

Subclasses de IgG: Reavaliação Após Seis Meses da sua Quantificação num Laboratório de Imunologia ⁽¹⁾

LUÍS DELGADO*, M. ABÍLIA BODAS**, M. JOÃO CARDOSO***, J.A. FLEMING TORRINHA**** - Porto, Portugal

RESUMO

Os isotipos das imunoglobulinas têm diferente predomínio e funções na resposta humoral a diferentes antígenos e mesmo em distintos compartimentos orgânicos. Estas diferenças podem reflectir-se parcialmente nos seus níveis séricos em diferentes situações patológicas. Têm sido descritas numerosas situações clínicas que se associam a deficiências de subclasses de IgG, mas a importância clínica da sua quantificação não está ainda estabelecida, em parte porque só recentemente os reagentes comerciais para a sua quantificação foram disponibilizados. Neste trabalho revemos os primeiros 96 pedidos de quantificação de subclasses de IgG no nosso laboratório, realizados num período de seis meses, dos quais 69 (72%) eram de doentes com menos de 15 anos. Utilizámos um método comercial de imunodifusão radial de diluição única, com leitura às 72 horas, calibrado com um soro humano estandardizado às preparações WHO 67/97 e UK SPS-01. Para os adultos os resultados foram comparados com valores de referência do fabricante e também com os valores publicados para as suas concentrações relativas (%); nas crianças valores abaixo de dois desvios padrões de valores de referência publicados foram considerados deficitários. Nesta população, as infecções ou

doenças respiratórias constituíram diagnóstico clínico mais frequente (37,7%), sendo as infecções recorrentes - 31,8% (52,9% nas crianças) e as imunodeficiências 31,6% (63,0% nos adultos) as principais causas clínicas para a quantificação das subclasses de IgG. Nos adultos, apesar de apenas 2/27 doentes (7,4%) terem níveis baixos de IgG1, a baixa relativa de uma ou mais subclasses de IgG foram muito frequentes (77,7%), especialmente nos doentes com SIDA (11/14). Nas crianças verificámos 9 casos (13,0%) de défices isolados: 2/8 com patologia respiratória (25%), 3/18 com infecções recorrentes (16,7%), 3/35 (8,9%) com cardiopatias congénitas e um associado com uma deficiência sintomática de IgA. A alteração mais frequentemente encontrada foi a baixa de IgG2, quer em crianças (6/10 casos) quer nas deficiências relativas encontradas nos doentes com SIDA (8/11 casos). Em conclusão, as infecções e doenças respiratórias parecem ser a principal preocupação do clínico ao requisitar a quantificação de subclasses de IgG. Apesar da diminuição dos níveis de subclasses de IgG e, especialmente, das suas proporções relativas, serem relativamente frequentes em soros patológicos, a definição mais precisa do significado clínico das baixas de subclasses de IgG aguarda estudos futuros.

PALAVRAS-CHAVE: Subclasses de IgG, imunodeficiências, SIDA.

SUMMARY

Immunoglobulin isotypes have different effector functions and predominance in the antibody response to different antigens, and within distinct local body environments. These differences can be partially reflected in their serum levels in disease states. To date, many clinical associations of IgG subclasses deficiencies have been described, but the clinical

* Assistente de Imunologia da Faculdade de Medicina do Porto. Assistente Hospitalar de Imunoalergologia do Serviço de Imunologia.

** Assistente Hospitalar de Imunologia do Serviço de Imunologia.

*** Interna Complementar de Patologia Clínica do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de S. João.

**** Professor Catedrático de Imunologia da Faculdade de Medicina do Porto. Director do Serviço de Imunologia do Hospital de S. João, Porto.

(1)

Trabalho apresentado na XVIII Reunião da Sociedade Portuguesa de Imunologia, 9.ªs Jornadas de Actualização em Imunologia: imunobiologia da infecção por retrovírus. Porto, Novembro de 1992.

relevance of their quantification is still unclear, in part because commercial reagents only recently became available to the clinical laboratory. We reviewed the first 96 requests of IgG subclasses quantification in our laboratory, performed in a period of 6 months, of which 69 were from patients under 15 years. A commercial single-dilution radial immunodiffusion method was used, with end point reading at 72h, calibrated with a human serum standardized to the WHO 67/97 and UK SPS-01 preparations. For adult patients results were compared to reference ranges provided by the manufacture, and also to their published relative concentrations (%); in children levels below 2 s.d. of published reference mean values were considered deficient. In this population respiratory diseases or infections comprised the majority of the clinical diagnosis (37.7%) and the most frequent causes for IgG subclasses quantification were recurrent infections - 31.8% (52.9% in children) or immunodeficiencies - 31.6% (63.0% in adults). Although only 2/27 adult patients (7.4%) had subnormal levels of IgG1, the relative decrease of one or more of the IgG subclasses were very frequent (77.7%), specially in AIDS patients (11/14). In children, 9 cases (13.0%) of isolated subclass deficiency were found: 2/8 with respiratory disease (25.0%), 3/18 with recurrent infections (16.7%), 3/35 with congenital heart diseases (8.9%), and one associated with IgA deficiency. Low IgG2 levels was the most common abnormality, both in children (6/10 cases) and in the relative decreases found in adult AIDS patients (8/11 cases). In conclusion, respiratory diseases and infections seem to be a major concern of the clinician for the request of IgG subclass quantification. Although the decrease of IgG subclass levels and, specially, of their relative proportions, is frequent in pathological sera, the definition of the clinical relevance of low IgG subclasses awaits further studies.

KEY-WORDS: *IgG subclasses, immunodeficiencies, AIDS.*

INTRODUÇÃO

A identificação de quatro subclasses da Imunoglobulina G na espécie humana data da década de 60, a partir de trabalhos de caracterização imunoquímica de proteínas de mieloma (revisto na referência 1). Em 1970 é descrita pela primeira vez a associação de défices selectivos das subclasses de IgG e infecções piogénicas recorrentes.² Desde essa data têm sido descritas numerosas patologias que se

associam a défices destas subclasses (revisto na referência 3) sendo, no entanto, a associação do défice selectivo de IgG2 com infecções repetidas por bactérias capsuladas a única entidade clinicamente bem definida.⁴

As quatro subclasses de IgG humana, numeradas pela ordem da sua concentração sérica e frequência de aparecimento como paraproteínas de mielomas (i.e. IgG1>IgG2>IgG3>IgG4), têm uma homologia de cerca de 95% na sequência de aminoácidos que constituem a sua cadeia pesada gama, encontrando-se a maior diversidade dessa cadeia na região charneira da imunoglobulina.⁵ A esta heterogeneidade na cadeia pesada correspondem diferentes propriedades biológicas das quatro subclasses (revisto na referência 6), particularmente relacionadas com a sua interacção com os sistemas de ampliação da resposta humoral - receptores celulares para o fragmento Fc⁷ e sistema do complemento. Para além dessa diversidade estrutural e funcional as diferentes subclasses têm diferente domínio na resposta aos antígenos - p.ex. a IgG1 e a IgG3 predominam na resposta a antígenos proteicos víricos⁸ ou bacterianos e a IgG2 aos polissacarídeos bacterianos⁹ - e mesmo em diferentes locais do organismo.^{3,10}

Apesar de estarem descritos défices de subclasses de IgG em indivíduos perfeitamente saudáveis¹¹ eles estão mais habitualmente associados a infecções crónicas de repetição, particularmente do foro respiratório.¹² Por outro lado, o aparecimento mais recente na literatura de estudos controlados que comprovam a melhoria clínica destes doentes quando submetidos à ministração parentérica de imunoglobulinas,^{11,13} a par de uma disponibilidade crescente de reagentes comerciais para a quantificação das subclasses de IgG, tem redobrado o interesse clínico do seu doseamento em situações patológicas.

Assim, neste estudo, procurámos analisar os diagnósticos clínicos que justificaram o pedido de doseamento das subclasses de IgG nos primeiros seis meses da sua quantificação de rotina no nosso laboratório. Procurámos, também, avaliar globalmente a adequação desses pedidos pela presença de défices absolutos ou relativos das diferentes subclasses nas amostras estudadas. Não foi nosso objectivo validar individualmente o significado clínico das alterações encontradas mas, tão somente, perspectivar as diferentes situações patológicas que levam o clínico a solicitar o doseamento das subclasses de IgG em meio hospitalar. Podemos concluir que a patologia respiratória, de natureza infecciosa ou não, foi o principal motivo para essa quantificação, sendo a baixa de IgG2 a alteração mais frequentemente encontrada.

MATERIAL E MÉTODOS

Analisámos 96 pedidos de doseamento de subclasses de IgG, realizados entre Janeiro e Junho de 1992, correspondendo à seguinte população: 69 indivíduos com menos de 15 anos (72%), 53 do sexo masculino (55%) e 43 do sexo feminino.

Para a quantificação das subclasses de IgG foi utilizado um método de imunodifusão radial (RID) a uma diluição, com leitura às 72 horas,¹⁴ que utiliza um soro humano padrão calibrado à preparação WHO 67/97 e à UK SPS-01 e antissoros policlonais mono-específicos em gel de agarose. Os resultados obtidos foram comparados no adulto com valores de referência do fabricante e também com os valores publicados para as suas concentrações relativas:¹⁵ IgG1 60,3 a 71,3%, IgG2 19,4 a 31,0%, IgG3 5,0 a 8,4% e IgG4 0,7 a 4,2%. Nas crianças valores abaixo de dois desvios padrões de valores de referência publicados¹⁶ foram considerados deficitários.

RESULTADOS

Doseamento de subclasses de IgG em Adultos

Analisando os diagnósticos que justificaram o pedido de doseamento de subclasses de IgG nos 27 indivíduos com mais de 15 anos, verificámos que a maioria se deveu a imunodeficiência (63% dos pedidos) ou infecções de repetição (14,8%).

Encontrámos apenas dois casos com diminuição dos valores absolutos de IgG1 (i.e. <3,15 g/l) - um com o diagnóstico de Imunodeficiência Comum Variável e outro com um abscesso pulmonar e infecções respiratórias de repetição. No entanto, os défices das proporções relativas (percentuais) de uma ou mais das subclasses foram muito frequentes, estando presentes em 21 casos, i.e. 77,7% dos pedidos. A maior parte dos casos com défices relativos (13 de 21) tinham o diagnóstico de imunodeficiência: 11 de S.I.D.A., 1 de Imunodeficiência Comum Variável e 1 de défice de C4. A proporção desses défices relativos por grupos de diagnóstico está representada na Figura 1.

Doseamento de subclasses de IgG em Crianças

Nos 69 pedidos de doseamento relativos a indivíduos com menos de 15 anos estavam incluídos 35 casos de crianças com cardiopatias congénitas, que foram seleccionadas especificamente pelo médico assistente para a avaliação dos níveis de subclasses de IgG. Dos restantes 34 casos os principais diagnósticos que justificaram esse doseamento foram as infecções de repetição (52,9%) e a patologia respiratória (23,5%).

Comparando os resultados individuais com os valores de referência publicados,¹⁶ encontrámos 9 casos

DÉFICES RELATIVOS DAS SUBCLASSES DE IgG (% DA IgG TOTAL) NOS 27 CASOS COM MAIS DE 15 ANOS

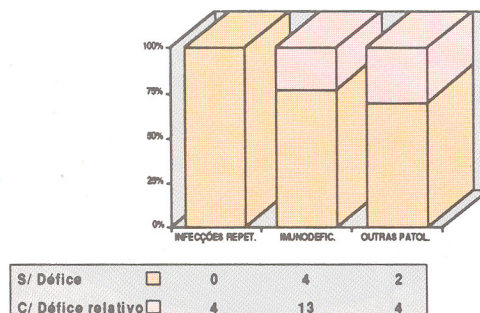


Figura 1 - A percentagem de défices encontrados estão representados no gráfico por grupos de diagnóstico.

com valores de uma das subclasses abaixo dos dois desvios padrões da média do respectivo grupo etário (6 de IgG2 e 3 IgG1). Um caso de hipogamaglobulinemia transitória da infância apresentou valores indeseáveis de IgG2 e IgG4. A proporção dos défices encontrados nos diferentes grupos de diagnóstico, nos indivíduos abaixo dos 15 anos está representada na Figura 2.

DÉFICES DAS SUBCLASSES DE IgG NOS 69 CASOS COM MENOS DE 15 ANOS.

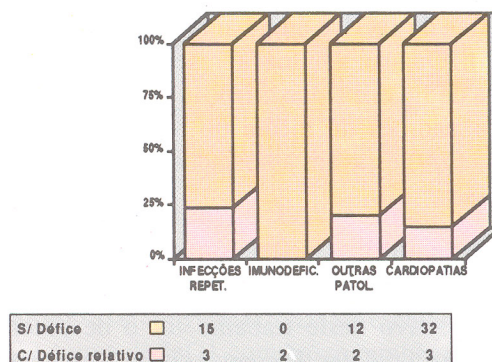


Figura 2 - A percentagem de défices encontrados (< 2 desvios padrão dos valores médios de referência, em g/L) estão representadas no gráfico por grupos de diagnóstico.

Na globalidade dos 96 pedidos analisados, e excluindo os 35 doentes com cardiopatias congénitas, as infecções ou doenças respiratórias constituíram o mais frequente diagnóstico clínico (23 de 61 pedidos, i.e. 37,7%).

Défices encontrados nas diferentes subclasses de IgG

A baixa de IgG2 foi a alteração mais frequentemente encontrada, quer nas crianças, quer nos défices relativos na população adulta (Figura 3).

de normalidade e de cálculo dos resultados globais, número inadequado de casos e mesmo diferenças genéticas, como p.ex. os alotipos Gm que influenciam os níveis das subclasses de IgG.^{6, 11, 15}

Esta dificuldade é reconhecidamente maior para a IgG4 pois até cerca de 15 a 20% dos indivíduos normais podem não ter IgG4 doseável por RID ou mesmo ELISA,^{3, 6, 20} pelo que um défice isolado de IgG4 é difícil de valorizar. Por outro lado parece não haver uma correlação perfeita entre a clínica e uma dada concentração de uma subclasse⁶ pois se pode haver indivíduos com ausência total de uma subclasse e totalmente assintomáticos, os indivíduos com infecções de repetição têm, com certa frequência, valores entre -1 e -3 desvios padrões da média.¹¹ Neste momento, valores abaixo dos limites normais das referências publicadas deverão sugerir, mas não diagnosticar por si só, um défice de imunidade humoral.⁶ Nesse contexto determinações em tempos diferentes que confirmem esse défice e o estudo da resposta humoral pós-vacinação, poderão dar informações relevantes.^{11, 21}

No adulto, apesar de variações importantes dos níveis séricos, as proporções relativas das diferentes subclasses apresentam limites relativamente estreitos,^{3, 15} pelo que, na população adulta que estudámos, analisámos não só os valores absolutos mas também os valores percentuais obtidos. Apenas dois casos apresentaram défice de IgG1 no seu valor absoluto, ambos com hipogamaglobulinemia e um quadro clínico dominado por infecções respiratórias, como aliás é característico desta deficiência (um caso de hipogamaglobulinemia comum variável e outro de um abcesso pulmonar). Os défices relativos de várias subclasses foram, nestes soros patológicos, muito frequentes. Apesar do significado clínico destas baixas relativas em indivíduos adultos ser difícil de estabelecer, a maior parte delas estavam associadas a imunodeficiências, como também tem sido observado em défices absolutos.^{6, 20} Assim, dos 14 doentes adultos com o diagnóstico de S.I.D.A. 11 tinham baixas relativas de uma ou mais subclasses, 8 dos quais de IgG2; de facto, apesar da hipergamaglobulinemia característica desta imunodeficiência, está bem descrita a sua associação a deficiência da IgG2, quer no adulto²² quer na criança.²³ As quatro deficiências relativas de IgG3 encontradas nos adultos estavam associadas a baixa relativa de outras subclasses e três delas a patologia respiratória: um caso de asma brônquica, um de bronquiectasias e outro de infecções respiratórias de repetição. Este perfil clínico é também o habitualmente observado nos défices absolutos de IgG.^{3, 6, 11}

Na criança, os valores normais das subclasses da IgG só se aproximam dos do adulto na puberdade^{16, 24} e em tempos diferentes: a IgG1 entre os 5-7 anos, a IgG3 pelos 7-9 anos, a IgG2 pelos 8-10 anos e a IgG4 entre os 9-11 anos. De entre os pedidos de doseamento de subclasses de IgG que analisámos, respeitantes a indivíduos com menos de 15 anos, e excluindo os indivíduos estudados por cardiopatias congénitas, predominam os diagnósticos de infecções de repetição (Fig. 2) e patologia respiratória (23,%%), que constituem, de facto, o espectro clínico mais habitual dos défices de subclasses de IgG em Pediatria.^{12, 20}

Neste grupo etário a valorização dos resultados da quantificação das subclasses de IgG é seguramente prejudicado pela ausência de valores de referência para as crianças com o método utilizado. Por esse facto, optámos pela comparação dos resultados com uma das séries publicadas,¹⁶ cujos resultados foram obtidos em 20 adultos e 182 crianças estratificadas pela idade, com outro método de difusão em gelose (electroimunodifusão). Os resultados desse estudo aproximam-se, em média, de outros obtidos por radioimunoensaio,²² excepto para a IgG4 cuja valorização clínica continua a ser controversa.^{3, 6} Por outro lado, os valores de referência deste estudo têm sido também utilizados com êxito na definição de estratégias terapêuticas de substituição.^{11, 13}

Utilizando estes valores de referência encontramos seis casos de défice selectivo de IgG2, o défice mais frequentemente observado em crianças,^{6, 11, 17} e três de IgG1. Destes, dois acompanhavam-se de baixa de IgG3 (< 1 desvio padrão) e outro de IgG4 numa criança com défice de IgA e uma infecção pulmonar grave, numa associação que tem sido amplamente reconhecida.^{6, 17, 20} Das 35 crianças com cardiopatias congénitas, duas apresentaram défice de IgG2 e uma de IgG1 com baixa também de IgG3. A associação de défices de subclasses de IgG e de outros parâmetros imunológicos foi já reconhecida em crianças com cardiopatias congénitas,²⁵ podendo contribuir, em parte, para a sua maior susceptibilidade às infecções.

Em conclusão, nesta revisão de seis meses da quantificação das subclasses da IgG num Laboratório de Imunologia, podemos verificar que as infecções e doenças respiratórias são a principal preocupação do clínico ao requisitar, em meio hospitalar, a quantificação de subclasses de IgG. Confirmámos, também, ser a IgG2 a subclasse que mais frequentemente se encontra em défice e a dificuldade de valorização dos níveis de IgG4. Apesar da elevada frequência de alterações nas proporções relativas das diferentes subclasses,

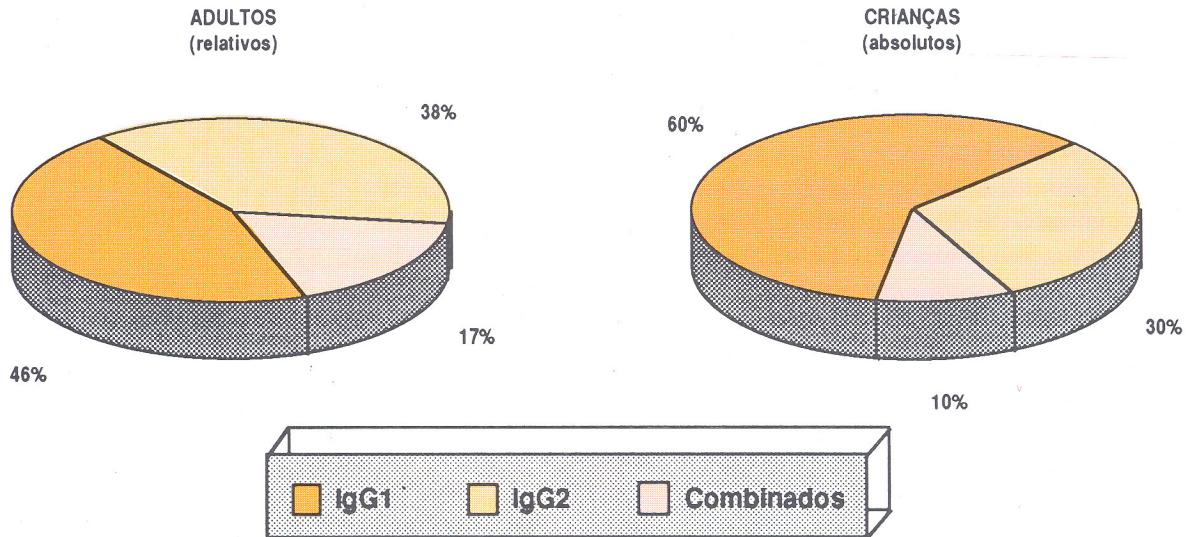


Figura 3 - Défices encontrados nas diferentes subclasses de IgG. Nos adultos estão representados os défices relativos (% da IgG total) e nas crianças os défices absolutos (< 2 desvios padrão dos valores médios de referência, em g/L).

Dos pedidos relativos a 14 doentes com S.I.D.A., oito tinham baixas relativas da IgG2 e três da IgG1. Num adulto com o diagnóstico de défice de C4 e Artrite Reumatóide verificou-se um défice relativo de IgG1. Por fim, numa criança com o diagnóstico de défice de IgA e infecção pulmonar grave encontramos um défice da IgG1 e uma baixa de IgG4 (< 1 desvio padrão). Quatro adultos apresentaram diminuição relativa de IgG3 e cinco crianças valores entre -1 e -2 desvios padrões da média de referência; destes, a maioria (7/9) estavam associados a défices de outras subclasses.

DISCUSSÃO

O objectivo deste trabalho foi o de obter uma perspectiva geral das diferentes situações patológicas que levam o clínico a solicitar o doseamento das subclasses de IgG em meio hospitalar, sem pretender validar individualmente o significado clínico dos défices encontrados. A quantificação de subclasses de IgG está particularmente indicada na suspeita de imunodeficiência, em indivíduos com história de infecções recorrentes por bactérias capsuladas, mesmo na presença de valores normais de IgG total, e sobretudo se se apresentam com infecções sinopulmonares repetidas.^{4,17} Na casuística que analisámos, e excluindo um grupo de doentes com cardiopatias congénitas que foram especificamente estudados nesse período, a história de infecções de repetição, imunodeficiências ou patologia respiratória estavam presentes na maior parte dos casos (Fig. 1 e 2).

Vários métodos têm sido utilizados para a quantificação de subclasses de IgG.¹⁸ No nosso laboratório utilizamos um método comercializado de imunodifusão radial (IDR), com um soro padrão calibrado a um soro de referência da Organização Mundial de Saúde (WHO 67/97) e a outro do Reino Unido (UK SPS-01). As vantagens deste método, apesar de uma menor sensibilidade que os métodos imunoenzimáticos (ELISA), é a sua fácil execução sem equipamento dispendioso, a necessidade de menor número de diluições que os métodos ELISA, os quais têm, habitualmente, curvas de referência com intervalos de doseamento relativamente estreitos. Por outro lado, o método IDR utilizado tem uma pequena variação intra e inter-ensaio (1% de acordo com o fabricante) e, num estudo de 1990 do College of American Pathologists (citado na ref.^a 14), apresentou um coeficiente de variação interlaboratório aceitável e inferior a 20%.

Independentemente das vantagens e desvantagens de cada método uma dificuldade comum à quantificação das subclasses da IgG é a valorização dos resultados, i.e., definir o que é um défice. Em termos quantitativos um défice de uma subclasse deverá ser ou a sua ausência completa ou um valor inferior às variações de um grupo controlo normal, do mesmo grupo etário.³ No entanto, em vários estudos realizados em populações normais os valores séricos obtidos têm diferenças consideráveis e muitas vezes uma distribuição não gaussiana, particularmente no caso da IgG4.^{6, 15, 16, 19} Essas diferenças podem ser devidas a diferentes antissoros e técnicas de doseamento, diferentes critérios

encontradas na população adulta estudada, a definição mais precisa do seu significado clínico aguarda estudos futuros.

BIBLIOGRAFIA

1. Natvig JB, Forre O. The initial recognition of IgG subclasses. *Monogr Allergy*. 1986; 19: 1-6.
2. Schur PH, Borel H, Gelfand EW, Alper CA, Rosen FS. Selective gamma G globulin deficiencies in patients with recurrent pyogenic infections. *N Engl J Med*. 1970; 283: 631-3.
3. Jefferis R, Kumararatne DS. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin exp Immunol*. 1990; 81: 357-67.
4. Second IUIS/WHO Report. Laboratory investigation in clinical immunology: methods, pitfalls and clinical indications. *Clin exp Immunol*. 1988; 74: 494-503.
5. Burton DR, Gregory J, Jefferis R. Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. *Monogr Allergy*. 1986; 19: 7-35.
6. Huston DP, Kavanaugh AF, Rohane PW, Huston MM. Immunoglobulin deficiency syndromes and therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1991; 87, 1 (part 1): 1-17.
7. Ravetch JV, Kinet J-P. Fc receptors. *Ann Rev Immunol*. 1991; 9: 457-92.
8. Skvaril F. IgG subclasses in viral infections. *Monogr Allergy*. 1986; 19: 134-43.
9. Hammarstrom L, Smith CIE. IgG subclasses in bacterial infections. *Monogr Allergy*. 1986; 19: 122-33.
10. Reynolds HY. Immunoglobulin G and its function in the human respiratory tract. *Mayo Clinic Proc*. 1988; 63: 161-74.
11. Hanson LA, Fasth A. IgG subclasses deficiencies. *Current Opinion in Pediatrics*. 1991; 3: 863-6.
12. Goldbatt D, Morgan G, Seymour ND, Strobel S, Turner MW, Levinsky. The clinical manifestations of IgG subclass deficiency. In: Levinsky RJ, eds. *IgG Subclass Deficiencies. International Congress and Symposium Series 143*. London: Royal Society of Medicine Services Ltd, 1989; 19-26.
13. Soderstrom T, Soderstrom R, Eskog A. Immunoglobulin subclasses and prophylactic use of immunoglobulin in immunoglobulin G subclass deficiency. *Cancer*. 1991; 68 (6 Suppl 1): 1426-9.
14. Check IJ, Piper M, Papadea C. Immunoglobulin quantification. In: Rose NR, Macario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1992; 12: 71-83.
15. French M. Serum IgG subclasses in normal adults. *Monogr Allergy*. 1986; 19: 100-7.
16. Oxelius VA. IgG subclass levels in infancy and childhood. *Acta Paediatr Scand*. 1979; 68: 23-7.
17. Schackelford PG, Polmar SH, Mayus JL, Johnson WL, Corry JM, Nahm MH. Spectrum of IgG2 subclass deficiency in children with recurrent infections: a prospective study. *J Pediatr*. 1986; 108 (1): 647-53.
18. Djurup R, Weeke B. Methods of detecting IgG subclass proteins and antibodies. *Monogr Allergy*. 1986; 19: 86-99.
19. Rodrigo MJ, Codina R, de-Gracia J, Morell F, Pascual C. [Normal values of the immunoglobulin G subclasses in an adult population. Importance in a study of their deficiency]. *Med Clin Barc*. 1992; 98 (5): 166-70.
20. Shyur S-D, Hill HR. Immunodeficiency in the 1990s. *Pediatr Infect Dis J*. 1991; 10: 595-611.
21. Ugazio AG, Duss M, Notarangelo LD. Intravenous immunoglobulin and immunodeficiency in children. *Current Opin Ped*. 1989; 1: 5-12.
22. Parkin JM. IgG2 subclass deficiency and pyogenic infection in patients with HIV-related disease. In: Levinsky RJ, eds. *IgG Subclass Deficiencies. International Congress and Symposium Series 143*. London: Royal Society of Medicine Services Ltd, 1989; 37-41.
23. Roilides E, Black C, Reimer C, Rubin M, Venzon D, Pizzo PA. Serum immunoglobulin G subclasses in children infected with human immunodeficiency virus type 1. *Pediatr Infect Dis J*. 1991; 10 (2): 134-9.
24. Lee SI, Heiner DC, Wara D. Development of serum IgG subclass levels in children. *Monogr Allergy*. 1986; 19: 108-21.
25. Radford DJ, Thong YH, Beard LJ, Ferrante A. IgG subclass deficiency in children with congenital heart disease. *Pediatr Allergy Immunol*. 1990; 1: 41-5.