Quando não respondem bem a esse tratamento, estes indivíduos são indicados para transplante alogênico de células hematopoiéticas (78). Além da neutropenia característica encontra-se também os seguintes achados laboratoriais nas diversas variações gênicas: hipogamaglobulemia, graus variáveis de linfopenia, monocitopenia, hipoglicemia, hiperlipidemia, etc (25) (71).

4.3.5- Defeitos na Imunidade Inata.

Várias condições são raras devido a defeitos no sistema imune inato, que é a primeira linha de defesa, a qual é independente do sistema adaptativo, relacionado com as funções dos linfócitos. Os principais componentes do sistema imunológico inato são as barreiras epiteliais, neutrófilos, macrófagos, células NK, Sistema Complemento (vias alternativa e das lectinas) e algumas citocinas secretadas por outros tipos celulares que não os linfócitos T e B, típicos da imunidade adaptativa. Muitos dos defeitos da imunidade inata, já caracterizados estão associados com problemas de pele (79).

Dentre os aspectos mais importantes da imunidade inata, destaca-se a capacidade de vários desses tipos celulares e cascatas enzimáticas detectarem nos tecidos a presença de patógenos infecciosos, ao reagirem com componentes bioquímicos que, de forma genérica, são característicos de microorganismos infecciosos e/ou vírus. Estes chamados Padrões Moleculares Associados à Patógenos (ou, abreviadamente, PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) são capazes de ligar e ativar receptores especializados de várias famílias, como os *Toll-Like Receptors* (TLR) e *NOD-like Receptors* (NLR), induzindo cascatas de sinalização intracelular, que culminam em mudanças profundas na expressão de muitos genes-alvo. Paralelamente a isto, os elementos do Sistema Complemento, que exercem função análoga na fase fluida, atuam sobre as células da Imunidade Inata indiretamente, através de receptores específicos para os fragmentos gerados durante a ativação do sistema. Vários defeitos genéticos, que prejudicam o reconhecimento de patógenos invasores pelo sistema imune inato,

aumentando a suscetibilidade a subgrupos bem-definidos de patógenos infecciosos foram recentemente descritos (80) (81).

Os defeitos de padrões de reconhecimento de receptores variam em sua gravidade, assim como na seletividade para diversos grupos de patógenos. Enquanto o quadro clínico costuma ser muito grave na infância, tende em alguns casos a diminuir com a idade, o que sugere que as respostas imunológicas adaptativas, que se desenvolvem ao longo da vida, têm o potencial de suprir, no todo ou em parte, essas deficiências da resposta inata (82).

4.3.6- Doenças Auto-inflamatórias.

As Doenças Auto-inflamatórias compreendem um grupo heterogêneo de doenças, caracterizado por intensos episódios de inflamação, em resposta a estímulos ainda não identificados, na ausência de níveis significativos de auto-anticorpos ou células T auto-reativas. A febre periódica ou de origem desconhecida, as erupções cutâneas, inflamação e dor articulares e dor abdominal intensa figuram entre as manifestações clínicas mais evidentes neste grupo de patologias. Em vários casos, os genes responsáveis foram identificados, e os defeitos funcionais foram atribuídos a falhas na imunidade inata e em mecanismos de controle da resposta inflamatória inespecífica.

Até o momento nove síndromes auto-inflamatórias hereditárias foram identificadas, sendo a mais conhecida a Febre Familiar do Mediterrâneo. Alterações genéticas em proteínas contendo domínios de Pirina, que são

frequentemente associados a processos biológicos de inflamação e apoptose (morte celular), são responsáveis por esta doença (83).

Na Síndrome de Hiper IgD (SHID) encontramos alteração no gene que codifica a enzima MK (mevalonato-cinase) (84) , fazendo com que haja alterações metabólicas, que indiretamente aumenta a produção de IL1- β , citocina pró-inflamatória potente e pleiotrópica, exacerbando o processo inflamatório (85). Em 80% dos casos, há um aumento de IgD, acompanhado por um aumento de IgA, sendo o nível elevado de IgD característico da síndrome, mas não relacionado à gravidade ou à fisiopatologia da SHID (86).

Os principais achados laboratoriais destas doenças envolvem leucocitose, neutrofilia, o aumento de Proteína C reativa, da Velocidade de Hemossedimentação e da proteína sérica amiloide A. Altos índices de ácido mevalônico urinário podem também sugerir o diagnóstico (87).

4.3.7- Deficiências de Complemento.

Classificadas em sua frequência como raras a extremamente raras (25), esta IDP se apresenta muitas vezes como uma síndrome autoimune, lembrando o Lupus Eritematoso. A deficiência em componentes da via clássica compromete a opsonização das bactérias, a atividade bactericida e a remoção dos imunocomplexos. As deficiências da via clássica com expressão clínica englobam defeitos funcionais em C1q, C1r, C1s, C4, C2 e C3. A deficiência de C2 e C3 está também associada a infecções por bactérias encapsuladas. Por outro lado, a deficiência da lectina ligadora de manose (MBL), um componente da via das lectinas, que é MBL-dependente, tem sido associada com maior

risco de infecções bacterianas recorrentes, especialmente durante os primeiros anos da vida. Dosagens laboratoriais de C3 e C4 e atividade de CH50 são considerados testes de triagem para estas deficiências (72).

4.3.8- Imunodeficiências Predominantemente de Anticorpos.

As imunodeficiências primárias predominantemente de anticorpos constituem a classe mais comum de imunodeficiência primária (88). Essas anomalias somam 50% de todas as imunodeficiências primárias descritas. É um grupo heterogêneo de doenças, com déficits muito diferentes de produção de anticorpos, resultantes de muitos defeitos gênicos distintos, que alteram a diferenciação de células B em diferentes fases. Em geral, a imunidade celular não está comprometida, ao contrário do que pode ser observado nas IDPs combinadas. A hipogamaglobulinemia característica destas doenças é definida por decréscimo em uma ou mais classes de imunoglobulinas, definido por valores abaixo da média por uma distância de pelo menos 2 desvios-padrão (89).

Recentemente, houve grandes descobertas que permitiram mapear os genes associados a muitas IDPs, mas para a maioria dos pacientes a etiologia permanece desconhecida (22) (25) (38). Como há uma grande variedade de defeitos que afetam diferentes fases do desenvolvimento do sistema imune, a idade de apresentação varia muito, podendo se manifestar ainda na infância, ou permanecer sem expressão clínica até a terceira década de vida (90) (91).

As alterações laboratoriais variam desde uma quase completa ausência de células B e imunoglobulinas, até uma deficiência seletiva da resposta de

anticorpos a antígenos específicos, mesmo na presença de concentrações normais de imunoglobulinas séricas totais (92). Todas as doenças do grupo, no entanto, apresentam aumento da susceptibilidade a infecções, e especialmente as que afetam o trato respiratório (93).

A demora no início do tratamento adequado para algumas dessas doenças, o qual consiste, em geral, em antibioticoterapia associada ou não à reposição de Imunoglobulinas por via intravenosa (IGIV) pode resultar em complicações graves relacionadas às infecções (94) (95). Um diagnóstico clínico e laboratorial precoce, com tratamento adequado, pode reduzir significativamente a morbidade e aumentar a expectativa e a qualidade de vida destes pacientes (96).

4.3.8.1- Redução grave em todos os isotipos de imunoglobulinas do soro com profunda redução ou ausência de células.

Está incluída neste subgrupo a agamaglobulinemia ligada ao X, doença rara resultante de deficiência na Btk (Bruton tirosina kinase), que acarreta diminuição da produção de todos os isotipos de imunoglobulinas, com número normal de células pré-B, e cursa com infecções bacterianas graves (97). Também se encontra neste subgrupo a Deficiência de cadeia pesada mu (μ), muito rara, em que todos os isotipos de imunoglobulinas se encontram diminuídos (98) (25). As infecções graves por bactérias também estão presentes, mas o padrão de herança é autossômico recessivo. Mutações nos genes que codificam $\lambda 5$, $Ig\alpha$, $Ig\beta$ e BNLK também provocam deficiências humorais extremamente raras (72). Todas elas têm em comum o decréscimo

em todas as classes de imunoglobulinas, infecções bacterianas graves e um número normal de células pré-B. Outra mutação genética, ainda não caracterizada, acarreta a Timoma com Imunodeficiência, associada a infecções oportunistas, com risco aumentado do desenvolvimento de auto-imunidade (99).

4.3.8.2- Intensa redução de mínimo 2 ou mais isotipos de imunoglobulinas no soro, com número normal ou baixo de células B.

A representante principal deste subgrupo é a Imunodeficiência Comum Variável. Trata-se da segunda imunodeficiência primária mais frequente, depois da Deficiência Seletiva de IgA, e afeta ambos os sexos (100). Existem vários diferentes fenótipos clínicos, provavelmente representando diferentes doenças, com mecanismos patogênicos bastante diversos. Apresentam baixos níveis de IgG e IgA, com ou sem baixa de IgM e número de células pré-B normal ou baixo(101)(102). Como os fenótipos clínicos variam, podem incluir infecções recorrentes do trato respiratório e gastrointestinal, por bactérias encapsuladas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) (103), bronquiectasia, autoimunidade, linfoproliferação e doença granulomatosa (91). A terapia com IVIG é benéfica nas infecções respiratórias e diminui significativamente suas recidivas, mas ocorrem danos pulmonares independentemente deste tratamento. As infecções recorrentes são causa de inúmeras internações hospitalares e alta morbidade (104) (105).

Outras deficiências incluídas neste subgrupo, como as deficiências de ICOS, CD19, TACI e Receptor de BAFF, são mais raras e apresentam níveis baixos de IgG e IgA e/ou IgM, sendo que a maioria tem padrão de herança recessiva autossômica (25).

4.3.8.3- Grave redução de IgG e IgA no soro, com níveis altos ou normais de IgM e número normal de células B.

Todas as mutações gênicas deste subgrupo são raras, ou extremamente raras. As deficiências em CD40L, CD40, AID e UNG cursam com infecções oportunistas, neutropenia e autoimunidade, ou com aumento dos gânglios linfáticos e centros germinativos. Os níveis de IgG e IgA estão diminuídos e IgM pode ou não se apresentar alterada. Com exceção da deficiência de CD40L, que é ligada ao cromossomo X, os demais são de herança autossômica recessiva (106).

4.3.8.4- Deficiências de subclasses (IgG ou IgA) ou de cadeia leve, com número normal de células B.

Deficiência isolada de uma ou mais subclasses de IgG, definida por níveis abaixo de 2 desvios-padrão em relação à média do intervalo de referência ajustado à faixa etária, com os níveis de IgG totais normais ou próximos da normalidade, é em muitos casos assintomática(89). Mais de 20% da população apresenta deficiência assintomática em uma ou mais subclasses de IgG, o que, por si só, na ausência de infecções recorrentes (tanto

bacterianas como virais) e defeito na resposta antígeno-anticorpo específica, não caracteriza doença. Estas deficiências podem estar associadas a outras imunodeficiências, congêntas ou adquiridas, e a manifestações auto-imunes (107).

Os níveis de imunoglobulinas para crianças até 2 anos são comparados com a média da faixa etária correspondente, com ponto de corte abaixo de 2 desvios-padrão. Na faixa etária de 4 a 10 anos são considerados deficiência quando: IgG1 < 2,5g/L, IgG2 < 0,5g/L, IgG3 < 0.15g/L e IgG4 < 0.01g/L. E na faixa etária acima de 10 anos: IgG1 < 3g/L, IgG2 < 0,75g/L, IgG3 < 0,25g/L e IgG4 < 0,01g/L (107). O significado clínico da deficiência de subclasses de IgG pode ser traduzida através da dosagem da resposta antígeno-anticorpo específica, de vacinas contendo antígenos polissacarídeos do pneumococo.(108)

As mutações genéticas que poderiam causar esse tipo de deficiência ainda são desconhecidas, mas em conjunto a deficiência de subclasses de IgG é relativamente comum. Quando associada à deficiência de IgA (< 0,07g/L), em geral há redução de uma ou mais subclasses, mais frequentemente IgG2, levando estes pacientes a um risco maior de infecções do trato respiratório superior e inferior do que aqueles que só apresentam deficiência de IgA (109).

Já a Deficiência Seletiva de IgA, onde há intensa redução de imunoglobulina A até a completa ausência, pode evoluir para Imunodeficiência Comum Variável, ou apresentar-se em grupos familiares que também incluem esta doença (110). Infecções recorrentes associadas com baixa resposta aos antígenos polissacarídeos típicos de microorganismos encapsulados (menigococos, pneumococos) podem ocorrer, assim como alergias e doenças

autoimunes. Todas essas deficiências são relativamente comuns, ou até muito comuns (25) (111) (112) (113).

As deleções e mutações da cadeia pesada (afetando uma ou mais subclasses de IgG e/ou IgA, assim como a IgE) e deficiência de cadeia κ são mais raras. Elas podem ser assintomáticas e são de herança autossômica recessiva (25).

4.3.8.5- Deficiência específica de anticorpos com concentrações normais de IgG e números normais de células B.

Apesar da concentração de IgG estar normal, nesta síndrome existe uma incapacidade de produzir anticorpos antígenos-específicos, ocasionando infecções recorrentes como otorrédias crônicas e infecções do trato respiratório (114)(115). Foi originalmente observada em alguns pacientes com infecções recorrentes, que tinham concentrações normais de IgG, mas não formavam anticorpos para um ou mais dos antígenos da vacina contra o pneumococo. (116)

O diagnóstico é difícil, pois a resposta de anticorpos contra pneumococos é variável, e os critérios laboratoriais de doença são extremamente específicos (117), da mesma forma que o benefício da IVIG ainda é discutível (118).

4.3.8.6- Hipogamaglobulinemia transitória da infância (HTI) com número de células B normais.

A Hipogamaglobulinemia transitória da infância pode ser definida pelos baixos níveis de IgG, com ou sem deficiência de IgA ou IgM, depois dos 6 meses de idade e tendo sido excluída outra IDP. É um aumento do tempo de Hipogamaglobulinemia fisiológica que ocorre entre 3 e 6 meses na criança, proveniente da degradação dos anticorpos maternos adquiridos via transplacentária e produção baixa de seus próprios anticorpos (119). Existem diferenças entre os sexos, tanto na maturação imunológica como na freqüência da doença (120). O atraso de maturação está relacionado a infecções recorrentes, principalmente bacterianas sinopulmonares e do trato respiratório em geral. Apesar dos níveis baixos de IgG, a maioria das crianças faz resposta vacinal durante os 6 primeiros meses de vida, mas em alguns casos, quando não ocorre esta resposta antígeno-específica, há necessidade de reforços de vacinação. Esse grupo, que apresenta infecções recorrentes, com baixos níveis de IgG e IgA, às vezes evolui para Deficiência Seletiva de IgA ou Deficiência de Subclasses de IgG. (20) (121). Outros achados laboratoriais incluem alterações nos níveis de IgE, apresentando manifestações alérgicas e níveis de subgrupos de linfócitos normais.

Antibióticoterapia preventiva está indicada nas infecções recorrentes. Se falhar ou não for bem tolerada, a IGIV é recomendada, mas deve ser administrada durante 3 a 6 meses e depois suspensa, para que haja um acompanhamento das funções humorais do paciente (22).

4.4 - IgG e suas subclasses.

A IgG é a principal classe de imunoglobulina no sangue, respondendo por cerca de 70 a 75% do total de imunoglobulinas, e constituindo o principal anticorpo nas respostas imunológicas secundárias. Ela é a única classe que atravessa a barreira placentária, conferindo passivamente imunidade ao recém-nascido. A transferência placentária é mediada por um receptor em células da placenta para a região Fc da IgG (122).

A IgG apresenta quatro subclasses distintas: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, que se distinguem por suas cadeias pesadas, similares, porém não-idênticas, com diferenças em número de pontes dissulfeto e sequência primária dos domínios C, que acarretam diferenças funcionais entre as diferentes subclasses. Os anticorpos de cada subclasse de IgG podem ativar funções biológicas diferentes, dependendo de vários parâmetros, tais como a densidade do epítipo, proporção antígeno / anticorpos, etc. As diferentes subclasses de IgG também se caracterizam por contribuições diferentes às respostas contra diferentes antígenos (123). A subclasse IgG2 é menos eficiente do que IgG1 na fixação de complemento e na ligação aos receptores Fc e liga-se menos avidamente ao Fc gama RIIA do que IgG1, em comparação com os demais isotipos de IgG (124) (125).

As subclasses se apresentam na proporção de 66% de IgG1, 23% de IgG2, 7% de IgG3 e 4% de IgG4 em adultos(126). A deficiência de IgG2 está muitas vezes associada à deficiência de IgA e especialmente a uma suscetibilidade maior a infecções virais e bacterianas, especialmente no trato respiratório. A IgG3 é a que fixa de modo mais eficiente o Complemento. A

IgG1 e a IgG2, respectivamente, fixam-se em ordem decrescente de eficiência, e a IgG4, em muitos casos, falha inteiramente em ativar o Complemento pela via clássica. A deficiência de IgG3 está associada a infecções respiratórias de repetição, especialmente pelo *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, e a infecções das vias urinárias. A IgG4 apresenta níveis séricos elevados, em pessoas atópicas. Sua deficiência também está associada a infecções do trato respiratório superior e inferior, especialmente a enfermidades bronco-pulmonares (108) (127).

Nem todas as subclasses de IgG cruzam igualmente a barreira placentária, sendo que IgG2 é um dos isotipos que não atravessa bem. As concentrações das subclasses de IgG variam com a idade. Devido à passagem transplacentária durante os últimos três meses de gravidez, os níveis de subclasses de IgG ao nascimento se aproximam dos encontrados em adultos. Devido ao catabolismo da IgG passivamente adquirida, um patamar mínimo de concentração de IgG é atingido em torno de 4 a 6 meses de idade, após o qual as concentrações começam a subir, como resultado da produção pelo lactente. Concentrações de IgG1 semelhantes aos níveis de adultos são atingidos entre de 5 e 7 anos de idade, de IgG3 em torno de 7 a 9 anos, enquanto IgG2 é o mais lento para amadurecer, atingindo níveis aproximados da fase adulta por volta dos 10 anos (128).

Do exposto sobre as diferentes formas de imunodeficiência primária em que a produção de subclasses de IgG pode estar afetada, que não se restringe a defeitos da classe principal (deficiências predominantemente de anticorpos), mas pode incluir também defeitos combinados, ou associação de vários defeitos imunológicos num mesmo paciente, ou numa mesma família, pode-se

concluir que a capacitação técnica de uma instituição de referência do ponto de vista da quantificação dessas subclasses é muito importante para o desempenho de suas funções de referência para IDP, visto que tal exame será requisitado como parte do processo diagnóstico em muitas situações distintas, e correspondendo a uma fração importante de todos os casos.

Os aspectos propriamente técnicos desta quantificação apresentam como discutidos a seguir, complexidades adicionais, que devem ser levadas em conta no estabelecimento e funcionamento do laboratório de referência, tendo em vista os aspectos de custo, especificidade, dependência de aparelhagem especializada e de pessoal experiente para a realização de tais exames.

4.5- Evolução dos padrões de proteínas plasmáticas e anticorpos anti-subclasses de IgG.

Diferentes materiais de referência para proteínas no soro/plasma, nas últimas quatro décadas, foram usados no mundo todo. Todos os padrões utilizados para quantificação de imunoglobulinas foram inicialmente produzidos apenas para Imunoglobulinas G, A e M (129), e mais tarde separadamente para IgD e IgE (130) (131). A evolução destes padrões demonstrou uma preocupação por parte de vários organismos internacionais quanto à padronização laboratorial. Os organismos em questão incluem: *o International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)*, *OMS*, *US International Institute of Standards and Technology*, *The National Institute for Biological Standards and Control (UK)*, *o Bureau International des Poids et*

Mésures, o Institute for Reference Materials Methods (IRMM), Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards e o The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM), que procuraram desenvolver padrões que se assemelhem, que possuam rastreabilidade dos seus valores nos materiais de referência, tanto nos calibradores quanto nos controles, e promovam a comutabilidade entre os métodos de ensaio a que se destinam e as amostras de pacientes (132). Para isso, precisam atender a três critérios básicos. O primeiro se refere à alta qualidade deste padrão, seja na sua preparação quanto na sua viabilização, que preserve o mais possível as características naturais de seus componentes e transfiram os seus valores para o material de referência com um método de alta precisão e acurácia. É também importante que os valores sejam atribuídos à maioria dos fabricantes de reagentes, insumos e equipamentos laboratoriais que utilizem estes componentes para quantificar (133). Isto nos leva ao segundo critério, que é a acurácia da transferência destes valores de um material de referência (MR) internacional para padrões ouro de MR produzidos pelos fabricantes de insumos laboratoriais. Deverão utilizar protocolos semelhantes de transferência de valores para assegurar uma boa precisão, ausência de viés e os materiais deverão se comportar como amostras de pacientes, tanto nos níveis normais quanto nos níveis alterados, nos diferentes métodos de ensaio. O terceiro critério corresponde às boas práticas laboratoriais, que asseguram acurácia nas amostras dos pacientes (134).

Diferentes materiais de referência para proteínas no soro/plasma, nas últimas quatro décadas, foram usados no mundo todo. No final da década de 60, com a introdução da Referência Internacional de Preparação, para

imunoglobulinas IgG, IgA e IgM no soro, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), foi elaborado o material de referência WHO 67/97 (135) (136). Sua avaliação, como padrão para subclasses de IgG, foi realizada por Klein em 1985 (137) e ratificada pela OMS em 1987 (138). Desde então, vários centros laboratoriais e produtos manufaturados da indústria diagnóstica adotaram este material como padrão (7), e vários materiais de referência internacional, como padrão protéico, especificamente para subclasses IgG, foram elaborados (9).

O primeiro padrão internacional de proteínas plasmáticas, incluindo as imunoglobulinas, foi um conjunto de soros de adultos saudáveis da Inglaterra, em 1968 (135). Parte deste conjunto, o lote 67/86, foi guardado para ser posteriormente submetido a uma avaliação por 10 laboratórios especializados para atribuição de valores de massa (139). Outros lotes, como, 67/95, 67/96, 67/97, 67/99 foram distribuídos para diversos centros de padronização. Os lotes 67/96 e 67/97 ficaram à disposição para distribuição internacional, no *WHO International Reference Centre for Immunoglobulins*, em Lausanne. Na década de 70, outros tantos trabalhos foram elaborados pela OMS e vários organismos internacionais (139) (140) (141) (142). Mas a primeira intervenção significativa foi feita pela IFCC, que demonstrou uma grande mudança de como as proteínas do soro seriam medidas. A introdução de ensaios de Nefelometria e Turbidimetria foi feita com a preparação IFCC 74/1, material de referência estéril, sem turvação, líquido, apropriado para todas as técnicas (inclusive Imunodifusão radial). Este material foi coletado de acordo com protocolos rígidos, para minimizar contato com tecidos, interferência pelo fibrinogênio e desnaturação por liofilização (143).

Ao longo dos anos 90, tanto na Europa (144) quanto nos EUA (145), foram criados grupos de trabalho para a elaboração de um padrão único, que atendesse a todas as exigências de uma padronização, reduzindo as variações interlaboratoriais. Isto culminou em um grande consenso internacional, gerando um manual de conduta de padronização de 14 proteínas plasmáticas, incluindo as Imunoglobulinas (146).

A evolução dos anticorpos anti-subclasse de IgG foi demonstrada em vários estudos colaborativos entre a OMS e IUIS (*International Union of Immunological Societies*) (147) (148). Estes trabalhos se preocuparam com o desempenho e a antigenicidade destes reagentes e sua viabilização para os insumos manufacturados laboratoriais (149).

4.6- Metodologias de quantificação das imunoglobulinas

4.6.1- Nefelometria.

A Nefelometria é um método ótico de medição, utilizado para a determinação imunoquímica de proteínas no soro, urina e outros fluidos corporais, baseada na mensuração da dispersão luminosa em uma suspensão, contendo, por exemplo, complexos antígenos-anticorpos (ag-ac) (150) (151). A dispersão luminosa medida é proporcional à quantidade de complexos ag-ac, e numa concentração constante de anticorpos, a medida é proporcional à concentração de antígeno. Através de uma curva de referência, construída a partir de um padrão, com concentrações de antígenos conhecidos, podem-se quantificar amostras desconhecidas, através da luz dispersa por elas e o sinal

da luz captado pode ser correlacionado com as concentrações conhecidas da curva.

O feixe de luz é gerado, através de um diodo de laser, nos nefelômetros mais modernos, com comprimento de onda de 840 nm, e é enviado através de uma cubeta de reação, sendo a luz dispersa pelos complexos ag-ac, formados nesta cubeta. O sinal de luz dispersa é amplificado pela utilização de anticorpos aderidos a partículas de látex. Isto torna possível uma mensuração mais sensível de proteínas pouco concentradas. A distribuição da intensidade de luz dispersa depende da relação entre a dimensão das partículas dos complexos ag-ac e o comprimento de onda. Se o diâmetro da partícula for pequeno em comparação com o comprimento de onda, ocorre a dispersão Rayleigh, ou seja, a luz é dispersa simetricamente para todas as direções, o que reduz a eficiência da medição da luz. Por outro lado, se o diâmetro da partícula for maior que o comprimento de onda usado ocorre a dispersão Mie, onde a luz é dispersa para a frente e sua medição tem maior eficiência. Com a utilização de anticorpos aderidos a partículas de látex, o diâmetro das partículas é maior que 1000nm e como o comprimento utilizado é de 840nm ocorre a dispersão do tipo Mie (152) (153).

O tempo médio de processamento das amostras para dosagem de subclasses de IgG, utilizando esta metodologia é de 15 minutos. Amostras de soro e de plasma utilizadas na reação variam de 10 μ L a 50 μ L de volume. Mas o volume mínimo de soro em microtubo é de 150 μ L. O carrossel de amostras aceita tanto tubos primários de sangue, quanto microtubos de polietileno. As amostras são previamente diluídas, automaticamente no equipamento, com solução de diluição. No caso de IgG1 a diluição é 1:100 e no caso de IgG2

1:20. Para IgG3 e IgG4 1:2000. Quando os resultados estão fora do intervalo de medição, estas são repetidas com uma diluição da amostra mais alta ou mais baixa. Os controles e o padrão protéico já vêm prontos para uso, em solução. Para cada subclasse de IgG deve-se fazer uma curva de referência, que precisa de 5 pontos de diluição para sua construção. E a cada mudança de lote de reagente é necessário a elaboração de nova curva de referência. Tanto as diluições quanto os cálculos para curva de referência são feitos automaticamente através do programa informatizado do equipamento, bem como o cálculo a partir da curva, para o resultado das amostras dos pacientes (154).

Os reagentes das subclasses IgG1 e IgG2 vem no volume de 1,5 ml por frasco, o que daria aproximadamente 30 testes cada. São compostos por soros policlonais de carneiro purificados, líquidos e prontos para uso. Já os reagentes para IgG3 e IgG4 vem no volume de 2,0ml por frasco, que daria aproximadamente 40 testes cada. São suspensões de partículas de polistireno ("látex") revestidas com anticorpos específicos para IgG3 e IgG4, em frascos separados, provenientes também de soros policlonais de carneiro. Estes testes também são utilizados para a elaboração da curva de referência, assim como todas as diluições necessárias para a liberação dos resultados dos pacientes (155)

Atualmente todos os equipamentos de Nefelometria são automatizados e possuem um analisador e um programa informatizado, onde todos os processos são realizados com base nos comandos de um usuário técnico treinado (156).

4.6.2- Turbidimetria.

A Turbidimetria está baseada no princípio de medição da intensidade de luz transmitida (156) (157). A determinação da concentração de antígeno solúvel pelo método turbidimétrico envolve a reação com anti-soro específico para formar complexo antígeno- anticorpos insolúveis.

Quando a luz passa através da suspensão formada, uma parte da luz é transmitida e é focada em um fotodiodo por um sistema de lentes ópticas. A quantidade de luz transmitida é diretamente proporcional à concentração de proteínas específicas na amostra do teste. As concentrações são automaticamente calculadas por referência a uma curva padrão, armazenada dentro da memória do programa informatizado, no computador do equipamento. Algumas reações antígeno-anticorpo não formam grandes imuno-complexos, suscetíveis a detecção turbidimétrica. Neste caso, se o anticorpo é depositado sobre partículas de látex de tamanho apropriado, a capacidade de dispersão da luz, pelos complexos imunes formados com o antígeno aumenta o suficiente para permitir a detecção por Turbidimetria.

As amostras para a quantificação de subclasses de IgG em geral são de soro, utilizados diretamente de tubos primários ou pipetados em tubos menores, com no mínimo de 150µL de volume. O volume utilizado por teste varia de 10µL a 50µL de soro e a reação de cada teste dura em média 15 minutos. Os anti-soros IgG1 e IgG2 são policlonais de soro de carneiro purificados, mono específicos e prontos para uso, em volume de 4,5 ml por frasco. Enquanto que os anti-soros de IgG3 e IgG4 , policlonais de carneiro purificados, mas estão revestindo partículas de látex em suspensão prontas

para uso, no volume de 6,7 ml por frasco. Reagente para IgG total também acompanha os insumos. Padrão (calibrador) e controles vêm em solução pronta para uso. As curvas de referência são elaboradas automaticamente com 6 pontos de diluição para cada uma das subclasses e devem ser refeitas sempre que um novo lote de reagente for trocado. A leitura se faz com aparelhos de espectrofotometria automatizados, em comprimentos de onda entre 340nm e 600nm, com programas informatizados, possibilitando que os procedimentos por um operador técnico treinado sejam realizados (158).

4.6.3- Imunodifusão radial.

É uma técnica quantitativa utilizando a reação de precipitação em gel para quantificar complexos antígeno-anticorpo. Trata-se de método largamente utilizado para quantificar imunoglobulinas e proteínas do soro em geral, baseado numa variação da técnica de imunodifusão simples (159), sendo que um anticorpo é incorporado ao gel de agarose (Ágar-ágar) e espalhado em uma placa ou lâmina de vidro. Poços, em forma de pequenos orifícios, são feitos no Ágar gel. O material a ser testado é colocado em um orifício e amostras de antígeno que servem como padrões são colocados em outros. A placa de Ágar é incubada em câmara úmida durante a difusão do antígeno (48 a 72 horas). Há a formação de halos de precipitina (complexos antígenos-anticorpos) em volta dos orifícios. Os diâmetros dos halos aumentam com o tempo, pois o antígeno se difunde no meio, reage com o anticorpo e formam os complexos insolúveis de precipitação na região de equivalência, a qual representa uma fronteira móvel à medida que o antígeno se difunde. Portanto a

área (ou o diâmetro) do halo de precipitação formado na presença de uma dada concentração de anticorpo pode ser medida nas condições em que o equilíbrio foi atingido, e é diretamente proporcional à concentração do antígeno. Uma curva padrão pode ser graficamente desenhada medindo os diâmetros (ou áreas) dos halos correspondentes a várias concentrações iniciais conhecidas de antígeno. Existe uma relação linear entre o quadrado do diâmetro do halo e a concentração do antígeno. Curvas-padrão em que a abscissa representa as concentrações dos padrões e a ordenada o diâmetro do halo de precipitina permitem que a concentração de antígeno de uma amostra desconhecida seja determinada graficamente (160). Existem placas comerciais prontas para uso, mas o procedimento técnico continua demorado (de 24h a 72 horas) e é essencialmente manual. A leitura dos halos, mesmo utilizando régua de leitura, é essencialmente visual.

No caso de dosagens de subclasses de IgG as placas são individuais para cada uma das subclasses, podendo ser adquiridas separadamente. Cada placa possui 24 orifícios. Controle e Padrão estão liofilizados e são reconstituídos em solução tampão. As amostras de soro devem ser diluídas previamente, de forma manual, em solução tampão e pipetadas nos orifícios das placas de agarose. Para IgG1 e IgG2 na diluição de 1:20 e IgG3 e IgG 4 na diluição de 1:4. O padrão também deve ser diluído para a elaboração da curva de referência, em quatro pontos, nas concentrações de 100%, 70%, 40% e 10% do calibrador em solução tampão. Estas concentrações são pipetadas, cada uma em um orifício da placa de agarose. O controle deve ser pipetado puro e estar dentro da faixa esperada na leitura. Tanto as amostras, padrões e controle devem ser pipetados com micropipeta no volume de 5 μ L. As placas de

gel de agarose devem ser fechadas e incubadas a temperatura ambiente (18°C à 25°C), na posição horizontal, de 64 a 72 horas. As leituras do diâmetro dos halos formados devem ser em milímetros e comparados ao gráfico da curva de referência. Placas utilizadas parcialmente estarão viáveis em até duas semanas se bem acondicionadas (sacos de embalagem fechados a temperatura de 2°C à 8°C) e suas curvas de referências validas (161).

4.6.4- Imunoenzimático.

Os métodos imunoenzimáticos (ELISA- *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*, por exemplo) são baseados na utilização de anticorpos marcados com enzimas para detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico. Na sua versão mais simples, utilizam-se microplacas de Poliestireno, com 96 poços de 100 µL de volume cada um, contendo antígenos absorvidos, que são reconhecidos pelos anticorpos cuja presença se quer detectar. A amostra de soro de um paciente, onde estão os anticorpos de interesse, é incubada em várias diluições, nos poços da microplaca, por períodos de no máximo algumas horas. Em seguida, a microplaca é lavada para a retirada dos anticorpos não ligados, seguindo-se a incubação com anticorpos secundários, conjugados com enzimas, os quais são específicos para as classes ou subclasses de Ig de interesse. Após nova lavagem, faz-se a incubação com o substrato da enzima utilizada, gerando o produto a ser quantificado por método colorimétrico. Coloca-se uma solução de parada para estancar a reação, e em seguida a microplaca é lida em leitor de microplaca, no comprimento de onda apropriado, que depende da combinação

conjugado/substrato utilizada. Os resultados lidos permitem estruturar a curva padrão, contra a qual as amostras desconhecidas serão avaliadas, desde que os controles com valores conhecidos e padrões façam parte do teste (162).

Para a quantificação de Subclasses de IgG este tipo de imunoenensaio ainda é semi- automatizado. Em geral precisam-se utilizar duas microplacas revestidas com anticorpo humano, por ensaio, mesmo tendo poucas amostras, inviabilizando os outros poços da placa, pois todas as amostras, controles e curva padrão devem ser realizados no mesmo ensaio. As amostras de soro devem ser previamente diluídas, em geral, em uma diluição 1:2500. Mas as bulas sugerem também que o próprio técnico deve encontrar o ponto ótimo de diluição. Para elaboração da curva padrão, o padrão deve ser reconstituído em solução tampão, pois vem liofilizado e posteriormente diluído para gerar 6 pontos para a construção da curva (padrão puro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). O controle também vem liofilizado e é reconstituído em solução tampão. Tanto as amostras e padrão diluídos, controle e os monoclonais específicos para cada subclasse são pipetados manualmente no volume de 50 μ L, nos poços das microplacas. Este sistema é uma ELISA tipo sanduíche, pois utiliza dois anticorpos entre o anticorpo alvo para detecção. A placa de microtitulação revestida captura os reagentes monoclonais, que são específicos para cada subclasse de IgG humana. Os anticorpos monoclonais, por sua vez capturam a subclasse IgG humana, para os quais são específicos, presentes na amostra de soro. O capturado é então marcado por uma peroxidase anti-IgG humana (conjugado). O sinal de detecção é então gerado em proporção à quantidade de anticorpos da subclasse humana presente na amostra de soro. Existem dois períodos de incubação de 30 minutos cada: um para incubar os monoclonais,

amostras, padrão e controles e posteriormente para incubar a peroxidase conjugada. São quatro lavagens com solução tampão entre as incubações. A incubação com o substrato colorimétrico, que se revelará com a ação da peroxidase é de 10 minutos. Todas as incubações são a temperatura ambiente. A leitura deste sinal colorimétrico é realizada em leitores de microplacas no comprimento de onda de 414nm ou 405nm, após a colocação de solução de parada e realizada em no máximo 1 hora e é proporcional a quantidade de subclasses de IgG presente no soro da amostra (163).

5- METODOLOGIA

5.1- Estudo de Revisão Sistemática conduzido de outubro 2010 a agosto de 2011.

Realizou-se levantamento de artigos científicos nas bases de dados eletrônicas: Pubmed, MEDLINE-Bireme, EMBASE - BIOMEDICAL ANSWERS, *Cochrane Library*, SciELO E LILACS e também Banco de Tese da CAPES, acessado através do Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), como a Biblioteca Digital da Universidade de São Paulo (USP) e o Portal de Teses e Dissertações em Saúde Pública da Biblioteca Virtual em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Na base Pubmed a busca foi referente aos anos de 1980 a 2011. O início do período foi escolhido pelo advento de novos padrões de referência para as metodologias. Cada busca foi salva em formato PDF, conservando o registro da data da pesquisa. A estratégia de busca baseou-se nos termos: *“Immunoglobulin G” AND “Reference Values” AND “igg subclass”, “Nephelometric” OR “Immunonephelometric”, “Immunodiffusion” AND “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”*. Nem todos os descritores estavam contemplados na base de descritores do Pubmed (*Mesh database – Medical subject Heading*). Por estas razões, as buscas foram realizadas primeiramente utilizando o Mesh e em seguida utilizando descritores escolhidos com base na literatura científica. Utilizamos na base Pubmed os limites da pesquisa em seres humanos; sendo algumas buscas limitadas em crianças. Os critérios de inclusão foram: artigos que fizessem referência a valores de referência de

dosagem de subclasse de imunoglobulina em crianças e publicados nos idiomas espanhol, inglês, francês, alemão e português.

5.2-Seleção dos Estudos.

5.2.1- Avaliação dos resumos e critérios de inclusão e exclusão.

Os documentos identificados tiveram seus títulos e resumos avaliados por dois revisores independentemente, aplicando os critérios de inclusão e exclusão. A seleção final foi realizada em reunião de consolidação da seleção dos pesquisadores.

5.2.2- Os critérios de inclusão e exclusão.

Critérios de inclusão: estudos que avaliem as quantidades das subclasses de IgG em indivíduos saudáveis, de seis meses a 18 anos, utilizando qualquer metodologia para quantificação de subclasses de IgG, com qualquer tipo de desenho de estudo e que permitam definir as faixas de valores de referência para as populações estudadas.

Critérios de exclusão: Quaisquer artigos recuperados nas buscas que não se enquadram na definição acima.

5.3- Coleta de Dados.

A coleta de dados dos estudos foi realizada por dois investigadores, em arquivo eletrônico, e quando houve discordância nas informações coletadas,

um terceiro revisor foi consultado. Os componentes principais que foram coletados são informações sobre os estudos, compreendendo suas referências, características do estudo, tais como, método, participantes (tamanho da amostra, idade, etc.), intervenção, desfechos e resultados e informações dos revisores.

A análise integral dos artigos excluiu os artigos que não possuíam dados capazes de serem extraídos.

Foi elaborada uma planilha de extração para a análise dos valores de referência das subclasses de imunoglobulina com os seguintes itens: PMID do artigo, Identificação da técnica usada, marca do fabricante dos insumos e reagentes, país de origem do estudo, tamanho e perfil da população da faixa etária (agrupada por meses até 12 meses de vida, e por ano até 15 anos), tipo de amostra biológica (sangue, soro) Em relação à amostra, registramos tempo e temperatura de estocagem da amostra. As informações sobre os valores registrados eram média geométrica, média aritmética e intervalo de referência (limite mínimo, limite máximo).

6- RESULTADOS

6.1 Busca, identificação, recuperação e análise da literatura científica internacional, sobre a quantificação de Subclasses de IgG por vários métodos laboratoriais.

Nas seções que se seguem, serão descritas, de forma sistemática, a realização e os resultados de busca realizada em diferentes bases de dados informatizadas. A busca foi inicialmente direcionada para os métodos laboratoriais, identificadas anteriormente, mas complementada por busca não direcionada por método laboratorial. Neste processo foi dada prioridade à base de busca PubMed, visto que esta cobre a vasta maioria das publicações científicas na área de Medicina, em muitos idiomas, e por um período muito amplo. Contudo, foram feitas também buscas em outras bases de dados mais restritos, as quais são descritas subseqüentemente, como complemento das informações obtidas na PubMed.

6.1.1. Nefelometria e Turbidimetria.

6.1.1.1- Busca inicial.

A busca foi inicialmente realizada com os termos "*Human IgG subclasses AND nephelometric or immunonephelometric AND Reference Values*", identificando 17 artigos (anexo 1). Quatorze destes foram eliminados, por estarem relacionados com dosagens de outras proteínas (Figura 2), sendo os outros três selecionados para análise integral (Figura 2). A busca foi limitada pelos seguintes itens: **Idioma:** Inglês, Francês, Espanhol, Alemão e Português. **Faixa Etária:** Todas as crianças – 0 – 18 anos (*All Child: 0-18 years*), **Período**

de publicação: entre 01 de janeiro de 1980 a 29 de abril de 2011 (data da realização da busca).

6.1.1.2- Novos ciclos de busca.

A segunda busca teve seus descritores selecionados pelo Mesh (mnemônico para *Medical Subject Headings*), recurso pelo qual a base de dados informatizada Pubmed dispõe para selecionar seus descritores: com ("*Immunoglobulin G*"[Mesh]) AND "*Reference Values*"[Mesh]) AND "*Nephelometry and Turbidimetry*"[Mesh]) foram encontrados 38 artigos. Essa busca foi refeita com os mesmos descritores, sem estar ligada a plataforma do Mesh, que ampliou o resultado para 46 artigos localizados, nos quais estava incluída a totalidade dos artigos já identificados na plataforma do Mesh. Após a aplicação dos limites especificados no item 6.1.1.1, restaram 19 artigos (anexo 2). Estes foram analisados pelo título e resumos, o que permitiu excluir mais 15 artigos, como se segue: 1 artigo de revisão, 3 artigos sobre dosagens de subclasses de Ig, em outros contextos não-relacionados com IDP, 10 sobre dosagens de Ig sem identificação de subclasses, 1 sobre dosagem de Ig em líquido cefalorraquidiano, e portanto não-relacionado com as dosagens plasmáticas em IDP. Restaram 4 artigos selecionados para análise integral (Figura 2).

6.1.1.3- Busca ampliada.

Com o objetivo de realizar uma busca mais abrangente, para excluirmos a possibilidade de que artigos relevantes tivessem escapado às buscas anteriores, uma terceira busca foi realizada, somente com os descritores

“*Immunoglobulin G*” [Mesh] AND “*Reference Values*” [Mesh], que localizou 1220 artigos. Destes, com a aplicação dos limites mencionados, foi possível selecionar 283 (Anexo 3); ao liberar do Mesh da seleção, foram localizados 361 artigos (Anexo 4), dos quais 354 foram eliminados porque não se referiam a quantificação de subclasses de IgG, ou porque se referiam a dosagens realizadas em contexto não relevante para IDP e 1 porque utilizava a metodologia de imunodifusão, motivo pelo qual foi transferido para a análise pertinente. Dois outros artigos não possuíam resumos que pudessem ser analisados e os textos integrais não estavam acessíveis (Figura 2). Como resultado, foi possível selecionar para análise integral apenas sete artigos (Figura 2). A busca foi limitada pelos seguintes itens: **Idioma:** Inglês, Francês, Espanhol, Alemão e Português. **Faixa Etária:** Todas as crianças – 0 – 18 anos (*All Child: 0-18 years*), **Período de publicação:** entre janeiro de 1980 a maio de 2011 (data da realização da busca).

6.1.1.4-Consolidação da busca com a Metodologia de Nefelometria e Turbidimetria.

Após a remoção das sobreposições entre resultados das várias rodadas de busca, cinco artigos foram selecionados para análise integral contendo dados extraíveis. (Figura 2). A Tabela 1 lista esses 5 artigos, detalhando o local onde cada um foi conduzido, o ano de publicação, a faixa etária estudada e o tamanho amostral. Com base na análise integral dos 6 artigos selecionados para a análise integral, um trabalho (“*Determination of IgG subclasses: a need for standardization*”) (10) foi excluído, por não analisar uma população saudável de crianças. Os 5 artigos apresentados na Tabela 1 possuíam dados

adequados para análise e todos eram da metodologia de Nefelometria e nenhum de Turbidimetria.

Figura 2

Fluxograma da busca relativa à Nefelometria e Turbidimetria.

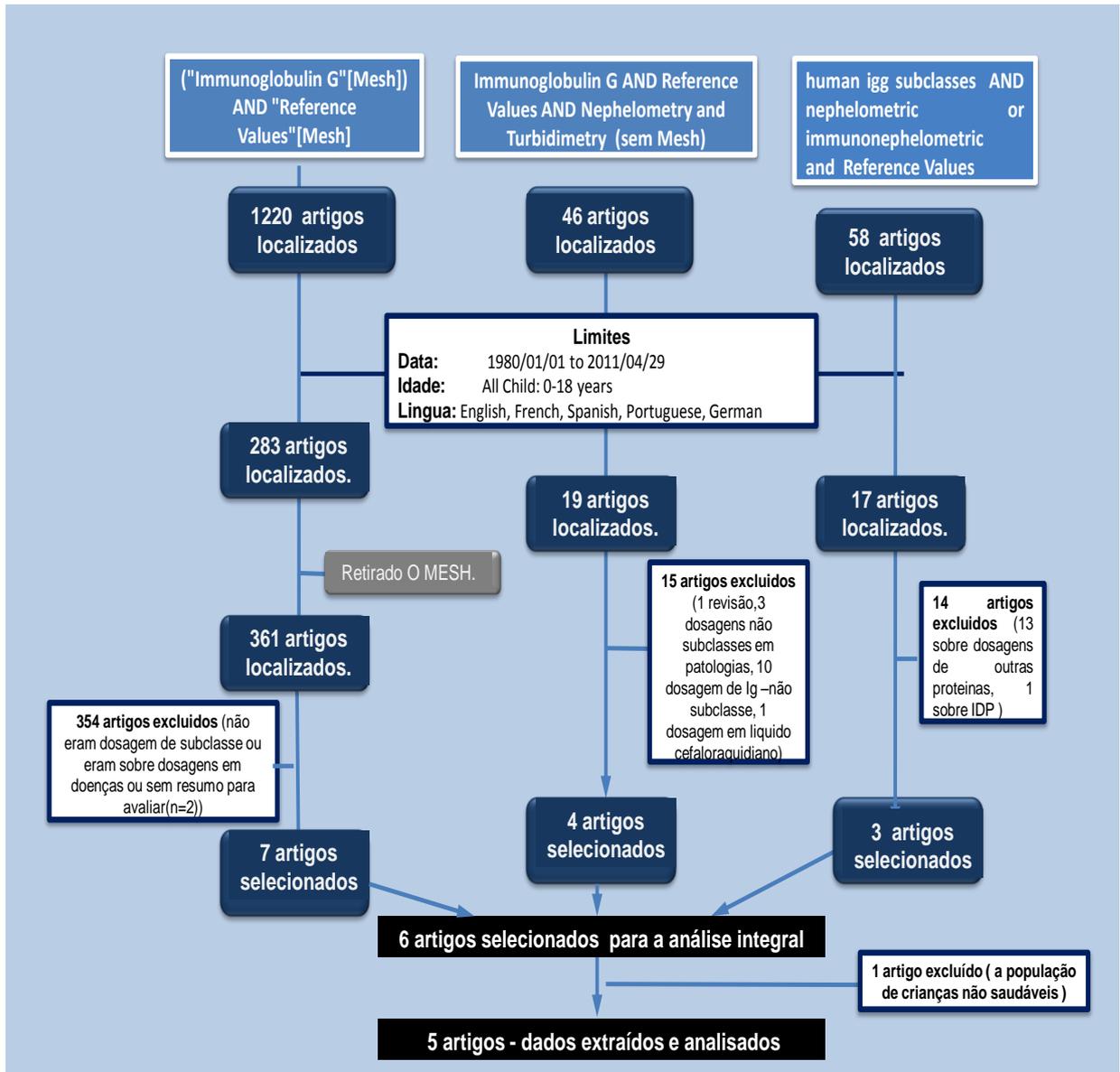


Tabela 1

Referências utilizadas para extração de dados: Nefelometria

PMID	TÍTULO	ANO	Autores	PAÍS	Tamanho amostral	Faixa etária
20153742	Pediatric reference intervals for immunoglobulin G and its subclasses with Siemens immunonephelometric assays.(4)	2010	Lepage e col ⁽⁴⁾	Canadá	417	1M a 18A
16562781	Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric technique.(5)	2005	Aksu e col ⁽⁵⁾	Turquia	545	1D a 16 A
14578325	IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents.	2003	Schauer e col ⁽⁹⁾	Alemanha	312	6M a 18A
7840433	Nephelometric measurements of human IgG subclasses and their reference ranges.	1994	Vlug e col ⁽¹⁶⁴⁾	Holanda	325	0M a 18A
7632032	Evaluation of human IgG subclass assays on Beckman array.	1995	Pressac e col ⁽¹⁶⁵⁾	França	85	10M a 15A

D=dias, M=meses, A= anos , PMID: numero identificador na plataforma PUBMED (*Pubmed identification*)

6.1.2. ELISA ("*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*")

6.1.2.1- Busca inicial.

A primeira busca realizada para a metodologia de ELISA foi baseada nos descritores ("*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*" [Mesh]) AND "*Reference Values*"[Mesh]) AND "*Immunoglobulin G*"[Mesh], sendo aplicados os limites definidos acima, o que permitiu localizar 75 artigos (anexo 5). Quando a mesma busca foi realizada sem ter sido feita seleção pelo Mesh, o resultado incluiu 111 artigos (anexo 6). Destes, foram eliminados 103 artigos, como se segue: 55 artigos eram estudos em adultos, 1 era conduzido em modelo animal, 47 descreviam dosagens de Ig total e/ou subclasses em patologias diversas, sem relação com IDP, ou ainda eram estudos de níveis de anticorpos pós-vacinação. No final do processo, 8 artigos selecionados para análise integral (Figura 3).

6.1.2.2- Novos ciclos de busca.

Uma segunda busca utilizou os descritores "*Human IgG subclasses AND ELISA AND Reference Values*", sem o Mesh. Foram localizados 31 artigos; com a aplicação dos limites previamente estabelecidos, este número se reduziu para 17 artigos (Anexo 7) que foram analisados pelo título e resumo restando 6 artigos selecionados para a análise integral (Figura 3).

6.1.2.3- Busca ampliada.

Uma terceira busca foi realizada com o objetivo de eliminar a possibilidade de que artigos relevantes tivessem escapado às buscas acima. Com essa finalidade, utilizou-se somente os descritores “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay or ELISA AND Human IgG subclasses*” e, com a aplicação dos limites previamente selecionados foram localizados 238 artigos (Anexos 8 e 9). A análise dos títulos e resumos resultou na eliminação de 230 artigos, por serem estudos com dosagens de Imunoglobulinas em várias patologias não relacionadas com IDP. Foi possível, no final, selecionar para análise integral 8 artigos (Figura 8).

6.1.2.4- Consolidação da busca para a Metodologia de ELISA.

Após a remoção das sobreposições entre os três ciclos de busca, 10 artigos foram selecionados para análise integral (Figura 3). Esta análise permitiu excluir mais 4 artigos como se segue: em três artigos não foram publicados os dados numéricos de forma que pudessem ser extraídos, só sendo apresentados os dados em gráficos e 1 artigo estudava anticorpos anti-tetânicos. Sobraram 6 que podiam ser analisados com obtenção de dados extraíveis. A Tabela 2 lista esses 6 artigos, detalhando o local onde foi conduzido cada estudo, o ano da publicação, a faixa etária estudada e o tamanho amostral.

Figura 3

Fluxograma da busca relativa à ELISA

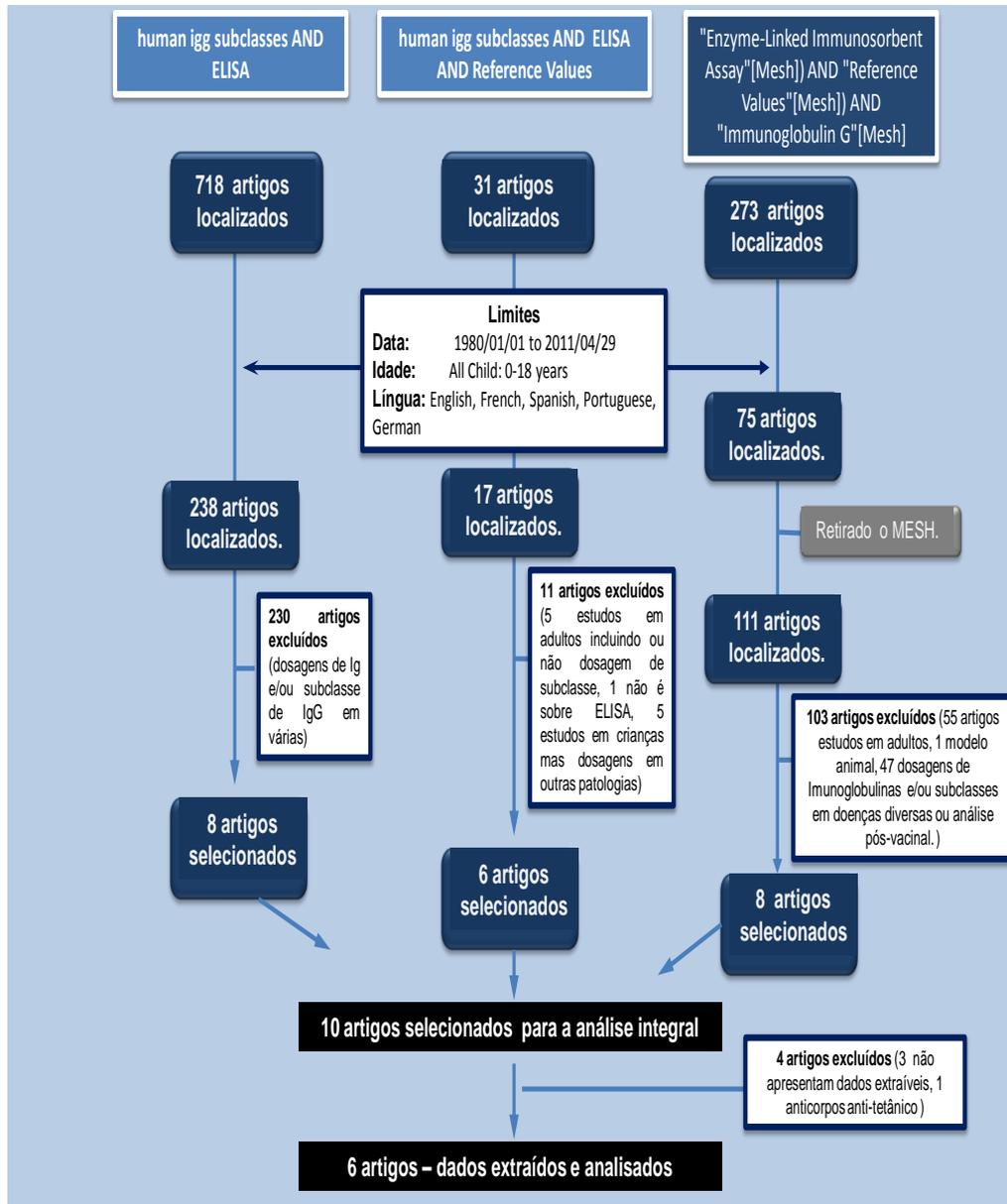


Tabela 2

Referências utilizadas para extração de dados: ELISA

PMID	TITULO	ANO	Autores	PAÍS	tamanho amostral	faixa etária
8572895	Development of IgG subclasses in healthy Polish children.	1994	Gregorek e col ⁽¹⁶⁶⁾	Polônia	152	4M a16 A
8503267	Normal levels of IgG subclass in childhood determined by a sensitive ELISA.	1993	Hayashibara e col ⁽¹⁶⁷⁾	Japão	308	7M a 14A
8250433	The determination of IgG subclasses in healthy children by ELISA with monoclonal antibodies].	1993	Quiles Durá e col ⁽¹⁶⁸⁾	Espanha	164	1A a 14A
8067664	The determination of IgG subclass concentrations in serum by enzyme-linked immunosorbent assay: establishment of age-related reference ranges for cord blood samples, children aged 5-13 years and adults.	1994	Miles e col ⁽⁷⁾	Alemanha	180	5A a 13A
7695068	Methodologic problems in establishing normal values for IgG subclass concentrations in a pediatric population; comparison of radial immunodiffusion and ELISA methods.	1994	Pressler e col ⁽¹²⁾	Dinamarca	227	6M a 14A
2398907	[IgG subclass level in healthy children].	1990	Zielen e col ⁽¹⁶⁹⁾	Alemanha	159	3M to 16A

D=dias, M=meses, A= anos , PMID: numero identificador na plataforma PUBMED (Pubmed identification)

6.1.3. Imunodifusão radial

6.1.3.1- Busca inicial.

A primeira busca realizada utilizou os descritores “(“*Immunoglobulin G* [Mesh]) AND “*Immunodiffusion* [Mesh]”) AND “*Reference Values* [Mesh])”, permitindo localizar 45 artigos. Após a aplicação dos limites definidos acima, foram selecionados 8 artigos (Anexo 10). Quatro destes foram eliminados por não dosarem subclasses de imunoglobulina, e os 4 restantes foram selecionados para análise integral (Figura 4).

6.1.3.2- Novos ciclos de busca.

A segunda busca foi realizada a partir dos descritores “*Immunoglobulin G* AND *Immunodiffusion* AND *Reference Values*”, e permitiu localizar 85 artigos, dos quais, com a aplicação dos limites definidos acima, foram selecionados 20 (Anexo 11). Onze destes foram eliminados na análise subsequente por não dosarem subclasses de imunoglobulina ou por tratarem de dosagens em patologias diversas, não relacionadas com IDP; 1 artigo não possuía resumo nem estava acessível; os 9 restantes foram selecionados para análise integral (Figura 4).

Uma terceira busca foi realizada com os descritores “*Human IgG subclasses*” AND “*radial Immunodiffusion*” AND “*Reference Values*”, resultando num total de 11 artigos localizados. Após a aplicação dos limites definidos acima, foram selecionados 8 artigos (Anexo 12). Um destes foi eliminado por não dosar subclasses de imunoglobulina e 7 foram selecionados para análise integral (Figura 4).

Uma quarta busca foi realizada com os descritores “*human igg subclasses AND radial Immunodiffusion*”, permitindo identificar 70 artigos. Com a aplicação dos limites definidos acima, foram selecionados 31 artigos (Anexo 13). Vinte e três destes foram excluídos por dosarem imunoglobulinas ou subclasses em doenças não relacionadas com IDP ou por não dosarem subclasses de IgG; 8 foram selecionados para análise integral (Figura 4).

6.1.3.3- Consolidação da busca com a Metodologia de Imunodifusão Radial.

Após a remoção das sobreposições, 11 artigos foram selecionados para análise integral (Figura 4). Após a análise integral, 4 artigos foram excluídos por não conterem dados que pudessem ser extraídos; não tivemos acesso ao texto integral de um artigo e os 7 artigos restantes foram selecionados para extração e análise. A Tabela 3 lista esses artigos, detalhando o local e o ano do estudo, a faixa etária estudada e o tamanho amostral. Um artigo que já constava na Tabela 2, da metodologia de ELISA, foi selecionado também nestas buscas para Imunodifusão Radial, pois tinha dados extraíveis para as duas metodologias (12).

Figura 4

Fluxograma da busca relativa à Imunodifusão radial

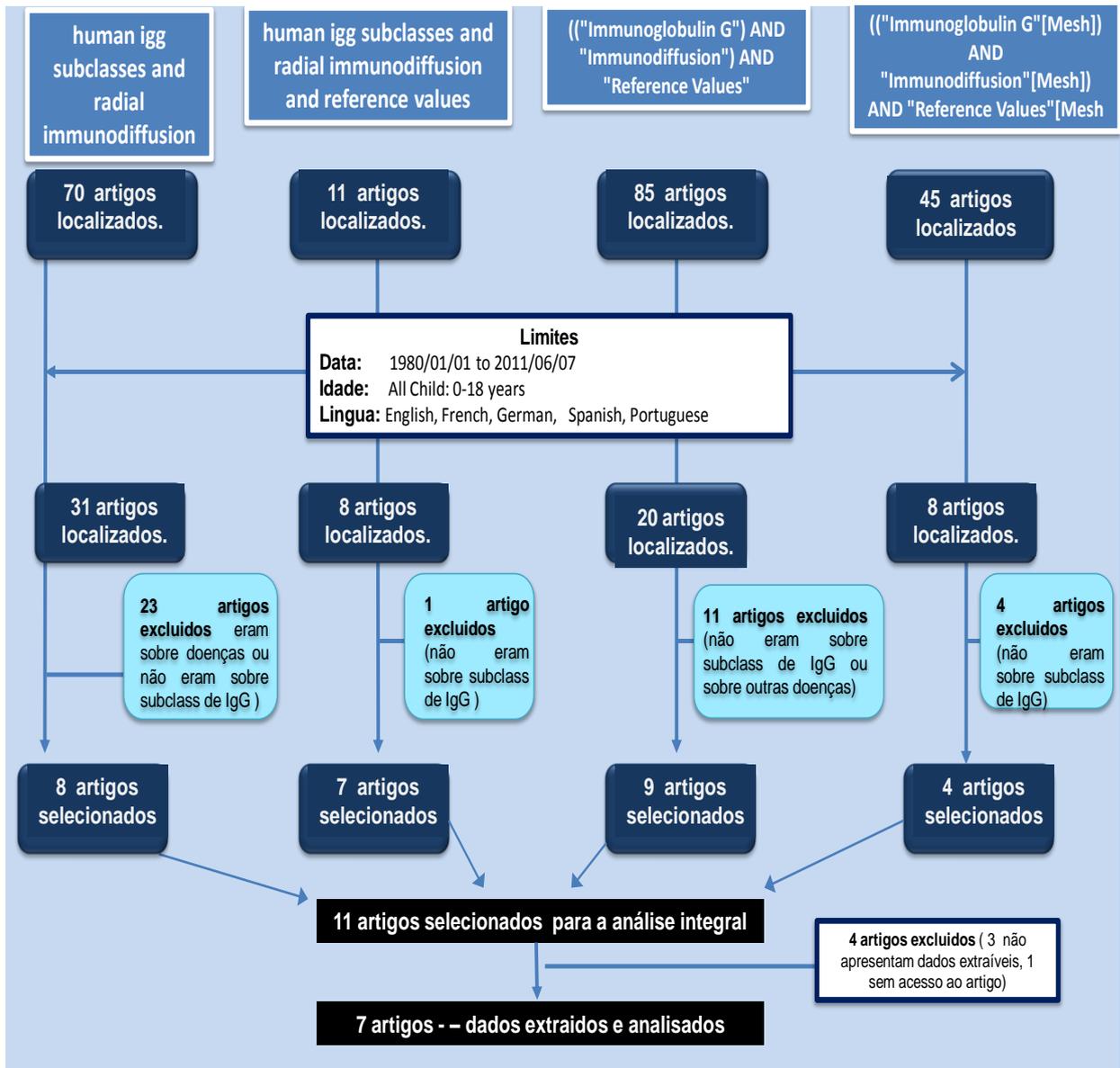


Tabela 3

Referências utilizadas para extração de dados: Imunodifusão

PMID	TÍTULO	ANO	Autores	PAÍS	tamanho amostral	faixa etária
9681129	Serum IgG subclass levels in a group of healthy Thai children.	1998	Ngamphaiboon e col ⁽¹⁷⁰⁾	Tailândia	195	0 a 15A
9084997	Serum immunoglobulin G subclasses in healthy infants and children in Greece.	1997	Liatsis e col ⁽¹⁷¹⁾	Grécia	414	1M a 14A
7695068	Methodologic problems in establishing normal values for IgG subclass concentrations in a pediatric population; comparison of radial immunodiffusion and ELISA methods.	1994	Pressler e col ⁽¹²⁾	Dinamarca	227	0 a 15A
6771908	Serum levels of immunoglobulin G subclasses in Nigerians.	1980	Apampa e col ⁽¹⁷²⁾	Nigéria	128	6A a 42A
2515060	Serum IgG subclass concentrations in healthy subjects at different age: age normal percentile charts.	1989	Plebani e col ⁽⁸⁾	Itália	448	6M a 18A
2398907	[IgG subclass level in healthy children].	1990	Zielen e col ⁽¹⁶⁹⁾	Alemanha	159	3M a 16A
7974810	Serum immunoglobulin G subclass values in healthy Turkish children and adults.	1994	Berkel e col ⁽¹⁷³⁾	Turquia	329	1D a 16A

D=dias, M=meses, A= anos , PMID: numero identificador na plataforma PUBMED (Pubmed identification)

6.1.4. Subclasse de IgG e concentração em crianças, independentemente da metodologia.

6.1.4.1- Busca inicial.

A busca foi inicialmente realizada com os termos de busca “*IgG subclasses*” AND “*concentrations*” AND “*Children*”, permitindo identificar 133 artigos (Figura 5), após a aplicação dos limites de data (01/01/1980 até 29/04/2011), idade (0 até 18 anos) e idioma (Inglês, Francês, Alemão, Espanhol e Português). Análise dos títulos e resumos levou à exclusão de 116 artigos, por dosarem subclasse de imunoglobulina em diversas doenças não relacionadas com IDP. Foram selecionados 17 artigos para a análise integral. Nessa etapa foram excluídos 4 artigos: 1 utilizava a metodologia de Radioimunoensaio; 1 não possuía dados adequados para extração; 2 não estavam acessíveis. Durante a análise dos 13 artigos restantes, verificou-se: 4 artigos utilizaram a metodologia de Nefelometria (100% já localizado nas buscas anteriores); 5 utilizaram ELISA (80% localizados nas buscas anteriores, 1 artigo novo incluído); e 4 utilizaram Imunodifusão (100% já localizado nas buscas anteriores).

6.1.4.2- Novos ciclos de busca.

Nova busca foi realizada com os descritores “*IgG subclass*” AND “*Levels*” AND “*Children*”, permitindo identificar 350 artigos, após a aplicação dos limites de data (01/01/1980 até 29/04/2011), idade (0 até 18 anos) e idioma (Inglês, Francês, Alemão, Espanhol e Português). Após a análise dos títulos e resumos foram excluídos 334 artigos, por dosarem subclasses de imunoglobulina em

diversas doenças. Foram selecionados 16 artigos para a análise integral, a qual permitiu excluir 1 artigos por não possuir dados extraíveis. Os 15 artigos restantes incluíam: 2 que utilizaram a metodologia de Nefelometria (100% já localizado nas buscas anteriores); 6 que utilizaram a metodologia de ELISA (66% localizado nas buscas anteriores, 2 artigos novos) e 7 que utilizaram a metodologia de Imunodifusão radial (100% localizados nas buscas anteriores), (Figura 6).

Uma terceira busca foi realizada com os descritores "*IgG subclass*" AND "*values*" AND "*Children*", permitindo identificar 96 artigos. Após a aplicação dos limites de data (01/01/1980 até 29/04/2011), idade (0 até 18 anos) e idioma (Inglês, Francês, Espanhol, Alemão e Português) passaram para 84 artigos. Pela análise dos títulos e resumos, foram excluídos 68 artigos, que tratavam de dosagens de subclasse de imunoglobulina em diversas doenças, relacionadas ou não com IDP, ou revisão de subclasses de IgG, ou doença de subclasses de IgG em resposta antígeno-específica e 1 por não tratar de dosagem de subclasse. Foram selecionados 16 artigos para a análise integral. Nessa etapa foram excluídos 2 artigos, pois não possuíam dados extraíveis. Os 14 artigos restantes incluíam: 3 que utilizaram a metodologia de Nefelometria (100% já localizado nas buscas anteriores); 5 tratando da metodologia de ELISA (66% localizados nas buscas anteriores, 2 artigo novo incluído); e 6 usando a metodologia de Imunodifusão (100% já localizado nas buscas anteriores). (Figura 7).

6.1.4.3- Consolidação das buscas de subclasse de IgG e dosagens, independentemente da metodologia.

A consolidação das buscas “*IgG subclass*” AND “*concentrations*” AND “*Children*” , “*IgG subclass*” AND “*levels*” AND “*Children*” e “*IgG subclass*” AND “*values*” AND “*Children*”, realizada sem especificação de metodologia e tendo sido verificada a sobreposição localizou mais dois artigos não localizados anteriormente. Um destes foi eliminado por não estar acessível. A referência restante está relacionada na tabela 4.

Figura 5

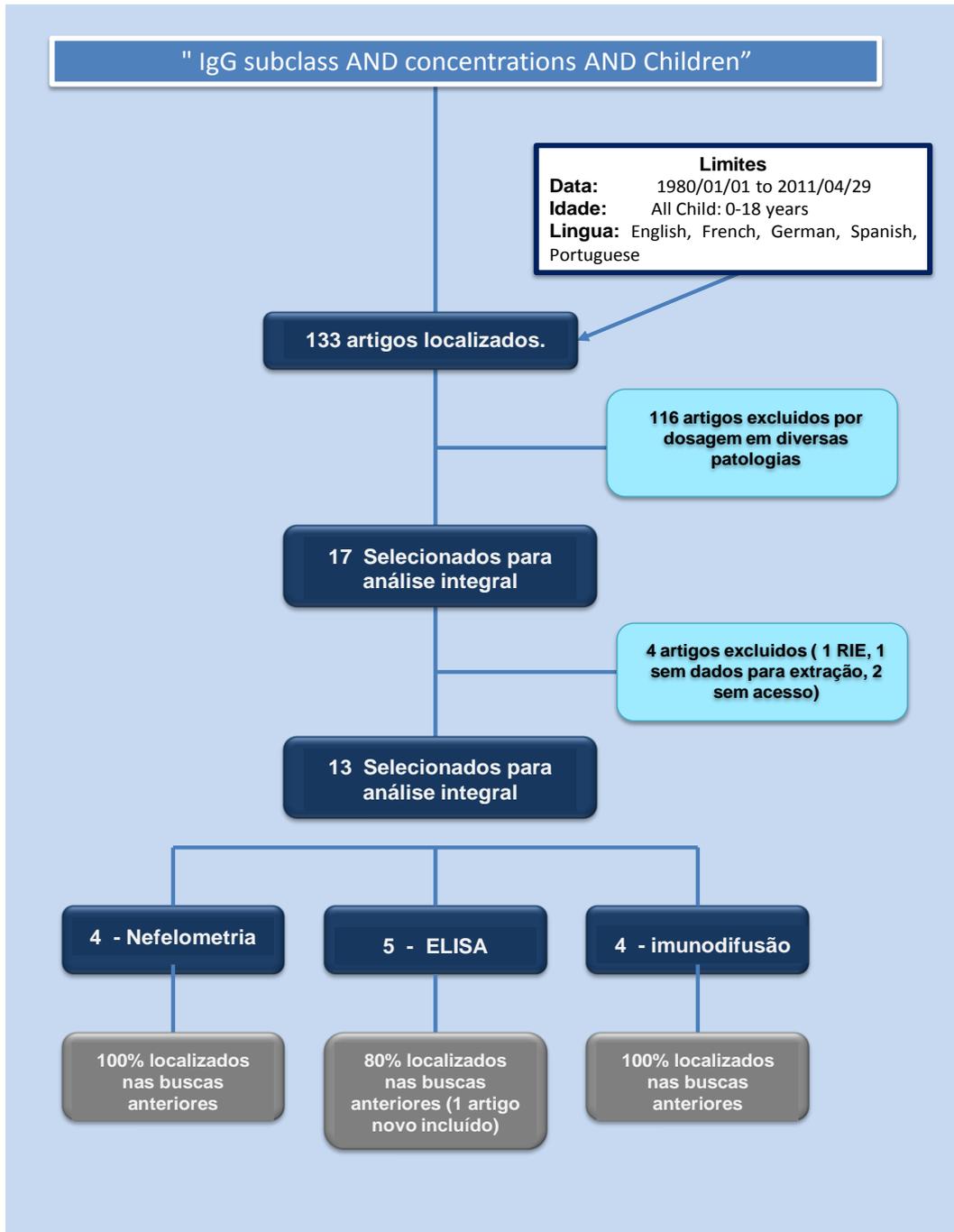
Fluxograma da busca relativa à Concentração de Subclasses de Imunoglobulina G

Figura 6

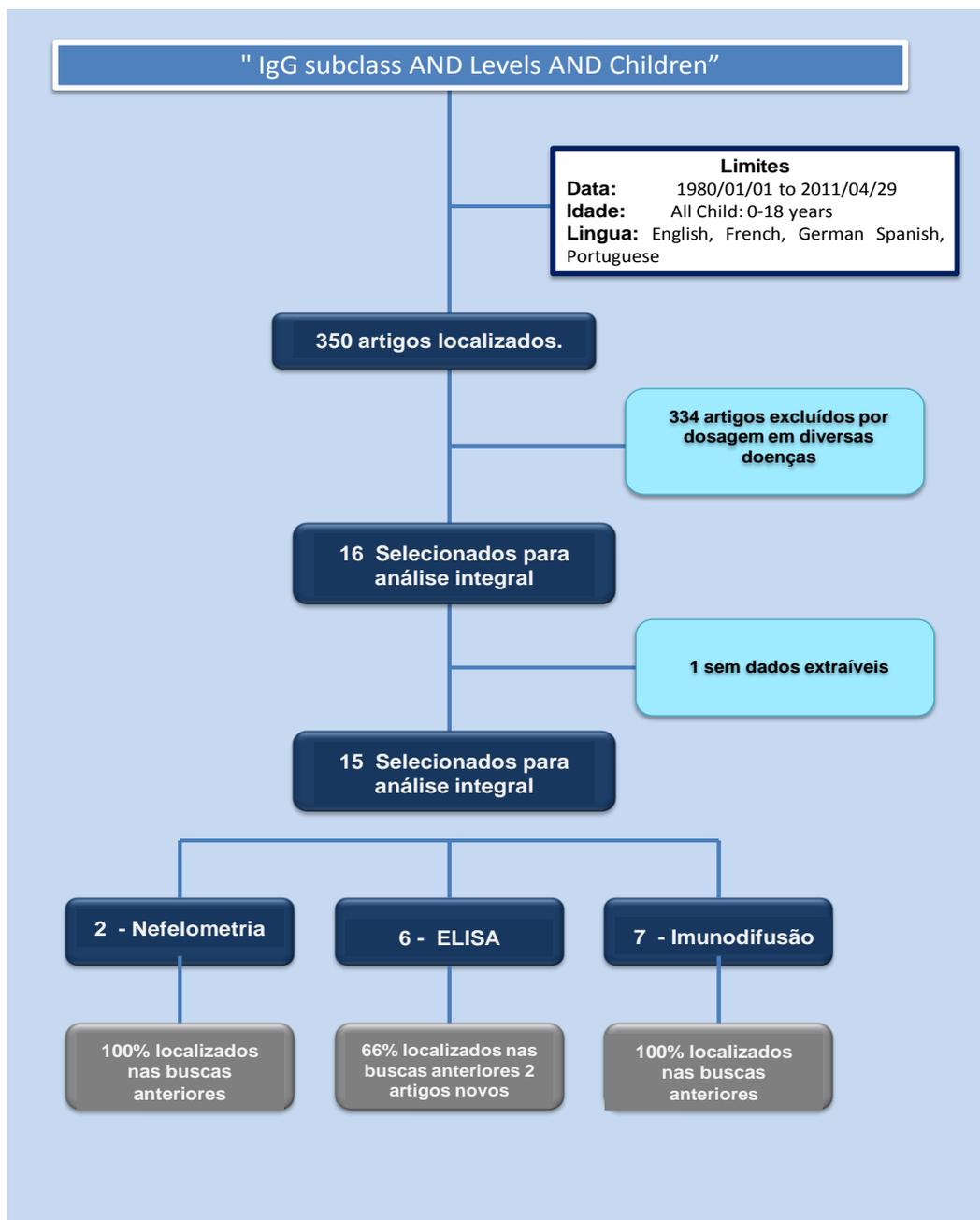
Fluxograma da busca relativa aos Níveis de Subclasses de Imunoglobulina g

Figura 7

Fluxograma da busca relativa aos Valores de Subclasses de Imunoglobulina G

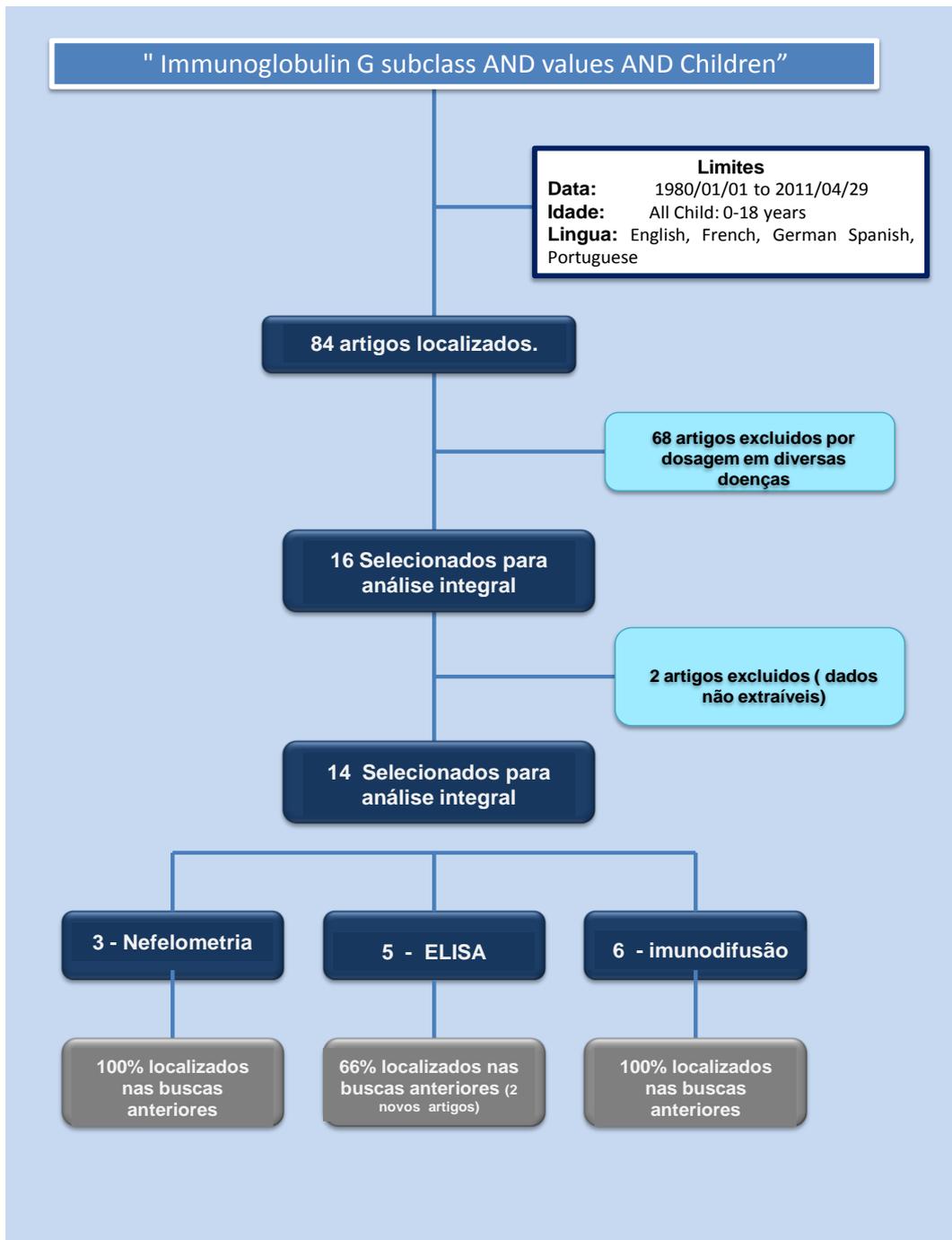


Tabela 4

Referências utilizadas para extração de dados: Subclasse de IgG e dosagens

PMID	TÍTULO	ANO	Autores	PAÍS	Tamanho amostral	Faixa etária
1960601	Immunoglobulin G subclass values in healthy black and white children.	1991	Ambrosino DM ⁽³⁹⁾	USA	910	6M a 60M

D=dias, M=meses, A= anos , PMID: numero identificador na plataforma PUBMED (Pubmed identification)

6.1.5. Buscas complementares nas BASES SciELO, LILACS e MEDLINE.

Para as buscas complementares, a sistemática foi a utilização dos seguintes descritores: *Immunodiffusion, Nephelometry and Turbidimetry, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, reference Values e human igg subclasses*. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos dessa busca. Nas bases Scielo e Lilacs não foi selecionado nenhum artigo para análise em nenhuma das três metodologias estudadas. Na base Medline a busca para a metodologia ELISA localizou 8 artigos, dos quais 5 foram excluídos como se segue: 1 era estudo in vitro, 1 era estudo em animal, 2 tratavam de dosagens em patologias diversas não relacionadas com IDP, 1 analisava anticorpos antipolissacarídeo. Os outros três artigos já tinham sido localizados na busca do PubMed.

A busca para a metodologia de Imunodifusão na base Medline localizou 4 artigos, os quais foram eliminados, sendo: 2 sobre Nefelometria (já localizados nas buscas anteriores); 1 estudo in vitro; 1 sobre dosagem em soro de paciente com Anthrax.

A busca para a metodologia de Nefelometria localizou 2 artigos, dos quais 1 foi eliminado por ser um estudo em adultos, e outro já tinha sido selecionado em buscas anteriores.

6.1.6. Busca complementar na base *Cochrane*.

A busca na *Cochrane Library* (que abrange revisões, ensaios clínicos, estudos metodológicos, avaliações econômicas, *Technology Assessments e Cochrane Groups*), para a metodologia de Nefelometria com os descritores

“*IgG subclasses and Nephelometry*” localizou 1 artigo que foi eliminado por tratar de patologia não relacionada com IDP. A busca para a metodologia de Imunodifusão localizou 3 artigos; destes foram eliminados: um por tratar de patologia não relacionada com IDP e outro de tratamento com IVIG. O artigo restante já estava incluído nas buscas anteriores.

A última busca, focada na metodologia de ELISA, usando os descritores “*IgG subclasses and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” localizou 27 artigos, sendo 26 eliminados por serem estudos em várias patologias não relacionadas com IDP. O artigo restante já tinha sido localizado anteriormente.

6.1.7. Busca Complementar na base EMBASE - *BIOMEDICAL ANSWERS*.

Para a metodologia de ELISA com os descritores “*IgG subclasses*” AND “*Reference*” AND “*Values*” AND “*Enzyme-Linked Immunosorbent*” localizou 7 artigos, dos quais 4 foram eliminados por tratarem de dosagem de subclasse em diferentes patologias não relacionadas com IDP; os 2 artigos já foram localizados em buscas anteriores e um novo estudo foi recuperado e encontra-se na Tabela 7, mas não possui PMID.

A busca para a metodologia de Imunodifusão com os descritores “*Immunoglobulin G*” AND “*Reference Values*” AND “*Immunodiffusion*” localizou 10 artigos; sendo 4 eliminados por tratarem de patologias diversas não relacionadas com IDP; Os 6 restantes incluíam 4 já localizados em buscas anteriores e 2 novos. Os dois foram excluídos por não terem acesso, um foi publicado em uma revista da Universidade do Kuwait e o outro publicado em

uma revista canadense, que foi editada por apenas dois anos e posteriormente incorporada à outra revista, não estando mais disponíveis as publicações iniciais.

Na busca para a metodologia de Nefelometria, utilizando os descritores “*Nephelometry AND Reference Values AND human igg subclasses*” foram localizados 3 artigos, dos quais foram eliminados 2 (1 dosagem de classe de Ig e 1 dosagem de opsoninas). O artigo restante já tinha sido localizado em buscas anteriores.

6.1.8. Busca complementar no Banco de Teses.

A busca realizada no banco de Teses da Capes foram utilizados os seguintes descritores: imunodeficiência primária, subclasses de igg, níveis séricos de igg, deficiência imunológica, deficiência de IgG, ELISA, Nefelometria, subclasse de IgG, valor de referência para subclasse de IgG, Imunodifusão radial (Figura 8). Num total de 529 teses, sem ter limitado nenhum período, foram localizadas duas teses:

- A) Fujimura, M D. Níveis séricos das subclasses de imunoglobulina g (igg) em crianças normais e nefróticas. [Tese de Doutorado]. São Paulo. Pós- graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 1990. (174)

- B) Martin, J G. Subclasses de imunoglobulina-g nos recém-nascidos de termo e pré-termo. [Dissertação de Mestrado]. Botucatu. SP. Pós-graduação da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita. 2000.

A tese “Subclasses de imunoglobulina-g nos recém-nascidos de termo e pré-termo” de Martin, J G, foi excluída da análise porque não contemplava os critérios de inclusão. Abordava as dosagens de subclasses dos recém-natos e suas respectivas mães, como forma comparativa às diversas variáveis, tais como peso ao nascer, tipo de parto, idade gestacional, escolaridade.

A busca no banco de teses da CAPES utilizando os descritores ELISA e subclasses de IgG não recuperou nenhuma tese relacionada com os critérios de inclusão.

A busca no banco de teses da FIOCRUZ não localizou nenhuma tese relacionada com o nosso estudo.

6.1.9. Análise da data e da origem dos estudos selecionados.

Inicialmente avaliamos onde os estudos selecionados para análise integral (27 artigos) tinham sido realizados e em que época. Essa análise revelou que a maioria dos estudos foi realizada em países europeus, seguidos dos países da América do norte e asiáticos. (Figura 9). O único estudo brasileiro encontrado foi a tese de Fujimura, M D, que não resultou em trabalho completo publicado, cujos dados estão disponibilizados no site do BRAGID (27). Mesmo nos estudos europeus, somente na Holanda e na Alemanha foram definidos valores de referências para as três metodologias avaliadas. A análise da época de realização dos estudos mostrou que somente no período de 1990 a 1995 foram realizados estudos de análise dos intervalos de referência (padronização) nas três metodologias. (Figura 10).

6.2 – Análise integral dos artigos selecionado.

Conseguimos obter acesso ao texto completo de todos os artigos selecionados para análise integral para as metodologias de Nefelometria, ELISA e Imunodifusão Radial, totalizando 27 artigos e uma Tese de Doutorado, sendo que 19 artigos e a tese possuíam dados extraíveis, principalmente em relação aos intervalos de referência das Subclasses de IgG. Um artigo (12) foi utilizado para extração de dados em duas metodologias.

A consolidação de todas as buscas nas bases de dados eletrônicas utilizadas neste trabalho resultou em três tabelas: Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8. Foram assim divididas pelas diferentes metodologias, constando em cada uma: 1) letra com número relacionados com a metodologia empregada e o artigo, 2) número de identificação do PubMed (quando existente), 3) título e número de sua referência bibliográfica.

As letras com números foram utilizados na identificação dos artigos nos gráficos de números 11 a 18. O estudo identificado por São Paulo é referente à única tese selecionada para análise.

Tabela 5

Resultado da busca nas Bases: Scielo, LILACS e MEDLINE

	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values AND Human IgG subclasses	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values AND IgG	IgG subclasses
SciELO	408	3	0	1	36
	Immunodiffusion	Immunodiffusion AND Reference Values	Immunodiffusion AND Reference Values AND Human IgG subclasses	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values AND IgG	
	116	3	0	1	
	Nephelometry and Turbidimetry	Nephelometry and Turbidimetry AND Reference Values	Nephelometry and Turbidimetry AND Reference Values AND Human IgG subclasses	Nephelometry and Turbidimetry AND Reference Values AND IgG	
Nº de artigos	1	0	0	0	
LILACS	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values AND Human IgG subclasses	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values AND IgG	IgG subclasses
	463	16	0	3	58
	Immunodiffusion	Immunodiffusion AND Reference Values	Immunodiffusion AND Reference Values AND human igg subclasses	Immunodiffusion AND Reference Values AND IgG	
	250	9	0	2	
MEDLINE	Nephelometry and Turbidimetry	Nephelometry AND Turbidimetry AND Reference Values	Nephelometry and Turbidimetry AND Reference Values AND Human IgG subclasses	Nephelometry and Turbidimetry AND Reference Values AND IgG	
	7	0	0	0	
MEDLINE	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values AND Human IgG subclasses	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay AND Reference Values AND IgG	IgG subclasses
	112.702	3006	8	465	3.617
	Immunodiffusion	Immunodiffusion AND Reference Values	Immunodiffusion AND Reference Values AND human igg subclasses	Immunodiffusion AND Reference Values AND IgG	
	30.203	371	4	80	
MEDLINE	Nephelometry and Turbidimetry	Nephelometry and Turbidimetry AND Reference Values	Nephelometry and Turbidimetry AND Reference Values AND Human IgG subclasses	Nephelometry and Turbidimetry AND Reference Values AND IgG	
	5.774	433	2	57	

Figura 8

Fluxograma da busca no BANCO DE TESES - CAPES

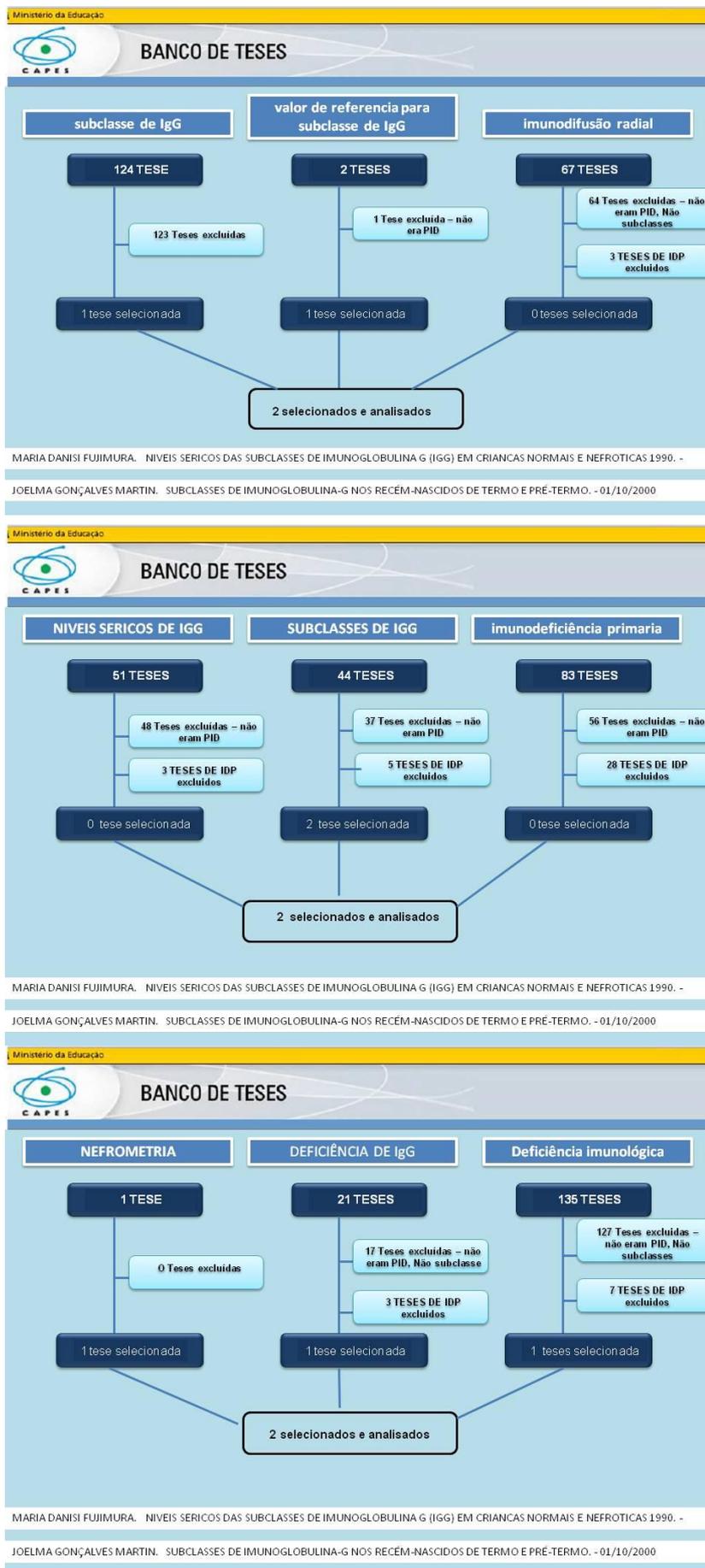


Figura 9

Distribuição dos trabalhos por país de origem

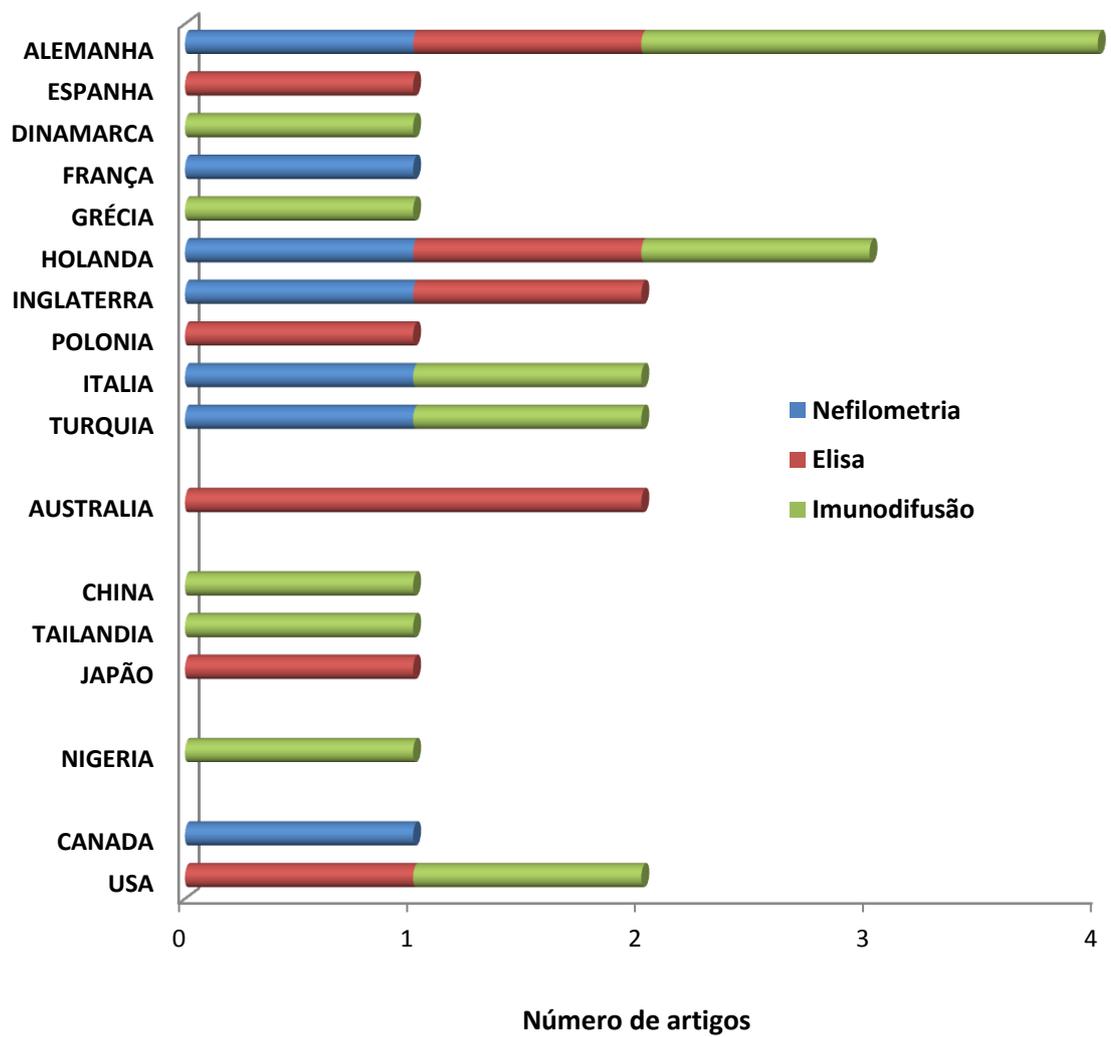
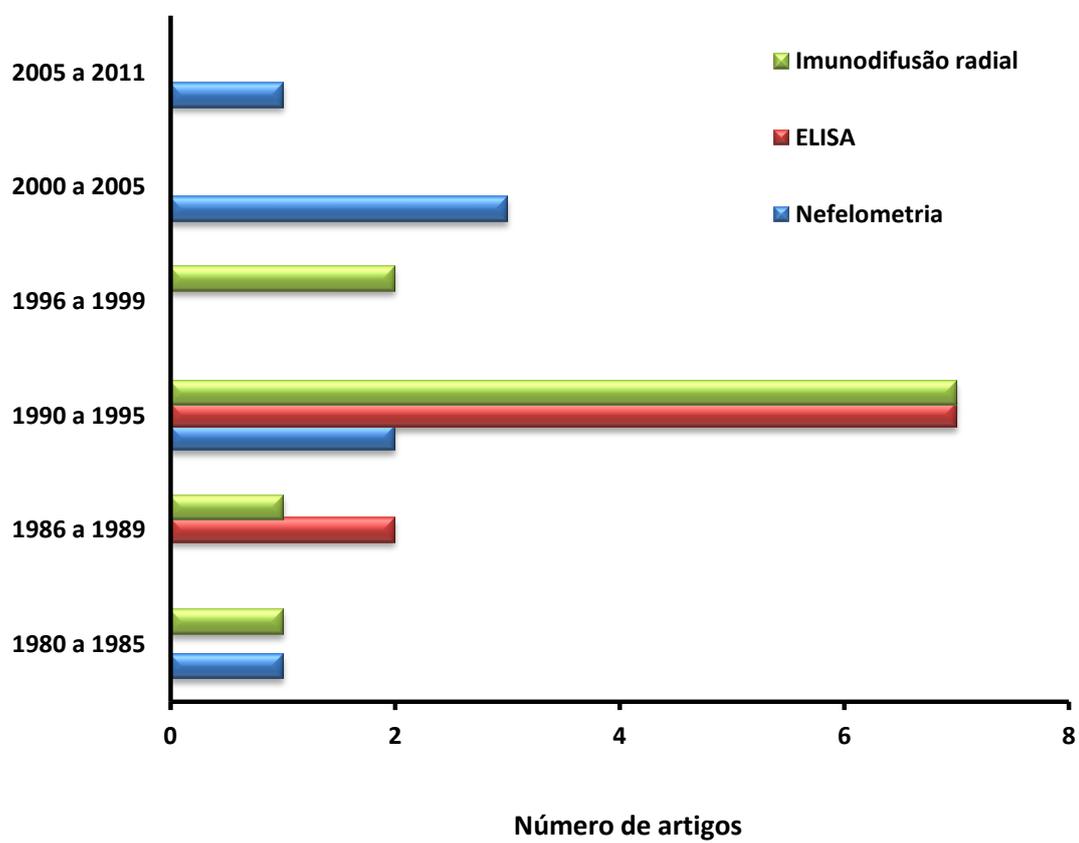


Figura 10

Distribuição dos trabalhos por período de realização dos estudos



6.3- Análise dos dados extraídos por Metodologia.

Os artigos foram separados em grupos por metodologia e os dados relevantes extraídos colocados em planilha eletrônica. Os dados relevantes foram: método laboratorial, tamanho amostral, faixas etárias, intervalos de referência das Subclasses de IgG, dosagem de IgG total, insumo laboratorial utilizado, estocagem e congelamento das amostras, tipo de amostra, método estatístico para cálculo dos intervalos de referência, coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio, tipo de antisoro para SubIgG e padrão de proteína plasmática.

6.3.1- Dados extraídos dos artigos de Nefelometria

Todos os 5 artigos analisados (tabela 6) realizaram dosagens das 4 subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) e IgG total. As companhias fabricantes dos insumos laboratoriais eram diferentes ("*Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH BN, Binding Site Reagents, BERING-BNA, BECKMAN, DADE-BERING*", etc.).

Três dos 5 trabalhos indicam que a duração do ensaio é inferior a 15 minutos, a natureza da amostra em 100% dos casos foi sangue(soro), 3 estudos congelaram a amostra, um não informou e outro não congelou, usando a amostra imediatamente. Dois dos 3 estudos que congelaram os soros informaram que o tempo de estocagem foi entre 60 a 84 dias. O reconhecimento imunológico das proteínas (subclasses de IgG) foi feita por anticorpos policlonais. Todos os 5 artigos fizeram a soma das concentrações

das subclasses relacionando com a concentração de IgG total e obtiveram boa correlação. Os coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 1.7% a 8.5 % e 2.3% a 10.3 % respectivamente e foram informados nos 5 artigos, demonstrando uma boa reprodutibilidade, tendo em vista a realidade da área de ensaios imunológicos, com coeficientes sempre abaixo dos 15%. Dois trabalhos apresentaram desvio-padrão e apenas um artigo apresentou intervalo de confiança 95%. Todos apresentaram limites mínimos e máximos e também calcularam seus intervalos de referência através dos percentis 2,5 a 97,5 das concentrações de subclasses de IgG, utilizando vários métodos e programas estatísticos. Os padrões de proteína utilizados foram: baseados no WHO 67/97(4 artigos) e CRM 470(1 artigo).

6.3.2- Dados extraídos dos artigos de ELISA

Foram analisados 8 artigos (Tabela 7), 7 dos quais realizaram dosagens das 4 subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), com 1 artigo só tendo dosado IgG4. A IgG total foi dosada em 50% dos artigos. As companhias fabricantes dos insumos e reagentes foram diferentes (*Jassen Biochemistry, Birmingham/Dako, Biomakor*, um insumo caseiro com diferentes marcas para cada reagente, *The Binding Site, Makela/Oxoid//Nycomed*). O tempo de realização das dosagens relatado variou entre 2 horas e 6 horas, em alguns com incubações durante a noite. A amostra utilizada em 100% dos casos foi soro e 5 dos 8 estudos indicaram que as amostras foram congeladas, mas sem informar o tempo de estocagem até a dosagem. O reconhecimento imunológico das subclasses foi pela utilização de anticorpos monoclonais. A soma das

concentrações das subclasses de IgG em relação a concentração de IgG total foi demonstrada em 6 artigos. Os intervalos de referência foram calculados a partir das médias geométricas e desvios padrões, calculada a partir do logaritmo das concentrações, em 5 artigos, para a obtenção de uma distribuição normal. Enquanto que nos outros três utilizaram medianas ou médias geométricas e percentis (2/2,5 a 95/97.5), definindo os limites mínimos e máximos através do primeiro e último percentil. Todos os trabalhos utilizaram o padrão de proteínas baseado no WHO 67/97. Os coeficientes de variação inter-ensaios e intra-ensaios foram de 4.8% a 7% e 8.7% a 18% e três artigos não informaram.

Tabela 6

Identificação das referências utilizadas para análise: Nefelometria

	PMID	TÍTULO
N#1	20153742	Pediatric reference intervals for immunoglobulin G and its subclasses with Siemens immunonephelometric assays (4)
N#2	14578325	IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents (9)
N#3	7840433	Nephelometric measurements of human IgG subclasses and their reference ranges. (164)
N#4	7632032	Evaluation of human IgG subclass assays on Beckman array. (165)
N#5	16562781	Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric technique. (5)

Tabela 7

Identificação das referências utilizadas para análise: ELISA

	PMID	TÍTULO
E#1	8572895	Development of IgG subclasses in healthy Polish children. (166)
E#2	8503267	Normal levels of IgG subclass in childhood determined by a sensitive ELISA. (167)
E#3	8250433	The determination of IgG subclasses in healthy children by ELISA with monoclonal antibodies. (168)
E#4	8067664	The determination of IgG subclass concentrations in serum by enzyme-linked immunosorbent assay: establishment of age-related reference ranges for cord blood samples, children aged 5-13 years and adults. (7)
E#5	7695068	Methodologic problems in establishing normal values for IgG subclass concentrations in a pediatric population; comparison of radial immunodiffusion and ELISA methods. (12)
E#6	2398907	IgG subclass level in healthy children (169)
E#7	1960601	Immunoglobulin G subclass values in healthy black and white children. (39)
E#8		Serum immunoglobulin G subclasses and serum immunoglobulin A in healthy Norwegian children and adults (175)

6.3.3- Dados extraídos dos artigos de Imunodifusão Radial.

Sete artigos foram analisados (tabela 8), 6 dos quais realizaram dosagens das 4 subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), com 1 artigo que não dosou IgG4. A IgG total foi dosada em 4 dos 7 artigos. As companhias fabricantes dos insumos laboratoriais foram diferentes (*Marine Colloids, The Binding site, Unipath, Lite* e policlonais da Cruz Vermelha Holandesa, etc.). O tempo de realização das dosagens relatado variou entre 1 a 3 dias. A amostra utilizada em 100% dos casos foi soro. Quatro estudos informaram que congelaram as amostras, mas sem informar o tempo de estocagem até a dosagem. Foram utilizados tanto monoclonais, como policlonais em antisoros de subclasses de IgG. Quatro artigos utilizaram padrões protéicos baseados no WHO 67/97, seja através de um conjunto de soros e calibrando-os ou comprando padrões comerciais. Os outros três não informaram os padrões utilizados. Dois estudos usaram para o cálculo dos intervalos de referência as médias geométricas e desvios padrões através da transformação dos valores das concentrações em logaritmos naturais, três se utilizaram das medianas e percentis 3 a 97, um usou média aritmética e desvio padrão para a construção da tabela e média geométrica para os gráficos. O último apresentou um valor médio de uma faixa etária (6 a 15 anos), com desvio padrão e não informou o método estatístico para o cálculo.

A tese de São Paulo (174) não pôde ser analisada integralmente, pois não foi disponibilizada pela Biblioteca da USP, obtendo-se apenas os dados dos intervalos de referência, em suas respectivas faixas etárias, no endereço eletrônico da BRAGID (27).

Tabela 8

Identificação das referências utilizadas para análise: Imunodifusão

	PMID	TÍTULO
I #1	9681129	Serum IgG subclass levels in a group of healthy Thai children.(170)
I #2	9084997	Serum immunoglobulin G subclasses in healthy infants and children in Greece.(171)
I #3	7695068	Methodologic problems in establishing normal values for IgG subclass concentrations in a pediatric population; comparison of radial immunodiffusion and ELISA methods.(12)
I #4	6771908	Serum levels of immunoglobulin G subclasses in Nigerians.(172)
I #5	2515060	Serum IgG subclass concentrations in healthy subjects at different age: age normal percentile charts.(8)
I #6	2398907	IgG subclass level in healthy children(169)
São Paulo		Níveis sericos das subclasses de imunoglobulina g (igg) em crianças normais e nefroticas(174)
I #7	7974810	Serum immunoglobulin G subclass values in healthy Turkish children and adults.(173)

6.4. Análise total dos dados extraídos.

Uma vez caracterizada a literatura sobre cada metodologia que podia ser extraída para definir intervalos de referência, procuramos extrair e organizar os dados, de forma a permitir, tanto quanto possível, uma análise comparativa, que levasse em conta o método, a faixa etária, necessidade inicial de converter todos os dados a uma só unidade (g/L), os insumos laboratoriais utilizado e, principalmente, a faixa que é relevante no caso das IDPs, ou seja, aquela faixa abaixo do limite inferior da normalidade, em que o método ainda fornece valores confiáveis.

Esta análise foi grandemente dificultada por vários fatores, destacando-se:

a) o uso de protocolos de estocagem, insumos laboratoriais e tempos de reação distintos, dentro de cada metodologia;

b) a descrição de resultados por faixas etárias que raramente são idênticas entre estudos com a mesma metodologia;

c) a impossibilidade de definir, para certas idades, qual o valor de referência. Isto ocorre, por exemplo, quando duas faixas examinadas se justapõem e diferem nos seus valores, mas o limite superior de uma faixa etária ("x a y meses") é também o limite inferior da outra faixa ("y a z meses"), e pode admitir dois valores totalmente distintos. Portanto, a estimativa mais segura é aquela que se situa no interior do intervalo especificado, e os limites duvidosos foram excluídos da análise.

Outro fator importante é que os diferentes estudos exprimem seus resultados de forma extremamente variável. São fornecidos em alguns a média aritmética, mas não a média geométrica, e vice-versa. Portanto, os indicadores

de tendência nem sempre estão disponíveis, e mesmo quando existem não são facilmente comparáveis.

Contudo, o limite inferior da normalidade ("valor mínimo", expresso em gramas/litro), uma informação diretamente relevante para o diagnóstico de IDP, pode ser recuperada a partir dos estudos selecionados, e foi utilizada no presente trabalho para comparações entre diferentes estudos e metodologias (Figuras 11 a 14, para crianças maiores que um ano; Figuras 15 a 18, para crianças abaixo de um ano); os dados são apresentados seguindo a ordem IgG1 a IgG4 na sequência das figuras, e a ordem Nefelometria, ELISA e Imunodifusão na sequência dos painéis em cada figura.

Nessas figuras, estudos diferentes podem ser identificados pelos números atribuídos a cada um. Como os símbolos foram utilizados de forma consistente para cada estudo, é possível a comparação dos resultados de cada estudo entre uma figura e outra.

Sequências de valores idênticos em várias idades, dentro de cada estudo, indicam que os dados, em cada ponto, são estimativas dadas pelo estudo para aquela idade, em geral contida numa faixa etária mais ampla, e que não há, naquele ponto, nenhuma ambiguidade quanto à estimativa, como mencionado acima para idades compartilhadas por duas faixas etárias contíguas, em alguns estudos.

É importante ressaltar que, em nenhum caso, foram feitos cálculos a partir dos dados de qualquer estudo, nem foram feitas estimativas juntando dados de diferentes estudos, visto que tanto um como outro procedimentos são criticáveis do ponto de vista metodológico.

Os painéis, portanto, limitam-se a apresentar, lado a lado, informações que os próprios autores disponibilizaram em seus trabalhos. Toda comparação entre elas é, portanto, visual, e não envolve cálculos estatísticos entre dados de diferentes estudos, até porque os estudos não são comparáveis em todos os seus aspectos, e os dados brutos obtidos em cada estudo não estão disponíveis para comparações estatísticas, mesmo que não houvesse diferenças metodológicas importantes, como há.

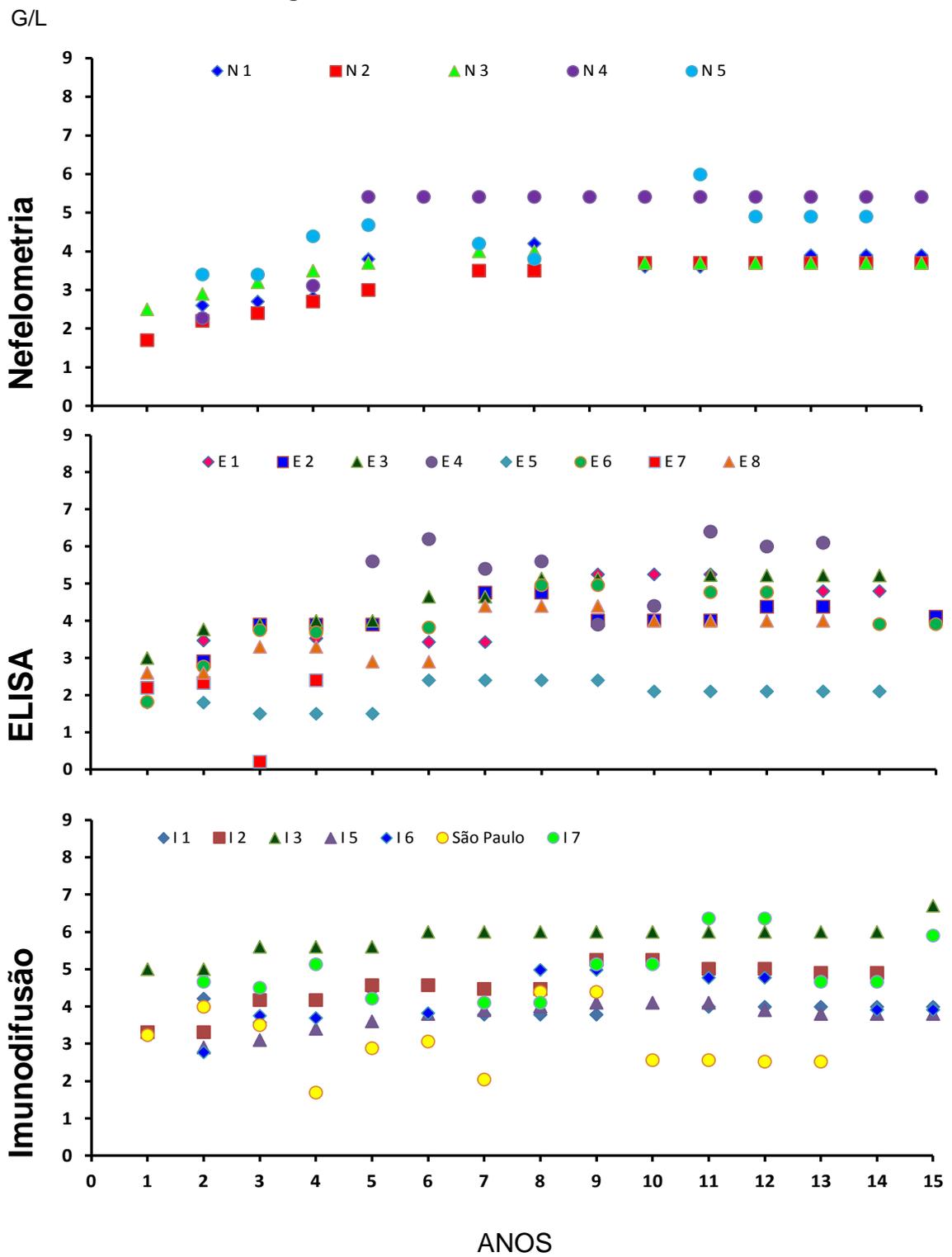
A análise global indica que, mesmo dentro de uma mesma metodologia, e com práticas laboratoriais bastante próximas, além do uso de padrões internacionalmente aceitos, os estudos analisados apresentam discrepâncias importantes quanto à estimativa do valor mínimo da normalidade em cada faixa etária. Isto significa que diferenças relativamente sutis nos reagentes utilizados, no processamento da amostra e nas condições de reação, podem acarretar diferenças importantes nos resultados obtidos.

Enquanto existe uma tendência à elevação deste valor com o desenvolvimento normal a partir de um ano, esta tendência é mais clara no caso da IgG1 e IgG2, e menos clara no caso da IgG3 e da IgG4. Há uma tendência à elevação, menos pronunciada, no intervalo de 0 a 12 meses, que também é mais visível para IgG1 e IgG2.

No caso da IgG3 e da IgG4, os valores inferiores da normalidade são muito baixos, e em alguns estudos se superpõem ao eixo horizontal. Isto mostra a dificuldade de definir um valor que seja claramente "deficiente" para um paciente individual, no caso destas duas subclasses, em contraste com a IgG1 e a IgG2.

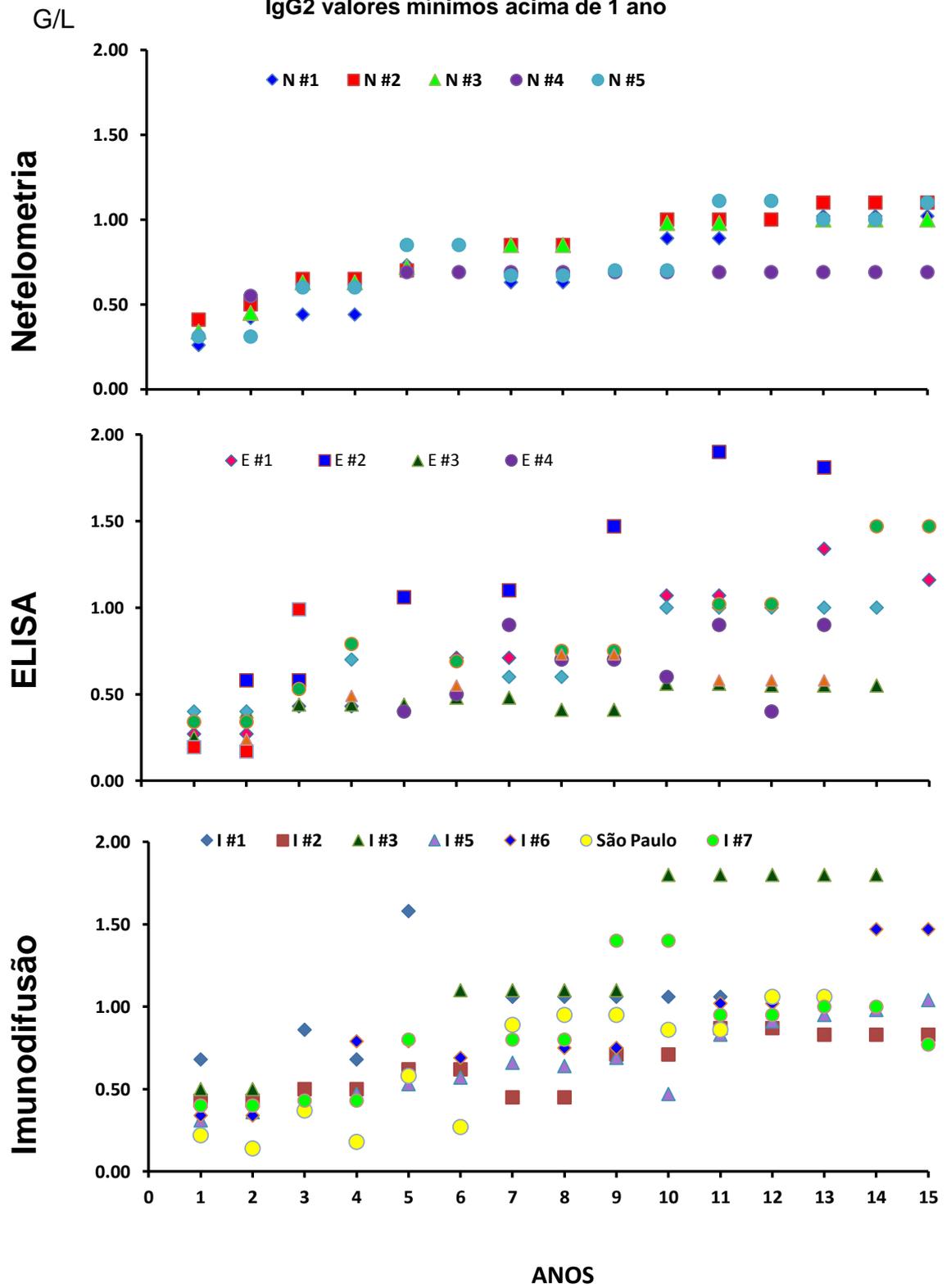
Por outro lado, a divergência de valores entre estudos que utilizam uma mesma metodologia, numa mesma faixa etária, mesmo no caso de IgG1 e IgG2, ilustra a dificuldade em definir a "deficiência" para um paciente individual com base apenas nos intervalos de referência disponíveis na literatura internacional. Um valor de IgG1 de 3 g/l, por exemplo, obtido de um indivíduo por ELISA, na idade de 8 anos, poderia ser considerado abaixo do limite normal se forem levados em conta os intervalos de referência de dois dos estudos (E4 e E8) (7 e 175), mas poderia igualmente ser considerado como estando na faixa de normalidade, se for levado em conta os intervalos de referência do estudos (E5) (12).

Figura 11
IgG1 valores mínimos acima de 1 ano



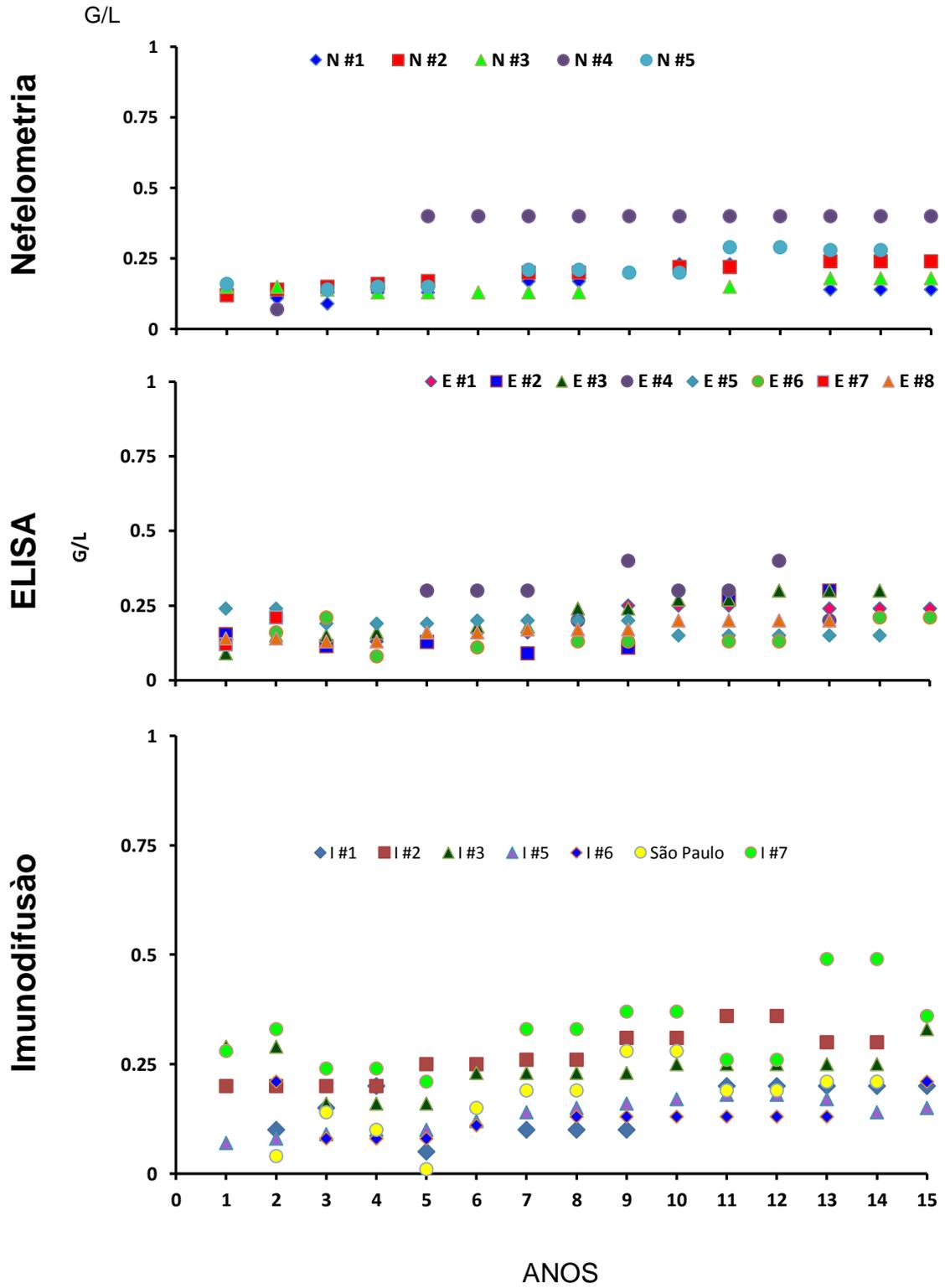
N- Nefelometria, E- ELISA, I- Imunodifusão, G/L- Gramas por Litro

Figura 12
IgG2 valores mínimos acima de 1 ano



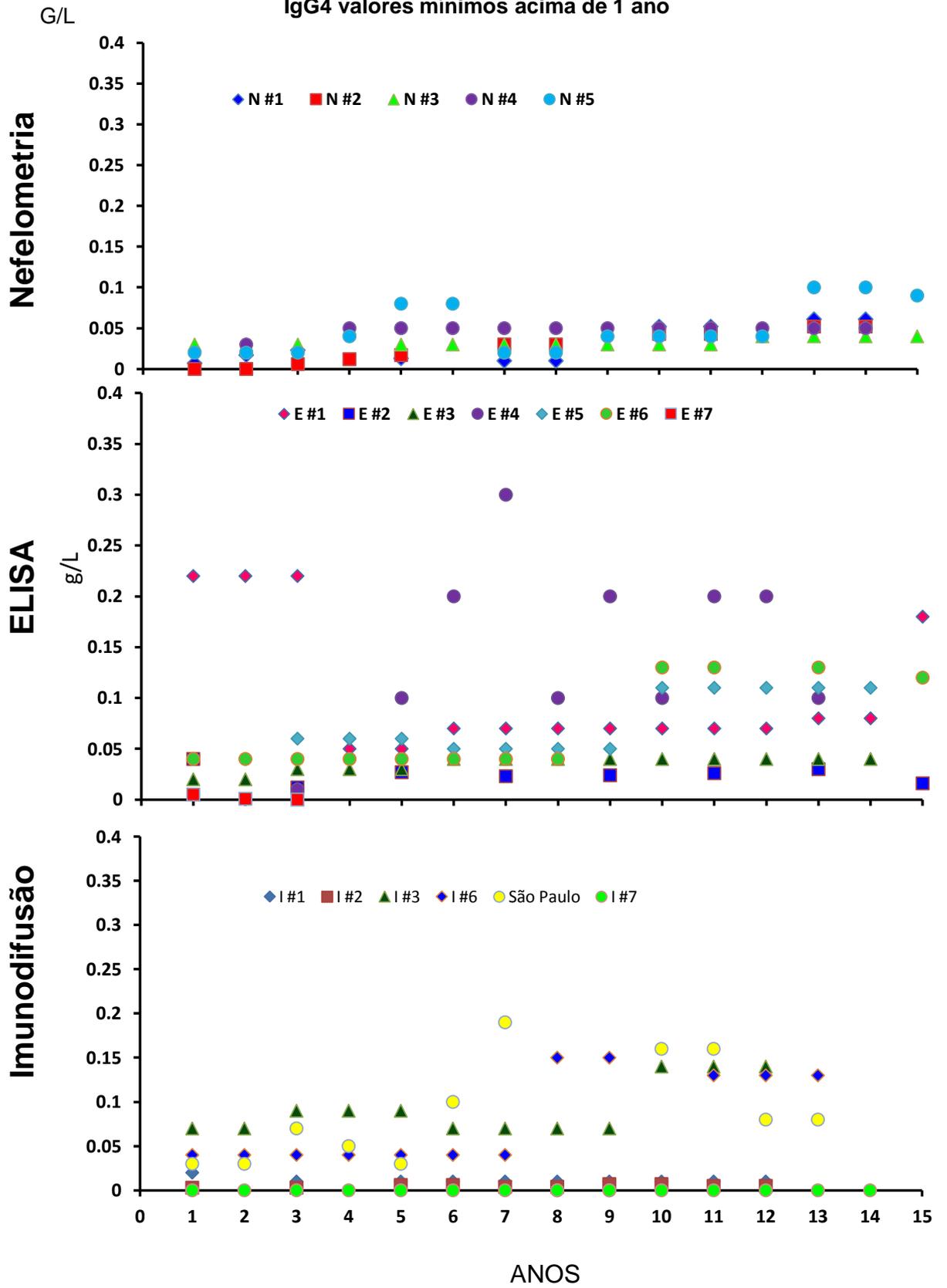
N- Nefelometria, E- ELISA, I- Imunodifusão, G/L- Gramas por Litro

Figura 13
IgG3 valores mínimos acima de 1 ano



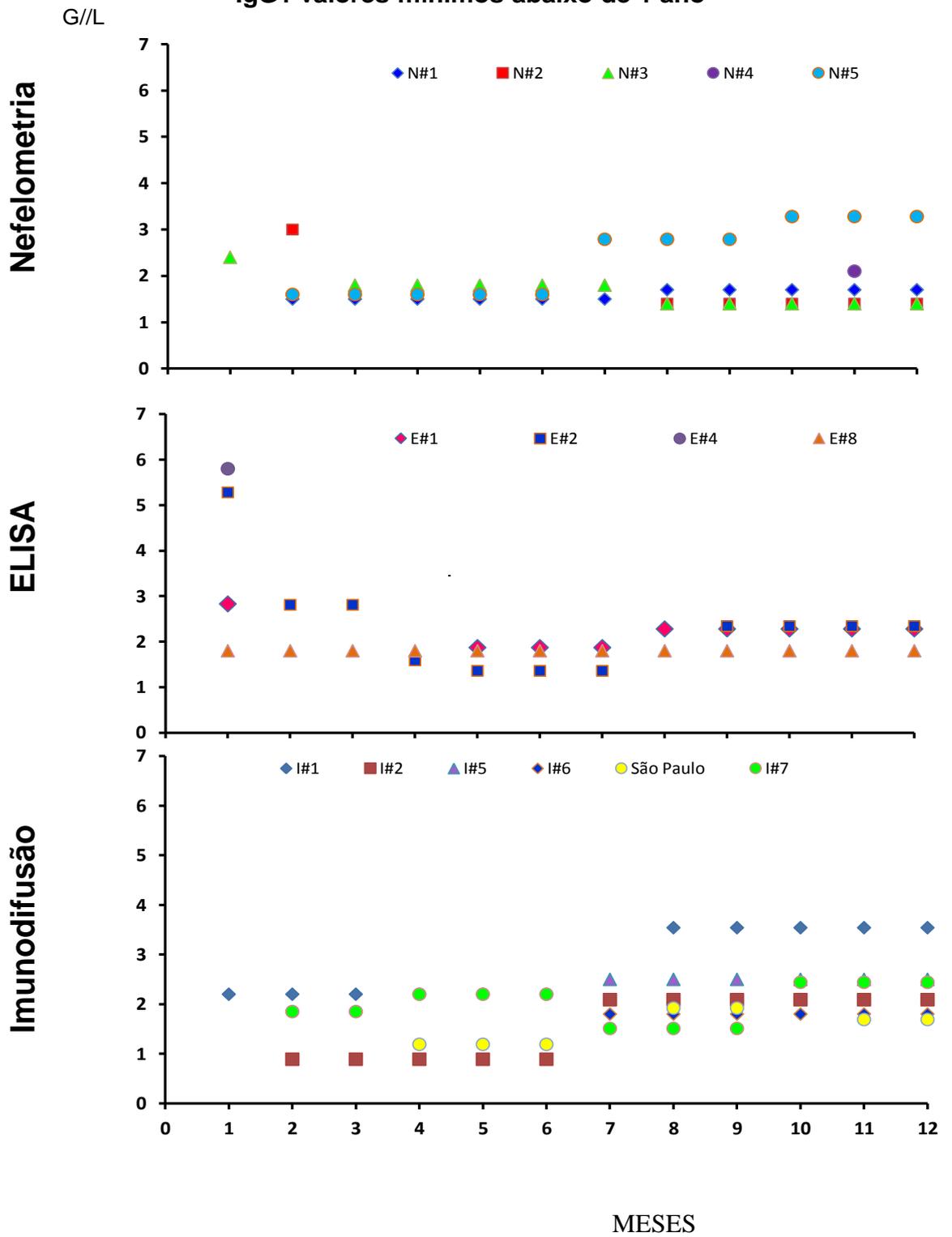
N- Nefelometria, E- ELISA, I- Imunodifusão, G/L- Gramas por Litro

Figura 14
IgG4 valores mínimos acima de 1 ano



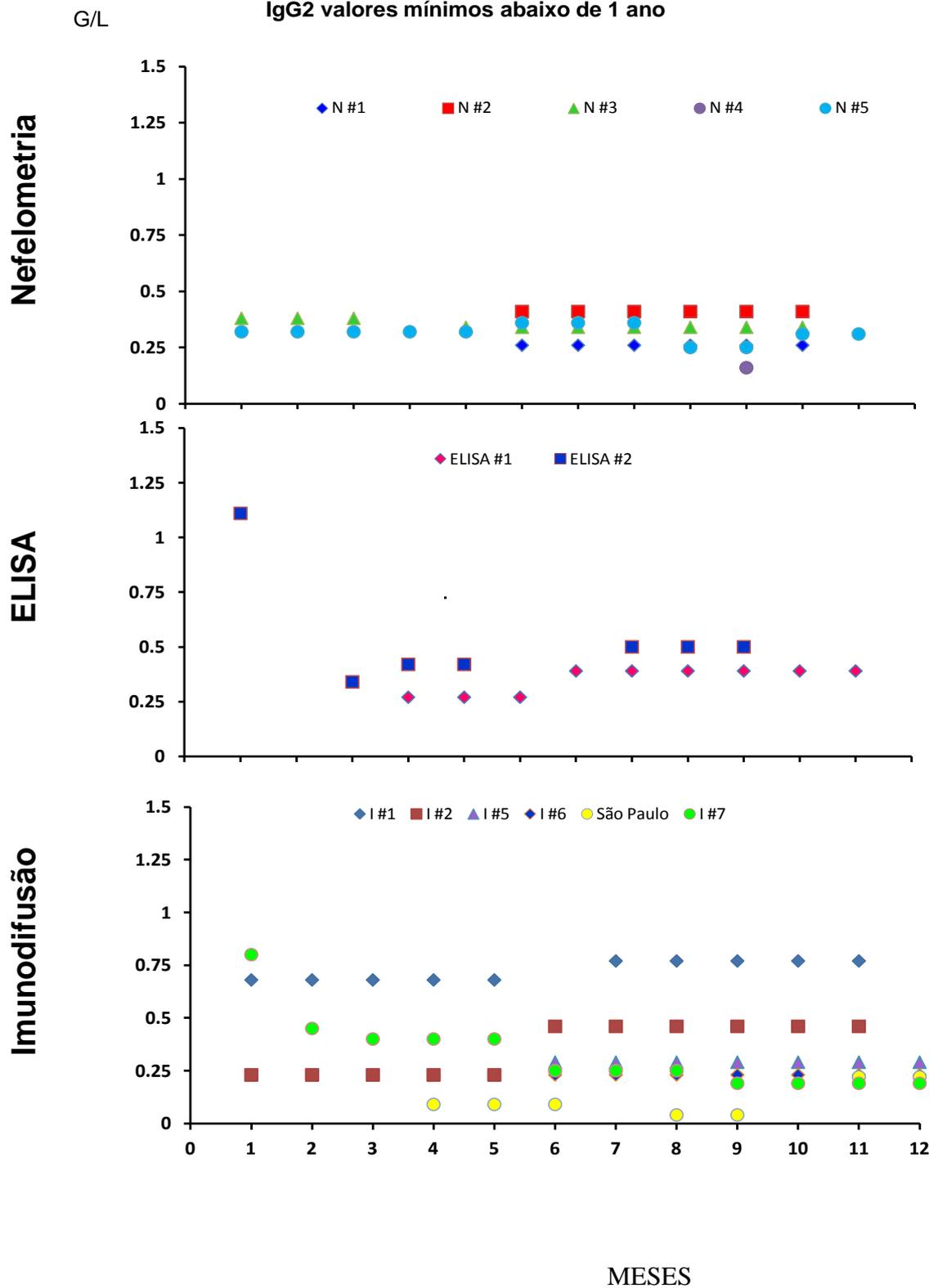
N- Nefelometria, E- ELISA, I- Imunodifusão, G/L- Gramas por Litro

Figura 15
IgG1 valores mínimos abaixo de 1 ano



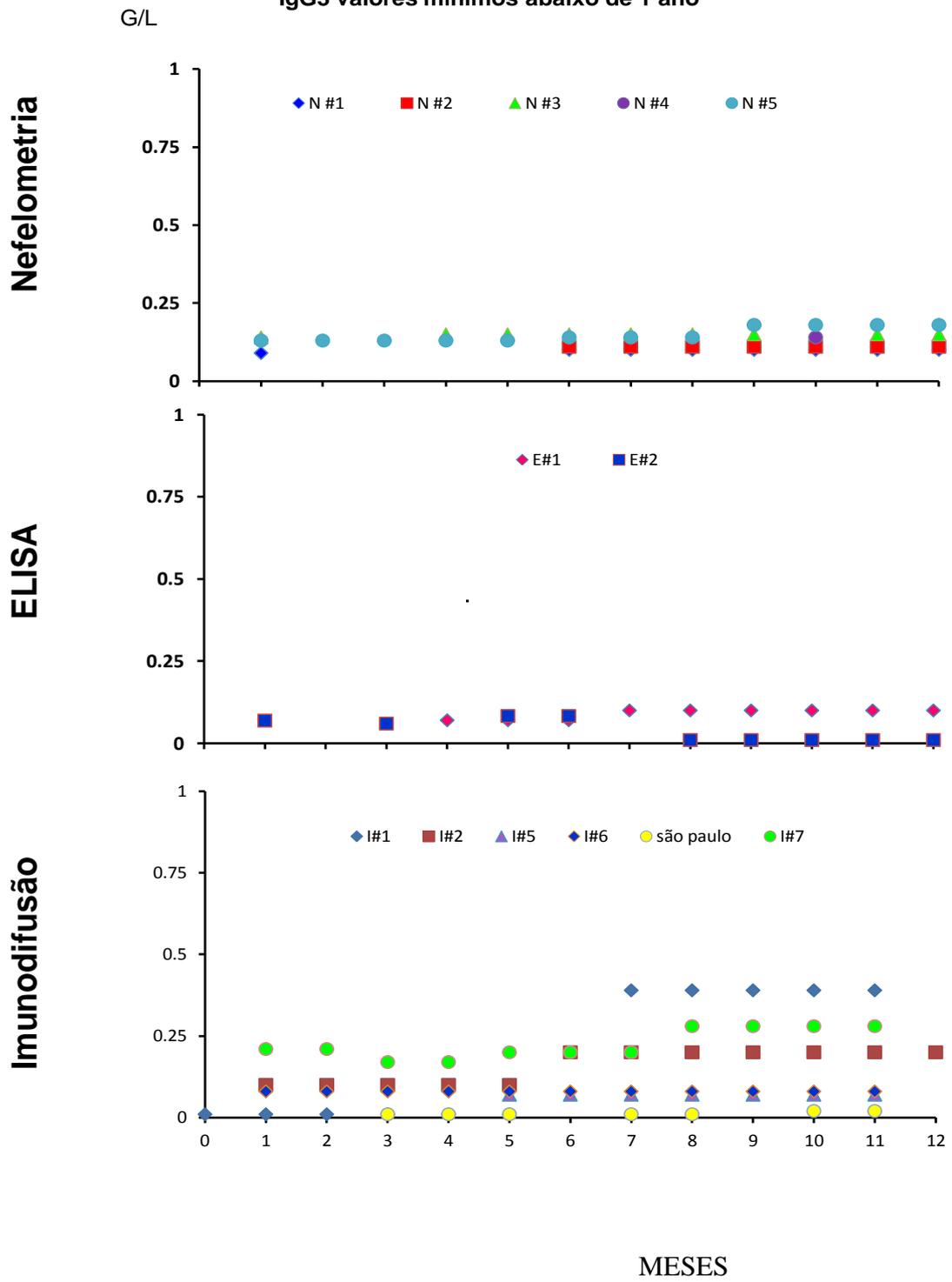
N- Nefelometria, E- ELISA, I- Imunodifusão, G/L- Gramas por Litro

Figura 16
IgG2 valores mínimos abaixo de 1 ano



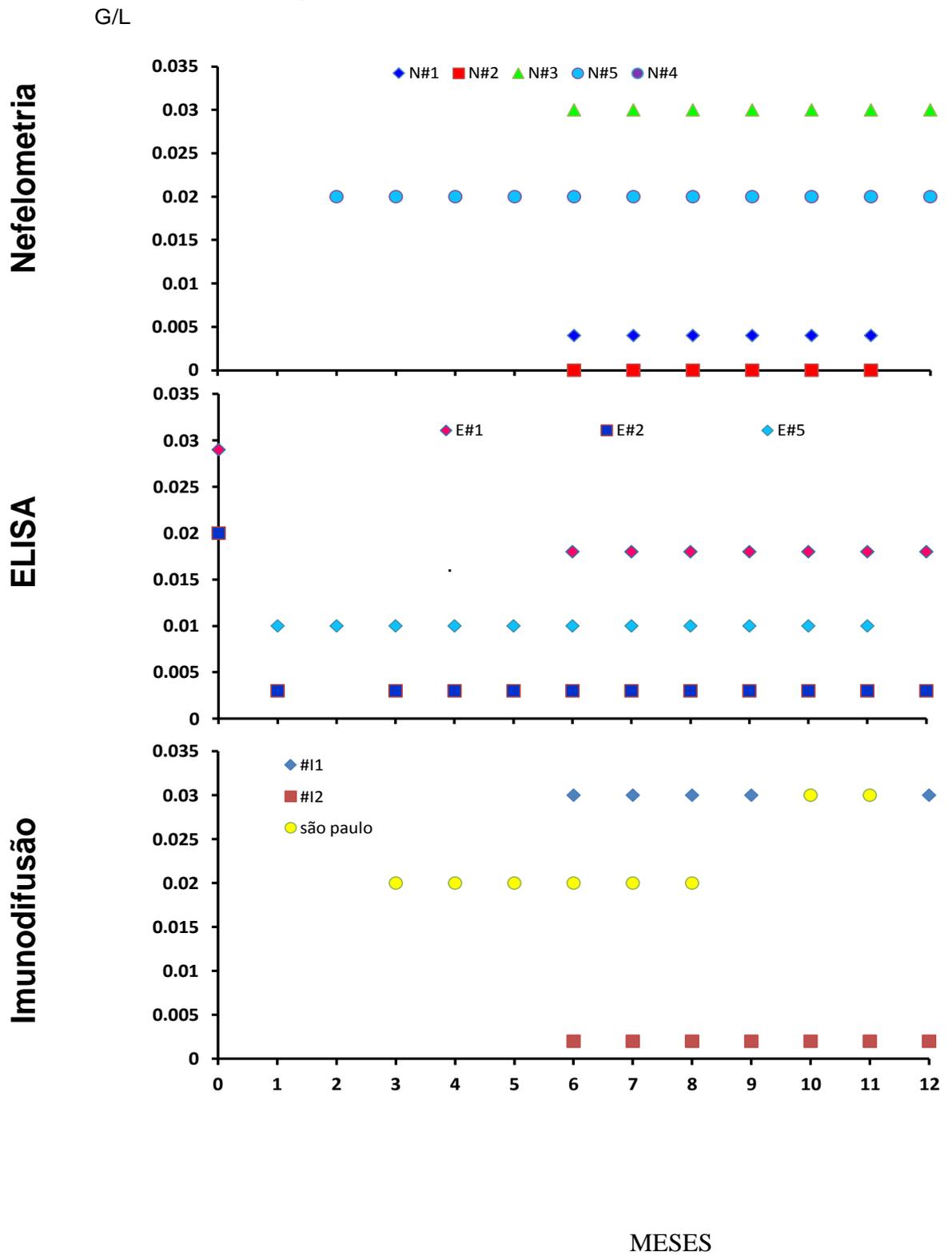
N- Nefelometria, E- ELISA, I- Imunodifusão, G/L- Gramas por Litro

Figura 17
IgG3 valores mínimos abaixo de 1 ano



N- Nefelometria, E- ELISA, I- Imunodifusão, G/L- Gramas por Litro

Figura 18
IgG4 valores mínimos abaixo de 1 ano



N- Nefelometria, E- ELISA, I- Imunodifusão, G/L- Gramas por Litro

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, procuramos abordar um problema de relevância prática para o laboratório diagnóstico de Imunologia – as bases científicas das dosagens de subclasses de Imunoglobulina G por diferentes métodos – através de uma revisão sistemática da literatura, com vistas a obter resultados que pudessem contribuir para a melhoria da capacitação do laboratório e dos profissionais que nele trabalham, trazendo informações precisas e fundamentadas sobre os valores de referência a utilizar como ponto de corte durante a investigação de pacientes pediátricos com suspeita de Imunodeficiência Primária.

Tal revisão é necessária e relevante, porque a metodologia utilizada para este fim se encontra em rápida evolução, passando de métodos mais laboriosos e subjetivos para métodos automatizados e mais objetivos, mas esta evolução não é nem programada nem controlada, na medida em que diferentes países e instituições utilizam métodos diferentes por razões ligadas à complexidade técnica, ao custo de insumos, aparelhagem e treinamento de pessoal, e até mesmo à organização de seus sistemas de saúde.

Como exemplo destas disparidades regionais, basta lembrar que, enquanto a tendência mundial é investir cada vez mais na Nefelometria, pelas vantagens operacionais que apresenta, o único estudo disponível voltado para a população brasileira foi realizado na Universidade de São Paulo, utilizando Imunodifusão radial (174).

A questão de qual método é mais adequado nos dias de hoje para ser utilizado em uma instituição brasileira permanece de grande relevância e atual. A Universidade de São Paulo é uma das instituições de pesquisa biomédica

mais produtiva e respeitada do Brasil, e inclui o mais antigo e respeitado centro de estudos sobre Imunodeficiências Primárias. No entanto, o estudo realizado na USP, utilizou uma metodologia que está sendo cada vez mais abandonada em outros centros internacionais, em favor da Nefelometria. Esta escolha pode, talvez, ter sido devido a fatores altamente relevantes, para a nossa realidade, como o menor custo e, possivelmente, um desempenho que não fica muito distante do obtido com as metodologias mais novas, que são significativamente mais dispendiosas. Somente uma análise crítica do desempenho das diferentes metodologias frente a este problema concreto – dosagem de subclasses de IgG no contexto do diagnóstico de IDP – poderá esclarecer se a escolha da Imunodifusão radial é mais adequada à nossa realidade.

A disponibilidade de bases de dados eletrônicas online revolucionou, em poucos anos, a rotina de buscas de bibliografia em todos os ramos de atividade técnica e científica. Ferramentas como o Google, e, mais aplicado ao nosso caso, o Google Scholar (Google Acadêmico) colocaram ao alcance do profissional a possibilidade de recuperar informações muito importantes em um tempo mínimo, ponderadas também pelo critério de interesse (número de acessos por parte de outros usuários).

A informatização de referências, feita com grande eficiência pela PubMed, e complementada no âmbito da América Latina, incluindo o Brasil, por outras bases como a ScieLo, abriu caminho para outros recursos ainda mais amplos, que cobrem ensaios clínicos registrados (*Cochrane Library*), teses defendidas (Banco de Teses da CAPES), etc.

Com tantos recursos disponíveis, a preocupação do profissional é, antes de tudo, aprender como se faz para recuperar a informação neles contida, e a expectativa é de que esta informação, em si, não apresente dificuldades de interpretação nem de análise. No entanto, a realização do presente trabalho mostrou que a multiplicidade de recursos existentes não aumenta proporcionalmente o número de informações recuperadas, pois as mesmas referências essenciais aparecem repetidamente em muitas rodadas de busca.

Por outro lado, a literatura recuperada, após sucessivas rodadas de depuração das referências irrelevantes ou incompletas, pode apresentar dificuldades importantes de interpretação ou de conciliação com outros estudos, e, portanto, a busca informatizada se revela como apenas o início do trabalho, fazendo da análise a parte mais laboriosa e complexa.

Os intervalos de referência pediátricos para subclasses de IgG geralmente não são usualmente encontrados nas bulas fornecidas pelos fabricantes dos insumos (“*kit*”) utilizados na bancada, mas são referenciados seja a compêndios de Imunologia, seja a artigos publicados em revistas científicas indexadas.

Em alguns casos, a informação fornecida pelos fabricantes nem mesmo inclui referências, apenas indicando que os intervalos devem ser buscados na literatura internacional e de preferência elaborados no próprio laboratório, como preconizado por organismos internacionais de padronização (CSLI E IFCC) (176) (177).

Basta lembrar o custo de operação destes testes, e, no caso das tecnologias mais sofisticadas, do acesso ao equipamento indispensável, além das limitações inevitáveis de obtenção de amostras de sangue humano,

especialmente de crianças, devidas a considerações éticas e médicas, para ver que a recomendação dos fabricantes, neste caso, apenas transfere para o usuário a responsabilidade de construir seus próprios valores de referência, o que é, inevitavelmente, sujeito a variações dificilmente controláveis, como a disponibilidade de crianças saudáveis em todas as faixas etárias de interesse, num curto período que permitisse uniformizar as condições de estocagem e manipulação das amostras, etc.

Em outras palavras, o laboratório diagnóstico de Imunologia tem dois caminhos possíveis, a partir do momento em que se propõe a oferecer um teste como o de quantificação de subclasses de IgG: a) recuperar da literatura científica disponível os dados de referência, como sugerido por alguns dos fornecedores; b) gerar suas próprias referências, o que envolve uma operação em grande escala, não somente em termos do investimento em material, equipamento e pessoal, mas também em termos do esforço institucional de viabilizar a seleção de indivíduos a serem estudados, dentro de rigorosos padrões éticos, e com dados clínicos que sustentem, sem possibilidade de erro, que se trata de indivíduos sadios.

Nossa opção, no presente estudo, foi a primeira, inclusive porque a segunda apresenta dificuldades importantes, tanto do ponto de vista organizacional como financeiro, enquanto a primeira depende, como se comprovou na prática, essencialmente de recursos online facilmente disponíveis no âmbito de uma instituição de pesquisa, e de um grande esforço organizado por parte do pesquisador.

As buscas demonstraram que a utilização de vários descritores referentes ao tema em uma única base de dados não é suficiente para cobrir

todos os artigos que deveriam ser contemplados pelo critério de inclusão. Mesmo utilizando descritores indexados a base de dados, como no caso do MESH da base PUBMED, tivemos dificuldades e precisamos nos utilizar de descritores mais abrangentes para não correremos o risco de perdermos algum estudo relevante.

As bases de dados EMBASE e *Cochrane Library*, que utilizam a árvore MESH, como recurso adicional, em suas buscas avançadas, além de aceitar também descritores gerais, nem por isso abrangeram o tema da pesquisa, pois foram as bases das quais menos recuperamos artigos, embora sejam justamente as bases de dados mais voltadas para revisões sistemáticas e ensaios clínicos. A BIREME se utiliza da MEDLINE, que está diretamente ligada ao PUBMED. E a SCIELO e a LILACS, bases de dados mais voltadas para estudos da América Latina.

Nossos resultados demonstram que, apesar desta interdependência das bases de dados, não há uma uniformidade de busca, nem uma uniformidade de descritores, sendo sempre importante explorar todas as possibilidades e utilizar várias bases e vários descritores, indexados ou não, para garantir uma melhor busca de artigos pertinentes ao tema.

A importância de se buscar em todas as bases disponíveis é confirmada pelo fato de a única fonte de informação direta sobre a execução destes testes na população brasileira ser o estudo da USP, que ainda não foi publicado como artigo, mas cujos dados estão disponíveis online, e que foi inicialmente localizado apenas através da busca no Banco de Teses da CAPES.

A análise dos nossos resultados de busca mostra que ciclos repetidos de busca com diferentes descritores, em diferentes bases de dados, com e

sem aplicação de recursos adicionais, como o MeSH, termina identificando um número surpreendentemente pequeno de referências originais, que correspondam aos critérios de inclusão do estudo.

Por um lado, este resultado pode surpreender, ao fornecer um retrato da literatura disponível sobre o assunto como muito menos numerosa do que inicialmente supúnhamos. O fato de que as mesmas referências reaparecem em inúmeros ciclos de busca alternativos mostra que o procedimento por nós adotado é bastante seguro, e tão próximo quanto possível de uma busca exaustiva sobre o assunto.

Mesmo com esta impressão global, foram encontradas em buscas secundárias referências úteis que tinham escapado às buscas originais. Um caso especialmente interessante foi o de uma referência que não tinha PMID (175), mas que foi encontrada por ter sido citada em um dos artigos localizados (171) e posteriormente recuperada na busca de dados na base eletrônica EMBASE. A falta de PMID num artigo que, por todos os critérios, deveria estar catalogado por este sistema, mostra que erros de informatização podem ocorrer até nas bases mais aperfeiçoadas, como a PubMed, mesmo que raramente, o que reforça o interesse de analisar com cuidado inclusive as referências dos artigos localizados.

A evolução técnica do laboratório de Imunologia nas últimas décadas é bem representada nos resultados das buscas sistemáticas realizadas por nós. Os dados retratam a própria evolução metodológica da área, com o surgimento da metodologia de ELISA como rotina laboratorial, seguida da Nefelometria, com a progressiva queda na utilização da Imunodifusão, por ser esta última menos sensível, mais laboriosa e mais sujeita à variabilidade por fatores

ligados ao operador. E observamos uma tendência mundial de uma padronização de dosagens protéicas nas metodologias de Nefelometria e Turbidimetria, com equipamentos automatizados, que assegurariam uma melhor qualidade e uniformização dos resultados (3) (10) (157) (178).

Essas mudanças são relevantes para a caracterização diagnóstica das deficiências de subclasses de IgG, que são novas IDPs, associadas a defeitos moleculares de menor gravidade, do que as agamaglobulinemias (Bruton) e defeitos globais da produção de anticorpos, exigindo portanto métodos sensíveis e capazes de avaliar independentemente, em curto período, múltiplos parâmetros (4 subclasses no caso).

Nossa expectativa, quando iniciamos este trabalho, foi de encontrar referências completas, que incluíssem valores seguros, coerentes para todas as faixas etárias e todos os países. O resultado das buscas frustrou a nossa expectativa inicial, mas permitiu consolidarmos um retrato muito mais realista e complexo da literatura científica nesta área, gerando com isto as condições para uma avaliação mais crítica e fundamentada do problema, indispensável a uma tomada de decisão racional no âmbito do laboratório de Imunologia em hospital que lida com pacientes em investigação de IDP.

O exame dos dados extraídos da literatura recuperada apontou não só para diferenças importantes entre os resultados obtidos com diferentes metodologias (o que era esperado, até certo ponto), mas também para diferenças importantes entre os resultados obtidos com uma mesma metodologia (o que era teoricamente possível, mas não esperado, pelo menos no grau em que foi observado). Estas diferenças nos obrigam a reflexões sobre

as consequências práticas da interpretação dos resultados, no caso de pacientes em investigação de IDP.

Vários estudos retratam dosagens, com base nas quais uma determinada criança poderia ser considerada imunodeficiente ou sadia, dependendo de qual intervalo de referência fosse utilizado. Este é o caso da quantificação de IgG4, que nas três metodologias apresenta uma grande variação na faixa etária de 0 a 12 meses.

Apesar da variabilidade de valores nas quantificações de subclasses de IgG, observa-se uma faixa de valores razoavelmente definida para o limite inferior do valor de referência, que é suficientemente próxima nas diferentes metodologias. Isto daria ao profissional uma noção do que é uma deficiência grave, principalmente em se tratando de IgG1, que representa a subclasse de maior concentração no soro (~66% do total) (126).

Contudo, quando essa deficiência não fica bem caracterizada, como no caso das outras subclasses, que correspondem a percentagens menores da IgG no soro, a dúvida persiste sobre a presença de uma real deficiência. Isto pode levar, muitas vezes, a dificuldades com o diagnóstico e a custos adicionais, como por exemplo, as repetições de exames.

Enquanto entre o 0 e o limite inferior de normalidade se situa um grande número de valores mensuráveis, dependendo do estudo, em vários dos estudos examinados por nós, o limite inferior da normalidade indicado pelos autores esteve muito próximo do limite de sensibilidade da técnica. Por este motivo, consideramos importante valorizar dados com subclasses que não apresentem este problema, como é o caso das IgG1, pois a deficiência é mais claramente demonstrável.

Como parte da sua capacitação científica, no contexto de um Mestrado Profissionalizante, o profissional de laboratório é levado, pelo exame dos resultados obtidos, a refletir em maior profundidade, sobre as fontes de tão grande variabilidade entre diferentes estudos. Muitas dessas fontes podem ser facilmente identificadas, como se segue:

- a) As várias subclasses de IgG diferem na sua abundância relativa, no seu *turnover*, e na sua estimulação por diferentes antígenos;
- b) Os ensaios imunológicos dependem de reagentes imunoquímicos que são, por definição, diferentes de um fabricante a outro, e de reações com sensibilidades distintas às variações na quantidade de IgG;
- c) Os métodos utilizados se baseiam em princípios físico-químicos distintos, compatíveis com metodologias mais ou menos rigorosas de quantificação e influenciadas em maior ou menor grau por fatores ligados ao operador.

Contudo, mesmo assim, existem diferenças notáveis entre estudos que foram feitos com a mesma metodologia para quantificar as mesmas subclasses, o que nos obriga a considerar outras fontes possíveis de variação. Entre elas, destacamos a etnia das populações estudadas, o que é especialmente relevante para nós, tendo em vista a composição étnica única da população brasileira, que ainda pode apresentar importantes variações regionais. É de interesse, sob este ponto de vista que o estudo realizado no Brasil (174) a que tivemos acesso difere bastante dos demais, realizados com a mesma técnica (de Imunodifusão radial), especialmente no caso da IgG3,

em que os valores referenciais para as faixas etárias iniciais beiram o limite de zero.

Estudos posteriores poderiam constatar também que diferenças nutricionais, sócio-econômicas e diferentes exposições ao meio ambiente também acarretariam diferenças nos níveis de subclasses, levando a uma provável diferença nos valores referenciais de cada população. Constantes exposições a determinados antígenos podem resultar em altos níveis de determinadas subclasses de IgG (39) (172).

Se considerarmos as IDPs somente do ponto de vista laboratorial, como é o caso das deficiências em subclasses de IgG, o critério da presença de doença repousa inteiramente sobre a qualidade e confiabilidade do teste diagnóstico. O que equivaleria a dizer que, em última análise, o teste tem de ser validado para as condições locais (Instituição) e da população do país (Brasil), a menos que seja bem estabelecido que não haja diferenças significativas entre instituições ou países.

Para a prática institucional, de um Centro de Referência em IDPs, como é o IFF, devemos avaliar de forma crítica o custo-benefício da implantação de um exame, como os das subclasses de IgG, como rotina laboratorial.

Deve-se lembrar que uma determinação de subclasses de IgG é, na realidade, a realização de vários testes paralelos, um para cada subclasse, mas que, como exposto acima, os resultados obtidos não são informativos no mesmo grau para todas as subclasses.

A infusão venosa de Imunoglobulinas é o tratamento preconizado para as DSIGGs e poderia ser iniciado apenas com base na clínica, mas para sua liberação o MS exige que a deficiência seja bem caracterizada, com base em

exames laboratoriais. Portanto, o impacto social e econômico das limitações nos testes laboratoriais se explica por permitirem o acesso a insumos de uso crônico, administração hospitalar por pessoal especializado, e custo considerável, como a IVIG.

A importância desta ligação entre a confiabilidade do teste e o acesso ao insumo é ainda maior no contexto atual, visto que a demanda crescente por IVIG, devido a um número cada vez maior de indicações, gerou uma defasagem entre a demanda social e a capacidade de produção do setor, que é limitada, inclusive pela dificuldade de obtenção da matéria-prima e pelos rigorosos controles de qualidade, que são indispensáveis.

Vale lembrar que as subclasses possuem diferentes papéis na defesa do hospedeiro contra as infecções, assim como diferentes concentrações séricas. Em geral as deficiências de subclasses estão mais comumente associadas à deficiência de resposta antígeno-específica, tais como antígenos bacterianos (*Haemophilus influenzae type B*, *Pneumococcus*, etc.) identificam indivíduos de risco para infecções recorrentes (179) (180) e talvez esse exame fosse de uma maior abrangência para diagnóstico, podendo ser apontado com uma alternativa racional, e provavelmente de menor custo, à quantificação de todas as subclasses de IgG.

Embora nossos resultados não tenham respondido por completo todas as questões relevantes ao tema, esperamos ter contribuído de alguma forma, para que tal análise possa ser conduzida com a fundamentação necessária, ao extrair e organizar os dados existentes na literatura recuperada, de forma a facilitar as comparações entre métodos, em diferentes populações e faixas etárias.

A realização deste trabalho foi uma experiência importante para a formação profissional, porque permitiu adquirir familiaridade com os recursos, métodos e critérios de qualidade, próprios da investigação científica e também demonstrou, que o diagnóstico laboratorial não pode ficar inteiramente dependente de dados fornecidos pelos fabricantes de insumos e de equipamentos, para tomar decisões que afetam o bem-estar de pacientes e de suas famílias.

8. CONCLUSÕES

1. A busca sistemática em múltiplas bases de dados eletrônicas, com diferentes descritores relativos à quantificação de subclasses de IgG humana na faixa etária pediátrica, contendo valores que possam servir de subsídio ao estabelecimento de intervalos de referência aplicáveis à nossa instituição, fornece um número limitado de referências, provenientes de vários centros internacionais, além de um único trabalho realizado na população brasileira.
2. A comparação sistemática dos valores encontrados nos diferentes estudos para o limite inferior da normalidade, por faixa etária e por subclasse, através de diferentes metodologias, mostra variações importantes entre os estudos, mesmo quando comparamos a mesma faixa etária e a mesma metodologia.
3. As variações têm maiores conseqüências para a interpretação dos exames quando se trata de IgG3 e IgG4, cujas concentrações séricas são menores, especialmente pela proximidade entre o valor inferior da normalidade e o limite da sensibilidade dos métodos empregados.
4. A comparação dos diferentes estudos sugere que diferenças étnicas e/o ambientais, entre as populações estudadas nestas referências, afetam de maneira importante a definição de valores de referência.
5. O estudo faz ressaltar a relativa carência de estudos de padronização na população brasileira, especialmente aqueles que utilizem metodologias e padrões adotados correntemente nos centros de referência internacionais.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). <http://portal.anvisa.gov.br> (acessado em junho de 2010).
- 2- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). <http://portal.anvisa.gov.br>. Pesquisa de Produtos para Saúde Registrados/ Produtos Diagnósticos de uso in-vitro. (acessado em junho de 2010).
- 3- Jolliff CR, Cost KM, Stivrins PC, Grossman PP, Nolte CR, Franco SM, Fijan KJ, Fletcher LL, Shriner HC. Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(8):1175-79.
- 4- Lepage N, et al. Pediatric reference intervals for immunoglobulin G and its subclasses with Siemens immunonephelometric assays. *Clin Biochem*, 2010; 43(7-8):694-6.
- 5- Aksu G, Genel F, Koturoglu G, et al. Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric technique. *Turk J Pediatr* 2006; 48:19–24.
- 6- Lau YL, Jones BM, Ng KW, Yeung CY. Percentile ranges for serum IgG subclass concentrations in healthy Chinese children. *Clin Exp Immunol* 1993 Feb; 91(2):337-41.
- 7- Miles J, Riches P. The determination of IgG subclass concentrations in serum by enzyme-linked immunosorbent assay: establishment of age-related reference ranges for cord blood samples children aged 5-13 years and adults. *Ann Clin Biochem*. 1994; 31 (3): 245-8.

- 8- Plebani A, Ugazio AG, Avanzini MA, Massimi P, Zonta L, Monafò V, Burgio GR. Serum IgG subclass concentrations in healthy subjects at different age: age normal percentile charts. *Eur J Pediatr.* 1989; 149(3):164-67.
- 9- Schauer U., Frank Stemberg F, Christian H.L. Rieger, CHL et al. IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents. *Clinical Chemistry* 2003; 49(11): 1924–29.
- 10- Bossuyt X, Mariën G, Meyts I, Proesmans M, De Boeck K. Determination of IgG subclasses: a need for standardization. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(4):872-74.
- 11- The Cochrane Library. Cochrane database of systematic reviews. www.thecochranelibrary. (acessado em junho de 2010).
- 12- Pressler T, Mansa B, Pedersen SS, Espersen F, Høiby N, Koch C. Allergy. Methodologic problems in establishing normal values for IgG subclass concentrations in a pediatric population; comparison of radial immunodiffusion and ELISA methods. *Allergy.* 1994; 49(9): 772-77.
- 13- Ministério da Saúde. Portaria nº 745 de 22 de dezembro de 2005. <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2005/PT-745.htm> (acessado em 08/10/2009).
- 14- Ministério da Saúde. Portaria nº 495 de 11 de setembro de 2007. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt2007_imunodeficiencia_primaria.pdf (acessado em 27/03/2010).
- 15- Sackett DL et al. *Medicina Baseada em Evidências – Prático e Ensino.* Artmed Editora, 2003, 2ª Ed. 270p.

- 16- Karaca NE, Karadeniz C, Aksu G, Kutukculer N. Clinical and laboratory evaluation of periodically monitored Turkish children with IgG subclass deficiencies. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2009 Mar; 27(1):43-8.
- 17- Abdou NI, Greenwell CA, Mehta R, Narra M, Hester JD, Halsey JF. Efficacy of intravenous gammaglobulin for immunoglobulin G subclass and/or antibody deficiency in adults. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149(3):267-74.
- 18- Garcia-Lloret M, McGhee S, Chatila TA. Immunoglobulin replacement therapy in children. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008; 28(4):833-49.
- 19- Abrahamian F, Agrawal S, Gupta S. Immunological and clinical profile of adult patients with selective immunoglobulin subclass deficiency: response to intravenous immunoglobulin therapy. *Clin Exp Immunol.* 2010; 159(3):344-50.
- 20- Stiehm et al. Immunodeficiency Disorders: General Considerations. In: *Immunologic Disorders in Infants and Children.* Elsevier Saunders.Philadelphia., 2004, 5ª edição, 290p.
- 21- Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9:722-28
- 22- Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94 (5 Suppl 1):1-63. Erratum in: *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006; 96(3):504.

- 23- Copper MD, Faulk W, Fudenberg HH et al. Classification of primary immunodeficiency. *N Engl J Med* 1973; 288: 966-67.
- 24- International Union of Immunological Societies. www.iuisonline.org. (acessado em maio de 2010).
- 25- Notarangelo LD, Fischer A et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:1161-78.
- 26- LAGID. Grupo Latino Americano de Imunodeficiências Primárias. <http://www.lagid.lsuhs.edu>. (acessado em junho de 2010).
- 27- BRAGID. Grupo Brasileiro de Imunodeficiências Primárias. <http://www.imunopediatria.org.br> (acessado em junho de 2010).
- 28- Gathmann, B et al. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2006–2008. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology* 2009; 157 (1): 3–11.
- 29- Herriot R and W A C Sewel .Antibody deficiency. *J Clin Pathol* 2008; 61: 994-1000.
- 30- Roxo PJ. Imunodeficiências primárias: aspectos relevantes para o pneumologista *J Bras Pneumol*. 2009; 35 (10): 1008-17.
- 31- de Carvalho TM. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN). *Rev Méd Minas Gerais*. 2003; 13 (1, Supl 2):109-35.
- 32- de Carvalho TM, dos Santos HP, dos Santos IC, Vargas PR, Pedrosa J. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30(4): 615.

- 33- Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros*. 2008; 7(1):15-22.
- 34- Al-Herz W. Primary immunodeficiency disorders in Kuwait: first report from Kuwait National Primary Immunodeficiency Registry (2004–2006). *J Clin Immunol* 2008; 28:186–93.
- 35- Kirkpatrick P, Riminton S. Primary immunodeficiency diseases in Australia and New Zealand. *J Clin Immunol* 2007; (27): 517–24.
- 36- Matamoros N, Llambi JM, Espanol T et al. Primary immunodeficiency syndrome in Spain: first report of the National Registry in children and adults. *J Clin Immunol* 1997; (17):333–9.
- 37- Pieters H, Brand CE, Badenhorst PN et al. Immunoglobulin G subclass concentrations in South African adults: ethnic differences and immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric. *Br J Biomed Sci* 1997; 54:104–9.
- 38- Buckley, R. Primary Immunodeficiency Diseases Due to Defects in Lymphocytes. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343(18):1313-24
- 39- Ambrosino DM, Black CM, Plikaytis BD, Reimer CB, Lee MC, Evatt BL, Carlone GM. Immunoglobulin G subclass values in healthy black and white children. *J Pediatr* 1991; 119(6):875-9.

- 40- Conley ME, Stiehm ER. Immunodeficiency disorders: general considerations. In: Stiehm ER, editor. Immunologic disorders in infants and children. Philadelphia: W B Saunders, 1996, p.201-49.
- 41- Buckley, R. Primary immunodeficiency diseases: dissectors of the immune system. *Immunol Rev* 2002; (185):206-19.
- 42- Rosen, F. S. A brief history of immune of deficiency disease. *Immunol. Rev* 2000; (178):8-12.
- 43- Good, R. A. Cellular immunology in a historical perspective. *Immunol Rev* 2002; (185): 135-58.
- 44- WHO. 1997. Primary Immunodeficiency Diseases – Report of a WHO scientific group. *Clin. Exp. Immunol* 1997;109, suppl 1, 1
- 45- Costa-Carvalho BT, Wandalsen GF, Pulici G, Aranda CS, Solé D. Pulmonary complications in patients with antibody deficiency *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2011; 39(3):128-32.
- 46- Seymour B. Primary antibody deficiency and diagnostic delay *J Clin Pathol* 2005; 58:546–47.
- 47- Notarangelo, Luigi D., Silvia Giliani, Cinzia Mazza et al. Of genes and phenotypes: the immunological and molecular spectrum of combined immune deficiency. Defects of the c-JAK3 signaling pathway as a model. *Immunol Rev* 2002;178: 39.
- 48- Oliveira JB, Fleishert TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2), 297-305.
- 49- Vlug A, van Remortel P. The structure and function of human IgG subclasses. *Eur.Clin.Lab* 1989; 8: 26.

- 50- Papadea C, Check IJ. Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27(1):27-58.
- 51- Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):41-52.
- 52- Fischer A, Notarangelo LD et al. Combined Immunodeficiencies. Stiehm ER e editors In: *Immunologic Disorders in Infants and Children*. Elsevier-Saunders. Philadelphia., 2004, 5ª edição, p.447-479.
- 53- Buckley RH. Transplantation of hematopoietic stem cells in human severe combined immunodeficiency: longterm outcomes. *Immunol Res* 2011; 49(1-3):25-43.
- 54- Abbas AK et al. *Cellular and Molecular Immunology*. Boston: Saunders, 1994, 2ª edição, p.415-416.
- 55- Railey MD, Likhnygina Y, Buckley RH. Long-term clinical outcome of patients with severe combined immunodeficiency who received related donor bone marrow transplants without pretransplant chemotherapy or post-transplant GVHD prophylaxis. *J Pediatr* 2009;155(6):834-40.
- 56- Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, Markert L, Williams LW, Roberts JL, Myers LA, Ward FE. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1999 ; 340(7):508-16.
- 57- Buckley RH. Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes. *N Engl J Med* 2000; 343(18):1313-24.
- 58- McKinnon PJ. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* 2004; 5(8):772-6.

- 59- Gatti RA, Becker-Catania S, Chun HH et al. The pathogenesis of ataxia-telangiectasia. Learning from a Rosseta Stone. Clin Rev Allergy Immunol 2001; 20(1):87-108.
- 60- Boder E, Sedgwick RP . Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. Pediatrics 1958, 21(4): 526–54.
- 61- Moghadam BK, Zadeh JY, Gier RE. Ataxia-telangiectasia. Review of the literature and a case report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993; 75(6):791-7.
- 62- Filipovich AH, Zhang K, Snow AL, Marsh RA. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? Blood 2010; 116(18):3398-408.
- 63- Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. Blood 2011 Sep 1.
- 64- Introne WJ ,Westbroek W, Golas GA, Adams D.In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. Chediak-Higashi Syndrome. . GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.2009 Mar 3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301751> (acessado em junho de 2011).
- 65- Haddad E, Le Deist F, Blanche S. Treatment of Chediak-Higashi Syndrome by Allogenic Bone Marrow Transplantation: Report of 10 Cases .Blood 1995; 85 (11) 3328-33.
- 66- Liang JS; Lu MY; Tsai MJ; Lin DT; Lin KH .Bone marrow transplantation from an HLA-matched unrelated donor for treatment of Chediak-Higashi syndrome. J Formos Med Assoc 2000; 99(6): 499-502.

- 67- Colla V A, Carvalho B T, Douglas I C, Pires R B, Salgado MM, Carneiro Sampaio M. Immunodeficiency, Chediak-Higashi's syndrome, albinism, bone marrow transplant. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 1998; 21(3): 83-90.
- 68- Carnide E M, Jacob C M E M, Jacob C M, Pastorino, A Ccol. Chédiak-Higashi syndrome:presentation of seven cases. *Rev Paul Med* 1998;116(6):1873-8.
- 69- Kaplan J, De Domenico I, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol.* Jan 2008; 15(1): 22-9.
- 70- Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria. *Acta Paediatr Suppl.* 1956; 45:1–78
- 71- Klein C. Congenital neutropenia *Hematology* 2009,1: 344-350p
- 72- Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb; 125(2 Suppl 2):S182-94
- 73- Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot C B Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis.* 2011 May 19; 6:26.
- 74- Ward AC, Dale DC. Genetic and molecular diagnosis of severe congenital neutropenia. *Curr Opin Hematol.* 2009; 16(1):9-13.
- 75- Dale DC, Person RE, Bolyard AA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood.* 2000; 96:2317–2322.
- 76- Boxer L A. Severe Congenital Neutropenia: Genetics and Pathogenesis *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2006; 117: 13–32.

- 77- Skokowa J, Lan D, Thakur BK, et al. NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via a NAD(+)-sirtuin-1-dependent pathway. *Nat Med.* 2009; 15:151–158
- 78- S W Choi, L A Boxer, M A Pulsipher, D Roulston, R J Hutchinson, G A Yanik, K R Cooke, J L M Ferrara and J E Levine. Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia with evidence of leukemic transformation. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35, 473–477.
- 79- De Benedetto A, Agnihotri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA.J. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *Invest Dermatol.* 2009; 129(1):14-30
- 80- McGirt LY, Beck LA.J. Innate immune defects in atopic dermatitis. *Allergy Clin Immunol.* 2006; 118(1):202-8.
- 81- van de Vosse E, van Dissel JT, Ottenhoff TH: Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2009, 9:688-698
- 82- Mihai G Netea, Frank L van de Veerdonk, Marcel van Deuren and Jos WM van der Meer. Defects of pattern recognition: primary immunodeficiencies of the innate immune system, *Current Opinion in Pharmacology* 2011, 11: 1–11
- 83- Shai Padeh, Yakov Berkun. Auto-inflammatory Fever Syndromes. *Rheum Dis Clin N Am* 33 (2007) 585–6230
- 84- Cuisset L, Drenth JP, Simon A et al. Molecular analysis of *mvk* mutations and enzymatic activity in hyper-igd and periodic fever syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 260-206p.

- 85- Houten SM, Wanders RJ, Waterham HR .Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1529(1-3):19-32.
- 86- van der Meer JW, Vossen JM, Radl J, van Nieuwkoop JA, Meyer CJ, Lobatto S, van Furth R. Hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever: a new syndrome.*Lancet*. 1984 19; 1(8386):1087- 1090.
- 87- Almeida Jesus A, Oliveira J B, Hilário M O, Terreri M T, Carneiro-Sampaio M. et al. Síndromes autoinflamatórias hereditárias na faixa etária pediátrica *Jornal de Pediatria* 2010, 86 (5) 353-366p
- 88- Fried A J, Bonilla FA. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Primary Antibody Deficiencies and Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2009 July; 22(3): 396–414
- 89- Stiehm RE. The four most common pediatric. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 601:15-26.
- 90- Abrahamian F, Agrawal S, Gupta S.Immunological and clinical profile of adult patients with selective immunoglobulin subclass deficiency: response to intravenous immunoglobulin therapy *Clin Exp Immunol*. 2010; 159(3):344-50.
- 91- Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999;92:34–48
- 92- Wood P Primary antibody deficiencies: recognition, clinical diagnosis and referral of patients. *Clin Med*. 2009; 9(6): 595-9.
- 93- Roxo PJ. Imunodeficiências primárias: aspectos relevantes para o pneumologista *J Bras Pneumol*. 2009; 35(10): 1008-1017

- 94- Eijkhout HW, van Der Meer JW, Kallenberg CG et al. The effect of two different dosages of intravenous immunoglobulin on the incidence of recurrent infections in patients with primary hypogammaglobulinemia. A randomized, double-blind, multicenter crossover trial. *Ann Intern Med* 2001; 135:165–74
- 95- Conley ME, Howard V. Clinical findings leading to the diagnosis of X-linked agammaglobulinemia. *J Pediatr* 2002; 141(4):566–71.
- 96- Wood P, Stanworth S, Burton J, Jones A, Peckham DG, Green T, Hyde C, Chapel H; UK Primary Immunodeficiency Network. Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review. *Clin Exp Immunol*. 2007; 149(3):410-23. Epub 2007 Jun 12.
- 97- Ramalho VD, Oliveira Júnior EB, Tani SM, Roxo Júnior P, Vilela MM. Mutations of Bruton's tyrosine kinase gene in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Med Biol Res*. 2010; 43(9): 910-3.
- 98- Yel L, Minegishi Y, Coustan-Smith E, et al. Mutations in the mu heavy-chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1996; 335:1486-93.
- 99- Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Thymoma and immunodeficiency (Good syndrome): a report of 2 unusual cases and review of the literature. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:185-90.
- 100- Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 2000 May; 120(2):225-31

- 101- Farrant J, Bryant A, Almandoz F, Spickett G, Evans SW, Webster ADB. B cell function in acquired "common-variable" hypogammaglobulinemia: proliferative responses to lymphokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 51:196-204
- 102- Iglesias Alzueta J, Matamoros Florí N. Common variable immunodeficiency. *Allergol Immunopathol* . 2001 May-Jun; 29(3):113-8.
- 103- Bonilla FA, Geha RS. 12. Primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(2 Suppl):S571-81
- 104- Garcia-Lloret M, McGhee S, Chatila TA. Immunoglobulin Replacement Therapy in Children. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2008 ; 28(4): 833–849.
- 105- Aydogan M, Eifan AO, Gocmen I, Ozdemir C, Bahceciler NN, Barlan IB. Clinical and immunologic features of pediatric patients with common variable immunodeficiency and respiratory complications. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008;18(4):260-265
- 106- Yong P, Chee R, Grimbacher B. Hypogammaglobulinaemia *Immunol Allergy Clin N Am* 2008.28, 691–713p.
- 107- Stiehm, ER. et al .IgG subclass deficiencies.In: *Immunologic Disorders in infants and children*.Philadelphia.Elsevier; 2004.p. 393-398.
- 108- R. Jefferis, D. S. Kumararatne. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin. exp. Immunoi* (1990) 81, 357-367.
- 109- French MA, Denis KA, Dawkins R, Peter JB. Severity of infections in IgA deficiency: correlation with decreased serum antibodies to

pneumococcal polysaccharides and decreased serum IgG2 and/or IgG4.

Clin Exp Immunol 1995; 100:47–53

110- Carvalho Neves Forte W, Ferreira De Carvalho Júnior F, Damaceno N, Vidal Perez F, Gonzales Lopes C, Mastroti RA. Evolution of IgA deficiency to IgG subclass deficiency and common variable immunodeficiency Allergol Immunopathol . 2000; 28(1): 18-20

111- Carneiro-Sampaio MM, Carbonare SB, Rozentraub RB, de Araújo MN, Riberiro MA, Porto MH. Frequency of selective IgA deficiency among Brazilian blood donors and healthy pregnant women.. Allergol Immunopathol (Madr). 1989 Jul-Aug; 17(4):213-6.

112- al-Attas RA, Rahi AH .Primary antibody deficiency in Arabs: first report from eastern Saudi Arabia. J Clin Immunol. 1998 Sep; 18(5):368-71

113- Holt PD, Tandy NP, Anstee DJ. Screening of blood donors for IgA deficiency: a study of the donor population of south-west England. J Clin Pathol. 1977 Nov; 30(11):1007-1010

114- Sanders LA, Rijkers GT, Kuis W et al. Defective antipneumococcal polysaccharide antibody response in children with recurrent respiratory tract infections. J Allergy Clin Immunol 1993; 91:110–119

115- Hidalgo H, Moore C, Leiva LE, Sorensen RU. Preimmunization and postimmunization pneumococcal antibody titers in children with recurrent infections. Ann Allergy Asthma Immunol 1996; 76:341–6.

116- Boyle RJ, Le C, Balloch A, Tang ML. The clinical syndrome of specific antibody deficiency in children. Clin Exp Immunol. 2006; 146(3):486-92.

- 117- Sorensen RU, Leiva LE, Javier FC 3rd et al. Influence of age on the response to *Streptococcus pneumoniae* vaccine in patients with recurrent infections and normal immunoglobulin concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:215–221.
- 118- Rose ME, Lang DM. Evaluating and managing hypogammaglobulinemia *Cleveland Clinic Journal of Medicine*.2006; 73(2) 133-7, 140, 143-4.
- 119- Ochs, HD, Steihm ER , Winkelstein. Antibody Deficiencies. In: ER Stiehm e editors. *Immunologic Disorders in Infants and Children*. Philadelphia, 2004. Elsevier: 391-393p
- 120- Whelan MA, Hwan WH, Beausoleil J et al. Infants presenting with recurrent infections and low immunoglobulins: characteristics and analysis of normalization. *Clin Immunol*. 2006 Jan; 26(1):7-11
- 121- Karaca NE, Aksu G, Gulez N, Yildiz B, Azarsiz E, Kutukculer N. New laboratory findings in Turkish patients with transient hypogammaglobulinemia of infancy *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2010; 9(4):237-43.
- 122- Johnson PM, Brown PJ. Fc gamma receptors in the human placenta: a review. *Placenta* 1981; 2:355-9.
- 123- Valim Y, Lachmann PJ. The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin Exp Immunol* 1991; 84: 1- 8

- 124- Jefferis R, Pound J, Lund J, Goodall M. Effector mechanisms activated by human IgG subclass antibodies: clinical and molecular aspects. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994; 52: 57- 65
- 125- Burton DR, Gregory L, Jefferis R. Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. *Monogr Allergy* 1986; 19: 7- 35
- 126- French, M., Harrison, G. (1984) Serum IgG subclass concentrations in healthy adults: a study using monoclonal antisera. *Clin. exp. Immunol.* 1984 56, 473.
- 127- Ochs, H D, Stiehm E R, Winkelstein J A . Antibody Deficiencies. In: Stiehm ER, editor. *Immunologic disorders in infants and children.* Philadelphia: W B Saunders. 2004, 393-398p.
- 128- Oxelius VA. IgG subclass levels in infancy and childhood .*Acta Paediatr Scand.* 1979 Jan; 68(1):23-27p.
- 129- Merlini G, Blirup-Jensen S, Johnson AM, Sheldon J, Zegers I. IFCC Committee on Plasma Proteins: Standardizing plasma protein measurements worldwide: a challenging enterprise. *Clin Chem Lab Med.* 2010 Nov; 48(11):1567-1575p.
- 130- Evans R 3rd. A U.S. reference for human immunoglobulin E. *J Allergy Clin Immunol.* 1981 Jul; 68(1):79-82.
- 131- Rowe DS, Anderson SG, Tackett L. A research standard for human serum immunoglobulin D. *Bull World Health Organ.* 1970; 43(4):607-9.
- 132- Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem.* 2009 Mar; 42(4-5):236-40.

- 133- Blirup-Jensen S, Johnson AM, Larsen M; IFCC Committee on Plasma Proteins Protein standardization V: value transfer. A practical protocol for the assignment of serum protein values from a Reference Material to a Target Material. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46(10):14709.
- 134- Johnson AM. Necessity for high-quality reference materials in the harmonization of laboratory assays. *Clin Chem Lab Med*. 2010 Jun;48(6):747-8
- 135- Rowe DS, Anderson SG, Fahey J L Immunological reagents for quantitative reference purposes: a preparation of human serum immunoglobulins. *Bull World Health Organ*. 1968; 39(6): 992–993
- 136- Rowe DS, Anderson SG, Grab B. A research standard for human serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM. *Bull World Health Organ*. 1970; 42(4):535-52.
- 137- Klein F, Skvaril F, Vermeeren R, Vlug A, Duimel WJ. The quantification of human IgG subclasses in reference preparations. *Clin Chim Acta* 1985; 150:119-27.
- 138- Public Health Service, Centers for Disease Control. WHO Collaborating Center for Research and Reagents for Human Immunoglobulin Subclasses. IgG subclass concentrations of WHO 67/97. Atlanta, GA: CDC, 1987.
- 139- Reimer C B, Smith S J, Hannon WH et al. Progress towards international reference standards for human serum proteins. *Journal of Biological Standardization*, 1978 6(2)133-150p.

- 140- Rowe, D.S., Grab, B. and Andersen, S.G A Research Standard for Human Serum Immunoglobulins G, A and M. Bull. Wld. Hlth. Org.1970 42, 535
- 141- WHO Expert Committee on Biological Standardization . Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser., No. 463Bull. Org. mond. Sante 1972, 46, 67-79
- 142- Rowe D S, Grab B, Anderson S G. An international reference preparation for human serum immunoglobulins G, A and M: content of immunoglobulins by weight. Bull. Wld Hlth Org 1972, 46, 67-7.
- 143- Hobbs JR, Harboe N, Alper C, Johansson BG International Federation of Clinical Chemistry. Committee on Standards. Expert Panel on Proteins. The human serum standard IFCC 74/1.Clin Chim Acta. 1979; 98(1-2):179-186p.
- 144- Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlstrom A, Johnson AM, Milford Ward A et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins CRM 470. BCR/92/92. Brussels, Belgium: Community Bureau of References (BCR) of the Commission of the European Communities, 1992.
- 145- Johnson AM. A new international reference preparation for proteins in human serum. Arch Pathol Lab Med 1993; 117:29–31p.
- 146- Dati F, Schumann G, Thomas L, Aguzzi F, Baudner S, Bienvenu J, Blaabjerg O, Blirup-Jensen S, Carlström A, Petersen PH, Johnson AM, Milford-Ward A, Ritchie RF, Svendsen PJ, Whicher J. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM

470). International Federation of Clinical Chemistry. Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities. College of American Pathologists. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1996; 34(6):517-20.

147- Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange G. et al. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes: results of an IUIS/WHO collaborative study. Immunol Lett. 1985; 10(3-4):223-52

148- Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange G. Announcement. Immunology 1988;63(1):171

149- Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange GG, Goodall DM, Bentley TL, Phillips DJ, Vlug A, Harada S, Radl J et al..Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. Immunol Lett. 1992 Feb;31(2):143-68

150- Peskett G L. Studies on the Growth of Yeast: A Nephelometric Method of Counting Yeast Suspensions. Biochem J. 1927;21(3):460-6.

151- Peskett GL.. Killingsworth, L. M., and Savory, J., Manual nephelometric methodsfor immunochemical determination of immunoglobulins IgG. Gun. Chem.1972. 18, 335

152- Marrack, J. R., and Richards, C. B., Light scattering studies of the formation of aggregates in mixture of antigen and antibody. Immunology, 1971. 20, 1019p.

- 153- Buffone, G. J., Savory, J., and Cross, R. E., Use of a laser modified centrifugal analyser for kinetic measurement of serum IgG. Clin. Chem. 20, 1320 (1974).
- 154- Manual e especificações técnicas do equipamento BN Pro Spec®. http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay~q_catalogId~e_-111~a_catTree~e_100004~a_langId~e_-111~a_productId~e_182042~a_storeId~e_10001~a_view~e_38.htm
- 155- Manual e especificações técnicas dos reagentes da Binding site <http://www.bindingsite.com/products>
- 156- Henry, JB .Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods – 18th ed. An HBJ Internacional Edition- 1991 by W.B.Saunders .
- 157- Denham E, Mohn B, Tucker L, Lun A et al. Evaluation of immunoturbidimetric specific protein methods using the Architect ci8200: comparison with immunonephelometry. Ann Clin Biochem 2007; 44: 529–536
- 158- Human IgG Subclass Liquid Reagent Kits <http://www.crlcorp.com/getDocument.cfm?documentID=49>
(www.bindingsite.co.uk)
- 159- Mancini G, Carbonara A O, Heremans J F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry1965, 2:235-54.
- 160- Fahey JL, Mckelvey EM. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. J Immunol. 1965; 94:84-90p.

- 161- Reagentes para Subclasses de IgG por Imunodifusão radial.[http://www.sanquin.nl/Sanquin-eng/reagents.nsf/8551110e498bd2c8c12572110034decf/a078f2ce2d79055ec12573f300502626/\\$FILE/ProductListIR2011.pdf](http://www.sanquin.nl/Sanquin-eng/reagents.nsf/8551110e498bd2c8c12572110034decf/a078f2ce2d79055ec12573f300502626/$FILE/ProductListIR2011.pdf)
- 162- Rudolf M. Lequin Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 51: 2415-2418, 2005
- 163- Reagentes para Subclasses de IgG por ELISA.
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/991000>
- 164- Vlug A, van Eijk RVW, Geertzen HGM, van Houte AJ. Nephelometric measurements of human IgG subclasses and their reference ranges. *Ann Biol Clin.* 1994; 52(7-8):561-567p.
- 165- Pressac M, Allouche F, Circaud R, Aymard P. Evaluation of human IgG subclass assays on Beckman array *Ann Clin Biochem.* 1995; 32(3):281-288p.
- 166- Gregorek H, Imielska D, Gornick J et al. Development of IgG subclasses in healthy Polish children. *Arch Immunol Ther Exp.* 1994;42(5-6):377-382p
- 167- Hayashibara H et al. Normal levels of IgG subclass in childhood determined by a sensitive ELISA. *Acta Paediatr Jpn.* 1993; 35(2):113-117p.
- 168- Quiles Durá JL, Subira MJE et al. The determination of IgG subclasses in healthy children by ELISA with monoclonal antibodies. *An Esp Pediatr.* 1993; 39(3):209-213p.
- 169- Zielen S et al. IgG subclass level in healthy children. *Monatsschr Kinderheilkd.* 1990; 138(7):377-380p.

- 170- Ngamphaiboon J, Theamboonlert A, Poovorawan Y. Serum IgG subclass levels in a group of healthy Thai children. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1998; 16(1):49-55p.
- 171- Liatsis M et al. Serum immunoglobulin G subclasses in healthy infants and children in Greece. *Eur J Epidemiol.* 1997; 13(2):151-155p.
- 172- Apampa OO et al. Serum levels of immunoglobulin G subclasses in Nigerians. *Trop Geogr Med.* 1980; 32(1):50-52p.
- 173- Berkel I A et al. Serum immunoglobulin G subclass values in healthy Turkish children and adults. *Turk J Pediatr.* 1994; 36(3):197-204p.
- 174- Fujimura, M D. Níveis séricos das subclasses de imunoglobulina G (IgG) em crianças normais e nefróticas.[Tese de Doutorado]. São Paulo. Pós- graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 1990.
- 175- Carlson K-H et al. Serum immunoglobulin G subclasses and serum immunoglobulin A in healthy Norwegian children and adults. *Pediatric Allergy and Immunology.* 1992; 3(3), 134–139p.
- 176- Henry J. The IFCC recommendations for determining reference intervals: strengths and limitations. *J Lab Med.* 2009; 33 (2): 45-51p.
- 177- Horowitz GL, Altaie S, Boyd J et al. Defining, establishing and verifying reference intervals in Clinical Laboratory. Approved Guideline – C28-A3.2008. Vol 28 n° 30. 1-59p.
- 178- Blirup-Jensen S. Protein Standardization III: Method Optimization Basic Principles for Quantitative Determination of Human Serum

Proteins on Automated Instruments Based on Turbidimetry or Nephelometry. *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39 (11): 1098-1109p.

179- Sorensen R, Hidalgo H, Moore C, Leiva LE. Post-immunization pneumococcal antibody titers and IgG subclasses. *Pediatr Pulmonol* 1996; 22: 167- 73

180- Borgers H, Moens L, Picard C, Jeurissen A, Raes M, Sauer K, Proesmans M, De Boeck K, Casanova JL, Meyts I, Bossuyt X. Laboratory diagnosis of specific antibody deficiency to pneumococcal capsular polysaccharide antigens by multiplexed bead assay. *Clin Immunol.* 2010 Feb; 134(2):198-205.

10. ANEXOS.