

## **AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE INATA DE PACIENTES COM INFECÇÃO BACTERIANA GRAVE**

Camila de Hollanda Cavalcanti Cordeiro Dias<sup>1</sup>; Alexandra Karla Santos Barreto<sup>2</sup>; Jailson de Barros Correia<sup>3</sup>; Marina Cadena da Matta<sup>4</sup>; Ana Carla Moura<sup>5</sup>; Paula Lyra<sup>6</sup>; Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte<sup>3</sup>; Leuridan Cavalcante Torres<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Aluna do curso de graduação de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco e bolsista do Programa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

<sup>2</sup> Aluna do curso de graduação de Farmácia da Faculdade Maurício de Nassau

<sup>3</sup> Docente da Pós-graduação stricto sensu do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP

<sup>4</sup> Mestranda da Pós-graduação em Saúde Materno Infantil.

<sup>5</sup> Médica Pediatra do IMIP e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

<sup>6</sup> Médica Pediatra do IMIP e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

Autor correspondente: leuridan.torres@gmail.com

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento: CNPq (Processo No. 476624/2011-8).

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar a imunidade inata de pacientes com infecção bacteriana grave. **Métodos:** Foi realizada a avaliação laboratorial em 54 pacientes (crianças e adultos) acompanhados no Ambulatório de Imunologia do IMIP. Foi realizada a imunofenotipagem de Linfócitos T, B e NK por citometria de fluxo. Para avaliar a função microbicida de fagócitos, foi realizado o teste de fagocitose e a dosagem de ânion superóxido, utilizando *Phagotest e Phagoburst kit* (Orpegen Pharma, Heidelberg), respectivamente e conforme instrução do fabricante **Resultados:** Verificou-se que os pacientes apresentam contagem global e diferencial de leucócitos dentro dos valores de normalidade. Dos 54 pacientes avaliados, 10 apresentaram deficiência de células T, B e NK, e 2 pacientes apresentaram apenas deficiência de células NK. Quanto à produção de ânion superóxido por neutrófilos, detectamos 5 pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC). Na análise quantitativa de fagocitose, verificou-se que os pacientes não apresentaram defeitos de fagocitose por neutrófilos e monócitos **Conclusão:** Na avaliação imunológica, verificou-se que 5,4% dos pacientes apresentaram defeitos de células T, B e NK, 1,1% apenas com deficiência de células NK e 2,7% Doença Granulomatosa Crônica (DGC). A realização de testes laboratoriais para investigação da imunidade inata em pacientes com infecções bacterianas graves e/ou de repetição é de suma importância para elevar as taxas de detecção de imunodeficiências primárias no Estado de Pernambuco. Com o presente projeto, foi possível realizar o diagnóstico de 5 pacientes com DGC, o que propiciou o tratamento adequado e o aconselhamento genético da família.

**Palavras-chave:** infecções bacterianas, imunodeficiências, imunidade inata

## **ABSTRACT**

**Aim:** To evaluate the clinical manifestations and the microbicidal function of phagocytes from patients with severe bacterial infections. **Methods:** Laboratory testing was performed in 54 patients (children and adults) accompanied at Immunology IMIP. Immunophenotyping of T, B and NK cells was performed by flow cytometry. To evaluate the phagocyte function, the test of phagocytosis and superoxide anion was performed using Phagotest and Phagoburst kit (ORPEGEN Pharma, Heidelberg), respectively and according to manufacturer's instructions. **Results:** The patients presented normal values of total leukocytes. Of the 54 patients evaluated, 10 presented of T, B and NK cell deficiency. In production of superoxide anion by neutrophils, we detected 5 patients with Chronic Granulomatous Disease (CGD). The quantitative analysis of phagocytosis, it was found that the patients did not show defects in phagocytosis by neutrophils and monocytes. **Conclusion:** In the immunological evaluation, it was found that 5.4% of patients presented defects in T, B and NK cells, 1.1% defective NK cells and 2.7% Granulomatous Chronic Disease (CGD). The laboratory testing for investigation of innate immunity in patients with severe and / or recurrent bacterial infections is a paramount importance to increase the detection rates of primary immunodeficiencies at Pernambuco (Brazil). With this project, it was possible to make the diagnosis of 5 patients with CGD, which allowed proper treatment and genetic counseling of the family.

**Keywords:** bacterial infections, immunodeficiency, innate immunity

## 1.INTRODUÇÃO

As Imunodeficiências Primárias (IDPs) são resultantes de defeitos genéticos das funções celulares do sistema imunológico, um grupo heterogêneo de doenças hereditárias que podem envolver um ou múltiplos componentes do sistema imune. Na maioria dos casos as Imunodeficiências Primárias (IDP) são desordens monogênicas que seguem a herança Mendeliana, entretanto algumas IDPs são de origem poligênica (MADKAIKAR, et al., DAVID et. al., WEBSTER et al.). Foi descrita pela primeira vez em 1952, e atualmente existe mais 180 IDPs conhecidas, cujos defeitos genéticos foram devidamente identificados. Embora as IDPs fossem originalmente estudadas como raras, elas são muito mais comuns do que previamente relatado, sendo as infecções recorrentes como as principais manifestações dessas doenças hereditárias (LILY & LEIVA, ZELAZCO et al., OLEASTRO et al.). Elas são classificadas de acordo com o braço da resposta imune que se encontra afetada (tabela 1). A detecção precoce de IDP, antes de infecções que possam comprometer as condições gerais do paciente, é importante para o bom prognóstico e para um oportuno aconselhamento genético da família. Essenciais para salvar a vida e implementar o tratamento adequado. (MADKAIKAR et al., ALATAKI, et al., AGHAMOHAMMADI et al). As infecções bacterianas recorrentes podem ser causadas por diversos fatores, incluindo inflamações e anormalidades anatômicas e funcionais, como infecções no trato respiratório, refluxo gastrointestinal e doenças do coração. As IDPs são condições desafiadoras em contexto dos cuidados primários, onde os médicos muitas vezes encontram pacientes portadores de um histórico de infecções recorrentes. (KUIJPERS et al., HOLLAND et al., AGHAMOHAMMADI et al).

**Tabela 1:** Principais IDP associadas com infecções por bactérias piogênicas e/ou *S. aureus*, de acordo com o comitê de especialistas “*The International Union Societies (IUIS) on Primary Immunodeficiencies*”

Doença	Células afetadas	Fatores associados	Gene envolvido e/ou patogênese	Frequência relativa de IDP
Deficiência de MyD88	Linfócitos e Monócitos	Infecção bacteriana (piogênica)	MyD88 (um componente associado à via de sinalização de <i>Toll Like Receptors</i> (TLR) e receptor de IL-1)	Muito rara
<b>Deficiência no receptor de IL-1 associada a quinase 4 (IRAK4)</b>	<b>Linfócitos e Monócitos</b>	<b>Infecção bacteriana (piogênica)</b>	<b>IRAK 4 (um componente associado à via de sinalização de <i>Toll Like Receptors</i> (TLR) e receptor de IL-1)</b>	<b>Muito rara</b>
Síndrome da Hiper-IgF	Linfócitos, Monócitos e Neutrófilos – Defeitos na sinalização via IL6, IL10, IL22, IL23	Eczema, osteoporose, infecção bacteriana da pele e pulmão	STAT3	Rara
<b>Deficiência de TYK2</b>	<b>Linfócitos, Monócitos e Neutrófilos. Defeitos na sinalização via IL6, IL10, IL12, IL23, IFN<math>\alpha</math> e <math>\beta</math></b>	<b>Abscessos causado por <i>S. aureus</i>; candidíase; susceptibilidade a bactéria intracelular</b>	<b>TYK2</b>	<b>Extremamente rara</b>
a)AD-HIES (Síndrome de Job)	Diminuído número de células circulantes TH17 normal; Elevada concentração sérica de IgE e baixa produção outras classes de anticorpos	Eczema, osteoporose, infecções bacterianas da pele e pulmão/abscessos recorrentes) causadas por <i>S. aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	Mutação heterozigota em STAT3	Rara
<b>IRAK-HIES + Deficiência de DOCK8</b>	<b>Redução número circulantes de célula T e B; elevada produção de IgE e baixa de IgM</b>	<b>Infecções respiratórias recidivantes; extensa infecção estafilocócica e viral cutânea, entre outros.</b>	<b>Mutação em DOCK8</b>	<b>Muito rara</b>
Deficiência do ligante de CD40 e receptor CD40	Diminuída concentração de IgG e IgA; IgM normal ou elevada	Infecções oportunistas, neutropenias, entre outros	Mutação no receptor CD40L e CD40, respectivamente	Rara e extremamente rara, respectivamente.
<b>Deficiência do componente C3 do sistema complemento</b>	<b>Defeitos na atividade hemolítica bactericida e na resposta imunológica.</b>	<b>Infecções piogênicas recorrentes</b>	<b>C3</b>	<b>Muito rara</b>

Os principais sinais de alerta para crianças e adultos são baseados nos principais sintomas clínicos, assim como históricos familiares. *Jeffrey Modell Foundation* apresentou uma lista com os 10 sinais de alerta para IDPs, com sensibilidade de 56% e especificidade de 16% (tabela 2). As suspeitas dessas desordens devem acontecer a partir de infecções recorrentes complicadas, multi localizadas e resistente a tratamentos (CARVALHO, et al., ). O diagnóstico precoce e o tratamento adequado é padrão ouro para o sucesso da sobrevivência e melhor qualidade de vida.

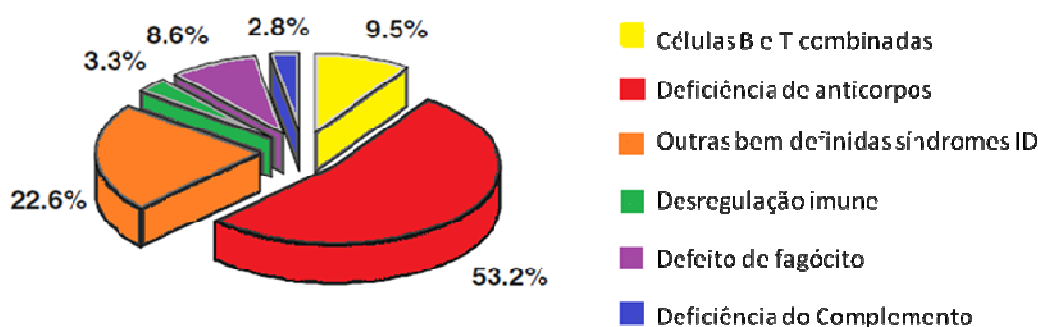
**Tabela 2:** Os 10 Sinais de Alerta para Imunodeficiências Primárias na Criança, de acordo com a *Jeffrey Modell Foundation*, EUA, 1996

- 
1. Oito ou mais novas Otites em um ano
  2. Duas ou mais Sinusites em um ano
  3. Duas ou mais Pneumonias em um ano
  4. Dois meses ou mais de antibioticoterapia sem efeito
  5. Dificuldade de crescer ou ganhar peso em lactentes
  6. **Abcessos cutâneos ou viscerais recorrentes**
  7. Monilíase persistente após um ano de idade
  8. Necessidade de antibioticoterapia para tratar infecção
  9. **Infecções sistêmicas graves (meningites, osteomielites, septicemias)**
  10. História familiar de imunodeficiência
- 

fonte: Conley & Stiehm, 1996

Com o passar dos tempos, o elevado grau de conhecimento na área das IDPs tem colaborado de forma fundamental para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares do sistema imune nos seres humanos. Com isso, os estudos crescentes nesta área de pesquisa colabora com a melhoria de qualidade de vida de pacientes adultos e crianças. (ARKWRIGHT & GENNERY). As Imunodeficiências Primária e Secundárias fazem parte das doenças crônicas mais comuns da infância nos países desenvolvidos, enquanto nos países subdesenvolvidos, especialmente nas regiões mais pobres, o conhecimento a respeito das mesmas ainda se encontra escasso, conseqüentemente há pouco investimento nos diagnósticos e muitos pacientes deixam de ser tratados, acarretando, em casos mais graves ao óbito, sem que haja a identificação da doença de base. (LILY & LEIVA, ZELAZCO et a., OLEASTRO et al). As infecções bacterianas de repetição e/ou graves são fundamentais para a suspeita de imunodeficiências. Como uma das categorias das IDPs, a fagocitose é um importante mecanismo da imunidade inata contra bactérias extracelulares. Os neutrófilos que são responsáveis por essa fagocitose, são de extrema importância na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas recorrentes ou não, como foi observado em pacientes acometidos pela Doença Granulomatosa Crônica (DGC). A mesma se ativa por defeitos na produção NADPH oxidase e no *burst* respiratório nos neutrófilos, ou seja, a conversão catalítica da molécula de oxigênio para o radical livre superóxido. (KUIJPERS, T ET AL. KANG, E ET AL.) Segundo a Sociedade Latino Americana de Imunodeficiências (LASID), em um estudo com 12 países e mais de 3000 pacientes a forma

predominante de IDPs encontrada foi a deficiência de anticorpos com 53,2% tendo a deficiência de IgA como fenotipo mais frequente. Categoria essa seguida por 22,6% de síndromes imunodeficientes, 9,5% de imunodeficiência combinada de células T e B, 3,3% doença de desregulação imune e 2,8% de deficiência de complemento (Figura 01). A DGC apresentou-se com incidência mínima entre 0,72 e 1,26 casos por 100.000 indivíduos nascidos. (LILY & LEIVA, ZELAZCO et al., OLEASTRO et al.). É possível comparar com dados da *Immunodeficiency Foundation* (IDF), onde a DGC apresentou estimativa mínima de 1:200.000 nascidos vivos nos Estados Unidos. Isso reflete que é preciso um aumento de consciência por parte dos profissionais de saúde para a detecção e diagnóstico dessa doença. (LILY & LEIVA, ZELAZCO et al., OLEASTRO et al.)



**Figura 01** – Distribuição de Imunodeficiência Primária entre 3321 pacientes pelo 2º Registro do LAGID

## 2. JUSTIFICATIVA

A realização de um estudo imunológico abrangente que vise investigar os diversos braços da resposta imune (inata e adaptativa) proporcionaria um melhor entendimento sobre o funcionamento do sistema imune dos pacientes com infecção bacteriana grave, além de possibilitar o diagnóstico de IDP. Além disso, o trabalho em questão favorece a implantação de técnicas laboratoriais que viabilizarão o diagnóstico de um maior espectro de IDP no Estado de Pernambuco, o que é de grande importância para o IMIP, pois constitui o principal centro hospitalar de referência para pacientes pediátricos com patologias complexas e graves da Região Nordeste do país. O IMIP se tornaria, assim, uma referência também para a identificação de IDPs, grupo de patologias de importância crescente como doenças de base de portadores de infecções graves. A Região Nordeste apresenta a peculiaridade da elevada percentagem de

casamentos consangüíneos, o que favorece o aparecimento de doenças autossômicas recessivas. Não é demais acrescentar que a identificação dos casos permite o seu tratamento adequado e o aconselhamento genético das famílias, o que pode prevenir o aparecimento de novos casos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a imunidade inata de pacientes com infecção bacteriana grave

#### **3.2 Objetivos Específicos**

3.2.1 Quantificar a produção de ânion superóxido por neutrófilos;

3.2.2 Determinar os valores percentuais de neutrófilos e monócitos que realizam fagocitose;

3.2.3 Determinar os valores absolutos de células T, B e NK do sangue periférico.

### **4. CASUÍSTICA E MÉTODO**

#### ***4.1 Casuística***

##### **4.1.1 População de Estudo**

**Pacientes:** A casuística compreendeu 54 pacientes que apresentam infecções bacterianas graves (crianças e adultos), acompanhados no ambulatório de Imunologia do IMIP.

**Controles:** Os indivíduos controles saudáveis foram adultos jovens de diferentes idades, e sem histórico de Imunodeficiência Primária na família.

##### ***4.1.2 Avaliação Clínica e Coleta de Amostras Biológicas***

Os pacientes foram submetidos a um protocolo de anamnese e exames clínicos e laboratoriais. A tabela 3 mostra a descrição dos pacientes.



**Tabela 3:** Descrição sócio-demográficas e achados clínicos dos paciente

Paciente	Idade	Sexo	Tipos de Infecções
P1	10 meses e 28 dias	M	Pneumonia, monilíase oral e BCGite
P2	10 meses e 28 dias	M	infecção por Acinetobacter, pneumonia e BCGite.
P3	17 anos e 5 meses 8 dias	F	Abscesso hepático, otite, furunculose e pneumonia infecciosa.
P4	7 anos e 30 dias	M	Osteomielite, Otite Média Aguda de repetição.
P5	1 ano e 2 meses	M	Pneumonia com derram e pleural, abscessos hepáticos, BCGite, adenite cervical abscedado, hepatopatia crônica.
P6	2 anos 10 meses 29 dias	M	Broncopneumonia, ITU, OMA supurada, bronquite, abscesso perianal.
P7	11 anos e 3 meses	M	Abscesso cerebral
P8	10 anos	M	Abscesso hepático
P9	1 ano e 10 meses 25 dias	F	Varicela, abscessos
P10	2 anos e 11 meses 16 dias	F	Catapora, varicela, abscesso, sepse.
P11	12 anos 11 meses 1 dia	M	Pneumonias de repetição, tuberculose, derram e pleural e pericárdio, adenite cervical.
P12	7 anos e 3 meses 24 dias	M	Furunculose, otite média aguda, celulite, pneumonia, sepse, cultura de secreção traqueobrônquica.
P14	10 anos 10 meses 29 dias	M	Pneumonia, hemorragia digestiva, hemorragia intestinal, abscessos em várias regiões do corpo.
P15	12 anos e 5 meses 28 dias	M	Sepse estafilocócica com acometimento pulmonar, articular e cutâneo (abscesso em couro cabeludo).
P16	3 anos 1 mês 4 dias	F	Piodermia gangrenosa grave
P17	2 anos 22 dias	F	Celulite, pneumonia extensa, anemia, diarreia.
P18		F	Infecção bacteriana grave
P19	2 anos 10 meses 11 dias	F	Infecção bacteriana grave
P20		F	Infecção bacteriana grave
P21		M	Pneumonia grave com derram e pleural e SARA.
P22	1 ano 3 meses 13 dias	F	Infecção bacteriana grave
P23	14 anos 18 dias	M	Infecção bacteriana grave
P24		M	Infecção bacteriana grave
P25	21 anos 3 meses 4 dias	M	Infecção bacteriana grave
P26		F	Pneumonia, derram e pleural.
P27	2 anos 1 mês 15 dias	F	Infecção bacteriana grave
P28		M	Estomatite herpética grave
P29		F	Infecção bacteriana grave
P30	10 anos e 9 meses	M	Abscesso pulmonar
P31	14 anos 3 meses 10 dias	M	Infecção bacteriana grave
P32	7 anos 6 meses 10 dias	M	Infecção bacteriana grave
P33	13 anos 4 meses 28 dias	F	Infecção bacteriana grave
P34	1 ano	M	Infecção bacteriana grave
P35	20 anos 19 dias	M	Infecção bacteriana grave
P36	2 anos e 10 meses 9 dias	M	Infecção bacteriana grave
P37	11 anos 5 meses 10 dias	F	Infecção bacteriana grave
P38	10 anos 4 meses 23 dias	M	Infecção bacteriana grave
P39	5 anos 3 meses 21 dias	F	Infecção bacteriana grave
P40		M	Infecção bacteriana grave
P41	3 anos 6 meses 29 dias	M	Infecção bacteriana grave
P42	11 meses 26 dias	M	Pneumoniae DP.
P43	11 anos	M	Infecção bacteriana grave
P44	1 ano	F	Pneumonia prévia e celulite no joelho direito, BCGite.
P45	13 anos 2 meses 7 dias	M	Abscesso intracavitário e antecedentes abscessos, infecção pulmonar grave.
P46	10 meses 25 dias	M	Anemia e neutropenia
P47		F	Infecção bacteriana grave
P48		RN	Infecção bacteriana grave
P49		M	Infecção bacteriana grave
P50		M	Quadro micobacteriano repetição
P51	10 meses 26 dias	F	Infecção bacteriana grave
P52		F	Infecção bacteriana grave
P53	4 anos 10 meses 24 dias	F	Pneumonia grave e diarreia recorrente
P54	14 anos 2 meses 21 dias	M	Infecção bacteriana grave
P55		F	Infecção bacteriana grave
P56	5 meses 14 dias	RN	Infecção bacteriana grave

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Testes Laboratoriais

#### 4.2.1.1 Imunofenotipagem de células T, B e NK

Para imunofenotipagem, numa alíquota de 100 µl de sangue periférico foram adicionados 2ml de solução lisante de hemácias 1x concentrada (BD Pharm Lyse™, BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA) que foi incubada por 20 min à temperatura ambiente. Para lavagem das células, foi adicionado 2 mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1X concentrado (pH 7,4), centrifugado a 2000 RPM por 5 minutos a 10 °C em centrífuga Universal 320R (Hettich, Germany), e descartado o sobrenadante.

Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos anti-CD04 FITC, anti-CD28 PE, anti-CD3 PerCP, anti-CD8 PE-Cy7, para linfócitos T, anti-CD19 FITC, anti-CD27 PE-Cy 7, anti-IgM PE, anti-IgD PerCP-Cy 5.5 para linfócitos B e anti-CD3 FITC, CD16 PE e CD56 PE-Cy5 para linfócitos NK (BD, Pharmingen®, San Diego, CA) e as amostras foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após incubação, foram realizadas mais duas etapas de lavagem.

A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo (FACSverse®, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Foram adquiridos 20.000 eventos celulares e as análises dos resultados foram realizadas com o programa BD FACS SUITE™ ou BD FACSDIVA™ (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais. Os resultados dos percentuais dos pacientes foram comparados aos valores de referência para faixa etária ou comparados aos dos indivíduos controles saudáveis.

Os resultados referentes às células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>/ CD56<sup>+</sup>/ CD16<sup>+</sup> foram expressos em valores absolutos, sendo os valores dos pacientes comparados aos valores de referência para faixa etária.

#### 4.2.1.2 Teste de fagocitose de neutrófilos e monócitos

Para o ensaio de fagocitose e dosagem da liberação de ânion superóxido será realizado com Phagotest kit (Orpegen Pharma, Heidelberg), conforme instrução do fabricante. As células foram ressuspendidas com 400µL de solução salina (SIGMA®, St. Louis, MO) a 1% para aquisição no citômetro de fluxo (FACSVERSE® - Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Foram adquiridos 20.000 eventos celulares no *gate* de neutrófilos e as análises dos resultados foram realizadas com o programa FACSSUÍTE software® (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

#### 4.2.1.3 Dosagem de ânion superóxido

Para dosagem de ânion superóxido foi utilizado o teste de oxidação de neutrófilos através da Dihidrorodamina-123 (DHR-123) por citometria de fluxo, utilizando Phagoburst kit (Orpegen Pharma, Heidelberg), conforme instrução do fabricante. O resultado foi obtido pelo cálculo do Índice de Estimulação (IE) que corresponde ao valor da média de fluorescência da amostra estimulada com PMA dividido pelo valor da média de fluorescência da amostra não-estimulada (S/E). Foi considerado IE normal, valores acima de 80.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Valores relativos e absolutos de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos do sangue periférico.

Foi realizado o leucograma dos pacientes e observamos que a maioria apresenta valores absolutos e relativos de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos dentro da normalidade, de acordo com a faixa etária. Não foi detectado neutropenia cíclica ou grave (Síndrome de Kostman).

**Tabela 4:** Valores absolutos das populações celulares do sangue periférico dos pacientes

Pacientes	Leucócitos totais (Cel./mm <sup>3</sup> )	Neutrófilos (Cel./mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (Cel./mm <sup>3</sup> )	Monócitos (Cel./mm <sup>3</sup> )
<b>P4</b>	8400 (3.400-9.500)	2755 (1.500-8.500)	3755 (1.500-7.000)	319 (0-800)
<b>P5</b>	10300 (6.000-11.000)	3306 (1.500-8.500)	5665 (1.500-7.000)	659 (0-800)
<b>P6</b>	10300 (6.000-11.000)	3090 (1.500-8.500)	6396 (1.500-7.000)	556 (0-800)
<b>P8</b>	16900 (3.400-9.500)	13909 (1.500-8.500)	1453 (1.500-6.500)	1217 (0-800)
<b>P9</b>	12500 (6.000-11.000)	5600 (1.500-8.500)	4763 (1.500-7.000)	813 (0-800)
<b>P10</b>	8500 (6.000-11.000)	5984 (1.500-8.500)	2006 (1.500-7.000)	289 (0-800)
<b>P11</b>	13400 (3.600-9.100)	9527 (1.800-8.000)	2626 (1.200-5.200)	871 (0-800)
<b>P12</b>	3800 (3.400-9.500)	38 (1.500-8.500)	2698 (1.500-6.500)	570 (0-800)
<b>P15</b>	2600 (3.600-9.100)	788 (1.800-8.000)	1173 (1.200-5.200)	377 (0-800)
<b>P16</b>	23500 (4.000-12.000)	10951 (1.500-8.500)	10411 (1.500-7.000)	1763 (0-800)
<b>P17</b>	17800 (6.000-11.000)	5447 (1.500-8.500)	8669 (1.500-7.000)	1282 (0-800)
<b>P18</b>	9600 (6.000-11.000)	3658 (1.500-8.500)	5309 (1.500-7.000)	346 (0-800)
<b>P19</b>	8400 (6.000-11.000)	5922 (1.500-8.500)	1672 (1.500-7.000)	563 (0-800)
<b>P22</b>	8800 (6.000-11.000)	2367 (1.500-8.500)	5201 (1.500-7.000)	651 (0-800)
<b>P23</b>	4900 (3.600-9.100)	49 (1.800-8.000)	2401 (1.200-5.200)	49 (0-800)
<b>P25</b>	9100 (3.500-10.500)	5369 (1.700-8.000)	2876 (900-2.900)	592 (300-900)
<b>P31</b>	10600 (3.600-9.100)	8342 (1.800-8.000)	1399 (1.200-5.200)	753 (0-800)
<b>P32</b>	9000 (3.400-9.500)	4680 (1.500-8.500)	3213 (1.500-6.500)	540 (0-800)
<b>P33</b>	7800 (3.600-9.100)	6256 (1.800-8.000)	647 (1.200-5.200)	640 (0-800)

<b>P34</b>	8600 (6.000-11.000)	4119 (1.500-8.500)	2528 (1.500-7.000)	722 (0-800)
<b>P35</b>	4000 (3.500-10.500)	2040 (1.700-8.000)	1500 (900-2.900)	276 (300-900)
<b>P36</b>	4300 (6.000-11.000)	2004 (1.500-8.500)	675 (1.500-7.000)	550 (0-800)
<b>P37</b>	5600 (3.400-9.500)	2957 (1.500-8.500)	2134 (1.500-6.500)	269 (0-800)
<b>P38</b>	6600 (3.400-9.500)	2937 (1.500-8.500)	2732 (1.500-6.500)	383 (0-800)
<b>P39</b>	9800 (4.000-12.000)	2911 (1.500-8.500)	4341 (1.500-7.000)	559 (0-800)
<b>P41</b>	6100 (4.000-12.000)	1891 (1.500-8.500)	3294 (1.500-7.000)	537 (0-800)
<b>P42</b>	10400 (6.000-11.000)	1446 (1.500-8.500)	7800 (1.500-7.000)	822 (0-800)
<b>P43</b>	14600 (3.400-9.500)	10789 (1.500-8.500)	2248 (1.500-6.500)	1022 (0-800)
<b>P44</b>	5400 (6.000-11.000)	2549 (1.500-8.500)	2219 (1.500-7.000)	346 (0-800)
<b>P45</b>	16900 (3.600-9.100)	14027 (1.800-8.000)	1183 (1.200-5.200)	1352 (0-800)
<b>P46</b>	5900 (6.000-11.000)	1221 (1.500-8.500)	4437 (1.500-7.000)	195 (0-800)
<b>P47</b>	14800 (3.400-9.500)	6956 (1.500-8.500)	592 (1.500-7.000)	592 (0-800)
<b>P53</b>	4800 (4.000-12.000)	1987 (1.500-8.500)	2131 (1.500-7.000)	432 (0-800)
<b>P54</b>	22800 (3.600-9.100)	17738 (1.800-8.000)	3032 (1.200-5.200)	1801 (0-800)

Os valores entre parênteses representam os valores de referência mínimo e máximo de populações celulares (células/mm<sup>3</sup>), de acordo com faixa etária para população brasileira, conforme descrito por Moraes-Pinto et al (2006).

## 5.2 Valores absolutos de Linfócitos T, Linfócitos B e B de memória e células NK do sangue periférico.

Na triagem imunológica de linfócitos T, B e NK, verificou-se que a maioria dos pacientes apresentou valores relativos e absolutos de linfócitos totais dentro da normalidade, de acordo com a faixa etária. A maioria dos pacientes apresenta valores normais de células T, TCD4, TCD8, B e NK (Tabela 5). Porém, dos 54 pacientes avaliados, 10 deles apresentaram deficiência de células T, B e/ou NK, e 2 pacientes apresentaram deficiência apenas de células NK.

**Tabela 5:** Valores absolutos das populações celulares T, B e NK (células/mm<sup>3</sup>) dos pacientes.

Pacientes	Linfócitos Totais	Linfócitos T	T CD4+	T CD8+	Células B	B de memória	NK
P4	3755 (1500-6500)	2838 (1280-2413)	1489 (1360-3066)	922 (390-1024)	476 (471-1031)	13 (18,6-46,7)	(127-515)
P5	5665 (1500-7000)	3314 (1969-4392)	2134 (957-2727)	967 (563-1753)	1404 (711-1553)	35,1 (4,1-20,6)	572 (153-703)
P6	6396 (1500-7000)	4080 (1515-3701)	2488 (780-2086)	1350 (453-1700)	1061 (631-1283)	21 (7,8-37,1)	511 (135-601)
P8	1453 (1500-6500)	1237 (1280-2413)	707 (618-1348)	447 (390-1024)	78 (471-1031)	1,4 (13,3-47,9)	101 (127-515)
P9	4763 (1500-7000)	3329 (1969-4392)	2223 (957-2727)	795 (563-1753)	1081 (711-1553)	49,7 (9,5-26,5)	100 (153-703)
P10	2006 (1500-7000)	1263 (1515-3701)	650 (780-2086)	506 (453-1700)	365 (631-1283)	6,9 (7,8-37,1)	202 (135-601)
P11	2626 (1200-5200)	2313 (1161-2077)	1366 (630-1182)	666 (332-776)	181 (460-1143)	3,6 (13,3-47,9)	10 (114-446)
P12	2698 (1500-6500)	1767 (1280-2413)	1016 (618-1348)	618 (390-1024)	809 (471-1031)	25,8 (18,6-46,7)	302 (127-515)
P15	1173 (1200-5200)	866 (1161-2077)	396 (630-1182)	258 (332-776)	213 (460-1143)	6,1 (13,3-47,9)	51,6 (114-446)
P16	10411 (1500-7000)	4320 (1515-3701)	1334 (780-2086)	2121 (453-1700)	1259 (631-1283)	22 (7,8-37,1)	1030 (135-601)
P17	8669 (1500-7000)	5158 (1515-3701)	1748 (780-2086)	2243 (453-1700)	2366 (631-1283)	89 (7,8-37,1)	615 (135-601)
P18	5.309	5318	1.898	5.212	2.515	88,0	297,2
P19	1672 (1500-7000)	1280 (1515-3701)	725 (780-2086)	422 (453-1700)	254 (631-1283)	6,3 (7,8-37,1)	35 (135-601)
P22	5201 (1500-7000)	3937 (1969-4392)	2866 (957-2727)	799 (563-1753)	561 (711-1553)	6,1 (9,5-26,5)	457 (153-703)
P23	2401 (1200-5200)	1757 (1161-2077)	1117 (630-1182)	423 (332-776)	410 (460-1143)	12,3 (13,3-47,9)	93 (114-446)
P25	2876 (900-2900)	2145 (844-1943)	1076 (476-1136)	960 (248-724)	394 (138-544)	18,9 (17,5-46,5)	212 (134-545)
P31	1399 (1200-5200)	1091 (1161-2077)	726 (630-1182)	360 (332-776)	172 (460-1143)	2,7 (13,3-47,9)	13,9 (114-446)
P32	3213 (1500-6500)	2795 (1280-2413)	1464 (618-1348)	997 (390-1024)	212 (471-1031)	4,4 (18,6-46,7)	19,2 (127-515)
P33	647 (1200-5200)	157 (1161-2077)	109 (630-1182)	32 (332-776)	127 (460-1143)	1,3 (13,3-47,9)	84 (114-446)
P34	2528 (1500-7000)	1759 (1969-4392)	1262 (957-2727)	379 (563-1753)	535 (711-1553)	19,2 (4,1-20,6)	35,3 (153-703)
P35	1500 (900-2900)	912 (844-1943)	462 (476-1136)	360 (248-724)	78 (138-544)	1,1 (17,5-46,5)	148 (134-545)
P36	675 (1500-7000)	188 (1515-3701)	107 (780-2086)	74 (453-1700)	120 (631-1283)	3,9 (9,5-26,5)	41,8 (135-601)
P37	2134 (1500-6500)	1519 (1280-2413)	923 (618-1348)	577 (390-1024)	409 (471-1031)	7,3 (13,3-47,9)	40,5 (127-515)
P38	2732 (1500-6500)	827 (1280-2413)	211 (618-1348)	540 (390-1024)	852 (471-1031)	12,7 (13,3-47,9)	79 (127-515)
P39	4341 (1500-7000)	3051 (1515-3701)	2117 (780-2086)	881 (453-1700)	616 (631-1283)	8,6 (18,6-46,7)	251 (135-601)
P41	3294 (1500-7000)	2249 (1515-3701)	1122 (780-2086)	814 (453-1700)	615 (631-1283)	23,3 (7,8-37,1)	279 (135-601)
P42	1800 (1500-7000)	1092 (2156-5004)	578 (1360-3066)	409 (560-1803)	574 (811-1792)	7,4 (4,1-20,6)	90 (164-801)
P43	2248 (1500-6500)	1351 (1280-2413)	567 (618-1348)	209 (390-1024)	548 (471-1031)	17,5 (18,6-46,7)	348 (127-515)
P44	2219 (1500-7000)	1579 (1969-4392)	851 (957-2727)	615 (563-1753)	505 (711-1553)	9 (4,1-20,6)	79 (153-703)
P45	1183 (1500-6500)	636 (1161-2077)	432 (630-1182)	159 (332-776)	156 (460-1143)	2,8 (13,3-47,9)	55 (114-446)
P46	4437 (1500-7000)	2178 (2156-5004)	1328 (1360-3066)	701 (560-1803)	1428 (811-1792)	21,4 (4,1-20,6)	292 (164-801)
P47	6.512	8.687	3.101	4.595	3.048	79,2	2127,8
P53	2131 (1500-7000)	1581 (1515-3701)	790 (780-2086)	580 (523-1798)	277 (631-1283)	13,2 (7,8-37,1)	100 (135-601)
P54	3032 (1200-5200)	1992 (1161-2077)	1059 (630-1182)	634 (332-776)	512 (460-1143)	9,2 (13,3-47,9)	251 (114-446)

(Entre parênteses constam os valores de referência de linfócitos absolutos (células/mm<sup>3</sup>) de acordo com a faixa etária para a população brasileira. (Klee G, [Thesis]2004; Natan e Oski, 1993; Moraes-Pinto et al, 2006 e Piotosa et al, 2010). Em vermelho, indica os pacientes com valores absolutos diminuídos das populações.

### 5.3 Dosagem de ânion superóxido em neutrófilos

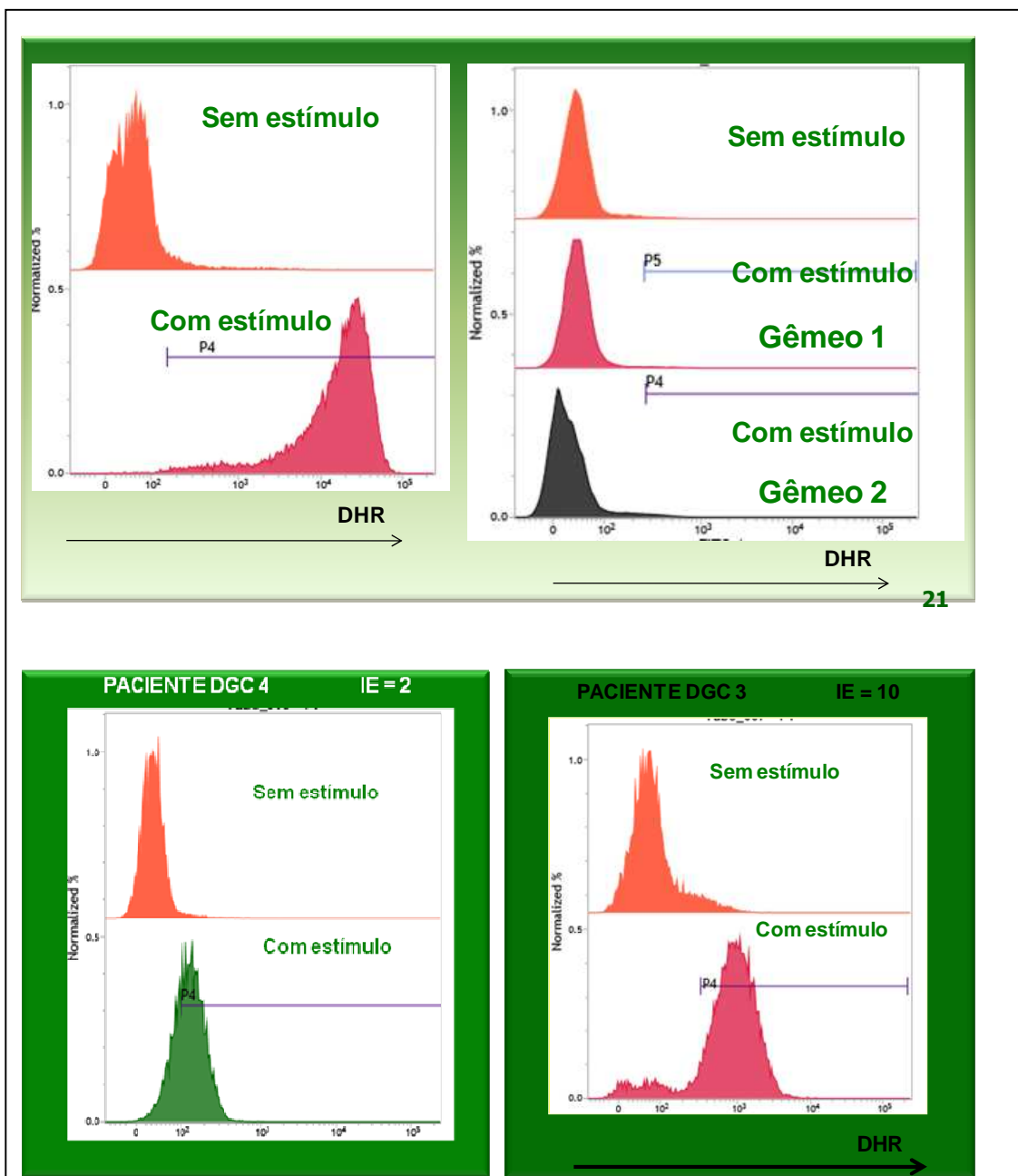
Dos 54 pacientes avaliados, 5 apresentaram ausência ou expressão parcial de ânion superóxido, estabelecendo o diagnóstico Doença Granulomatosa Crônica (DGC), como mostra a tabela 6. A Figura 2 mostra os histogramas do controle e de 4 pacientes do teste de DHR.

**Tabela 6:** Índice de Estimulação que foi encontrado nos pacientes

<b>Pa</b>	<b>Diagnóstico de Doença Granulomatosa</b>	<b>Índice de Estimulação (IE)</b>
<b>cientes</b>	<b>Crônica (DGC</b>	<b>VR: IE&gt;80</b>
<b>P1</b>	<b>DGC</b>	<b>0.0</b>
<b>P2</b>	<b>DGC</b>	<b>0.0</b>
<b>P3</b>	<b>DGC</b>	<b>4.3</b>
<b>P4</b>	Normal	181
<b>P5</b>	Normal	412.9
<b>P6</b>	<b>DGC</b>	<b>13</b>
<b>P7</b>	Normal	651
<b>P8</b>	Normal	193
<b>P9</b>	Normal	809
<b>P10</b>	Normal	178
<b>P11</b>	Normal	251
<b>P12</b>	Normal	653
<b>P13</b>	Normal	189
<b>P14</b>	Normal	264.1
<b>P15</b>	Normal	282.3
<b>P16</b>	Normal	170.8
<b>P17</b>	Normal	414.1
<b>P19</b>	Normal	104.1
<b>P20</b>	Normal	40.5
<b>P21</b>	Normal	53.1
<b>P22</b>	Normal	84.7
<b>P23</b>	Normal	87
<b>P26</b>	Normal	75.4
<b>P27</b>	Normal	43.1
<b>P30</b>	Normal	36.2
<b>P31</b>	<b>DGC</b>	<b>0.0</b>
<b>P32</b>	Normal	145
<b>P33</b>	Normal	52
<b>P34</b>	Normal	160
<b>P35</b>	Normal	149
<b>P41</b>	Normal	221
<b>P42</b>	Normal	216
<b>P43</b>	Normal	409
<b>P44</b>	Normal	90
<b>P45</b>	Normal	125
<b>P46</b>	Normal	621
<b>P47</b>	Inconclusivo*	30.7

P48	Normal	168
P49	Normal	163
P51	Normal	25.7
P52	Normal	231.4
P54	Normal	66.3
P56	Normal	509

\* **Inconclusivo:** Necessita repetir o teste, pois o paciente apresentava infecção durante a realização do teste de DHR. Segundo a NIH, nesses casos, faz-se necessário repetir o teste quando o paciente estiver sem sinais clínicos de infecção.



**Figura 2:** Histogramas do teste de DHR realizado por citometria de fluxo de um controle normal e 4 pacientes com DGC, sendo 2 gêmeos.

#### **5.4 Determinação do percentual de fagocitose dos neutrófilos e monócitos.**

Na análise quantitativa de fagocitose, verificou-se que os pacientes não apresentaram defeitos de fagocitose por neutrófilos e monócitos. Os pacientes apresentaram os valores percentuais acima 95% de neutrófilos que realizaram fagocitose de *E.coli*. Com relação aos monócitos, os pacientes apresentaram os valores percentuais acima de 65% de monócitos que realizaram fagocitose.

### **6 COMENTÁRIOS E CONCLUSÃO**

Na avaliação imunológica de 53 pacientes com infecções bacterianas graves e/ou de repetição, verificou-se que i) não apresentam defeitos numéricos de fagócitos, ii) não apresentam deficiência de anticorpos totais, iii) nove pacientes apresentaram deficiência combinada de células B e NK, iv) cinco com deficiência combinada de T e B, e de subpopulações memória efetora e central, v) 5 pacientes com Doença Granulomatosa Crônica. Portanto, verificou-se que 5,4% dos pacientes apresentaram defeitos de células T, B e NK, 1,1% defeito de células NK e 2,7% Doença Granulomatosa Crônica (DGC). A realização de testes laboratoriais para investigação da imunidade inata em pacientes com infecções bacterianas graves e/ou de repetição é de suma importância para elevar as taxas de detecção de imunodeficiências primárias no Estado de Pernambuco. Com o presente projeto, foi possível realizar o diagnóstico de 5 pacientes com DGC, o que propiciou o tratamento adequado e o aconselhamento genético da família. Os pacientes (gêmeos) com DGC estão sendo acompanhados no ITACI – HCFMUSP e serão submetidos ao transplante de medula óssea que está previsto para ser realizado em Setembro/2014. A realização de testes laboratoriais para investigação da imunidade inata em pacientes com infecções bacterianas graves é de suma importância para elevar as taxas de detecção de IDP em Pernambuco.



## 7 REFERÊNCIAS

1. Andriolo A. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar. São Paulo: 2005. Ed. Manole.
2. Annane D, Bellissant E, and Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* **365**, 63–78. 2005.
3. Arkwright, PD; Gennery, AR. ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21<sup>st</sup> century. *annals of the new york academy of science*, 1238: p.7-14, 2011.
4. Bellanti JA, Soner AL. Immunology of the fetus and newborn. In: VERY, G.B., ed. *Neonatology*. 3a ed. J; B. Lippincott, 1987, p. 850
5. Biedermann T. Dissecting the role of infections in atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **86**, 99–109. 2006.
6. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 244–269. 2001
7. Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary Immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol.* **27**: 497. 2007
8. Braunwald E. *Harrison Medicina Interna*. Rio de Janeiro: 2002. 15. ed. Editora Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil.
9. Carneiro-Sampaio, MMS - Primary Immunodeficiencies in Latin America. *Allergy & Clinical Immunology International*, **11 (5)**, 157-161, 1999
10. Cassettari VC.; Strabelli T, Medeiros EA. *S. Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Braz J Infect Dis.* **9**, 70-6, 2005.
11. Conley, ME & Stiehm, ER – Immunodeficiency Disorders: General Considerations. In: Stiehm, ER *Immunologic Disorders in Infants and Children*. W B Saunders, Philadelphia, 1996, 4<sup>th</sup> ed, p. 201-249
12. Costa-carvalho, B.T et.al. Attending to warning signs of primary immunodeficiency diseases across the range of clinical practice. *J clin immunol*, v.34: p. 10-22, 2014.
13. David A, Webster B. the immunocompromised patient: primary immunodeficiencies. *medicine*, v.41, ed.11, p.619-623, 2013.
14. De Vries, E. for the Clinical Working Party of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. *Clin Exp Immunol.* **145**, 204–214. 2006
15. Elbim C, Lizard, G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *V.* 75A, p. 475-481, 2009.
16. Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, Greenberg F, Hill SC, Malech HL, Miller JA, O'Connell AC, Puck JM Hyper-IgE syndrome with recurrent infections--an autosomal dominant multisystem disorder. *N Engl J Med.* **340(9)**, 692–702. 1999
17. Harrington LE, .Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* **6(11)**, 1123–1132. 2005
18. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* **15(5)**, 578–584. 2003
19. Kang, E. M, Marciano B. E, Deravin S, Zarembek, K A, Holland SM, Malech HL. Chronic Granulomatous Disease: Overview and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Allergy clin Immunol*, V. 127, p. 1319-26, 2011.
20. Kielian T., Phulwani NK, Esen N, Syed MM, Haney AC, McCastlain K, Johnson J. MyD88-dependent signals are essential for the host immune response in experimental brain abscess. *J. Immunol.* 178: 4528–4537. 2007
21. Kim, HY et al., Rapid determination of chimerism status using dihydrorhodamine assay in a patient with X-linked chronic granulomatous disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of Laboratory Medicine*, V.33, p. 288-292, 2013.
22. Koneman E. *Diagnóstico microbiológico*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001. 5<sup>o</sup> edição.
23. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* **361**, 151–160. 2003

24. Li Q., Kumar A, Gui JF, Yu FS.. Staphylococcus aureus lipoproteins trigger human corneal epithelial innate response through toll-like receptor-2. *Microb. Pathog.* **44**: 426–434. 2008
25. Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. *Rev Panam Infectol*, 7, 34-6.2005.
26. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl.J. Med.* **339**, 520–532. 1998.
27. Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, Fulcher DA, Tangye SG, Cook MC Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J Exp Med.* **205(7)**,1551–1557. 2008
28. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature.* **452(7188)**, 773–776. 2008
29. Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A. Primary Immunodeficiency diseases: an update. *J Allergy Clin Immunol.* **114**, 677–87. 2004
30. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RF, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update: The International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiencies (PID) Expert Committee. *J Allergy Clin Immunol.* **124**, 1161-1178. 2009
31. Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, et al. Clinical Features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine.* **89**, 403-425. 2010.
32. Renner ED, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Rack AL, Reichenbach J, Carey JC, Zhu Q, Jansson AF, Barboza J, Schimke LF, Leppert MF, Getz MM, Seger RA, Hill HR, Belohradsky BH, Torgerson TR, Ochs HD Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reducedT(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* **122(1)**,181–187. 2008
33. Schechter M, Marangoni DV. Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica.Rio de Janeiro: 1998, 2 ed. Guanabara Koogan.
34. Schmalzer M., Jann NJ, Ferracin F, Landolt LZ, Biswas L, Go"tz F, Landmann R. Lipoproteins in Staphylococcus aureus mediate inflammation by TLR2 and iron-dependent growth in vivo. *J. Immunol.* 182: 7110–7118. 2009.
35. Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein, JA. Immunodeficiency disorders: general considerations. In: *Immunologic Disorders in Infants and Children*. Elsevier Saunders, Philadelphia, 5<sup>th</sup> ed. p. 289-355, 2004
36. Trabulsi LR, Altherthum F. *Microbiologia.Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005.