

# Imunodeficiência comum variável em adultos e crianças: Correlação entre fenótipos clínicos e imunológicos

*Correlation between the clinical and immunological phenotypes in adults and children with common variable immunodeficiency*

Data de recepção / Received in: 11/03/2011

Data de aceitação / Accepted for publication in: 25/07/2011

Rev Port Imunoalergologia 2011; 19 (3): 171-181

Eugénia Almeida<sup>1</sup>, Emília Faria<sup>1,2</sup>, Nuno Sousa<sup>1</sup>, Tiago Carvalheiro<sup>3</sup>, Sónia Lemos<sup>2</sup>, Artur Paiva<sup>3</sup>, António Segorbe Luís<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Imunoalergologia. Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC)

<sup>2</sup> Consulta de Imunodeficiência Primária. Departamento de Pediatria de Centro Hospitalar dos Covões (HPC)

<sup>3</sup> Laboratório de Citometria. Centro de Histocompatibilidade do Centro

## RESUMO

**Fundamentos:** A imunodeficiência comum variável (IDCV) é uma doença heterogénea caracterizada por infecções recorrentes e deficiência de anticorpos. Têm sido descritas várias classificações que correlacionam diferentes perfis imunológicos das células B e T com distintos fenótipos clínicos. **Objetivos:** Conhecer as características clínicas e sua correlação com as subpopulações linfocitárias de adultos e crianças com IDCV. **Material e métodos:** Dos doentes com IDP observados na consulta de Imunodeficiência Primária dos HUC e HPC, entre 1 de Janeiro de 2000 e 31 de Dezembro de 2010, seleccionámos aqueles que cumpriam o diagnóstico de IDCV e procedeu-se ao estudo retrospectivo dos processos clínicos. Efetuou-se o estudo de imunofenotipagem dos linfócitos B e T através de citometria de fluxo e os resultados foram comparados com 12 controlos saudáveis. **Resultados:** Foram avaliados 14 doentes com IDCV, 12 adultos e 2 crianças. Os adultos, com uma relação feminino/masculino de 2:1, tinham uma média de idade de 48,5 anos e uma média de idade na altura do diagnóstico de 36 anos. Nestes doentes, as infecções respiratórias baixas recorrentes e as gastrointestinais estavam presentes em 75% e 33% dos casos, respectivamente. As complicações associadas foram bronquiectasias e doenças autoimunes (50% dos casos), doenças lin-

foproliferativas (25%), esplenomegalia e enteropatia crónica (17%). As crianças, ambas de sexo feminino, com 8 e 12 anos, para além da clínica de infeções respiratórias recorrentes, apresentavam bronquiectasias. Da análise das subpopulações linfocitárias nos adultos, salienta-se a diminuição de células T reguladoras em 2 doentes, diminuição inferior a 1% das células CD19 em 2 doentes e diminuição das células B memória *switched* em 10 doentes. Dos 4 doentes com diminuição de CD4 *naive*, 2 apresentavam doenças autoimunes e os restantes complicações linfoproliferativas. Nas crianças, o estudo das subpopulações B e T revelou-se normal. **Conclusões:** A análise efectuada das subpopulações de células B e T demonstrou que a principal alteração encontrada nos doentes com complicações linfoproliferativas, autoimunes e esplenomegalia foi a acentuada diminuição das células B memória. Ao contrário, os doentes com IDCV sem complicações associadas não apresentam alterações das subpopulações T e B, o que poderá documentar um prognóstico mais favorável.

**Palavras-chave:** Bronquiectasias, fenótipos clínicos, imunodeficiência comum variável, imunoglobulinas, subpopulações linfocitárias B e T.

## ABSTRACT

**Background:** Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous disorder characterised by recurrent infections and antibody deficiency. Various classification schemes for distinct clinical phenotypes have been developed and correlated with different B cell and T cell phenotypes. **Aim:** To understand the clinical characteristics and their correlation with the B and T cell phenotypes in adult and children CVID patients. **Material and methods:** We selected the CVID patients followed-up in HUC and HPC Primary Immunodeficiency Outpatient Clinics from 1st January 2000 to 31st December 2010 and performed a retrospective study of their clinical files. Different T and B lymphocyte immunophenotyping was then performed using the flow cytometer and the results were compared with 12 healthy controls. **Results:** Fourteen CVID patients (12 adults/2 children) were evaluated. The adults had a mean age of 48.5 years and mean age at diagnosis of 36 years, F/M ratio 2:1. Recurrent lower respiratory tract infections and gastrointestinal infections were found in 75% and 33% of cases, respectively. The associated complications were bronchiectasis and autoimmune diseases (50%), lymphoproliferative disease (25%), splenomegaly and chronic enteropathy (17%). The children, both female, aged 8 and 12, had recurrent respiratory tract infections and bronchiectasis. In the adult patients, T and B lymphocyte subpopulations showed decrease of Treg cells in 2 patients, CD19 less than 1% in 2 patients and decreased switched memory B cells in 10 patients. Two of the 4 patients with reduction of naive CD4 cells had autoimmune diseases and the others lymphoproliferative diseases. In the children, the T and B lymphocyte subpopulations were normal. **Conclusions:** The B and T cell subset analysis revealed that the major abnormality was the more significant decrease of switched memory B cells in the patients with additional lymphoproliferative and autoimmune diseases and splenomegaly. In contrast, CVID patients without associated complications have no changes in T and B subpopulations, which may mean a more favourable prognosis.

**Key-words:** Bronchiectasis, clinical phenotypes, common variable immunodeficiency, immunoglobulins, B and T lymphocyte subsets

## INTRODUÇÃO

A imunodeficiência comum variável (IDCV), descrita pela primeira vez em 1953, é uma imunodeficiência primária (IDP) caracterizada por alterações na função terminal das células B com compromisso na produção de anticorpos e, clinicamente, por infecções recorrentes. Segundo a classificação da *European Society for Immunodeficiencies* (ESID) e *Pan-American Group for Immunodeficiency* (PAGID), são critérios de IDCV a diminuição do nível de IgG, IgM e/ou IgA (pelo menos dois desvios-padrão abaixo do valor médio para o grupo etário), início dos sintomas depois dos 2 anos, ausência de isoemaglutininas e/ou deficiente resposta à vacinação, após a exclusão de outras causas de hipogamaglobulinemia<sup>1</sup>. Mais recentemente, o *European Initiative for Primary Immunodeficiencies* (EUROPID) sugere a alteração do critério idade para um mínimo de 4 anos<sup>2</sup>.

A IDCV é resultante de um defeito primário de imunidade celular B com falha na diferenciação das células B maduras em plasmócitos, estando também descritas algumas alterações na função e expressão do receptor da célula T e na produção e expressão de citocinas. Foram recentemente encontradas alterações genéticas em doentes com IDCV, nomeadamente mutações em genes codificadores das moléculas envolvidas na sobrevivência da célula B e no *switch* de isotipo (CD19, TACI, ICOS)<sup>2,3,4</sup>.

Na IDCV, os sintomas podem ocorrer em qualquer idade, com dois picos de incidência, entre 5 e 10 anos e entre os 20 e os 30 anos<sup>5</sup>. Considerada a IDP sintomática mais frequente no adulto, esta doença afecta de igual modo ambos os sexos e a sua incidência está estimada em 1 para 10 000-50 000 casos<sup>6</sup>.

A IDCV é uma doença heterogénea com uma variedade ampla de manifestações clínicas de gravidade variável. As infecções sinopulmonares recorrentes são as mais frequentes, embora as doenças gastrointestinais e autoimunes tenham uma prevalência elevada e possam ser a manifestação inicial de IDCV. As bronquiectasias, frequentemente presentes na altura do diagnóstico, são o resultado de

infecções graves e repetidas do aparelho respiratório inferior e não parecem estar relacionadas com o nível de IgG<sup>2</sup>. As manifestações gastrointestinais de natureza infecciosa, neoplásica, inflamatória ou autoimune podem mimetizar doenças gastrointestinais bem conhecidas, como doença inflamatória intestinal ou doença celíaca e ainda síndromes de malabsorção, ou coexistir com estas doenças. O mecanismo fisiopatológico subjacente à maioria destas manifestações, para além de deficiências da célula B, parece também estar relacionado com disfunção da célula T<sup>7,8</sup>. Cerca de 20% dos doentes com IDCV desenvolvem complicações autoimunes, sendo as mais frequentes a púrpura trombocitopénica imune e a anemia hemolítica. Tal como a doença granulomatosa sistémica, são situações de prognóstico menos favorável. Permanece por esclarecer a presença desta inesperada autorreactividade em doentes que ao mesmo tempo apresentam deficiência de anticorpos<sup>9,10</sup>. Os doentes com IDCV têm também risco aumentado de carcinoma gástrico e linfoma, particularmente do tipo B, associado ao vírus Epstein-Barr. No sexo feminino, o linfoma apresenta uma maior incidência na quinta ou sexta décadas de vida<sup>11</sup>.

Recentemente, os estudos realizados na criança mostram uma apresentação clínica da IDCV semelhante ao adulto no que se refere a patologias auto-imunes e a patologias infecciosas. Contudo, demonstram uma presença mais elevada de asma e a associação com deficiência da hormona de crescimento<sup>12,13</sup>. Os casos clínicos descritos de IDCV de início precoce são menos frequentes, não sendo o diagnóstico em geral efectuado antes dos 4 ou 6 anos de idade. Na criança, o diagnóstico diferencial estabelece-se com outras IDP, nomeadamente hipogamaglobulinemia transitória da infância, agamaglobulinemia ligada ao X, deficiência de subclasses de IgG, deficiência de IgA e síndrome de Hiper-IgM. Perante uma criança com imunidade celular T normal mas com hipogamaglobulinemia, definida como redução dos níveis de um ou mais isotipos de imunoglobulinas (pelo menos dois desvios-padrão abaixo do valor médio para o grupo etário), há que considerar poder tratar-se de imunodeficiência transitória, adqui-

rida ou fisiológica, que pode persistir após os 6 meses de idade<sup>14</sup>.

Nos últimos 10 anos, assistiu-se a um número crescente de publicações de IDCV na idade adulta, o que permitiu o conhecimento mais aprofundado desta doença. É actualmente considerada uma síndrome com múltiplos fenótipos clínicos, correlacionada com diferentes perfis imunológicos. Chapel *et al*, num estudo recente, verifica que 83% dos 334 doentes com IDCV estudados apresentava um dos cinco seguintes fenótipos clínicos: sem complicações, autoimunidade, infiltração linfocítica policlonal, enteropatia e neoplasia linfóide, que se reflectem em diferentes taxas de sobrevivência<sup>4</sup>. Foi encontrado, como factor clínico preditivo, a associação de infiltração linfocítica policlonal com risco aumentado de neoplasia linfóide, que se correlaciona com o nível sérico superior de IgM. A doença autoimune correlaciona-se com diminuição de células CD8 circulantes. Outros autores sugerem a definição de subgrupos com base no fenótipo da célula B, baseado na análise por citometria de fluxo das populações de células B periféricas. Em 2002, o estudo de Warnatz *et al* foi um dos primeiros a classificar os doentes com IDCV, baseando-se na quantificação das células B memória *switched* (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) e correlacionando-a com fenótipos clínicos<sup>15</sup>. Posteriormente, o estudo multicentro EUROclass, envolvendo 303 doentes com IDCV, confirma uma redução significativa de células de memória *switched* na maioria dos doentes com elevado risco de esplenomegalia e doença granulomatosa, adiciona o conceito de expansão de células B CD21<sup>low</sup> em doentes com esplenomegalia e expansão de células B *transitional* (grupo SmB-Tr<sup>hi</sup>) associada a linfadenopatia (no grupo de doentes com uma percentagem de células de memória *switched* inferior ou igual a 2%)<sup>16</sup>.

Mais recentemente, o estudo prospectivo francês DEFI concluiu que a redução das células de memória *switched* e das células CD4 e CD8 *naive*, encontradas nos doentes com IDCV que apenas desenvolvem infecções, é mais pronunciada nos doentes que apresentam doenças linfoproliferativas, citopenias autoimunes ou enteropatia crónica.

Este estudo demonstrou ainda que os doentes com complicações linfoproliferativas e citopenias autoimunes apresentam diminuição das células T reguladoras<sup>17</sup>.

À semelhança do observado no adulto, Yong *et al* detectaram, recentemente, associação entre diferentes fenótipos clínicos e alterações imunológicas, nomeadamente diminuição do número de células B de memória *switched* em 45 crianças com IDCV. Estas crianças apresentavam níveis séricos de IgG e IgM mais baixos que se correlacionavam com maior número de infecções, doença autoimune, bronquiectasias, doença granulomatosa pulmonar e neoplasias hematológicas<sup>18</sup>.

A terapêutica de reposição regular com imunoglobulina G é a base do tratamento desta entidade, para além da instituição precoce de antibioterapia durante as infecções agudas, sendo discutível a utilidade de antibiótico profiláctico. A realização de cinesiterapia respiratória regular é fundamental.

Vários autores demonstraram a diminuição da frequência e gravidade das infecções e a melhoria do prognóstico desta IDP em doentes com terapêutica adequada com imunoglobulina<sup>2,19</sup>. A terapêutica imunossupressora pode ser usada no tratamento de doença autoimune. A precocidade do diagnóstico e a optimização da terapêutica tem reduzido consideravelmente a mortalidade e aumentado a qualidade da vida destes doentes nas últimas décadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado o estudo retrospectivo dos processos clínicos de adultos e crianças com o diagnóstico de IDP observadas nas consultas de imunodeficiência primária dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) e no Hospital Pediátrico de Coimbra (HPC), entre 1 de Janeiro de 2000 e 31 de Dezembro de 2009. Procedeu-se à caracterização das IDP com base na classificação do Comité da União Internacional da Sociedade de IDP<sup>20</sup>. Foram seleccionados os casos de adultos e crianças que, em Dezembro de 2009, cumpriram os critérios de IDCV e foi analisada

a clínica, terapêutica efectuada, tomografia computadorizada (TC) torácica, ecografia abdominal e espirometria. Procedeu-se também à quantificação das subpopulações linfocitárias nos doentes e em doze controlos saudáveis. Para marcação das células T CD4 e CD8 *naive*, memória e efectoras, utilizaram-se os anticorpos anti-CD 4 *pacific* B, anti-CD3 FITC, anti-CCR7 ficoeritrina, anti-CD8 PerCP, anti-CD45RA APC; para as células B *naive* e memória, os anticorpos anti-CD20 *pacific* B, anti-CD45 *pacific orange*, anti-IgG FITC, anti-IgE PE, anti-IgD PE, anti-CD27 PC5, anti-CD19 PC7, anti-IgMAPC e anti-CD38APC-H7 e, para células T reguladoras, os anticorpos anti-CD25 FITC, anti-CD127 PE e anti-CD4 PerCPCy5.5, através da expressão combinada para CD4, CD25 de expressão forte e expressão débil a negativa para CD127. A aquisição de resultados foi realizada em duas fases consecutivas no citómetro de fluxo FACSCanto II™ com recurso ao *software* FACSDiva e, no caso particular das células T reguladoras, no citómetro de fluxo FACSCalibur com recurso ao *software* CellQuest Pro. A análise de resultados foi realizada usando o *software* de análise Infinicyt.

## RESULTADOS

Foram seleccionados 12 doentes adultos com o diagnóstico de IDCV, 14,5% do total de doentes adultos com IDP seguidos na respectiva consulta dos HUC, e 2 crianças do HPC com o mesmo diagnóstico as quais representam 2,4% dos doentes da consulta de IDP deste hospital.

Na população de doentes adultos com IDCV, encontramos uma relação sexo feminino/sexo masculino de 2:1, com média de idade de 48,5 anos, tendo o início dos sintomas ocorrido, em média, aos 24 anos para as mulheres e aos 12 anos para os homens. A média das idades na altura do diagnóstico foi de 36 anos. O tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 16 anos. Apenas um doente tinha um filho com deficiência de IgA e IgG2.

Na série de doentes adultos, as infecções respiratórias baixas recorrentes estavam presentes em 75% dos doentes

e as gastrintestinais em 33%. Um dos doentes apresentava apenas clínica de infecções urinárias e outro sofreu um episódio de encefalite a enterovírus na infância. Metade dos doentes apresentava bronquiectasias na altura do diagnóstico. Na última avaliação, 3 doentes (25%) apresentavam síndrome obstrutivo (D2, D7, D8) e 2 (17%) síndrome restritivo no estudo funcional ventilatório. As complicações mais frequentes foram as doenças autoimunes, a par das bronquiectasias (50%), seguidas das doenças linfoproliferativas (25%) e, por último, esplenomegalia e enteropatia crónica (ambas 17%). Um dos doentes apresentava síndrome de malabsorção grave, tendo sido excluída doença celíaca e linfoma intestinal (D1). O exame parasitológico das fezes e/ou biópsia por endoscopia digestiva alta detectou giardíase em 50% dos casos. Em três doentes (25%) foi detectada hiperplasia nodular linfóide e dois desenvolveram neoplasias malignas (carcinoma papilar da tiróide e adenoma do antro gástrico) (Quadro 1).

Nos doentes com IDCV em idade adulta, os valores das imunoglobulinas na altura do diagnóstico, a contagem total de leucócitos, células B, células T, subpopulações de células T e células de memória *switched* são apresentados no Quadro 2. Todos os doentes apresentavam diminuição das três classes de imunoglobulinas. Os linfócitos T CD4 encontravam-se diminuídos em 9 casos e os linfócitos CD8 estavam aumentados noutros 9. Apenas dois doentes apresentavam uma diminuição de linfócitos CD19 inferior a 1% (D2 e D10). Encontramos inversão da relação CD4/CD8 em 50%. Somente dois doentes apresentavam diminuição das células T reguladoras em relação ao mesmo grupo. Dez doentes apresentavam diminuição das células B memória *switched*, sendo que, em 7 deles, o valor é inferior ou igual a 2%. Os dois doentes que apresentavam apenas clínica de infecções não tinham alterações no número de células B memória. Na contagem diferencial das células CD4 e CD8 verificamos diminuição das células CD4 *naive* e das CD8 *naive* em 4 e 6 doentes, respectivamente, na comparação com o grupo-controlo. Na análise das subpopulações linfocitárias do grupo de doentes que desenvolveram complicações clínicas, dos 3 três que desenvolveram complicações linfoproliferativas,

**Quadro I.** Características clínicas e terapêutica diária dos doentes com IDCV em idade adulta

Doentes	Sexo	Idade (anos)			Infecções Repetição	FEV <sub>1</sub> %	BQ	Enteropatia crónica/HNL	Giardia	Esplenomegalia	Doença autoimune	Doenças linfoproliferativas	Terapêutica diária
		Actual	Início	Diagnóstico									
1	M	45	6	30	RA+RB+GI	97	Sim	Sim (SMA)	Sim	Sim	Não	Carcinoma tiróide	Lepicortinole Levotiroxina Cloreto de potássio
2	F	36	10	27	RA+RB+GI	79	Sim	Sim HNL	Sim	Não	Não	Não	Deflazacort Tinidazol Cloreto de potássio
3	M	37	2	30	RB	93	Não	Não	Sim	Sim	Não	Granulomatose sistémica	Não
4	F	41	31	31	RA+GI	88	Não	Não HNL	Sim	Não	Poliartrite	Não	Salazopirina Naproxeno Tinidazol
5	M	48	30	40	RA+RB+C	93	Não	Não	Sim	Não	TCAI	Não	Não
6	F	57	47	52	RA+RB	89	Sim	Não	Sim	Não	TCAI?	Não	Levotiroxina Mucolítico
7	F	61	26	41	RB	68	Não	Não	Não	Não	GCA	Não	CI+BD Levotiroxina
8	F	57	33	46	RA+RB	57	Sim	Não HNL	Não	Não	Não	Adenoma antro gástrico	CI+BD Oxigenoterapia
9	F	57	6	32	RB+GI	108	Sim	Não	Não	Não	GCA	Não	Captopril
10	F	66	18	40	RB	136	Sim	Não	Não	Não	GCA	Não	Omeprazol
11	M	21	11	28	RA Encefalite	88	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Mucolítico Anticonvulsionante
12	F	56	20	37	U	130	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

HNL – Hiperplasia nodular linfóide; RA – Infecções respiratórias altas; RB – Infecções respiratórias baixas; GI – Infecções gastrintestinais; C – Candidíase oral; U – Infecções urinárias BQ – Bronquiectasias; GCA – Gastrite crónica atrófica; TAI – Tiroidite autoimune; TCAI – Trombocitopenia autoimune; CI – Corticóide inalado; BD – Broncodilatador inalado; SMA – Síndrome de malabsorção

dois apresentavam simultaneamente diminuição de células T reguladoras e diminuição grave das células B memória (0%). O mesmo número apresentava diminuição na percentagem de células CD4 *naive*. No grupo de doentes que desenvolveram complicações autoimunes, 2/3 apresentavam diminuição das células B memória, CD4 e CD8 *naive*; 1/3 diminuição de células CD4 *naive* e apenas um deles apresentava as células T reguladoras diminuídas. Os doentes que tinham somente complicações infecciosas apresentavam valores normais nas subpopulações linfocitárias B e T analisadas.

As crianças, de 8 e 12 anos, do sexo feminino, apresentavam-se com clínica de infecções do aparelho respiratório superior e inferior, necessitando de internamento em média uma vez por ano e, uma delas, também com infecções envolvendo a pele e o aparelho urinário. Em ambos os casos, foi identificada colonização das vias respiratórias por *Haemophilus influenzae* e bronquiectasias na altura do diagnóstico. Ambas apresentavam asma brônquica. Um dos casos revelou uma repercussão negativa no desenvolvimento estatoponderal (Quadro 3). O estudo das imuno-

**Quadro 2.** Imunidade humoral e celular dos doentes com IDCV em idade adulta

Doentes	Leucócitos totais (cels/ $\mu$ L)	CD19		IgG (mg/dL)	IgM (mg/dL)	IgA (mg/dL)	CD4		CD8		Razão CD4/CD8	Treg		Cél. B memória switched (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> )	
		céls/ $\mu$ L	%				céls/ $\mu$ L	%	céls/ $\mu$ L	%		céls/ $\mu$ L	%	céls/ $\mu$ L	%
1	12000	240	2	<3	23	<7	840	28	2010	67	0,42	5	0,2	0	0
2	7900	24	0,3	260	17,8	23	583	41	782	55	0,75	9	0,6	0,48	2
3	5400	162	3	542	4	<6	522	46	408	36	1,27	4	0,4	0	0
4	6100	122	2	321	30	<6,6	869	57	655	43	1,32	6	0,4	1,22	1
5	5700	228	4	391	18	52	520	57	337	37	1,54	7	0,7	75	33
6	5400	108	2	287	64	<6	441	48	459	50	0,96	6	0,7	0	0
7	5600	112	2	497	72	<7	521	30	1180	68	0,44	7	0,4	4,48	4
8	4800	96	2	225	9	6,6	206	43	240	50	0,86	7	1,5	1,92	2
9	7300	365	5	444	14	<7	906	43	494	52	0,83	5	0,5	14,6	4
10	4600	5	0,1	396	<4	<7	290	15	1623	84	0,18	4	0,2	0	0
11	4000	120	3	37	4	<6	640	50	550	43	1,16	7	0,5	6	5
12	5600	185	3	212	250	22	497	65	238	31	2,09	9	1,2	18,96	14
<b>C (n=12)</b>	6383 $\pm$ 1377	283 $\pm$ 220	4,17 $\pm$ 2,55	NE	NE	NE	973 $\pm$ 485	63,3 $\pm$ 8,6	454 $\pm$ 196	30,5 $\pm$ 7,5	2,22 $\pm$ 0,77	6,25 $\pm$ 2,09	0,52 $\pm$ 0,29	44,3 $\pm$ 43,7	20,9 $\pm$ 16,6
<b>Valores referência</b>				700-1600	40-230	70-160									6,5-29,2

**Quadro 3.** Características clínicas, exames complementares de diagnóstico e terapêutica dos doentes com IDCV em idade pediátrica

Doente		13	14
Sexo		F	F
Idade	Actual	8 anos	12 anos
	Início sintomas	4 meses	2 anos
	No diagnóstico	7 anos	12 anos
Infecções de repetição		RB	RA+RB+U
FEV <sub>1</sub> (%)		102,6	60
Bronquiectasias		Sim	Sim
Outras complicações (Esplenomegalia, giardíase, doença autoimune, doenças malignas)		Não	Não
Terapêutica diária		IGSC (desde 7A) CI+BD Amoxicilina+ácido clavulânico (dose profiláctica)	IGSC (desde 13A) CI Cinesiterapia respiratória regular

RA – Infecções respiratórias altas; RB – Infecções respiratórias baixas; U – Infecções urinárias; CI – corticoide inalado; BD – Broncodilatador inalado; IGSC – Imunoglobulina subcutânea

**Quadro 4.** Evolução dos valores de imunoglobulinas e subpopulações linfocitárias T e B das crianças com IDCV

Doentes	Idade (anos)	Nível de Ig (mg/dL)			CD19		CD4		CD8		CD4/CD8	Treg (cél/μL)	Cel. B memória switched (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> )		Título Isoem.	Resposta à vacinação	
		IgG	IgM	IgA	cél/μL	%	cél/μL	%	cél/μL	%			cél/μL	%		Antes (mg/dL)	Depois (mg/dL)
13	5	534	59	40											Neg	< 33	>154
	7	350	19	0	229	5,17	0,82	58,4	332	34,1	1,71	0,82	0,95	0,02		< 33	< 33
14	7	1010	50	<24											Neg		
	12	460	94	<6	138	2,18	6,41	60,2	152	32,2	1,87	6,41	0,34	0,01		76	190

**Quadro 5.** Contagem diferencial das subpopulações de células CD4 e CD8

Doentes	CD4 (%)				CD8 (%)			
	Naive	Memória central	Memória efetora	Terminal efetora	Naive	Memória central	Memória efetora	Terminal efetora
1	5	39	34	13	2	3	70	26
2	30	42	25	6	7	9	40	50
3	36	33	19	15	22	8	35	41
4	22	42	29	9	25	10	32	33
5	29	48	22	2	38	21	23	20
6	33	36	25	5	11	6	18	64
7	29	36	22	13	9	7	44	43
8	9	53	35	8	5	9	30	60
9	26	43	18	11	13	9	20	56
10	20	39	36	5	3	2	50	45
11	63	29	4	5	74	6	15	8
12	35	23	27	15	32	19	30	21
13	66	21	10	5	56	8	16	21
14	24	30	27	18	26	13	21	40
C (n=12)	34,7 ±10,7	42,0 ±12,7	18,3 ±5,5	7,8 ±5,8	29,0 ±13,4	11,3 ±8,6	27,0 ±11,3	35,1 ±16,1

globulinas e subpopulações linfocitárias B e T destas crianças apresentava ligeira diminuição das células B e valores normais das diferentes subpopulações de células B e T (Quadros 4 e 5, casos 13 e 14).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, a IDCV representa 8,5 % do total de IDP, percentagem inferior ao encontrado na base euro-

peia da ESID entre os anos 2006-2008 (20,7%). O atraso no diagnóstico foi de 16 anos, em média, sobreponível ao encontrado por outros autores. Este eventual subdiagnóstico poderá reflectir o facto de esta doença ainda não ser reconhecida por alguns profissionais de saúde. O período de tempo que decorreu entre o início da sintomatologia e o diagnóstico não parece estar relacionado com o desenvolvimento de complicações estruturais, já que 50% dos doentes apresentavam bronquiectasias na altura do diagnóstico, independente do tempo de evolução. Por outro lado, as complicações autoimunes, imunoproliferativas e inflamatórias também não parece estarem relacionadas com o tempo de evolução da doença. Encontraram-se síndromes restritivo e obstrutivo, apesar da função pulmonar estar normal na maioria dos casos. A prevalência de doença gastrintestinal, na forma de diarreia crónica (variável entre as séries, de 21 a 56,6%), foi de 14,3% na presente série, inferior ao esperado, ao contrário da hiperplasia nodular linfóide, descrita em 8% dos casos, e, neste estudo, presente em 25% dos doentes<sup>7</sup>. Relativamente às complicações de natureza linfoproliferativa, salienta-se o facto de nenhum doente ter desenvolvido linfoma, patologia de elevada mortalidade, com risco aumentado nos doentes com IDCV.

Nos 6 doentes que desenvolveram complicações autoimunes (42,8%), a maioria apresenta diminuição da percentagem de células B memória *switched* (metade destes inferior a 2%), assim como das células CD8 *naive*, e 1/3 redução das células CD4 *naive*, tal como é observado no estudo prospectivo DEFI<sup>17</sup>. Em contrapartida, apenas um doente apresenta diminuição das células T reguladoras. De modo semelhante, nos 3 doentes com doenças linfoproliferativas (21,4%), as células B memória *switched* estão diminuídas, a par duma diminuição das células CD 4 *naive* em dois casos. O número absoluto de células T reguladoras apenas se encontra diminuído em um dos doentes.

Os dois doentes com enteropatia crónica apresentavam diminuição de células B memória, num inferior a 2%. Num dos casos verificou-se ainda diminuição das células CD4 *naive*. Estas observações estão de acordo com o observado no estudo DEFI<sup>17</sup>. Um destes apresenta ainda diminuição

das células T reguladoras. Nos dois casos com esplenomegalia só se verifica diminuição acentuada das células B memória, semelhante ao encontrado noutras séries.<sup>16,17</sup>

Os quatro doentes (28%) que apresentavam apenas infecções respiratórias de repetição (dois deles crianças) tinham valores normais de células CD4 *naive*, CD 8 *naive* e B memória *switched*, o que contrasta com o encontrado no estudo já referido, onde esses valores estavam diminuídos<sup>17</sup>.

A evolução clínica observada nas crianças incluídas neste estudo ilustra as dificuldades no diagnóstico definitivo desta doença em idade pediátrica. As duas crianças apresentavam as primeiras manifestações de doença nos primeiros 2 anos de vida, com os estudos imunológicos iniciais normais aos 4 anos. Entre os 6 e 8 anos, assiste-se a uma diminuição progressiva dos valores das imunoglobulinas e resposta ineficaz na produção de anticorpos *anti-pneumococcus* após vacinação, associada ao aparecimento de rápida degradação da função pulmonar e de bronquiectasias. À semelhança do descrito, estas crianças com IDCV apresentavam doença pulmonar obstrutiva associada<sup>21</sup>. O tempo médio entre o início dos sintomas e o estabelecimento do diagnóstico, com consequente introdução de terapêutica de substituição, foi de 7 anos, semelhante ao que se encontra descrito<sup>12</sup>.

Apesar dos estudos na idade pediátrica sugerirem presença de fenótipos de IDCV diferentes do adulto, poucos são os que avaliaram as subpopulações de células B e ainda não existem estudos que correlacionem as células B e T com determinadas características clínicas. Os estudos que incluíram doentes em idade pediátrica sugerem que a diminuição no número de células B memória *switched* se associa a um risco mais elevado de complicações e a um prognóstico menos favorável<sup>18</sup>. Nas duas crianças, a caracterização imunológica das subpopulações de células B e T revelou-se normal, designadamente as células B memória, o que pode justificar a ausência de complicações, excepto bronquiectasias. O prognóstico destes doentes poderá ser favorável, pois, segundo Yong *et al.*, o mesmo parece estar dependente da quantificação das células B memória na criança<sup>18</sup>.

Dez doentes efectuem terapêutica de substituição adequada com imunoglobulina IgG por via endovenosa e qua-

tro por via subcutânea. Estudos revelam que a instituição precoce de IgG policlonal de substituição não parece diminuir o risco de desenvolvimento de bronquiectasias, apesar da manutenção dum nível de IgG pré-infusão adequado (superior a 500 mg/dl)<sup>22</sup>.

O prognóstico dos doentes com IDCV depende das alterações estruturais na altura do diagnóstico e do aparecimento de complicações, nomeadamente de doença autoimune, neoplásica ou doença granulomatosa sistémica.

## CONCLUSÕES

Este estudo encontrou distintas características imunológicas nos diferentes fenótipos clínicos. Nesta série, a análise efectuada das subpopulações de células B e T demonstrou que, nos doentes com complicações linfoproliferativas, autoimunes e esplenomegalia, a principal alteração encontrada foi a acentuada diminuição das células B memória. Nos doentes apenas com complicações infecciosas não encontramos alterações nas subpopulações linfocitárias. Salientamos o facto de as bronquiectasias estarem presentes em metade dos doentes na altura do diagnóstico e de o desenvolvimento de complicações não estar relacionado com o tempo de evolução da doença. Atendendo à natureza sistémica e à gravidade das complicações associadas a esta doença, o seguimento regular destes doentes é decisivo para a sua identificação precoce e consequente intervenção no sentido de um melhor prognóstico.

**Financiamento:** Nenhum

**Declaração de conflitos de interesse:** Nenhum a declarar

*Contacto:*

Prof. António Segorbe Luís  
Serviço de Imunoalergologia  
Hospitais da Universidade de Coimbra  
Praceta Prof. Mota Pinto  
Coimbra

## REFERÊNCIAS

1. European Society of Immunodeficiencies (ESID). 2008. Available from: <http://www.esid.org>.
2. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with this conditions. *Br J Haematol* 2009; 145: 709-27.
3. Ahn S, Cunningham-Rundles C. Role of B cells in common variable immunodeficiency. *Expert Rev Clin Immunol* 2009; 5(5):557-64.
4. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008; 112(2):277-86.
5. Glocker E, Ehl S, Grimbacher B. Common variable immunodeficiency in children. *Curr Opin Pediatr* 2007; 19(6):685-92.
6. Touw CML, Van de Ven AA, De Jong PA, Terheggen-Lagro S, Beek E, Sanders EAM, et al. Detection of pulmonary complications in common variable immunodeficiency. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 793-805.
7. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(4): 658-64.
8. Kalha I, Sellin JH. Common variable immunodeficiency and the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6:377-83.
9. Cunningham-Rundles C. Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2008; 28(Suppl 1): S42-5.
10. Silva SL, Ferreira MB, Rizzo LV. Imunodeficiência comum variável e doença autoimune. *Rev Port Imunoalergologia* 2008; 16 (3): 231-40.
11. Gompels MM, Hodges E, Lock RJ, Angus B, Whites H, Larkin A, et al. Lymphoproliferative disease in antibody deficiency: a multi-centre study. *Clin Exp Immunol* 2003; 134:314-20.
12. Urschel S, Kayikci L, Wintergerst U, Notheis G, Jansson A, Belohradsky B. Common Variable Immunodeficiency Disorders in Children: Delayed Diagnosis Despite Typical Clinical Presentation. *J Pediatr* 2009; 154:888-94.
13. Ogershok PR, Hogan MB, Welch JE, Corder WT, Wilson NH. Spectrum of illness in pediatric common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97:653-56.
14. Keles S, Artac H, Kara R, Gokturk B, Ozen A, Reisli I. Transient hypogammaglobulinemia and unclassified hypogammaglobulinemia: 'Similarities and differences'. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21:843-51.
15. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+) IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002; 99(5):1544-51.

16. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; 111(1):77-85.
17. Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier JL, Fieschi C, Vince N, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol* 2010; 30:746-55
18. Yong PL, Orange JS, Sullivan KE. Pediatric common variable immunodeficiency: Immunologic and phenotypic associations with switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 852-8.
19. Faria E, Silva S, Español T. Tratamento das imunodeficiências primárias por deficiência predominante de anticorpos. *Rev Port Imunoalergologia* 2004; 12(3): 251-60.
20. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(4): 776-94.
21. Llobet MP, Bertrán JM, Español T. Imunodeficiencia común variable en la edad pediátrica. *Allergol et Immunopathol* 2002; 30(1): 42-6.
22. Kainulainen L, Varpula M, Liippo K, Svedström E, Nikoskelainen J, Ruuskanen O. Pulmonary abnormalities in patients with primary hypogammaglobulinemia. *JACI* 1999; 104(5):1031-6.

# Correlation between the clinical and immunological phenotypes in adults and children with common variable immunodeficiency

## *Imunodeficiência comum variável em adultos e crianças: Correlação entre fenótipos clínicos e imunológicos*

Data de recepção / Received in: 11/03/2011

Data de aceitação / Accepted for publication in: 25/07/2011

Rev Port Imunoalergologia 2011; 19 (3): 171-181

Eugénia Almeida<sup>1</sup>, Emília Faria<sup>1,2</sup>, Nuno Sousa<sup>1</sup>, Tiago Carvalheiro<sup>3</sup>, Sónia Lemos<sup>2</sup>, Artur Paiva<sup>3</sup>, António Segorbe Luís<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Allergy and Clinical Immunology Department, Hospitais da Universidade de Coimbra. (HUC)

<sup>2</sup> Primary Immunodeficiency Outpatient Clinic, Paediatrics Unit, Centro Hospitalar dos Covões. (HPC)

<sup>3</sup> Cytometry Laboratory, Centro de Histocompatibilidade do Centro.

### ABSTRACT

**Background:** Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous disorder characterised by recurrent infections and antibody deficiency. Various classification schemes for distinct clinical phenotypes have been developed and correlated with different B cell and T cell phenotypes. **Aim:** To understand the clinical characteristics and their correlation with the B and T cell phenotypes in adult and children CVID patients. **Material and Methods:** We selected the CVID patients followed-up in HUC and HPC Primary Immunodeficiency Outpatient Clinics from 1st January 2000 to 31st December 2010 and performed a retrospective study of their clinical files. Different T and B lymphocyte immunophenotyping was then performed using the flow cytometer and the results were compared with 12 healthy controls. **Results:** Fourteen CVID patients (12 adults/2children) were evaluated. The adults had a mean age of 48.5 years and mean age at diagnosis of 36 years, F/M ratio 2:1. Recurrent lower respiratory tract infections and gastrointestinal infections were found in 75% and 33% of cases, respectively. The associated complications were bronchiectasis and autoimmune diseases (50%), lymphoproliferative disease (25%), splenomegaly and chronic en-

teropathy (17%). The children, both female, aged 8 and 12, had recurrent respiratory tract infections and bronchiectasis. In the adult patients, T and B lymphocyte subpopulations showed decrease of Treg cells in 2 patients, CD19 less than 1% in 2 patients and decreased switched memory B cells in 10 patients. Two of the 4 patients with reduction of naive CD4 cells had autoimmune diseases and the other lymphoproliferative diseases. In the children, the T and B lymphocyte subpopulations were normal. **Conclusions:** The B and T cell subset analysis revealed that the major abnormality was the more significant decrease of switched memory B cells in the patients with additional lymphoproliferative and autoimmune diseases and splenomegaly. In contrast, CVID patients without associated complications have no changes in T and B subpopulations, which may mean a more favourable prognosis.

**Key-words:** Bronchiectasis, clinical phenotypes, common variable immunodeficiency, immunoglobulins, B and T lymphocyte subsets

## RESUMO

**Fundamentos:** A imunodeficiência comum variável (IDCV) é uma doença heterogénea caracterizada por infeções recorrentes e deficiência de anticorpos. Têm sido descritas várias classificações que correlacionam diferentes perfis imunológicos das células B e T com distintos fenótipos clínicos. **Objetivos:** Conhecer as características clínicas e sua correlação com as subpopulações linfocitárias de adultos e crianças com IDCV. **Material e métodos:** Dos doentes com IDP observados na consulta de Imunodeficiência Primária dos HUC e HPC, entre 1 de Janeiro de 2000 e 31 de Dezembro de 2010, seleccionámos aqueles que cumpriam o diagnóstico de IDCV e procedeu-se ao estudo retrospectivo dos processos clínicos. Efectuou-se o estudo de imunofenotipagem dos linfócitos B e T através de citometria de fluxo e os resultados foram comparados com 12 controlos saudáveis. **Resultados:** Foram avaliados 14 doentes com IDCV, 12 adultos e 2 crianças. Os adultos, com uma relação feminino/masculino de 2:1, tinham uma média de idade de 48,5 anos e uma média de idade na altura do diagnóstico de 36 anos. Nestes doentes, as infeções respiratórias baixas recorrentes e as gastrintestinais estavam presentes em 75% e 33% dos casos, respectivamente. As complicações associadas foram bronquiectasias e doenças autoimunes (50% dos casos), doenças linfoproliferativas (25%), esplenomegalia e enteropatia crónica (17%). As crianças, ambas de sexo feminino, com 8 e 12 anos, para além da clínica de infeções respiratórias recorrentes, apresentavam bronquiectasias. Da análise das subpopulações linfocitárias nos adultos, salienta-se a diminuição de células T reguladoras em 2 doentes, diminuição inferior a 1% das células CD19 em 2 doentes e diminuição das células B memória switched em 10 doentes. Dos 4 doentes com diminuição de CD4 naive, 2 apresentavam doenças autoimunes e os restantes complicações linfoproliferativas. Nas crianças, o estudo das subpopulações B e T revelou-se normal. **Conclusões:** A análise efectuada das subpopulações de células B e T demonstrou que a principal alteração encontrada nos doentes com complicações linfoproliferativas, autoimunes e esplenomegalia foi a acentuada diminuição das células B memória. Ao contrário, os doentes com IDCV sem complicações associadas não apresentam alterações das subpopulações T e B, o que poderá documentar um prognóstico mais favorável.

**Palavras-chave:** Bronquiectasias, fenótipos clínicos, imunodeficiência comum variável, imunoglobulinas, subpopulações linfocitárias B e T.

## INTRODUCTION

Common Variable Immunodeficiency (CVID) was first described in 1953. It is a primary immunodeficiency (PID) characterised by abnormalities in the terminal function of B cells with compromised antibody production and clinically by recurrent infections. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) and the Pan-American Group for Immunodeficiency (PAGID) classify as CVID criteria a decreased IgG, IgM and/or IgA levels (at least 2 standard-deviations below the mean for the age group), onset of symptoms after 2 years of age, lack of isohaemagglutinins and/or deficient response to vaccination, after the exclusion of other causes of hypogammaglobulinaemia<sup>1</sup>. More recently, the European Initiative for Primary Immunodeficiencies (EUROPID) has suggested a change in the criterion of age to a minimum of 4 years<sup>2</sup>.

CVID is the result of a primary defect of B cell immunity with lack of differentiation of mature B cells into plasma cells, and some abnormalities in the function and expression of T cell receptor and in cytokine production and expression have also been described. Genetic abnormalities have recently been seen in CVID patients, particularly mutations in the coding genes of the molecules involved in the survival of the B cell and the isotype switch (CD19, TACI, ICOS)<sup>2,3,4</sup>.

Symptoms in CVID can onset at any age, with two peaks of incidence; 5-10 and 20-30 years of age<sup>5</sup>. Considered the most frequent symptomatic PID in adults, this disease affects both sexes equally and its incidence is estimated at 1 in 10,000-50,000 cases<sup>6</sup>.

CVID is a heterogeneous disease with a wide variety of clinical manifestations which vary in severity. Recurrent sinopulmonary infections are the most frequent, while gastrointestinal and autoimmune diseases are common and can represent an initial manifestation of CVID. Bronchiectasies,

usually seen when diagnosis is made, stem from severe recurrent infections of the lower respiratory tract and do not seem to be related to IgG level<sup>2</sup>. Infectious gastrointestinal infections, neoplastic, inflammatory or autoimmune diseases can mimic well-known gastrointestinal diseases, such as inflammatory intestinal disease, coeliac disease, or malabsorption syndromes, or coexist with these diseases. The physiopathological mechanism underlying the majority of these manifestations, in addition to B cell deficiency, seems also to be associated with T cell dysfunction<sup>7,8</sup>. Around 20% of CVID patients develop autoimmune complications, with the most frequent being immune thrombocytopenic purpura and haemolytic anaemia. This and systemic granulomatous disease have a less favourable associated prognosis. This unexpected autorreactivity in patients who have antibody deficiency at the same time remains to be elucidated<sup>9,10</sup>. Patients with CVID also run a higher risk of gastric carcinoma and lymphoma, particularly type B, associated with Epstein-Barr virus. Lymphoma in females presents more frequently in their fifth or sixth decade of life<sup>11</sup>.

Recent studies conducted with children have shown a clinical presentation of CVID similar to that seen in adults in terms of autoimmune and infectious diseases. They show a higher rate of asthma and an association with growth hormone deficiency<sup>12,13</sup>. There are less frequent early-onset clinical cases of CVID described, and the diagnosis is not usually made before the child is 4-6 years old. The differential diagnosis in the child is made with other PID, namely transitory hypogammaglobulinaemia of infancy, X-linked agammaglobulinaemia, IgE subclass deficiency, IgA deficiency and Hyper-IgA syndrome. When a child has normal T cellular immunity but hypogammaglobulinaemia, defined as a decrease in levels of one or more immunoglobulin isotypes (at least 2 standard-deviations below the mean for the age group), the hypothesis of an acquired or physiological tran-

sitory immunodeficiency which might persist beyond 6 months of age should be considered<sup>14</sup>.

The last 10 years have seen an increasing number of publications on adult-age CVID, allowing a deeper understanding of this disease. It is currently considered a syndrome with multiple clinical phenotypes, correlated with different immunological profiles. In a recent study, Chapel *et al.* found 83% of the 334 CVID patients studied had one of the 5 following clinical phenotypes: no complication, autoimmunity, polyclonal lymphocyte infiltration, enteropathy and lymphoid neoplasia, reflected in the different survival rates<sup>4</sup>. The association of polyclonal lymphocyte infiltration with increased risk of lymphoid neoplasia was found as a predictive clinical factor, which correlates with an increased serum IgA level. Autoimmune disease correlated with decreased circulating CD8 cells. Other authors have suggested the definition of subgroups with B cell phenotype base, based on flow cytometry analysis of the populations of peripheral B cells. The 2002 Warnatz *et al.* study was one of the first to classify CVID patients based on the count of switched memory B cells (CD27<sup>+</sup>IgM-IgD) and correlate this with clinical phenotypes<sup>15</sup>. After that, the multicentre *EUROclass* study of 303 CVID patients confirmed a significant decrease in switched memory cells in the majority of patients at higher risk of splenomegaly and granulomatous disease, added to the concept of expansion of B CD21<sup>low</sup> cells in patients with splenomegaly and expansion of Transitional B cells (group SmB-Tr<sup>hi</sup>) associated to lymphadenopathy (in the group of patients with a percentage of switched memory cells below or equal to 2%)<sup>16</sup>.

More recently, the prospective French DEFI study concluded that a decrease in switched memory cells and naive CD4 and CD8 cells found in CVID patients which only develops infections is more pronounced in patients with lymphoproliferative diseases, autoimmune cytopaenias or chronic enteropathy. This study also showed that patients

with lymphoproliferative complications and autoimmune cytopaenias have decreased Treg cells<sup>17</sup>.

Similar to that seen in adults, Yong *et al.* recently found an association between different clinical phenotypes and immunological abnormalities, namely decreased number of switched memory B cells in 45 children with CVID. These children had lower serum IgG and IgM levels, which correlated with a greater number of infections, autoimmune disease, bronchiectasias, pulmonary granulomatous disease and haematological neoplasia<sup>18</sup>.

Regular replacement with immunoglobulin G is the basis of treatment of this condition, in addition to the early institution of antibiotics during acute infections, with opinion divided over the usefulness of prophylactic antibiotics. Regular respiratory kinesitherapy is fundamental.

Several authors have shown the decreased rate and severity of infections and the improved prognosis of this PID in patients with adequate treatment with immunoglobulin<sup>2,19</sup>. Immunosuppression therapy can be used in the treatment of autoimmune disease. The speed of diagnosis and optimisation of treatment has considerably reduced mortality and increased the quality of life of these patients in the last few decades.

## MATERIAL AND METHODS

We performed a retrospective study into the clinical files of adults and children diagnosed with PID followed-up at Primary Immunodeficiency outpatient appointments at the Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) and the Hospital Pediátrico de Coimbra (HPC) January 1 2000-December 31 2009. We characterised PID based on the classification of the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee<sup>20</sup>. We se-

lected adults and children who in December 2009 met the criteria for CVID, and analysed the clinical aspects, treatment administered, computerised thoracic tomography (CT), abdominal scan and spirometry. We also made a count of the lymphocyte subpopulations in the patients and in 12 healthy controls. To stain the naive, memory and effector CD4 and CD8 T cells, we used Pacific B anti-CD4 antibodies, anti-CD3 FITC, anti-CCR7 phycoerythrin, anti-CD8 PerCP and anti-CD45RA APC; for naive and memory B cells, Pacific B anti-CD4 antibodies, Pacific Orange anti-CD45, anti-IgG FITC, anti-IgE PE, anti-IgD PE, anti-CD27 PC5, anti-CD19 PC7, anti-IgM APC and anti-CD38 APC-H7 and, for Treg cells, anti-CD25 FITC antibodies, anti-CD127 PE and anti-CD4 PerCP-Cy5.5, using combined expression for CD4, strong expression for CD25 and weak to negative expression for CD127. Acquisition of results was performed in two consecutive stages in a FACSCanto II™ flow cytometer using FACSDiva software and for Treg cells, FACSCalibur flow cytometer using CellQuest Pro software. Analysis of results was performed using Infinicyt analysis software.

## RESULTS

We selected 12 adult patients diagnosed with CVID, 14.5% of the total adult patients with PID followed-up at HUC, and 2 children from HPC with the same diagnosis who represented 2.4% of the patients having PID appointments at this hospital.

In the population of adult patients with CVID, there was a 2:1 female/male ratio, mean age 48.5 years, with symptoms beginning at mean 24 years of age in women and 12 years of age for men. The mean age at time of diagnosis was 36 years. Mean time between onset of symptoms and diagnosis was 16 years. Only one patient had a child with IgA and IgG2 deficiency.

In the adult series of patients, recurring lower respiratory tract infections were found in 75% of patients and gastrointestinal infections in 33%. One patient had only a clinical picture of urinary infections and another experienced an episode of childhood encephalitis and enterovirus. Half of the patients had bronchiectasias at the time of diagnosis. In the last evaluation, lung function study found 3 patients (25%) had obstructive syndrome (D2, D7, D8) and 2 (17%) restrictive syndrome. The most frequent complications were autoimmune diseases such as bronchiectasias (50%), followed by lymphoproliferative disease (25%) and finally splenomegaly and chronic enteropathy (both 17%). One patient had severe malabsorption syndrome, with celiac disease and intestinal lymphoma excluded (D1). The faecal paracytology exam and/or upper digestive tract endoscopic biopsy detected giardiasis in 50% of cases. Three patients (25%) had nodular lymphoid hyperplasia and 2 developed malignant neoplasias (papillary carcinoma of the thyroid and adenoma of the gastric antrum) (Table 1).

Table 2 shows the immunoglobulin levels, total leukocyte count, B cells, T cells, T cell subsets and switched memory cells at the time of diagnosis in adult age CVID patients. All patients had decrease in the three immunoglobulin classes. T CD4 lymphocytes were decreased in 9 cases and CD8 lymphocytes were increased in another 9. Only 2 patients had CD19 lymphocytes decreased below 1% (D2 and D10). We found an inverse CD4/CD8 relationship in 50%. Only 2 patients had decreased Treg cells in relation to the same group. Ten patients had decreased switched memory B cells with the count in 7 below or equal to 2%. The 2 patients who had only a clinical picture of infections had no change in the number of memory B cells. The differential count of CD4 and CD8 cells showed a decrease in naive CD4 cells and naive CD8 cells in 4 and 6 patients in turn, in comparison with the control group. In an analysis of lymphocyte subpopulations in the group of patients with clinical complications, 2 of the 3 who developed lym-

**Table 1.** Daily clinical and treatment characteristics of adults with CVID

Patients	Sex	Age (yrs)			Repeat Infections	FEV <sub>1</sub> %	BQ	Chronic Enteropathy /HNL	Giardiasis	Splenomegaly	Autoimmune Disease	Lymphoproliferative Disease	Daily Treatment
		Current	Start	Diagnosis									
1	M	45	6	30	RA+RB+GI	97	Yes	Yes (SMA)	Yes	Yes	No	Thyroid Carcinoma	Lepicortinolo Levothyroxine Potassium chloride
2	F	36	10	27	RA+RB+GI	79	Yes	Yes HNL	Yes	No	No	No	Deflazacort Tinidazol Potassium chloride
3	M	37	2	30	RB	93	No	No	Yes	Yes	No	Systemic granulomatous	Não
4	F	41	31	31	RA+GI	88	No	No HNL	Yes	No	Polyarthritis	No	Salazopyrin Naproxen Tinidazol
5	M	48	30	40	RA+RB+C	93	No	No	Yes	No	TCAI	No	Não
6	F	57	47	52	RA+RB	89	Yes	No	Yes	No	TCAI?	No	Levothyroxine Mucolytic
7	F	61	26	41	RB	68	No	No	No	No	GCA	No	CI+BD Levothyroxine
8	F	57	33	46	RA+RB	57	Yes	No HNL	No	No	No	Adenoma Gastric antrum	CI+BD Oxygentherapy
9	F	57	6	32	RB+GI	108	Yes	No	No	No	GCA	No	Captopril
10	F	66	18	40	RB	136	Yes	No	No	No	GCA	No	Omeprazol
11	M	21	11	28	RA Encephalitis	88	No	No	No	No	No	No	Mucolytic Anticonvulsant
12	F	56	20	37	U	130	No	No	No	No	No	No	Não

HNL – Lymphoid nodular hyperplasia; RA – Upper respiratory infections; RB – Lower respiratory infections; GI – Gastrointestinal infections; C – oral candidiasis; U – Urinary infections; BQ – Bronchiectasias; GCA – Chronic atrophic gastritis; TAI – Autoimmune thyroiditis; TCAI – Autoimmune thrombocytopaenia; CI – Inhaled corticosteroids; BD – Inhaled bronchodilator; SMA – Malabsorption syndrome

phoproliferative complications had simultaneous decrease of Treg cells and severe decrease in memory B cells (0%). The same number had a decreased percentage of naive CD4 cells. Two-thirds of the group of patients who developed autoimmune complications had decreased memory B cells and CD4 and naive CD8 cells. One-third had decreased naive CD4 cells and only one of them had decreased Treg cells. The patients who had only infectious complications had normal counts in the B and T lymphocyte subpopulations analysed.

The children aged 8-12 years old, female, had a clinical picture of upper and lower respiratory tract infections needing hospital admission, mean once a year. One of them also had skin and urinary tract infections. In both cases colonisation of the respiratory tract by *Haemophilus influenza* and bronchiectasias was identified at diagnosis. Both had bronchial asthma. One case had a negative impact on height and weight development (Table 3). Study of immunoglobulins and B

**Table 2.** Humoral and cellular immunity in adults with CVID

Patients	Total Leukocytes (cels/ $\mu$ L)	CD19		IgG (mg/dL)	IgM (mg/dL)	IgA (mg/dL)	CD4		CD8		CD4/CD8 Ratio	Treg		Switched memory B cell (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> )	
		cells/ $\mu$ L	%				cells/ $\mu$ L	%	cells/ $\mu$ L	%		cells/ $\mu$ L	%	cells/ $\mu$ L	%
1	12000	240	2	<3	23	<7	840	28	2010	67	0,42	5	0,2	0	0
2	7900	24	0,3	260	17,8	23	583	41	782	55	0,75	9	0,6	0,48	2
3	5400	162	3	542	4	<6	522	46	408	36	1,27	4	0,4	0	0
4	6100	122	2	321	30	<6,6	869	57	655	43	1,32	6	0,4	1,22	1
5	5700	228	4	391	18	52	520	57	337	37	1,54	7	0,7	75	33
6	5400	108	2	287	64	<6	441	48	459	50	0,96	6	0,7	0	0
7	5600	112	2	497	72	<7	521	30	1180	68	0,44	7	0,4	4,48	4
8	4800	96	2	225	9	6,6	206	43	240	50	0,86	7	1,5	1,92	2
9	7300	365	5	444	14	<7	906	43	494	52	0,83	5	0,5	14,6	4
10	4600	5	0,1	396	<4	<7	290	15	1623	84	0,18	4	0,2	0	0
11	4000	120	3	37	4	<6	640	50	550	43	1,16	7	0,5	6	5
12	5600	185	3	212	250	22	497	65	238	31	2,09	9	1,2	18,96	14
<b>C (n=12)</b>	6383 $\pm$ 1377	283 $\pm$ 220	4,17 $\pm$ 2,55	NE	NE	NE	973 $\pm$ 485	63,3 $\pm$ 8,6	454 $\pm$ 196	30,5 $\pm$ 7,5	2,22 $\pm$ 0,77	6,25 $\pm$ 2,09	0,52 $\pm$ 0,29	44,3 $\pm$ 43,7	20,9 $\pm$ 16,6
Reference values				700-1600	40-230	70-160									6,5-29,2

**Table 3.** Clinical characteristics, ancillary diagnostic exams and treatment in children with CVID

Patient	13	14
Sex	F	F
Age	Current	8 yrs
	At start of symptoms	12 yrs
	At diagnosis	2 yrs
Recurrent infections	RB	RA+RB+U
FEV <sub>1</sub> (%)	102,6	60
Bronchiectasias	Yes	Yes
Other complications (Splenomegaly, Giardiasis, Autoimmune Disease, Malignant Disease)	No	No
Daily treatment	IGSC (since 7 yrs) CI+BD Amoxicillin + clavulanic acid (prophylactic dose)	IGSC (since 13 yrs) CI Regular respiratory kinesiotherapy

RA – Upper respiratory infections; RB – Lower respiratory infections; U – Urinary infections; CI – Inhaled corticosteroid; BD – Inhaled bronchodilator; IGSC – Subcutaneous immunoglobulin

**Table 4.** Evolution of the immunoglobulin and T and B lymphocyte subpopulation values in children with CVID

Patients	Age (yrs)	Ig level (mg/dL)			CD19		CD4		CD8		CD4/CD8	Treg (cells/ $\mu$ L)	Switched memory B cell (CD27 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> )		Isohaem.	Response to vaccination	
		IgG	IgM	IgA	cells/ $\mu$ L	%	cells/ $\mu$ L	%	cells/ $\mu$ L	%			cells/ $\mu$ L	%		Before (mg/dL)	After (mg/dL)
13	5	534	59	40											Neg	< 33	>154
	7	350	19	0	229	5,17	0,82	58,4	332	34,1	1,71	0,82	0,95	0,02		< 33	< 33
14	7	1010	50	<24											Neg		
	12	460	94	<6	138	2,18	6,41	60,2	152	32,2	1,87	6,41	0,34	0,01		76	190

**Table 5.** Differential count of the CD4 and CD8 cell subpopulations

Patients	CD4 (%)				CD8 (%)			
	Naive	Central memory	Effector memory	Effector terminal	Naive	Central memory	Effector memory	Effector terminal
1	5	39	34	13	2	3	70	26
2	30	42	25	6	7	9	40	50
3	36	33	19	15	22	8	35	41
4	22	42	29	9	25	10	32	33
5	29	48	22	2	38	21	23	20
6	33	36	25	5	11	6	18	64
7	29	36	22	13	9	7	44	43
8	9	53	35	8	5	9	30	60
9	26	43	18	11	13	9	20	56
10	20	39	36	5	3	2	50	45
11	63	29	4	5	74	6	15	8
12	35	23	27	15	32	19	30	21
13	66	21	10	5	56	8	16	21
14	24	30	27	18	26	13	21	40
C (n=12)	34,7 $\pm$ 10,7	42,0 $\pm$ 12,7	18,3 $\pm$ 5,5	7,8 $\pm$ 5,8	29,0 $\pm$ 13,4	11,3 $\pm$ 8,6	27,0 $\pm$ 11,3	35,1 $\pm$ 16,1

and T lymphocyte subsets in these children showed a slight decrease in B cells and normal counts of the different B and T cell subsets (Tables 4 and 5, cases 13 and 14).

**DISCUSSION**

In our study, CVID represented 8.5% of the total PID, a lower percentage than that found in the ESID European

database for 2006-2008 (20.7%). The time to diagnosis was a mean 16 years, similar to that found by other authors. This possible underdiagnosis could be a reflection of this disease not yet being recognised by some health-care professionals. The timelag between onset of symptoms and diagnosis does not seem to be related to the development of structural complications, as 50% of patients had bronchiectasias at diagnosis, independently of how long they had had the disease. Equally so, autoimmune, immunoproliferative and inflammatory complications also do not seem to be related to how long the patient has had the disease. Restrictive and obstructive syndromes were found, despite lung function being normal in the majority of cases. The rate of gastrointestinal disease in the form of chronic diarrhoea ranges in various series from 21-56.6% and was 14.3% in our series. This was lower than expected, unlike nodular lymphoid hyperplasia, which was seen in 8% of cases and in our study found in 25% of patients<sup>7</sup>. In terms of lymphoproliferative complications, we highlight that no patient had development of lymphoma, a pathology with high mortality and of which CVID patients run high risk.

The majority of the 6 patients who developed autoimmune complications (42.8%) had a decreased switched memory B cell count (half of them below 2%), along with naive CD8 cells and one-third reduction of naive CD4 cells, as was seen in the prospective DEFI study<sup>17</sup>. In counterpoint, only 1 patient had decreased Treg cells. Similarly, in the 3 patients with lymphoproliferative diseases (21.4%), the switched memory B cells were lowered, as were the naive CD4 cells in 2 cases. The absolute number of Treg cells was only found decreased in one of the patients.

The 2 patients with chronic enteropathy had lowered memory B cell count, in one below 2%. One had in addition

lowered naive CD4 cell count. These findings are in line with those seen in the DEFI study<sup>17</sup>. One of these also had decreased Treg cells. Marked decrease in memory B cells was only seen in the two cases with splenomegaly, similar to what was found in other series<sup>16,17</sup>.

The 4 patients (28%) who only had recurrent respiratory infections (two of them children) had normal naive CD4 cell, naive CD8 and switched B memory cell counts, unlike that seen in the abovementioned study in which these counts were lowered<sup>17</sup>.

The clinical evolution seen in the children in this study illustrates the difficulties in making a definite diagnosis in this disease in children. Two children presented the first manifestations of disease within the first 2 years of life, with the initial immunology studies normal at 4 years. Between the ages of 6-8 there was a progressive decrease in immunoglobulin levels and inefficient response in the production of *anti-pneumococcus* antibodies after vaccination, associated to the appearance of rapid degradation of lung function and bronchiectasias. Similar to that described, these children with CVID had associated obstructive pulmonary disease<sup>21</sup>. Mean time between onset of symptoms and establishment of diagnosis, with consequent introduction of replacement therapy, was 7 years, similar to that described<sup>12</sup>.

Despite studies into children suggesting the presence of different CVID phenotypes to those found in adults, there are only a handful of studies which evaluate the B cell subpopulations and there are as yet no studies which correlate the B and T cells with determined clinical characteristics. Studies which include children suggest that the decreased switched memory B cell count is associated with a higher risk of complications and a less favourable prognosis<sup>18</sup>. In the two children, the immunological characterisation of the B and T cell subpopulations was normal,

particularly memory B cells, which might explain the lack of complications, except bronchiectasias. The prognosis of these patients might be favourable as, according to Yong *et al.*, it seems to depend on the memory B cell count in the child<sup>18</sup>.

Ten patients underwent adequate replacement therapy with intravenous IgG and 4 with subcutaneous IgE. Studies show that the early institution of polyclonal replacement IgE does not seem to lower the risk of developing bronchiectasias, despite the maintaining of an adequate pre-infusion IgE level (over 500 mg/dl)<sup>22</sup>.

The prognosis of CVID patients depends on the structural abnormalities at the time of diagnosis and any complications, namely autoimmune, neoplasia or systemic granulomatous disease.

## CONCLUSIONS

This study found distinct immunological characteristics in the different clinical phenotypes. In this series the analysis carried out in the B and T cell subsets showed that the main abnormality found in the patients with lymphoproliferative, autoimmune and splenomegaly complications was a marked decrease in memory B cells. In the patients who only had infectious complications, we found no abnormalities in the lymphocyte subpopulations. We highlight that half the patients had bronchiectasias at diagnosis and development of complications was not related to the disease's length of evolution. Given the systemic nature and the severity of the complications associated with this disease, the regular follow-up of patients is vital for an early identification and consequent intervention for a better prognosis.

**Funding:** None

**Conflict of interest disclosure:** None

## REFERENCES

1. European Society of Immunodeficiencies (ESID). 2008. Available from: <http://www.esid.org>.
2. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with this conditions. *Br J Haematol* 2009; 145: 709-27.
3. Ahn S, Cunningham-Rundles C. Role of B cells in common variable immunodeficiency. *Expert Rev Clin Immunol* 2009; 5(5):557-64.
4. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, *et al.* Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008; 112(2):277-86.
5. Glocker E, Ehl S, Grimbacher B. Common variable immunodeficiency in children. *Curr Opin Pediatr* 2007; 19(6):685-92.
6. Touw CML, Van de Ven AA, De Jong PA, Terheggen-Lagro S, Beek E, Sanders EAM, *et al.* Detection of pulmonary complications in common variable immunodeficiency. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 793-805.
7. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(4): 658-64.
8. Kalha I, Sellin JH. Common variable immunodeficiency and the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6:377-83.
9. Cunningham-Rundles C. Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2008; 28(Suppl 1): S42-5.
10. Silva SL, Ferreira MB, Rizzo LV. Imunodeficiência comum variável e doença autoimune. *Rev Port Imunoalergologia* 2008; 16 (3): 231-40.
11. Gompels MM, Hodges E, Lock RJ, Angus B, Whites H, Larkin A, *et al.* Lymphoproliferative disease in antibody deficiency: a multi-centre study. *Clin Exp Immunol* 2003; 134:314-20.
12. Urschel S, Kayikci L, Wintergerst U, Notheis G, Jansson A, Belohradsky B. Common Variable Immunodeficiency Disorders in Children: Delayed Diagnosis Despite Typical Clinical Presentation. *J Pediatr* 2009; 154:888-94.
13. Ogershok PR, Hogan MB, Welch JE, Corder WT, Wilson NH. Spectrum of illness in pediatric common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97:653-56.
14. Keles S, Artac H, Kara R, Gokturk B, Ozen A, Reisli I. Transient hypogammaglobulinemia and unclassified hypogammaglobulinemia: 'Similarities and differences'. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21:843-51.
15. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G *et al.* Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+) IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002; 99(5):1544-51.

16. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; 111(1):77-85.
17. Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier JL, Fieschi C, Vince N, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol* 2010; 30:746-55
18. Yong PL, Orange JS, Sullivan KE. Pediatric common variable immunodeficiency: Immunologic and phenotypic associations with switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 852-8.
19. Faria E, Silva S, Español T. Tratamento das imunodeficiências primárias por deficiência predominante de anticorpos. *Rev Port Imunoalergologia* 2004; 12(3): 251-60.
20. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: An update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(4): 776-94.
21. Llobet MP, Bertrán JM, Español T. Inmunodeficiencia común variable en la edad pediátrica. *Allergol et Immunopathol* 2002; 30(1): 42-6.
22. Kainulainen L, Varpula M, Liippo K, Svedström E, Nikoskelainen J, Ruuskanen O. Pulmonary abnormalities in patients with primary hypogammaglobulinemia. *JACI* 1999; 104(5):1031-6.