



Departamento de Medicina

Programa de Doctorado
3139 Medicina

TESIS DOCTORAL

Estudio multicéntrico de la fisiopatología de la
Inmunodeficiencia Común Variable con hiperactivación del Sistema Inmune y
Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica
como modelo de dis inmunidad

Presentada por: Marta Dafne Cabañero Navalón
Octubre 2023

Directores:

María José Forner Giner
Alejandro Mira Obrador

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Codirectores:

1.- Apellidos y nombre: Mira Obrador, Alejandro, N.I.F. 52773306J, Departamento/Instituto: Laboratorio de Microbioma Oral. Centro: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO)

2.- Apellidos y nombre: Forner Giner, María José, N.I.F. 25411810F, Departamento/Instituto: Departamento de Medicina. Centro: Universitat de València

Directores y tutora, respectivamente, de la tesis doctoral: "Estudio multicéntrico de la fisiopatología de la Inmunodeficiencia Común Variable con hiperactivación del sistema inmune y Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica como modelo de dis inmunidad"

de Dña. Marta Dafne Cabañero Navalón,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe *favorable* para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 10 de noviembre de 2023

Los estudios que forman parte de esta **tesis doctoral por compendio de publicaciones** pertenecen a una misma línea de investigación y se han recogido en **tres artículos originales**, publicados en revistas de alto impacto y amplia difusión internacional, con un factor de impacto global de 23,2 puntos: dos publicaciones en la revista *Frontiers in Immunology*: (doi: 10.3389/fimmu.2022.1033666 y doi: 10.3389/fimmu.2022.81349), con factor de impacto 2022: 7,3 y Q1 en la categoría *Immunology* del *Journal Citation Reports* (JCR), y la tercera en *Clinical Immunology*: (doi: 10.1016/j.clim.2023.109796), con factor de impacto 2022: 8,6 y Q1 y D2 en la categoría *Immunology* del JCR. Dichos artículos **no han sido utilizados para la realización de otra tesis doctoral**.

Fdo.: Alejandro Mira Obrador
ALEJANDRO|
MIRA|
OBRADOR|
Director
Firmado digitalmente
por ALEJANDRO|MIRA|
OBRADOR
Fecha: 2023.11.13
23:45:23 +01'00'

Fdo.: María José Forner Giner
MARIA JOSE|
FORNER|
GINER|
Directora y Tutora
Firmado digitalmente
por MARIA JOSE|
FORNER|GINER
Fecha: 2023.11.14
19:52:57 +01'00'

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

*“Words are, in my not so humble opinion, our most inexhaustible source of magic,
capable of both influencing injury, and remedying it.”*

Albus Dumbledore

AGRADECIMIENTOS

A Álex y María José, por su tiempo, sus conocimientos y su capacidad para enseñar y compartir.

A mis compañeros del Servicio de Medicina Interna del Hospital La Fe, por su inestimable y constante apoyo en esta aventura académica.

A los investigadores de FISABIO, imprescindibles para el desarrollo de este proyecto.

A los residentes, por hacer que el trabajo no sea sólo un deber y convertirse en verdaderos amigos.

A aquellos que, aunque ausentes, permanecen conmigo en cada instante.

A mis amigos, por sostenerme siempre y por su lealtad sin precio, incluso en la distancia derivada de mi pasión por la investigación.

A mi familia, por ser una fuente interminable de cariño.

A Pedro, por compartir una ilusión, por su dedicación y ser mi guía constante.

A mi padre, por ser mi fortaleza en cada paso.

A mi madre, por su inagotable paciencia, su amor y su eterna ayuda.

A Vic, por ser todo y más.

Índice (I)

Resumen

1.1. Resumen.....	9
1.2. Abstract.....	10
1.3. Abreviaturas.....	11
1.4. Listado de tablas y figuras.....	12

Consideraciones para la lectura de la Tesis Doctoral

2. Consideraciones para la lectura de la Tesis Doctoral.....	14
--	----

Introducción

3.1. Introducción a las Inmunodeficiencias Primarias.....	16
3.2. Introducción a la Inmunodeficiencia Común Variable.....	20
3.3. Antecedentes históricos, definiciones y criterios diagnósticos de Inmunodeficiencia Común Variable: el cajón de sastre.....	21
3.4. Epidemiología.....	25
3.5. Fisiopatología.....	26
3.5.1. Genética de la Inmunodeficiencia Común Variable.....	26
3.5.2. Rol de la microbiota y la disbiosis en la etiopatogenia de la Inmunodeficiencia Común Variable.....	29
3.6. Defectos celulares.....	32
3.6.1. Defectos en linfocitos B.....	32
3.6.2. Defectos en linfocitos T.....	33
3.7. Manifestaciones clínicas: hacia un cambio de paradigma.....	33
3.7.1. Complicaciones infecciosas.....	33
3.7.2. Complicaciones no infecciosas.....	36
3.7.2.1. Disinmunidad y autoinmunidad.....	36
3.7.2.2. Linfoproliferación benigna.....	37
3.7.2.3. Enfermedad Pulmonar Intersticial y Enfermedad Pulmonar Granulomatosa Intersticial Linfocítica.....	38
3.7.2.4. Enteropatía.....	41
3.7.2.5. Malignidad.....	42
3.8. Tratamiento.....	42
3.8.1. Terapia de reemplazo de inmunoglobulinas.....	42
3.8.2. Tratamiento de la disregulación inmune: la paradoja de la Inmunodeficiencia Común variable.....	46
3.9. Pronóstico.....	47

Hipótesis y Objetivos

4.1. Hipótesis.....	50
4.2. Objetivos.....	51

Material y Métodos

5.1. Estudio sobre el espectro clínico actual de la Inmunodeficiencia Común Variable en España: creación del registro multicéntrico nacional GTEM-SEMI-CVID.....	53
---	----

Índice (II)

5.1.1.	Diseño del estudio, escenario y población objetivo.....	53
5.1.2.	Recolección de datos.....	54
5.1.3.	Análisis estadístico.....	56
5.1.4.	Declaración ética.....	57
5.2.	Identificación de parámetros clínicos, de laboratorio y de imagen para la predicción y diagnóstico de la Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica asociada a la Inmunodeficiencia Común Variable.....	57
5.2.1.	Desarrollo general del trabajo, criterios de inclusión y criterios de exclusión.....	57
5.2.2.	Recolección de los datos clínicos.....	58
5.2.3.	Aplicación de los scores clínicos a los TC pulmonares de alta resolución.....	59
5.2.4.	Análisis estadístico.....	62
5.2.5.	Declaración ética.....	63
5.3.	Estudio de la microbiota asociada a los diferentes fenotipos clínicos y a la dis inmunidad en la Inmunodeficiencia Común Variable.....	63
5.3.1.	Pacientes y recolección de datos.....	63
5.3.2.	Muestreo.....	64
5.3.3.	Extracción de ADN.....	65
5.3.4.	Análisis bioinformático y estadístico.....	66
5.3.5.	Declaración ética.....	66

Resultados

6.1.	Estudio sobre el espectro clínico actual de la Inmunodeficiencia Común Variable en España: creación del registro multicéntrico nacional GTEM-SEMI-CVID.....	68
6.2.	Identificación de parámetros clínicos, de laboratorio y de imagen para la predicción y diagnóstico de la Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica asociada a la Inmunodeficiencia Común Variable.....	87
6.3.	Estudio de la microbiota asociada a los diferentes fenotipos clínicos y a la dis inmunidad en la Inmunodeficiencia Común Variable.....	101

Discusión

7.	Discusión.....	118
----	----------------	-----

Conclusiones

8.	Conclusiones.....	133
----	-------------------	-----

Bibliografía

9.	Bibliografía.....	135
----	-------------------	-----

Anexos

10.1.	Persistent SARS-CoV-2 infection with repeated clinical recurrence in a patient with Common Variable Immunodeficiency.....	155
10.2.	Norovirus infection as a model of chronic or recurrent infection in Common Variable Immunodeficiency.....	162

RESUMEN

1.1. Resumen

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) constituye un grupo de inmunodeficiencias humorales primarias con elevada heterogeneidad clínica. En esta tesis doctoral, se creó un registro multicéntrico nacional que describe las características epidemiológicas, clínicas, de laboratorio, terapéuticas y pronósticas de 250 pacientes con IDCV, evidenciando que las complicaciones no infecciosas han desplazado a las infecciones como principal causa de morbimortalidad. Pese a que el 60% de los pacientes presentaba afectación pulmonar no infecciosa, menos del 65% había sido sometido a estudios de imagen, lo que señala una falta de detección oportuna de comorbilidad dis inmune asociada con la IDCV, y objetiva la necesidad de realizar protocolos nacionales para homogeneizar su manejo clínico.

Además, se presenta un modelo predictivo para abordar la problemática del diagnóstico precoz en la comorbilidad dis inmune asociada a la IDCV en el contexto de la Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Crónica (EPIGL). Se establece que la EPIGL puede ser la manifestación pulmonar de una disregulación inmunitaria sistémica en la IDCV. A través de este modelo predictivo que combina parámetros clínicos, de laboratorio y de imagen, el estudio ofrece una herramienta no invasiva útil para la detección y diagnóstico precoz.

En cuanto a la fisiopatología de esta disregulación inmunológica, se pretendió analizar la microbiota oral, pulmonar e intestinal de los pacientes con IDCV, proponiendo que puede existir una disbiosis bacteriana que impulse estas manifestaciones no infecciosas. Se encontraron diferencias significativas en la composición de la microbiota de saliva, esputo y heces entre pacientes con IDCV con y sin dis inmunidad. A pesar de que no se identificó una única especie como un predictor robusto de dis inmunidad independiente, la combinación de alrededor de 5-7 especies en cada tipo de muestra podría predecir este fenotipo dis inmune con una precisión de alrededor del 90% en nuestra población.

En resumen, este trabajo doctoral subraya dos aspectos fundamentales: la imperativa necesidad de estandarizar el manejo clínico de la IDCV a través de protocolos nacionales, teniendo en cuenta su inherente naturaleza sistémica, así como la disregulación inmunológica asociada. Esta última requiere una perspectiva holística que integre parámetros clínicos, analíticos, radiológicos y microbiológicos, facilitando así un diagnóstico precoz y una intervención terapéutica más específica. Por ello, en futuras investigaciones, sería relevante explorar la relación entre la microbiota y los parámetros clínicos, de laboratorio y radiológicos estudiados, para desarrollar modelos predictivos más precisos y personalizados, tras su validación externa y multicéntrica, que permitan continuar acelerando el diagnóstico y mejorando el pronóstico de los pacientes con IDCV

1.2. Abstract

Common Variable Immunodeficiency (CVID) represents a spectrum of primary humoral immunodeficiencies with marked clinical heterogeneity. In this doctoral thesis, a national multicenter registry was established, detailing the epidemiological, clinical, laboratory, therapeutic, and prognostic features of 250 patients with CVID. The data indicate that non-infectious complications have surpassed infections as the primary cause of morbidity and mortality. Despite 60% of the patients exhibiting non-infectious pulmonary involvement, less than 65% had undergone imaging studies. This highlights an underdiagnosis of immune-related comorbidities associated with CVID and evidences the imperative need for national protocols to standardize clinical management.

Furthermore, a predictive model addressing early diagnosis of immune-related comorbidities associated with CVID in the context of Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) is introduced. The study postulates that GLILD may represent a pulmonary manifestation of systemic immune dysregulation in CVID. Using a combination of clinical, laboratory, and imaging parameters, this model provides a non-invasive tool for early detection and diagnosis.

Regarding the pathophysiology of this immune dysregulation, oral, pulmonary, and intestinal microbiota of CVID patients were analyzed. The hypothesis suggests that a bacterial dysbiosis might drive these non-infectious manifestations. Significant variations were observed in the composition of the saliva, sputum, and fecal microbiota between CVID patients with and without immune-related complications. While no single bacterial species emerged as a robust independent predictor of immune dysregulation, a combination of approximately 5-7 species in each sample type could predict this dysimmune phenotype with about 90% accuracy in our cohort.

In summary, this doctoral research emphasizes two core aspects: the urgent need to standardize CVID clinical management through national protocols, considering its inherent systemic nature and associated immune dysregulation. Such dysregulation demands a holistic approach, integrating clinical, analytical, radiological, and microbiological parameters, thereby facilitating early diagnosis and more targeted therapeutic interventions. Hence, future research should explore the nexus between microbiota and the clinical, laboratory, and radiological parameters studied. This could pave the way for the development of more precise and individualized predictive models, pending their external and multicentric validation, which could prompt early diagnosis and improve prognosis for CVID patients.

1.3. Abreviaturas

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AHAI: Anemia hemolítica autoinmune

APDS: Síndrome de activación de fosfoinositida 3-quinasa delta

ANCOM-BC: Análisis de composiciones de microbiomas con corrección de sesgo

ASV: variantes de secuencia de amplicón

AUC: Área bajo la curva

Bc: linfocito B

BCG: Bacilo de Calmette Guérin

CMV: Citomegalovirus

dIDCV: Pacientes con inmunodeficiencia común variable y fenotipo dis inmune

DLCO: Difusión pulmonar para el monóxido de carbono

DLCOc: Difusión pulmonar para el monóxido de carbono corregida

EICH: Enfermedad de injerto contra huésped

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ERC: Enfermedad renal crónica

ESID: European Society for Immunodeficiencies

FEV1: Volumen de espiración forzada en el primer segundo

FVC: Capacidad vital forzada

GLILD: siglas en inglés de EPIGL, *granulomatous lymphocytic interstitial lung disease*

HDL: Lipoproteína de alta densidad o high density lipoprotein

IC: Insuficiencia cardíaca

IDCS: Inmunodeficiencia combinada severa

IDCV: Inmunodeficiencia común variable

IDP: Inmunodeficiencias primarias

IgIv: Inmunoglobulina de administración intravenosa

IgRT: Terapia de remplazo con inmunoglobulinas

IgSc: Inmunoglobulina de administración subcutánea

iIDCV: pacientes con inmunodeficiencia común variable y fenotipo solo infeccioso

IgScf: Inmunoglobulina de administración subcutánea facilitada con hialuronidasa

LDL: Lipoproteína de baja densidad o *low density lipoprotein*

LES: Lupus eritematoso sistémico

LNH: Linfoma no Hodgkin

LTc: Linfocito T citotóxico

LTh: Linfocito T helper

MALT: Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas

NGS: Secuenciación de próxima generación o *next generation sequencing*

NIA: Neumopatía intersticial alérgica

NIL: Neumonía intersticial linfoide

NINE: Neumonía intersticial no especificada

NO: Neumonitis obliterante

PET: tomografía por emisión de positrones

PTI: Púrpura trombocitopénica idiopática o inmune

ROC: Curva de característica operativa del Receptor o *Receiver operating characteristic curve*

SI: Sistema inmunitario

SNC: Sistema nervioso central

STROBE: *Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology*

TC: Tomografía computerizada

TCAR: Tomografía computerizada de alta resolución

VEB: Virus Epstein Barr

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad o *very low density lipoprotein*

VRS: Virus respiratorio sincitial

1.4. Listado de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Características clínicas y patógenos típicos en las inmunodeficiencias primarias. Adaptación de Cooper et al., (2001).

Tabla 2. Clasificación de la International Union of Immunological Societies de las inmunodeficiencias primarias. Adaptado de Bousfiha et al., (2022), con ejemplos de las patologías más prevalentes en cada categoría.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de la Inmunodeficiencia Común Variable según la European Society for Immunodeficiencies 2019. Adaptado de Seidel et al., (2019).

Tabla 4. Prevalencia agrupada de diversas infecciones entre los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable. Adaptado de Zainaldain et al., (2020).

Tabla 5. Prevalencia de diferentes patologías autoinmunes en la Inmunodeficiencia Común Variable en 8521 pacientes de 51 estudios. Adaptado del metaanálisis de Janssen et al. (2021).

Tabla 6. Comparación clínica de las características de las inmunoglobulinas intravenosas y subcutáneas.

Tabla 7. Centros participantes en el registro GTEM-SEMI-CVID.

Tabla 8. Variables consideradas en el score radiológico de Baumann.

Tabla 9. Implicaciones de la microbiota en la Inmunodeficiencia Común Variable: evidencia científica y hallazgos relevantes.

Figuras

Figura 1. Esquema para la realización e interpretación del test de respuesta vacunal para el diagnóstico de Inmunodeficiencia Común Variable.

Figura 2. Definición y clasificación de la Inmunodeficiencia Común Variable según los criterios de la *International Union of Immunological Societies*. Extraído de Bousfiha et al., (2022).

Figura 3. Prevalencia de la Inmunodeficiencia Común Variable en el mundo. Extraído de Weifenbach et al., (2020). Los datos se expresan en número de enfermos por cada 100.000 habitantes.

Figura 4. Evolución histórica de la identificación de las variantes monogénicas asociadas a la Inmunodeficiencia Común Variable. Extraído de Peng et al., (2023).

Figura 5. Biomarcadores analíticos y clínicos de la Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica.

Figura 6. Cinética en plasma de las inmunoglobulinas endovenosas (curva rosa) respecto a la cinética de las inmunoglobulinas subcutáneas (curva azul). Extraído de Ochs et al., (2006).

Figura 7. Protocolo de inicio y mantenimiento de la terapia con inmunoglobulinas intravenosas y subcutáneas convencionales o facilitadas.

Figura 8. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable con y sin complicaciones no infecciosas. Los pacientes con complicaciones no infecciosas presentaron mortalidad significativamente mayor que aquellos que sólo presentaban infecciones ($p < 0.0001$). Extraído de Resnick et al., (2012).

Figura 9. TC de tórax de 4 pacientes diferentes del estudio detallando la evaluación de parámetros radiológicos del score Baumann.

Figura 10. Procedimiento del muestreo del microbioma oral, pulmonar y fecal en los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable y controles sanos.

Figura 11. Protocolo de procesamiento de muestras y extracción de ADN.

CONSIDERACIONES PARA LA LECTURA DE LA TESIS DOCTORAL

2. Consideraciones para la lectura de la Tesis Doctoral

El desarrollo de la presente tesis doctoral por **compendio de tres publicaciones** se justifica a través de la exploración de tres retos fundamentales interrelacionados sobre la IDCV en el ámbito nacional: la necesidad de estudios multicéntricos para abordar la falta de conocimiento epidemiológico y clínico de la enfermedad; la ausencia de marcadores que prevean el desarrollo de la EPIGL, un fenómeno de dis inmunidad asociado con la IDCV, cuya identificación temprana podría mejorar la morbimortalidad; y la influencia de la microbiota oral, pulmonar e intestinal en la etiología y progresión de la disregulación inmunológica de la IDCV, cuya variabilidad podría correlacionarse con diferentes fenotipos clínicos de la enfermedad. Este enfoque tridimensional aborda brechas significativas en la literatura actual, proporcionando una perspectiva integral sobre la IDCV, y sienta las bases para futuras investigaciones y posibles intervenciones terapéuticas. Por ello, esta tesis doctoral se configura en torno a un compendio de tres publicaciones científicas publicadas en revistas internacionales de alto impacto.

Una vez planteado el estado del arte en el apartado de **introducción**, se presentan las **hipótesis** y los **objetivos** de la investigación. Posteriormente, se detalla un apartado de **metodología** ampliado que complementa la información metodológica contenida en los manuscritos originales, proporcionando detalles adicionales de interés para el lector que resultaron abreviados debido a limitaciones de extensión inherentes a cada una de las revistas, y que facilitan la comprensión y reproducibilidad de los trabajos.

En la sección de **resultados**, cada artículo es resumido en castellano y acompañado por su referencia bibliográfica, con una copia del trabajo original anexada posteriormente.

La **discusión** evalúa críticamente la contribución de cada uno de los tres artículos principales, seguida por una discusión general que destaca brechas de conocimiento, integra la evidencia de los artículos y explora el potencial de métodos diagnósticos multidisciplinarios. Se reflexiona, además, sobre futuras líneas de investigación y se presentan ideas para desarrollar a partir del conocimiento generado.

Se **concluye** con unas reflexiones finales que sintetizan los principales aportes de la investigación.

Adicionalmente, al concluir la tesis, se incorporan dos **artículos anexos** centrados en la problemática de infecciones recurrentes en pacientes con IDCV. Estos documentos, emergentes a partir del desarrollo de la tesis, abordan los desafíos en la práctica clínica y presentan evidencia sobre la disfunción inmunológica en estos pacientes, sugiriendo un modelo de activación inmunológica asociado a infecciones persistentes y estados proinflamatorios continuados.

INTRODUCCIÓN

3.1. Introducción a las Inmunodeficiencias Primarias

Las inmunodeficiencias constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por la presencia de anomalías en uno o más componentes del sistema inmune (SI). Globalmente, estas patologías pueden clasificarse en dos tipos principales según su origen: primarias y secundarias.

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son trastornos genéticos poco frecuentes en la población, que suelen manifestarse en la infancia o la edad adulta temprana. Por otro lado, las inmunodeficiencias secundarias se consideran patologías adquiridas y pueden ser causadas por una gran variedad de etiologías, incluyendo infecciones como por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH, la malnutrición, el estrés crónico, la inmunosenescencia debida al envejecimiento, y, especialmente, tratamientos con perfil inmunosupresor, como los agentes quimioterápicos, múltiples tratamientos biológicos con dianas terapéuticas dirigidas al SI o los corticosteroides, entre otros (Rich RR et al., 2019).

El SI consta de dos componentes fundamentales para realizar la correcta defensa del organismo: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa respondiendo de manera inmediata, pero esta respuesta es de carácter no específico y clásicamente se asociaba con ausencia de memoria inmunológica, si bien este paradigma está siendo cuestionado recientemente (Netea MG et al., 2019). Por el contrario, el sistema inmune adaptativo es capaz de generar una respuesta específica para cada patógeno y posee memoria inmunológica, proporcionando una respuesta más duradera. Sin embargo, su activación suele ser más lenta y ocurre después de la respuesta innata (Rich RR et al., 2019).

Dentro de las IDP, se distinguen cuatro grupos generales de inmunodeficiencias según el componente del SI afectado: inmunodeficiencias humorales, celulares, defectos en la fagocitosis y defectos en el sistema del complemento (**Tabla 1**).

Las deficiencias humorales y celulares se relacionan principalmente con los componentes adaptativos del sistema inmune. Las inmunodeficiencias humorales, o de anticuerpos, generalmente implican una disfunción o ausencia de los linfocitos B, responsables de la producción de inmunoglobulinas que reconocen y se unen a antígenos específicos facilitando su eliminación. La disminución o disfunción de la producción de anticuerpos compromete la capacidad del SI para combatir infecciones, especialmente aquellas causadas por bacterias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Además, los pacientes afectados de inmunodeficiencias humorales presentan fundamentalmente infecciones bacterianas recurrentes, sobre todo en el tracto respiratorio superior e inferior, incluyendo otitis media, sinusitis y neumonía, que pueden ser persistentes y graves. También, algunos pacientes pueden sufrir complicaciones autoinmunes y neoplásicas por la disregulación inmunitaria (D'Elios et al., 2019).

Las inmunodeficiencias celulares o combinadas, también conocidas como trastornos de inmunidad celular, se originan por anomalías en la función o la cantidad de linfocitos T que defienden al organismo a través de dos mecanismos fundamentales: la mediación directa de la destrucción de células patógenas o infectadas por los linfocitos T citotóxicos (LTc); y la regulación de la respuesta inmune a través de la liberación de citoquinas, mediante los linfocitos T *helper* (LTh). Clínicamente, estas patologías se caracterizan por presentar infecciones fúngicas, o bien por bacterias intracelulares, infecciones virales, y por ciertos parásitos. También pueden aparecer infecciones graves y recidivantes producidas por patógenos oportunistas como el *Pneumocystis jirovecii* o virus de la familia herpes, con elevada morbilidad (Buckley et al., 2002).

Los trastornos de la fagocitosis, generados por disfunción de células fagocitarias como los neutrófilos y macrófagos, pueden deberse a una disminución del número absoluto de fagocitos, a defectos en la quimiotaxis o a una inadecuada destrucción de los microorganismos tras su internalización. Este tipo de trastornos conducen a una susceptibilidad aumentada a infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes, con manifestaciones clínicas que abarcan desde infecciones cutáneas hasta neumonías graves (Rich et al., 2019).

Por otro lado, los trastornos del sistema del complemento, una serie de proteínas plasmáticas que facilitan la opsonización y lisis de los patógenos, se relacionan con un incremento en las infecciones causadas especialmente por *Neisseria spp.* y a enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) o las glomerulonefritis (Rich et al., 2019). Todas estas características se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características clínicas y patógenos típicos en las inmunodeficiencias primarias.
Adaptación de Cooper et al., 2001.

Características	Defecto de las células B	Defectos de las células T	Defecto de la fagocitosis	Defectos del complemento
Edad de inicio	5-12 meses	Desde el nacimiento	Desde el nacimiento	Cualquier edad
Patógenos comunes	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> tipo B, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Campylobacter</i> spp., Enterovirus, <i>Giardia</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp.	Micobacterias, <i>Pseudomonas</i> spp., citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, varicela, enterovirus, <i>Candida</i> spp., <i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>S. aureus</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Nocardia</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.	<i>Neisseria</i> spp., <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>Babesia</i> spp.
Clínica común	Sinopulmonares Gastrointestinal Malabsorción Artritis Meningoencefalitis	Disminución de peso, diarrea crónica, candidiasis persistente	Celulitis Abscesos Adenitis Periodontitis Osteomielitis	Meningitis Artritis Sepsis Infecciones sinopulmonares
Características especiales	Autoinmune Linfoma Timoma Parálisis asociada a vacuna de polio	Enfermedad de injerto contra huésped (EICH), reacciones adversas a la vacunación por el bacilo de Calmette Guérin (BCG), tetania hipocalcémica	Retraso en la caída del cordón umbilical	Vasculitis LES Glomerulonefritis Dermatomiositis Angioedema

Más allá de esta clasificación de las IDPs en cuanto a la afectación del sistema inmune innato o adaptativo y su mecanismo etiopatogénico, el comité de expertos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS, de sus siglas en inglés *International Union of Immunological Societies*) realiza actualizaciones periódicas de la clasificación fenotípica para los diferentes tipos de inmunodeficiencias primarias, incluyendo los últimos avances genotípicos (Bousfiha et al., 2022) (**Tabla 2**). Esta clasificación se realiza con el propósito de asistir a los profesionales clínicos en la atención de pacientes con errores innatos o primarios de la inmunidad, basándose en sus características clínicas y fenotipos tanto clínicos como de laboratorio. A continuación, se representa un resumen de las diferentes categorías clínicas de las inmunodeficiencias primarias de acuerdo con la última actualización de la IUIS a fecha de 2022, y sus principales enfermedades:

Tabla 2. Clasificación de la International Union of Immunological Societies de las inmunodeficiencias primarias. Adaptado de Bousfiha et al., (2022), con ejemplos de las patologías más prevalentes en cada categoría.

Grupo 1	Inmunodeficiencias que afectan la inmunidad celular y humoral	SCID Inmunodeficiencia combinada con o sin diagnóstico genético Síndrome de activación PI3K Síndrome de Omenn Déficit de CD40 y CD40 ligando Déficit de HLA de clase II Déficit selectivo de CD4 Déficit de DOCK8
Grupo 2	Inmunodeficiencias combinadas con características sindrómicas o asociadas	Ataxia telangiectasia hereditaria Síndrome de DiGeorge Síndrome de HiperIgE Síndrome de Wiskott-Aldrich Trombocitopenia ligada al X Síndrome de Nijmegen Breakage Disqueratosis congénita Síndrome de Bloom
Grupo 3	Inmunodeficiencias predominantemente humorales	Inmunodeficiencia común variable Déficit selectivo de IgA Déficit de subclases de IgG Déficit de subclase de IgA con IgG Síndrome de hiper-IgM Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia Déficit específico de anticuerpos
Grupo 4	Enfermedades por disregulación inmunitaria	Síndrome de linfoproliferación autoinmune (ALPS) Linfocitosis hemofagocítica familiar Enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X Síndrome polyglandular autoinmune tipo 1 Síndrome de Chediak Higashi Síndrome de inmunodisregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al X Déficit de CTLA-4 Déficit de LRBA Síndrome de Griscelli tipo 2 Ganancia de función de STAT3
Grupo 5	Defectos congénitos en el número o la función de los fagocitos	Enfermedad granulomatosa crónica Neutropenia congénita Desórdenes de la fagocitosis no especificados Síndrome de Shwachman-Diamond Neutropenia cíclica Déficit de GATA2 Deficiencia de adhesión leucocitaria
Grupo 6	Defectos en la inmunidad innata e intrínseca	Candidiasis Mucocutánea Crónica Susceptibilidad Mendeliana a Enfermedades Micobacterianas Defectos en la inmunidad innata no clasificados Asplenia congénita aislada Deficiencias en las proteínas IRAK4 y MyD88 Síndrome de Verrugas, Hipogammaglobulinemia, Infecciones y Mielocatexis Encefalitis herpética
Grupo 7	Enfermedades autoinflamatorias	Interferonopatías de tipo 1 Defectos afectando al inflamasoma Condiciones no relacionadas con el inflamasoma
Grupo 8	Deficiencias de complemento	Déficit de componente 2 del complemento
Grupo 9	Fallo de médula ósea	Anemia de Fanconi Síndrome ataxia-pancitopenia
Grupo 10	Fenocopias de inmunodeficiencias primarias	Asociada con mutaciones somáticas: - Síndrome linfoproliferativo autoinmune - Síndrome de VEXAS - Síndrome leucoproliferativos asociados a mutaciones en RAS Asociado con autoanticuerpos: - Candidiasis crónica mucocutánea - Susceptibilidad a las micobacterias en adultos - Proteinosis alveolar primaria - Angioedema adquirido - Síndrome urémico atípico - Síndrome de Good

3.2. Introducción a la Inmunodeficiencia Común Variable

La inmunodeficiencia común variable (IDCV), la IDP que nos ocupa en la presente Tesis Doctoral, se encuadra dentro de las inmunodeficiencias primarias humorales y se presenta como una entidad heterogénea cuya etiología continúa siendo desconocida para la comunidad científica. Constituye la IDP sintomática más frecuente, con una prevalencia estimada de 1:20.000 a 1:50.000 en la población (Seidel, 2019) y se caracteriza por la alteración en la transición del linfocito B naïve a linfocito B de memoria y célula plasmática.

Como consecuencia, los pacientes afectados presentan una disminución en la producción de gammaglobulinas y una disfunción en la capacidad de respuesta a antígenos proteicos o polisacáridos. Debido a este defecto en la inmunidad humoral, hasta un 70-80% de los pacientes asocian una tasa elevada de procesos infecciosos de vías respiratorias altas o bajas, así como del tracto gastrointestinal.

Desde la introducción de la terapia de remplazo con inmunoglobulinas (de sus siglas en inglés *immunoglobulin replacement therapy* o IgRT), el pronóstico de estos pacientes relacionado con las complicaciones infecciosas ha mejorado notablemente (Pulvirenti et al., 2019). Sin embargo, desde hace años, se ha asociado la IDCV a fenómenos no infecciosos, la mayoría de ellos de naturaleza dis inmune: autoinmunidad, linfoproliferación no maligna, granulomatosis, enteropatía inflamatoria y fenómenos de hipersensibilidad con una prevalencia que oscila entre 20 y el 40% según la serie, así como diferentes tipos de neoplasias (Chapel et al., 2009; Janssen et al., 2021; Ho and Cunningham-Rundles, 2020; Mormile et al., 2021; Kiaee et al., 2019) que son los principales responsables de la morbilidad en estos pacientes (Orange et al., 2010; Resnick et al., 2012). Es relevante señalar que algunos pacientes con IDCV pueden manifestar inicialmente estas condiciones, sin haber presentado síntomas infecciosos significativos. Ue hagan sospechar su diagnóstico (Azizi et al., 2017).

Por ello, Chapel et al. (2008) establecieron cinco fenotipos de pacientes con IDCV: aquellos que presentaban infiltración linfocítica policlonal, pacientes que presentaban autoinmunidad, individuos que desarrollaban enteropatía, otros que padecían cánceres de origen linfoide y, finalmente, los que solo presentaban infecciones (Chapel et al., 2008). Hasta el momento, no se ha establecido por qué algunos pacientes con IDCV desarrollan solo infecciones y otros presentan el resto de las manifestaciones además de la inherente comorbilidad infecciosa. Actualmente, la morbilidad de los pacientes con IDCV está condicionada por estos fenómenos no infecciosos cuyo pronóstico es independiente al adecuado tratamiento con IgRT.

3.3. Antecedentes históricos, definiciones y criterios diagnósticos de la Inmunodeficiencia Común Variable: el cajón de sastre

A principios del siglo XX, médicos y científicos reportaron casos de pacientes con inmunodeficiencias humorales detectadas en la edad adulta con complicaciones infecciosas, inmunológicas y neoplásicas, de etiología desconocida, inicialmente etiquetadas como agammaglobulinemias o hipogammaglobulinemias adquiridas (Fudenberg et al., 1971). No fue hasta 1971 cuando la Organización Mundial de la Salud acuñó el término “inmunodeficiencia común variable” por primera vez, en un intento de englobar a esta “gran cantidad de pacientes con inmunodeficiencia con alta variedad de hallazgos inmunológicos” que no podían ser clasificados de forma inequívoca (Fudenberg et al., 1971; Peng et al., 2023). En aquel entonces, el diagnóstico de IDCV permitía diferenciar al escaso número de pacientes que presentaban una inmunodeficiencia de herencia mendeliana conocida, del resto de pacientes con un patrón de herencia desconocido, con la esperanza de que un análisis más pormenorizado pudiera en el futuro delimitar su etiopatogenia (Fudenberg et al., 1971; Peng et al., 2023), al sospechar que se trataba de una entidad que presumiblemente podía incluir una “gran cantidad de síndromes” de difícil clasificación debido a la falta de tecnología y medios para diferenciarlos entre sí.

Por ello, en 1971, la IDCV comprendía todas aquellas inmunodeficiencias primarias que no pudiesen ser diagnosticadas como una agammaglobulinemia ligada al X, un déficit selectivo de IgA, una síndrome hiper- IgM ligado al X, una ataxia telangiectasia, un síndrome de Wiskott-Aldrich, una inmunodeficiencia severa combinada y otros pocos síndromes clínicamente diferenciados (Fudenberg et al., 1971).

Más de 50 años después, científicos y clínicos de todo el mundo han investigado cómo desentrañar la IDCV mediante técnicas avanzadas de secuenciación genética, expresión génica, proteómica, metabolómica, citometría, e incluso analizando la microbiota de estos pacientes; sin olvidar los numerosos estudios de estratificación de características puramente clínicas (Chapel et al., 2008; Wehr et al., 2008; Resnick et al., 2012; Jorgensen et al., 2019). Si bien es cierto que los avances tecnológicos de la última década han permitido aumentar mucho el conocimiento fenotípico y genotípico de la IDCV separando y “descubriendo” nuevos síndromes como entidades diferentes a la propia IDCV, el consenso universal sobre su etiopatogenia y definición completa está todavía lejos. Muchos científicos sugieren que no es posible encontrar una única explicación a este conjunto de síndromes y que será el avance tecnológico el que poco a poco vaya desentrañando completamente su fisiopatología (Peng et al., 2023). De hecho, esto es lo que ha ido sucediendo en los últimos años, siendo necesaria una revisión de sus criterios diagnósticos cada vez más frecuente debido a la diferenciación de entidades definidas que previamente se incluían bajo el concepto global de IDCV (Bousfiha et al., 2022).

Actualmente, según los criterios diagnósticos europeos de 2019 de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID, de sus siglas en inglés *European Society for Immunodeficiencies*) (Seidel et al., 2019), la IDCV se define como una inmunodeficiencia humoral primaria en la que se observa una marcada disminución de las inmunoglobulinas IgG e IgA, con o sin niveles bajos de IgM, junto con una escasa respuesta de anticuerpos tras la vacunación y/o un bajo recuento de células B de memoria, tras excluir otras causas secundarias de hipogammaglobulinemia, como infecciones, pérdida de proteínas, medicación o malignidad, y sin que exista evidencia de depleción grave de células T. Además, los pacientes con IDCV deben presentar al menos uno de los siguientes síntomas: mayor susceptibilidad a la infección, manifestaciones autoinmunes, enfermedad granulomatosa o linfoproliferación policlonal inexplicada. Estos criterios se resumen en la **Tabla 3**.

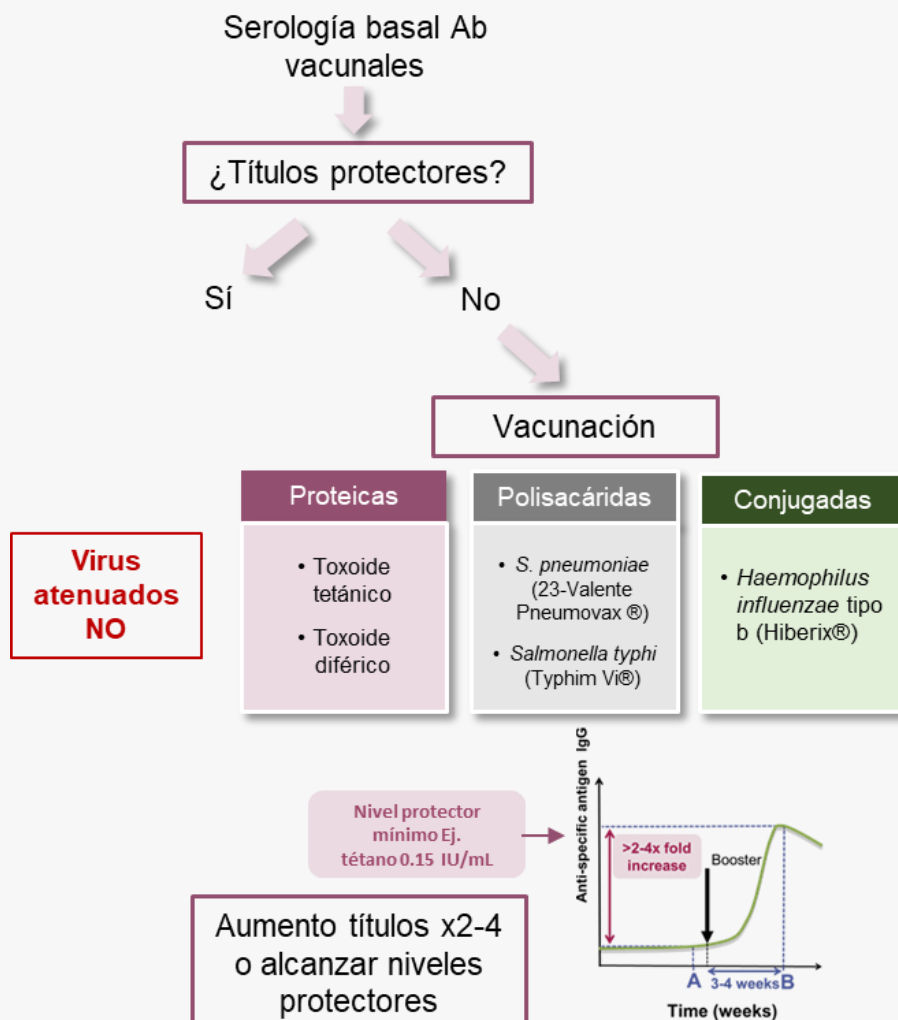
Tabla 3. Criterios diagnósticos de la Inmunodeficiencia Común Variable según la *European Society for Immunodeficiencies* 2019. Adaptado de Seidel et al., (2019)

Criterios Diagnósticos de la Inmunodeficiencia Común Variable	Descripción
Al menos uno de los siguientes:	Mayor susceptibilidad a infecciones
	Manifestaciones autoinmunes
	Enfermedad granulomatosa
	Linfoproliferación policlonal inexplicada
	Miembro de la familia afectado con deficiencia humoral
Y	Marcada disminución de IgG y marcada disminución de IgA con o sin niveles bajos de IgM (medido al menos dos veces; <2SD de los niveles normales para su edad)
Y al menos uno de los siguientes:	Escasa respuesta de anticuerpos a la vacunación (y/o ausencia de isohemaglutininas); es decir, ausencia de niveles protectores a pesar de la vacunación
	Bajo recuento de células B de memoria <i>switched</i> (<70% del valor normal relacionado con la edad)
Y	Exclusión de causas secundarias de hipogammaglobulinemia (por ejemplo, infección, pérdida de proteínas, medicación, malignidad)
Y	El diagnóstico se establece después del cuarto año de vida (aunque los síntomas pueden estar presentes antes)
Y	No hay evidencia de deficiencia profunda de células T, definida como 2 de las siguientes (y $\frac{1}{4}$ años de vida):
	Números de CD4/microlitro: 2-6 años < 300 6-12 años < 250, >12 años < 200
	% de CD4 naive: 2-6 años < 25% 6-16 años < 20% >16 años < 10%
	Ausencia de proliferación de células T

Para la valoración de la respuesta vacunal en la práctica clínica habitual se realiza en primer lugar un estudio serológico basal con evaluación de la presencia de títulos protectores frente a la vacunas habituales. En caso de que no existan títulos protectores de anticuerpos, se procede a la vacunación del paciente con vacunas proteicas, polisacáridas y conjugadas.

Se considera que el paciente presenta una respuesta vacunal óptima si se produce un aumento en los títulos de anticuerpos protectores del doble al cuádruple del valor basal previo y si estos valores alcanzan el nivel mínimo de protección, como se observa en la **Figura 1** (Bonilla et al., 2015; Orange et al., 2012).

Figura 1. Esquema para la realización e interpretación del test de respuesta vacunal para el diagnóstico de Inmunodeficiencia Común Variable



Bonilla J Allergy Clin Immunol 2015;136:1186-205
Orange J Allergy Clin Immunol 2012;130:S1-24

Sin embargo, la IUIS definió la IDCV como una inmunodeficiencia humoral caracterizada por la disminución de IgG e IgA y/o disminución de IgM con fenotipos clínicos que pueden variar entre infecciones recurrentes, linfoproliferación policlonal, citopenias autoinmunes y enfermedad granulomatosa (Tangye et al., 2020).

A diferencia de la clasificación proporcionada por la ESID, la IUIS identifica este conjunto de trastornos dentro del llamado “fenotipo IDCV” en 2022 (Bousfiha et al., 2022), discriminando diferentes categorías diagnósticas dentro del fenotipo en función de las alteraciones monogénicas identificadas hasta el momento.

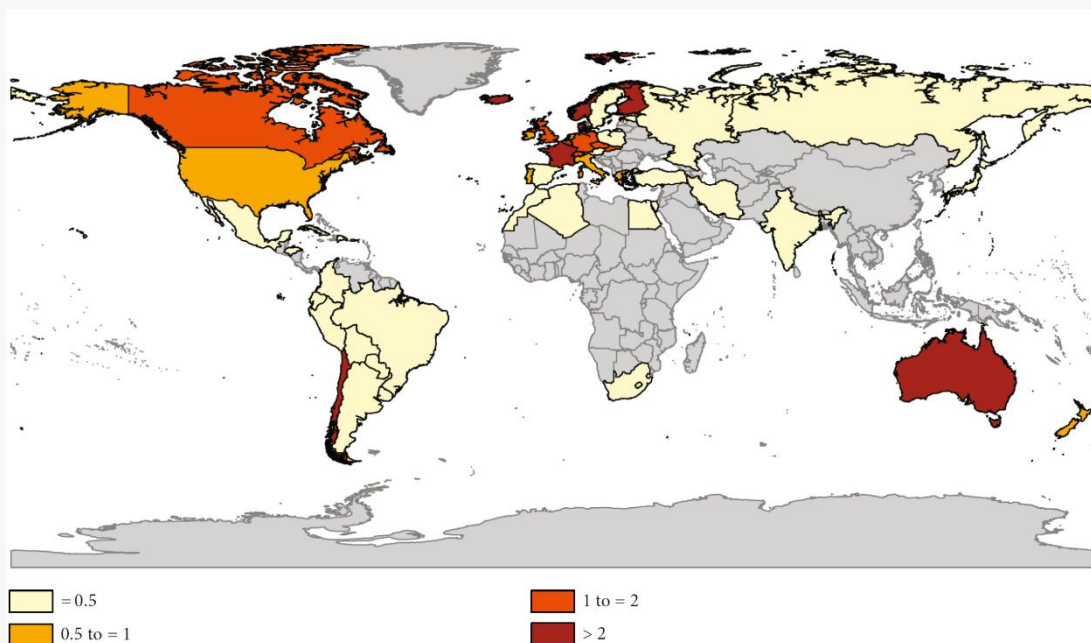
Aquellos pacientes sin mutación genética conocida se incluyen dentro del subgrupo “CVID sin defecto genético especificado”, como se puede observar en la **Figura 2**.

Figura 2. Definición y clasificación de la Inmunodeficiencia Común Variable según los criterios de la International Union of Immunological Societies.
Extraído de Bousfiha et al., (2022)

III. Predominantly Antibody deficiencies. a: Hypogammaglobulinemia	
IgG, IgA and/or IgM ↓↓ Exclude second causes: drugs [Hx], myeloma [bone marrow], lymphoma. Ig loss (not hypo-IgM) in urine, gastro-intestinal or skin. → B Lymphocyte (CD19+) enumeration (CMF)	
Bc absent	Bc >1 %
Severe bacterial infection. All Ig isotypes decreased. X-Linked Agammaglobulinemia. <i>BTK</i>. Some patients have detectable Ig. ProBc: NI AR: μ heavy chain Def. <i>IGHM</i> Igα def*. <i>CD79A</i>, Igβ def*. <i>CD79B</i> BLNK def*. <i>BLNK</i>, λ5 def*. <i>IGLL1</i>, ProBc: NI E47 transcription factor def*. <i>TCF3</i> Severe, failure to thrive. p85 def*. <i>PIK3R1</i>. Cytopenia. ProBc:↓ p110δ def*. <i>PIK3CD</i>. Autoimmune complications. ZIP7 def*. <i>SLC39A7</i>. Early onset infections, blistering dermatosis, thrombocytopenia AD E47 transcription factor def*. <i>TCF3</i>. Hoffman syndrome*. <i>TOP2B</i>. Facial dysmorphism, limb anomalies	Commun Variable Immunodeficiency Phenotype CVID with no gene defect specified. Clinical phenotypes vary: most have recurrent infections, some have polyclonal lymphoproliferation, autoimmune cytopenias and/or granulomatous disease Activated p110δ syndrome (APDS) AD. Severe bacterial infections. Lymphadenopathy, lymphoproliferation, lymphoma. Reduced memory Bc and increased transitional Bc. <i>PIK3CD GOF</i>. EBV± CMV viremia, autoimmunity. <i>PIK3R1</i>. Developmental delay. PTEN Deficiency (LOF)*. <i>PTEN</i>. AD. Lymphoproliferation, Autoimmunity. Developmental delay. ARHGEF1 deficiency**. <i>ARHGEF</i>. Recurrent infections, bronchiectasis. SH3BP1 deficiency** <i>SH3BP1 (CIN85)</i>. XL. Severe bacterial infections. SEC61A1 deficiency*. <i>SEC61A1</i>. AD. Severe recurrent respiratory tract infections RAC2 deficiency**. <i>RAC2</i>. AR. Recurrent sinupulmonary infections, poststreptococcal glomerulonephritis; urticaria. Some have selective IgA def. CD20 deficiency**. <i>CD20</i>. Recurrent infections. Low IgG, NI or elevated IgM and IgA. TACI deficiency. <i>TNFRSF13B (TACI)</i>. AD or AR. Variable clinical expression and penetrance for monoallelic variants. BAFF receptor deficiency*. <i>TNFRSF13C (BAFF-R)</i>. Variable clinical expression. Low IgG and IgM. TWEAK deficiency**. <i>TWEAK (TNFSF12)</i>. AD. Pneumonia, bacterial infections, warts, thrombocytopenia. Neutropenia. Low IgM and A, lack of anti-pneumococcal antibody. IRF2BP2 deficiency**. <i>IRF2BP2</i>. Recurrent infections, possible autoimmunity and inflammatory disease. Hypogammaglobulinemia, absent IgA. CD19 deficiency*. <i>CD19</i>. Recurrent infections, may have glomerulonephritis. CD81 deficiency*. <i>CD81</i>. Recurrent infections, may have glomerulonephritis. Phenocopy of CD19 deficiency. CD21 deficiency*. Recurrent infections. Low IgG, impaired anti-pneumococcal response. TRNT1 deficiency. <i>TRNT1</i>. Congenital sideroblastic anemia, deafness, developmental delay. B cell deficiency and hypogammag. NFKB1 deficiency. <i>NFKB1</i>. AD. Recurrent sinupulmonary infections, COPD, EBV proliferation, autoimmune cytopenias, alopecia and autoimmune thyroiditis. Ig NI or ↓, Bc ↓ or NI, ↓ memory Bc. NFKB2 deficiency. <i>NFKB2</i>. AD. Recurrent sinupulmonary infections, alopecia and endocrinopathies (ie, central adrenal insufficiency). Low Bc. IKAROS haploinsufficiency. <i>IKZF1</i>. AD. Recurrent sinupulmonary infections; increased risk of ALL, autoimmunity. Decreased pro-Bc, low or normal Bc reducing levels with age. ATP6AP1 deficiency. <i>ATP6AP1</i>. XL. Hepatopathy, leukopenia, low copper. Variable Ig findings. Mannosyl-oligosaccharide glucosidase deficiency (MOGS)*. <i>MOGS (GCS1)</i>. Low bacterial and viral infections in comparison to the level of hypogammaglobulinemia, severe neurologic disease, also known as congenital disorder of glycosylation type IIb (CDG-IIb).

Un registro del Jeffrey Modell Centers Network contabiliza un total de pacientes con IDCv de 6443 en América del Norte, 4279 en Europa, 657 en Australia, 459 en Asia y 156, en África (Weifenbach et al., 2020; Yazdani et al., 2020). Una de las razones propuestas para explicar esta diferencia regional es la disponibilidad de métodos diagnósticos y de registros nacionales e internacionales presente en países de mayor nivel socioeconómico y tecnológico (Weifenbach 2020), como se representa en la **Figura 3**.

Los datos se expresan en número de enfermos por cada 100.000 habitantes

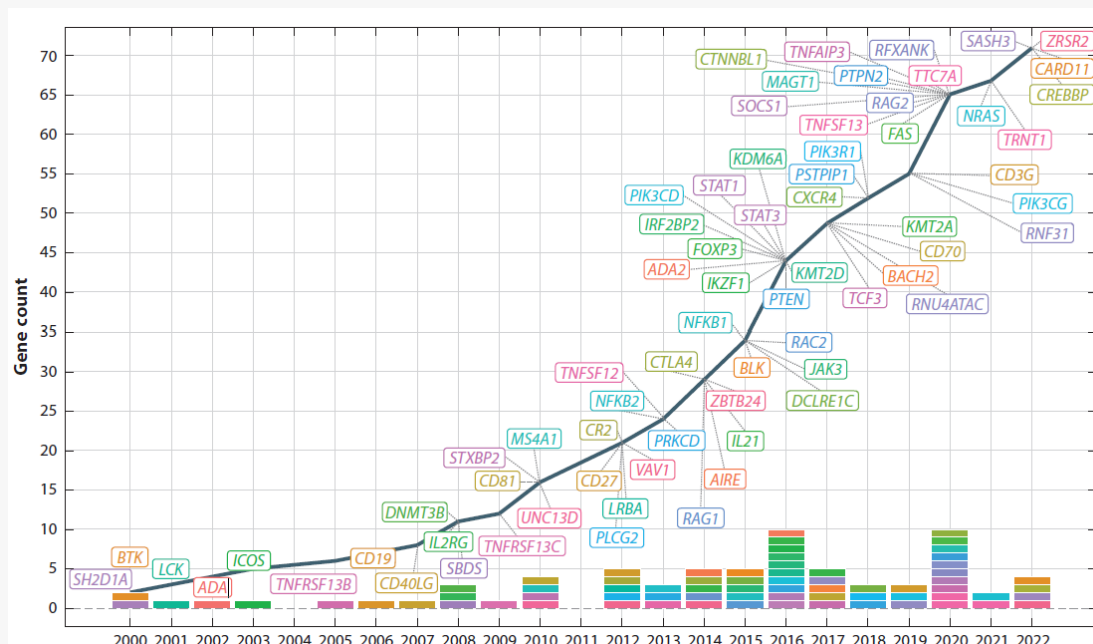


3.5. Fisiopatología

3.5.1. Genética de la Inmunodeficiencia Común Variable

Aunque hasta la fecha solo se han identificado mutaciones monogénicas que expliquen aproximadamente el 20-30% de los casos de IDCV (Gereige et al., 2019; Peng et al., 2023), se han descubierto más de 60 variantes de IDCV asociadas a mutaciones monogénicas en los últimos 20 años, que se ilustran de forma resumida en la **Figura 4**, extraída de Peng et al., (2023).

Figura 4. Evolución histórica de la identificación de las variantes monogénicas asociadas a la Inmunodeficiencia Común Variable. Extraído de Peng et al., (2023)



Según la función que desempeña la proteína a la que afecta cada mutación, se desarrolla la siguiente síntesis de las mutaciones monogénicas asociadas a la IDCV.

- Las primeras formas monogénicas de IDCV identificadas presentaban **mutaciones en genes clave para la supervivencia, proliferación, desarrollo, maduración y función de los linfocitos B**, tales como proteínas coestimuladoras del receptor de células B (CD19, MS4A1/CD20, CR2/CD21, y CD81) o aquellas que afectan a la superfamilia del factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa) incluyendo tanto los ligandos (TNFSF13B, TALL1/BAFF/BLYS, TNFSF13/APRIL, y TNFSF12/TWEAK) como el receptor (AFF-R, TACI, y BCMA) (Bossen et al., 2006).

- **Errores innatos del citoesqueleto de actina:** los genes como *CXCR4*, *RAC2*, *ARHGEF1*, *TTC7A*, y *PSTPIP1*, que codifican reguladores clave de la dinámica del actina, han sido asociados a IDCV. Las alteraciones en estas vías pueden afectar a la migración de las células B y a la señalización intracelular, causando diferentes fenotipos de IDCV (Hsu et al., 2019).
- **Señalización lipídica:** los defectos genéticos en las vías de señalización de PI3K y PI4K se han vinculado a la enfermedad, evidenciando la relevancia de la señalización de mTOR para la homeostasis inmunológica. Las mutaciones en la vía PI3K conllevan una proliferación incontrolada de linfocitos, acelerando la maduración y senescencia de las células T e impidiendo la maduración de las células B (Elkaim et al., 2016).
- **Factores de transcripción que median la diferenciación y la comunicación intercelular:** las mutaciones en los factores de transcripción como *IKZF1* (IKAROS) y la familia *NF-κB* pueden afectar a la diferenciación y función de las células B, que producen manifestaciones clínicas encuadrables dentro de la IDCV. Estos factores de transcripción tienen un amplio impacto en la regulación de genes de las células del SI (Kuehn et al., 2021; Fliegau et al., 2015).
- **Errores congénitos del metabolismo:** las mutaciones que causan trastornos congénitos de glicosilación y trastornos mitocondriales pueden afectar a la capacidad de las células B para sobrevivir y proliferar, y resultar en el cuadro clínico de la enfermedad. Estos incluyen defectos en genes como *MOGS*, *MAGT1*, *ATP6AP1*, *PGM3*, y *TRNT1* (Zhang et al., 2014).
- Las **mutaciones hipomorfás en genes relacionados con el desarrollo de las células B**, como la *BTk* (causante de la agammaglobulinemia ligada al X) pueden estar asociadas a la IDCV. Esto se debe a una señalización residual del BCR que permite la supervivencia de una pequeña población de células B. Algunas mutaciones encontradas en pacientes con IDCV también se identifican en genes asociados con los síndromes de hiper-IgM debido a la falta de criterios de diagnóstico específicos. Además, se han identificado mutaciones en la CD40LG ligada al cromosoma X (Yong et al., 2011).
- También se han identificado **genes relacionados con la disfunción de las células T y la disregulación inmunológica**, subrayando la importancia de las células T efectoras en la conformación de los linfocitos B (Dieli-Crimi et al., 2018).
- **Defectos en la regulación genética de la tolerancia inmunológica:** las mutaciones en los genes *AIRE*, *FOXP3* y *STAT3*, críticos para la regulación de la tolerancia inmune, pueden conducir a fenotipos similares a la IDCV debido a la disfunción de células T y B (Hao H et al., 2021; Russell et al., 2017).

- **Dinámica de orgánulos de membrana:** cabría destacar mutaciones en genes como *CTLA4* y *LRBA* afectan la dinámica de los orgánulos de membrana, alterando la homeostasis celular y la regulación inmune (Qureshi et al., 2011).
- **Ciertas mutaciones en genes asociados con la inmunodeficiencia combinada severa (IDCS)** pueden resultar en formas variables de inmunodeficiencia, desde IDCS clásica hasta la propia IDCV, a menudo asociando comorbilidades autoinmunes o autoinflamatorias, como *ADA*, *IL2RG* y *JAK3*. Además, genes involucrados en la reparación del ADN también pueden contribuir a la patogénesis de IDCV como *PMS2* o *MSH5* (Delmonte OM et al., 2018).
- **La señalización de las células T** es crucial en la IDCV, por lo que mutaciones en ICOS y otros genes relacionados con la activación y supervivencia de las células T pueden causar defectos en la diferenciación de células B y la respuesta humoral, así como inmunodeficiencia celular y autoinmunidad (Salzer et al., 2004).
- **Errores innatos de la regulación epigenética.** Mutaciones en enzimas de metilación/desmetilación de ADN e histonas pueden afectar la diferenciación de células B y la expresión de genes de cambio de isotipo de inmunoglobulinas y mutación somática (Li G et al., 2013).
- **Vía de la autoinflamación:** ciertas mutaciones en genes asociados con autoinflamación se han encontrado en pacientes con IDCV, como la *ADA2*, *LUBAC*, o *PLCG2* contribuyendo a disfunciones de células B tanto a nivel intrínseco como extrínseco (Park et al., 2013).

Además, otros mecanismos genéticos como la epistasis, donde la expresión de un gen está influenciada o modificada por la presencia o acción de otros genes variando el fenotipo final, o la identificación de *loci* de riesgo, parecen también tener un papel en la fisiopatología de la IDCV (Ameratunga et al, 2018). De igual manera, se está comenzando a investigar el papel de las variaciones somáticas en la enfermedad (Savola et al., 2020).

Considerando la variedad de fenotipos presentes y la posibilidad de un origen genético poligénico u oligogénico en muchos casos, la secuenciación del genoma completo puede convertirse en el método preferido para el diagnóstico clínico de inmunodeficiencias heterogéneas como la IDCV (Peng et al., 2023).

Sin embargo, es posible que coexistan en su etiopatogenia factores epigenéticos y ambientales con un rol importante en las manifestaciones de la enfermedad (Agarwal et al., 2019).

3.5.2. Rol de la microbiota y la disbiosis en la etiopatogenia de la Inmunodeficiencia Común Variable

Dado que las mutaciones monogénicas representan una minoría de pacientes con IDCV como se ha comentado previamente (Gereige et al., 2019; Peng et al., 2023), se cree que múltiples factores de riesgo genéticos y ambientales pueden interactuar para causar esta patología (Jorgensen et al., 2019; Berbers et al., 2017). Recientemente, varios estudios han comenzado a investigar el perfil del microbioma en estos pacientes.

La microbiota constituye la comunidad de microorganismos simbióticos, incluyendo bacterias, virus, hongos, arqueas y protozoos, que colonizan un nicho ecológico específico. En el organismo humano, la microbiota se distribuye en varios biotopos como el tracto gastrointestinal, la piel, la cavidad oral, el tracto urinario y las vías respiratorias. Estos microorganismos, adquiridos principalmente del entorno, han co-evolucionado con los mamíferos, resultando en comunidades microbianas especializadas, presentando una relación simbiótica que proporciona nutrientes a los microorganismos y confiere al hospedador beneficios como metabolitos derivados de la digestión bacteriana, protección contra patógenos y educación del sistema inmune (Berg et al., 2020).

La microbiota intestinal ha sido la más estudiada hasta el momento y juega roles fundamentales en procesos tan variables como la digestión, la síntesis de vitaminas, la defensa contra patógenos, el desarrollo inmunológico y la modulación de la función cerebral. La composición de la microbiota es dinámica y está influenciada por factores como la dieta, el estilo de vida, la edad, el sexo, la genética del huésped y el uso de medicamentos como los antibióticos o los inmunosupresores tan esenciales en el manejo clínico de los pacientes con IDCV (Thais et al., 2016).

La disbiosis, o el desequilibrio en la composición de la microbiota, se ha asociado con diversas patologías, incluyendo enfermedades inflamatorias intestinales, obesidad, enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas, trastornos neurológicos y cáncer (Chen et al., 2021). De hecho, se ha establecido una asociación entre la presencia de ciertas bacterias y diversas enfermedades, identificándose determinadas especies bacterianas como biomarcadores o patobiontes con relevancia en la etiopatogenia de enfermedades y, en algunos casos, con utilidad diagnóstica (Kim & Kim, 2016).

El avance en las técnicas de secuenciación de ADN ha permitido una mayor comprensión de la diversidad y función de la microbiota, abriendo nuevas vías terapéuticas, como los trasplantes de microbiota fecal y la modulación de la microbiota a través de probióticos y prebióticos personalizados (Gebrayel et al., 2022) sin necesidad de llevar a cabo un cultivo. El gen ARNr 16S, encargado de codificar la subunidad menor del ARN ribosómico de los procariotas, es el más utilizado para la identificación bacteriana porque se distribuye universalmente entre todas

las bacterias y es lo suficientemente pequeño como para ser secuenciado con facilidad. Este gen puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores universales de amplio espectro (Hargreaves & Cohen, 2011). Esto permite medir parámetros como la diversidad alfa, que hace referencia a la diversidad biológica dentro de un área o ecosistema específico, siendo una medida de la riqueza (número total de especies) y abundancia (cantidad total de individuos de cada especie) en un nicho particular. Para expresar esta diversidad alfa, existen algunos índices de medida, como el índice de Chao1, que estima la riqueza de especies en base al número total de especies estimado, considerando especies poco observadas; o el índice de Shannon, que combina el número de especies y su abundancia en el nicho. Un valor mayor en el índice de Shannon indica una comunidad bacteriana más diversa y equitativa en la abundancia de cada especie.

En los pacientes con IDCV, el deterioro de la inmunidad puede dar lugar a un aumento de la traslocación microbiana a través de la barrera intestinal, lo que podría provocar una activación inmunitaria sistémica persistente y la ruptura de la homeostasis inmunitaria, produciendo a su vez una disregulación inmunitaria local y sistémica responsable de las complicaciones no infecciosas asociadas con la IDCV (Berbers et al., 2017; Jørgensen et al., 2016). De hecho, el grupo de Jørgensen et al. (2016) detectó niveles elevados de lipopolisacárido sérico (LPS) y otros marcadores de activación inmunológica como el CD14 soluble y la IL-2 en pacientes con IDCV, junto con una menor diversidad alfa y una mayor disbiosis en su microbiota gastrointestinal. Cabe destacar que estos hallazgos fueron más pronunciados en aquellos pacientes con IDCV con complicaciones inflamatorias y autoinmunes que en aquellos pacientes que solo sufrieron complicaciones infecciosas (Jørgensen et al., 2016).

Además, la microbiota pulmonar también está siendo estudiada como una de las causas de la disregulación inmune local y de la linfoproliferación que ocurre en otras enfermedades autoinmunes sistémicas como la sarcoidosis o en las enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) (Ricci, 2021; Inaoka, 2019). Además, estudios recientes sugieren un posible vínculo bidireccional entre la microbiota intestinal y la pulmonar, lo que se conoce como el eje intestino-pulmón (Young, 2016; Varricchi, 2021). Varios estudios han documentado alteraciones en la microbiota intestinal como consecuencia del aumento de mediadores inflamatorios bacterianos en el contexto de infecciones respiratorias (Varricchi et al., 2021). A su vez, las infecciones intestinales crónicas o recurrentes resultan en un aumento de la translocación microbiana por el daño del epitelio intestinal (Hand et al., 2016; Huang et al., 2018). Sin embargo, no existen estudios dedicados a analizar la microbiota respiratoria en la IDCV. Además, se han documentado cambios en la microbiota orofaríngea en pacientes con EPI y deficiencias primarias de anticuerpos como la IDCV (Berbers et al., 2020), lo que refleja indirectamente cambios en la microbiota pulmonar a través de la siembra bacteriana desde el tracto respiratorio inferior.

A fecha de junio de 2023, los estudios realizados para investigar la microbiota en pacientes con IDCV han proporcionado los siguientes hallazgos clave:

1. Diversidad de la microbiota: la diversidad alfa se encontró consistentemente disminuida en los pacientes con IDCV en comparación con los controles en varios estudios (Jørgensen et al., 2016; Fiedorová et al., 2019; Nöltner et al., 2023). Esta disminución en la diversidad alfa se asoció con una alteración en la composición de la microbiota, y con marcadores de inflamación sistémica y lipopolisacáridos (LPS) revelando una traslocación de gramnegativos aumentada en los pacientes con IDCV (Jørgensen et al., 2016; Macpherson et al., 2020; Macpherson et al., 2023).
2. Distribución de especies bacterianas: únicamente dos estudios revelan datos taxonómicos a nivel de especie de la composición bacteriana de la microbiota en los pacientes con IDCV (Shulzhenko et al., 2018; Nöltner et al. 2023). Por ejemplo, *Acinetobacter baumannii* se identificó como un posible patobionte en pacientes con IDCV y enteropatía (Shulzhenko et al., 2018). Nöltner et al., (2023) identificaron varios patobiontes, incluyendo *Bacteroides fragilis*, *Veillonella atypica*, *Neisseria perfava*, *Haemophilus parainfluenzae* y *Escherichia* no clasificada, asociados con niveles disminuidos de IgA e IgM fecales y una diversidad microbiana reducida.
3. Niveles de inmunoglobulinas: los niveles de IgA e IgM han demostrado tener una relación significativa con la diversidad de la microbiota en pacientes con IDCV. En un estudio, se encontró que los niveles bajos de IgA e IgM en las heces se asociaban con una diversidad microbiana reducida y una disbiosis incrementada (Nöltner et al., 2023). Además, en pacientes con IDCV y enteropatía, se observó un nivel extremadamente bajo de IgA en los tejidos duodenales (Shulzhenko et al., 2018). En el nicho oral, el estado de IgA se asoció con una diversidad beta diferente y una mayor diversidad alfa en presencia de enfermedad pulmonar radiográfica más grave (Berbers et al., 2020). Estos hallazgos sugieren que los niveles de inmunoglobulinas, tanto a nivel sistémico como en mucosas, pueden estar intrínsecamente vinculados a la composición y diversidad de la microbiota en los pacientes con IDCV.
4. Ácidos grasos y triglicéridos: los individuos afectados de IDCV presentaron un perfil desfavorable de ácidos grasos, con reducciones en los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y el ácido linoleico, que se asociaron positivamente con la diversidad alfa (Skarpengland et al., 2021). Además, se encontró que los niveles plasmáticos de triglicéridos y de VLDL, estaban asociados con inflamación sistémica, LPS y disbiosis intestinal en IDCV (Macpherson et al., 2023).
5. Dieta y medicación: las alteraciones en los ácidos grasos no parecían estar relacionadas con la dieta o la enteropatía de IDCV (Skarpengland et al., 2021). Además, la

antibioterapia con rifaximina disminuyó la diversidad alfa y los niveles de ácidos grasos poliinsaturados n-6 (Skarpengland et al., 2021).

Con todo ello, aún no existe evidencia sobre las diferencias del microbioma entre los pacientes con IDCV y dis inmunidad a nivel de especie. La realización de análisis específicos sobre la composición de la microbiota en diferentes lugares y en los diversos fenotipos de IDCV es crucial para entender la fisiopatología de esta entidad.

3.6. Defectos celulares

En pacientes con IDCV, se han reportado defectos en el sistema inmunológico adaptativo e innato, en particular valores anormales de células B y T. Aunque el defecto inmunológico clásico en IDCV son las anomalías en las células plasmáticas, no son infrecuentes las alteraciones en otros subgrupos de células B, e incluso en linfocitos T (Yazdani et al., 2020).

3.6.1. Defectos en linfocitos B

El desarrollo de las células B implica pasos secuenciales de maduración iniciados en la médula ósea y completados en órganos del SI periférico. Existen una serie de procesos intermedios por el que los linfocitos B inmaduros se convierten en linfocitos B de la zona marginal o linfocitos B foliculares periféricos naïve. En los centros germinales, las células B foliculares se diferencian en células B de memoria con cambio de clase o *switched*, y células plasmáticas capaces de producir anticuerpos, mientras que las células B de la zona marginal evolucionan a células B de memoria capaces de producir IgM (Carsetti et al., 2005). Casi el 90% de los pacientes con IDCV tienen recuentos normales de células B, lo que indica que el principal defecto probablemente esté relacionado con alteraciones en las etapas terminales de su diferenciación (Ahn et al., 2009).

Varios estudios han reportado una disminución de las células B de memoria IgM (CD19+/CD27+), de las células B de memoria con cambio de clase (CD19+/CD27+/IgD-/IgM-) y de las células plasmáticas (Carsetti et al., 2005). Además, un subgrupo de pacientes manifiesta la expansión de una subpoblación de linfocitos B, los CD21^{low}, que se distinguen de otros subconjuntos de células B por su baja expresión simultánea de CD21 y CD38 (Warnatz et al., 2009). Dicha expansión se asocia con una abundancia de linfocitos T *helper* foliculares (CD4+ CXCR5+) productores de IFN-γ y con la disfunción inmunológica en pacientes con IDCV (Unger et al., 2018).

De hecho, en 2008 se realizó un consenso (EUROclass trial) en el que se estableció que diferentes patrones en las subpoblaciones linfocitos B se correlacionaban con la presencia de diferentes fenotipos clínicos o complicaciones no infecciosas: la caracterización fenotípica

mediante citometría de flujo demostró que una reducción severa de las células B de memoria *switched* se asociaba a un mayor riesgo de esplenomegalia y enfermedad granulomatosa. Asimismo, la expansión de las células B CD21^{low} se asoció a la presencia de esplenomegalia (Wehr et al., 2008).

3.6.2. Defectos en linfocitos T

Si bien es cierto que la deficiencia profunda de células T es un criterio de exclusión para el diagnóstico de IDCv (Seidel et al., 2019), algunos estudios indican una reducción en células T CD4⁺ totales, naïve y de memoria, y un aumento en células T CD4⁺ activadas. Esta reducción puede deberse a una disminución en la producción tímica y un aumento en la apoptosis espontánea (Oraei et al., 2012).

A pesar de estas anomalías, el papel de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T *helper* en la fisiopatología de la IDCv es controvertida. Algunos estudios sugieren una desviación hacia respuestas TH2, mientras que otros indican una respuesta excesiva de TH1 (Cunill et al., 2017; Yazdani et al., 2020). Además, se ha demostrado menor recuento de linfocitos TH17 (Ganjalkhani-Hakemi et al., 2014).

Por otra parte, los linfocitos T reguladores, importantes para la autotolerancia antigénica, no parecen ser relevantes en su patogenia, aunque algunos estudios sugieren que pueden influir en las manifestaciones inmunológicas de la enfermedad. De igual modo, se han documentado menores recuentos de linfocitos T CD8⁺ naïve y de memoria efectora, junto a un aumento de los linfocitos T CD8⁺ activados. También se ha reportado la expansión de linfocitos T $\gamma\delta$, aunque se necesitan más estudios para confirmar este hallazgo (Pellerin et al., 2014; Yazdani et al., 2020).

3.7. Manifestaciones clínicas: hacia un cambio de paradigma

3.7.1. Complicaciones infecciosas

Debido a la disminución de la producción de los niveles de anticuerpos, las infecciones son las manifestaciones clínicas más típicas y frecuentes de la IDCv, pudiendo ser graves y recurrentes, y afectando principalmente a las vías respiratorias y gastrointestinales (Patuzzo et al., 2016).

Las infecciones respiratorias son la complicación infecciosa más frecuente en pacientes con IDCv, contribuyendo significativamente a su morbilidad (Yazdani et al., 2017). Las infecciones bacterianas del tracto respiratorio superior, como la sinusitis, la otitis media y las bronquitis recidivantes, son altamente comunes entre los pacientes, afectando hasta al 50% de los pacientes según las series, y son uno de los signos de alarma fundamentales para sospechar

la presencia de una inmunodeficiencia subyacente (Yazdani et al., 2020). *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* son los dos agentes patógenos más frecuentemente aislados en estos casos. También se describe con relativa frecuencia la presencia de *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, y especies de *Staphylococcus* como agentes etiológicos (Hampson FA et al., 2012; Zainaldain et al., 2020).

Además, las infecciones de vías respiratorias inferiores, como las neumonías bacterianas así como infecciones por micobacterias, también pueden ocurrir, siendo *Mycobacterium avium-complex* uno de los principales responsables. La neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, una infección oportunista grave, también puede presentarse en estos pacientes, si bien no es tan frecuente ni característica como en los pacientes con inmunosupresión celular (Oksenhendler et al., 2008). Estos casos se han relacionado con el uso de terapia inmunosupresora, más que con la propia inmunodeficiencia humoral, y con aquellos subgrupos de pacientes con IDCV que presentan además un recuento bajo de linfocitos CD4+. La sucesión de infecciones pulmonares graves y de repetición, puede conllevar el desarrollo de bronquiectasias y enfermedad pulmonar intersticial (Ramzi et al., 2020).

Las infecciones gastrointestinales son otra manifestación frecuente en pacientes con IDCV, expresándose clínicamente como diarrea crónica o aguda. La giardiasis, causada por el protozoo *Giardia lamblia*, es una infección parasitaria que puede cursar con diarrea crónica, distensión abdominal y pérdida de peso, y es el patógeno más comúnmente identificado, seguido por *Campylobacter jejuni* y algunas especies de *Salmonella*, especialmente en aquellos IDCV que muestran niveles indetectables de IgA sérica (Agarwal et al., 2013). Si bien la IgRT es capaz de controlar y disminuir el número de infecciones de vías respiratorias altas y bajas, las IgRT no mejoran de forma consistente los síntomas gastrointestinales. También es importante destacar la infección por *H. pylori*, que, si bien no presenta una prevalencia superior respecto a la formación general en este grupo de pacientes, su asociación con la displasia gástrica y finalmente, el cáncer gástrico, obliga a su *screening* precoz (Yazdani et al., 2020).

Las infecciones fúngicas son menos frecuentes y características que las previamente descritas, y en caso de aparecer, pueden variar desde candidiasis orales hasta infecciones mortales graves por *Aspergillus* spp. Estos últimos casos se suelen relacionar con fenotipos más graves de IDCV que además asocian defectos en la inmunidad celular (Antachopoulos et al., 2007).

Si bien las infecciones bacterianas son más frecuentes que las infecciones virales, estas también son destacables. Los virus que comúnmente causan las infecciones de vías respiratorias superior e inferior incluyen el virus respiratorio sincitial (VRS), los virus de la gripe y el rinovirus (Kainulainen et al., 2010). Entre los virus que pueden causar infecciones gastrointestinales se incluyen los rotavirus y los norovirus, siendo estos últimos, a menudo, muy difíciles de erradicar pese a la optimización de la IgRT y de los antivirales (Woodward et al., 2017).

Además, tanto el CMV como el VEB pueden afectar a los pacientes con IDCv especialmente aquellos con fenotipo clínico más grave o con defectos en el número o función de las células T o una disfunción en la respuesta inmune innata. Las infecciones por VEB en estos pacientes pueden ser difíciles de controlar y se han relacionado con la aparición de linfoproliferación y neoplasias (Costagliola et al., 2021).

En la **Tabla 4** se representa la prevalencia agrupada de diferentes infecciones según los resultados de un metaanálisis amplio incluyendo series de pacientes hasta el año 2020 (Zainaldain et al., 2020).

Tabla 4. Prevalencia agrupada de diversas infecciones entre los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable.
Adaptado de Zainaldain et al., (2020)

Infecciones	Número de estudios	Suma del tamaño de la muestra, suma de casos positivos	Rango de prevalencias entre los estudios
Neumonía	58	3937, 2294	19.1–100
Infecciones de vía aérea superior	20	1477, 978	12.0–100
Sinusitis	44	2187, 1339	6.3–100
Otitis media	32	1471, 628	10.0–100
Infección bacteriana	19	950, 274	5.3–100
Amigdalitis	4	507, 49	5.0–100
Infección gastrointestinal	26	1635, 409	0–87.5
Infección viral	26	1837, 472	1.6–100
Infección parasitaria	22	1344, 163	1.9–87.0
Faringitis	4	598, 101	7.2–32.0
Infección cutánea	17	938, 178	2.5–36.4
Absceso	11	1084, 91	1.6–100
Conjuntivitis	13	975, 154	9.1–36.0
Infección del SNC	25	3141, 192	1.3–100
Sepsis	14	1632, 128	1.2–22.2
Candidiasis	12	1367, 125	0.8–42.9
Hepatitis C	14	1870, 108	1.2–34.9
Artritis séptica	9	908, 44	0.8–24.0
Infección fúngica	11	1458, 51	1.1–46.9
Osteomielitis	7	900, 22	0.8–12.0

3.7.2. Complicaciones no infecciosas

Un total del 30–50% de los pacientes con IDCV presentan manifestaciones no infecciosas, incluyendo complicaciones autoinmunes, gastrointestinales, pulmonares, linfoproliferativas y malignas, que contribuyen fuertemente a la morbilidad y mortalidad (Chapel et al., 2008; Resnick et al., 2012). A continuación, se detallan estos fenotipos clínicos.

3.7.2.1. Dis inmunidad y autoinmunidad

Las enfermedades autoinmunes ocurren en el 20–30% de los pacientes con IDCV. Las citopenias autoinmunes, y en particular la púrpura trombocitopénica inmune (PTI), la anemia hemolítica autoinmune (AHA), y el síndrome de Evans (Odnoletkova et al., 2018; Cunningham-Rundles et al., 2011), son las más comúnmente descritas, aunque también se han objetivado enfermedades autoinmunes sistémicas y específicas de órganos y sistémicas. Estas patologías pueden ser la primera manifestación de la propia IDCV sin que exista una historia típica de infecciones (Chapel H et al., 2012).

En cuanto a las enfermedades autoinmunes sistémicas, en un estudio de 870 pacientes con IDCV del registro de la Red de Inmunodeficiencia de Estados Unidos (USIDNET), se encontró que el 5% tenían una enfermedad reumatológica (Gutierrez et al., 2018), siendo la artritis inflamatoria la más documentada, en un 3% de los pacientes. También se han descrito casos lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de Sjögren, enfermedad de Behçet, y psoriasis (Resnick et al., 2012; Gutierrez et al., 2018; Abolhassani et al., 2013).

Entre las enfermedades autoinmunes órgano-específicas, en un registro de la ESID de 2700 pacientes con IDCV, el hipotiroidismo fue el más prevalente con un 3,5%, seguido por alopecia areata, vitíligo, y diabetes mellitus tipo I (Odnoletkova et al., 2018).

Diversos estudios sugieren que la patogénesis de la enfermedad autoinmune en la IDCV muestra un trasfondo genético e inmunológico. La disfunción de las células T es un factor contribuyente en el desarrollo de la autoinmunidad en la IDCV (Azizi et al., 2016). En pacientes con IDCV y autoinmunidad se ha observado un fenotipo de células T hiperactivadas (Warnatz et al., 2012), un número disminuido y alteración de la función de las células Tregs (Genre et al., 2009), y un aumento en las células LTh1, LTh17 y LTh foliculares (Cunningham-Rundles et al., 2011). Además, la autoinmunidad puede ser causada no sólo por una alteración en la tolerancia a los autoantígenos, sino también por la incapacidad de los pacientes con IDCV para erradicar completamente los antígenos microbianos, resultando en respuestas inflamatorias compensatorias, a menudo exageradas y crónicas (Amaya-Urbe et al., 2019). En cuanto al trasfondo genético, se han

documentado numerosos genes implicados en la linfoproliferación y la autoinmunidad en los pacientes con IDCV, como, por ejemplo, la mutación TNFRSF13B (que codifica para el factor activador de las células B (BAFF) y el receptor APRIL, TACI) o el déficit de NF- κ B1 y NF- κ B2, entre otros (ver apartado de genética) (Peng et al., 2023).

A continuación, se resume la prevalencia de las manifestaciones autoinmunes y dis inmunes de la IDCV según el metanálisis de Janssen et al., (2021) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Prevalencia de diferentes patologías autoinmunes en la Inmunodeficiencia Común Variable en 8521 pacientes de 51 estudios.
Adaptado del metaanálisis de Janssen et al., (2021)

Manifestación clínica	Frecuencia (IC 95%)
Anemia hemolítica autoinmune	6 (4-8)
Artritis reumatoide	3 (2-4)
Artritis seronegativa	4 (2-7)
Autoinmunidad	27 (22-32)
Celiaquía	3 (2-4)
Citopenias autoinmunes	13 (10-17)
Enfermedad inflamatoria intestinal	6 (10-16)
Enfermedad tiroidea	9 (4-16)
Granulomatosis	12 (9-16)
Lupus eritematoso sistémico	1 (1-2)
Neutropenia autoinmune	4 (2-6)
Púrpura trombocitopénica idiopática	10 (7-14)
Síndrome de Sjögren	3 (1-6)
Tiroiditis autoinmune	4 (2-6)
Vitíligo	5 (3-8)

3.7.2.2. Linfoproliferación benigna

El 8–20% de los pacientes con IDCV pueden presentar linfoproliferación benigna en diferentes órganos, según las series (Ho HE et al., 2020; Chapel et al., 2008; Farmer et al., 2017). El desencadenante de este trastorno en IDCV sigue siendo desconocido. El hecho de que la aparición de enfermedad granulomatosa y la linfoproliferación benigna se relacione con un aumento de la incidencia de enfermedades autoinmunes en pacientes con IDCV sugiere que la etiopatogenia está relacionada con una disfunción inmunológica

que favorece la formación de granulomas y la linfoproliferación benigna (Ardeniz et al., 2009). Además, se han sugerido diversos desencadenantes infecciosos, relacionado el virus herpes 8 y el *Toxoplasma gondii* con la formación de granulomas en la IDCV (Wheat et al., 2005; Mrusek et al., 2004). Sin embargo, los estudios sobre la etiopatogenia de la linfoproliferación benigna son limitados y se requiere más investigación para comprender mejor la patogénesis de la enfermedad granulomatosa en IDCV.

Esta patología granulomatosa afecta principalmente a los pulmones, seguidos por los ganglios linfáticos y el hígado (Ho HE et al., 2020; Janssen et al., 2021). La enfermedad granulomatosa a nivel pulmonar puede ir acompañada de infiltrados linfocíticos intersticiales, a lo que se denomina enfermedad pulmonar intersticial linfocítica granulomatosa (EPIGL) (ver siguiente epígrafe). Sin embargo, en más de un 50% de los pacientes se documenta enfermedad granulomatosa extrapulmonar, afectando también a ganglios linfáticos, hígado, bazo, tracto gastrointestinal (tracto GI), médula ósea (MO), piel, ojos, sistema nervioso central (SNC), glándula parótida y riñones (Ho HE et al., 2020; Janssen et al., 2021; van Stigt AC et al., 2020). El tratamiento de la linfoproliferación benigna es muy heterogéneo y la evidencia es considerablemente limitada. Las terapias más utilizadas varían desde agentes inmunosupresores clásicos, incluyendo corticoesteroides, y fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FAMES), hasta biológicos más específicos como el rituximab (Boursiquot et al., 2013).

3.7.2.3. Enfermedad pulmonar intersticial y Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica

La EPI es una complicación no infecciosa característica de algunos pacientes con IDCV asociada a fenotipos clínicos complejos y mayor morbimortalidad. Con una prevalencia variable entre el 30-50% (Ho y Cunningham-Rundles et al., 2020), presenta una histología heterogénea, observándose frecuentemente patrones mixtos en una única biopsia, incluyendo inflamación granulomatosa no necrotizante, neumonitis intersticial linfoide, hiperplasia linfoide, bronquiolitis folicular, neumonía organizada, y fibrosis intersticial (Rao et al., 2015; Dhalla et al., 2020). El término EPIGL o GLILD por sus siglas inglés, acuñado para describir los hallazgos histopatológicos en los pulmones de pacientes con IDVC con o sin granulomas multisistémicos, es algo controvertido ya que los granulomas pulmonares no siempre están presentes en la histología y la naturaleza de los linfocitos infiltrantes es variable, por lo que algunos autores proponen englobar las manifestaciones parenquimatosas pulmonares no infecciosas como EPI asociada a la IDCV o IDCV-EPI (Dhalla et al., 2020).

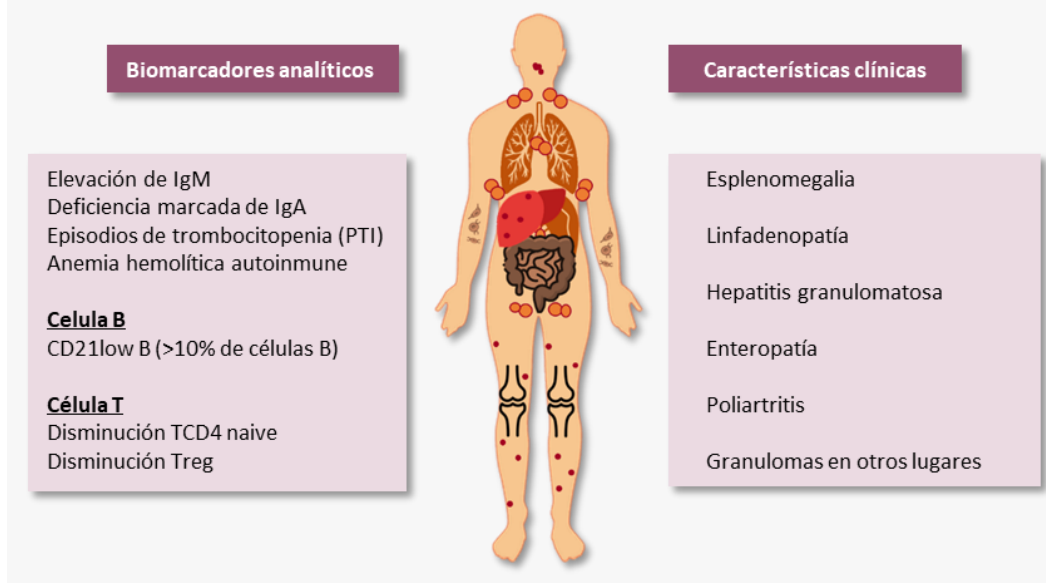
La EPIGL, con una prevalencia entre el 10-30% de los pacientes, constituye el gran paradigma de la dis inmunidad en la IDCV, pues se trata de una hiperproliferación linfocítica pulmonar que se asocia a fenómenos autoinmunes, mayor frecuencia de enteropatía y malabsorción, y al posterior desarrollo de neoplasias de origen linfocitario, identificándose así los cinco fenotipos clínicos establecidos por Chapel et al (2008).

La EPIGL ha sido definida, tras el consenso Delphi de la *British Lung Foundation* y la *United Kingdom Primary Immunodeficiency Network*, como “una enfermedad intersticial pulmonar distinta con infiltrado linfocítico y/o granulomas en el pulmón, y en la que se han considerado y excluido otras condiciones en la medida de lo posible” (Hurst et al., 2017). De hecho, está asociada a mayor morbilidad en pacientes con IDCV con comorbilidades no infecciosas, debido a la falta de herramientas que faciliten su sospecha y diagnóstico tempranos con manifestaciones clínicas inespecíficas, así como a estrategias terapéuticas mal definidas (Resnick et al, 2012).

El diagnóstico de EPIGL se basa en hallazgos clínicos, radiológicos e histopatológicos, y debe diferenciarse de otras causas de enfermedad pulmonar en IDCV, tales como infecciones y neoplasias. Por ello, la tomografía computerizada (TC) de alta resolución (TCAR) es la modalidad de imagen preferida. Los hallazgos radiológicos en el TCAR se observan principalmente en el tercio medio e inferior pulmonar, e incluyen la presencia de micronódulos difusos, engrosamiento septal interlobar, asociación con discretas bronquiectasias, y adenopatías, así como patrón en vidrio deslustrado. Recientemente, se han diseñado varios sistemas de puntuación radiológica para los TCs con el fin de evaluar el grado de lesión pulmonar e incluso diagnosticar y clasificar a los pacientes con EPIGL (Meerburg et al., 2020; Schütz et al., 2019). Sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere de una evaluación radiológica e histopatológica del pulmón, principalmente a través de técnicas como la biopsia transbronquial, la criobiopsia o la biopsia por videotoracoscopia asistida (VATS), que conllevan asimismo una importante morbilidad (Lamers et al., 2021).

Algunos autores han demostrado una asociación significativa entre la EPIGL y otros fenómenos de dis inmunidad como la púrpura trombocitopénica inmunológica (PTI), la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) y la hiperplasia linfática del bazo, hígado y linfadenopatías (Cinetto et al., 2021). Del mismo modo, se ha relacionado la PTI y la AHA con el desarrollo de granulomas en cualquier tejido, por lo que la EPIGL podría no considerarse exclusivamente como una forma localizada de linfoproliferación (Rao et al., 2015) (**Figura 5**). En este sentido, y para evitar la morbilidad que supone la realización de una biopsia pulmonar, se han desarrollado modelos predictivos que pretenden predecir el riesgo de desarrollo de EPIGL para un diagnóstico y tratamiento más precoces en base a hallazgos clínicos (Hartono et al., 2017; Manina et al., 2016).

Figura 5. Biomarcadores analíticos y clínicos de la Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica



En cuanto al tratamiento, el manejo de la EPIGL implica principalmente el uso de terapias inmunomoduladoras y/o inmunosupresoras, aunque las pautas terapéuticas no están bien establecidas. Los corticosteroides han sido la piedra angular del tratamiento, consiguiendo inducir la remisión en un 67% de los casos (Lamers et al., 2017), a menudo en combinación con agentes como la azatioprina o el micofenolato con una elevada heterogeneidad en los resultados (Lamers et al., 2017; Jolles et al., 2021). También se han reportado experiencias aisladas positivas con el uso de otros inmunosupresores convencionales como la ciclofosfamida, el metotrexate o el sirolimus (Boursiquot et al., 2013). Recientemente, se ha constatado mejoría radiológica y espirométrica con el uso de rituximab, si bien se ha documentado una recurrencia en torno al 30% al año de tratamiento (Lamers et al., 2021). El uso de rituximab y azatioprina ha demostrado una mejoría sostenida de al menos 4 años, con una tasa de recaídas del 25% a los 3 años (Lamers et al., 2021). Sin embargo, estas terapias presentan una tasa alta de efectos secundarios, especialmente de complicaciones infecciosas derivadas de la inmunosupresión (Ramzi et al., 2020).

La realización de un exoma clínico que permita identificar mutaciones monogénicas con tratamiento dirigido es esencial en estos pacientes. El uso de abatacept ha demostrado ser eficaz en casos aislados de pacientes con déficit de LRBA y haploinsuficiencia *CTLA-4* (Lo B et al., 2015). El trasplante de progenitores hepatopoyéticos constituye una opción terapéutica en casos con IDCv y EPIGL de elevada complejidad, con eficacia variable (Lamers et al., 2021).

3.7.2.4. Enteropatía

La prevalencia de enteropatía en pacientes con IDCV oscila entre 9-34%. El principal desafío radica en la falta de una definición universal de la enteropatía de IDCV, que complica la investigación y comparación de estudios. La diarrea es el síntoma más común en estos pacientes, con variaciones de prevalencia debido a diferencias en los diseños de estudio (Andersen et al. 2022).

La gastritis crónica se presenta en el 3-20% de los pacientes con IDCV. Aunque se ha asociado la infección por *H. pylori*, algunos estudios sugieren que otros factores pueden contribuir a su desarrollo, como la disregulación inmune y su papel en la aparición de gastritis crónica atrófica tipo anemia perniciosa. Asimismo, los pacientes con IDCV presentan una mayor incidencia de cáncer de estómago asociada con la presencia de gastritis atrófica y metaplasia intestinal (Jorgensen et al., 2016).

El hallazgo histológico más común en el tracto gastrointestinal superior de pacientes con IDCV es similar a la enfermedad celíaca, incluyendo la infiltración de células mononucleares y el aumento de linfocitos intraepiteliales, aunque en menor número y menor atrofia de las vellosidades y con ausencia de células plasmáticas (Malamut et al., 2010; Agarwal et al., 2013) y con una asociación limitada con los perfiles de HLA relacionados con la celiaquía (*DQ2-DQ8*) (Venhoff et al., 2013). Por otra parte, la inflamación gastrointestinal baja en la IDCV es muy heterogénea, con hallazgos histológicos que van desde patrones similares a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), con una prevalencia del 2-14%, hasta colitis linfocítica/colágena en el 10-26% y afecciones parecidas al EICH (Biagi et al., 2012). La enfermedad granulomatosa, que puede afectar el tracto GI y el hígado, ocurre en el 8-22% de los pacientes con IDCV (Boursiquot et al., 2013).

Existe un subgrupo de pacientes con IDCV que desarrolla una enteropatía crónica grave, presentando pérdida de peso, malnutrición proteica y en algunos casos precisando nutrición parenteral prolongada. Además, muestran un aumento de linfocitos intraepiteliales, positividad para norovirus y considerables pérdidas digestivas de IgG con descenso de niveles plasmáticos. Actualmente, este subgrupo de pacientes se clasifica como “Enteropatía grave” distinguiéndose de aquellos pacientes con diarrea intermitente/crónica sin pérdida de peso o malnutrición, que se englobarían dentro de la “enteropatía no grave asociada a la IDCV” (Jorgensen et al, 2022).

3.7.2.5. Malignidad

Los pacientes con IDCV tienen un riesgo significativamente mayor de padecer tanto neoplasias hematológicas como sólidas, con una prevalencia de aproximadamente el 10% (variando desde el 1,5% hasta el 20,7% según la serie) (Resnick et al., 2012; Kiaee et al., 2019; Quinti et al., 2019; Cunningham-Rundles y Bodian et al., 1999; Abolhassani et al., 2012; Tak Manesh et al., 2017).

Los linfomas constituyen el tipo de neoplasia más frecuentemente observada en pacientes con IDCV. De ellos, linfoma no Hodgkin (LNH) es el tipo de cáncer más frecuente, seguido por tumores epiteliales de estómago, mama, pulmón, vejiga y cuello uterino, así como los tumores cutáneos. Entre ellos, el adenocarcinoma gástrico es el cáncer más prevalente (Piquer et al., 2015; Resnick et al., 2012; Kiaee et al., 2019; Quinti et al., 2019; Cunningham-Rundles y Bodian et al., 1999; Abolhassani et al., 2012; Tak Manesh et al., 2017; López-Rocha et al., 2015; Dhalla et al., 2015). Tras la mejora en el control de la patología infecciosa, y su consecuente aumento en la supervivencia, la incidencia acumulada de neoplasias en pacientes IDCV está aumentando progresivamente (Pulvirenti et al., 2018).

Según un estudio realizado por la Sociedad de Australasia de Inmunología Clínica y Alergia (ASCIA), se encontró un incremento significativo en el riesgo de ciertas neoplasias en los pacientes con IDCV en comparación con la población general. Los aumentos se identificaron de la siguiente manera: un riesgo 12 veces mayor para linfoma no Hodgkin, 7 veces mayor para cáncer gástrico, 2,49 veces mayor para leucemia, 2,24 veces mayor para cáncer de mama y, de manera sorprendente, un riesgo 146 veces mayor para cáncer de timo (Vajdic et al., 2010).

3.8. Tratamiento

3.8.1. Terapia de reemplazo de inmunoglobulinas

La terapia de reemplazo con inmunoglobulinas (IgRT) se utiliza desde los años 50 como terapia sustitutiva en las inmunodeficiencias primarias. De acuerdo con la Agencia Europea del Medicamento (EMA por su siglas en inglés, *European Medicines Agency*), la IgRT está indicada para la terapia de reposición en IDP con alteración en la producción de anticuerpos y en pacientes con inmunodeficiencias secundarias que padecen infecciones graves o recurrentes, en los que el tratamiento antibiótico es ineficaz, y que asocian, o insuficiencia de anticuerpos específicos demostrada tras la vacunación, o un nivel de IgG <400mg/dL. Por ello, el tratamiento

con Ig constituye el *gold standard* en el manejo de los pacientes con IDCV, previniendo eficazmente el desarrollo de infecciones graves y recurrentes (Lucas et al., 2010; Perez et al., 2017).

La IgRT ejerce su mecanismo de acción a través de dos vías principales. Por un lado, presentan actividad antígeno-específica mediante mecanismos de opsonización, neutralización de patógenos y activación del complemento. Por otro lado, poseen actividad inmunomoduladora y antiinfecciosa, incluyendo la modulación de receptores celulares y sistema de complemento, neutralización de autoanticuerpos patógenos, regulación de la producción de autoanticuerpos, apoptosis, o producción de citoquinas (Lucas et al., 2010; Perez et al., 2017). Pese a ello, las Ig no tienen efecto en la prevención del desarrollo de neoplasias en los pacientes con IDCV y tampoco son capaces de controlar la linfoproliferación, la enteropatía, o el desarrollo de patología autoinmune o autoinflamatoria más allá de las dosis terapéuticas en crisis de citopenias inmunes, siendo necesario el uso de otros tratamientos como los inmunosupresores (Lamers et al., 2017; Jolles et al., 2021; Varricchi et al., 2021).

Las Ig pueden administrarse esencialmente de dos formas: por vía intravenosa (IgIV), o por vía subcutánea (IgSc) (Bonilla et al., 2008). La vía intramuscular ha quedado en desuso. La IgIV se administra con menor frecuencia (cada 3-4 semanas), requiere mayor volumen y tiempo de infusión, y es una vía óptima para el tratamiento con altas dosis. Sin embargo, presenta fluctuaciones del nivel de IgG en suero, requiere personal sanitario capacitado para su administración en el hospital y conlleva un coste global más elevado. En contraste, la IgSc se administra con más frecuencia (cada 1-4 semanas), requiere menor volumen y tiempo de infusión y proporciona una mayor estabilidad en los niveles de IgG. La formación para la autoadministración en domicilio ofrece mayor flexibilidad e independencia al paciente, mejorando su calidad de vida. Si bien puede haber reacciones en el punto de infusión, suelen ser leves y disminuir con el tiempo; a diferencia de las IgIV, con efectos adversos más frecuentes, especialmente en las primeras infusiones, y pudiendo presentar carácter sistémico (fiebre, artromialgias, lumbalgia, cefalea e incluso, anafilaxia). Estas características diferenciales entre ambos preparados aparecen detalladas en la **Tabla 6** (Jolles et al., 2011; Koleba et al., 2006)

El uso de IgSc ha aumentado significativamente durante la última década debido a su eficacia similar a la IgIV, pero con menos efectos adversos sistémicos. Además, al mantener unos niveles de IgG más estables en el tiempo, carece del efecto “*wear off*”: una disminución gradual de los niveles de inmunoglobulinas en sangre hacia el final del ciclo de infusión que aumenta la susceptibilidad a las infecciones y los síntomas relacionados con la enfermedad. En cambio, con el tratamiento con IgIV, hay un rápido aumento en los niveles de IgG después de la administración, seguido de una caída gradual antes de la próxima infusión, como puede objetivarse en la **Figura 6** (Ochs et al., 2006).

Actualmente existen dos preparados de IgSc: uno al 20% que se administra cada 1-2 semanas, y otro al 10% facilitado con hialuronidasa (IgScf) que se administra cada 3-4 semanas y que admite un mayor volumen que las IgSc convencionales con menor reacción en el punto de infusión (Ponsford et al., 2015).

En la **Figura 7**, se representan, de forma ilustrativa, los esquemas de tratamiento utilizados en la práctica clínica según el Protocolo de Uso de gammaglobulinas en pacientes con IDP de la Unidad de Referencia de Inmunodeficiencias Primarias a la que pertenece la autora, para el inicio y mantenimiento de las diferentes vías de administración de la IgRT.

Tabla 6. Comparación clínica de las características de las inmunoglobulinas intravenosas y subcutáneas

	IgIV	IgSc
Frecuencia de infusión	Menos frecuente: cada 3 o 4 semanas.	Más frecuente: cada 1-4 semanas.
Volumen	Mayor	Menor
Tiempo de infusión	2 a 6 horas	30-120 minutos
Terapia de alta dosis	Posible	Limitado por el volumen tolerado (ideal para pacientes con IC o ERC)
Determinación niveles IgG	Valle de IgG, extraído al final del ciclo de infusión de 3 a 4 semanas	Situación estable de IgG, se puede extraer en cualquier momento
Farmacocinética	Aumento rápido del nivel sérico de IgG al inicio. Fluctuación del nivel de IgG en suero. Efecto "wear off" los días de niveles valle.	Mayor estabilidad en los niveles valle. No efecto "wear off"
Lugar de la infusión	Hospital – requiere personal médico capacitado	Domicilio – requiere formar al paciente
Reacción en el punto de infusión	Poco común	Es común, pero no grave y tiende a disminuir con el tiempo: hinchazón, eritema, picazón durante algunas horas a algunos días
Reacciones sistémicas	Frecuentes, especialmente durante las primeras infusiones	Poco común
Satisfacción del paciente	Preferido por pacientes que no desean auto-administración	Mejor calidad de vida (flexibilidad, independencia, portabilidad)
Coste farmacoeconómico	Mayor (producto, suministros intravenosos, gastos de enfermería)	Menor (producto, fungible de infusión, bomba)

IC: insuficiencia cardíaca; ERC: enfermedad renal crónica

Figura 6. Cinética en plasma de las inmunoglobulinas endovenosas (curva rosa) respecto a la cinética de las inmunoglobulinas subcutáneas (curva azul).
Extraído de Ochs et al., (2006)

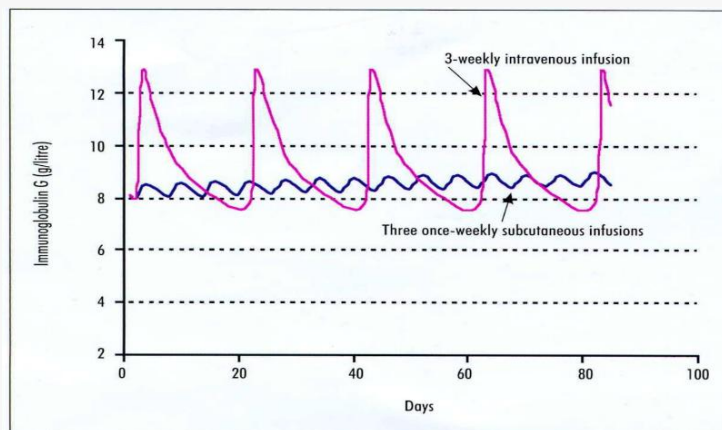
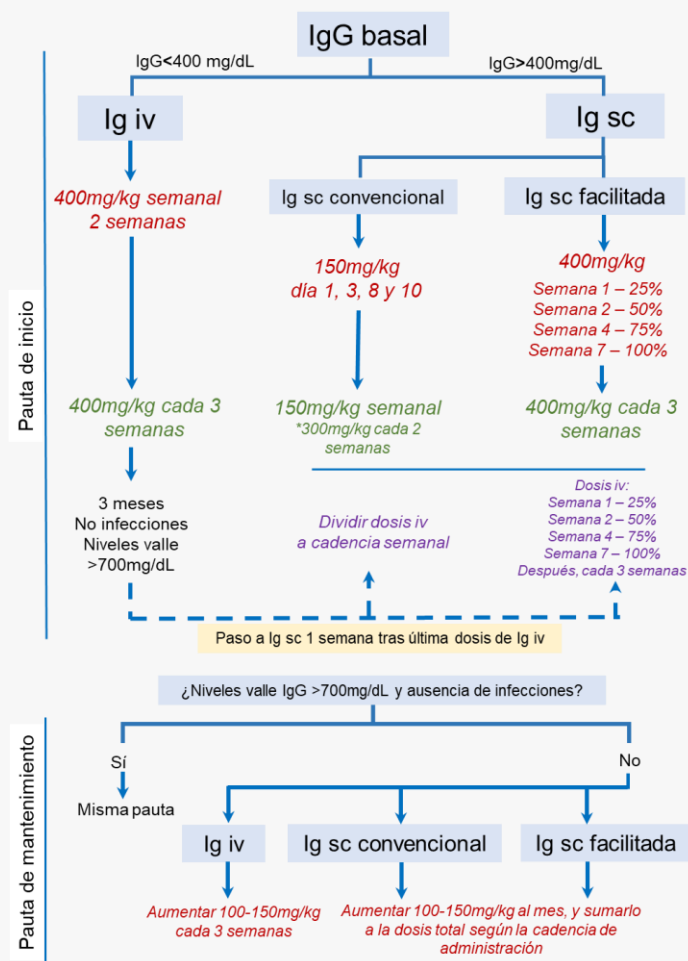


Figura 7. Protocolo de inicio y mantenimiento de la terapia con inmunoglobulinas intravenosas y subcutáneas convencionales o facilitadas



3.8.2. Tratamiento de la disregulación inmune: la paradoja de la Inmunodeficiencia Común Variable

Desde la introducción de la IgRT, el perfil de paciente con IDCV ha sufrido un cambio de paradigma, y las manifestaciones autoinmunes y dis inmunes de la enfermedad suponen actualmente la principal causa de morbilidad y un gran reto terapéutico (Resnick et al., 2012; Orange et al., 2010).

El tratamiento sustitutivo no modifica ni el curso ni la evolución de estas complicaciones, y ante la notable ausencia de evidencias y de dianas terapéuticas específicas, en ocasiones se requiere el uso de tratamiento inmunosupresor en este subgrupo de pacientes ya de por sí inmunosuprimidos (Perez et al., 2017; Agarwal et al., 2019; Gathmann et al., 2014)

Las enfermedades autoinmunes sistémicas asociadas a la IDCV se tratan, en general, de la misma manera que aquellas que aparecen en pacientes sin IDCV, utilizando con mayor frecuencia fármacos como los corticosteroides o tratamientos inmunosupresores como la azatioprina, el metotrexato, el micofenolato o la ciclofosfamida, así como tratamientos biológicos frente al factor de necrosis tumoral alfa o frente al receptor CD20 como el rituximab, entre otros (Chase et al., 2013; Malbran et al., 2010; Franxman et al., 2014; Pecoraro A., 2019). Por ello, el tratamiento de esta dis inmunidad es altamente complejo por el riesgo aumentado de infecciones o de desarrollo de neoplasias, que ya de por sí están intrínsecamente relacionados con la propia fisiopatología de la IDCV (Agarwal et al., 2019).

La enteropatía asociada a la IDCV constituye otro desafío terapéutico, debido a la ausencia de respuesta a las terapias habituales utilizadas para el tratamiento de la EII y desarrollando finalmente atrofia vellositaria avanzada y cuadros graves de malabsorción de elevada morbilidad (Andersen et al., 2022). Se han utilizado pautas de tratamiento a dosis bajas de corticoides sistémicos, antibioterapia para eliminar el posible sobrecrecimiento bacteriano asociado, budesonida oral y otros inmunosupresores como los 5-aminosalicilatos o la azatioprina, así como inhibidores de TNF, IL-12, IL-23 e integrinas, con efectividad variable y alta tasa de efectos adversos (Agarwal et al., 2009; Uzzan et al, 2016; Boland et al, 2017).

La secuenciación de última generación (*Next Generation Sequencing*, o NGS), particularmente el análisis del exoma clínico, se está convirtiendo en una herramienta esencial para la identificación de mutaciones patogénicas en la IDCV, guiando el manejo terapéutico (Peng et al., 2023). Por ejemplo, la identificación de mutaciones en los genes *PIK3CD* y *PIK3R1* que causan el síndrome de activación de fosfoinositida 3-quinasa delta (APDS) ha permitido la aplicación de terapias dirigidas con inhibidores de PI3Kδ, como el leniolisib (Rao VK et al., 2023).

Del mismo modo, para pacientes con defectos en CTLA-4 que manifiestan síntomas similares a la IDCV, el abatacept, que imita a CTLA-4, ha demostrado ser beneficioso (Lo B et al., 2015).

Este enfoque ofrece un diagnóstico preciso y facilita la personalización del tratamiento, optimizando el manejo del paciente y disminuyendo los efectos secundarios asociados con el uso de tratamientos más generales como los inmunosupresores.

3.9. Pronóstico

La IDCV se ha caracterizado históricamente por mayor susceptibilidad a infecciones recurrentes, que suponían el principal determinante pronóstico. Sin embargo, gracias a la IgRT, las complicaciones no infecciosas, como los trastornos autoinmunes, la linfoproliferación benigna y el cáncer, han emergido en la actualidad como las comorbilidades con mayor impacto pronóstico (**Figura 8**) (Gathmann et al., 2014). Estos fenómenos de disfunción inmune pueden afectar hasta el 70% de los pacientes (Orange et al., 2010; Resnick et al., 2012) y conllevan un riesgo de muerte hasta 11 veces mayor, ya que la IgRT no cambia su curso evolutivo (Resnick et al., 2012; Fisher et al., 2018).

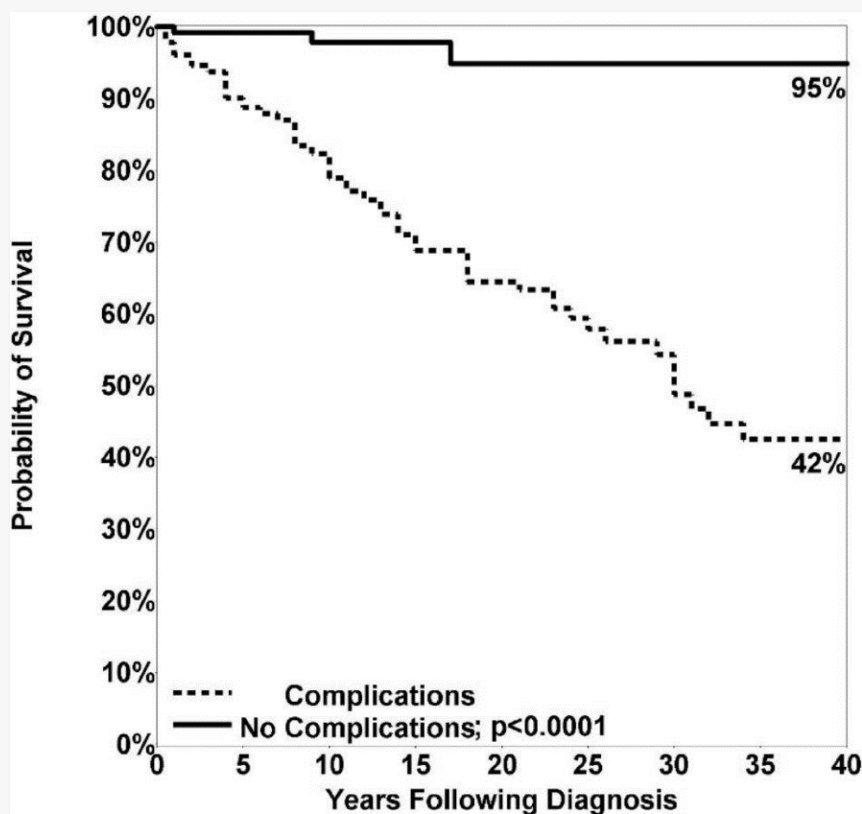
Además, la edad de inicio y la edad de diagnóstico se asocian significativamente con la supervivencia del paciente. Un aumento de un año en la edad de diagnóstico está asociado con un aumento del 4,5% en el riesgo de muerte, que ya es del 3% en el momento del debut de la enfermedad (Gathmann et al., 2014). Un mayor retraso diagnóstico también se asocia con un mayor riesgo de muerte, y la presencia de linfoma y tumores sólidos aumenta aún más este riesgo. En un análisis multivariante, la edad de diagnóstico resultó ser el principal factor correlacionado con la supervivencia del paciente (Gathmann et al., 2014), al permitir instaurar un tratamiento sustitutivo precoz y prevenir las infecciones graves y recurrentes, y sus secuelas.

Por otra parte, niveles más bajos de IgG basal, niveles más elevados de IgM y un menor número de células B periféricas como parámetros inmunológicos, se han asociado asimismo a peor pronóstico (Resnick et al., 2012). Según Resnick et al., (2012), la mortalidad se asoció significativamente con la presencia de linfoma, cualquier forma de hepatitis, daño pulmonar funcional o estructural como la EPIGL (Chase et al., 2013), y enfermedad gastrointestinal con o sin malabsorción.

Por ello, los factores de riesgo de mortalidad en pacientes con IDCV son múltiples y complejos, abarcando tanto aspectos inmunológicos como comorbilidades no infecciosas. Estos hallazgos subrayan la necesidad de un enfoque de atención más integral y personalizado para estos pacientes, centrado no sólo en la prevención de infecciones, sino también en el manejo de las comorbilidades asociadas

Figura 8. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable con y sin complicaciones no infecciosas. Los pacientes con complicaciones no infecciosas presentaron mortalidad significativamente mayor que aquellos que sólo presentaban infecciones ($p < 0.0001$).

Extraído de Resnick et al., (2012)



HIPÓTESIS y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

Se plantean las siguientes hipótesis para el desarrollo de la tesis doctoral:

1. En torno al 40% de los pacientes con IDCV presentan una activación inflamatoria sistémica cuya etiología se desconoce. Para poder caracterizar mejor esta entidad, es necesario el desarrollo de estudios multicéntricos que aúnen características epidemiológicas, clínicas, analíticas, terapéuticas y pronósticas, especialmente dada la rareza de la IDCV, con una prevalencia de 1:25.000-1:50.000, y la ausencia de registros nacionales en España. Por ello, proponemos que la realización de un estudio multicéntrico nacional, recopilando datos de más de 17 centros españoles, es crucial para adquirir un conocimiento más profundo y preciso de las características clínicas y la evolución de la enfermedad. Este esfuerzo recopilatorio abordará una notable brecha en la literatura actual, proporcionando datos valiosos sobre la prevalencia de enfermedades autoinmunes, dis inmunes, linfoproliferativas y neoplasias en pacientes con IDCV, en el contexto específico de la población española.
2. La EPIGL es el mayor ejemplo de dis inmunidad presente en los pacientes con IDCV, pues cursa con fenómenos autoinmunes, se asocia a enteropatía y a una marcada linfoproliferación y granulomatosis a todos los niveles del organismo. No existe en la actualidad ningún marcador clínico, analítico o radiológico que permita predecir qué pacientes con IDCV desarrollan EPIGL, ya que los estudios que existen al respecto son escasos y contradictorios. Suponemos que la conjunción de una serie de variables clínicas, analíticas y/o radiológicas que puedan jugar un papel relevante o ser el reflejo de la patogenia de este proceso, podrían predecir de manera precoz el desarrollo de esta entidad en la población de pacientes con IDCV, pudiendo mejorar potencialmente su morbimortalidad y permitiendo identificación y tratamientos tempranos.
3. Se ha establecido que la microbiota intestinal juega un papel esencial en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. En el caso de la IDCV, se ha evidenciado una menor biodiversidad de especies y una mayor traslocación de bacterias gramnegativas. Por tanto, la detección de determinadas especies bacterianas tanto a nivel intestinal, como oral y pulmonar podría relacionarse con los diferentes fenotipos clínicos de IDCV, y por tanto servir como biomarcadores de la enfermedad o su pronóstico.

En conjunto, estas hipótesis describen una tríada de interrelaciones en la etiología de la IDCV: las características clínicas y evolutivas de la enfermedad en un contexto nacional, la relación entre la EPIGL y la IDCV como paradigma de dis inmunidad, y la influencia de la microbiota en la progresión y los fenotipos de la enfermedad con especial énfasis a los pacientes con manifestaciones no infecciosas. Esta síntesis de tres facetas distintas pero entrelazadas de la

IDCV propone una perspectiva más completa de la enfermedad y ofrece múltiples vías para futuras investigaciones y posibles intervenciones terapéuticas.

4.2. Objetivos

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es avanzar en la comprensión de la IDCV a través de tres vertientes interconectadas: primero, al establecer un registro multicéntrico nacional de pacientes con IDCV que proporcionará un panorama epidemiológico más amplio de la enfermedad en España; segundo, al caracterizar la EPIGL como modelo de dis inmunidad e hiperactivación del sistema inmunitario en pacientes con IDCV, y tercero, mediante el análisis y comparación de la taxonomía bacteriana a nivel fecal, salivar y pulmonar en pacientes con IDCV con y sin comorbilidad no infecciosa, para determinar la posible relación entre la microbiota y las manifestaciones dis inmunes de la enfermedad. Este enfoque integrado tiene como meta proporcionar una visión más completa de la IDCV, potencialmente revelando relaciones entre su prevalencia, la microbiota del paciente y la aparición de EPIGL, lo que permitirá identificar posibles factores de riesgo y guiar futuras intervenciones terapéuticas.

Para la consecución del objetivo principal se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar las posibles relaciones entre las características clínicas y el desarrollo de manifestaciones no infecciosas en una cohorte nacional de pacientes con IDCV.
2. Describir el manejo terapéutico llevado a cabo en los pacientes con IDCV y manifestaciones no infecciosas a nivel nacional.
3. Desarrollar una herramienta clínica predictiva basada en el análisis multiparamétrico de alteraciones analíticas, citométricas, radiológicas en pacientes con IDCV para facilitar la identificación temprana de pacientes con riesgo de desarrollo de EPIGL.
4. Comparar y analizar la microbiota fecal, oral y respiratoria en pacientes con IDCV y comorbilidad no infecciosa respecto a los pacientes con IDCV y comorbilidad exclusivamente infecciosa.
5. Valorar si la presencia de determinadas bacterias en esputo, heces y saliva de pacientes con IDCV podría definir el fenotipo dis inmune asociado a peor pronóstico.

MATERIAL y MÉTODOS

5.1. Estudio sobre el espectro clínico actual de la Inmunodeficiencia Común Variable en España: creación del registro multicéntrico nacional GTEM-SEMI-CVID

5.1.1. Diseño del estudio, escenario y población objetivo

En 2019 se creó un registro multicéntrico nacional para el estudio de pacientes diagnosticados de IDCV, diseñado por la Unidad de Inmunodeficiencias del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, y promovido a través del Grupo de Trabajo de Enfermedades Minoritarias (GTEM) dentro de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). El registro se llamó “GTEM-SEMI-CVID”.

Se invitó a los centros participantes a realizar la inclusión de pacientes durante un tiempo máximo de tres años. Así pues, en junio de 2022, con los datos aportados por dicho registro procedentes de 17 centros participantes españoles (pueden visualizarse en la **Tabla 7**), se diseñó el presente estudio de carácter transversal y multicéntrico.

Se consideró elegibles a todos los pacientes mayores de 16 años con diagnóstico de IDCV de acuerdo con la definición propuesta por la ESID (Seidel et al., 2019).

Tabla 7. Centros participantes en el registro GTEM-SEMI-CVID

Centro participante	Ciudad	Número de pacientes registrados
Hospital Universitario y Politécnico La Fe	Valencia	49
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol	Badalona	36
Hospital Universitari Bellvitge	Barcelona	34
Hospital Universitario Virgen de la Victoria	Málaga	29
Hospital Universitario La Paz	Madrid	21
Hospital General Universitario de Valencia	Valencia	19
Hospital Universitario Rafael Méndez	Lorca	17
Hospital Universitario de Cruces	Barakaldo	9
Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa	Zaragoza	8
Hospital Universitario Miguel Servet	Zaragoza	7
Hospital Universitario 12 de Octubre	Madrid	5
Hospital General de Castellón	Castellón	5
Hospital General de Alicante	Alicante	5
Complejo Asistencial de Ávila	Ávila	4
Hospital Universitario Santiago Ramón y Cajal	Madrid	3
Hospital de Alcorcón	Madrid	2
Hospital Universitario de Elche	Elche	1
Hospital Clínico Universitario de Valencia	Valencia	1

5.1.2. Recolección de datos

El registro GTEM-SEMI-CVID recoge datos sociodemográficos, epidemiológicos, genéticos, antecedentes infecciosos y no infecciosos, hallazgos de pruebas de imagen, de pruebas de laboratorio, hallazgos histopatológicos así como tratamientos recibidos y datos pronósticos, de una forma sistemática. Todos estos datos fueron aportados a partir de la revisión de las historias clínicas de los pacientes. A continuación se desglosan cada uno de estos parámetros:

- Datos **demográficos**: se incluyó el sexo y la edad de los pacientes en el momento de la inclusión, o la edad en el momento del fallecimiento; la edad diagnóstica y la edad al comienzo de los síntomas para calcular el retraso diagnóstico; el primer síntoma relacionado con su inmunodeficiencia primaria (infección, dis inmunidad, malignidad u otros), y el tiempo de seguimiento. También se incluyó de forma dicotómica la realización de estudio genético de inmunodeficiencias y su resultado, y la presencia de antecedentes familiares y/o historia de consanguinidad.
- Historial de **infecciones** bacterianas mayores, tales como neumonía, meningitis o encefalitis, osteomielitis, celulitis o infección de piel y partes blandas, infecciones de vía urinaria con fiebre, sepsis de cualquier origen o historial de infecciones oportunistas. También se recogieron datos sobre la presencia de infecciones de repetición (tres infecciones o más al año) de vía respiratoria alta, baja, de vía urinaria, de origen gastrointestinal, de piel y partes blandas o de cualquier otro origen.
- La comorbilidad no infecciosa se subdividió en varios apartados.
 - Por un lado, la historia de **citopenias autoinmunes** y el tipo de citopenia.
 - También se recogió la presencia de **linfadenopatías**, si se había realizado una biopsia adenopática y si cuál era el resultado histopatológico (granulomatosis, linfoproliferación benigna, linfoma u otros).
 - La presencia de **esplenomegalia** diagnosticada a partir de una prueba de imagen, así como la realización de análisis histopatológico y su resultado (granulomatosis, linfoproliferación benigna, linfoma u otros).
 - La historia de afectación **hepática**, incluyendo la presencia de hepatomegalia, de nódulos hepáticos en pruebas de imagen, de signos clínicos o radiológicos de hipertensión portal, y el resultado histopatológico en caso de haberse realizado biopsia hepática (hiperplasia nodular regenerativa, granulomatosis, linfoproliferación benigna, fibrosis u otros).
 - En cuanto a la afectación **pulmonar**, se recogieron datos sobre la presencia de disnea y tos crónica. También se documentó si el paciente se había realizado un

TCAR torácico y sus resultados: la afectación predominante (parenquimatosa, pleural, bronquial + pleural, parenquimatosa + pleural, bronquial + parenquimatosa, o no afectación); y dentro de cada afectación predominante, se especificó el tipo de afectación bronquial (bronquiectasias, engrosamiento difuso u otros), el tipo de afectación pleural (engrosamiento, derrame pleural u otros) y el tipo de afectación parenquimatosa (neumonía intersticial no especificada (NINE), neumopatía intersticial linfocítica (NIL), neumopatía intersticial alérgica (NIA), neumonitis obliterante (NO), bronquiolitis respiratoria asociada a EPI o EPIGL). También se registró la realización de biopsia pulmonar y su resultado histopatológico (EPIGL, granulomas, bronquiolitis, NIL, linfoma, combinación de los anteriores u otros). Además, se incluyó la realización de test de función respiratoria, especificando el resultado y la difusión pulmonar para el monóxido de carbono corregida (DLCOc).

- Sobre la afectación **gastrointestinal**, se recogió la presencia de dolor abdominal, diarrea crónica no infecciosa y malabsorción intestinal. Además, se documentó la presencia de *H. pylori*, anticuerpos de celiaquía, anticuerpos anti-CPG (célula parietal gástrica), anticuerpos anti-FI (factor intrínseco) y la realización y resultado del HLA *DQ2/DQ8*. También, se recogieron los resultados de la biopsia gastroduodenal, de intestino delgado y colon en caso de haberse realizado, a saber: la atrofia vellositaria, gastritis atrófica, hiperplasia nodular linfocítica, infiltrados linfocitarios submucosos, infiltrados eosinofílicos submucosos, ausencia de células plasmáticas, granulomatosis, enfermedad intestinal inflamatoria compatible con Crohn o colitis ulcerosa, colitis linfocitaria u otros.
- Se recogieron datos sobre antecedentes de riesgo **cardiovascular**, tales como historia de hipertensión arterial, dislipemia, hiperuricemia y diabetes mellitus de tipo 2. Además, se documentó la presencia de enfermedades cardiovasculares, como la insuficiencia cardíaca, enfermedad vascular cerebral, arteriopatía periférica, insuficiencia renal crónica y enfermedad tromboembólica. Se recogieron los datos de HDL (mg/dL), LDL (mg/dL) y triglicéridos (mg/dL) de la última analítica disponible.
- A nivel **cutáneo**, se documentó la historia de vitíligo, psoriasis, eccema, verrugas, alopecia u otros.
- En cuanto a la afectación **neurológica**, se recogieron datos sobre la presencia de lesiones desmielinizantes-like del SNC, meningitis linfocitaria, paquimeningitis, neuritis óptica, mielitis transversa, neuropatía periférica y se dejó un espacio abierto para especificar otras afectaciones neurológicas, si las hubiese.
- Se recogieron también datos sobre la presencia de patología **autoinmune o autoinflamatoria** asociada, tales como la presencia de diabetes mellitus tipo 1,

lupus, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica, espondiloartropatía seronegativa, vasculitis, miositis, así como un espacio abierto para especificar otras afectaciones sistémicas autoinmunes.

- En cuanto a las manifestaciones **oncológicas** asociadas a la IDCV, se recogió la presencia de adenocarcinoma gástrico, linfoma MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) gástrico, linfoma tipo Hodgkin o tipo no Hodgkin, leucemia, y se dejó un espacio abierto para especificar otras posibles afectaciones neurológicas.
 - Se recogieron también datos de parámetros analíticos **inmunológicos**, tales como la IgG (mg/dL), IgA (mg/dL), IgM (mg/dL) e IgE (mg/dL) al diagnóstico y el último parámetro valle disponible; el recuento de linfocitos totales, linfocitos CD3, linfocitos CD4, linfocitos CD8 y linfocitos CD19 (cél/mL) al diagnóstico y tras el tratamiento con inmunoglobulinas. Asimismo, se determinaron los últimos títulos disponibles de ANA, ANCA, ENAs, factor reumatoide, anticuerpos anti-citrulina, y si se había realizado un blot de miositis o de esclerosis sistémica, especificando su resultado.
- En cuanto al tratamiento **inmunosupresor**, se documentó la administración previa o actual de corticoides, antipalúdicos, azatioprina, micofenolato de mofetilo, metotrexate, ciclofosfamida, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, rituximab, belimumab, infliximab, etanercept, anakinra, tocilizumab y/o abatacept, dejando también un campo abierto titulado “otros” en caso de que se hubiese administrado algún otro tratamiento inmunosupresor no indicado previamente.
 - También se recogió si el paciente se encontraba en tratamiento con **inmunoglobulinas**, mediante qué vía de administración y qué tipo de preparado, así como su lugar de administración, su dosis habitual en gramos/semanales y la cadencia de administración (semanal, bisemanal, trisemanal o mensual).
 - Finalmente, se recogieron datos sobre la **mortalidad** de los pacientes, especificando si habían fallecido, cuál fue la causa y la edad en el momento de la muerte, y el tiempo de seguimiento hasta el fallecimiento.

5.1.3. Análisis estadístico

Debido al carácter epidemiológico y transversal del estudio, las variables se analizaron principalmente mediante estadística descriptiva. Los análisis y la realización de la iconografía estadística se llevaron a cabo con el software estadístico R versión 4.2.1 (R Development Core Team, 2022).

Los datos cuantitativos se expresaron como media y desviación estándar. Los datos cualitativos se expresaron como recuento absoluto y porcentaje de casos, sin tener en cuenta los valores no

disponibles. Para los subanálisis de las variables de interés, la significación se evaluó con la prueba de χ^2 o exacta de Fisher para variables categóricas y la prueba de la t de Student para variables continuas después de verificar los supuestos estadísticos pertinentes. Un p-valor por debajo de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

5.1.4. Declaración ética

El protocolo del Registro GTEM-SEMI-CVID se envió a todos los centros participantes y fue aprobado de forma independiente por todos los Comités de Ética de Investigación Clínica institucionales de cada hospital bajo sus códigos de registro correspondientes.

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitari i Politècnic La Fe como centro promotor, con código de registro GIC-GAM-2020-01 previa evaluación y autorización por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) con el mismo código de protocolo.

Se garantizó el anonimato y la confidencialidad de los datos de todos los pacientes incluidos de acuerdo con la normativa española de estudios observacionales. El trabajo se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y siguiendo las directrices de la Iniciativa STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology*) para la comunicación de estudios observacionales.

5.2. Identificación de parámetros clínicos, de laboratorio y de imagen para la predicción y diagnóstico de la Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica asociada a la Inmunodeficiencia Común Variable

5.2.1. Desarrollo general del trabajo, criterios de inclusión y criterios de exclusión

Para el desarrollo de este trabajo, se realizó un estudio retrospectivo mediante la revisión de las historias clínicas de los pacientes diagnosticados de IDCv que se encontraban en seguimiento por la Unidad de Inmunodeficiencias Primarias del Hospital Universitario y Politécnico La Fe desde el año 2000 hasta la actualidad. Este hospital atiende a una población de más de 300.000 habitantes dentro de los 5.000.000 de habitantes de la Comunidad Valenciana, y consta de 996 camas de ingreso hospitalario.

Todos aquellos pacientes diagnosticados de IDCv con una edad superior o igual a 18 años fueron seleccionados y estudiados. Inicialmente se revisó que dichos pacientes cumpliesen los

criterios diagnósticos de acuerdo con la definición establecida por la ESID (Seidel et al., 2019), para posteriormente poder ser incluidos en el estudio.

Los pacientes “**caso**” fueron definidos como aquellos pacientes con IDCV que presentaban un TC pulmonar de alta resolución con resultado radiológico compatible con EPIGL, que además fuese histopatológicamente confirmado con una biopsia realizada mediante toracoscopia video-asistida o biopsia transbronquial que excluyera la presencia de malignidad, junto con un lavado broncoalveolar que excluyese a su vez la presencia de neumonía de origen infeccioso. El diagnóstico final de EPIGL se estableció tras la revisión de cada caso en un comité multidisciplinar compuesto por un radiólogo torácico, un patólogo, un neumólogo y un internista especialista en inmunodeficiencias primarias.

Los pacientes “**controles**” fueron identificados como aquellos pacientes que cumpliesen criterios de IDCV y que no presentaran EPI. Se excluyó a todos los pacientes con IDCV y enfermedad pulmonar intersticial compatible con EPIGL no confirmada histopatológicamente.

En el momento de la inclusión en el estudio, tanto casos como controles debían presentar al menos un TCAR realizado, junto con una determinación de IgG, IgA, IgM al diagnóstico y previo a la administración de tratamiento inmunosupresor; y durante el seguimiento. También debían presentar una ecografía abdominal realizada, así como constar en la evolución clínica la presencia o no de malignidad, enteropatía, citopenia autoinmune y linfoproliferación en la evolución clínica de los pacientes, así como un análisis de las poblaciones linfocitarias B y T.

5.2.2. Recolección de los datos clínicos

Se recogieron los siguientes datos clínicos de cada paciente:

- Se recogió una aproximación **demográfica de los pacientes**, incluyendo la edad, el sexo y la fecha diagnóstica de IDCV.
- Los parámetros **clínicos** recogía la historia clínica de los pacientes y su comorbilidad: la presencia de diabetes mellitus de tipo 1, poliartritis, dermatitis, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica inmune, síndrome de Evans, la presencia de linfadenopatías generalizadas documentadas mediante TC o mediante tomografía por emisión de positrones (PET), la documentación de esplenomegalia (diámetro craneocaudal >12cm mediante ecografía abdominal o TC); hepatopatía (aumento de las transaminasas y/o hipertensión portal o imagen hepática anormal mediante ecografía o TC); el desarrollo de infecciones respiratorias de repetición (>3 al año); la presencia de enteropatía (diarrea crónica o hallazgos histológicos sugestivos de dicha enfermedad en ausencia de infección) y la historia de neoplasia sólida o hematológica.

- Los datos de **laboratorio** incluyeron la IgG (mg/dL), IgM (mg/dL), IgA (mg/dL), LDL (mg/dL), HDL (mg/dL), triglicéridos (mg/dL), el recuento de linfocitos CD4 (cél/uL), CD8 (cél/uL), CD19 (cél/uL), *natural killers* (cél/uL) y el ratio CD4/CD8 al diagnóstico. Para caracterizar el perfil lipídico de los pacientes, se investigó si habían recibido estatinas, fibratos y/o inhibidores de NPC1L1 o de PCSK9.
- Los parámetros **respiratorios** incluyeron datos de los tests de función respiratoria de los pacientes, datos radiológicos de los TCAR pulmonares y también, la objetivación del grado de disnea de acuerdo con la escala mMRC (*Modified Medical Council Scale*). Los datos de los tests de función respiratoria que se determinaron en el estudio fueron la capacidad vital forzada (FVC), el volumen de espiración forzada en el primer segundo de espiración (FEV1), la capacidad de difusión pulmonar del monóxido de carbono sin corregir y corregida (DLCO y DLCOc, respectivamente). A nivel radiológico, se usó la escala pulmonar Baumann para determinar la afectación pulmonar y su extensión. Las variables que usa dicha escala pueden visualizarse en la **Tabla 8**.
- También se recogieron datos sobre el **tratamiento** recibido por paciente, especialmente la dosis total administrada de Ig, su cadencia y su vía de administración. También se documentó si los pacientes habían recibido tratamiento inmunosupresor, indicando cuál era y su dosis de administración.

5.2.3. Aplicación de los scores clínicos a los TC pulmonares de alta resolución

Se revisó el TC pulmonar de alta resolución más reciente disponible para cada paciente, antes de que el paciente recibiera tratamiento inmunosupresor para la EPIGL. Se descartaron aquellos TC en los que hubiera una presencia elevada de artefactos de movimiento, en los que existiera neumotórax, derrame pleural significativo o en el que no se visualizaran completamente los pulmones.

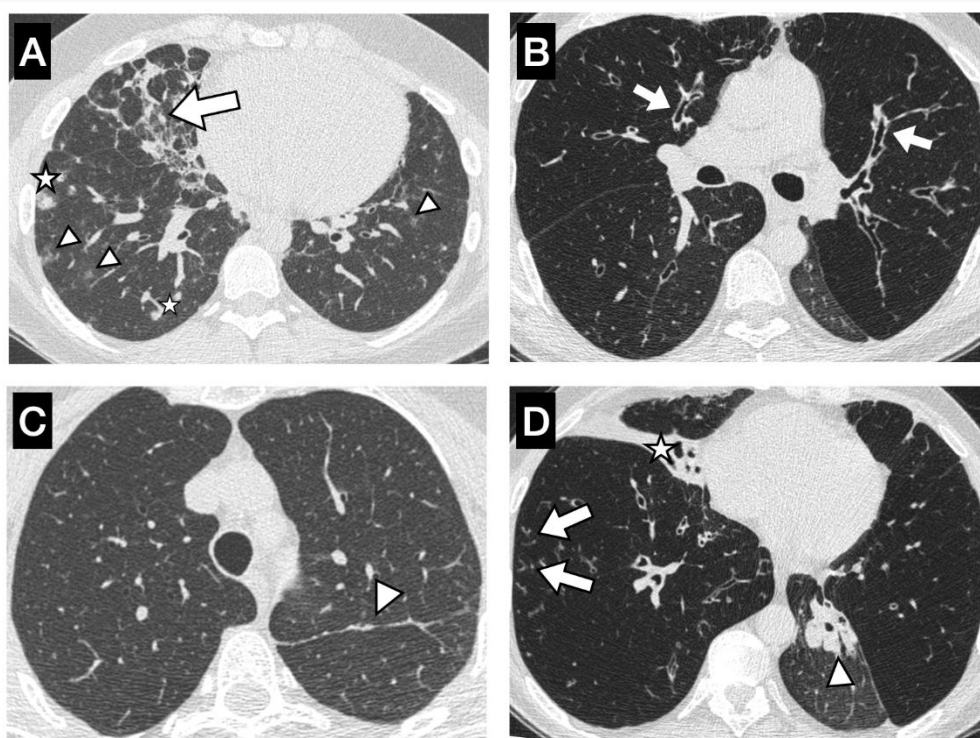
Las imágenes fueron analizadas mediante el software *RadiAnt DICOM viewer* versión 2021.1 (Medixant, Poznan, Polonia). Se calculó el score compuesto de Baumann, desarrollado por el *Chest CT Antibody Deficiency Group* (Schutz K et al., 2019) para cada paciente. Los ítems que valora el score compuesto de Baumann pueden visualizarse en la **Tabla 8**. En este score, se valoran 13 anormalidades pulmonares diferentes, así como su extensión, generando un total de 22 ítems a valorar por cada TC pulmonar. El score compuesto para la valoración de la EPIGL es la suma de los siguientes componentes:

- Número de lóbulos afectados por opacidades pulmonares en vidrio deslustrado
- Opacidades en vidrio deslustrado debidas a fibrosis o inflamación

- Número de lóbulos afectados con nódulos menores de 5mm
- Número de lóbulos afectados con nódulos de entre 5mm y 10mm
- Número de lóbulos afectados con nódulos mayores de 10mm
- Número de lóbulos afectados con reticulaciones
- Predominancia de líneas reticulares

Cada TCAR fue analizado por un especialista en radiología torácica y a su vez, por un neumólogo entrenado en TC pulmonar (**Figura 9**). El análisis fue doble ciego, y se comparó la puntuación percibida por cada ítem entre ambos especialistas. Para ello, se determinaron los intervalos de confianza y se usó el coeficiente kappa Cohen (κ), valorando la concordancia en la evaluación radiológica del score compuesto Baumann-EPIGL.

Figura 9. TC de tórax de 4 pacientes diferentes del estudio detallando la evaluación de parámetros radiológicos del score Baumann



A: paciente con EPIGL con múltiples nódulos bilaterales en vidrio deslustrado <5 mm (puntas de flecha), nódulos sólidos (estrellas) y líneas mixtas (inflamatorias y fibróticas) (flecha).

B: Paciente sin EPIGL con engrosamiento difuso de la pared bronquial leve y bronquiectasias leves (flechas) con atrapamiento de aire predominantemente en los lóbulos superiores y atelectasia parcial del lóbulo inferior izquierdo.

C: paciente sin EPIGL con banda parenquimatosa lineal en el lóbulo superior izquierdo (punta de flecha).

D: paciente sin EPIGL con taponamiento mucoso en las vías respiratorias grandes del lóbulo inferior izquierdo con >50 % de atelectasia del mismo lóbulo (flechas), atelectasia completa del lóbulo medio (estrella), patrón de árbol en brote en el lóbulo inferior derecho (flechas) y atrapamiento de aire en los lóbulos superior izquierdo e inferior derecho.

Tabla 8. Variables consideradas en el score radiológico de Baumann

Ítem	Definición	Puntuación
Número de lóbulos con:		
- Engrosamiento de pared bronquial - Bronquiectasias - Moco en vía aérea superior - Moco en vía aérea inferior - Atelectasias - Nódulos <5 mm - Nódulos >5 - <10 mm - Nódulos >10 mm - Líneas - Consolidación - Cicatrices lineares y bandas - Opacidades en vidrio deslustrado - Quistes - Enfisema o bullas	Número de lóbulos	0-6
Gravedad de:		
El engrosamiento de la pared bronquial más engrosada	0 = ninguno 1 = $PB < 0.5 \times V$ 2 = $0.5 \times V < PB < V$ 3 = $PB > V$	0-3
Bronquiectasia de mayor tamaño	0 = ninguno 1 = $B < 2 \times V$ 2 = $2 \times V < B < 3 \times V$ 3 = $B > 3 \times V$	0-3
Mecanismos patológicos de:		
Causa de opacidades en vidrio deslustrado	0 = Fibrosis, 1 = Inflamación	0-1
Tipo de líneas predominante	0 = Inflamación 1 = Fibrosis 2 = Tipo mixto	0-2
Presencia de:		
- Atrapamiento aéreo inspiratorio - Atrapamiento aéreo espiratorio - Linfadenopatía hiliar mediastínica	0 = No 1 = Sí	0-1
Tamaño de:		
Linfadenopatía hiliar mediastínica	Tamaño (eje corto) de la mayor adenopatía	milímetros

B, lumen bronquial; PB, pared bronquial; V, vaso acompañante

5.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con la colaboración del Departamento de Data Science, bioestadística y bioinformática del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Para ello, se usó el programa estadístico R versión 4.0.5 (R Core Team).

Se realizó un análisis descriptivo para resumir las características clínicas de los pacientes. Las variables cuantitativas se expresaron como la media y desviación estándar. Las variables cualitativas se expresaron como el recuento absoluto y como porcentaje de casos. Se realizaron análisis univariantes para describir las diferencias epidemiológicas entre ambos grupos, pero no para realizar el análisis predictivo, ya que este tipo de inferencia está sujeta a errores de tipo I y II así como a sesgos de confusión. El test χ^2 o test exacto de Fisher se usó para analizar la normalidad de las variables categóricas y el test de T de Student se usó para valorar la normalidad de las variables continuas, especialmente a fin de asegurar la ausencia de diferencias significativas en la demografía de ambas poblaciones. Se usaron gráficos Q-Q para valorar gráficamente la normalidad. Un p-valor menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Debido al escaso tamaño muestral inherente a la naturaleza de la enfermedad, y a sus esperables amplios intervalos de confianza, se seleccionaron las variables predictivas de acuerdo con el método de selección de variables *elastic net* mediante el *glmnet package* según los datos previamente publicados (Friedman et al., 2010). Se usó el método *elastic net* debido al escaso número de observaciones con un relativamente elevado número de predictores, así como por la incrementada colinealidad y la dimensionalidad de los datos. Este método supera a los métodos *lasso* y *ridge*, y se ha demostrado útil en la selección de variables, fomentando un efecto de agrupación donde los predictores fuertemente correlacionados tienden a estar dentro o fuera del modelo juntos (Zou et al., 2005). La cantidad de regularización fue determinada por el parámetro de regularización λ . Pese a suponer una ausencia de significatividad estadística debido a los esperablemente amplios intervalos de confianza, se incluyeron las variables en el modelo. Se realizó una regresión Bayesiana con las variables finalmente elegidas para considerar conjuntamente la relación de las variables entre ellas y en la predicción del efecto. La capacidad predictiva del modelo se estimó mediante el área bajo la curva (AUC en inglés) de las curvas ROC (*receiver operating characteristic curve*), eligiéndose el mejor modelo que combinara parámetros clínicos, de laboratorio y radiológicos. Se realizó una validación interna del modelo mediante la técnica *bootstrap*, usando más de 500 muestras *bootstrap* generadas.

Finalmente, con estos datos, se construyó un nomograma para representar gráficamente la probabilidad de EPIGL, integrando las variables finalmente seleccionadas en el modelo.

5.2.5. Declaración ética

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitari i Politècnic La Fe con código de registro 2020-359-1 y se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

5.3. Estudio de la microbiota asociada a los diferentes fenotipos clínicos y a la dis inmunidad en la Inmunodeficiencia Común Variable

5.3.1. Pacientes y recolección de datos

Se realizó un estudio transversal que incluyó pacientes con diagnóstico de IDCv seguidos en la Unidad de Inmunodeficiencias Primarias del Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Mediante revisión retrospectiva de historias clínicas electrónicas, se analizaron variables clínicas, de laboratorio y relativas a pruebas de imagen. Finalmente, se consideraron elegibles 41 pacientes con diagnóstico de IDCv mayores de 18 años en seguimiento por dicha unidad. Todos los pacientes inicialmente seleccionados fueron evaluados para confirmar el diagnóstico de IDCv de acuerdo con las definiciones de trabajo del registro de la ESID (Seidel et al., 2019) para su inclusión final en el estudio.

Las variables demográficas recogidas y analizadas incluyeron el sexo, la edad y la fecha de diagnóstico de los pacientes. Los parámetros clínicos incluyeron la historia de diabetes mellitus tipo 1, AHAI, PTI, síndrome de Evans, linfadenopatías generalizadas presentes en TC de tórax o PET-TC realizados, presencia de EPIGL diagnosticada y confirmada mediante biopsia pulmonar, esplenomegalia diagnosticada mediante ecografía o TC, hepatopatía (elevación de las enzimas hepáticas, hallazgos de imagen anormales en ecografía o TC, o evidencia de hipertensión portal), enteropatía (diarrea crónica o hallazgos histopatológicos anormales en biopsias intestinales) y presencia de tumores sólidos y hematológicos. Las variables de laboratorio incluyeron los niveles de IgG (mg/dL), IgM (mg/dL), IgA (mg/dL), recuento de células CD4⁺ (células/ μ L), recuento de células CD8⁺ (células/ μ L), relación CD4/CD8, recuento de células CD19⁺ (células/ μ L) y recuento de células NK (células/ μ L) al diagnóstico.

Las definiciones de las variables fueron superponibles a las descritas en el apartado 1.2. del estudio sobre el espectro clínico actual de la IDCv en España: creación del registro multicéntrico nacional GTEM-SEMI-CVID.

Según los parámetros clínicos y siguiendo la clasificación de Chapel et al., los pacientes se clasificaron en dos fenotipos clínicos distintos (Chapel et al., 2012). Veinticinco pacientes con IDCv tenían antecedentes de AHAI, PTI, síndrome de Evans, EPIGL, adenopatías no

infecciosas, hepatopatía, esplenomegalia, enteropatía crónica no infecciosa y/o malignidad sólida o hematológica y, por lo tanto, se clasificaron como "IDCV disimmune". Hasta la fecha de inclusión, los otros 16 pacientes con IDCV no habían presentado ninguna patología disimmune y solo habían desarrollado infecciones. Por lo tanto, fueron clasificados como "IDCV con sólo infecciones".

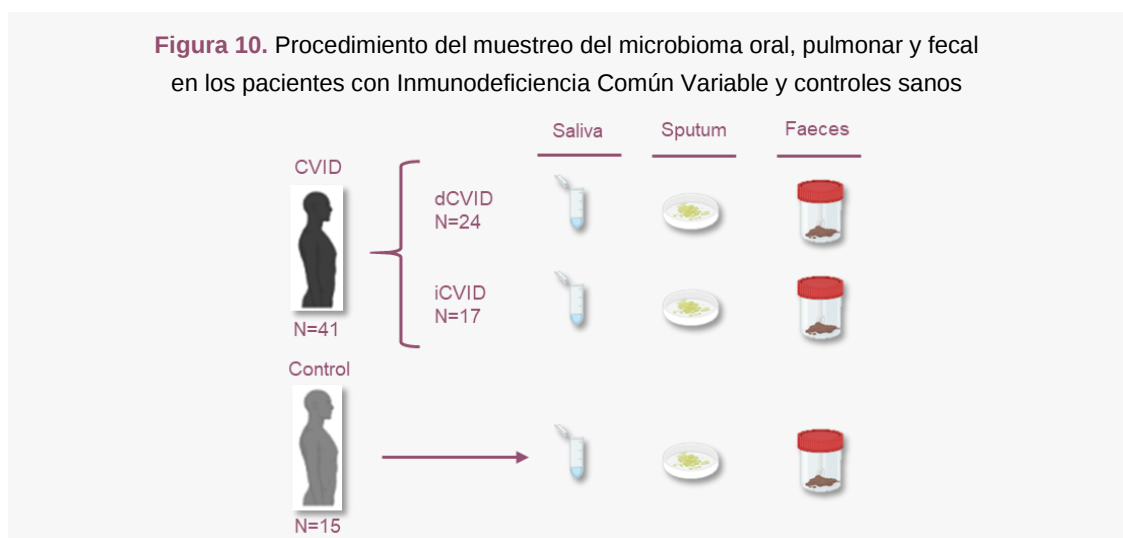
Además, se obtuvieron también muestras de 15 personas sanas no convivientes y sin historia de patología de inmunodeficiencia, enfermedad autoinmune y sin tratamiento actual para ninguna enfermedad.

5.3.2. Muestreo

Se recogieron muestras de 41 pacientes diagnosticados con IDCV y de 15 donantes sanos. Los controles no debían presentar lesiones cariógicas activas diagnosticadas en el momento de la inclusión. Se excluyeron los pacientes con antecedente de toma de antibióticos distintos a cotrimoxazol o azitromicina en regímenes profilácticos 1 mes antes de su inclusión en el estudio y recogida de las muestras. Ningún control tenía antecedente de toma de antibióticos el intervalo de tiempo contemplado.

Por cada participante se obtuvo una muestra oral, una muestra de esputo y una muestra fecal (**Figura 10**). En el muestreo oral, se tomó aproximadamente una muestra estandarizada de 1 mL de saliva no estimulada después de tres minutos de salivación siguiendo la metodología descrita por Simon-Soro et al., (2013). En cuanto a las muestras respiratorias, se recogió por cada participante una muestra de 1 mL de esputo no inducido después de realizar entrenamiento respiración profunda y tos intensa hasta obtención del volumen seleccionado (Data et al., 2019). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el proceso de extracción de ADN (**Figura 11**). Para el muestreo fecal, se recogieron 5 mL de heces que fueron almacenadas en frascos estériles con una solución de 5mL de RNAlater®, a fin de preservar el material genético hasta su análisis.

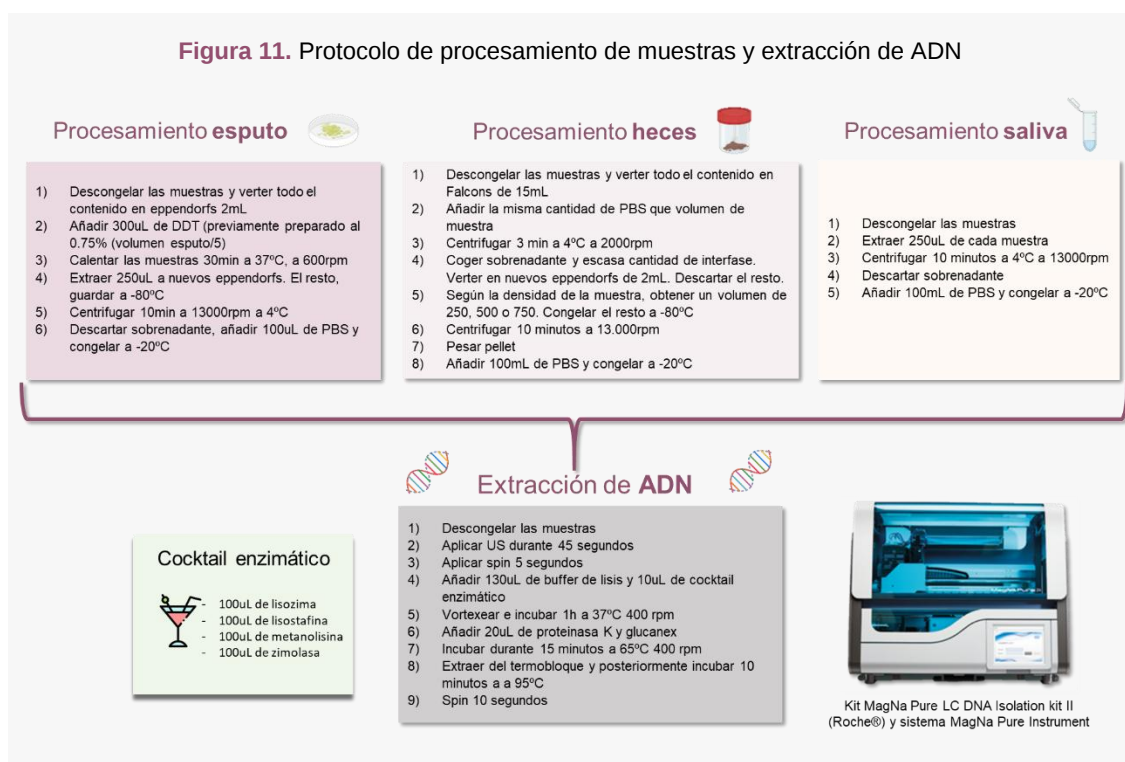
Figura 10. Procedimiento del muestreo del microbioma oral, pulmonar y fecal en los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable y controles sanos



5.3.3. Extracción de ADN

El proceso de extracción de ADN se realizó con el kit MagNa Pure LC DNA Isolation kit II (Roche®) y el sistema MagNa Pure Instrument. Las muestras se lisaron usando ciclos de ultrasonidos de 3 x 10 segundos. Se realizó la digestión enzimática de las muestras mediante un cóctel de enzimas de lisostafina (5 kU/mL), lisozima (100 mg/mL) y mutanolisina (2,5 kU/mL), seguido de la degradación proteica mediante proteinasa K (Rosier et al., 2010).

A continuación se presenta el protocolo de extracción de ADN seguido por los investigadores en la **Figura 11**.



Después de la extracción, se estimó la concentración de ADN con el kit de ensayo Quant-It™ PicoGreen® dsDNA y un fluorómetro Qubit™ 3 (ThermoScientific). Las regiones hipervariables V3-V4 se amplificaron con los cebadores universales del gen 16S rRNA Forward (CCTACGGGNGGCWGCAG) y V3-V4 Reverse (GACTACHVGGGTATCTAATCC) optimizados para la secuenciación Illumina siguiendo el procedimiento descrito por Dzidic et al., (2018). Se utilizó el equipo Illumina Miseq para la secuenciación de alto rendimiento y se construyó una biblioteca siguiendo el 16s rRNA gene Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina (Parte #15,044,223 Rev. A). El procedimiento se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Instituto FISABIO (Valencia) utilizando el Protocolo 2x300bp *paired-end* Illumina.

5.3.4. Análisis bioinformático y estadístico

En primer lugar, para la comparación de las características clínicas de los participantes, se utilizaron las pruebas de Fisher y ANOVA después de comprobar los supuestos de normalidad con gráficos Q-Q y la igualdad de varianzas con la prueba de Levene.

A fin de filtrar, recortar, eliminar ruido y fusionar lecturas emparejadas se usó el software Dada2 v1.16 utilizando parámetros predeterminados (Callahan et al., 2016). Se filtraron los adaptadores las lecturas de secuencias, que se recortaron posteriormente en ventanas de 10 pares de bases con ausencia de Ns y valores de calidad <35. Se eliminaron los singletons excepto para calcular los índices de riqueza y diversidad. El resto de las lecturas se fusionaron, agruparon y limpiaron. Las secuencias de alta calidad se transfirieron al análisis de *pipeline* Dada2. Finalmente, se las asignó tanto a variantes de secuencia de amplicón (ASV) como a nivel de especie utilizando la base de datos no redundante SILVA v138.1 (Quast et al., 2013).

Para realizar el análisis *downstream*, se utilizó el software estadístico R. Se eliminaron aquellos géneros que mostraron una abundancia inferior a <0,01%. Los análisis multivariante se llevaron a cabo mediante la prueba Adonis (*Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices*), proporcionado por la biblioteca Vegan de R (Oksanen et al., 2015).

Además, los datos de 16S se normalizaron y compararon mediante la prueba ANCOM-BC (o Análisis de composiciones de microbiomas con corrección de sesgo) (Lin y Peddada, 2020), y los índices de diversidad se compararon mediante la prueba de Wilcoxon. El taxón con una abundancia menor que el valor de abundancia más cercano a cero en los grupos comparados multiplicado por cuatro en menos del 60 % de las muestras se eliminó del ANCOM-BC.

Para finalizar, con el objetivo de analizar interacciones complejas entre biomarcadores bacterianos y determinar la cantidad de bacterias necesarias para discriminar eficientemente entre los grupos de pacientes, se llevó a cabo un análisis de tipo *random forest*. Utilizamos el algoritmo de *bootstrap* implementado en la biblioteca Boruta de R para seleccionar dichos biomarcadores bacterianos (Havdsed et al., 2021). La precisión de los modelos se evaluó por los valores del AUC, utilizando combinaciones de 30 o menos bacterias con las mejores puntuaciones, y se seleccionó el menor número de bacterias con mayor capacidad predictiva. Este análisis se realizó tanto para biomarcadores a nivel de género (a través de ASVs) como de especie.

5.3.5. Declaración ética

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Instituto de Investigaciones Sanitarias La Fe con código de registro 2020-376-1 y se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS

6.1. Estudio sobre el espectro clínico actual de la Inmunodeficiencia Común Variable en España: creación del registro multicéntrico nacional GTEM-SEMI-CVID

Resumen en castellano:

La IDCV constituye un grupo heterogéneo de trastornos de inmunodeficiencia primaria con un amplio espectro clínico. La morbilidad no infecciosa asociada a IDCV se ha convertido en un desafío importante que requiere una comprensión completa de su fisiopatología y su importancia clínica y variabilidad global, especialmente considerando la amplia heterogeneidad clínica, genética y regional de los trastornos de IDCV. Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un estudio retrospectivo multicéntrico a nivel nacional durante un período de 3 años que describiera las características epidemiológicas, clínicas, de laboratorio, terapéuticas y pronósticas de 250 pacientes con IDCV en España.

El retraso diagnóstico medio fue de unos 10 años y la mayoría de los pacientes presentaron inicialmente complicaciones infecciosas seguidas de trastornos inmunitarios no infecciosos.

Sin embargo, las enfermedades infecciosas no supusieron la principal causa de morbimortalidad. La enfermedad pulmonar no infecciosa fue extraordinariamente frecuente en nuestro registro, afectando aproximadamente al 60% de los pacientes. Las bronquiectasias fueron el hallazgo de imagen más frecuente (35%) en consonancia con estudios previos. A pesar de la alta prevalencia de enfermedad pulmonar, menos del 65% de los pacientes incluidos en la cohorte se habían sometido en el momento de su inclusión en el registro a una TCAR. Esto sugiere que algunos pacientes con afectación subclínica pueden haber sido infradiagnosticados en nuestra cohorte, ya que solo alrededor del 20% presentó manifestaciones clínicas respiratorias como tos o disnea. De acuerdo con esto, la EPIGL confirmada histológicamente solo se observó en 17 pacientes; una prevalencia notablemente menor a la esperada según la evidencia previa. Esto enfatiza la necesidad de una mayor búsqueda activa de enfermedad pulmonar crónica en el seguimiento de estos pacientes a pesar de ser asintomáticos o paucisintomáticos, ya que se ha asociado con peores resultados clínicos.

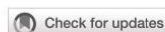
Más de un tercio de los pacientes de nuestra cohorte presentaron adenopatías y esplenomegalia en su seguimiento, y en torno a un 33% presentaron citopenias inmunes, especialmente síndrome de Evans. Se observó enfermedad gastrointestinal en más del 40% de los pacientes. Entre los órganos biopsiados en nuestra cohorte, la linfoproliferación benigna fue la principal alteración histopatológica. Estos resultados concuerdan con la creciente evidencia que respalda la linfoproliferación benigna diseminada y la infiltración como una de las principales características de la inmunidad anormal en pacientes con IDCV, lo que puede resultar en disfunción orgánica en diferentes niveles.

Superando el 15%, la prevalencia global de cáncer en nuestro registro fue una de las más altas reportadas hasta la fecha, siendo el linfoma no Hodgkin B el más frecuente. A pesar de la disminución de la incidencia de cáncer gástrico en informes más antiguos, la prevalencia del 2% en esta serie es significativamente mayor en comparación con otros estudios recientes. El hecho de que se haya determinado aproximadamente la presencia de *H. pylori* en la mitad de los pacientes puede haber contribuido a estas cifras más altas, y pone de manifiesto la necesidad de realizar pruebas de detección periódicas y de forma sistemática de esta infección en todos los pacientes con IDCV.

Este es el primer estudio multicéntrico de ámbito nacional sobre pacientes con IDCV en España, que incluye hospitales de referencia tanto de segundo como de tercer nivel. Los datos que aporta este trabajo subrayan la necesidad de desarrollar guías nacionales para optimizar el diagnóstico y manejo de estos pacientes. Las complicaciones dis inmunes crónicas se han convertido en la principal causa de morbilidad y mortalidad después de la introducción de las inmunoglobulinas, y representan un gran desafío para los médicos que tratan las IDP. La falta de tratamientos efectivos y el uso de inmunosupresores para el manejo de estos trastornos enfatiza la importancia de la investigación básica y traslacional que profundice en las vías fisiopatológicas involucradas en la desregulación inmune y la infiltración linfocítica difusa. Esto revelaría nuevas estrategias personalizadas para reducir las complicaciones inmunitarias, la carga de atención médica asociada y garantizar una mejor calidad de vida para los pacientes con IDCV.

Este artículo fue publicado en la revista **Frontiers in Immunology**:

Cabañero-Navalon MD, Garcia-Bustos V, Nuñez-Beltran M, et al. Current clinical spectrum of common variable immunodeficiency in Spain: The multicentric nationwide GTEM-SEMI-CVID registry. *Front Immunol.* 2022 Oct 28;13:1033666. doi: 10.3389/fimmu.2022.1033666.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Hans-Hartmut Peter,
University of Freiburg Medical Center,
Germany

REVIEWED BY
Ulrich Salzer,
University of Freiburg Medical Center,
Germany
Jacqueline Kerr,
Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Germany

*CORRESPONDENCE
Victor Garcia-Bustos
victorgarciabustos@gmail.com

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Primary Immunodeficiencies,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 31 August 2022

ACCEPTED 11 October 2022

PUBLISHED 28 October 2022

CITATION
Cabañero-Navalon MD, Garcia-
Bustos V, Nuñez-Beltran M,
Císcar Fernández P, Mateu L,
Solanich X, Carrillo-Linares JL,
Robles-Marhuenda A,
Puchades-Gimeno F, Pelaez Ballesta A,
López-Osle N, Torralba-Cabeza MA,
Bielsa Masdeu AM, Diego Gil J,
Tornador Gaya N, Pascual
Castellanos G, Sánchez-Martínez R,
Barragán-Casas JM, González-
García A, Patier de la Peña JL,
López-Wolf D, Mora Rufete A,
Canovas Mora A, Forner Giner MJ and
Moral Moral P (2022) Current clinical
spectrum of common variable
immunodeficiency in Spain: The
multicentric nationwide GTEM-SEMI-
CVID registry.
Front. Immunol. 13:1033666.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1033666

Current clinical spectrum of common variable immunodeficiency in Spain: The multicentric nationwide GTEM-SEMI-CVID registry

Marta Dafne Cabañero-Navalon¹, Victor Garcia-Bustos^{1*},
Maria Nuñez-Beltran¹, Pascual Císcar Fernández¹,
Lourdes Mateu², Xavier Solanich³,
Juan Luis Carrillo-Linares⁴, Ángel Robles-Marhuenda⁵,
Francesc Puchades-Gimeno⁶, Ana Pelaez Ballesta⁷,
Nuria López-Osle⁸, Miguel Ángel Torralba-Cabeza⁹,
Ana María Bielsa Masdeu¹⁰, Jorge Diego Gil¹¹,
Nuria Tornador Gaya¹², Guillem Pascual Castellanos¹²,
Rosario Sánchez-Martínez¹³, José Manuel Barragán-Casas¹⁴,
Andrés González-García¹⁵, José Luís Patier de la Peña¹⁵,
Daniel López-Wolf¹⁶, Antonia Mora Rufete¹⁷,
Alba Canovas Mora¹⁷, Maria José Forner Giner¹⁸
and Pedro Moral Moral¹

¹Department of Internal Medicine, University and Polytechnic Hospital LaFe, Valencia, Spain,

²Department of Internal Medicine, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain,

³Department of Internal Medicine, Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain, ⁴Department of

Internal Medicine, Virgen de la Victoria University Hospital, Málaga, Spain, ⁵Department of Internal

Medicine, La Paz University Hospital, Madrid, Madrid, Spain, ⁶Department of Internal Medicine,

University General Hospital of Valencia, Valencia, Spain, ⁷Department of Internal Medicine, Rafael

Méndez University Hospital, Murcia, Spain, ⁸Department of Internal Medicine, Cruces University

Hospital, Bizkaia, Spain, ⁹Department of Internal Medicine, Lozano Blesa University Clinical Hospital,

Zaragoza, Spain, ¹⁰Department of Internal Medicine, Miguel Servet University Hospital,

Zaragoza, Spain, ¹¹Department of Internal Medicine, University Hospital October 12,

Madrid, Spain, ¹²Department of Internal Medicine, University General Hospital of Castellón,

Castellón, Spain, ¹³Department of Internal Medicine, University General Hospital of Alicante,

Alicante, Spain, ¹⁴Department of Internal Medicine, Complejo Asistencial de Ávila,

Ávila, Spain, ¹⁵Department of Internal Medicine, Santiago Ramón y Cajal University Hospital, Madrid,

Spain, ¹⁶Department of Internal Medicine, University Hospital Alcorcón Foundation, Madrid, Spain,

¹⁷Department of Internal Medicine, General University Hospital of Elche, Alicante, Spain,

¹⁸Department of Internal Medicine, Clinical University Hospital of Valencia, Valencia, Spain

Common variable immunodeficiency (CVID) constitutes a heterogenic group of primary immunodeficiency disorders with a wide-ranging clinical spectrum. CVID-associated non-infectious morbidity constitutes a major challenge requiring a full understanding of its pathophysiology and its clinical importance and global variability, especially considering the broad clinical, genetic, and regional heterogeneity of CVID disorders. This work aimed to

develop a nationwide, multicenter, retrospective study over a 3-year period describing epidemiological, clinical, laboratory, therapeutic, and prognostic features of 250 CVID patients in Spain. The mean diagnostic delay was around 10 years and most patients initially presented with infectious complications followed by non-infectious immune disorders. However, infectious diseases were not the main cause of morbimortality. Non-infectious lung disease was extraordinarily frequent in our registry affecting approximately 60% of the patients. More than one-third of the patients in our cohort showed lymphadenopathies and splenomegaly in their follow-up, and more than 33% presented immune cytopenias, especially Evans' syndrome. Gastrointestinal disease was observed in more than 40% of the patients. Among biopsied organs in our cohort, benign lymphoproliferation was the principal histopathological alteration. Reaching 15.26%, the global prevalence of cancer in our registry was one of the highest reported to date, with non-Hodgkin B lymphoma being the most frequent. These data emphasize the importance of basic and translational research delving into the pathophysiological pathways involved in immune dysregulation and diffuse lymphocytic infiltration. This would reveal new tailored strategies to reduce immune complications, and the associated healthcare burden, and ensure a better quality of life for CVID patients.

KEYWORDS

common variable immunodeficiency, CVID, cohort, dysimmunity, immune dysregulation, lymphoproliferation

Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) constitutes a heterogenic group of primary immunodeficiency disorders (PID) with an estimated prevalence of 1:50.000 – 1:25.000 (1–3). It is characterized by decreased levels of serum IgG, together with decreased IgM and/or IgA, and it can be diagnosed after excluding secondary causes of hypogammaglobulinemia and other primary immunodeficiencies (1, 2). Infectious diseases were its main cause of morbidity and mortality until the introduction of immunoglobulin replacement therapy (IgRT) in the late 20th century. Due to this treatment, non-infectious complications such as autoimmune, benign lymphoproliferative disorders, and even cancer have emerged as comorbidities with a larger impact on prognosis than infections (4). These dysimmune phenomena may affect up to 70% of patients (5, 6) and imply an 11-fold increased risk of death (5, 7). In fact, IgRT does not seem to prevent or improve many of these conditions (5).

Therefore, the clinical spectrum of CVID is wide-ranging. Back in 2008, Chapel et al. already described five clinical phenotypes of CVID: those that showed polyclonal lymphocytic infiltration, those with autoimmune diseases, those that developed enteropathy, those showing malignant

neoplasia, and those only suffering infectious diseases (8). These non-infectious phenomena can be the first symptom of CVID disease in some patients (9) or can appear over time. Polyclonal infiltration may affect lymph nodes, liver, spleen, skin, or lung -causing the well-known granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD)- although every organ might be virtually infiltrated (10). The most common autoimmune complications are blood cytopenias. Nevertheless, almost every autoimmune disease has been described in association with CVID (7, 11). Some patients with CVID present with non-infectious inflammatory gastrointestinal disease resulting in diarrhea, malabsorption, and weight loss (12). Additionally, hematologic, and solid organ malignancies have been more frequently described in CVID than in the rest of PIDs and are associated with poorer outcomes (4, 13).

Thus, CVID-associated non-infectious morbidity constitutes a major challenge requiring a full understanding of its pathophysiology and its clinical importance and variability worldwide, especially considering the wide clinical, genetic, and even regional heterogeneity of CVID disorders. Moreover, many of these complications might be part of a common altered immunological substrate resulting in a complex multisystemic disease that needs to be further characterized (14). The development of standardized targeted therapies is also required,

as IgRT only plays a role in preventing infectious disorders. The use of other anti-inflammatory or immunosuppressant agents for immune complications is not exempt from serious adverse effects in these already immunocompromised patients and lacks a wide body of evidence (15).

Consequently, registries and large cohort studies are needed in order to provide an updated epidemiological overview of the clinical spectrum of CVID with less biased results considering high variability and even regional diversity of these disorders. The aim of this work was to develop a nationwide, multicenter, retrospective study over a 3-year period describing epidemiological, clinical, laboratory, therapeutic, and prognostic features of CVID patients in Spain.

Material and methods

Study design, setting, and population

A multicenter, cross-sectional, nationwide study of patients diagnosed with CVID was carried out in Spain from November 2019 to May 2022. A total of 17 hospitals treating PIDs participated in the creation of the GTEM-SEMI-CVID-Registry promoted by the Working Group of Minority Diseases of the Spanish Society of Internal Medicine (GTEM-SEMI). All patients aged 16 years and above with CVID diagnosis according to the European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry working definitions (2) and who were or had been followed up by the participating units were considered eligible. By protocol, all selected patients for inclusion were initially screened to confirm CVID diagnosis according to the consensus ESID criteria, and patients with definite monogenic immunodeficiencies were not eligible for inclusion at the time of data collection.

Data collection and variables

The GTEM-SEMI-CVID-Registry systematically compiles sociodemographic and epidemiological data, genetic information, infectious and non-infectious comorbidities, imaging findings, laboratory and histopathological parameters, treatments, and patient outcomes. All data were collected by reviewing electronic medical records and included in a predesigned database.

Demographic data included sex, current age, or age at the time of death, age at diagnosis, age at clinical onset, diagnostic delay, first PID-related clinical complication (infection, dysimmunity, malignancy, or other), and time of follow-up. Genetic testing, family history, and consanguinity were recorded. All described genes with variants not listed under CVID and attributable to defined monogenic PIDs were compulsorily those of 'uncertain significance' or 'likely benign',

according to the Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.

History of major bacterial infections, opportunistic, and recurrent infections were collected, including chronic Epstein-Barr virus (EBV) and *Helicobacter pylori* infections. Non-infectious comorbidities included autoimmune cytopenias, lymphadenopathies, splenomegaly, hepatomegaly, and clinical or imaging findings of portal hypertension, systemic autoimmune disorders, lung, gastrointestinal, cutaneous, and neurological involvement, as well as cardiovascular comorbidity and malignancy (both solid and hematological neoplasia). Furthermore, clinical symptoms such as chronic cough, dyspnea, chronic diarrhea, and abdominal pain were recorded. Chronic enteropathy was considered, if the presence of chronic diarrhea, and/or diagnosed malabsorption were recorded in absence of documented infection.

Imaging findings were limited to chest CT scanning due to frequent and potentially severe lung involvement in CVID and according to the follow-up recommendations of the British Society for Immunology/United Kingdom Primary Immunodeficiency Network Consensus on managing non-infectious complications of CVID (16). Additionally, and following previous recommendations, lung function tests (LFT) and values of corrected diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide (cDLCO) were also considered.

Laboratory variables included IgG (mg/dL), IgM (mg/dL), IgA (mg/dL), CD4 cell count (cell/ μ L), CD8 cell count (cell/ μ L), CD4/CD8 ratio, CD19 cell count (cell/ μ L), CD3 cell count (cell/ μ L), and natural killers (NK) cell count (cell/ μ L) both at diagnosis and last determination after treatment, first available LDL (mg/dL), HDL (mg/dL), triglycerides levels (mg/dL), positivity at any point of autoantibodies such as antinuclear antibodies (ANA) -only if titres exceed 1/80-, extractable nuclear antigens (ENA), rheumatoid factor (RF), antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), and myositis-related and systemic sclerosis-related antibodies. Due to the high prevalence of bowel disease, positivity at any point of coeliac-related antibodies, intrinsic factor, and gastric parietal cells antibodies (GPC), and HLA DQ2/DQ8 typing were also noted.

Histopathological results of lymph nodes, spleen, liver, lung, and digestive tract were compiled. In lymph node and spleen biopsies, the presence of granulomatosis, benign lymphoproliferation, lymphoma, or other features were collected. In liver biopsies, evidence of fibrosis or nodular regenerative hyperplasia (NRH) was registered too. For those patients who underwent lung biopsy, histologically relevant findings were classified as lymphoid interstitial pneumonia (LIP), GLILD, follicular bronchiolitis, granulomas, lymphoma, and their combinations. Gastric and bowel histology was comprehensively studied, including variables such as atrophic gastritis, nodular lymphoid hyperplasia (NLH), intestinal villous

atrophy, lymphocytic infiltration, eosinophilic infiltration, absence of plasma cells, presence of granulomas, lymphocytic colitis, or findings compatible with Crohn's disease or ulcerative colitis.

Treatment with IgRT, regime, and route of administration were also included. Moreover, therapy with all categories of immunosuppressant agents received at any point of the clinical history was considered. The GTEM-SEMI-CVID-Registry also collected the mortality rate, cause of death, and follow-up time until death in those deceased patients.

Statistics

Owing to the epidemiological and cross-sectional nature of the study, variables were mainly analyzed using descriptive statistics. The analyses were performed with R statistical software version 4.2.1 (R Development Core Team, 2022). Quantitative data were expressed as mean and standard deviation (SD). Qualitative data were expressed as absolute count and percentage of cases, without accounting for non available values. For subanalyses of variables of interest, significance was assessed with the χ^2 or Fisher exact test for categorical variables and the Student t test for continuous variables after checking pertinent statistical assumptions. Two-tailed p-value below 0.05 was considered statistically significant.

Ethical statement

The creation and protocol of the GTEM-SEMI-CVID-Registry were independently approved by all institutional Ethical Committees of each participating hospital under their corresponding registry codes. Anonymity and data confidentiality of all included patients were ensured in accordance with the Spanish regulation of observational studies. The work was performed according to the Declaration of Helsinki and followed the STROBE guidelines (Supplementary Material).

Results

Demographics

As of May 2022, a total of 250 patients diagnosed with CVID were included in the GTEM-SEMI-CVID Spanish Registry. In our cohort, the mean age was 54.08 (SD 18.22) years old, and 121 patients (48.4%) were male. The mean age at diagnosis was 40.89 (SD 19.74) years old. However, the mean diagnostic delay was 10.01 (SD 13.21) years, while the global mean age at characteristic symptom onset was 29.8 (SD 20.08) years old. Most patients initially presented with infectious complications

(158, 63.2%), followed by non-infectious or neoplastic complications (83, 33.2%). Two patients presented with non-Hodgkin lymphoma. Family history and consanguinity were registered in 226 and 193 patients, respectively. Twenty-seven (11.95%) patients had a previous family history of CVID. History of consanguinity was seen in 8 patients (4.14%). Genetic testing was performed in 99 (39.6%) patients. Genetic variants were found in 35 patients, and all of them were considered benign or of unknown significance (Table 1).

Infectious complications

Information on the history of infectious complications of CVID was available for all patients included in the cohort, with airway infections being the most common. Almost 65% had suffered at least one episode of a major bacterial infection, and pneumonia accounted for most episodes. A history of sepsis, nevertheless, was only reported in 31 patients. Of all respiratory infections, more than 50% were recurrent and around 70% of patients reported a previous history of recurrent upper respiratory tract infections. Skin, soft tissue, or musculoskeletal infections were less frequent than opportunistic infections (considering deep-seated candidiasis, cryptococcosis, tuberculosis (TBC), and infection by non-TBC mycobacteria, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, cytomegalovirus (CMV) infection, JC virus infection, leishmaniasis or toxoplasmosis among others). Noteworthy, there were 2 reported cases of TBC, 3 cases of disseminated CMV infection, and 1 case of visceral leishmaniasis. Further information is detailed in Table 2.

A significantly higher proportion of patients who suffered opportunistic infections had received or were under treatment with corticosteroids (68.2% versus 32.2%, χ^2 p=0.002). Additionally, this was also significantly observed when considering treatment with azathioprine (31.8% versus 10.3%, χ^2 p=0.01), as well as the combination of corticosteroids, azathioprine, and rituximab (20.8% versus 5.3%, χ^2 p=0.015). No other significant differences were observed in relation to rituximab alone or other immunosuppressive treatments, or in relation to CD4+ cell count and genetic mutations. However, the genetic information is limited due to the absence of genetic analysis in a large part of the studied population.

Overview of non-infectious immune complications

Forty-three patients showed non-infectious immune complications as the first manifestation of the disease. During the mean follow-up time until data collection (8.90 years, SD 7.90), the most common immune complication was the presence of lymphadenopathies (35.2%), closely followed by the development of immune cytopenias (33.73%), non-infectious

TABLE 1 List of genetic variants in the Spanish GTEM-SEMI-CVID Registry.

Genetic variants	N
<i>TAC1</i>	7
<i>NFKB1</i>	7
<i>CTLA4</i>	5
<i>MBL2</i>	3
<i>IKAROS</i>	2
<i>BTX</i>	1
<i>NFKB2</i>	1
<i>LRBA</i>	1
<i>MLL2</i>	1
<i>PI3KCD</i>	1
<i>PI3KR1</i>	1
<i>PCLG2</i>	1
<i>PTPN2</i>	1
<i>RAG1</i>	1
<i>TPC3</i>	1
<i>CD27</i>	1

N, number of patients with mutations in the mentioned gene.

enteropathy (33.60%) and splenomegaly (33.06%). A total of 19.68% of patients had been previously diagnosed with a systemic autoimmune disease. Liver disease was less frequent, with hepatomegaly and liver nodules being found in 18.8% and 6.5% of patients, respectively (Figure 1). Considering GLILD as a severe lung immune complication in CVID, its presence was histologically confirmed in 7.69% of patients. Dysimmune

TABLE 2 Descriptive statistics of the major bacterial and the recurrent infections in the GTEM-SEMI-CVID Registry.

	N	Frequency (%)
Major bacterial infections		
Major bacterial infections	159	63.6
Abdominal infections	29	11.6
Cellulitis	20	8
Febrile UTI	17	6.8
Meningitis	8	3.2
Opportunistic infections	24	9.64
Osteomyelitis	2	0.8
Pneumonia	146	58.5
Sepsis	31	12.4
Recurrent infections		
Upper airway	178	70.8
Lower airway	133	53.2
Gastrointestinal	59	23.6
Urinary	21	8.4
Intestinal parasitosis	23	9.2
SST	11	4.4

N, number of patients with the mentioned variable; SST, soft and skin tissue infections; UTI, urinary tract infections.

neurological complications were also reported in 15 patients (6.02%) of the cohort.

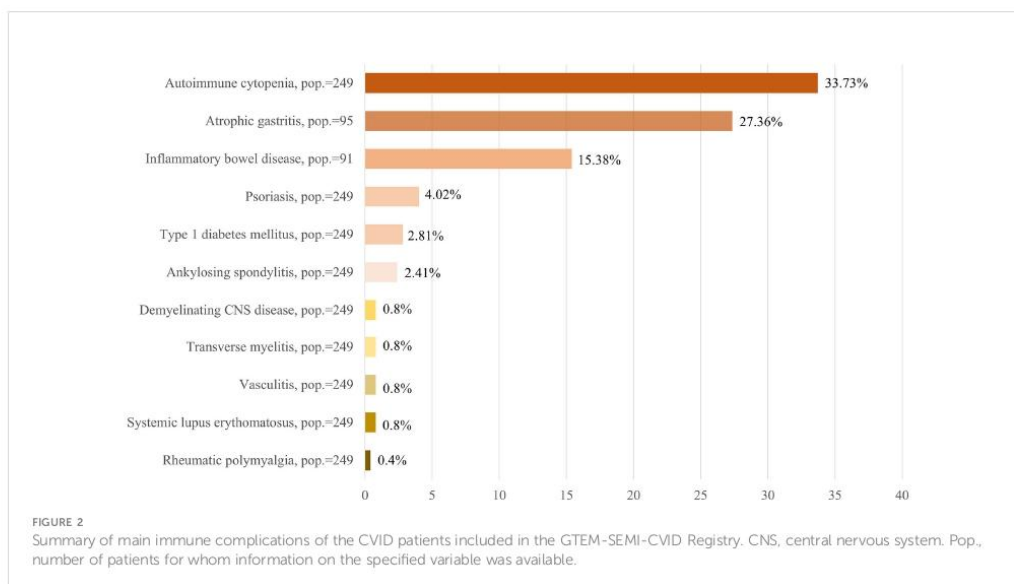
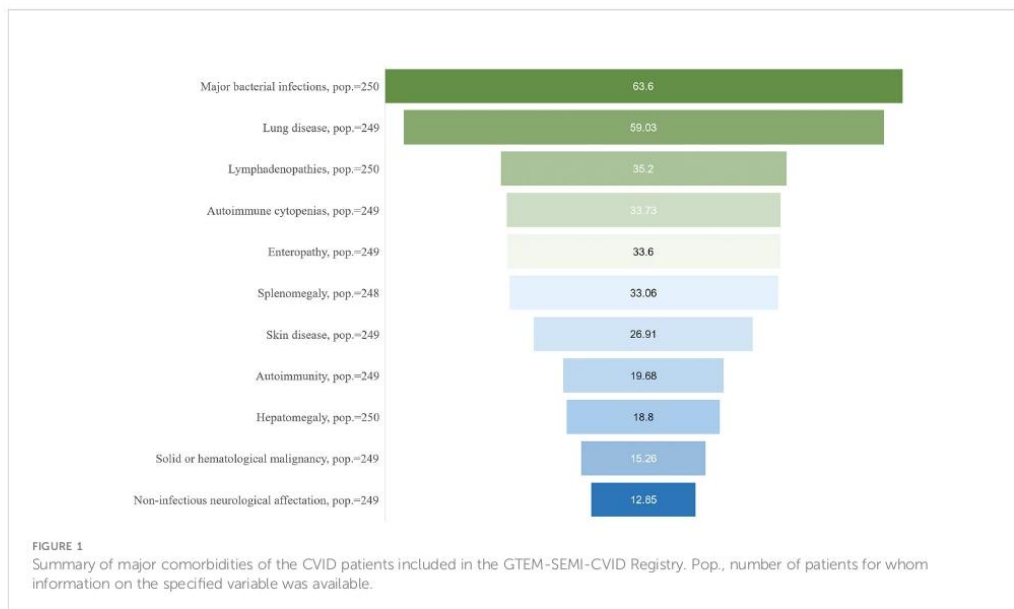
Organ-specific manifestations will be described in detail below.

Systemic autoimmune diseases and immunosuppressant drugs

Cytopenias were present in 84 patients of the cohort. Two hundred and thirty-one patients were recorded for the specific presence of cytopenias. Evans' syndrome, defined as both the simultaneous presence of immune anemia and thrombopenia, as well as leukopenia and thrombopenia were the most frequent cytopenias in our cohort, reported in 12 and 11 patients, respectively (5.19% and 4.76%). Isolated immune thrombopenia and hemolytic anemia were present in 6 (2.60%) and 4 (1.73%) patients, respectively. Isolated immune neutropenia was reported in 4 patients (1.73%).

Autoimmunity was present in 49 patients (19.68%) (Figure 1). The most common rheumatic disease in our cohort was ankylosing spondylitis, with a prevalence of 2.41% (6 cases), closely followed by sarcoidosis (2% and 5 cases). Systemic lupus erythematosus (SLE) and unspecified vasculitis had been diagnosed in 2 patients each (0.80%), and only 1 case of Sjögren syndrome and rheumatic polymyalgia were described (Figure 2). No reports on other autoimmune diseases such as systemic sclerosis or rheumatoid arthritis were seen. Type 1 diabetes mellitus was reported in 7 patients (2.81%) (Figure 2). Antinuclear antibodies (ANA), extractable nuclear antigen antibodies (ENA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) were positive in 8.84% (17), 1.77% (2), and 2.86% (4) of determinations. Of all patients, 94 had received pharmacological immunosuppressant or immunomodulatory treatments (Table 3). Corticosteroids (34.17%), followed by azathioprine (12.24%) and rituximab (12.23%) were the most frequently used immunosuppressant agents, mainly targeting CVID immune complications such as cytopenias, lymphoproliferation, and autoimmune disorders.

Eighty-one patients had received or were under corticosteroid treatment at the time of inclusion, of which 52 presented autoimmune cytopenias, 14 had histologically confirmed GLILD, and 24 patients suffered intestinal malabsorption. Azathioprine had been administered in 21 patients affected by immune cytopenias and 12 patients with confirmed GLILD. Rituximab therapy was the most used monoclonal antibody, and it had been administered in 24 patients with immune cytopenias, 14 patients with GLILD and in 6 patients who suffered non-Hodgkin lymphoma. Seventeen patients received treatment with all three agents, of which 10 patients presented coexistence of autoimmune cytopenias and GLILD. Further information on significant immunosuppressant therapies and the observed comorbidities in these patients can be consulted in the Supplementary S1 File.



Spleen and lymph node involvement

The presence of significant lymphadenopathies was observed in 88 patients. Half of them (18) had undergone a lymph node biopsy. Eighty-two patients (33.06%) presented splenomegaly (Figure 1), but a splenic biopsy was only performed in 4 patients due to high hemorrhagic risk. Benign lymphoproliferation (65.91% of lymph node biopsies and 50% of spleen biopsies) and node granulomatosis (44.45% of lymph node biopsies and 75% of spleen biopsies) were the most frequent histological findings for both organs. Further histological data are detailed in Table 4.

Liver involvement

In 47 patients (18.8%), hepatomegaly was documented on imaging tests regardless of the presence of splenomegaly. Liver nodules were observed in 16 patients (6.5%). Clinical, laboratory, imaging, or endoscopic evidence of portal hypertension was present in 19 patients (7.75%), and liver biopsy had been performed in 12 individuals (4.8%) during follow-up. As seen in Table 4, liver nodular hyperplasia was the most frequent histological finding (58.33%) followed by liver granulomatosis (41.67%).

Lung involvement

Non-infectious lung disease was extraordinarily frequent and was seen in almost 60% of CVID patients (Figure 1).

Nevertheless, less than 25% of them reported chronic dyspnea or cough as the most frequent clinical manifestation (Table 5). High-resolution CT (HRCT) scanning had been performed for nearly 65% of the patients and isolated bronchial affection, mainly bronchiectasis was the most frequent imaging finding (35%). Lung parenchymal involvement was observed in 15% of the patients, and the most regularly described radiological pattern was compatible with lymphoid interstitial pneumonia (13.83% of HRCT scans). Almost 80% of the patients had undergone LFT during follow-ups. Normal results were obtained in 56.90% of them and an obstructive spirometry pattern was seen in 27.59%. The mean cDLCO was 73.62 (21.28 SD). Further data are detailed in Table 5. Thirty-one patients underwent lung biopsy. Histological results concurred with imaging observations, and combined lymphocytic interstitial pneumonia and granulomatosis were the most frequent findings (25.81% of lung biopsies), as seen in Table 4. Confirmed GLILD according to the British Lung Foundation Criteria (15) was seen in 17 patients (Table 5).

Digestive tract involvement

Gastrointestinal affection was common (40.56%) but also highly variable. Non-infectious diarrhea was reported in 83 patients (33.60%) (Figure 1). However, proved malabsorption was diagnosed in 30 patients (23.81%). Determination of *H. pylori* infection was performed in 126 patients, with a prevalence in our population of 23.81%. Screening for coeliac, anti-gastric parietal, and anti-intrinsic factor antibodies, as well as screening

TABLE 3 History of immunosuppressant treatment in the GTEM-SEMI-CVID Registry.

	N	Frequency (%)
Patients who received immunosuppressant therapies	94	38.68
Corticosteroid treatment	81	34.17
Antimalarial treatment	6	2.55
Abatacept	1	0.42
Anakinra	0	0
Azathioprine	29	12.24
Belimumab	0	0
Cyclophosphamide	1	0.42
Cyclosporin	2	0.84
Etanercept	0	0
Infliximab	5	2.12
Mofetil mycophenolate	9	3.81
Methotrexate	2	0.84
Rituximab	29	12.23
Sirolimus	2	0.84
Tacrolimus	7	2.96

N, number of patients that received each treatment.

TABLE 4 Lymph node, spleen, liver, lung, and gastrointestinal histopathology of GTEM-SEMI-CVID Registry.

	N	Frequency (%)
Lymph node biopsy	44	17.89
Node granulomatosis	20	44.45
Node lymphoma	9	20.45
Node benign lymphoproliferation	29	65.91
Other	1	2.27
Spleen biopsy	4	1.6
Spleen granulomatosis	3	75
Spleen lymphoma	1	25
Spleen benign lymphoproliferation	2	50
Other	1	25
Liver biopsy	12	4.8
Liver granulomatosis	5	41.67
Liver fibrosis	3	25
Liver benign lymphoproliferation	1	8.33
Liver nodular hyperplasia	7	58.33
Lung biopsy	31	13.06
Follicular bronchiolitis	2	6.45
Granulomatosis	1	3.22
Advanced interstitial pneumonia	1	3.22
Lymphocytic interstitial pneumonia	7	22.58
Lymphocytic interstitial pneumonia and bronchiolitis	1	3.22
Lymphocytic interstitial pneumonia and granulomatosis	8	25.81
Other	13	41.94
Diagnosed GLILD	17	7.69
Gastroduodenal biopsy	95	38.61
Small intestine biopsy	49	20.16
Colon biopsy	76	31.27
Histological findings		
Atrophic gastritis	26	27.36
Gastrointestinal nodular lymphoid hyperplasia	38	40
Inflammatory bowel disease	14	15.38
Intestinal eosinophilic infiltrate	9	9.47
Intestinal plasmatic cell absence	35	39.66
Intestinal granulomatosis	3	3.37
Intestinal lymphocytic infiltrate	37	38.95
Lymphocytic colitis	16	18.39
Villous atrophy	26	27.08

for HLA DQ2/DQ8, was carried out in 241, 71, 53, and 33 patients obtaining a positive result in 3.73%, 19.72%, 3.77%, and 24.24%, respectively. Gastroduodenal, small intestine, and colon biopsies were performed in 95, 49, and 76 patients, correspondingly. Histological findings are detailed in Table 4. To highlight, lymphoid nodular hyperplasia, lymphocytic infiltrate, and intestinal absence of plasma cells were the most common traits. Atrophic gastritis was observed in 27.36% of the patients (Figure 2).

Involvement of other organs: cutaneous and neurological manifestations

Skin disorders were reported in 67 patients in our cohort (26.91%) (Figure 1). The most frequent lesions were eczema, in 22 patients (8.83%); psoriasis, in 10 patients (4.02%) (Figure 2); followed by vitiligo and alopecia, both recorded for 6 patients (2.41%). The presence of warts was registered for 3 patients (1.20%). However, the occurrence of other non-specified lesions

TABLE 5 Lung disease in the GTEM-SEMI-CVID Registry.

	N	Frequency (%)
Lung disease	147	59.03
Dyspnoea	48	19.91
Cough	56	23.14
Chest HRCT performed	158	64.49
Normal	67	33.33
Bronchial	72	35.82
Parenchymatous	31	15.42
Bronchial and parenchymatous	24	11.94
Bronchial, parenchymal and pleural	2	1
Bronchial and pleural	2	1
Parenchymal and pleural	3	1.49
Radiological patterns		
Respiratory bronchiolitis and interstitial lung disease	1	0.53
Desquamative interstitial pneumonia	1	0.53
Lymphocytic interstitial pneumonia	26	13.83
Non-specific interstitial pneumonia	10	5.32
Usual interstitial pneumonia	1	0.53
Normal	149	79.26
Lung function test (LFT)	188	79.66
LFT pattern		
Normal	99	56.9
Obstructive	48	27.59
Restrictive	13	7.47
Mixed	14	8.05
Diagnosed GLILD	17	7.69

GLILD, granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease; HRCT, high resolution computerized tomography; LFT, lung function test; N, number of patients with the mentioned variable

of a wide nature (cutaneous neoplasms, nevi, among others) was reported in 37 individuals.

The presence of non-infectious neurological involvement was also studied. Five patients (2.01%) presented both intellectual disability and peripheral neuropathy of diverse severity and etiology. Of note, 4 patients suffered epilepsy (1.60%) and immune demyelinating lesions and transverse myelitis were described in 2 cases each (Figure 2). One episode of subacute sclerosing panencephalitis with severe sequelae was reported after measles vaccination in an undiagnosed CVID patient at that moment.

Neoplastic complications

Prevalence of both solid and hematological malignancies from inclusion to follow-up was 15.26% (38 cases) (Figure 1). Non-Hodgkin B lymphoma (11 cases and 4.41%) was the most frequent malignancy in our population. Gastric cancer and lung adenocarcinoma were reported in 5 (2.01%) and 3 (1.20%) patients, respectively. Interestingly, only 2 cases of colorectal

cancer, as well as 1 case of breast cancer and prostate cancer were diagnosed. Of note, 3 patients reported basal cell carcinomas, and 1 patient was diagnosed with both basal cell and skin squamous cell carcinoma of the skin. The remaining 7 cases were diagnosed with other less frequent tumors (namely, myeloma, splenic lymphoma, thyroid, renal, uterine, or cervical cancer).

Other comorbidities

The prevalence of diseases resulting in increased cardiovascular events such as hypertension, type 2 diabetes mellitus (DM), dyslipidemia, and gout were seen in 52, 22, 41, and 4 individuals (namely, 20.88%, 8.84%, 16.65%, and 1.61%). Eighteen patients (7.23%) presented heart failure, 5 (2%) had suffered a stroke, and 3 (1.20%) reported peripheral arteriopathy. Chronic kidney disease was documented in 12 patients (4.82%). Venous thromboembolic disease was reported in 7 patients (2.81%).

Immunological parameters

Immunoglobulin levels at diagnosis as well as lymphocyte subpopulation cell count are detailed in Table 6. There was wide variation in the immunoglobulin levels and B and T cell subpopulations cell counts.

IgRT and mortality

Two hundred and fourteen patients were under active treatment with IgRT. Remarkably, 29 patients were not being treated or had received IgRT at the time of data collection, and 3/29 had already died. Therapeutic information was lacking for 8 patients in the national cohort. No differences were observed in the baseline epidemiological features of patients in the non-treated group, being only discretely younger than the treated group (46.10 vs 51.51 years). Intravenous route (IVIgRT) was preferred (124 patients, 57.94%) over subcutaneous (SCIgRT) (88, 41.12%) or intramuscular (IMIgRT) (1, 0.47%) routes. All patients received IVIgRT at the hospital, and most patients under SCIgRT (74 patients) administered it at home, or both (5).

Fifteen patients had died until the time of data collection, meaning a mortality rate of 6% in our cohort until data cut-off, with a mean age at death of 57 years old (SD 20.16) and a follow-up time until death of 7.6 years (SD 7.75). Non-infectious complications such as chronic respiratory failure (3 patients), solid or hematological malignancies (3 patients), or dysimmune complications (3 patients) were more frequent than infectious complications (3 patients) when analyzing the cause of death.

Discussion

The GTEM-SEMI-CVID-Registry systematically compiles the current clinical profile of 250 patients diagnosed with CVID in Spain on the basis of a nationwide multicentric approach. Hence, a complete, updated, and integrated view of

the CVID clinical course is detailed in this study, which increases the available data provided by other CVID cohorts.

In line with previous reports, the mean diagnostic delay in our study was around 10 years (8, 19, 20), and most patients initially presented with infectious complications followed by non-infectious immune disorders. However, the current diagnostic delay appears higher than previously reported in partial cohorts in our country, which ranged from 4-6 years (4). More than one-third of the patients in our cohort showed lymphadenopathies and splenomegaly in their follow-up, and more than 30% presented immune cytopenias, with a higher prevalence than in other international cohorts, possibly due to a relatively higher mean age of our patients and longer disease evolution (8, 14, 17, 19) (Figures 1, 2). Remarkably, Evans' syndrome was the most frequently described immune cytopenia instead of isolated ITP as previously described (5, 8, 14). Furthermore, systemic autoimmunity was reported in 20% of the patients, with ankylosing spondylitis being the most frequent rheumatic disease. This highlights the present need for developing referral protocols allowing an earlier diagnosis, which should include not only repeated infections as the main red flag for suspecting CVID and other immunodeficiencies (21, 22) but also immune disorders and organ lymphoproliferation.

Since the introduction of IgRT, infectious complications are not the main cause of morbimortality in CVID patients (5), as illustrated in this series. For more than a decade, SCIgRT has been introduced as a successful alternative to conventional IVIgRT with optimal IgG trough levels, fewer side effects, better health-related quality of life, patient empowerment, and faster functional recovery with less contact with the healthcare environment (23). Nevertheless, less than half of the patients received SCIgRT and IVIgRT was preferred by almost 60%. Through these data, practitioners should be encouraged to consider switching IVIgRT to SCIgRT for qualified patients with CVID.

Non-infectious lung disease was extraordinarily frequent in our registry affecting approximately 60% of the patients, which shows a higher prevalence than previously known (5, 8, 14) (Figure 1). Bronchiectasis was the most frequent imaging finding

TABLE 6 Data on immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations count in the GTEM-SEMI-CVID Registry.

	Mean	Median	SD	Interquartile range
Serum IgG levels at diagnosis (mg/dL)	403.219	382	218.65	290.25
Serum IgA levels at diagnosis (mg/dL)	47.09	15	78.26	51.83
Serum IgM levels at diagnosis (mg/dL)	53.3	26	88.88	54.25
Total lymphocyte count at diagnosis (cell/ μ L)	1794.05	1500	1055.95	966.5
CD3 cell count at diagnosis (cell/ μ L)	1302.81	1151	708.06	774
CD4 cell count at diagnosis (cell/ μ L)	678.9	616	427.81	436
CD8 cell count at diagnosis (cell/ μ L)	520.6	432	393	453
CD19 cell count at diagnosis (cell/ μ L)	231.22	178	192.1	192.75

SD, standard deviation.

(35%) in consonance with previous studies (14). This could be due to chronic and repeated infections rather than local immune dysregulation (24). However, lung parenchymal involvement was observed in around 15% of the patients, mainly as lymphoid interstitial pneumonia. Despite the high prevalence of lung disease, less than 65% of the patients included in the cohort underwent a HRCT. This advocates that some patients with subclinical affectation may have been underdiagnosed in our cohort, as only around 20% experienced respiratory clinical manifestations such as cough or dyspnea. In line with this, histologically confirmed GLILD was only seen in 17 patients; a notably lesser prevalence than expected according to previous evidence (25, 26). This emphasizes the need for a further active search for chronic lung disease in the follow-up of these patients despite being asymptomatic or paucisymptomatic, as it has been associated with poorer clinical outcomes (8, 27).

In the GTEM-SEMI-CVID Registry, gastrointestinal disease was observed in more than 40%, which is the high end of previously reported data (range: 9 – 44%) (8, 14, 17, 19, 20, 28). Intestinal lymphocytic infiltration was the most common histological finding, being present in almost 40% of the biopsies, as recently published (14).

These results concur with growing evidence supporting disseminated benign lymphoproliferation and infiltration as one of the main characteristics of abnormal immunity in CVID patients, which may result in organ dysfunction at different levels. Among biopsied organs in our cohort, benign lymphoproliferation was the principal histopathological alteration, except for spleen and liver, where granulomatosis was observed in 75% and 42% of the biopsies, respectively. Interestingly, in non-lymphoid organs, lymphocytic infiltration was more frequent in gastrointestinal tract, probably due to the continuous antigen-lymphocyte interaction with local microbiota. Many studies have shown increased permeability of the gut barrier which results in microbial translocation and local inflammation, both endpoints of the systemic immune activation that was expressed in the histological findings of the patients in our cohort (29–31).

This coexistence of immunodeficiency and immune dysregulation with diffuse lymphocytic infiltration and autoimmune disorders in CVID patients seems paradoxical, requiring the use of immunosuppressant treatments on already immunosuppressed patients. In our case, almost 40% of the individuals had received immunosuppressant therapies, mainly corticosteroids followed by azathioprine and, notably, rituximab. These agents were mainly used to treat immune cytopenias, granulomatous or lymphocytic disorders, and other autoimmune complications. Given their risk of adverse effects, the need for these therapies reveals an important therapeutic complexity (32), especially considering the relatively high prevalence of opportunistic infections in our cohort, of up to 9.64% with clear relation to some of the most frequently used treatments. Further pathophysiological studies are needed to

unravel the genetic and molecular pathways driving CVID dysimmunity that will allow the development of targeted therapies with fewer side effects.

In this regard, the presence of persistent abnormalities in immune activation and systemic inflammation have been related to an increased risk of cardiovascular disease (33, 34). Although the chronic proinflammatory state of CVID could be related to higher cardiovascular risk, evidence is still scarce (35–37). Nonetheless, the prevalence of cardiovascular comorbidities was not increased in our series when compared to the Spanish general population of the same age group. For instance, hypertension and type 2 DM are found in 42.6% and 14.8% of the Spanish adult population respectively, whereas in our study, the global prevalence of hypertension and type 2 DM was 20.88% and 8.84%, respectively. Chronic kidney disease (CKD) accounted for 4.82% of the patients in our registry, while the global prevalence of CKD is 15.1% for the Spanish adult population (38, 39). Studies aiming to profile the cardiovascular risk in CVID are needed to overcome this large knowledge gap.

Moreover, in the literature, patients with CVID have a significantly higher risk of both hematological and solid malignancies, with a described prevalence of approximately 10% (ranging from 1.5 – 20.7%). The overall prevalence of cancer in our registry was one of the highest reported to date, of up to 15.26% (5, 13, 14, 39–42) (Figure 1). As with immune complications, the higher mean age in the Registry as well as the diagnostic delay could partially explain these findings (13). In line with previous evidence, non-Hodgkin B lymphoma was the most frequently reported malignancy, followed by gastric cancer, lung tumors, and cutaneous malignancies. Despite the declining incidence of gastric cancer in older reports (43, 44), the prevalence of 2% in this series is significantly higher compared to the other recent studies (5, 14). The fact that approximately half of all patients had been actively investigated for the presence of *H. pylori* may have contributed to these higher figures and indicates the need for periodical screening for this infection in all CVID patients.

Several important limitations deserve mention. Firstly, this is a retrospective cohort study. Despite a systematic and closed form with clear instructions and definition of variables was provided, data were collected by a large number of researchers which could have led to heterogeneity in data input and validation. In fact, due to the retrospective approach based on the review of electronic clinical records, some information was not available, thus limiting its extrapolation to the general population with CVID. Secondly, despite the large number of clinical and complementary variables included in the registry, other important variables such as a complete cardiovascular risk evaluation, other received treatments apart from immunosuppressants and immunoglobulins, and complete lymphocyte subpopulation counts, among others, were not included. Noteworthy, only adult individuals were included,

and many hospitals were not reference institutions for treating PIDs. This fact might have influenced the follow-up of CVID patients but is a clear reflection of the Spanish reality in the diagnosis, management, and treatment of this heterogeneous disease. Finally, this study was conceived from a descriptive approach, and no inferential analyses were performed. Data from the GTEM-SEMI-CVID Registry will be used for the design of further studies aiming to characterize and compare patient subpopulations.

Conclusion

This is the first nationwide multicentric study on CVID patients in Spain including both secondary and tertiary referral hospitals. The data provided by this work stress the need for developing national guidelines to optimize the diagnosis and management of these patients. Chronic dysimmune complications have emerged as the main cause of morbidity and mortality after the introduction of IgRT and pose a great challenge for clinicians treating PIDs. The lack of effective treatments and the use of immunosuppressants for the management of these disorders emphasizes the importance of basic and translational research delving into the pathophysiological pathways involved in immune dysregulation and diffuse lymphocytic infiltration. This would reveal new tailored strategies to reduce immune complications, the associated healthcare burden, and ensure a better quality of life for CVID patients. Moreover, evidence on cardiovascular disease in CVID is lacking and new studies should be designed to address this considerable knowledge gap. Finally, further studies with a large sample size in other regions, and meta-analyses of current evidence are needed to improve the epidemiological knowledge of this complex and heterogeneous disorder.

Data availability statement

The datasets presented in this article are not readily available because they belong to an institutional multicentric registry from the Spanish Society of Internal Medicine. Requests to access the datasets should be directed to the promotor of the registry, PMM: moral_ped@gva.es.

Ethics statement

This study has been independently approved by the ethics committees of all participating institutions. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Author contributions

MC-N, VG-B, and PMM conceived the idea, searched the bibliographic materials, and reviewed the existing literature. MC-N, VG-B, and PMM developed the tables. VG-B performed the statistical analysis. MC-N, VG-B, MN-B and PMM contributed to the writing of the article. The rest of the authors contributed in data inclusion and variable collection in their respective centers. All authors are responsible for the care of the patients and provided their data to the GTEM-SEMI-CVID Registry.

Funding

The article processing charge for publication has been funded by CSL Behring. The funder was not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication.

Acknowledgments

We would like to thank the Working Group of Minority Diseases of the Spanish Society of Internal Medicine (GTEM), the Spanish Society of Internal Medicine (SEMI) and the Valencian Community Society of Internal Medicine (SMICV) for their support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1033666/full#supplementary-material>

References

- Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International union of immunological societies: 2017 primary immunodeficiency diseases committee report on inborn errors of immunity. *J Clin Immunol* (2018) 38:96–128. doi: 10.1007/s10875-017-0464-9
- Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, van Montfrans J, et al. The European society for immunodeficiencies (ESID) registry working definitions for the clinical diagnosis of inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2019) 7(6):1763–70. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.004
- Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, et al. International consensus document (ICON): common variable immunodeficiency disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2016) 4:38–59. doi: 10.1016/j.jaip.2015.07.025
- Gathmann B, Mahlaoui N, CEREDIH, Gérard L, Oksenhendler E, Warnatz K, Schulze J, et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 134(1):116–26. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1077
- Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* (2012) 119(7):1650–7. doi: 10.1182/blood-2011-09-377945
- Orange JS, Grossman WJ, Navickis RJ, Wilkes MM. Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: A meta-analysis of clinical studies. *Clin Immunol* (2010) 137(1):21–30. doi: 10.1016/j.clim.2010.06.012
- Fischer A, Provot J, Jais JP, Alcais A, Mahlaoui N, Members of the CFPIDsg. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* (2017) 140:1388–93.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.12.978
- Chapel H, Lucas M, Lee M, Björkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* (2008) 112:277–86. doi: 10.1182/blood-2007-11-124545
- Azizi G, Abolhasani H, Asgardoost MH, Alinia T, Yazdani R, Mohammadi J, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: epidemiology, pathophysiology and management. *Expert Rev Clin Immunol* (2017) 13(2):101–15. doi: 10.1080/1744666X.2016.1224664
- Cabañero-Navalon MD, García-Bustos V, Forero-Naranjo LF, Baetig-Arriagada EJ, Núñez-Beltrán M, Cañada-Martínez AJ, et al. Integrating clinics, laboratory, and imaging for the diagnosis of common variable immunodeficiency-related granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease. *Front Immunol* (2022) 13:813491. doi: 10.3389/fimmu.2022.813491
- Rizvi FS, Zainaldain H, Rafiemanesh H, Jamee M, Hossein-Khannazer N, Hamedifar H, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Clin Immunol* (2020) 16(12):1227–35. doi: 10.1080/1744666X.2021.1850272
- Andersen IM, Jørgensen SF. Gut inflammation in CVID: causes and consequences. *Expert Rev Clin Immunol* (2022) 18(1):31–45. doi: 10.1080/1744666X.2021.2008241
- Kiaee F, Azizi G, Rafiemanesh H, Zainaldain H, Sadaat Rizvi F, Alizadeh M, et al. Malignancy in common variable immunodeficiency: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Clin Immunol* (2019) 15(10):1105–13. doi: 10.1080/1744666X.2019.1658523
- Ho HE, Cunningham-Rundles C. Non-infectious complications of common variable immunodeficiency: Updated clinical spectrum, sequelae, and insights to pathogenesis. *Front Immunol* (2020) 11:149. doi: 10.3389/fimmu.2020.00149
- Hurst JR, Verma N, Lowe D, Baxendale HE, Jolles S, Kelleher P, et al. British Lung Foundation/United Kingdom primary immunodeficiency network consensus statement on the definition, diagnosis, and management of granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease in common variable immunodeficiency disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2017) 5(4):938–45. doi: 10.1016/j.jaip.2017.01.021
- Bethune C, Egnor W, Garcez T, Huissoon A, Jolles S, Karim Y, et al. British Society for Immunology/United Kingdom primary immunodeficiency network consensus statement on managing non-infectious complications of common variable immunodeficiency disorders. *Clin Exp Immunol* (2019) 196(3):328–35. doi: 10.1111/cei.13272
- Mormile I, Punziano A, Riolo CA, Granata F, Williams M, de Paulis A, et al. Common variable immunodeficiency and autoimmune diseases: A retrospective study of 95 adult patients in a single tertiary care center. *Front Immunol* (2021) 12:652487. doi: 10.3389/fimmu.2021.652487
- Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med* (1993) 86(1):31–42.
- 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. doi: 10.1182/blood-2007-06-091744
- Ramírez-Vargas N, Arabin-Oropeza SE, Mojica-Martínez D, Yamazaki-Nakashimada MA, de la Luz García-Cruz M, Terán-Juárez LM, et al. Clinical and immunological features of common variable immunodeficiency in Mexican patients. *Allergol Immunopathol* (2014) 42(3):235–40. doi: 10.1016/j.aller.2013.01.007
- Arslan S, Ucar R, Caliskaner AZ, Reisli I, Guner SN, Sayar EH, et al. How effective are the 6 European society of immunodeficiency warning signs for primary immunodeficiency disease? *Ann Allergy Asthma Immunol* (2016) 116(2):151–155.e1. doi: 10.1016/j.ana.2015.12.001
- Arkwright PD, Gennery AR. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century. *Ann N Y Acad Sci* (2011) 1238:7–14. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06206.x
- Abolhasani H, Sadaghiani MS, Aghamohammadi A, Ochs HD, Rezaei N. Home-based subcutaneous immunoglobulin versus hospital-based intravenous immunoglobulin in treatment of primary antibody deficiencies: systematic review and meta-analysis. *J Clin Immunol* (2012) 32(6):1180–92. doi: 10.1007/s10875-012-9720-1
- Schussler E, Beasley MB, Maglione PJ. Lung disease in primary antibody deficiencies. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2016) 4(6):1039–52. doi: 10.1016/j.jaip.2016.08.005
- Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2004) 114(2):415–21. doi: 10.1016/j.jaci.2004.05.057
- Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* (2005) 5(5):370–5. doi: 10.1007/s11882-005-0008-x
- Verma N, Grimbacher B, Hurst JR. Lung disease in primary antibody deficiency. *Lancet Respir Med* (2015) 3(8):651–60. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00202-7
- Farmer JR, Ong MS, Barnettler S, Yonker LM, Fuleihan R, Sullivan KE, et al. Common variable immunodeficiency non-infectious disease endotypes redefined using unbiased network clustering in large electronic datasets. *Front Immunol* (2018) 8:1740. doi: 10.3389/fimmu.2017.01740
- Jørgensen SF, Fevang B, Aukrust P. Autoimmunity and inflammation in CVID: a possible crosstalk between immune activation, gut microbiota, and epigenetic modifications. *J Clin Immunol* (2019) 39(1):30–6. doi: 10.1007/s10875-018-0574-z
- Gerege JD, Maglione PJ. Current understanding and recent developments in common variable immunodeficiency associated autoimmunity. *Front Immunol* (2019) 10:2753. doi: 10.3389/fimmu.2019.02753
- Varricchi G, Poto R, Ianaro G, Punziano A, Marone G, Gasbarrini A, et al. Gut microbiome and common variable immunodeficiency: Few certainties and many outstanding questions. *Front Immunol* (2021) 12:712915. doi: 10.3389/fimmu.2021.712915
- Xiao X, Miao Q, Chang C, Gershwin ME, Ma X. Common variable immunodeficiency and autoimmunity—an inconvenient truth. *Autoimmun Rev* (2014) 13(8):858–64. doi: 10.1016/j.autrev.2014.04.006
- Fioranelli M, Bottaccioli AG, Bottaccioli F, Bianchi M, Rovesti M, Rocca MG. Stress and inflammation in coronary artery disease: A review psychoneuroendocrine-immunology-based. *Front Immunol* (2018) 9:2031. doi: 10.3389/fimmu.2018.02031
- So-Armah K, Benjamin LA, Bloomfield GS, Feinstein MJ, Hsue P, Njuguna B, et al. HIV and cardiovascular disease. *Lancet HIV* (2020) 7(4):e279–93. doi: 10.1016/S2352-3018(20)30036-9
- Vieira DG, Costa-Carvalho BT, Hix S, da Silva R, Correia MSG, Sarni ROS. Higher cardiovascular risk in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. *Ann Nutr Metab* (2015) 66(4):237–41. doi: 10.1159/000435818
- Ucar R, Arslan S, Turkmen K, Caliskaner AZ. Accelerated atherosclerosis in patients with common variable immunodeficiency: Is it overlooked or absent? *Med Hypotheses* (2015) 85(4):485–7. doi: 10.1016/j.mehy.2015.07.002
- Macpherson ME, Halvorsen B, Yndestad A, Ueland T, Molnes TE, Berge RK, et al. Impaired HDL function amplifies systemic inflammation in common variable immunodeficiency. *Sci Rep* (2019) 9(1):9427. doi: 10.1038/s41598-019-45861-1
- Menéndez E, Delgado E, Fernández-Vega F, Prieto MA, Bordiú E, Calle A, et al. Prevalence, diagnosis, treatment, and control of hypertension in Spain: results of the diabetest study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* (2016) 69(6):572–8. doi: 10.1016/j.rec.2015.11.034
- Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Rullope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaría R. Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of

accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrologia (Engl Ed)* (2018) 38(6):606–15. doi: 10.1016/j.nefro.2018.04.004

40. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* (1999) 92(1):34–48. doi: 10.1006/clim.1999.4725

41. Abolhassani H, Aghamohammadi A, Imanzadeh A, Mohammadinejad P, Sadeghi B, Rezaei N. Malignancy phenotype in common variable immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol* (2012) 22(2):133–4.

42. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* (2007) 27(3):308–16. doi: 10.1007/s10875-007-9075-1

43. Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF, et al. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet* (1985) 1(8423):263–6. doi: 10.1016/s0140-6736(85)91037-2

44. Tak Manesh A, Azizi G, Heydari A, Kiaee F, Shaghghi M, Hossein-Khannazer N, et al. Epidemiology and pathophysiology of malignancy in

common variable immunodeficiency? *Allergol Immunopathol (Madr)* (2017) 45(6):602–15. doi: 10.1016/j.aller.2017.01.006

COPYRIGHT

© 2022 Cabañero-Navalon, García-Bustos, Nuñez-Beltrán, Ciscar Fernández, Mateu, Solanich, Carrillo-Linares, Robles-Marhuenda, Puchades-Gimeno, Peláez Ballesta, López-Osle, Torralba-Cabeza, Bielsa Masdeu, Diego Gil, Tornador Gaya, Pascual Castellanos, Sánchez-Martínez, Barragán-Casas, González-García, Patier de la Peña, López-Wolf, Mora Rufete, Canovas Mora, Fomer Giner and Moral Moral. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary material

Table S1. Comorbidities of patients who had received or were under corticosteroid treatment.

Total number of patients who had received or were under corticosteroid treatment	N=81
Autoimmune cytopenia	N=52
Enteropathy	N=24
GLILD	N=14
NHL	N=9
Ankylosing spondylitis	N=4
Demyelinating CNS disease	N=2
Transverse myelitis	N=2
Optic neuritis	N=1
SLE	N=1
Peripheral neuropathy	N=1
Sjögren disease	N=1

CNS, Central Nervous System; GLILD, Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease; N, number of patients who had received or were under the specified treatment; NHL, Non-Hodgkin lymphoma; SLE, Systemic Lupus Erythematosus

Table S2. Comorbidities of patients who had received or were under azathioprine treatment.

Total number of patients who had received or were under azathioprine treatment	N=29
Autoimmune cytopenia	N=21
GLILD	N=12
Enteropathy	N=8
NHL	N=4
Transverse myelitis	N=1
Ankylosing spondylitis	N=1
Vasculitis	N=1

GLILD, Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease; N, number of patients who had received or were under the specified treatment; NHL, Non-Hodgkin lymphoma

Table S3. Comorbidities of patients who had received or were under rituximab treatment.

Total number of patients who had received or were under rituximab treatment	N=29
Autoimmune cytopenia	N=24
GLILD	N=14
Enteropathy	N=4
NHL	N=6
Transverse myelitis	N=1
Optic neuritis	N=1
Demyelinating CNS disease	N=1

CNS, Central Nervous System; GLILD, Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease; N, number of patients who had received or were under the specified treatment; NHL, Non-Hodgkin lymphoma

Table S4. Comorbidities of patients who had received or were under corticosteroids, rituximab, and azathioprine.

Total number of patients who had received or were under corticosteroids, azathioprine, and rituximab treatment	N=17
GLILD + autoimmune cytopenia	N=10
GLILD	N=1
Enteropathy	N=3
Autoimmune cytopenia	N=2
NHL	N=3
Transverse myelitis	N=1

GLILD, Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease; N, number of patients who had received or were under the specified treatment; NHL, Non-Hodgkin lymphoma

Table S5. Comorbidities of patients who had received or were under mycophenolate mofetil treatment.

Total number of patients who had received or were under mycophenolate mofetil treatment	N=9
Autoimmune cytopenia	N=4
GLILD	N=4
Enteropathy	N=2

GLILD, Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease; N, number of patients who had received or were under the specified treatment.

Table S6. Comorbidities of patients who had received or were under tacrolimus treatment.

Total number of patients who had received or were under tacrolimus treatment	N=7
Autoimmune cytopenia	N=2
GLILD	N=1
Enteropathy	N=3
Demyelinating CNS disease	N=1
Transverse myelitis	N=1
Optic neuritis	N=1

CNS, Central Nervous System; GLILD, Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease; N, number of patients who had received or were under the specified treatment; NHL, Non-Hodgkin lymphoma

Table S7. Comorbidities of patients who had received or were under antimalarial treatment.

Total number of patients who had received or were under antimalarial treatment	N=6
Autoimmune cytopenia	N=5
SLE + autoimmune cytopenia	N=2
SLE	N=1

N, number of patients who had received or were under the specified treatment; SLE, Systemic Lupus Erythematosus.

6.2. Identificación de parámetros clínicos, de laboratorio y de imagen para la predicción y diagnóstico de la Enfermedad Pulmonar Intersticial Granulomatosa Linfocítica asociada a la Inmunodeficiencia Común Variable

Resumen en castellano:

La EPIGL es una enfermedad pulmonar intersticial con características clínicas, radiológicas y anatomopatológicas distintivas que se desarrolla en el 9% al 30% de los pacientes con IDC.V. A menudo relacionado con trastornos dis inmunes extrapulmonares, se asocia con daño pulmonar a largo plazo y peor pronóstico. El objetivo de este estudio fue explorar el uso potencial de la integración entre parámetros clínicos, variables de laboratorio y scores de valoración de imágenes de TC desarrollados para mejorar la precisión diagnóstica de herramientas no invasivas.

Se realizó un estudio transversal retrospectivo de 50 pacientes con IDC.V en una unidad de referencia de inmunodeficiencias primarias. Las variables clínicas incluyeron datos demográficos y comorbilidades; parámetros analíticos con niveles de inmunoglobulinas, metabolismo de lípidos y subpoblaciones de linfocitos; y también, se recogieron parámetros radiológicos y de pruebas de función pulmonar. Para la valoración sistemática de las imágenes radiológicas, se utilizó el score GLILD de Baumann. Este sistema fue validado externamente por dos observadores en TCAR. Se desarrolló un modelo predictivo exploratorio mediante selección de variables utilizando un modelo *elastic net*, y regresión bayesiana. Posteriormente se evaluó su capacidad discriminativa mediante el estadístico c o área bajo la curva y se llevó a cabo su validación interna mediante remuestreo *bootstrap*.

Finalmente, en el modelo se incluyó la presencia de adenopatías (OR ajustado 9,42), esplenomegalia (OR ajustado 6,25), puntuación GLILD de Baumann (OR ajustado 1,56) y recuento de células CD8+ (OR ajustado 0,9). El mayor rango de valores del score GLILD validado de Baumann le confirió un mayor impacto predictivo y diagnóstico en el modelo. El estadístico κ de Cohen fue de 0,832 (IC 95% 0,70-0,90), mostrando una alta concordancia entre ambos observadores. El modelo combinado mostró una muy buena capacidad de discriminación con un AUC validada internamente de 0,969.

Todavía no se han desarrollado estudios de cohortes longitudinales para determinar los factores de riesgo de EPIGL, y no existen estudios sobre la precisión de modelos predictivos que combinen variables clínicas, analíticas y de imagen para su diagnóstico, principalmente debido a la naturaleza de la enfermedad. Esto es de notable importancia, especialmente considerando que se sugiere que la EPIGL es el componente pulmonar de un proceso dis inmune generalizado en pacientes con IDC.V que conduce a una enfermedad linfoproliferativa multisistémica.

Además, su diagnóstico histológico definitivo mediante biopsia pulmonar conlleva una carga añadida de morbilidad y mortalidad, con tasas de mortalidad en enfermedades intersticiales pulmonares que alcanzan el 1,7% en procedimientos programados.

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto el potencial de modelos combinados que integren la clínica, las pruebas de laboratorio y los métodos sistemáticos o scores de valoración de imágenes radiológicas de TC para mejorar la precisión del diagnóstico no invasivo de la EPIGL. Si bien este estudio está limitado por el tamaño muestral y supone un abordaje exploratorio, tras futuras investigaciones y validaciones de estos sistemas en cohortes mayores, estas herramientas podrían, idealmente, incluso desplazar a las técnicas de diagnóstico agresivas como la biopsia pulmonar en pacientes seleccionados. Además, estos resultados resaltan la necesidad de estudios idealmente prospectivos y de mayor tamaño para desentrañar la fisiopatología de la EPIGL y desarrollar métodos de diagnóstico alternativos que permitan un diagnóstico temprano que conlleve una mayor supervivencia de los pacientes.

Este artículo fue publicado en la revista *Frontiers in Immunology*:

Cabanero-Navalon MD, Garcia-Bustos V, Forero-Naranjo LF, et al. Integrating Clinics, Laboratory, and Imaging for the Diagnosis of Common Variable Immunodeficiency-Related Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease. Front Immunol. 2022 Feb 23;13:813491. doi: 10.3389/fimmu.2022.813491.



Integrating Clinics, Laboratory, and Imaging for the Diagnosis of Common Variable Immunodeficiency-Related Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease

Marta Dafne Cabanero-Navalon¹, Víctor García-Bustos^{1*}, Leonardo Fabio Forero-Naranjo², Eduardo José Baettig-Arriagada³, María Núñez-Beltrán¹, Antonio José Cañada-Martínez⁴, María José Forner Giner⁵, Nelly Catalán-Cáceres⁶, Manuela Martínez Francés² and Pedro Moral Moral¹

OPEN ACCESS

Edited by:
Mikko Risto Juhana Seppänen,
Helsinki University Central Hospital,
Finland

Reviewed by:
Rik Schrijvers,
KU Leuven, Belgium
William Rae,
University of Cambridge,
United Kingdom

***Correspondence:**
Víctor García-Bustos
victorgarciabustos@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to
Primary Immunodeficiencies,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 11 November 2021

Accepted: 27 January 2022

Published: 23 February 2022

Citation:
Cabanero-Navalon MD,
García-Bustos V, Forero-Naranjo LF,
Baettig-Arriagada EJ, Núñez-Beltrán M,
Cañada-Martínez AJ, Forner Giner MJ,
Catalán-Cáceres N, Martínez Francés M
and Moral Moral P (2022) Integrating
Clinics, Laboratory, and Imaging for
the Diagnosis of Common Variable
Immunodeficiency-Related
Granulomatous-Lymphocytic
Interstitial Lung Disease.
Front. Immunol. 13:813491.
doi: 10.3389/fimmu.2022.813491

¹ Primary Immune Deficiencies Unit, Department of Internal Medicine of the University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain, ² Department of Pneumology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain, ³ Department of Radiology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain, ⁴ Department of Data Science, Biostatistics and Bioinformatics, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain, ⁵ Department of Internal Medicine, University Clinical Hospital, Valencia, Spain, ⁶ Department of Allergology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain

Background: Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) is a distinct clinic-radio-pathological interstitial lung disease (ILD) that develops in 9% to 30% of patients with common variable immunodeficiency (CVID). Often related to extrapulmonary dysimmune disorders, it is associated with long-term lung damage and poorer clinical outcomes. The aim of this study was to explore the potential use of the integration between clinical parameters, laboratory variables, and developed CT scan scoring systems to improve the diagnostic accuracy of non-invasive tools.

Methods: A retrospective cross-sectional study of 50 CVID patients was conducted in a referral unit of primary immune deficiencies. Clinical variables including demographics and comorbidities; analytical parameters including immunoglobulin levels, lipid metabolism, and lymphocyte subpopulations; and radiological and lung function test parameters were collected. Baumann's GLILD score system was externally validated by two observers in high-resolution CT (HRCT) scans. We developed an exploratory predictive model by elastic net and Bayesian regression, assessed its discriminative capacity, and internally validated it using bootstrap resampling.

Results: Lymphadenopathies (adjusted OR 9.42), splenomegaly (adjusted OR 6.25), Baumann's GLILD score (adjusted OR 1.56), and CD8+ cell count (adjusted OR 0.9) were included in the model. The larger range of values of the validated Baumann's GLILD HRCT scoring system gives it greater predictability. Cohen's κ statistic was 0.832 (95% CI 0.70–0.90), showing high concordance between both observers. The combined model showed a very good discrimination capacity with an internally validated area under the curve (AUC) of 0.969.

Conclusion: Models integrating clinics, laboratory, and CT scan scoring methods may improve the accuracy of non-invasive diagnosis of GLILD and might even preclude aggressive diagnostic tools such as lung biopsy in selected patients.

Keywords: GLILD, CVID, common variable immunodeficiency, interstitial lung disease, predictive model, diagnosis, scoring system, splenomegaly

INTRODUCTION

Common variable immunodeficiency (CVID) constitutes a group of primary antibody deficiency disorders characterized by decreased IgG serum levels together with decreased IgA and/or IgM levels and reduced antibody response to immunization or infections (1). Nowadays, thanks to the introduction of immunoglobulin replacement therapy (IgRT), infectious diseases are not the main cause of morbidity and mortality in CVID patients. Non-infectious complications such as autoimmune or benign lymphoproliferative disorders (2, 3) have emerged as the comorbidities with a larger impact on prognosis and quality of life over infections involving up to 70% of patients (4). Nevertheless, their pathophysiology and the mechanisms by which they affect determined subsets of CVID patients are still poorly understood.

Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD), a non-infectious lung complication, develops in 9% to 30% of patients with CVID (5, 6) and has been associated with long-term lung damage and poorer clinical outcomes in symptomatic patients (7, 8). After the Delphi consensus, GLILD has been defined as a distinct clinic-radio-pathological interstitial lung disease associated with lymphocytic infiltrate and/or granuloma in the lung and in whom other conditions have been considered and where possible excluded (9). Several radiological scoring systems for CT scans have recently been designed to evaluate the degree of lung injury in patients with CVID and to phenotype CT scans of GLILD patients (10, 11). However, the definite diagnosis requires both radiological and histopathological assessment of the lung, mainly through techniques such as transbronchial biopsy or video-assisted thoracoscopic (VATS) biopsy that entails important morbidity. Furthermore, it has been revealed as a major cause of death in CVID patients with non-infectious comorbidities owing to the lack of tools aiding its early clinical suspicion and diagnosis, as well as undefined therapeutic strategies (12). There is still no worldwide consensus on GLILD treatment and data on patients' overall survival, and quantitative well-controlled evidence is lacking (12). Several immunosuppressants such as corticosteroids, cyclosporine, infliximab, azathioprine, and rituximab are being used, with variable efficacy (12, 13).

Some authors have demonstrated a significant association between GLILD and other dysimmune phenomena such as immune thrombocytopenic purpura (ITP), autoimmune hemolytic anemia (AIHA), and lymphatic hyperplasia of the spleen, liver, and lymphadenopathies (14–16). Similarly, ITP and AIHA have been related to the development of granulomas in any tissue (6, 17); and therefore, GLILD may not be exclusively

considered as a localized form of lymphoproliferation, as it has been suggested in some works evaluating the features of the disease using ^{18}F -FDG PET/CT (18, 19).

Further evidence is hence required on the independent predictors of GLILD in CVID (20). Less invasive alternative diagnostic approaches must be defined to reduce the morbimortality caused by lung biopsy and diagnostic delay, especially after diagnostic tools combining clinical, radiological, and analytical information are lacking.

The aim of this study was to explore the potential use of the integration between clinical and laboratory parameters associated with GLILD in patients with CVID, as well as develop CT scan scoring systems after external validation in order to improve the diagnostic predictability of non-invasive tools in a reference unit of primary immunodeficiencies.

MATERIAL AND METHODS

Study Design and Setting

A cross-sectional study was conducted *via* a retrospective review of electronic medical records of patients with a diagnosis of CVID in the Primary Immune Deficiencies Unit of the Department of Internal Medicine of the University and Polytechnic Hospital La Fe (UPHLF). UPHLF is a university hospital with 996 beds providing tertiary care in Valencia, Spain, and has an assigned population of 300,000. Patients with primary immunodeficiencies from the Valencian Community (population, 5,000,000) in the Spanish Mediterranean region are referred to the UPHLF Primary Immune Deficiencies Unit.

Patients with CVID diagnosis aged 18 years and above in follow-up by the Primary Immune Deficiencies Unit were considered eligible. These selected patients were screened to confirm CVID diagnosis according to the European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry working definitions (21) for inclusion in the study. Cases were defined as patients with a chest high-resolution CT (HRCT) scan consistent with GLILD, a bronchoalveolar lavage excluding infectious pneumonia, and histological confirmation of GLILD after lung biopsy through both video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) or transbronchial biopsy excluding malignancy (22). The final GLILD diagnosis was established after discussion in a multidisciplinary team involving a clinical immunologist, thoracic radiologist, pathologist, pneumologist, and internal medicine specialist in primary immunodeficiencies. Controls were defined as patients with CVID in the absence of interstitial lung disease. Patients with interstitial lung disease

with no histological confirmation of GLILD or alternative diagnoses were excluded.

At the time of enrolment, both GLILD cases and controls were required to have at least one HRCT scan; IgG, IgA, IgM, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), and triglyceride levels at last follow-up prior to diagnosis or GLILD immunosuppressant therapy; one abdominal ultrasound; clinical history regarding cancer, enteropathy, autoimmune cytopenia, and lymphoproliferation; and B- and T-cell subpopulation count by flow cytometry, similar to previously described (16).

This study was approved by the Ethical Committee of Health Research Institute La Fe with registry code 2020-359-1 and was performed according to the Declaration of Helsinki.

Data Collection

Several parameters were investigated for all patients:

- Demographic variables included sex, age, and date of diagnosis.
- Clinical parameters included type 1 diabetes mellitus, polyarthritis, dermatitis, hemolytic autoimmune anemia, ITP, Evans syndrome, generalized lymphadenopathies present at chest CT and/or CT-PET scans, splenomegaly (craniocaudal length >12 cm diagnosed after an abdominal ultrasound or CT scan), hepatopathy (elevation of liver enzymes, abnormal image findings in abdominal ultrasound or CT scan, or portal hypertension), frequent respiratory airway infections (≥ 3 /year), enteropathy (chronic diarrhea or abnormal findings in a digestive tract biopsy), and presence of both solid and hematologic malignancy.
- Laboratory variables included IgG (mg/dl), IgM (mg/dl), IgA (mg/dl), LDL (mg/dl), HDL (mg/dl), triglyceride levels (mg/dl), intake of lipid-lowering drugs recorded (statins, fibrates, NPC1L1 inhibitors, and PCSK9 inhibitors were considered), CD4 cell count (cell/ μ l), CD8 cell count (cell/ μ l), CD4/CD8 ratio, CD19 cell count (cell/ μ l), and natural killer (NK) cell count (cell/ μ l).
- Respiratory parameters included lung function tests (LFTs) such as forced expiratory volume in 1 s (FEV1), forced vital capacity (FVC), gas transfer [diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide (DLCO) and corrected DLCO (cDLCO)], basal dyspnea measured by the Modified Medical Research Council (mMRC) scale, and chest CT findings of hilar lymphadenopathies, parenchymal lung disease, nodules, and bronchiectasis.
- Lung HRCT scan images and Baumann scoring method (11).
- Route and dosage of IgRT.

High-Resolution CT Scan Collection and Analysis

The most recent available HRCT scan before treatment of GLILD with immunosuppressant agents was collected for each patient for image analysis. The exclusion criteria for assessment

were as follows: presence of important motion artifacts, incomplete display of the lungs, and pneumothorax, as previously described (10).

HRCT scan images were analyzed by means of the software RadiAnt DICOM Viewer version 2021.1 (Medixant, Poznan, Poland), and the composite GLILD score of the Baumann Scoring method developed by the Chest CT Antibody Deficiency Group (11) was calculated for each patient. The scoring items included in the Baumann scoring method are represented in **Table 1**. In this scoring system, 13 different global lung image abnormalities and their extent are evaluated, creating a total of 22 scoring items per HRCT scan. The GLILD composite score is the sum of the following components: Number of lobes affected by ground glass + Ground glass due to fibrosis or inflammation + number of affected lobes with nodules smaller than 5 mm + number of affected lobes per nodules between 5 and 10 mm, + Number of affected lobes with frosted glass + frosted glass due to fibrosis or inflammation + number of affected lobes with nodules smaller than 5 mm + number of affected lobes with nodules between 5 and 10 mm + Number of Lobes Affected with Nodules Greater than 10 mm + Number of Lobes Affected with Reticulations + Predominance of Reticular Lines.

Each HRCT lung scan was blindly analyzed by a specialized thoracic radiologist and a trained pneumologist.

Statistical Analysis

The statistical analysis was conducted with the collaboration of the Department of Data Science, Biostatistics and Bioinformatics at Health Research Institute La Fe. The analyses were performed with the R statistical software version 4.0.5 (23).

Descriptive analyses were performed in order to summarize the patient characteristics. Quantitative data were expressed as mean and SD. Qualitative data were expressed as absolute count and percentage of cases. Univariate contrast analyses were only performed to check for epidemiological differences between both groups but not for predictor variables, as this type of analysis is subject to type I and II errors, as well as confusion bias. Significance was assessed by the χ^2 or Fisher's exact test for categorical variables and Student's t-test for continuous variables with normal distributions, especially to ensure the lack of demographic differences between populations. Quantile-quantile plots were used to assess normality (**Figures S1, S2** in the **Supplementary Material**). A two-tailed p-value below 0.05 was considered statistically significant.

Due to the low sample size inherent to the nature of the disease and high expected CIs, variables were selected according to previously published data and through the variable selection method *via* elastic net regularization using the *glmnet* package (24). Owing to the low number of observations with relatively high number of predictors, high collinearity, and dimensionality of the data, the elastic net technique was chosen. It outperforms both lasso and ridge methods and has been shown to serve as a variable selection technique, encouraging a grouping effect where strongly correlated predictors tend to be in or out of the model together (25). The amount of regularization was determined by the regularization parameter λ . Although

TABLE 1 | Variables of Baumann's scoring system.

Item	Definition	Score
Number of lobes with:	Number of lobes	0–6
Bronchial wall thickening		
Bronchiectasis		
Mucus large airways		
Mucus small airways		
Atelectasis		
Nodules <5 mm		
Nodules >5 to <10 mm		
Nodules >10 mm		
Lines		
Consolidation		
Linear scars and bands		
Ground-glass opacities		
Cysts		
Emphysema or bullae		
Severity of:		
Thickest bronchial wall thickening	0 = none 1 = $BW < 0.5 \times V$ 2 = $0.5 \times V < BW < V$ 3 = $BW > V$	0–3
Largest bronchiectasis	0 = none 1 = $B < 2 \times V$ 2 = $2 \times V < B < 3 \times V$ 3 = $B > 3 \times V$	0–3
Pathologic mechanism of:		
Cause ground-glass opacities	0 = fibrosis 1 = inflammation	0–1
Predominant type lines	0 = inflammation 1 = fibrosis 2 = mixed type	0–2
Presence of:		
Trapped air inspiratory scan	0 = no 1 = yes	0–1
Trapped air expiratory scan		
Lymphadenopathy hilar mediastinal		
Size of:		
Lymphadenopathy hilar mediastinal	Size (shortest axis) of largest lymph node	Millimeters

B, bronchial lumen; BW, bronchial wall; V, accompanying vessel.

assuming a lack of statistical significance due to high expected CIs, variables were included in the subsequent model. A Bayesian regression was performed with the final selected variables in order to jointly consider the relationship of the variables to each other in the prediction of the effect. The discriminative performance of the model was estimated by means of the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC) curve (Figure 1B), and the best model including clinical, laboratory, and radiological parameters was selected. The internal validation of the model was assessed by a bootstrap technique using 500 generated bootstrap samples (26). Further information on the Bayesian model can be consulted in the **Supplementary Material**.

Finally, a nomogram was constructed to generate the graphic representation of the numerical probability of GLILD by integrating the final variables included in the model (Figure 1A).

To analyze the agreement in the measurements of Baumann's GLILD composite score between both observers, Cohen's kappa (κ) coefficient and CIs were calculated.

RESULTS

A total of 50 patients with CVID were enrolled in the study. Of the 50 CVID patients, 7 patients received a definite GLILD diagnosis and were considered as cases, and 2 patients with undefined interstitial disease pending biopsy and multidisciplinary assessment were excluded from the analysis. Only 2 controls underwent lung biopsy: one for severe bronchiectasis after lung transplant and the other one for etiological diagnosis of severe bilateral pneumonia without microbiological isolates, which finally showed *Pneumocystis jiroveci*. No significant differences were observed in age, sex, and diagnostic delay of both groups (Students t-test p-value = 0.128, Fisher's test p-value = 1, Mann-Whitney test p-value = 0.593, respectively), although patients with GLILD diagnosis tended to be younger than control patients.

Thirty-seven out of 48 enrolled patients, with all GLILD cases included, underwent a genetic screening. Only one patient with GLILD presented a variant in PIK3R1 gene of uncertain significance. Among controls, 1 patient showed a pathologic mutation in NFKB2 gene, 1 patient had a pathological mutation in PIK3CD gene, 3 patients presented variants in NFKB1 gene (1 pathological and 2 possibly pathological), 1 patient had a non-pathological variant in RAG1 gene, and one patient presented a variant in TCF3 gene. Mutations in TCF3 gene have been related to immunodeficiencies and have been described in agammaglobulinemia with an autosomal dominant pattern of inheritance (27). The variant c.1555A>G found in our patient has not previously been described in CVID patients and has been previously reported in a healthy population with a very low frequency. After the application of several *in silico* predictive algorithms on the basis of evolutionary conservation, protein structure, protein function, and alignment and measurement of similarity between variant sequence and protein sequence homologs, it could only be interpreted as a variant of uncertain significance.

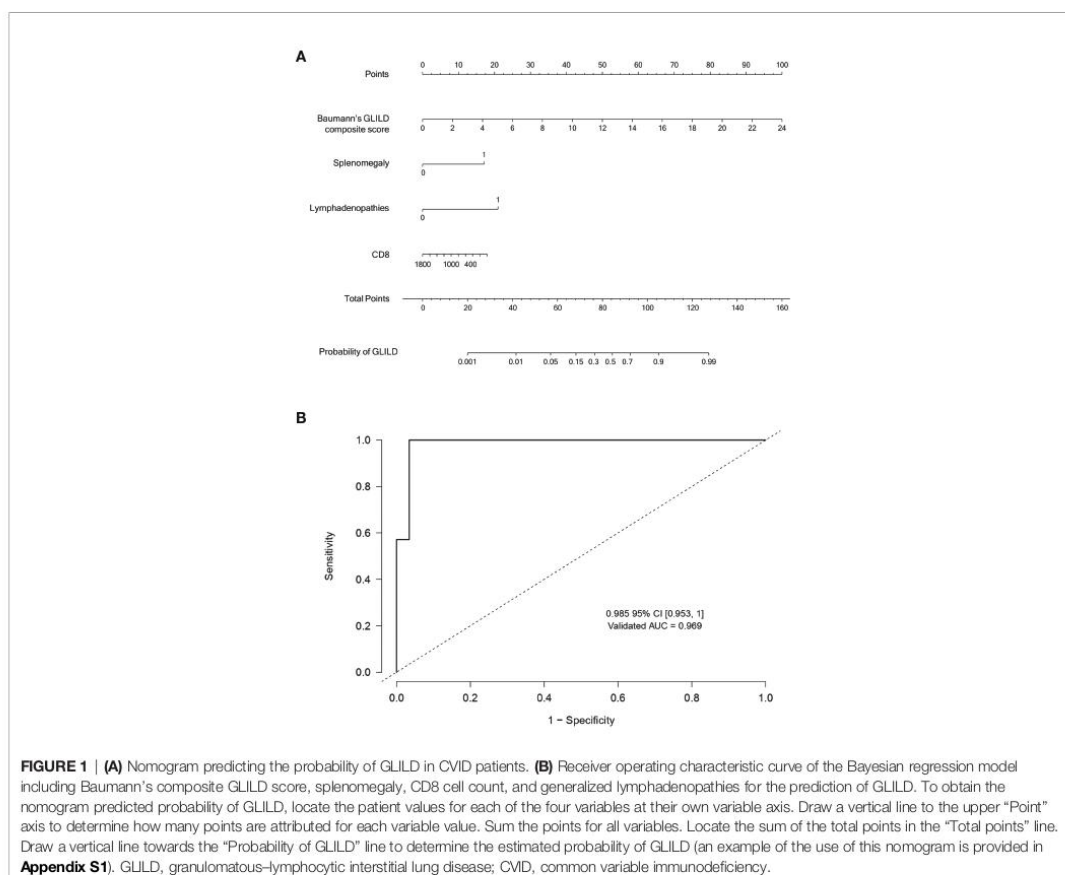
Further information on the genetic mutations or variants is described in **Table 2**.

All patients were receiving IgRT. Six out of 7 GLILD patients and 31 out of 41 patients were under subcutaneous IgRT (ScIgRT). No differences were observed in the mean weekly Ig dose between both groups, being 8 and 11.69 g/week. None of the cases had smoking habits, and only one of the controls smoked.

Demographic parameters are summarized in **Table 3**.

Baseline Clinical and Laboratory Parameters

Baseline comorbidities were analyzed in both groups at the time of inclusion. The absolute frequency of benign lymphoproliferative-related and autoimmune-related disorders was higher in the cases, as seen in **Table 3**. Namely, the percentage of patients presenting type 1 diabetes, hemolytic immune anemia, and immune thrombocytopenia—and hence, Evans syndrome—as well as splenomegaly and generalized lymphadenopathies was higher in patients suffering from GLILD than in control CVID patients with the Chapel "infection only" phenotype (7). However, the absolute



frequency of recurrent airway infections, enteropathy, polyarthralgia, and malignancy tended to be increased in the control group (Table 3).

Pulmonary Functional Assessment in Patients With Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease

Of the 7 patients with GLILD, two patients had undergone more than 1 LFT prior to diagnosis. Both of them presented significant moderate alterations: patient number 2 mainly progressed with the CO diffusing capacity being affected (decrease in 28% of the cDLCO). Patient number 5 showed both cDLCO impairment and a moderate restrictive ventilatory alteration through a reduction of 4.65% in the FVC from previously normal values in two sequential LFTs but with a known restrictive pattern due to a decreased total lung capacity (TLC) (68%) at the expense of decreased residual volume (RV) (38%).

Among the rest of the patients, 3 of them had undergone only 1 LFT before the time of diagnosis, and two of whom already

presented clearly altered findings easily attributable to GLILD, namely, restrictive patterns and reduced cDLCO.

Treatment and Follow-Up

Of the seven patients with GLILD, two of the patients presented functional and radiological progression in LFT prior to diagnosis. One received high-dose corticoid treatment with progressive descent to the minimum dose with poor response of both functional and image alterations, but without further significant progression, and the other was treated with mycophenolate following a 4-week rituximab regimen, with partial response and further stabilization. During the follow-up of the rest of the patients after diagnosis, two of them required treatment with azathioprine following rituximab in the same therapeutic scheme due to progression. A long-term response was achieved in one, but the other patient required two treatment cycles for relapse and further progression after a medium-term response. Three patients have not required treatment during follow-up to date.

Cabanero-Navalon et al.

Clinics, Laboratory, and Imaging in GUILD

TABLE 2 | Description of the genetic mutations and variants.

Patient	Gene	Genetic mutation/variant	Protein change	Previously described in general population	Previously described in CVID patients	Interpretation
1 (GUILD)	PIK3R1 (heterozygosis)	c.5A>T	p.Tyr2Phe	Yes	No	Uncertain significance
2 (non-GUILD)	NFKB2 (heterozygosis)	c.2600_2619del	p.Ala867Glyfs*12	No	No	Pathological
3 (non-GUILD)	PIK3CD (homozygosis)	c.2608C>[	p.Arg870Ter	No	No	Pathological
4 (non-GUILD)	NFKB1 (heterozygosis)	c.94C>T	p.Gln32Ter	No	No	Pathological
5 (non-GUILD)	NFKB1 (heterozygosis)	c.983C>A	p.Ala328Asp	No	No	Possibly pathological significance
6 (non-GUILD)	RAG1 (heterozygosis)	c.1186C>T	p.Arg396Cys	Yes	No	Non-pathological*
7 (non-GUILD)	NFKB1 (heterozygosis)	c.920A>G	p.His307Arg	No	No	Possibly pathological significance
8 (non-GUILD)	TCF3 (heterozygosis)	c.1555A>G	p.Lys519Glu	Yes	No	Uncertain significance

CVID, common variable immunodeficiency; GUILD, granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease.

*This mutation has been associated with severe combined immunodeficiency in homozygosis. The identification of this mutation in heterozygosis is not enough to explain the cause of the disease.

TABLE 3 | Patient characteristics.

Variable	CVID (n = 41)	GUILD (n = 7)
	Mean (SD)/n (%)	Mean (SD)/n (%)
Age	44.07 (15.74)	34 (17)
Male sex	17 (41.46)	3 (42.86)
Diagnostic delay of CVID (years)	11.08 (15.72)	8.43 (6.16)
Comorbidities		
Type I diabetes mellitus	2 (4.88)	1 (14.29)
Upper airway infections	26 (63.41)	3 (42.86)
Polyarthralgia	5 (12.2)	0 (0)
Skin disease	7 (17.07)	2 (28.57)
Autoimmune hemolytic anemia	2 (4.88)	4 (57.14)
Immune thrombocytopenic purpura	8 (19.51)	3 (42.86)
Evans syndrome	3 (7.32)	2 (28.57)
Lymphadenopathies	7 (17.07)	6 (85.71)
Splenomegaly	8 (19.51)	6 (85.71)
Liver affection	4 (9.76)	1 (14.29)
Enteropathy	21 (51.22)	2 (28.57)
Malignant tumor	4 (9.76)	0 (0)
Lung parameters		
Lung function test		
Normal LFT	27 (79.41)	2 (33.33)
Obstructive LFT	6 (17.65)	1 (16.67)
Restrictive LFT	1 (2.94)	3 (50)
FEV1	95.18 (31.64)	87.5 (19.03)
FVC	103.69 (21.8)	90.17 (19.36)
cDLCO	79 (19.58)	70 (12.71)
Dyspnea degree (mMRC)		
0	33 (80.49)	6 (85.71)
1	4 (9.76)	1 (14.29)
3	1 (2.44)	0 (0)
4	3 (7.32)	0 (0)
Laboratory parameters		
Detected genetic mutation	8 (26.67)	1 (14.29)
IgG	965.33 (224.05)	1098.57 (192.17)
IgM	151.18 (425.79)	19.14 (25.22)
IgA	68.67 (204.88)	12.86 (20.81)
CD4	686.76 (482.42)	308.14 (132.89)
CD8	579.61 (412.06)	196.14 (88.48)
CD4/CD8	1.49 (0.91)	1.72 (1.01)
CD19	158.08 (139.45)	41 (54.75)
Natural killers	177.89 (109.2)	95 (52.68)
HDL cholesterol	50.56 (16.08)	43 (12.68)
LDL cholesterol	97.73 (34.95)	83.71 (25.32)
Triglycerides	93.68 (42.7)	124 (63.44)
Total cholesterol	167.22 (44.2)	151.57 (15.31)
Lipid-lowering drugs	0 (0)	5 (11)

cDLCO, corrected diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide; FVC, forced vital capacity; FEV1, forced expiratory volume in 1 s; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; LFT, lung function test; CVID, common variable immunodeficiency; GUILD, granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease; mMRC, Modified Medical Research Council.

Inter-Observer Agreement of Lung Radiological Findings

Bronchiectasis was present in 28.6% (2) of GLILD patients and in 44.7% (17) of controls, and their global presence in all patients who underwent an HRCT ($n = 45$) was 42.2%. Furthermore, 85.7% ($n = 6$) of cases showed hilar lymphadenopathies versus 24.4% ($n = 10$) in the control group. The number of lobes with nodules, reticulation, and ground-glass opacities after evaluation by both observers is represented in **Table 4**. Furthermore, the bronchiectasis and bronchial wall thickening scores, the airway disease composite score, and total Baumann's score are represented in **Table 5**. Blinded Baumann's GLILD composite scores were substantially higher for cases in both observers (**Table 4**). The mean GLILD score of both measures for GLILD patients was 17.07 (7), while it was 2.61 (3.72) for controls. Cohen's κ statistic was 0.832 (95% CI 0.70–0.90), showing high concordance between the measures taken by the specialized thoracic radiologist and the trained pneumologist. Details on the radiological findings observed can be seen in **Figure 2**.

Exploring Granulomatous–Lymphocytic Interstitial Lung Disease Associations Through Bayesian Regression

Several regression models were built through the elastic net variable selection technique including clinical, radiological, and laboratory parameters previously associated with GLILD in order to determine the set of interrelated variables with greater discrimination capacity. Mean Baumann's composite GLILD score of both observers, splenomegaly, CD8 cell count, and generalized lymphadenopathies were selected by the elastic net model (regularization parameter λ of 0.1228). After inclusion in a

Bayesian multivariable regression approach to explore their associations to GLILD, the presence of lymphadenopathies and splenomegaly was the most powerful predictor, with odds ratios (ORs) of 9.42 and 6.25, respectively. The OR of Baumann's GLILD score was 1.56, and the CD8 cell count was found to be inversely related to the likelihood of GLILD (OR 0.9). However, as it can be seen in the constructed nomogram with the four variables (Baumann's GLILD score, splenomegaly, CD8 cell count, and presence of lymphadenopathies) for the estimated probability of GLILD (**Figure 1**), the larger range of values of the validated Baumann's GLILD scoring system gives it greater predictability.

This exploratory model was validated by calculating the AUC of the ROC curve (**Figure 1**), with a result of 0.985. The internal validation of the model in 500 generated bootstrap samples showed a very good discrimination capacity, with a validated AUC of 0.969.

DISCUSSION

The main findings of this study can be summarized as follows: i) the use of integrative predictive tools combining clinical, laboratory, and radiologic scoring parameters might be useful for the early diagnosis of GLILD in COVID patients. ii) The presence of splenomegaly, lymphadenopathies, low CD8 cell count, and high Baumann's GLILD composite score predicts with almost perfect accuracy the presence of histologically confirmed GLILD even after internal validation. iii) Baumann's GLILD score is strongly correlated to GLILD probability and is highly reproducible between trained observers.

Longitudinal cohort studies have not yet been developed to determine risk factors for GLILD, and there are no studies on the accuracy of predictive models combining clinical, analytical, and

TABLE 4 | Differences in the observers' findings of variables included in Baumann's composite score: nodules, reticulation, and ground-glass opacities, and composite GLILD score.

Variable	Observer 1 (pneumologist)		Observer 2 (thoracic radiologist)	
	Mean	SD	Mean	SD
Number of lobes with nodules >5 to <10 mm				
GLILD	3.66	2.58	3.80	3.03
Non-GLILD	0.00	0.00	0.18	0.55
Number of lobes with nodules >10 mm				
GLILD	0.50	0.84	1.25	1.89
Non-GLILD	0.03	0.18	0.03	0.19
Number of lobes with nodules <5 mm				
GLILD	4.66	2.33	5.40	1.34
Control	0.37	1.07	1.78	2.00
Number of lobes with reticulation				
GLILD	4.83	1.94	2.60	2.30
Non-GLILD	0.93	1.36	0.30	0.67
Number of lobes with GGO				
GLILD	4.33	2.16	1.60	2.07
Non-GLILD	0.50	1.11	0.48	1.40
GLILD score				
GLILD	19	9.27	15.14	4.74
Non-GLILD	2.32	3.04	2.9	4.41

GLILD, granulomatous–lymphocytic interstitial lung disease; GGO, ground-glass opacities.

TABLE 5 | Differences in the observers' findings in Baumann's composite scores.

Variable	Observer 1 (pneumologist)		Observer 2 (thoracic radiologist)	
	Mean	SD	Mean	SD
Bronchiectasis				
GLILD	3.83	5.74	0.20	0.45
Non-GLILD	3.70	5.11	2.63	3.87
Bronchial wall thickening				
GLILD	9.66	5.64	1.40	2.60
Non-GLILD	7.66	6.24	2.63	4.43
Airway disease score				
GLILD	16.33	10.23	4.20	4.91
Control	13.96	11.84	7.11	9.78
GLILD score				
GLILD	19	9.27	15.14	4.74
Non-GLILD	2.32	3.04	2.9	4.41
Total score				
GLILD	45.16	14.21	99.40	45.92
Non-GLILD	17.96	15.04	95.93	39.04

GLILD, granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease.

imaging variables for its diagnosis, mainly due to the nature of the disease. This is of remarkable importance, especially considering that GLILD has been defined as a distinct clinic-radio-pathological interstitial lung disease (9) and suggested to be the pulmonary component of a generalized dysimmune process in patients with CVID leading to a multisystemic lymphoproliferative disease (28). Furthermore, its definite histological diagnosis through lung biopsy carries an added burden of morbidity and mortality, with mortality rates for lung interstitial diseases reaching 1.7% in elected procedures (29). Here we present a first study integrating comorbidities and laboratory findings previously associated with the GLILD phenotype, including Baumann's CT scoring system after external validation in our cohort, combining robust elastic net and Bayesian regression techniques. Despite its exploratory purpose and limited sample size from a reference unit of primary immunodeficiencies, this model demonstrates a very high discrimination capacity even after internal validation through the bootstrap technique that prompts replication in larger cohorts and multicenter studies.

However, this work presents obvious limitations. The small sample size due to the low prevalence of the disease and the single-center approach raises the probability of type II error, and the statistical potency is limited; therefore, this study was conceived exploratory in nature. As no prospective analyses have been performed to date, our work shares the limitation of a retrospective design with previous studies (14–16). Moreover, there may be a selection bias as a result of including patients from a tertiary care referral unit with potentially different characteristics from those of patients in the general population. The model also lacks an external validation with patients from other centers, subpopulations, and geographical origins. During the performance of this study and the collection time of the variables, none of the GLILD patients was actively treated with immunosuppressant agents. However, one of them had previously (6 years prior to GLILD diagnosis and variable collection) received a 4-week regimen of rituximab therapy due to benign generalized lymphadenopathies,

and this fact must be considered, as it could influence some of the parameters in the model.

Beyond these constraints, several important concerns arise from the model. On the one hand, according to our data and as previously described, splenomegaly and lymphadenopathies are associated with GLILD (13–16). Both lymphadenopathies and splenomegaly are easily detectable by physical examination and CT scan, making these variables extremely useful in defining determined subsets of CVID patients who may develop GLILD or present with compatible image findings in clinical practice. These results also concur with the previously stated idea that GLILD is the lung expression of a systemic dysimmune lymphoproliferation disorder (28). This gains importance considering the difficulty of establishing a clinical suspicion based only on clinical symptoms, as patients are asymptomatic or present with completely unspecific symptoms, such as dyspnea on exertion or cough (12, 30). In fact, in our work, the degree of dyspnea was almost unchanged in both cases and controls (Table 1), with findings that contrast with the found alterations in LFTs (Table 1).

Almost 60% of our CVID patients with GLILD suffered from AIHA, while it was not observed in any of the control patients, as in the study by Chase and colleagues 2013 (13). A trend of lower absolute levels of IgA was also more frequently observed for cases. However, as in the work by Hartono and colleagues (14), it was not identified as an independent predictive factor itself, contrary to previous studies (13, 16). The prevalence of polyarthritis in both groups of patients was similar. In fact, none of our 7 cases suffered from arthralgia or arthritis, unlike previously suggested (15). Interestingly, the absolute frequency of patients with enteropathy seemed to be higher in the control group, which is striking, as it has been traditionally considered a non-infectious frequent complication possibly related to immune infiltration (19).

On the other hand, a lower CD8+ cell count appeared to be associated with the presence of histologically confirmed GLILD in the multivariable Bayesian model. Some studies have delved into peripheral blood lymphocyte subpopulations in

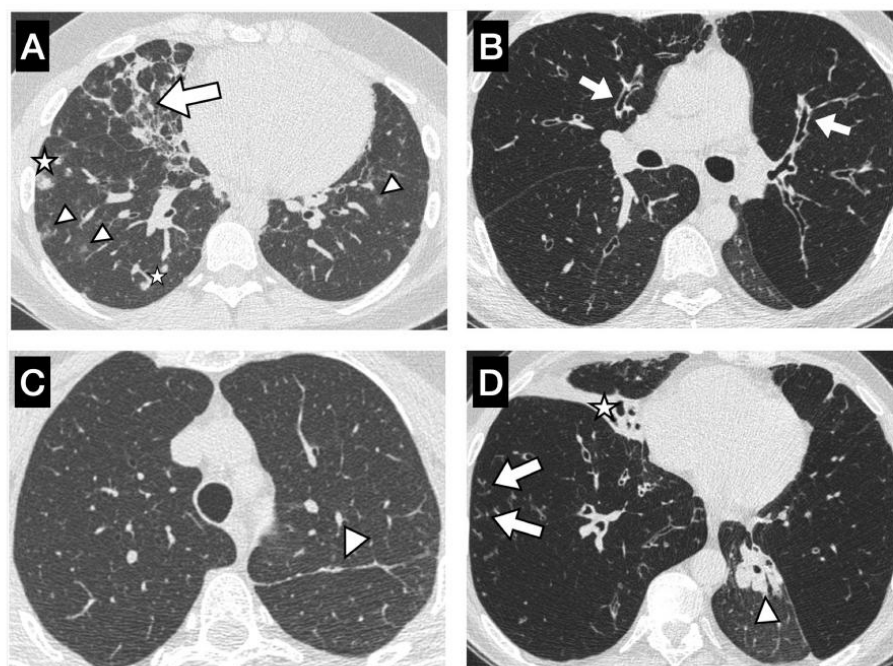


FIGURE 2 | Chest CT from 4 different patients of our study with some of the evaluated parameters. **(A)** GLILD patient with multiple bilateral ground-glass nodules <5 mm (arrowheads), solid nodules (stars), and mixed (inflammatory and fibrotic) lines (arrow). **(B)** Non-GLILD patient with diffuse mild bronchial wall thickening and mild bronchiectasis (arrows) with air trapping predominantly in the upper lobes and partial atelectasis of left lower lobe. **(C)** Non-GLILD patient with linear parenchymal band in the left upper lobe (arrowhead). **(D)** Non-GLILD patient with mucus plugging in large airways of the left lower lobe with >50% atelectasis of the same lobe (arrows), complete atelectasis of the middle lobe (star), tree in bud pattern in the right lower lobe (arrows), and air trapping on the left upper and right lower lobes. GLILD, granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease.

characteristics in CVID patients with GLILD (16, 19, 31, 32). Our findings are in agreement with other reports in cellular defects in patients suffering from GLILD (16), autoimmune and granulomatous disorders (32), or interstitial lung disease (31), which also present an association between lower CD8+ subpopulations and the frequency of GLILD in that subgroup. Furthermore, and in concordance with our work, Bateman et al. (2012) (32) reported lower CD4+ and CD8+ lymphocyte counts in patients with CVID and GLILD compared to non-GLILD CVID patients. This was also documented by Kellner et al. (2019) (31) in their USIDNET Registry, with the most dramatic difference seen in the lower number of CD8+ cytotoxic T cells in patients with interstitial lung disease compared to those without lung disease. This finding could be related to a possible immune-mediated mechanism of lymphopenia, a frequent systemic comorbidity in patients with GLILD. Due to the limited sample size, the association of other cell compartments with GLILD cannot be firmly affirmed; however, a trend of lower CD19+ cell count was observed in the cases; and several authors previously stated that

patients with splenomegaly, granulomas, enteropathy (33, 34), or interstitial lung disease (31, 33) had a lower B CD19+ cell compartment.

Recently, impaired HDL function has been linked to systemic inflammation in CVID patients with dysimmune complications (35). Therefore, we included for the first time its assessment in our GLILD cohort as well as other metabolic parameters such as LDL and TG. Despite that our results are limited, no absolute differences were observed between the lipid metabolism of cases and controls, and higher levels were not selected as protective factors in the model. Further studies with a larger sample size are needed to determine whether HDL function plays a role in the inflammatory pathways leading to the development of GLILD in CVID.

Interestingly, bronchiectasis was less frequently seen in our series than in other works in both cases and controls. While in the study by Meerburg and colleagues (10) bronchiectasis was present in 82% of all patients, the prevalence in our series was almost half, at 42%. Unlike previously reported (16), the absolute frequency of bronchiectasis was higher in the control group than

in patients with GLILD. Additionally, the important differences in the higher prevalence of hilar lymphadenopathies in the cases advocate the idea that a common pathway of extrapulmonary lymphoproliferation may exist.

Several scoring systems have been developed for HRCT characterization in patients with CVID, such as the Baumann and Hartman methods (10, 11, 36). Despite that the Hartmann score has been reported to have slightly better inter-observer reproducibility for evaluating GLILD and airway disease, Baumann's composite GLILD score was chosen in this study due to its easier application in clinical practice, good reproducibility for GLILD assessment, and lesser extensiveness. In our external validation of the Baumann score for GLILD prediction, our results improved those reported by Meerburg et al. (10), who showed an intraclass correlation coefficient of 0.74 and was similar to that observed for Hartmann's GLILD composite score (0.84). We believe that this scoring system is a valuable outcome measure in research, but also its application in clinical practice and referral units might be useful for improving GLILD diagnostic accuracy.

To date, some works have been developed to identify potential predictors of GLILD that might aid in identifying subgroups of patients prone to developing GLILD or enhancing its clinical suspicion when facing compatible clinical symptoms and CT scan findings (14–16). However, GLILD is a clinical entity that has been recently redefined. Evidence is still scarce, and studies, despite some having large sample sizes, are not exempt from limitations. On the one hand, previous works include both histologically diagnosed and non-diagnosed patients as GLILD cases. As pathological confirmation in patients with clinical, analytical, and radiological suspicion is considered the gold standard for diagnosis, it could represent a selection bias, particularly including false positives, and could limit their result interpretation, extrapolation, and external validity. Therefore, in this study, only histologically confirmed GLILD cases after lung biopsy were included. In addition, like this work, all of them have a retrospective approach, but none has performed any internal or external validation, and despite carrying out univariate analyses with multiple comparisons, no p-value penalization is applied, resulting in an inflated type I error. Moreover, in the works by Mannina (15) and Cinetto (16), univariate analysis is used as a variable selection method for their inclusion in the regression model, which is a questionable approach since univariate analyses are less comprehensive and do not consider inter-variable relationships, making the final

model prone to exclusion of false negatives, the inclusion of false positives, and important confusion biases.

In conclusion, our findings suggest the potential of models integrating clinics, laboratory, and CT scan scoring methods to improve the accuracy of non-invasive diagnosis of GLILD, which, after further research and validation, might even preclude aggressive diagnostic tools such as lung biopsy in selected patients. Additionally, these results highlight the need for ideally prospective and larger studies in order to unravel the pathophysiology of GLILD as well as develop diagnostic tools, allowing early diagnosis and leading to better long-term outcomes.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC-N, VG-B, LF-N, and PMM conceived the idea, searched the bibliographic materials, and reviewed the existing literature. MC-N, VG-B, and PMM developed the figures and wrote the article. LF-N and EB-A analyzed the HRCT. AC-M and VG-B carried out the statistical analysis. MN-B, NC-C, MMF, and MFG reviewed the literature and contributed to the writing of the article. PMM supervised the work. MN-B and PMM are responsible for the care of the patients. All authors provided critical feedback and helped shape the final version of the manuscript.

FUNDING

The article processing charge for publication has been funded by CSL Behring. The funding company has not intervened in the development of the project.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.813491/full#supplementary-material>

REFERENCES

1. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* (2018) 38(1):96–128. doi: 10.1007/s10875-017-0464-9
2. Orange JS, Grossman WJ, Navickis RJ, Wilkes MM. Impact of Trough IgG on Pneumonia Incidence in Primary Immunodeficiency: A Meta-Analysis of Clinical Studies. *Clin Immunol* (2010) 137(1):21–30. doi: 10.1016/j.clim.2010.06.012
3. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and Mortality in Common Variable Immune Deficiency Over 4 Decades. *Blood* (2012) 119(7):1650–7. doi: 10.1182/blood-2011-09-377945
4. Bonagura VR, Marchlewski R, Cox A, Rosenthal DW. Biologic IgG Level in Primary Immunodeficiency Disease: The IgG Level That Protects Against Recurrent Infection. *J Allergy Clin Immunol* (2008) 122(1):210–2. doi: 10.1016/j.jaci.2008.04.044
5. Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-Lymphocytic Lung Disease Shortens Survival in Common Variable Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2004) 114(2):415–21. doi: 10.1016/j.jaci.2004.05.057

6. Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous Disease in Common Variable Immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* (2005) 5(5):370–5. doi: 10.1007/s11882-005-0008-x
7. Chapel H, Lucas M, Patel S, Lee M, Cunningham-Rundles C, Resnick E, et al. Confirmation and Improvement of Criteria for Clinical Phenotyping in Common Variable Immunodeficiency Disorders in Replicate Cohorts. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 130(5):1197–8.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.046
8. Verma N, Grimbacher B, Hurst JR. Lung Disease in Primary Antibody Deficiency. *Lancet Respir Med* (2015) 3(8):651–60. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00202-7
9. Hurst JR, Verma N, Lowe D, Baxendale HE, Jolles S, Kelleher P, et al. British Lung Foundation/United Kingdom Primary Immunodeficiency Network Consensus Statement on the Definition, Diagnosis, and Management of Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease in Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2017) 5(4):938–45. doi: 10.1016/j.jaip.2017.01.021
10. Meerburg JJ, Hartmann JJC, Goldacker S, Baumann U, Uhlmann A, Andrinopoulou ER, et al. Analysis of Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease Using Two Scoring Systems for Computed Tomography Scans-A Retrospective Cohort Study. *Front Immunol* (2020) 11:589148. doi: 10.3389/fimmu.2020.589148
11. Schutz K, Alessandro D, Grimbacher B, Haddock J, Bruining A, Driessen G, et al. Imaging of Bronchial Pathology in Antibody Deficiency: Data From the European Chest CT Group. *J Clin Immunol* (2019) 39(1):45–54. doi: 10.1007/s10875-018-0577-9
12. Lamers OAC, Smits BM, Leavis HL, de Bree GJ, Cunningham-Rundles C, Dalm VASH, et al. Treatment Strategies for GLILD in Common Variable Immunodeficiency: A Systematic Review. *Front Immunol* (2021) 12:606099. doi: 10.3389/fimmu.2021.606099
13. Chase NM, Verbsky JW, Hintermeyer MK, Waukau JK, Tomita-Mitchell A, Casper JT, et al. Use of Combination Chemotherapy for Treatment of Granulomatous and Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Patients With Common Variable Immunodeficiency (CVID). *J Clin Immunol* (2013) 33(1):30–9. doi: 10.1007/s10875-012-9755-3
14. Hartono S, Motosue MS, Khan S, Rodriguez V, Iyer VN, Divekar R, et al. Predictors of Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease in Common Variable Immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* (2017) 118(5):614–20. doi: 10.1016/j.janai.2017.01.004
15. Mannina A, Chung JH, Swigris JJ, Solomon JJ, Huie TJ, Yunt ZX, et al. Clinical Predictors of a Diagnosis of Common Variable Immunodeficiency-Related Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease. *Ann Am Thorac Soc* (2016) 13(7):1042–9. doi: 10.1513/AnnalsATS.201511-728OC
16. Cinetto F, Scarpa R, Carabba M, Firinu D, Lougaris V, Buso H, et al. Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Multicenter Retrospective Study of Patients From Italian PID Referral Centers. *Front Immunol* (2021) 12:627423. doi: 10.3389/fimmu.2021.627423
17. Ramyar A, Aghamohammadi A, Moazzami K, Rezaei N, Yeganeh M, Cheraghi T, et al. Presence of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura and Autoimmune Hemolytic Anemia in the Patients With Common Variable Immunodeficiency. *Iran J Allergy Asthma Immunol* (2008) 7(3):169–75.
18. Jolles S, Carne E, Brouns M, El-Shanawany T, Williams P, Marshall C, et al. FDG PET-CT Imaging of Therapeutic Response in Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* (2017) 187(1):138–45. doi: 10.1111/cei.12856
19. Fraz MSA, Moe N, Revheim ME, Stavrinou ML, Durheim MT, Nordoy I, et al. Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease in Common Variable Immunodeficiency-Features of CT and 18F-FDG Positron Emission Tomography/CT in Clinically Progressive Disease. *Front Immunol* (2021) 11:617985. doi: 10.3389/fimmu.2020.617985
20. Somogyi V, Eichinger M, Lasitschka F, Kappes J, Kreuter M. Interstitial Lung Disease in CVID (GLILD): Clinical Presentation and Comparison to CVID Without ILD. *Eur Respir J* (2019) Suppl. 63:PA1409.
21. Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, van Montfrans J, et al. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2019) 7(6):1763–70. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.004
22. Dhalla F, Lochlainn DJM, Chapel H, Patel SY. Histology of Interstitial Lung Disease in Common Variable Immune Deficiency. *Front Immunol* (2020) 11:605187. doi: 10.3389/fimmu.2020.605187
23. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org/>.
24. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw* (2010) 33(1):1–22. doi: 10.18637/jss.v033.i01
25. Zou H, Hastie T. Regularization and Variable Selection via the Elastic Net. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol* (2005) 67(2):301–20. doi: 10.1111/j.1467-9868.2005.00503.x
26. Steyerberg EW, Harrell FE Jr, Borsboom GJ, Eijkemans MJ, Vergouwe Y, Habbema JD. Internal Validation of Predictive Models: Efficiency of Some Procedures for Logistic Regression Analysis. *J Clin Epidemiol* (2001) 54(8):774–81. doi: 10.1016/s0895-4356(01)00341-9
27. Ameratunga R, Woon ST, Bryant VL, Steele R, Slade C, Leung EY, et al. Clinical Implications of Digenic Inheritance and Epistasis in Primary Immunodeficiency Disorders. *Front Immunol* (2018) 8:1965. doi: 10.3389/fimmu.2017.01965
28. Rao N, Mackinnon AC, Routes JM. Granulomatous and Lymphocytic Interstitial Lung Disease: A Spectrum of Pulmonary Histopathologic Lesions in Common Variable Immunodeficiency-Histologic and Immunohistochemical Analyses of 16 Cases. *Hum Pathol* (2015) 46(9):1306–14. doi: 10.1016/j.humpath.2015.05.011
29. Hutchinson JP, Fogarty AW, McKeever TM, Hubbard RB. In-Hospital Mortality After Surgical Lung Biopsy for Interstitial Lung Disease in the United States, 2000 to 2011. *Am J Respir Crit Care Med* (2016) 193(10):1161–7. doi: 10.1164/rccm.201508-1632OC
30. Baumann U, Routes JM, Soler-Palacin P, Jolles S. The Lung in Primary Immunodeficiencies: New Concepts in Infection and Inflammation. *Front Immunol* (2018) 9:1837. doi: 10.3389/fimmu.2018.01837
31. Kellner ES, Fuleihan R, Cunningham-Rundles C, USIDNET Consortium, Wechsler JB. Cellular Defects in CVID Patients With Chronic Lung Disease in the USIDNET Registry. *J Clin Immunol* (2019) 39(6):569–76. doi: 10.1007/s10875-019-00657-w
32. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A, et al. T Cell Phenotypes in Patients With Common Variable Immunodeficiency Disorders: Associations With Clinical Phenotypes in Comparison With Other Groups With Recurrent Infections. *Clin Exp Immunol* (2012) 170(2):202–11. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04643.x
33. 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. doi: 10.1182/blood-2007-06-091744
34. Malphettes M, Gérard L, Carmagnat M, Mouillot G, Vince N, Boutboul D, et al. Late-Onset Combined Immune Deficiency: A Subset of Common Variable Immunodeficiency With Severe T Cell Defect. *Clin Infect Dis* (2009) 49(9):1329–38. doi: 10.1086/606059
35. Macpherson ME, Halvorsen B, Yndestad A, Ueland T, Mollnes TE, Berge RK, et al. Impaired HDL Function Amplifies Systemic Inflammation in Common Variable Immunodeficiency. *Sci Rep* (2019) 9(1):9427. doi: 10.1038/s41598-019-45861-1
36. Wainwright CE, Vidmar S, Armstrong DS, Byrnes CA, Carlin JB, Cheney J, et al. Effect of Bronchoalveolar Lavage-Directed Therapy on Pseudomonas Aeruginosa Infection and Structural Lung Injury in Children With Cystic Fibrosis: A Randomized Trial. *JAMA* (2011) 306(2):163–71. doi: 10.1001/jama.2011.954

Conflict of Interest: The authors declare that this study received funding from CSL Behring Ltd. The funder had the following involvement with the study: funding the article processing charge.

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in

Cabanero-Navalon et al.

Clinics, Laboratory, and Imaging in GLILD

this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Cabanero-Navalon, Garcia-Bustos, Forero-Naranjo, Baettig-Arriagada, Núñez-Beltrán, Cañada-Martínez, Forner Giner, Catalán-Cáceres, Martínez Francés and Moral Moral. This is an open-access article distributed

under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6.3. Estudio de la microbiota asociada a los diferentes fenotipos clínicos y a la dis inmunidad en la Inmunodeficiencia Común Variable

Resumen en castellano:

La IDCV es la inmunodeficiencia primaria sintomática más común caracterizada por una disminución en el nivel de inmunoglobulinas e infecciones recurrentes. Su etiología sigue siendo desconocida, y algunos pacientes presentan complicaciones autoinmunes o inflamatorias no infecciosas graves con alta morbilidad asociada. Recientemente, la disbiosis intestinal se ha propuesto como uno de los impulsores de la disregulación inmunológica. Se postula que la disfunción inmunitaria en estos pacientes podría resultar en una mayor translocación microbiana a través de la barrera intestinal, llevando a un estado persistente de activación inmune sistémica y, consecuentemente, a la ruptura de la homeostasis inmune. Esto derivaría en disregulación inmune local y sistémica, posiblemente responsable de complicaciones no infecciosas asociadas a la propia IDCV.

Se están realizando investigaciones en torno al microbioma pulmonar y su posible papel en la disfunción inmune local y linfoproliferación en otras patologías sistémicas, además de su potencial conexión bidireccional con el microbioma intestinal, conocida como eje intestino-pulmón. Sin embargo, aún no existen estudios centrados en el microbioma respiratorio en IDCV, y la evidencia disponible sobre las alteraciones de la microbiota según fenotipos clínicos y complicaciones asociadas es todavía escasa. Además, apenas existe información sobre las alteraciones microbianas con resolución a nivel de especie.

Este estudio se propone identificar diferencias en la composición del microbioma oral, respiratorio y gastrointestinal entre 41 pacientes con IDCV, estratificados entre aquellos con complicaciones dis inmunes (dIDCV) (24) y aquellos pacientes que sólo presentan infecciones (iIDCV) (17), así como individuos sanos (15) con el objetivo de dilucidar posibles diferencias en la composición microbiana que podrían estar asociadas a la generación de la disregulación inmunológica en estos pacientes.

Para ello, se realizó un análisis mediante secuenciación masiva del gen 16S ARNr en muestras orales, respiratorias y fecales para explorar biomarcadores bacterianos con identificación a nivel de especie así como asociaciones entre perfiles de microbioma y fenotipos de IDCV. Como resultado, se detectaron diferencias notables en la composición de la microbiota en la saliva, el esputo y las heces entre pacientes con IDCV y dis inmunidad, e individuos sanos. A nivel global, la diversidad de especies respiratorias y la riqueza de bacterias fecales fueron menores en las personas con IDCV y complicaciones inmunitarias. A pesar de que no se identificó una única especie como un predictor robusto de dis inmunidad independiente, la combinación de alrededor

de 5-7 especies en cada tipo de muestra podría predecir este fenotipo severo con una precisión de alrededor del 90% en nuestra población.

En las muestras orales, *Veillonella tobetsuensis*, *Peptococcus* spp. no asignados, *Prevotella oris*, *Cardiobacterium hominis*, *Corynebacterium matruchotii*, *Capnocytophaga granulosa* y *Streptococcus mitis* podrían predecir conjuntamente la disfunción inmune en los pacientes con IDCV con una precisión del 95% en nuestra población. *P. oris* y *C. matruchotii* también se consideraron buenos indicadores de disfunción inmune en muestras de esputo, junto con *Streptococcus cristatus*, *Corynebacterium durum* y una especie de *Kingella*, mostrando una precisión del 92%. Es interesante que, en este estudio, el microbioma fecal fue el enfoque menos discriminatorio. Considerando que casi todos los estudios en la literatura se centran en análisis de heces o digestivos, estos resultados destacan la importancia de profundizar nuestros conocimientos en nichos alternativos con fines diagnósticos o para desentrañar el papel del microbioma en la generación de disfunción inmune y autoinmunidad en la IDCV. En las muestras fecales, las *Peptococcaceae* no asignadas, *Christensellaceae*, *Oscillospirales*, *Alistipes*, *Defluviitaleaceae* y *Parabacteroides merdae* podrían clasificar al paciente con una precisión del 86%.

Nuestro estudio proporciona nuevos conocimientos sobre estos nichos ecológicos y perfiles de pacientes previamente inexplorados pero altamente interrelacionados, y sugiere que esta disbiosis microbiana sistémica relacionada con la enfermedad podría estar implicada en la disregulación inmune asociada a casos graves de IDCV. Además, estos datos resaltan la importancia de la identificación bacteriana con resolución taxonómica a nivel de especie, especialmente considerando el comportamiento heterogéneo de diferentes especies del mismo género en la activación de respuestas inflamatorias sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. La información proporcionada por este trabajo abre nuevas oportunidades para futuros estudios que profundicen en los desencadenantes microbiológicos de la disfunción inmune en la IDCV que deberían ser probados experimentalmente y que podrían potencialmente ayudar en el manejo diagnóstico e incluso terapéutico.

Este artículo fue publicado en la revista **Clinical Immunology:**

Cabanero-Navalon MD, Garcia-Bustos V, Mira A, et al. Dysimmunity in common variable immunodeficiency is associated with alterations in oral, respiratory, and intestinal microbiota. Clin Immunol. 2023 Sep 27:109796. doi: 10.1016/j.clim.2023.109796.



Dysimmunity in common variable immunodeficiency is associated with alterations in oral, respiratory, and intestinal microbiota

Marta Dafne Cabanero-Navalon^{a,b}, Víctor García-Bustos^{a,c,*}, Alex Mira^d, Pedro Moral Moral^{a,b}, Miguel Salavert-Lleti^{c,e}, María José Forner Giner^f, María Núñez Beltrán^a, José Todolí Parra^{a,b}, Carme Bracke^g, Miguel Carda-Diéguez^d

^a Primary Immune Deficiencies Unit, Department of Internal Medicine, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain

^b Research Group of Chronic Diseases and HIV Infection, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain

^c Severe Infection Research Group, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain

^d Genomics & Health Department, FISABIO Foundation, Valencia, Spain

^e Unit of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine of the University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain

^f Department of Internal Medicine, University Clinical Hospital, Valencia, Spain

^g Department of Infectious Diseases, Germans Trias i Pujol Hospital, Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Common variable immunodeficiency

CVID

Microbiota

Immune dysregulation

Autoimmunity

Microbiome

ABSTRACT

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most common symptomatic primary immunodeficiency characterized by decreased immunoglobulins and recurrent infections. Its aetiology remains unknown, and some patients present with severe non-infectious autoimmune or inflammatory complications with elevated associated morbimortality. Recently, intestinal dysbiosis has been proposed as a driver of immune dysregulation. In this study, we assessed the oral, respiratory, and gastrointestinal microbiota of 41 CVID patients (24 with dysimmune and 17 with infection complications) and 15 healthy volunteers using 16S rRNA gene sequencing to explore associations between microbiome profiles and CVID phenotypes. Profound differences in the composition of the microbiota in saliva, sputum, and stool were detected between dysimmune CVID patients and healthy individuals. Globally, respiratory species diversity and faecal bacterial richness were lower in CVID individuals with immune complications. Although a single species could not be identified as a robust predictor of dysimmunity, a combination of around 5–7 bacterial species in each type of sample could predict this severe phenotype with an accuracy of around 90% in the study population. Our study provides new insights into these previously unexplored but highly interrelated ecological niches among themselves and with patient profiles. Our data suggest that this disease-related systemic dysbiosis could be implicated in the immune dysregulation associated with severe cases of CVID.

1. Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most common symptomatic primary immunodeficiency (PID) with an estimated prevalence of 1:25,000 to 1:50,000 worldwide. It comprises clinically and genetically heterogeneous disorders that are characterized by decreased levels of serum IgG, together with decreased IgM and/or IgA, and whose diagnosis is made after excluding secondary causes of hypogammaglobulinemia and other PID [1–3]. This deficient synthesis of

antibodies causes recurrent infections and also results in non-infectious autoimmune or inflammatory complications. CVID is treated with intravenous or subcutaneous immunoglobulin infusions, which normally correct antibody deficiency and control infectious disorders. Nowadays, after the introduction of this immunoglobulin replacement therapy (IgRT), associated dysimmune complications represent the main cause of CVID morbimortality [4–6]. Consequently, two main phenotypes could be distinguished: CVID patients only suffering infections (iCVID), and those who will develop autoimmune diseases, enteropathy,

Abbreviations: CVID, Common variable immunodeficiency; PID, primary immunodeficiency; IgRT, immunoglobulin replacement therapy; LPS, lipopolysaccharide; ILD, interstitial lung disease; Dysimmune CVID, dCVID; Infectious CVID, iCVID; ITP, immune thrombocytopenic purpura.

* Corresponding author at: Avinguda Fernando Abril Martorell, 106, 46026 Valencia, Spain.

E-mail address: victorgarciabustos@gmail.com (V. García-Bustos).

<https://doi.org/10.1016/j.clim.2023.109796>

Received 6 March 2023; Received in revised form 10 July 2023; Accepted 25 September 2023
Available online 27 September 2023

1521-6616/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

M.D. Cabanero-Navalon et al.

Clinical Immunology 256 (2023) 109796

and/or neoplastic complications due to an immune system dysfunction (dCVID) [7].

The aetiology of CVID remains unknown. As monogenic mutations represent a minority of CVID patients [8], it is believed that multiple genetic and environmental risk factors may interact to cause this disorder [9,10]. Recently, several studies have begun to investigate the microbiome profile of CVID patients. Impaired immunity may result in increased microbial translocation across the gut barrier, which could lead to persistent systemic immune activation and breakage of immune homeostasis, causing local and systemic immune dysregulation responsible for non-infectious complications associated with CVID [10–12]. In fact, Jorgensen et al. [12] detected elevated levels of serum lipopolysaccharide (LPS) and other immune markers such as soluble CD14 and IL-2 in CVID patients, together with lower alpha diversity and a high dysbiosis index of their gastrointestinal microbiota. Noteworthy, these findings were more pronounced in CVID patients with inflammatory and autoimmune complications than in patients only suffering infectious complications.

In addition, lung microbiota is also being studied as one of the causes of local immune dysregulation and lymphoproliferation in systemic autoimmune diseases such as sarcoidosis or interstitial lung diseases (ILD) [13,14]. Furthermore, recent studies suggest a possible bidirectional link between gut and lung microbiota, which is known as the gut-lung axis [15,16]. In this regard, several reports have documented alterations in the intestinal microbiota as a consequence of increased bacterial inflammatory mediators in the context of respiratory infections [16], and chronic or recurrent intestinal infections result in increased microbial translocation due to the damage of the intestinal epithelium [17]. Soluble microbial components, modulation of immunological and non-immunological responses in the lungs via host-mediated inflammatory mediators from the gut, or migration of inflammatory cells might also explain this correlation [18]. However, there are no studies devoted to analyzing respiratory microbiota in CVID. Moreover, changes in oropharyngeal microbiota have been documented in patients with ILD and primary antibody deficiencies such as CVID [19], indirectly reflecting changes in pulmonary microbiota through bacterial seeding from the lower respiratory tract.

However, there is a lack of studies aiming to characterize the distinct microbiota profile of CVID in relation to patient clinical phenotypes and associated complications, and evidence of microbiome differences between dysimmune and non-dysimmune CVID patients at the species level is yet absent. Therefore, specific analyses on the composition of microbiota at different locations in different phenotypes of CVID are urgently needed.

This study aims to identify differences in oral, respiratory, and gastrointestinal microbiome composition in patients with CVID and healthy individuals. In addition, CVID patients were distinguished depending on clinical phenotypes and the microbiotas in each niche were compared in order to detect potential differences associated with the generation of abnormal immune responses and immune dysregulation. Hence, we aim to provide further insights into disease pathogenesis and expand the scarce evidence regarding microbiota in CVID patients.

2. Material and methods

2.1. Patients

A cross-sectional study of patients with a CVID diagnosis followed in the Primary Immune Deficiencies Unit of the Department of Internal Medicine of the University and Polytechnic Hospital La Fe was conducted. Clinical, laboratory, and imaging variables were obtained via a retrospective review of electronic medical records. Forty-one patients with a CVID diagnosis aged >18 years in follow-up by the Primary Immune Deficiencies Unit were considered eligible (Fig. 1). These selected patients were screened to confirm CVID diagnosis according to the European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry working

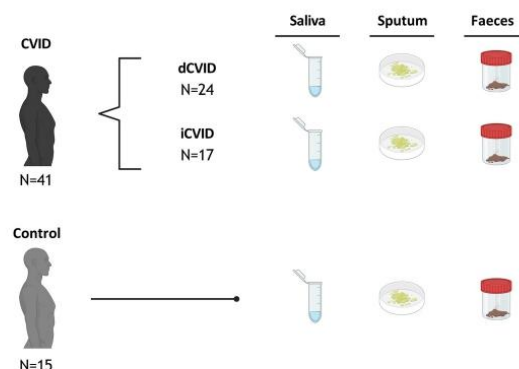


Fig. 1. Graphical description of the study design. CVID, common variable immunodeficiency; dCVID, dysimmune CVID; iCVID, infections-only CVID. Created with BioRender.

definitions [2] for final inclusion in the study.

Demographic, clinical and laboratory parameters were investigated for all patients. Demographic variables included sex, age, and date of diagnosis. Clinical parameters included type 1 diabetes mellitus, autoimmune haemolytic anaemia (AHA), immune thrombocytopenic purpura (ITP), Evans syndrome, generalized lymphadenopathies present at chest CT and/or CT-PET scans, the presence of granulomatous lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) diagnosed after lung biopsy, splenomegaly diagnosed after an abdominal ultrasound or CT scan, hepatopathy (elevation of liver enzymes, abnormal image findings in abdominal ultrasound or CT scan, or portal hypertension [20]), enteropathy (chronic diarrhoea or abnormal findings in a digestive tract biopsy) and presence of both solid and hematologic malignancy. Laboratory variables included IgG (mg/dL), IgM (mg/dL), IgA (mg/dL), CD4+ cell count (cell/ μ L), CD8+ cell count (cell/ μ L), CD4/CD8 ratio, CD19+ cell count (cell/ μ L) and natural killers (NK) cell count (cell/ μ L). Genetic results were also recorded.

According to the clinical parameters and following Chapel et al.'s classification, patients were classified into two distinct clinical phenotypes [7]. Twenty-four CVID patients had a history of AHA, ITP, Evans syndrome, GLILD, non-infectious lymphadenopathies, hepatopathy, splenomegaly, non-infectious chronic enteropathy, and/or solid or hematologic malignancy and thus they were classified as 'Dysimmune CVID' (dCVID). To date, the other 17 CVID patients had not shown any dysimmune pathology and had only developed infections. Therefore, they were classified as 'Infectious-only CVID' (iCVID).

This study was approved by the Ethical Committee of Health Research Institute La Fe with registry code 2020–376-1 and performed according to the Declaration of Helsinki.

2.2. Sampling

Samples were collected from 41 patients diagnosed with CVID and 15 healthy donors. Controls were required not to have active caries lesions or periodontal disease. Patients who had taken antibiotics other than cotrimoxazole or azithromycin for prophylaxis in the last month were excluded. The use of immunosuppressant therapy, prophylactic antibiotics, and probiotics was registered. Healthy donors had not taken any antibiotics in the month before sample collection. One oral sample, one sputum sample and one faecal sample were collected from each participant (Fig. 1). Approximately 1 mL of non-stimulated, drooling saliva was gathered for the oral sampling after three minutes of salivation. For sputum sampling, 1 mL was collected after induced deep breathing and heavy coughing. These samples were centrifuged, and the

microbial pellets were immediately stored at -80°C before DNA extraction. A flask containing 5 mL of nucleic acid stabilizing solution RNAlater® was delivered to each participant for the sampling of 5 mL of faecal sample, which was kept at room temperature until delivery to the laboratory, where it was stored at -80°C until DNA extraction.

2.3. DNA extraction

DNA extraction was performed using the MagNa Pure LC DNA Isolation kit II (Roche®) and a MagNa Pure Instrument. Samples were lysed using 3×10 s cycles of ultrasounds. Enzymatic digestion with an enzyme cocktail of lysostaphin (5kU/mL), lysozyme (100 mg/mL) and mutanolysin (2.5kU/mL) was performed, followed by protein degradation with Proteinase K [21].

After extraction, DNA concentration was estimated with the Quant-It™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit and a Qubit™ 3 Fluorometer (ThermoScientific). The V3-V4 hypervariable regions were amplified with 16S rRNA gene universal primers Forward (CCTACGGGNGGCWGCAG) and V3-V4 Reverse (GACTACHVGGGTATCTAATCC) which had been optimized for Illumina sequencing following Dzidic et al. 2018 [22]. Illumina Miseq was used for high-throughput sequencing, and a library was constructed following the 16S rRNA gene Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina protocol (Part #15,044,223 Rev. A) and sequenced at the sequencing service at the FISABIO Institute (Valencia) using the 2x300bp paired-end Illumina protocol.

2.4. Bioinformatic analysis and statistics

Firstly, for the comparison of the clinical characteristics of the participants, Fisher tests and ANOVA tests were used after checking normality assumptions with Q-Q plots and variance equality with Levene's test. The software Dada2 v1.16 was used to filter, end-trim, denoise, and merge paired reads [23] (Callahan et al., 2016) using default parameters. Adapters and primers were first filtered out from the sequence reads and then end-trimmed in 10 bp windows with an absence of Ns and quality values <35 . Singletons were removed except for calculating richness and diversity indexes. Filtered reads were then merged, clustered, and cleaned for host and chimeric reads. High-quality sequences were transferred to the Dada2 pipeline analysis. Finally, they were assigned at the amplicon sequence variants (ASV) and species level using the SILVA non-redundant database v138.1 [24].

To perform the downstream analysis, the R programming language for statistical computing (R Development Core Team, 2016) was used [25]. Those genera showing a lower abundance than $<0.01\%$ were removed. An Adonis test (Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices), provided by the Vegan library of R [26] was used for performing multivariate analyses.

In addition, 16S data were normalized and compared using the ANCOM-BC test (or Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction) [27], and diversity indexes were compared using the Wilcoxon test. Taxa with an abundance smaller than the closest abundance value to zero in the groups compared multiplied by four in $<60\%$ of samples were removed from the ANCOM-BC comparison.

Finally, a random forest analysis was used to address complex interactions between bacterial biomarkers and to determine the number of taxa necessary to efficiently discriminate between groups of patients. We used the bootstrapping algorithm implemented in Boruta R library to select biomarkers [28]. The model accuracy was evaluated by the area under the curve (AUC) values. This analysis was performed for biomarkers at the genus (through amplicon sequence variants) and the species levels.

3. Results

3.1. Clinical profile of studied patients

Forty-one CVID patients were enrolled in the study. According to the defined classification criteria, 24 patients with CVID and dysimmune complications were included in the "Dysimmune-CVID" group (dCVID) and 17 patients were classified as "Infections-only CVID" patients (iCVID). Fifteen volunteers were also recruited (healthy controls). No significant differences were observed in the age and sex distributions between groups.

Autoimmune cytopenias, which included the presence of ITP, Evan's syndrome, or AHA were not documented in any patient from the iCVID subgroup nor in the Control group. Only one patient in the iCVID subgroup showed lymphadenopathies of infectious aetiology. The iCVID and Control groups did not have splenomegaly, autoimmune systemic diseases, enteropathy, or GLILD.

Ten dCVID patients presented non-infectious lymphadenopathies. Splenomegaly, enteropathy, and autoimmune systemic diseases were described in 12 (50%), 11 (45.8%), and 5 (20.8%) patients, respectively. GLILD was histologically confirmed in 7 patients. Three patients from the dCVID group had developed solid or hematologic malignancies.

In addition to the clinical findings, genetic analysis revealed several mutations of unknown significance according to the Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. One control subject exhibited a genetic variant in the number of BTK copies, while another control subject had mutations in the TCF3 and CD27 genes. Among the cases, a total of four patients had mutations of unknown significance. Two patients had mutations in NFKB1, one patient had a mutation in RAG1, and one patient had a mutation in PI3K. The use of prophylactic antibiotics as well as immunosuppressants was recorded. No significant differences were observed between dCVID and iCVID regarding prophylactic antibiotic therapies. However, immunosuppressant therapy use was significantly higher in dCVID patients ($p = 0.024$). No patients were under probiotic treatment. Further data are represented in Table 1.

Table 1
Clinical, laboratory, and imaging variables of the three study groups.

	Dysimmune-CVID (n = 24)	Infections-only CVID (n = 17)	Healthy controls (n = 15)
Age	43.87 (15.92)	49.88 (16.90)	44.42 (14.19)
Females	50%	71%	60%
Autoimmune cytopenias			
ITP	41.6%	0	0
Evan's syndrome	21%	0	0
AHA	21%	0	0
Lymphadenopathies	41.6%	0.5%	0
Splenomegaly	50%	0	0
Autoimmune systemic disease	20.8%	0	0
Enteropathy	45.8%	0	0
Malignancy	12.5%	0.5%	0
GLILD	29.1%	0	0
Baumann score	8.02 (8.48)	1.33 (1.63)	NA
CD4	581.20 (487.87)	662.87 (248.14)	NA
CD8	457.95 (355.58)	563.75 (307.77)	NA
Serum IgA	26.33 (42.41)	43.94 (44.44)	NA
Prophylactic antibiotic use	29.2%	11.8%	0
Immunosuppressant treatment	37.5%	5.9%	0

3.2. Indices of alpha-diversity: dysimmune CVID patients harbour altered respiratory and faecal microbiota

Saliva, sputum, and faecal samples were obtained for each patient at one single point, and the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was sequenced. The mean number of sequence reads per sample for all participants was 86,212.99 (SD 24,537.25). Diversity at the species level was adequately covered with this sequencing effort, as all samples reached saturation after 10,000 reads according to rarefaction curves (Fig. 2).

No significant differences in species richness or evenness were found between the saliva of the dCVID, iCVID or healthy groups (Fig. 3). Respiratory bacterial evenness was significantly lower in dCVID patients compared to controls (Wilcoxon test p -value = 0.02), as measured by the Shannon index. In sputum samples, the Shannon index differed between dCVID and controls but not between CVID phenotypes or iCVID and controls. Although the Chao1 richness index (an estimate of the total number of bacterial species) was higher in controls than in CVID patients independently of their clinical phenotype, the difference was not statistically significant (Fig. 3). No significant differences were found in species richness or diversity in the saliva between dCVID patients, iCVID patients, and controls.

Regarding faecal samples, Chao-1 index was significantly lower in stool from dCVID patients than in controls (p -value = 0.02) and iCVID patients (p -value = 0.04) (Fig. 3). No clear differences were observed in the Shannon index in faecal samples between the studied groups.

3.3. Oral, respiratory, and faecal microbiota associated with CVID clinical phenotypes

Bacterial composition at the species level in saliva, sputum, and faeces diverged between groups. Statistically significant differences in the abundance of species as well as their relative frequency in the total bacterial composition were taken into consideration for the analysis (Supplementary Fig. 1). Therefore, only species with a proportion of $\geq 0.1\%$ of the total population will be described in this section, but all significant differences are graphically represented in Supplementary Figs. 2–4.

First, we screened the three types of samples for species significantly associated with the dCVID group in comparison to the iCVID and control groups. In respiratory samples, *Corynebacterium matruchotii*, *Corynebacterium durum*, *Lautropia mirabilis*, *Streptococcus cristatus*, and *Prevotella oris* were significantly (p -value < 0.05) more abundant in the dCVID group in comparison to iCVID (Supplementary Fig. 2A). Moreover, an

unassigned species of *Alistipes* was significantly more prevalent in faeces of dCVID patients than in participants from the iCVID group (p -value = 0.03) (Supplementary Fig. 3A). When analyzing the bacterial composition of saliva, *C. matruchotii*, *S. cristatus*, *Capnocytophaga granulosa* and *P. oris* were again associated with the dCVID group in comparison to iCVID (p -value < 0.05) (Supplementary Fig. 4A). These dysimmunity-associated species were screened for significant differences when dCVID was compared to the control group. Whilst no significant differences were seen in stools for these previously reported bacteria (Supplementary Fig. 3B), sputum from dCVID significantly harboured higher proportions of *C. matruchotii* and *L. mirabilis* in comparison to controls (p -value < 0.003) (Supplementary Fig. 2B). Similarly, the abundance of *C. matruchotii* was significantly (p -value = 0.01) lower in the saliva of patients in the dCVID group in comparison to both the iCVID and control groups (Supplementary Fig. 4B). Furthermore, unassigned *Streptobacillus* and *Granulicatella elegans* were statistically more represented in both respiratory (p -value < 0.001) and saliva (p -value < 0.05) samples of dCVID individuals than in control individuals (Supplementary Fig. 2B and 4B).

Species significantly associated with iCVID patients included *Gemella sanguinis*, *Veillonella tobetsuensis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, and *Campylobacter concisus* in sputum (p -value < 0.05) (Supplementary Fig. 2A), *Parabacteroides merdae* in faeces (p -value = 0.04) (Supplementary Fig. 3A) and *Gemella parahaemolysans* in saliva in comparison to dCVID (p -value = 0.04) (Supplementary Fig. 4A). However, these differences were not conjointly observed when comparing both phenotypes of CVID patients with the control group. Only *Veillonella massiliensis* was more frequently observed in the iCVID group than in the control group in sputum (p -value < 0.001) (Supplementary Fig. 2C).

The abundance of microbes at the species level was compared between the control group and CVID patients. Although no differences were detected in faecal samples, *Fusobacterium periodonticum* was significantly more abundant in the sputum of controls when compared to both CVID subgroups (p -value < 0.01) (Supplementary Fig. 2B–C). Interestingly, *Prevotella melaninogenica* was found more abundant in sputum, faeces, and saliva from healthy volunteers in comparison with dCVID patients (p -value < 0.05). In addition to *F. nucleatum* and *P. melaninogenica*, other known oral periodontal pathogens such as *Porphyromonas endodontalis*, or *Alloprevotella tannerae*, and another *Prevotella* species, *Prevotella pallens*, were more abundant in sputum samples from the control group in comparison to dCVID (p -value < 0.05). Moreover, a statistically higher abundance of *Prevotella oris*, *Oribacterium sinus*, and *Streptococcus lactarius* was observed in the sputum of healthy controls than in patients included in the iCVID group (p -

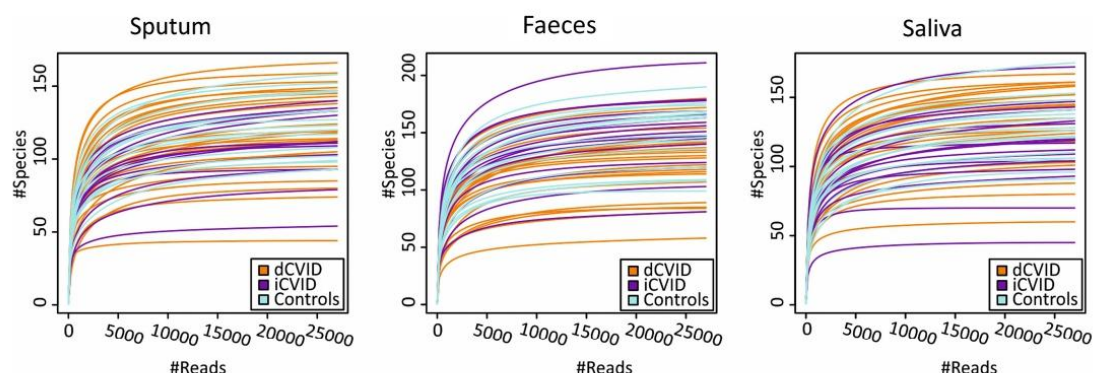


Fig. 2. Rarefaction curves of sputum, faecal and oral samples in CVID and controls. CVID, common variable immunodeficiency; dCVID, dysimmune CVID; iCVID, infections-only CVID; healthy volunteers, controls. The estimated number of bacterial species detected is plotted relative to the number of sequence reads obtained by Illumina sequencing of the 16S rRNA gene. Bacterial richness is stabilized at 20,000 reads (minimum number of reads for all samples).

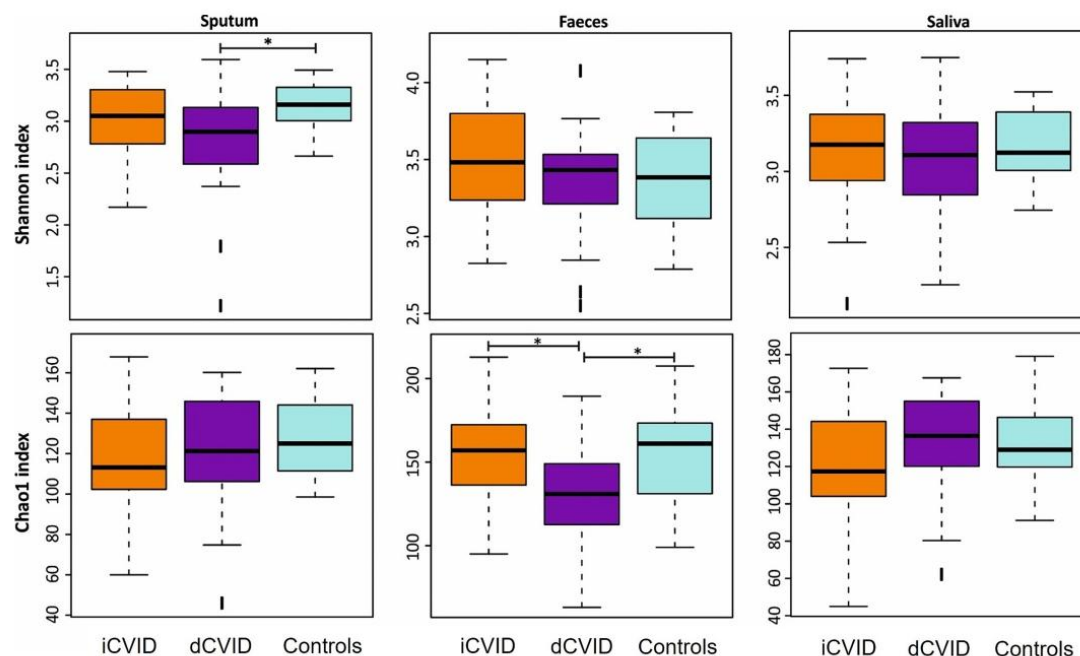


Fig. 3. Microbial diversity analysis of respiratory, faecal and oral microbiota samples in CVID and controls. CVID, common variable immunodeficiency; dCVID, dysimmune CVID; iCVID, infections-only CVID; healthy volunteers, controls. The Chao1 index was used to measure species richness and the Shannon index was used to estimate species evenness. Statistically significant differences (p -value <0.05) are indicated by an asterisk.

value <0.05) (Supplementary Fig. 2C). Regarding other oral bacteria, *S. lactarius* and *Oribacterium sinus* were significantly associated with controls when compared to dCVID patients (p -value <0.03). An unassigned species of *Streptobacillus* and an unassigned species of *Veillonella* were significantly more abundant in saliva samples from controls versus iCVID. In addition, there were no pooled differences in the abundance of any species of bacteria in oral samples of controls versus CVID patients.

3.4. Predicting CVID phenotypes through the microbiome

A predictive model for each type of sample was built using a random forest-based analysis in order to determine the number of species needed to discriminate CVID phenotypes (Fig. 4). The obtained results suggested that several species were necessary to properly distinguish between groups. For example, in respiratory samples from sputum, seven species differentiated dCVID from iCVID groups with an accuracy of 95% (Fig. 4A). Ordered according to their relative predictive capacity, these bacteria were *S. cristatus*, *C. matruchotii*, *P. oris*, *C. durum*, and an unassigned *Kingella*, unassigned *Actinobacillus*, and an unassigned *Capnocytophaga* (Table 2). Regarding the oral microbiota, five species were considered as potential biomarkers of dCVID when comparing with iCVID with an accuracy of 92%, namely *V. tobetsuensis*, an unassigned species of *Peptococcus* spp., *Cardiobacterium hominis*, *C. matruchotii*, and lastly, *Capnocytophaga granulosa* (Table 2 and Fig. 4C). Finally, 7 species from faeces were necessary to discriminate both groups with an accuracy of 86%, as detailed in Fig. 4B. For faecal samples, the species progressively included in the model with declining predictive capacity were three unassigned species of the families *Peptococcaceae*, *Christensenellaceae*, and *Oscillospirales*, an unassigned species of *Alistipes*, an unassigned species of the family *Oscillospirales* and genus UCG.010, an

unassigned species of the family *Defluviitaleaceae* genus UCG.011 and *P. merdae* (Table 2). The use of a higher number of species did not result in greater predictive accuracy and was shown to even limit the predictive capacity of the model (Fig. 4).

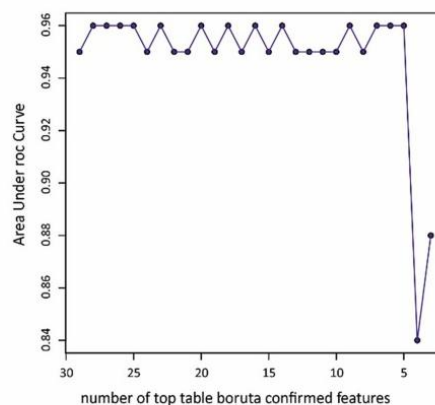
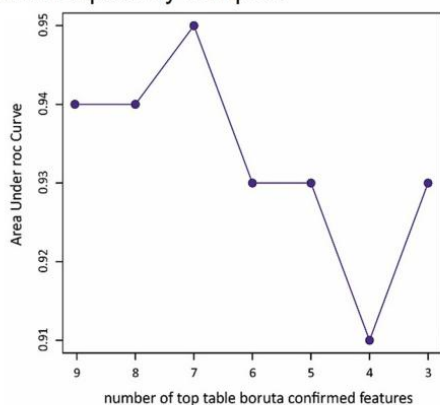
4. Discussion

This study is, to the best of our knowledge, the first work aiming to jointly characterize the composition of oropharyngeal, respiratory, and faecal microbiota at the species level in CVID patients with a dysimmune phenotype in comparison with those patients only showing infectious complications and non-CVID controls. Here, we have demonstrated that dysimmune CVID patients harbour important differences in the microbiome composition of their saliva, sputum, and stool. Globally, respiratory evenness was lower in dCVID patients compared to controls, whereas faecal bacterial richness was lower in dCVID patients compared to either controls or iCVID patients. In fact, a combination of around 5–7 species in each type of sample could independently predict dysimmunity in CVID patients with an accuracy of around 90% in our population.

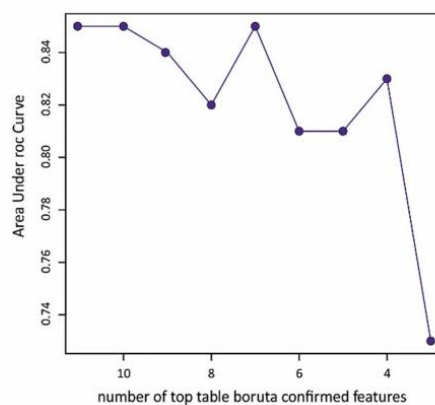
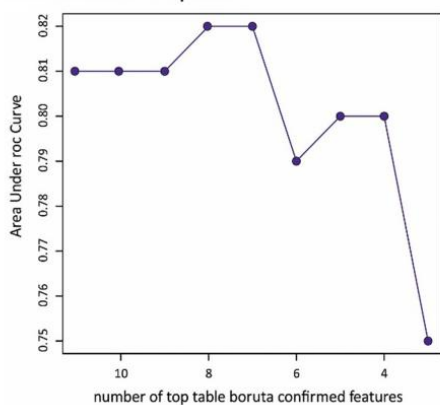
Several studies have been devoted to describing the microbiota profile in patients with CVID [12,29–35]. However, current evidence is limited to gut microbiota [12,28–34] or oropharyngeal microbiota [19]. Although most studies do not reach species resolution and some of them have a low sample size or lack a control group [29,30,35], overall results suggest a smaller biodiversity of gut and oral microbiomes in CVID patients compared to controls. As higher bacterial species diversity has generally been associated with healthy resilient microbiomes, we hypothesized that alterations of the global alpha diversity could be present in dCVID patients.

In our work, while no differences in alpha diversity indexes were

4A. Respiratory samples



4B. Faecal samples



4C. Oral samples

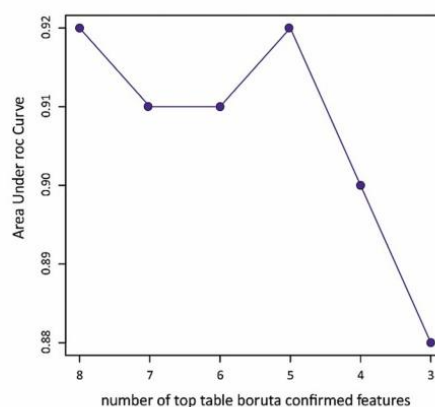
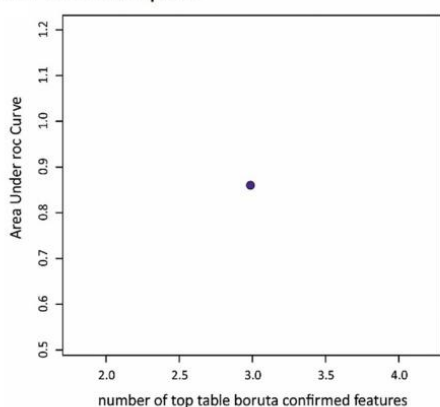


Fig. 4. Accuracy expressed as area under the curve (AUC) of random forest models to discriminate between COVID phenotypes in respiratory samples (A), faecal samples (B), and oral samples (C) according to the number of bacterial species (right) and amplicon sequence variants (ASVs) (left) for each sample.

Table 2
Bacterial species as predictors of dysimmunity in CVID as selected by the Boruta algorithm.

Species	Boruta Predictive capacity	ANCOM-BC-confirmed	ANCOM-BC log2FC	Relative abundance in dCVID (%)	Relative abundance in iCVID (%)
Oral microbiota 					
<i>Veillonella tobetsuensis</i>			1.154	0.241	0.536
unassigned <i>Peptococcus</i>			-0.219	0.055	0.047
<i>Prevotella oris</i>			-0.927	0.320	0.073
<i>Cardiobacterium hominis</i>			2.238	0.010	0.048
<i>Corynebacterium matruchotii</i>			-1.685	0.235	0.073
<i>Capnocytophaga granulosa</i>			-3.127	0.165	0.019
<i>Streptococcus mitis</i>			1.431	0.006	0.016
<i>Streptococcus cristatus</i>			-1.222	0.882	0.378
Pulmonary microbiota 					
<i>Streptococcus cristatus</i>			-1.743	0.985	0.294
<i>Corynebacterium matruchotii</i>			-2.153	0.161	0.028
<i>Prevotella oris</i>			-1.643	0.237	0.076
<i>Corynebacterium durum</i>			-2.629	0.157	0.025
unassigned <i>Kingella</i>			-1.927	0.058	0.015
unassigned <i>Actinobacillus</i>			-10.310	0.103	0
unassigned <i>Capnocytophaga</i>			-0.307	0.186	0.151
<i>Leptotrichia buccalis</i>			-3.246	0.066	0.007
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>			0.563	0.108	0.159
Gastrointestinal microbiota 					
Not assigned <i>Peptococcaceae</i>			2.221	0.007	0.032
Not assigned <i>Christensellaceae</i>			2.113	0.018	0.078
unassigned <i>Oscillospirales</i>			1.420	0.008	0.022
unassigned <i>Alistipes</i>			-0.576	1.605	1.077
unassigned <i>Oscillospirales</i> , family UCG.010			2.264	0.076	0.364
unassigned <i>Deftuivitaaceae</i>			1.503	0.007	0.364
UCG.011 genus					
<i>Parabacteroides merdae</i>			0.33	1.027	1.299
<i>Negativibacillus massiliensis</i>			1.735	0.023	0.076
unassigned <i>Rikenella</i>			7.521	0	0.012
<i>Collinsella massiliensis</i>			6.592	0	0.006
unassigned <i>Ruminococcaceae</i> UBA1819 genus			-0.552	0.091	0.286

ANCOM-BC: Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction. CVID: Common variable immunodeficiency. Log2FC: Log value base 2 of the fold change between relative abundances in both groups.

Boruta predictive capacity: graded scale represents the relative predictive capacity of each bacterium in the predictive model as determined by the Boruta algorithm: red means higher predictive capacity, and blue lower predictive power.

ANCOM-BC-confirmed positive and negative predictors: grey: no significant differences between both groups in the ANCOM-BC. Green: Significant differences between both groups in the ANCOM-BC and positive predictor of dysimmune-CVID. Red: Significant differences between both groups in the ANCOM-BC and negative predictor of dysimmune-CVID.

observed in the oral microbiota depending on the CVID phenotype, the species richness was significantly lower in stool from dCVID patients than in iCVID, as previously reported in severe CVID conditions with complications [12,31]. These findings concur with known evidence of dysbiosis as a biomarker of inflammatory intestinal disorders [9,12,16] and elevated levels of sCD14, sCD25, and LPS. In fact, sCD25 and plasma LPS were strong determinants of reduced alpha diversity in severe CVID with immune dysregulation [12]. Furthermore, another study found that CVID patients had decreased levels of faecal adenosine and inosine, two purine metabolites that modulate several aspects of the immune response [29]. However, the molecular pathways by which microbiota contribute to systemic inflammation in CVID patients remain poorly understood. It is well established that the oral microbiota invades the gut and respiratory niches in immune-depressed individuals, and the presence of oral bacteria in the gut has been associated with multiple inflammation disorders [36–38]. The mechanisms underlying this

pathogenic effect include, among others, TH1 cell induction and inflammation [39], reduced gene expression of tight junction proteins, and elevated LPS levels in plasma [40].

In our samples, we did not find oral bacteria overrepresented in the gut, but many oral microbes were at significantly higher levels in the respiratory tract of dCVID individuals. In fact, the five species identified by our random forest modelling as the best biomarkers of dCVID in the lungs are all oral bacteria. It has recently been shown that the invasion of oral microbes in the respiratory tract was associated with antibiotic use in children with pneumonia [41]. In our series, the absolute number of patients under prophylactic antibiotic therapy was higher in the dCVID patients, which also showed a lower microbial respiratory evenness when compared to healthy controls. Thus, the potential role of respiratory tract invasion by oral bacteria in systemic inflammation in sCVID patients should be further studied.

Beyond some studies delving into the gut microbiome and only one

studying the oral microbiota, one fundamental question is whether bacterial populations in other niches may underlie immune dysregulation in CVID patients. This is the first study analyzing sputum samples, and, interestingly, respiratory bacterial evenness was lower in dCVID patients compared to controls. Given that sputum samples have been shown to be only partially representative of the respiratory microbiota [42], the analysis of lung samples, ideally from the lower respiratory tract, is of high importance considering the bidirectional gut-lung axis in CVID [16] and the high frequency of severe immune lung complications in the immune dysregulation phenotype, such as GLILD [43,44].

While biodiversity indexes may help identify global differences in microbial populations, taxonomic comparisons are essential in order to identify possible pathobionts or microbial species associated with each CVID phenotype. In addition to comparing significant differences between bacterial species abundance in the different niches of dysimmune and non-dysimmune CVID patients and controls, we used a multivariable analysis based on the Boruta algorithm to predict the CVID phenotypes according to the abundances of specific bacteria. To date, evidence on differences in bacterial abundance at the species level in relation to clinical CVID phenotypes is scarce, but our data show that this is a promising strategy, as the models reached high discrimination accuracy, especially for oral and sputum samples.

In oral samples, *V. tobetsuensis*, unassigned *Peptococcus* spp., *P. oris*, *C. hominis*, *C. matruchotii*, *C. granulosa* and *S. mitis* could jointly predict dysimmunity in CVID patients with a 95% accuracy in our population. *P. oris* and *C. matruchotii* were also considered good indicators of dysimmunity in sputum samples, together with *S. cristatus*, *C. durum*, and a species of *Kingella*, showing an accuracy of 92%. We cannot discard the possibility that the overrepresentation of these oral bacteria in the sputum of CVID patients could partly be due to salivary contamination or bacterial seeding in the lower respiratory tract. However, this overrepresentation might be real, as contamination would be expected to be the same for all groups [19]. Interestingly, in this study, faecal microbiome was the least discriminatory approach. Considering that mostly all studies in the literature are focused on stool or digestive analyses [12,29–33,35], these results highlight the importance of deepening our knowledge in alternative niches for diagnostic purposes or to unravel the role of the microbiome in the generation of immune dysregulation and autoimmunity in CVID. Here, unassigned *Peptococcaceae*, *Christensenellaceae*, *Oscillospirales*, *Alistipes*, *Deftuviitaleaceae* and *P. merdae* could classify the patient with an accuracy of 86%.

Although information at the species level is scarcely available, *Veillonella* spp. has also been previously linked to the CVID microbiome as well as autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), autoimmune hepatitis, Sjögren syndrome, and rheumatoid arthritis [45]. While it is the third most frequently observed genus in oropharyngeal samples from CVID patients [19] and has been significantly associated with these patients in faecal samples [9], these species have also been related to an inflammatory fatty acid profile in the context of disturbed gut microbiota in CVID [34]. Given that *Veillonella* uses organic acids as carbon sources, their overrepresentation is normally indicative of an acidic pH or high lactate levels. Higher lactate levels could be the result of bacterial fermentation but also could be due to lactate-dehydrogenase overexpression in human tissue [46]. As in our work, an increased abundance of *Prevotella* spp. has also been previously reported in oropharyngeal samples of severe CVID patients with immune dysregulation and lower IgA levels [19], and increased *P. oris* has already been reported in SLE independently of periodontal status. Other species of *Prevotella* have also been linked to SLE, rheumatoid arthritis, or sarcoidosis [45,47]. *Streptococcus* species also deserve mention, as it is the overall most abundant bacterial genus in the oral microbiome of these patients [19] and therefore a first indicator of oral leakage to the gut, but is also highly associated with CVID disease in stool samples [31]. As in our work, an increased abundance of *Streptococcus* has been positively related to dysimmunity and interstitial lung disease in CVID [19], and *S. mitis* has also been reported as an enriched species in

rheumatoid arthritis [45]. The genus has also been considered pro-inflammatory in systemic autoimmune diseases, as the evidence on an enrichment of *Streptococcus* in ankylosing spondylitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, SLE, systemic sclerosis, or sarcoidosis, has been consistent [45,47]. Results must be carefully interpreted, especially when different species of the genus possess both inflammatory or anti-inflammatory features, and considering the limitations of previous studies, which on most occasions only reached up to the genus level.

Our findings concur with previous evidence regarding other genera such as *Leptotrichia* or families such as *Ruminococcaceae*, which are also more frequently observed in oral and intestinal samples of CVID patients, respectively [19,35]. However, evidence in other systemic autoimmune diseases is more controversial, with ambivalent reports in rheumatoid arthritis or Sjögren syndrome [45]. Additionally, *Alistipes* species such as *A. onderdonkii* have also been linked to CVID patients [29]. In this study, an unassigned species of the genus was significantly more prevalent in faeces of dysimmune CVID patients and was considered an independent predictor after the Boruta analysis. Some studies have found *Alistipes* to thrive in an inflamed environment and promote inflammation and tumour formation [48]. Despite the evidence being controversial, *Alistipes* LPS is known to be proinflammatory, leading to an increase in Th17 cells expressing CD161 and CCR6/integrin Beta7, as well as a decrease in butyrate-producing bacteria, which are known to be anti-inflammatory [49]. Hence, an increased abundance of *Alistipes* in CVID could be part of the potential drivers for gut barrier dysfunction and inflammation [49], especially considering consistent evidence of an increased abundance of this genus in SLE and rheumatoid arthritis [45].

Our findings propose that the microbiome present in different niches could play a crucial role in the pathophysiology of autoimmune and inflammatory complications associated with CVID. This suggests a potential need for intervention in microbiota modulation. Despite initial insights into the alterations of the microbiome in CVID patients, there is a notable lack of basic and clinical evidence regarding the impact of microbiota modulators. These modulators include prebiotics, non-viable substrates serving as nutrients for beneficial microorganisms, and probiotics which can involve genetically modified microbes or faecal microbiota transplantation. The efficacy of symbiotics, a combined therapy of prebiotics and probiotics, as well as dietary interventions, also remains underexplored [50].

Several limitations deserve mention. CVID is a heterogeneous disease, and clinically based classifications can also be heterogeneous despite systematic and strict defining criteria. Therefore, current evidence on microbiota findings is limited to available molecular and genetic evidence on the disease. Patients with CVID are highly complex and commonly require prophylactic antibiotic therapy or immunosuppressant therapies, which highly influence their microbiomes and must be considered when interpreting the data. In fact, dCVID patients received significantly more immunosuppressants due to their associated complications than iCVID patients. Moreover, there is a growing body of knowledge about the different microbiota compositions in CVID patients, but whether these changes are a cause or effect of the disease is yet to be determined. Additionally, as this is a single-centre study, the microbiome compositions could be influenced by the local bacterial commensal population, necessitating future multi-centre studies to confirm these patterns. Thus, future work in animal models should aim to establish the potential causal relationship between some of the bacteria identified as consistently related to CVID and disease development. In addition to bacteria, the role of the mycobiome or the fungal component in the microbiota is also important in maintaining tissue homeostasis. Its dysbiosis has been linked to other pathological conditions and it has only been studied once in CVID without significant findings to date [31]. In our study, only the bacterial component was analyzed, but not the mycobiome or, even, the virome. The eukaryotic and prokaryotic viruses co-colonising human tissues are collectively referred to as human virome, and has been recently implicated in the

pathogenesis of diseases such as inflammatory bowel disease, or diabetes, among others, but there is no evidence in CVID yet. Their relations with the host microbiome and the host itself could also be crucial in disease pathogenesis and therapeutics and may inspire novel therapeutic strategies beyond contemporary microbiome therapeutics in the future [51]. The low relative abundance of biomarkers is also another limitation, as it could lead to an increased risk of type 1 error. Respiratory samples were obtained from sputum, and salivary contamination is obvious, suggesting that lower airway samples like bronchoalveolar lavages or biopsies could provide better microbial resolution. Finally, another limitation of the study is derived from the low frequency of many of the bacterial species associated with CVID, and their contribution to the disease should therefore be further studied experimentally.

5. Conclusion

In summary, our results concur with the hypothesis that different clinical phenotypes of CVID harbour a distinct microbiome composition not only in the digestive tract but also in the oropharynx and respiratory airways. Our work provides new insights into these previously unexplored but highly interrelated niches and patient profiles and suggests this disease-related systemic dysbiosis could be implicated in the immune dysregulation associated with severe cases of CVID with immune complications. Although there was no single pathobiont identified as a unique marker of dysimmunity in CVID, the model built by random forest analysis identified groups of 5–7 species in all samples, accurately differentiating between phenotypes and healthy individuals. Our data also highlight the importance of bacterial identification with taxonomic species resolution, especially considering the heterogeneous behaviour of different species of the same genus in triggering systemic inflammatory responses in immunocompromised patients. The novel information provided by this work opens new opportunities for further studies delving into the microbial drivers of immune dysregulation in CVID that should be experimentally tested and that could potentially aid diagnostic and even therapeutic management.

Funding

This work was supported by the Research Support Grant of the Internal Medicine Society of the Valencian Community (SMICV) of the year 2022.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clim.2023.109796>.

References

- [1] C. Picard, H. Bobby Gaspar, W. Al-Herz, A. Bousfiha, J.L. Casanova, T. Chatila, et al., International union of immunological societies: 2017 primary immunodeficiency diseases committee report on inborn errors of immunity, *J. Clin. Immunol.* 38 (2018) 96–128, <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0464-9>.
- [2] M.G. Seidel, G. Kindler, B. Gathmann, I. Quinti, M. Buckland, J. van Montfrans, et al., The European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry working definitions for the clinical diagnosis of inborn errors of immunity, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 7 (6) (2019) 1763–1770, <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.02.004>.
- [3] R. Ameratunga, S.T. Woon, Perspective: E evolving concepts in the diagnosis and understanding of common variable immunodeficiency disorders (CVID), *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 59 (2020) 109–121, <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08765-6>.
- [4] A. Fischer, J. Provot, J.P. Jais, A. Alcais, N. Mahlaoui, members of the CFPIDsg, Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies, *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 (2017) 1388–1393, e8, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.978>.
- [5] E.S. Resnick, E.L. Moshier, J.H. Godbold, C. Cunningham-Rundles, Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades, *Blood* 119 (7) (2012) 1650–1657, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-377945>.
- [6] J.S. Orange, W.J. Grossman, R.J. Navickis, M.M. Wilkes, Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: a meta-analysis of clinical studies, *Clin. Immunol.* 137 (1) (2010) 21–30, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.06.012>.
- [7] H. Chapel, M. Lucas, S. Patel, M. Lee, C. Cunningham-Rundles, E. Resnick, et al., Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (5) (2012) 1197–1198, e9, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.046>.
- [8] J.D. Gereige, P.J. Maglione, Current understanding and recent developments in common variable immunodeficiency associated autoimmunity, *Front. Immunol.* 10 (2019 Dec 10) 2753, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02753>.
- [9] S.F. Jørgensen, B. Fevang, P. Aukrust, Autoimmunity and inflammation in CVID: a possible crosstalk between immune activation, gut microbiota, and epigenetic modifications, *J. Clin. Immunol.* 39 (1) (2019 Jan) 30–36, <https://doi.org/10.1007/s10875-018-0574-z>.
- [10] R.M. Berbers, S. Nierkens, J.M. van Laar, D. Bogaert, H.L. Leavis, Microbial dysbiosis in common variable immune deficiencies: evidence, causes, and consequences, *Trends Immunol.* 38 (3) (2017 Mar) 206–216, <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.11.008>.
- [11] M. Perreau, S. Vigano, F. Bellanger, C. Pellaton, G. Buss, D. Comte, et al., Exhaustion of bacteria-specific CD4 T cells and microbial translocation in common variable immunodeficiency disorders, *J. Exp. Med.* 211 (10) (2014 Sep 22) 2033–2045, <https://doi.org/10.1084/jem.20140039>.
- [12] S.F. Jørgensen, M. Trøseid, M. Kummén, J.A. Anmarkrud, A.E. Michelsen, L. T. Osnes, et al., Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation, *Mucosal Immunol.* 9 (6) (2016 Nov) 1455–1465, <https://doi.org/10.1038/mi.2016.18>.
- [13] A. Ricci, A. Pagliuca, M. Vermi, D. Pizzirusso, M. Innammorato, R. Sglavo, et al., The role of lung colonization in connective tissue disease-associated interstitial lung disease, *Microorganisms* 9 (5) (2021 Apr 27) 932, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050932>.
- [14] P.T. Inaoka, M. Shono, M. Kamada, J.L. Espinoza, Host-microbe interactions in the pathogenesis and clinical course of sarcoidosis, *J. Biomed. Sci.* 26 (1) (2019 Jun 11) 45, <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0537-6>.
- [15] R.P. Young, R.J. Hopkins, B. Marsland, The gut-liver-lung axis. Modulation of the innate immune response and its possible role in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54 (2) (2016 Feb) 161–169, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0250PS>.
- [16] G. Varriechi, R. Poto, G. Ianaro, A. Punziano, G. Marone, A. Gasbarrini, G. Spadaro, Gut microbiome and common variable immunodeficiency: few certainties and many outstanding questions, *Front. Immunol.* 12 (2021 Aug 2) 712915, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.712915>.
- [17] T.W. Hand, The role of the microbiota in shaping infectious immunity, *Trends Immunol.* 37 (10) (2016 Oct) 647–658, <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.007>.
- [18] Y. Huang, K. Mao, X. Chen, M.A. Sun, T. Kawabe, W. Li, N. Usher, J. Zhu, J. F. Urban Jr., W.E. Paul, R.N. Germain, S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense, *Science* 359 (6371) (2018 Jan 5) 114–119, <https://doi.org/10.1126/science.1258099>.
- [19] R.M. Berbers, F.A. Mohamed Hoesin, P.M. Ellerbroek, J.M. van Montfrans, V.A. S.H. Dalm, P.M. van Hagen, et al., Low IgA associated with oropharyngeal microbiota changes and lung disease in primary antibody deficiency, *Front. Immunol.* 11 (2020 Jun 19) 1245, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01245>.
- [20] L. Crescenzi, A. Pecoraro, A. Fiorentino, R. Poto, G. Varriechi, A. Rispo, et al., Liver stiffness assessment by transient elastography suggests high prevalence of liver involvement in common variable immunodeficiency, *Dig. Liver Dis.* 51 (11) (2019 Nov) 1599–1603, <https://doi.org/10.1016/j.dld.2019.05.016>.
- [21] B.T. Rosier, E. Buettas, E.M. Moya-Gonzalez, A. Artacho, A. Mira, Nitrate as a potential prebiotic for the oral microbiome, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020 Jul 30) 12895, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69931-x>.
- [22] M. Dzidic, M.C. Collado, T. Abrahamsson, et al., Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay, *Isme J.* 12 (9) (2018 Sep) 2292–2306.
- [23] B.J. Callahan, P.J. McMurdie, M.J. Rosen, A.W. Han, A.J. Johnson, S.P. Holmes, DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nat. Methods* 13 (7) (2016 Jul) 581–583, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- [24] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, et al., The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Res.* 41 (Database issue) (2013 Jan), <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>. D590–6.
- [25] R Development Core Team, R: a language and environment for statistical computing, *R. Found. Stat. Comput.* (2016), <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [26] J. Oksanen, F.G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, O. Minchin, P.B. O'Hara, et al., *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>, 2023.
- [27] H. Lin, S.D. Peddada, Analysis of compositions of microbiomes with bias correction, *Nat. Commun.* 11 (1) (2020 Jul 14) 3514, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>.
- [28] K. Havsd, M. Stensson, H. Jansson, M. Carda-Díez, A. Pedersen, J. Neilands, et al., Bacterial composition and metabolomics of dental plaque from adolescents, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11 (2021 Jul 30), 716493, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.716493>.

- [29] J. Bosák, M. Lexa, K. Fiedorová, D.C. Gađara, L. Micenková, Z. Spacík, et al., Patients with common variable immunodeficiency (CVID) show higher gut bacterial diversity and levels of low-abundance genes than the healthy housemates, *Front. Immunol.* 12 (2021 May 14), 671239, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.671239>.
- [30] N. Shulzhenko, X. Dong, D. Vyshenska, R.L. Greer, M. Gurung, S. Vasquez-Perez, et al., CVID enteropathy is characterized by exceeding low mucosal IgA levels and interferon-driven inflammation possibly related to the presence of a pathobiont, *Clin. Immunol.* 197 (2018 Dec) 139–153, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.09.008>.
- [31] K. Fiedorová, M. Radvanský, J. Bosák, H. Grombířková, E. Němcová, P. Králíčková, et al., Bacterial but not fungal gut microbiota alterations are associated with common variable immunodeficiency (CVID) phenotype, *Front. Immunol.* 10 (2019 Aug 13) 1914, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01914>.
- [32] M.E. Macpherson, J.R. Hov, T. Ueland, T.B. Dahl, M. Kummen, K. Otterdal, et al., Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide associates with inflammation in common variable immunodeficiency, *Front. Immunol.* 11 (2020 Sep 16), 574500, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.574500>.
- [33] C.M. van Schewick, C. Nöltner, S. Abel, S.O. Burns, S. Workman, A. Symes, et al., Altered microbiota, impaired quality of life, malabsorption, infection, and inflammation in CVID patients with diarrhoea, *Front. Immunol.* 11 (2020 Jul 31) 1654, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01654>.
- [34] T. Skarpengland, M.E. Macpherson, J.R. Hov, X.Y. Kong, P. Bohov, B. Halvorsen, et al., Altered plasma fatty acids associate with gut microbial composition in common variable immunodeficiency, *J. Clin. Immunol.* 42 (1) (2022 Jan) 146–157, <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01146-9>.
- [35] A.P. Franco-Esquival, C.G. Peña, C. Torres-Lozano, F. Vaca-Panigua, C. Díaz-Velasquez, M. Ortega-Cisneros, A. Quintero-Ramos, Gut microbiota in Mexican patients with common variable immunodeficiency, *Gac. Med. Mex.* 155 (5) (2019) 447–452, <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000330>.
- [36] S.Y. Park, B.O. Hwang, M. Lim, S.H. Ok, S.K. Lee, K.S. Chun, et al., Oral-gut microbiome axis in gastrointestinal disease and cancer, *Cancers (Basel)* 13 (9) (2021 Apr 28) 2124, <https://doi.org/10.3390/cancers13092124>.
- [37] M.F. Konig, The microbiome in autoimmune rheumatic disease, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 34 (1) (2020 Feb), 101473, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2019.101473>.
- [38] A. Camelo-Castillo, D. Henares, P. Brotons, A. Galiana, J.C. Rodríguez, A. Mira, C. Muñoz-Almagro, Nasopharyngeal microbiota in children with invasive pneumococcal disease: identification of bacteria with potential disease-promoting and protective effects, *Front. Microbiol.* 10 (2019 Jan 28) 11, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00011>.
- [39] K. Atarashi, W. Suda, C. Luo, T. Kawaguchi, I. Motoo, S. Narushima, et al., Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation, *Science*. 358 (6361) (2017 Oct 20) 359–365, <https://doi.org/10.1126/science.aan4526>.
- [40] K. Arimatsu, H. Yamada, H. Miyazawa, T. Minagawa, M. Nakajima, M.I. Ryder, K. Gotoh, D. Motooka, S. Nakamura, T. Iida, K. Yamazaki, Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota, *Sci. Rep.* 4 (2014 May 6) 4828, <https://doi.org/10.1038/srep04828>.
- [41] D. Henares, P. Brotons, M.F. de Sevilla, A. Fernandez-Lopez, S. Hernandez-Bou, A. Perez-Argüello, et al., Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status, *Microb. Genom.* 7 (10) (2021 Oct), 000661, <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000661>.
- [42] R. Cabrera-Rubio, M. García-Núñez, L. Setó, J.M. Antó, A. Moya, E. Monsó, A. Mira, Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease, *J. Clin. Microbiol.* 50 (11) (2012 Nov) 3562–3568, <https://doi.org/10.1128/JCM.00767-12>.
- [43] E.M. Matson, M.L. Abayzi, K.A. Bell, K.M. Hayes, P.J. Maglione, B cell dysregulation in common variable immunodeficiency interstitial lung disease, *Front. Immunol.* 11 (2021 Feb 5), 622114, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.622114>.
- [44] M.D. Cabanero-Navalon, V. García-Bustos, L.F. Forero-Naranjo, E.J. Baettig-Arriagada, M. Núñez-Beltrán, A.J. Cañada-Martínez, et al., Integrating clinics, laboratory, and imaging for the diagnosis of common variable immunodeficiency-related granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease, *Front. Immunol.* 13 (2022 Feb 23), 813491, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.813491>.
- [45] L. Gao, Z. Cheng, F. Zhu, C. Bi, Q. Shi, X. Chen, The oral microbiome and its role in systemic autoimmune diseases: a systematic review of big data analysis, *Front Big Data* 5 (2022 Jun 29), 927520, <https://doi.org/10.3389/fdata.2022.927520>.
- [46] T.Q. Tan, E.O. Mason Jr., E.R. Wald, W.J. Barson, G.E. Schutze, J.S. Bradley, L. B. Givner, R. Yogeve, K.S. Kim, S.L. Kaplan, Clinical characteristics of children with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Pediatrics*. 110 (1 Pt 1) (2002 Jul) 1–6, <https://doi.org/10.1542/peds.110.1.1>.
- [47] A. Becker, G. Vella, V. Galata, K. Rentz, C. Beisswenger, C. Herr, et al., The composition of the pulmonary microbiota in sarcoidosis - an observational study, *Respir. Res.* 20 (1) (2019 Feb 28) 46, <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1013-2>.
- [48] A.R. Moschen, R.R. Gerner, J. Wang, V. Klepsch, T.E. Adolph, S.J. Reider, et al., Lipocalin 2 protects from inflammation and tumorigenesis associated with gut microbiota alterations, *Cell Host Microbe* 19 (4) (2016 Apr 13) 455–469, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.007>.
- [49] B.J. Parker, P.A. Wearsch, A.C.M. Veloo, A. Rodríguez-Palacios, The genus *Altipates*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health, *Front. Immunol.* 11 (2020 Jun 9) 906, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>.
- [50] R. Poto, G. Ianaro, A. de Paulis, G. Spadaro, G. Marone, A. Gasbarrini, et al., Correction to: is there a role for microbiome-based approach in common variable immunodeficiency? *Clin. Exp. Med.* (2023 Mar 14) <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01032-1>.
- [51] Z. Cao, N. Sugimura, E. Burgermeister, M.P. Ebert, T. Zuo, P. Lan, The gut virome: a new microbiome component in health and disease, *EBioMedicine*. 81 (2022 Jul), 104113, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113>.

Supplementary material

Figure S1. Relative abundance of representative bacterial species in sputum, fecal, and saliva samples from CVID patients and controls. The relative abundance is expressed in % of the total bacterial population. Dysimmune CVID, dCVID; infections only CVID, iCVID; healthy volunteers, Controls.

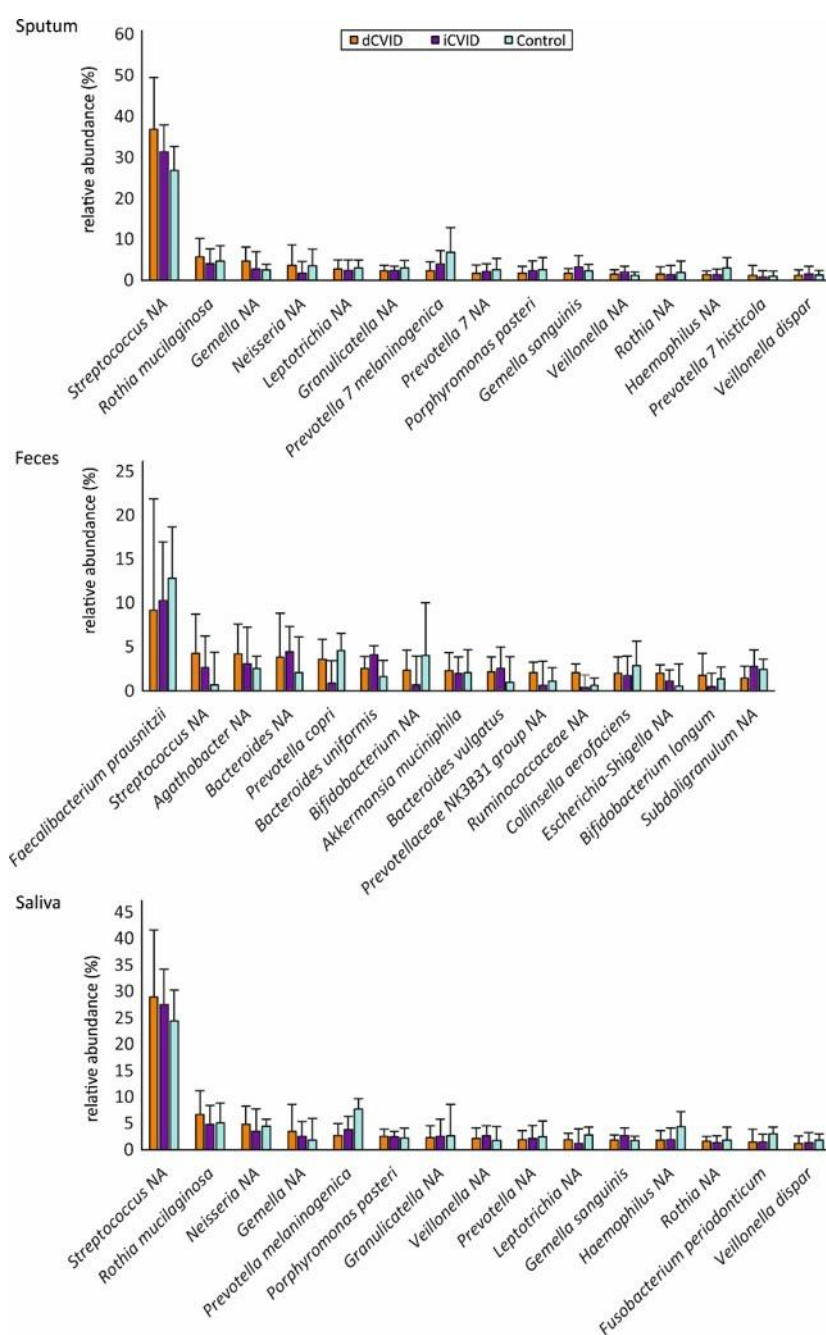


Figure S2. Differences in sputum-associated microbiota from CVID patients and controls. The log2 fold change of the abundance of species significantly different between the groups compared was represented as bars. Dysimmune CVID, dCVID; infections only CVID, iCVID; healthy volunteers, Controls.

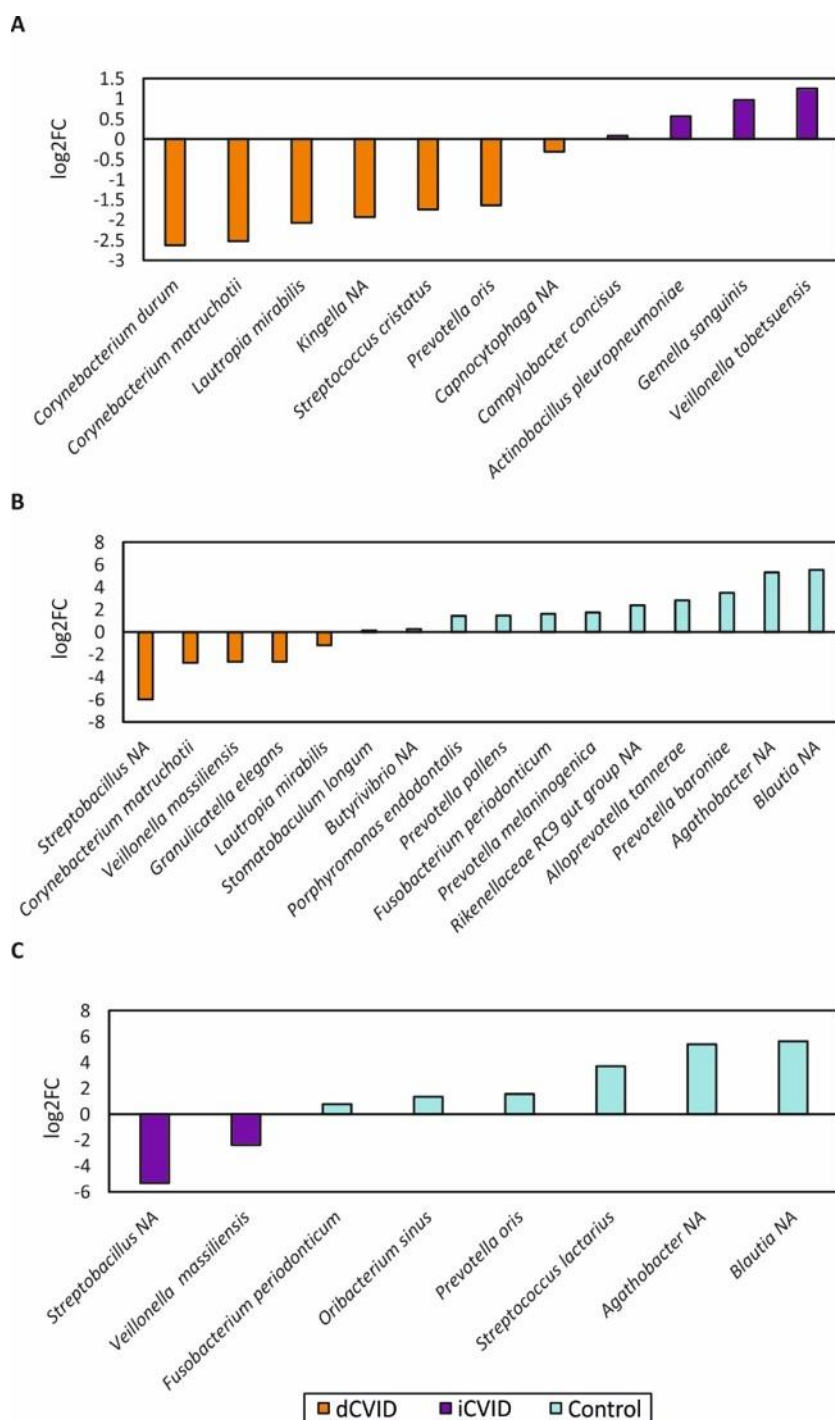


Figure S3. Differences in feces-associated microbiota from CVID patients and controls. The log₂ fold change of the abundance of species significantly different between the groups compared was represented as bars. Dysimmune CVID, dCVID; infections only CVID, iCVID; healthy volunteers, Controls.

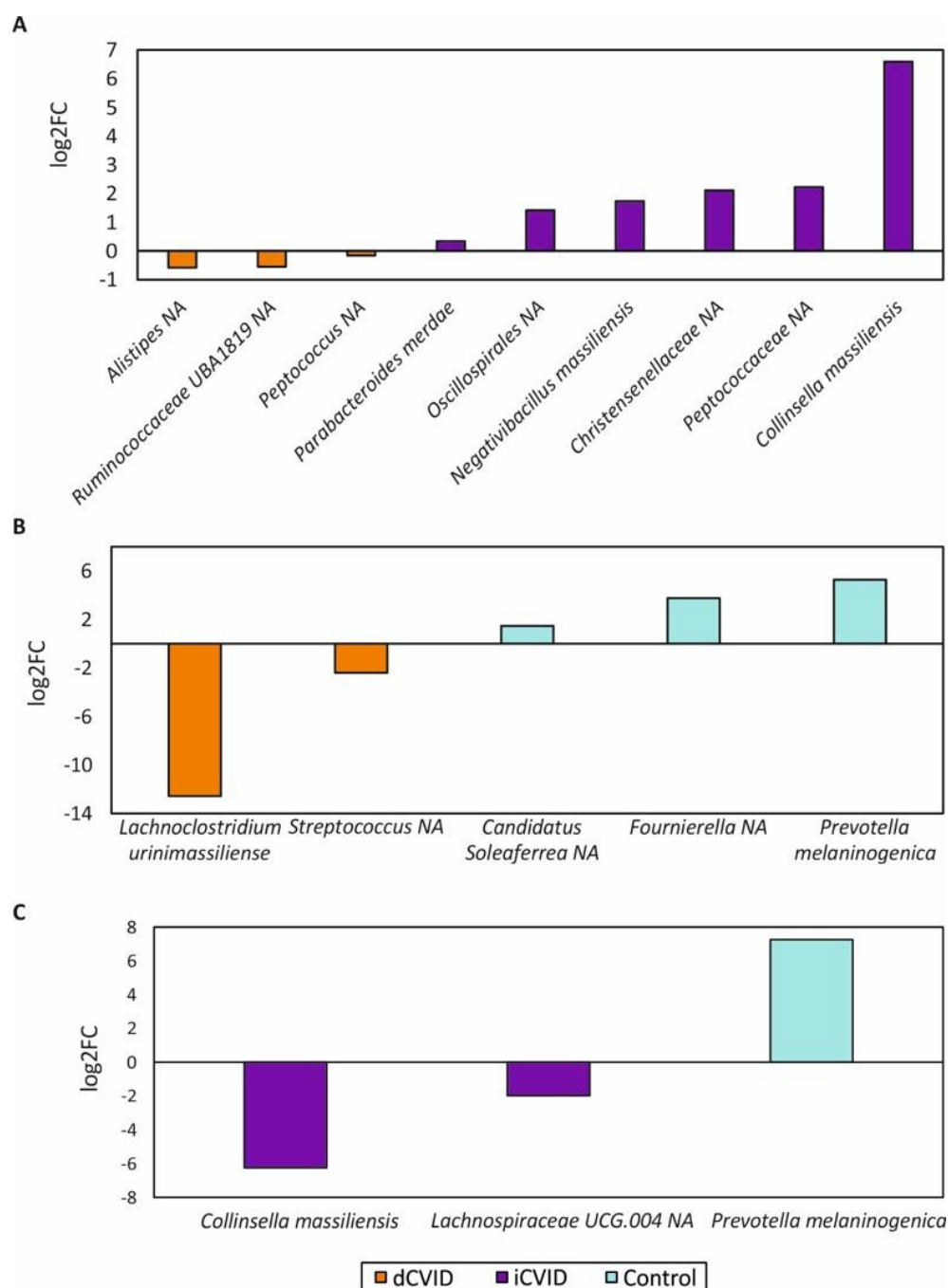
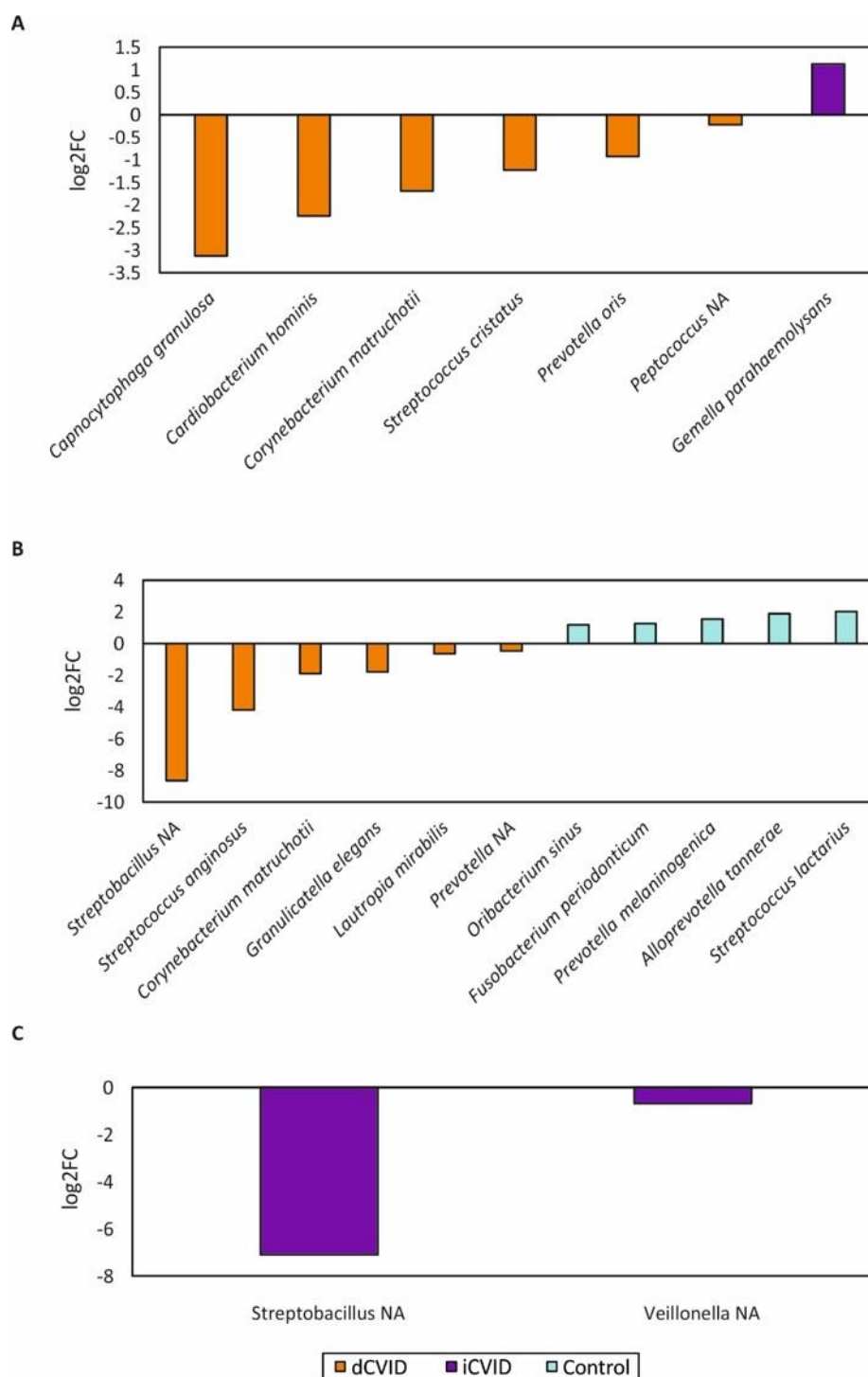


Figure S4. Differences in saliva-associated microbiota from CVID patients and controls. The log2 fold change of the abundance of species significantly different between the groups compared was represented as bars. Dysimmune CVID, dCVID; infections only CVID, iCVID; healthy volunteers, Controls.



DISCUSIÓN

7. Discusión

El desarrollo de esta tesis doctoral comenzó actualizando la evidencia sobre los pacientes con IDCV a nivel nacional. Gracias a la creación del registro GTEM-SEMI-CVID se han recopilado de forma sistemática las características clínicas actuales de 250 pacientes diagnosticados con IDCV en España mediante un enfoque multicéntrico. Por lo tanto, se detalla en este primer estudio una visión completa, actualizada e integrada del curso clínico de la IDCV, que aumenta los datos disponibles proporcionados por otras cohortes multicéntricas nacionales e internacionales

Según los datos de series de pacientes con IDCV anteriormente publicadas, el retraso diagnóstico medio fue de alrededor de 10 años (Chapet et al., 2008; Wehr et al., 2008; Ramírez-Vargas et al., 2014), y la mayoría de los pacientes debutaron clínicamente con complicaciones infecciosas, seguidas de trastornos inmunitarios no infecciosos. Sin embargo, el retraso diagnóstico actual parece mayor que lo reportado previamente en cohortes parciales en nuestro país, que osciló entre 4-6 años (Gathman et al., 2014). Más de un tercio de los pacientes en nuestra cohorte mostraron linfadenopatías y esplenomegalia en su seguimiento, y más del 30% presentaron citopenias inmunitarias, con una prevalencia mayor que en otras cohortes internacionales, posiblemente debido a una edad media relativamente mayor de nuestros pacientes y una evolución de la enfermedad más larga (Chapel et al., 2008; Ho HE et al., 2020; Mormile et al., 2021; Wehr et al., 2008). Sorprendentemente, el síndrome de Evans fue la citopenia inmunitaria más frecuentemente descrita en lugar de la PTI aislada, como ya había sido descrito con anterioridad (Resnick et al., 2012; Chapel et al., 2008; Ho HE et al., 2020). Además, la autoinmunidad sistémica se documentó en el 20% de los pacientes, siendo la espondilitis anquilosante la enfermedad reumática más frecuente. Esto destaca la necesidad actual de desarrollar protocolos de derivación que permitan un diagnóstico más temprano, que debería incluir no solo infecciones repetidas como la principal señal de alerta para sospechar IDCV y otras inmunodeficiencias (Arslan et al., 2016; Arkwright et al. 2011), sino también trastornos inmunitarios y linfoproliferación benigna.

Desde la introducción de la IgRT, las complicaciones infecciosas ya no son la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con IDCV (Resnick et al., 2012), como se ilustra en esta serie. Durante más de una década, la IgSc se ha introducido como una alternativa eficaz a la Iglv convencional, consiguiendo alcanzar unos niveles valle de IgG más estables y elevados, con menos efectos secundarios, mejor calidad de vida relacionada con la salud, empoderamiento del paciente y recuperación funcional más rápida con menos contacto con el entorno sanitario (Abolhassani et al., 2012). Sin embargo, menos de la mitad de los pacientes recibieron IgSc y casi el 60% prefirió Iglv. Ante esta constatación de la infrautilización de la IgSc en nuestro medio, se debe alentar a los profesionales a considerar cambiar de Iglv a IgSc en todos aquellos pacientes en el que dicho cambio sea factible.

Por otra parte, la enfermedad pulmonar no infecciosa fue extraordinariamente frecuente en nuestro registro, afectado aproximadamente al 60% de los pacientes, lo que muestra una prevalencia mayor que la conocida anteriormente (Resnick et al, 2012; Chapel et al., 2008; Ho He et al., 2020). Las bronquiectasias fueron el hallazgo de imagen más frecuente (35%) en consonancia con estudios anteriores (Ho He et al., 2020). Esto podría deberse a infecciones crónicas y repetidas más que a la disregulación inmunitaria local (Schussler et al., 2016). Sin embargo, se observó compromiso del parénquima pulmonar en alrededor del 15% de los pacientes, principalmente como neumonía intersticial linfoide. A pesar de la alta prevalencia de la enfermedad pulmonar, menos del 65% de los pacientes incluidos en la cohorte se sometieron a una TCAR. Esto sugiere que algunos pacientes con afectación subclínica pueden haber sido infradiagnosticados en nuestra cohorte, ya que solo alrededor del 20% experimentó manifestaciones clínica respiratoria como tos o disnea. En consonancia con esto, la EPIGL confirmada histológicamente solo se documentó en 17 pacientes; una prevalencia notablemente menor de lo esperado de acuerdo con la evidencia previa (Bates et al., 2004; Morimoto et al., 2005).

Antes del desarrollo de esta tesis doctoral, no se habían desarrollado estudios de cohorte longitudinales para determinar factores de riesgo de desarrollo de EPIGL, y no existían estudios sobre la capacidad discriminativa de modelos que combinen variables clínicas, analíticas y de imagen para su diagnóstico, especialmente por la naturaleza de esta enfermedad. Esto tiene una importancia reseñable, especialmente considerando que la EPIGL se ha definido como una entidad clínico-radio-patológica intersticial pulmonar (Hurst et al., 2009) y tras sugerirse que el componente pulmonar forma parte de un proceso dis inmune global en los pacientes con IDCv que lleva a una enfermedad linfoproliferativa benigna multisistémica (Rao et al., 2015). Además, su diagnóstico definitivo histológico mediante biopsia pulmonar conlleva una morbilidad y mortalidad añadida, con una mortalidad de 1,7% en intervenciones programadas para el diagnóstico de enfermedad pulmonar intersticial (Hutchinson et al., 2016). Esto podría explicar también la baja prevalencia y enfatiza la necesidad de una búsqueda más activa de la enfermedad pulmonar crónica en el seguimiento de estos pacientes a pesar de ser asintomáticos o paucisintomáticos, ya que se ha asociado con peores resultados clínicos (Chapel et al., 2008; Verma et al., 2015), como se discutirá más adelante siguiendo los resultados del segundo trabajo de esta tesis.

Además, en el Registro GTEM-SEMI-CVID se documentó enfermedad gastrointestinal en más del 40% de los pacientes, una prevalencia en el límite superior de los datos previamente publicados (rango: 9 – 44%) (Chapel et al., 2008; Ho HE et al., 2020; Mormile et al., 2021; Wehr et al., 2008; Ramírez-Vargas et al., 2014; Farmer et al., 2018). La infiltración linfocítica intestinal fue el hallazgo histológico más común, presente en casi el 40% de las biopsias, como se publicó recientemente (Ho HE et al., 2020).

Estos resultados concuerdan con la creciente evidencia que respalda que la linfoproliferación benigna diseminada es una de las principales características de la disregulación inmunológica en los pacientes con IDCV, resultado en una disfunción orgánica a diferentes niveles. Entre los órganos biopsiados en nuestra cohorte, la linfoproliferación benigna fue la principal alteración histopatológica, excepto en el bazo y el hígado, donde se observó granulomatosis en el 75% y el 42% de las biopsias, respectivamente. Curiosamente, en órganos no linfoides, la infiltración linfocítica fue más frecuente en el tracto gastrointestinal, probablemente debido a la interacción continua de antígeno-linfocito con la microbiota local. Muchos estudios han mostrado un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal que resulta en un aumento de translocación microbiana y de inflamación sistémica, lo que podría explicar los hallazgos histológicos de los pacientes en nuestra cohorte (Jorgensen et al., 2019; Gereige et al., 2019; Varricchi et al., 2021), y que se discutirá a continuación en el contexto de los resultados obtenidos en el análisis de microbiota oral, respiratoria y fecal.

Esta coexistencia de inmunodeficiencia y disregulación inmune con infiltración linfocítica difusa y trastornos autoinmunes en pacientes con IDCV parece paradójica, requiriendo el uso de tratamientos inmunosupresores en pacientes ya de por sí inmunosuprimidos. En el registro GTEM-SEMI-CVID, casi el 40% de los individuos habían recibido tratamiento inmunosupresor, principalmente corticosteroides, seguidos por la azatioprina y, notablemente, el rituximab. Estos agentes se utilizaron principalmente para tratar citopenias inmunitarias, trastornos granulomatosos o linfocíticos y otras complicaciones autoinmunes. Dado su riesgo de efectos adversos, la necesidad de estos tratamientos revela una importante complejidad terapéutica (Xiao et al., 2014), especialmente considerando la prevalencia relativamente alta de infecciones oportunistas en nuestra cohorte, de hasta 9,64% con una clara relación con algunos de los inmunosupresores más utilizados. Se necesitan más estudios fisiopatológicos para desentrañar las vías genéticas y moleculares que impulsan la dis inmunidad de la IDCV para permitir el desarrollo de terapias dirigidas con menores efectos secundarios.

Además, en la literatura, los pacientes con IDCV tienen un riesgo significativamente mayor de cáncer hematológico y sólido, con una prevalencia descrita de aproximadamente el 10% (oscilando entre el 1,5% y el 20,7% según la serie). La prevalencia global de cáncer en el registro GTEM-SEMI-CVID fue una de las más altas reportadas hasta la fecha, de hasta el 15,26% (Resnick et al., 2012; Kiaee et al., 2019; Ho HE et al., 2020; Cunningham-Rundles et al., 1999; Abolhassani et al., 2012; Quinti et al., 2007). Al igual que con las complicaciones inmunitarias, la mayor edad media en el registro, así como el retraso diagnóstico, podrían explicar parcialmente estos hallazgos (Kiaee et al., 2019). En consonancia con la evidencias previa, el linfoma no Hodgkin B fue la neoplasia más frecuentemente reportada, seguida por el cáncer gástrico, los tumores pulmonares y las neoplasias cutáneas. A pesar de la disminución de la incidencia del cáncer gástrico en estudios más antiguos (Kinlen et al., 1985; Tak Manesh et al., 2017), la prevalencia del 2% en esta serie es significativamente más alta en comparación con otros

estudios recientes (Resnick et al., 2012; Ho HE et al., 2020). El hecho de que se haya investigado activamente la presencia de *H. pylori* en aproximadamente la mitad de los pacientes del registro podría haber contribuido a estos porcentajes más elevados, señalando la necesidad de realizar pruebas periódicas de detección de *H. pylori* en los pacientes con IDC.V.

Estos datos nacionales subrayan la necesidad de desarrollar guías estandarizadas para optimizar y homogeneizar el diagnóstico y manejo de estos pacientes. Las complicaciones crónicas por dis inmunidad son la principal causa de morbilidad y mortalidad tras la introducción de la IgRT y representan un gran desafío para los clínicos que tratan las IDP. La falta de tratamientos efectivos y el uso de inmunosupresores para el manejo de estos trastornos resalta la importancia de la investigación básica y traslacional que profundiza en las vías fisiopatológicas implicadas en la disfunción inmune y la infiltración linfocítica, como las alteraciones en la microbiota y un aumento en la traslocación bacteriana.

Como se ha comentado y entrelazando el estudio GTEM-SEMI-CVID con el segundo trabajo de esta tesis doctoral, la EPIGL es el mayor ejemplo dentro de este marco de dis inmunidad presente en los pacientes con IDC.V, pues cursa con fenómenos autoinmunes, se asocia a enteropatía y produce una marcada linfoproliferación con o sin granulomatosis y afectación multisistémica. Gracias a los hallazgos del segundo estudio que se discutirá a continuación, se ha demostrado por primera vez que el uso integrador de herramientas predictivas combinando parámetros clínicos, analíticos y radiológicos pueden resultar útiles para el diagnóstico precoz de EPIGL en los pacientes con IDC.V. De hecho, la presencia de esplenomegalia, linfadenopatías, un recuento CD8+ disminuido y una puntuación elevada en el score GLILD de Baumann predice con una precisión casi perfecta la presencia de EPIGL histológicamente confirmado tras validación interna. El score radiológico de Baumann se encuentra altamente correlacionado con la probabilidad de EPIGL y es altamente reproducible entre observadores entrenados. Este modelo predictivo se ha realizado combinando métodos de *elastic net* y regresión Bayesiana. Pese a un propósito exploratorio y la limitación del tamaño muestral, demuestra una elevada capacidad discriminativa incluso tras la validación interna media la técnica *bootstrap* que invita a su replicación en cohortes con mayor tamaño muestral y a estudios multicéntricos.

Más allá de estas limitaciones, existen varias cuestiones importantes que se plantean a partir del modelo. Por una parte, de acuerdo con nuestros datos y tal y como se ha descrito previamente, la esplenomegalia y las linfadenopatías se asocian a la EPIGL (Chase et al., 2013; Hartono et al., 2017; Mannina et al., 2016; Cinetto et al., 2021). Tanto la esplenomegalia como las linfadenopatías se pueden detectar fácilmente mediante la exploración física y la realización de pruebas de imagen, convirtiendo estas variables en extremadamente útiles para predecir qué pacientes pueden desarrollar EPIGL o elevar la sospecha clínica ante sintomatología e imágenes compatibles en TC pulmonar.

Estos resultados también concuerdan con la idea de que la EPIGL es la expresión pulmonar de un trastorno dis inmune linfoproliferativo benigno sistémico (Rao et al., 2015). Este hallazgo presenta un gran interés desde el punto de vista clínico, especialmente por la dificultad a la hora de establecer una sospecha clínica basada en la sintomatología de los pacientes, pues estos suelen encontrarse asintomáticos o paucisintomáticos en la mayoría de los casos (Lamers et al., 2021; Baumann et al., 2018). De hecho, según los datos de este segundo estudio de la presente tesis doctoral, el grado de disnea apenas mostró cambios entre casos y controles, lo que contrasta con las alteraciones halladas en las pruebas de función respiratoria.

Además, casi un 60% de los pacientes con IDCv y EPIGL presentaron AHAI, que no fue documentada en ningún paciente control, de la misma manera que en el estudio realizado por Chase et al., (2017). Los niveles de IgA bajos también se relacionaron más frecuentemente con los casos que con los controles. Sin embargo, al igual que en trabajo realizado por Hartono et al., (2017), el déficit de IgA no se identificó como un factor predictivo *per se*, al contrario que en otros estudios previos (Chase et al., 2013; Cinetto et al., 2021). La prevalencia de la poliartritis en ambos grupos fue similar. De hecho, ninguno de los 7 casos con EPIGL e IDCv sufrió artralgias o artritis, al contrario de lo sugerido por otros trabajos (Mannina et al., 2016). Por otra parte, la frecuencia absoluta de pacientes con enteropatía fue mayor en el grupo control, lo que es sorprendente ya que tradicionalmente se ha considerado una complicación no-infecciosa derivada de la infiltración inmune (Fraz et al., 2021).

Por otra parte, un recuento bajo de CD8+ se ha asociado con la presencia de EPIGL confirmado histológicamente. Algunos estudios ya han analizado los linfocitos de sangre periférica y los han relacionado con los diferentes fenotipos clínicos de los pacientes con IDCv, y de los pacientes con EPIGL (Cinetto et al., 2021; Fraz et al., 2021; Kellner et al., 2019; Bateman et al., 2012). Los hallazgos del segundo estudio van en línea con otros trabajos sobre los defectos celulares de los pacientes con EPIGL (Cinetto et al., 2021) afectación granulomatosa o autoinmune (Seidel et al., 2019) o enfermedad pulmonar intersticial (Kellner et al., 2019), que también muestran una asociación entre un recuento disminuido de CD8+ y la frecuencia de EPIGL. El recuento de CD19+ fue también menor en los casos, en consonancia con la evidencia disponible, que muestra que los pacientes con esplenomegalia, granulomas, enteropatía (Wehr et al., 2008; Malphettes et al., 2009) o EPI (Kellner et al., 2019; Wehr et al., 2008) presentan un recuento de linfocitos B CD19+ menor.

Se han desarrollado algunos sistemas de predicción para la caracterización de TCAR en los pacientes con IDCv, como el método Baumann o el método Hartmann (Meerburg et al., 2020; Schutz et al., 2019; Wainwright et al., 2011). Pese a que el score de Hartmann presenta una reproductibilidad inter-observador para la evaluación de EPIGL y la presencia de enfermedad de la vía aérea ligeramente mejor que el score compuesto de Baumann, este último fue elegido en el segundo trabajo por presentar una aplicación más sencilla en la práctica clínica, una adecuada

reproductibilidad para el estudio de EPIGL y por mostrar una menor extensión. En nuestra validación externa del score Baumann para la predicción de EPIGL, los resultados fueron mejores que los documentados por Meerburg et al., (2020), que mostraron una correlación interclase de 0,74, y fue similar a la observada por el score compuesto de Hartmann para la evaluación de la EPIGL (0,84). Así, consideramos que este sistema de predicción es una herramienta adecuada de medición para estudios de investigación, pero también para la práctica clínica, permitiendo mejorar la exactitud diagnóstica de la EPIGL.

Hasta el momento, los trabajos desarrollados identifican potenciales factores predictores de EPIGL que podrían ayudar a identificar subgrupos de pacientes con IDCV con posterior potencial evolución a EPIGL, o aumentar la sospecha clínica cuando se visualicen hallazgos clínicos o radiológicos compatibles (Hartono et al., 2017; Mannina et al., 2016; Cinetto et al., 2021). Sin embargo, la EPIGL constituye una entidad clínica que ha sido recientemente redefinida. La evidencia es actualmente escasa, y los estudios, pese a incluir un mayor tamaño muestral, no están exentos de limitaciones. Por un lado, los trabajos previos incluyen tanto pacientes con diagnóstico no histológico como con diagnóstico histológico de EPIGL. Dado que la confirmación histopatológica en los pacientes con sospecha clínica, analítica y radiológica de EPIGL se considera el *gold standard* para el diagnóstico, esto podría representar un sesgo de selección al incluir posibles falsos positivos, limitando la interpretación de resultados, así como la extrapolación y la validación externa. Por ello, en este estudio, solo se incluyeron aquellos pacientes con EPIGL con confirmación histológica tras biopsia pulmonar. Además, toda la evidencia publicada mostró una aproximación retrospectiva al igual que en el presente trabajo, pero ninguno de los artículos realizó una validación interna o externa, y pese a realizar análisis univariantes con múltiples comparaciones, no se aplicó una penalización de los p-valores, resultando en un mayor error tipo I. Asimismo, en los trabajos de Mannina et al., (2016) y Cinetto et al., (2021), se utilizaron análisis univariantes para la selección de variables y su inclusión en el modelo de regresión: una aproximación cuestionable, ya que son menos comprensivos y no consideran relaciones inter-variables, resultando en un modelo final que tiende a excluir falsos negativos y a incluir falsos positivos, con importantes sesgos de confusión.

Así, nuestros hallazgos sugieren un rol potencial de modelos que integren la clínica, los hallazgos de laboratorio y los scores de TC pulmonar para mejorar la exactitud del diagnóstico no invasivo de la EPIGL que, tras mayor investigación y validación, podrían incluso evitar técnicas potencialmente agresivas de diagnóstico como la biopsia pulmonar en pacientes seleccionados. Además, estos resultados subrayan la necesidad de desarrollar estudios prospectivos con mayor tamaño muestral que permitan entender la fisiopatología de la EPIGL y generar herramientas diagnósticas que permitan un diagnóstico más precoz y se traduzcan en una mejoría en el pronóstico de estos pacientes.

En esta línea, el tercer y último estudio de la presente tesis doctoral, pretende adentrarse en el conocimiento de la fisiopatología de la disregulación inmunitaria asociada a IDCV y añadir una potencial variable más en las técnicas de predicción de la dis inmunidad: el microbioma.

Este trabajo constituye el primer estudio que caracteriza conjuntamente la participación de la microbiota orofaríngea, respiratoria y fecal a nivel de especie en pacientes con dIDCV en comparación con aquellos pacientes que solo presentan complicaciones infecciosas, y considerando controles sanos. En él se demuestra que los pacientes con dIDCV presentan diferencias notables en la composición del microbioma de su saliva, esputo y heces respecto a los pacientes sin complicaciones inmunológicas y sólo comorbilidad infecciosa. Globalmente, la diversidad de especies en las muestras respiratorias y la riqueza de la microbiota fecal fueron menores en los pacientes con dIDCV. A pesar de que no se identificó una sola especie como predictor sólido de dis inmunidad, una combinación de alrededor de 5 a 7 especies en cada tipo de muestra podría predecir de forma independiente este fenotipo de mayor gravedad con una precisión de alrededor del 90 % en nuestra población.

Hasta la fecha, se han publicado diversos estudios con el objetivo de describir el perfil de la microbiota en pacientes con IDCV como puede observarse en la **Tabla 9**, en la que se encuentra la interrelación con nuestros hallazgos (Bosák et al., 2021; Shulzenko et al., 2018; Fiedorová et al., 2019; Jorgensen et al., 2016; Macpherson et al., 2020; Van Schewick et al., 2020; Berbers et al., 2020; Skarpengland et al., 2021; Franco-Esquivias et al., 2019). Sin embargo, la evidencia actual se limita fundamentalmente a la microbiota intestinal (Bosák et al., 2021; Shulzenko et al., 2018; Fiedorová et al., 2019; Jorgensen et al., 2016; Macpherson et al., 2020; Van Schewick et al., 2020; Skarpengland et al., 2021; Franco-Esquivias et al., 2019) o, en todo caso, a la microbiota orofaríngea (Berbers et al., 2020). A pesar de que la mayoría de los trabajos no realizan una determinación a nivel de especie y algunos carecen de grupo de control o tienen un bajo tamaño muestral (Bosák et al., 2021; Shulzenko et al., 2018; Franco-Esquivias et al., 2019), los resultados generales sugieren una disminución de la biodiversidad del microbioma intestinal u oral en los pacientes con IDCV en comparación con los controles sanos. Dado que una mayor diversidad de especies bacterianas se ha asociado con microbiomas sanos y resilientes, planteamos la hipótesis de si en los pacientes con IDCV y fenotipo dis inmune podrían presentar alteraciones de la diversidad alfa global oral, respiratoria y fecal, en términos de riqueza de especies y uniformidad o *evenness*.

Tabla 9. Implicaciones de la microbiota en la Inmunodeficiencia Común Variable: Evidencia científica y hallazgos relevantes

Nicho biológico	Tamaño muestral	Índices de biodiversidad	Hallazgos principales	Patobiontes	Referencia
Intestino	44 IDCV, 45 EI y 263 controles	Menor diversidad alfa	Menor biodiversidad alfa y el alto índice de disbiosis, LPS, y marcadores inmunológicos en dIDCV	No analizado a nivel de especie	Jørgensen et al., 2016
Intestino	7 IDCV con enteropatía, 8 IDCV sin enteropatía, 7 controles con colon irritable	Sin diferencias en diversidad alfa	Nivel extremadamente bajo de IgA en IDCV con enteropatía. <i>Acinetobacter baumannii</i> como posible patobionte en este subgrupo	<i>Acinetobacter baumannii</i> como posible patobionte en IDCV con enteropatía y baja IgA	Shulzhenko et al., 2018
Intestino	55 IDCV y 16 controles convivientes	Menor diversidad alfa y diferente diversidad beta, correlacionado con fenotipo grave	Menor diversidad y mayor alteración en microbiota bacteriana pero no fúngica. Asociación con fenotipos graves	No analizado a nivel de especie	Fedorová et al., 2019
Intestino	5 IDCV	Sin grupo comparativo	Menor presencia de <i>Bacteroidetes</i> y alta abundancia de <i>Firmicutes</i> podrían indicar la existencia de disbiosis intestinal	No analizado a nivel de especie	Franco-Esquivias et al., 2019
Intestino	104 IDCV y 30 controles	No explorada	Concentración plasmática de TMAO elevada, asociada con inflamación sistémica y mayor abundancia de <i>Gammaproteobacteria</i> , sugiriendo un vínculo entre disbiosis e inflamación.	No analizado a nivel de especie	Macpherson et al., 2020
Intestino	15 IDCV y 12 controles convivientes	Diversidad alfa (Shannon) más baja en IDCV en comparación con controles, especialmente en los pacientes con diarrea crónica	Menor diversidad alfa medida por índice de Shannon en pacientes con IDCV. Peor calidad de vida en los pacientes con diarrea	No analizado a nivel de especie	van Schewick et al., 2020
Oral	86 IDCV, 12 agammaglobulinemia ligada al X y 49 controles	Estado de IgA asociado a una beta-diversidad diferente y mayor diversidad alfa con enfermedad pulmonar radiográfica más grave	<i>Prevotella</i> , <i>Alloprevotella</i> y <i>Selenomonas</i> asociada con enfermedad de la vía respiratoria superior. Patología intersticial pulmonar asociada con <i>Streptococcus</i> y negativamente con <i>Rothia</i> . En IDCV estable, déficit de IgA asociado con enfermedad pulmonar y expansión de taxones bacterianos orofaríngeos específicos.	No analizado a nivel de especie	Berbers et al., 2020

Intestino	39 IDCV y 30 controles	Ácidos grasos poliinsaturados n-6 y ácido linoleico disminuidos IDCV y asociados positivamente con la diversidad alfa	IDCV presentan un perfil desfavorable de ácidos grasos, con reducciones en EPA, DHA y diversidad alfa microbiana, no atribuibles a la dieta o enteropatía de IDCV. Rifaximina disminuye la biodiversidad	No analizado a nivel de especie	Skarpenland et al., 2021
Intestino	6 IDCV y sus convivientes sanos	Aumento de riqueza y disminución de Shannon	Mayor diversidad bacteriana con alteración en la abundancia de ciertas especies en pacientes con IDCV. Disregulación en determinadas vías metabólicas con niveles disminuidos de adenosina.	<i>Hungatella hathewayi</i> más frecuente en IDCV y ausente en controles	Bosák et al., 2021
Intestino	28 IDCV, 21 controles y 21 controles convivientes	Menor diversidad alfa en IDCV con niveles bajos o ausentes de IgA fecal	Niveles disminuidos de IgA e IgM fecales asociados a diversidad microbiana reducida y disbiosis incrementada	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Veillonella atypica</i> , <i>Neisseria perflava</i> , <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , y <i>Escherichia</i> no clasificada	Nöltner et al., 2023
Intestino	40 IDCV, 28 controles	Niveles de triglicéridos no asociados a la diversidad alfa	Aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos y todas las tamaños de partículas de VLDL, asociados con inflamación sistémica, LPS y disbiosis intestinal en IDCV, pero no con dieta o IMC	No analizado a nivel de especie	Macpherson et al., 2023
Oral, pulmonar e intestino	41 IDCV (24 con dis inmunidad, 17 solo infecciones), 16 controles	Diversidad alfa fecal y respiratoria menor en pacientes con IDCV y dis inmunidad	La combinación de 5-7 bacterias en cada tipo de muestra predice el fenotipo dis inmune con una precisión del 90%	Oral: <i>V. tobetsuensis</i> , unassigned <i>Peptococcus</i> , <i>C. hominis</i> , <i>C. matruchotii</i> , <i>C. granulosa</i> , <i>P. oris</i> Pulmonar: <i>S. cristatus</i> , <i>C. matruchotii</i> , <i>P. oris</i> , <i>C. durum</i> , unassigned species of <i>Kingella</i> , <i>Capnocytophaga</i> and <i>Actinobacillus</i> Intestino: Unassigned <i>Peptococcaceae</i> , <i>Christesellaceae</i> , <i>Oscillospirales</i> , <i>Defluviitaleaceae</i> UCG.010, and <i>Alistipes</i> , and <i>P. merdae</i>	Cabanero-Navalon et al., 2023

En nuestro trabajo, si bien no se observaron diferencias en los índices globales de diversidad alfa en la microbiota oral según el fenotipo de IDCV, la riqueza de especies fecales fue significativamente menor en las heces de pacientes con IDCV con complicaciones inmunitarias, de forma similar a lo descrito previamente en pacientes con IDCV grave complicada (Jorgensen et al., 2016; Fiedorová et al., 2019). Estos hallazgos van en línea con la evidencia disponible que defiende que la alteración del microbioma y la disbiosis en estos pacientes son marcadores de trastornos intestinales inflamatorios (Jorgensen et al., 2016; Varricchi et al., 2021; Jorgensen et al., 2019), y se encuentran fuertemente asociados a niveles elevados de sCD14, sCD25 y LPS. De hecho, el sCD25 y el LPS plasmático se correlacionaron con una reducción de la diversidad alfa en pacientes con IDCV grave y disregulación inmunitaria (Jorgensen et al., 2016). Además, otro estudio demostró que los pacientes con IDCV presentan menores niveles fecales de adenosina e inosina, dos metabolitos de las purinas que modulan varios aspectos de la respuesta inmune (Bósak et al., 2021). Sin embargo, todavía desconocemos ampliamente cuáles son las vías moleculares por las que la microbiota contribuye a la inflamación sistémica en pacientes IDCV.

También, se ha descrito que la microbiota oral invade los nichos intestinales y respiratorios en individuos inmunodeprimidos, y la presencia de bacterias orales en el intestino se ha asociado con múltiples trastornos inflamatorios (Park et al., 2021; Camello-Castillo et al., 2019). Los mecanismos subyacentes a este efecto patogénico incluyen, entre otros, la actividad de las células TH1 y la inflamación sistémica (Atarashi et al., 2017), la reducción de la expresión génica de proteínas de unión estrecha y los elevados niveles de LPS en plasma (Arimatsu et al., 2014).

En nuestras muestras, no encontramos bacterias orales sobrerrepresentadas en el intestino, pero muchos microbios orales se encontraban más representados en el tracto respiratorio de individuos con dIDCV. De hecho, las cinco especies identificadas por nuestro modelo *random forest* como los mejores biomarcadores de dIDCV en los pulmones son bacterias orales. Recientemente se ha demostrado que la invasión de microorganismos orales en el tracto respiratorio se asocia con el uso de antibióticos en niños con neumonía (Henares et al., 2021). En nuestra serie, el número absoluto de pacientes en tratamiento con antibióticos profiláctico fue mayor en los pacientes con dIDCV, que también mostraron una menor diversidad microbiana respiratoria en comparación con los controles sanos. Por lo tanto, el posible papel de la invasión del tracto respiratorio por bacterias orales en la inflamación sistémica en este subgrupo de pacientes debería ser estudiado más a fondo.

Más allá de algunos estudios que se adentran en el microbioma intestinal y solo uno que estudia la microbiota oral, una pregunta fundamental es si las poblaciones bacterianas en otros nichos pueden tener un papel en la disfunción inmune en pacientes con IDCV. Este es el primer estudio que analiza muestras de esputo y, curiosamente, la diversidad bacteriana respiratoria fue menor en pacientes con dIDCV en comparación con los controles. Dado que se ha demostrado que las

muestras de esputo son solo parcialmente representativas de la microbiota respiratoria (Cabrera-Rubio et al., 2012), el análisis de muestras de pulmón, idealmente del tracto respiratorio inferior, es de alta importancia considerando el eje bidireccional intestino-pulmón en IDCV (Varricchi et al., 2021) y la alta frecuencia de complicaciones pulmonares inmunológicas graves en el fenotipo de disregulación inmune, como la EPIGL.

Igualmente, aunque los índices generales de biodiversidad pueden ayudar a identificar las diferencias globales de las poblaciones microbianas, las comparaciones taxonómicas son esenciales para identificar posibles patobiontes o especies microbianas asociadas a cada fenotipo de IDCV. En las muestras orales, *V. tobetsuensis*, una especie no asignada de *Peptococcus* spp., *P. oris*, *C. hominis*, *C. matruchotii*, *C. granulosa* y *S. mitis*, podrían predecir de forma conjunta la dis inmunidad en pacientes con IDCV con una precisión del 95 % en nuestra población de estudio. Posiblemente debido a contaminación salivar o siembra bacteriana (Berbers et al., 2020), *P. oris* y *C. matruchotii* se detectaron también como predictores independientes en muestras de esputo, junto con *S. cristatus*, *C. durum* y una especie de *Kingella*, mostrando una precisión del 92%. Curiosamente, en este estudio, el microbioma fecal fue el menos discriminatorio.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los trabajos en la literatura se centran en análisis de heces o digestivos (Bosák et al., 2021; Shulzenko et al., 2018; Fiedorová et al., 2019; Jorgensen et al., 2016; Macpherson et al., 2020; Van Schewick et al., 2020; et al., 2021; Franco-Esquivias et al., 2019), estos resultados resaltan la importancia de profundizar el conocimiento en nichos alternativos para desentrañar el papel del microbioma a múltiples niveles en la generación o perpetuación de la disregulación inmunológica y la autoinmunidad en la IDCV. En las muestras fecales, diversas especies no asignadas de *Peptococcaceae*, *Christensellaceae*, *Oscillospirales*, *Alistipes*, *Defluviitaleaceae* y *P. merdae* fueron capaces de clasificar a los pacientes en función de su fenotipo con una precisión del 86%.

Aunque los estudios realizados hasta la actualidad desentrañando el rol de la microbiota en las enfermedades inmunes son complejos y heterogéneos, en este trabajo se demuestra evidencia consistente respecto a la alteración de la microbiota y la frecuencia de algunas especies bacterianas previamente implicadas en patología autoinmune sistémica o autoinflamatoria. Existe muy poca información a nivel de especie, sin embargo, *Veillonella* spp. también se ha relacionado previamente con el microbioma en IDCV, así como con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), la hepatitis autoinmune, el síndrome de Sjögren y la artritis reumatoide (Gao et al., 2022). Al igual que en nuestro trabajo, una mayor abundancia de *Prevotella* spp. también se ha descrito previamente en muestras orofaríngeas de pacientes con IDCV grave con disregulación inmunitaria y niveles más bajos de IgA (Berbers et al., 2020). Además, se ha descrito una proporción significativamente aumentada de *P. oris* en pacientes con LES independientemente del estado periodontal. Otras especies de *Prevotella* también se

han relacionado con el LES, artritis reumatoide o sarcoidosis (Gao et al., 2022; Becker et al., 2019).

Merecen mención, adicionalmente, las especies del género *Streptococcus*, ya que supone el género bacteriano más abundante en el microbioma oral e intestinal de los pacientes con IDCV (Berbers et al., 2020, Fiedorova et al., 2019). Al igual que en nuestro trabajo, un aumento de su abundancia se ha relacionado positivamente con la dis inmunidad y la enfermedad pulmonar intersticial en IDCV (Berbers et al., 2020), y también se ha descrito que *S. mitis* es una especie enriquecida en la artritis reumatoide (Gao et al., 2022). El género también se ha considerado proinflamatorio en enfermedades autoinmunes sistémicas, con evidencia clara de abundancia aumentada de *Streptococcus* en la espondilitis anquilosante, la artrosis, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren, el LES, la esclerosis sistémica o la sarcoidosis (Gao et al., 2022; Becker et al., 2019). Sin embargo, se deben interpretar estos resultados con cuidado, especialmente teniendo en cuenta que diferentes especies del género pueden presentar características tanto inflamatorias como antiinflamatorias, y considerando las limitaciones de los estudios previos, que solo identifican géneros o, como máximo, unidades taxonómicas operativas.

Nuestros hallazgos concuerdan con la evidencia previa en cuanto a otros géneros como *Leptotrichia* o familias como *Ruminococcaceae*, también observados con mayor frecuencia en muestras orales e intestinales de pacientes con IDCV, respectivamente (Berbers et al., 2020; Franco-Esquivias et al., 2019). Sin embargo, la evidencia en otras enfermedades autoinmunes sistémicas es más controvertida, con informes ambivalentes en artritis reumatoide o síndrome de Sjögren (Gao et al., 2022). Además, especies de *Alistipes* como *A. onderdonkii* también se han relacionado con pacientes con IDCV (Bosák et al., 2021). En este estudio, una especie no asignada del género fue significativamente más prevalente en heces de pacientes dis inmunes con IDCV y se consideró como predictor independiente después del análisis de Boruta.

Estos hallazgos sugieren que el microbioma de diferentes nichos podría desempeñar un papel importante en la fisiopatología de la dIDCV. A pesar de que sí se está documentando una alteración de la microbiota en los pacientes con IDCV, existe una falta de evidencia básica o clínica sobre el impacto de los moduladores de la microbiota como los prebióticos, los probióticos en sí mismos, incluyendo microorganismos genéticamente modificados o el trasplante de microbiota fecal, o simbióticos como la terapia combinada de prebióticos y probióticos, así como intervenciones dietéticas (Poto et al., 2023).

Este estudio presenta varias limitaciones. La IDCV es una enfermedad heterogénea, por lo que las clasificaciones clínicas también pueden ser heterogéneas a pesar de los criterios de definición sistemáticos y estrictos. Por ello, la evidencia actual sobre los hallazgos de la microbiota se limita a la evidencia genética y molecular disponible sobre la enfermedad. Los pacientes con IDCV son muy complejos y comúnmente requieren terapia antibiótica profiláctica o tratamiento inmunosupresor, que influyen mucho en sus microbiomas y deben tenerse en cuenta al

interpretar los datos. De hecho, los pacientes con IDCV y complicaciones dis inmunes recibieron significativamente más inmunosupresores debido a sus complicaciones asociadas que los pacientes con solo infecciones. Además, si bien es cierto que existen varios estudios que analizan la alteración de la microbiota en pacientes con IDCV, aún no se ha determinado si estos cambios son la causa o el efecto de la enfermedad.

Otra limitación que merece mención es la naturaleza unicéntrica del estudio, ya que el microbioma puede encontrarse fuertemente influenciado por factores relacionados con la atención específica administrada en el mismo hospital, o la diferente población comensal bacteriana en el área, como consecuencia de factores ambientales como la dieta o el tipo de agua (ver, por ej. Willis et al., 2018). Por lo tanto, los futuros trabajos en modelos animales deberían apuntar a establecer la potencial relación causal entre algunas de las bacterias identificadas como consistentemente relacionadas con la IDCV y el desarrollo de la enfermedad. También, se obtuvieron muestras respiratorias de esputo y su contaminación con microbiota salival es evidente. Además, no se realizó un diagnóstico del estado periodontal en los controles ni en los casos, lo que podría limitar la interpretación de los hallazgos en la microbiota bucal.

Por todo ello, los hallazgos del tercer estudio de la tesis doctoral concuerdan con la hipótesis de que los diferentes fenotipos clínicos de IDCV albergan una composición de microbioma distinta no solo en el tracto digestivo, sino también en la orofaringe y las vías respiratorias. Nuestro trabajo proporciona nuevos conocimientos en estos nichos y su relación con determinados perfiles de pacientes previamente inexplorados, pero altamente interrelacionados, y sugiere que esta disbiosis bacteriana sistémica podría estar implicada en la disregulación inmunitaria asociada a casos graves de IDCV con complicaciones inmunológicas. De hecho, a pesar de que no se identificó un solo patobionte como marcador único de dis inmunidad en IDCV, el modelo construido por análisis *random forest* identificó grupos de 5-7 especies en todas las muestras diferenciando con precisión entre fenotipos de IDCV e individuos sanos.

A modo de síntesis global, la integración de los tres estudios proporciona una visión holística y multidisciplinar de la IDCV, sus manifestaciones clínicas, sus complicaciones y su relación con el microbioma. Al integrar esta información, se pueden extraer diversas inferencias y se abre la puerta a la posibilidad de combinar parámetros clínicos, analíticos, radiológicos y microbiológicos en el diagnóstico y manejo de la IDCV, a la par que desentrañar la fisiopatología de la dis inmunidad inherente a ciertos fenotipos clínicos de esta patología.

La limitada evidencia disponible sobre la situación epidemiológica y clínica de la IDCV en España, la carencia de registros nacionales concernientes a la IDCV, así como la inconsistencia en el manejo terapéutico, condujeron al desarrollo del registro multicéntrico GTEM-SEMI-CVID. En él se puso de manifiesto la relevancia de las complicaciones dis inmunes en el tratamiento y pronóstico de esta enfermedad. De ellas, la afectación pulmonar intersticial, entre la que se encuentra la EPIGL, emerge como la de mayor impacto y confiere un peor pronóstico. Con el

objetivo de profundizar en esta complicación, elaboramos un modelo clínico-analítico y radiológico para predecir, en etapas tempranas, aquellos pacientes con IDCV y afectación pulmonar que podrían evolucionar desfavorablemente. Sin embargo, este modelo de dis inmunidad no aborda la fisiopatología subyacente al desarrollo de la disregulación inmune. En ese marco, se plantea un interrogante central: ¿por qué ciertos pacientes con IDCV manifiestan dis inmunidad y un pronóstico deteriorado en comparación con otros que sólo presentan clínica infecciosa?

Con base en la literatura existente, y considerando que la genética sólo parece explicar actualmente hasta un 30% de estos casos, postulamos que la microbiota podría desempeñar un papel determinante. Siguiendo esta hipótesis y reconociendo el carácter sistémico de la dis inmunidad en la IDCV, decidimos examinar no solo la microbiota intestinal, como se ha hecho en investigaciones anteriores, sino también la oral y pulmonar. Como resultado, identificamos una alteración notable en la microbiota salivar, respiratoria y fecal de pacientes con IDCV y complicaciones dis inmunes, que es capaz de predecir con elevada fiabilidad el fenotipo dis inmune de los pacientes.

La posibilidad de integrar análisis del microbioma en el ámbito clínico es prometedora, pero también plantea retos. A medida que se desarrollan técnicas más avanzadas para analizar el microbioma, se vuelve cada vez más factible su integración en la práctica clínica. Sin embargo, aún existen barreras, como la variabilidad interindividual en la composición del microbioma, la necesidad de métodos estandarizados y validados para el análisis microbiológico, y su elevado coste económico.

Finalmente, este trabajo doctoral subraya dos aspectos fundamentales: la imperativa necesidad de estandarizar el manejo clínico de la IDCV a través de protocolos nacionales e internacionales, teniendo en cuenta su inherente naturaleza sistémica y la disregulación inmunológica asociada. Esta última requiere una perspectiva holística que integre parámetros clínicos, analíticos, radiológicos y microbiológicos, facilitando así un diagnóstico precoz y una intervención terapéutica más específica. Por ello, en futuras investigaciones, sería relevante explorar la relación entre la microbiota y los parámetros clínicos, de laboratorio y radiológicos estudiados, para desarrollar modelos predictivos más precisos y personalizados, tras su validación externa y multicéntrica, que permitan continuar acelerando el diagnóstico y mejorando el pronóstico de los pacientes con IDCV.

CONCLUSIONES

8. Conclusiones

Los hallazgos obtenidos de los estudios que componen la presente Tesis Doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha elaborado el primer estudio nacional multicéntrico español de IDCV que incluye pacientes en seguimiento por hospitales secundarios y terciarios.
2. La IDCV ha sufrido un cambio de paradigma en el que las complicaciones dis inmunes suponen el mayor reto terapéutico y el principal factor pronóstico. Es necesario crear más estudios que analicen la fisiopatología de la dis inmunidad en la IDCV para desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas que eviten el uso de tratamiento inmunosupresor.
3. El desarrollo de protocolos nacionales resulta imprescindible para optimizar el manejo de los pacientes con IDCV, especialmente estimulando el cambio a IgSc, desarrollando cribados de neoplasia y factores de riesgo, y mejorando la identificación precoz de afectación subclínica pulmonar como la EPIGL.
4. El uso de herramientas predictivas integrativas que combinen parámetros de puntuación clínicos, de laboratorio y radiológicos podría ser útil para el diagnóstico temprano de EPIGL en pacientes con IDCV.
5. La presencia de esplenomegalia, linfadenopatías, un bajo recuento de células CD8 y un alto puntaje en el score GLILD de Baumann predice con casi perfecta exactitud la presencia de EPIGL confirmado histológicamente, incluso después de la validación interna.
6. El score de GLILD de Baumann está fuertemente correlacionado con la probabilidad de EPIGL y es altamente reproducible entre observadores entrenados.
7. Se ha caracterizado por primera vez la composición de la microbiota orofaríngea, respiratoria y fecal a nivel de especie en pacientes con IDCV con fenotipo dis inmune en comparación con aquellos pacientes que solo presentan complicaciones infecciosas y controles sanos.
8. Los pacientes con IDCV y complicaciones dis inmunes presentan diferencias importantes en la composición del microbioma de su saliva, esputo y heces. La diversidad bacteriana respiratoria en términos de uniformidad de especies así como la riqueza bacteriana fecal fueron menores en los pacientes con fenotipos dis inmunes respecto a los controles sanos y a los pacientes con complicaciones exclusivamente infecciosas.
9. La disbiosis bacteriana sistémica, tal como se refleja en los perfiles alterados de microbiota en las muestras fecales, orales y respiratorias, podría estar implicada en la dis regulación inmunológica asociada con casos graves de IDCV con complicaciones inmunitarias.
10. Una combinación de alrededor de 5-7 especies en cada tipo de muestra puede clasificar fenotípicamente a los pacientes con IDCV con una precisión de alrededor del 90% en nuestra población, apoyando el uso de la microbiota como biomarcador de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

9. Bibliografía

1. Abolhassani H, Aghamohammadi A, Imanzadeh A, Mohammadinejad P, Sadeghi B, Rezaei N. Malignancy phenotype in common variable immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2012;22(2):133-4.
2. Abolhassani H, Amirkashani D, Parvaneh N, Mohammadinejad P, Gharib B, Shahinpour S, Hirbod-Mobarakeh A, Mirghorbani M, Movahedi M, Gharagozlou M, Rezaei N, Aghamohammadi A. Autoimmune phenotype in patients with common variable immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23(5):323-9.
3. Abolhassani H, Sadaghiani MS, Aghamohammadi A, Ochs HD, Rezaei N. Home-based subcutaneous immunoglobulin versus hospital-based intravenous immunoglobulin in treatment of primary antibody deficiencies: systematic review and meta analysis. *J Clin Immunol*. 2012 Dec;32(6):1180-92. doi: 10.1007/s10875-012-9720-1.
4. Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2019 Nov;123(5):454-460. doi: 10.1016/j.anai.2019.07.014.
5. Agarwal S, Mayer L. Diagnosis and treatment of gastrointestinal disorders in patients with primary immunodeficiency. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Sep;11(9):1050-63. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.024. Epub 2013 Mar 13.
6. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct;124(4):658-64. doi: 10.1016/j.jaci.2009.06.018.
7. Agencia Europea de Medicamentos. Flebogamma ficha técnica [Internet]. 2007 [accedido el 28 jun 2023]; Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/>
8. Ahn S, Cunningham-Rundles C. Role of B cells in common variable immune deficiency. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009 Sep;5(5):557-64. doi: 10.1586/eci.09.43.
9. Amaya-Urbe L, Rojas M, Azizi G, Anaya JM, Gershwin ME. Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2019 May;99:52-72. doi: 10.1016/j.jaut.2019.01.011.
10. Ameratunga R, Woon ST, Bryant VL, Steele R, Slade C, Leung EY, Lehnert K. Clinical Implications of Digenic Inheritance and Epistasis in Primary Immunodeficiency Disorders. *Front Immunol*. 2018 Jan 26;8:1965. doi: 10.3389/fimmu.2017.01965.
11. Andersen IM, Jørgensen SF. Gut inflammation in CVID: causes and consequences. *Expert Rev Clin Immunol*. 2022 Jan;18(1):31-45. doi: 10.1080/1744666X.2021.2008241.
12. Antachopoulos C, Walsh TJ, Roilides E. Fungal infections in primary immunodeficiencies. *Eur J Pediatr*. 2007 Nov;166(11):1099-117. doi: 10.1007/s00431-007-0527-7.
13. Ardeniz O, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2009 Nov;133(2):198-207. doi: 10.1016/j.clim.2009.05.001. Epub 2009 Aug 28. PMID: 19716342; PMCID: PMC2760682.

14. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep*. 2014 May 6;4:4828. doi: 10.1038/srep04828.
15. Arkwright PD, Gennery AR. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Nov;1238:7-14. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06206.x.
16. Arslan S, Ucar R, Caliskaner AZ, Reisli I, Guner SN, Sayar EH, Baloglu I. How effective are the 6 European Society of Immunodeficiency warning signs for primary immunodeficiency disease? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016 Feb;116(2):151-155.e1. doi: 10.1016/j.anai.2015.12.001.
17. Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, Kiguchi Y, Yasuma K, Watanabe E, Tanoue T, Thaïss CA, Sato M, Toyooka K, Said HS, Yamagami H, Rice SA, Gevers D, Johnson RC, Segre JA, Chen K, Kolls JK, Elinav E, Morita H, Xavier RJ, Hattori M, Honda K. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T_H1 cell induction and inflammation. *Science*. 2017 Oct 20;358(6361):359-365. doi: 10.1126/science.aan4526.
18. Azizi G, Abolhassani H, Asgardoost MH, Alinia T, Yazdani R, Mohammadi J, Rezaei N, Ochs HD, Aghamohammadi A. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: epidemiology, pathophysiology and management. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017 Feb;13(2):101-115. doi: 10.1080/1744666X.2016.1224664.
19. Azizi G, Rezaei N, Kiaee F, Tavakolinia N, Yazdani R, Mirshafiey A, Aghamohammadi A. T-Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2016;26(4):233-43. doi: 10.18176/jiaci.0069. Epub 2016 Apr 15. PMID: 27374799.
20. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A, Packwood K, Burden J, Harrison D, Kaenzig N, Lee M, Chapel HM, Ferry BL. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clin Exp Immunol*. 2012 Nov;170(2):202-11. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04643.x.
21. Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Aug;114(2):415-21. doi: 10.1016/j.jaci.2004.05.057.
22. Baumann U, Routes JM, Soler-Palacín P, Jolles S. The Lung in Primary Immunodeficiencies: New Concepts in Infection and Inflammation. *Front Immunol*. 2018 Aug 8;9:1837. doi: 10.3389/fimmu.2018.01837.
23. Becker A, Vella G, Galata V, Rentz K, Beisswenger C, Herr C, Walter J, Tierling S, Slevogt H, Keller A, Bals R. The composition of the pulmonary microbiota in sarcoidosis - an observational study. *Respir Res*. 2019 Feb 28;20(1):46. doi: 10.1186/s12931-019-1013-2.
24. Berbers RM, Mohamed Hoesein FAA, Ellerbroek PM, van Montfrans JM, Dalm VASH, van Hagen PM, et al. Low IgA Associated With Oropharyngeal Microbiota Changes and Lung

- Disease in Primary Antibody Deficiency. *Front Immunol.* 2020 Jun 19;11:1245. doi: 10.3389/fimmu.2020.01245.
25. Berbers RM, Nierkens S, van Laar JM, Bogaert D, Leavis HL. Microbial Dysbiosis in Common Variable Immune Deficiencies: Evidence, Causes, and Consequences. *Trends Immunol.* 2017 Mar;38(3):206-216. doi: 10.1016/j.it.2016.11.008.
26. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH, Kazou M, Kinkel L, Lange L, Lima N, Loy A, Macklin JA, Maguin E, Mauchline T, McClure R, Mitter B, Ryan M, Sarand I, Smidt H, Schelke B, Roume H, Kiran GS, Selvin J, Souza RSC, van Overbeek L, Singh BK, Wagner M, Walsh A, Sessitsch A, Schloter M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome.* 2020 Jun 30;8(1):103. doi: 10.1186/s40168-020-00875-0. Erratum in: *Microbiome.* 2020 Aug 20;8(1):119.
27. Biagi F, Bianchi PI, Zilli A, Marchese A, Luinetti O, Lougaris V, Plebani A, Villanacci V, Corazza GR. The significance of duodenal mucosal atrophy in patients with common variable immunodeficiency: a clinical and histopathologic study. *Am J Clin Pathol.* 2012 Aug;138(2):185-9. doi: 10.1309/AJCPEIILH2C0WFYE.
28. Boland BS, Riedl MA, Valasek MA, Crowe SE, Sandborn WJ. Vedolizumab in Patients With Common Variable Immune Deficiency and Gut Inflammation. *Am J Gastroenterol.* 2017 Oct;112(10):1621. doi: 10.1038/ajg.2017.246.
29. Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, Keller M, Kobrynski LJ, Komarow HD, Mazer B, Nelson RP Jr, Orange JS, Routes JM, Shearer WT, Sorensen RU, Verbsky JW, Bernstein DI, Blessing-Moore J, Lang D, Nicklas RA, Oppenheimer J, Portnoy JM, Randolph CR, Schuller D, Spector SL, Tilles S, Wallace D; Joint Task Force on Practice Parameters, representing the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; the American College of Allergy, Asthma & Immunology; and the Joint Council of Allergy, Asthma & Immunology. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Nov;136(5):1186-205.e1-78. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.049.
30. Bonilla FA. Intravenous and subcutaneous immunoglobulin G replacement therapy. *Allergy Asthma Proc.* 2016 Nov;37(6):426-431. doi: 10.2500/aap.2016.37.3987.
31. Bosák J, Lexa M, Fiedorová K, Gadara DC, Micenková L, Spacil Z, Litzman J, Freiburger T, Šmajš D. Patients With Common Variable Immunodeficiency (CVID) Show Higher Gut Bacterial Diversity and Levels of Low-Abundance Genes Than the Healthy Housemates. *Front Immunol.* 2021 May 14;12:671239. doi: 10.3389/fimmu.2021.671239.
32. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol.* 2006 Oct;18(5):263-75. doi: 10.1016/j.smim.2006.04.006. Epub 2006 Aug 17. PMID: 16914324.
33. Boursiquot JN, Gérard L, Malphettes M, Fieschi C, Galicier L, Boutboul D, Borie R, Viallard JF, Soulas-Sprauel P, Berezne A, Jaccard A, Hachulla E, Haroche J, Schleinitz N, Têtu L, Oksenhendler E; DEFI study group. Granulomatous disease in CVID: retrospective analysis of clinical characteristics and treatment efficacy in a cohort of 59 patients. *J Clin Immunol.* 2013 Jan;33(1):84-95. doi: 10.1007/s10875-012-9778-9.

34. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, Rundles CC, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Oksenhendler E, Puel A, Puck J, Seppänen MRJ, Somech R, Su HC, Sullivan KE, Torgerson TR, Meyts I. The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2022 Oct;42(7):1508-1520. doi: 10.1007/s10875-022-01352-z.
35. Buckley RH. Primary cellular immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(5):747-57. doi: 10.1067/mai.2002.123617.
36. Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, Mira A. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3562-8. doi: 10.1128/JCM.00767-12.
37. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016 Jul;13(7):581-3. doi: 10.1038/nmeth.3869.
38. Camelo-Castillo A, Henares D, Brotons P, Galiana A, Rodríguez JC, Mira A, Muñoz-Almagro C. Nasopharyngeal Microbiota in Children With Invasive Pneumococcal Disease: Identification of Bacteria With Potential Disease-Promoting and Protective Effects. *Front Microbiol*. 2019 Jan 28;10:11. doi: 10.3389/fmicb.2019.00011.
39. Cao Z, Sugimura N, Burgermeister E, Ebert MP, Zuo T, Lan P. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *EBioMedicine*. 2022 Jul;81:104113. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104113.
40. Carsetti R, Rosado MM, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A, Plebani A, Aiuti F, Quinti I. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Feb;115(2):412-7. doi: 10.1016/j.jaci.2004.10.048.
41. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol*. 2009 Jun;145(6):709-27. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07669.x.
42. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, Fieschi C, Thon V, Abedi MR, Hammarstrom L. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008 Jul 15;112(2):277-86. doi: 10.1182/blood-2007-11-124545.
43. Chapel H, Lucas M, Patel S, Lee M, Cunningham-Rundles C, Resnick E, Gerard L, Oksenhendler E. Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Nov;130(5):1197-1198.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.046.
44. Chase NM, Verbsky JW, Hintermeyer MK, Waukau JK, Tomita-Mitchell A, Casper JT, Singh S, Shahir KS, Tisot WB, Nugent ML, Rao RN, Mackinnon AC, Goodman LR, Simpson PM, Routes JM. Use of combination chemotherapy for treatment of granulomatous and lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Immunol*. 2013 Jan;33(1):30-9. doi: 10.1007/s10875-012-9755-3.

45. Chen Y, Zhou J, Wang L. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Mar 17;11:625913. doi: 10.3389/fcimb.2021.625913.
46. Cinetto F, Scarpa R, Carrabba M, Firinu D, Lougaris V, Buso H, Garzi G, Gianese S, Soccodato V, Punziano A, Lagnese G, Tessarin G, Costanzo G, Landini N, Vio S, Bondioni MP, Consonni D, Marasco C, Del Giacco S, Rattazzi M, Vacca A, Plebani A, Fabio G, Spadaro G, Agostini C, Quinti I, Milito C. Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Multicenter Retrospective Study of Patients From Italian PID Referral Centers. *Front Immunol.* 2021 Mar 10;12:627423. doi: 10.3389/fimmu.2021.627423.
47. Cooper MA, Pommering TL, Korányi K. Primary immunodeficiencies. *Am Fam Physician.* 2003 Nov 15;68(10):2001-8.
48. Costagliola G, Consolini R. Lymphadenopathy at the crossroad between immunodeficiency and autoinflammation: An intriguing challenge. *Clin Exp Immunol.* 2021 Sep;205(3):288-305. doi: 10.1111/cei.13620. Epub 2021 Jun 20.
49. Cunill V, Clemente A, Lanio N, Barceló C, Andreu V, Pons J, Ferrer JM. Follicular T Cells from smB- Common Variable Immunodeficiency Patients Are Skewed Toward a Th1 Phenotype. *Front Immunol.* 2017 Feb 27;8:174. doi: 10.3389/fimmu.2017.00174.
50. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol.* 1999 Jul;92(1):34-48. doi: 10.1006/clim.1999.4725.
51. Cunningham-Rundles C. Human B cell defects in perspective. *Immunol Res.* 2012 Dec;54(1-3):227-32. doi: 10.1007/s12026-012-8318-2.
52. Datta S, Shah L, Gilman RH, Evans CA. Comparison of sputum collection methods for tuberculosis diagnosis: a systematic review and pairwise and network meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2017 Aug;5(8):e760-e771. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30201-2. Epub 2017 Jun 15. Erratum in: *Lancet Glob Health.* 2017 Aug;5(8):e759.
53. D'Elios MM, Rizzi M, editors. Humoral Primary Immunodeficiencies. Springer; 2019.
54. Delmonte OM, Schuetz C, Notarangelo LD. RAG Deficiency: Two Genes, Many Diseases. *J Clin Immunol.* 2018 Aug;38(6):646-655. doi: 10.1007/s10875-018-0537-4.
55. Development Core Team (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R. Found. Stat. Comput. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
56. Dhalla F, da Silva SP, Lucas M, Travis S, Chapel H. Review of gastric cancer risk factors in patients with common variable immunodeficiency disorders, resulting in a proposal for a surveillance programme. *Clin Exp Immunol.* 2011 Jul;165(1):1-7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04384.x.
57. Dhalla F, Lochlainn DJM, Chapel H, Patel SY. Histology of Interstitial Lung Disease in Common Variable Immune Deficiency. *Front Immunol.* 2020 Nov 20;11:605187. doi: 10.3389/fimmu.2020.605187.

58. Dieli-Crimi R, Martínez-Gallo M, Franco-Jarava C, Antolin M, Blasco L, Paramonov I, Semidey ME, Álvarez Fernández A, Molero X, Velásquez J, Martín-Nalda A, Pujol-Borrell R, Colobran R. Th1-skewed profile and excessive production of proinflammatory cytokines in a NFKB1-deficient patient with CVID and severe gastrointestinal manifestations. *Clin Immunol*. 2018 Oct;195:49-58. doi: 10.1016/j.clim.2018.07.015.
59. Dzidic M, Collado MC, Abrahamsson T, Artacho A, Stensson M, Jenmalm MC, Mira A. Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *ISME J*. 2018 Sep;12(9):2292-2306. doi: 10.1038/s41396-018-0204-z. Epub 2018 Jun 13.
60. Elkaim E, Neven B, Bruneau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L, Lucas CL, Matthews H, Deau MC, Sharapova S, Curtis J, Reichenbach J, Glastre C, Parry DA, Arumugakani G, McDermott E, Kilic SS, Yamashita M, Moshous D, Lamrini H, Otremba B, Gennery A, Coulter T, Quinti I, Stephan JL, Lougaris V, Brodski N, Barlogis V, Asano T, Galicier L, Boutboul D, Nonoyama S, Cant A, Imai K, Picard C, Nejntsev S, Molina TJ, Lenardo M, Savic S, Cavazzana M, Fischer A, Durandy A, Kracker S. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Jul;138(1):210-218.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.022.
61. Farmer JR, Ong MS, Barmettler S, Yonker LM, Fuleihan R, Sullivan KE, Cunningham-Rundles C; USIDNET Consortium; Walter JE. Common Variable Immunodeficiency Non-Infectious Disease Endotypes Redefined Using Unbiased Network Clustering in Large Electronic Datasets. *Front Immunol*. 2018 Jan 9;8:1740. doi: 10.3389/fimmu.2017.01740.
62. Fevang B. Treatment of inflammatory complications in common variable immunodeficiency (CVID): current concepts and future perspectives. *Expert Rev Clin Immunol*. 2023 Jun;19(6):627-638. doi: 10.1080/1744666X.2023.2198208.
63. Fiedorová K, Radvanský M, Bosák J, Grombířková H, Němcová E, Králíčková P, Černochová M, Kotásková I, Lexa M, Litzman J, Šmajš D, Freiburger T. Bacterial but Not Fungal Gut Microbiota Alterations Are Associated With Common Variable Immunodeficiency (CVID) Phenotype. *Front Immunol*. 2019 Aug 13;10:1914. doi: 10.3389/fimmu.2019.01914.
64. Fioranelli M, Bottaccioli AG, Bottaccioli F, Bianchi M, Rovesti M, Rocchia MG. Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease: A Review Psychoneuroendocrineimmunology-Based. *Front Immunol*. 2018
65. Fischer A, Provot J, Jais JP, Alcais A, Mahlaoui N; members of the CEREDIH French PID study group. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Nov;140(5):1388-1393.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.12.978.
66. Fliegauf M, Bryant VL, Frede N, Slade C, Woon ST, Lehnert K, Winzer S, Bulashevskaya A, Scerri T, Leung E, Jordan A, Keller B, de Vries E, Cao H, Yang F, Schäffer AA, Warnatz K, Browett P, Douglass J, Ameratunga RV, van der Meer JW, Grimbacher B. Haploinsufficiency of the NF- κ B1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet*. 2015 Sep 3;97(3):389-403. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.07.008.

67. Franco-Esquivias AP, Peña CG, Torres-Lozano C, Vaca-Paniagua F, Díaz-Velásquez C, Ortega-Cisneros M, Quintero-Ramos A. Gut microbiota in Mexican patients with common variable immunodeficiency. *Gac Med Mex.* 2019;155(5):447-452. doi: 10.24875/GMM.M20000330.
68. Franxman TJ, Howe LE, Baker JR Jr. Infliximab for treatment of granulomatous disease in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2014 Oct;34(7):820-7. doi: 10.1007/s10875-014-0079-3.
69. Fraz MSA, Moe N, Revheim ME, Stavrinou ML, Durheim MT, Nordøy I, Macpherson ME, Aukrust P, Jørgensen SF, Aaløkken TM, Fevang B. Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease in Common Variable Immunodeficiency-Features of CT and ¹⁸F-FDG Positron Emission Tomography/CT in Clinically Progressive Disease. *Front Immunol.* 2021 Jan 26;11:617985. doi: 10.3389/fimmu.2020.617985.
70. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw.* 2010;33(1):1-22.
71. Fudenberg H, Good RA, Goodman HC, Hitzig W, Kunkel HG, et al. Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee. *Pediatrics.* 1971;47(5):927-4.
72. Ganjalikhani-Hakemi M, Yazdani R, Sherkat R, Homayouni V, Masjedi M, Hosseini M. Evaluation of the T helper 17 cell specific genes and the innate lymphoid cells counts in the peripheral blood of patients with the common variable immunodeficiency. *J Res Med Sci.* 2014 Mar;19(Suppl 1):S30-5.
73. Gao L, Cheng Z, Zhu F, Bi C, Shi Q, Chen X. The Oral Microbiome and Its Role in Systemic Autoimmune Diseases: A Systematic Review of Big Data Analysis. *Front Big Data.* 2022 Jun 29;5:927520. doi: 10.3389/fdata.2022.927520.
74. Gathmann B, Mahlaoui N; CEREDIH; Gérard L, Oksenhendler E, Warnatz K, Schulze I, Kindle G, Kuijpers TW; Dutch WID; van Beem RT, Guzman D, Workman S, Soler-Palacín P, De Gracia J, Witte T, Schmidt RE, Litzman J, Hlavackova E, Thon V, Borte M, Borte S, Kumararatne D, Feighery C, Longhurst H, Helbert M, Szaflarska A, Sediva A, Belohradsky BH, Jones A, Baumann U, Meyts I, Kutukculer N, Wågström P, Galal NM, Roesler J, Farmaki E, Zinovieva N, Ciznar P, Papadopoulou-Alataki E, Bienemann K, Velbri S, Panahloo Z, Grimbacher B; European Society for Immunodeficiencies Registry Working Party. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jul;134(1):116-26. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1077.
Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood.* 2012 Feb 16;119(7):1650-7. doi: 10.1182/blood-2011-09-377945.
75. Gebrayel P, Nicco C, Al Khodor S, Bilinski J, Caselli E, Comelli EM, Egert M, Giaroni C, Karpinski TM, Loniewski I, Mulak A, Reygnier J, Samczuk P, Serino M, Sikora M, Terranegra A, Ufnal M, Villegier R, Pichon C, Konturek P, Edeas M. Microbiota medicine: towards clinical revolution. *J Transl Med.* 2022 Mar 7;20(1):111. doi: 10.1186/s12967-022-03296-9.
76. Genre J, Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Câmara NO, Rizzo LV. Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in

- patients with Common Variable Immunodeficiency: a link to autoimmunity? Clin Immunol. 2009 Aug;132(2):215-21. doi: 10.1016/j.clim.2009.03.519.
77. Gereige JD, Maglione PJ. Current Understanding and Recent Developments in Common Variable Immunodeficiency Associated Autoimmunity. Front Immunol. 2019 Dec 10;10:2753. doi: 10.3389/fimmu.2019.02753.
78. Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaría R, Del Pino MD, Guallar-Castillón P, de Álvaro F, Rodríguez-Artalejo F, Banegas JR. Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. Nefrologia (Engl Ed). 2018 Nov-Dec;38(6):606-615. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nefro.2018.04.004.
79. Gutierrez MJ, Sullivan KE, Fuleihan R; USIDNET Consortium; Bingham CO 3rd. Phenotypic characterization of patients with rheumatologic manifestations of common variable immunodeficiency. Semin Arthritis Rheum. 2018 Oct;48(2):318-326. doi: 10.1016/j.semarthrit.2018.02.013.
80. Hampson FA, Chandra A, Screaton NJ, Condliffe A, Kumararatne DS, Exley AR, Babar JL. Respiratory disease in common variable immunodeficiency and other primary immunodeficiency disorders. Clin Radiol. 2012 Jun;67(6):587-95. doi: 10.1016/j.crad.2011.10.028.
81. Hand TW. The Role of the Microbiota in Shaping Infectious Immunity. Trends Immunol. 2016 Oct;37(10):647-658. doi: 10.1016/j.it.2016.08.007.
82. Hao H, Nakayamada S, Tanaka Y. Differentiation, functions, and roles of T follicular regulatory cells in autoimmune diseases. Inflamm Regen. 2021 May 3;41(1):14. doi: 10.1186/s41232-021-00164-9.
83. Hargreaves, K.M. & Cohen, S. (2011): Cohen Vías de la pulpa, 10ª edición, Barcelona, Elsevier España.
84. Hartono S, Motosue MS, Khan S, Rodriguez V, Iyer VN, Divekar R, Joshi AY. Predictors of granulomatous lymphocytic interstitial lung disease in common variable immunodeficiency. Ann Allergy Asthma Immunol. 2017 May;118(5):614-620. doi: 10.1016/j.anai.2017.01.004.
85. Havsed K, Stensson M, Jansson H, Carda-Diéguez M, Pedersen A, Neilands J, Svensäter G, Mira A. Bacterial Composition and Metabolomics of Dental Plaque From Adolescents. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Jul 30;11:716493. doi: 10.3389/fcimb.2021.716493.
86. Henares D, Brotons P, de Sevilla MF, Fernandez-Lopez A, Hernandez-Bou S, Perez-Argüello A, Mira A, Muñoz-Almagro C, Cabrera-Rubio R. Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status. Microb Genom. 2021 Oct;7(10):000661. doi: 10.1099/mgen.0.000661.
87. Ho HE, Cunningham-Rundles C. Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis. Front Immunol. 2020 Feb 7;11:149. doi: 10.3389/fimmu.2020.00149.
88. Hsu AP, Donkó A, Arrington ME, Swamydas M, Fink D, Das A, Escobedo O, Bonagura V, Szabolcs P, Steinberg HN, Bergerson J, Skoskiewicz A, Makhija M, Davis J, Foruraghi L,

- Palmer C, Fuleihan RL, Church JA, Bhandoola A, Lionakis MS, Campbell S, Leto TL, Kuhns DB, Holland SM. Dominant activating RAC2 mutation with lymphopenia, immunodeficiency, and cytoskeletal defects. *Blood*. 2019 May 2;133(18):1977-1988. doi: 10.1182/blood-2018-11-886028.
89. Huang Y, Mao K, Chen X, Sun MA, Kawabe T, Li W, Usher N, Zhu J, Urban JF Jr, Paul WE, Germain RN. S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense. *Science*. 2018 Jan 5;359(6371):114-119. doi: 10.1126/science.aam5809.
90. Hurst JR, Verma N, Lowe D, Baxendale HE, Jolles S, Kelleher P, Longhurst HJ, Patel SY, Renzoni EA, Sander CR, Avery GR, Babar JL, Buckland MS, Burns S, Egner W, Gompels MM, Gordins P, Haddock JA, Hart SP, Hayman GR, Herriot R, Hoyles RK, Huissoon AP, Jacob J, Nicholson AG, Rassl DM, Sargur RB, Savic S, Seneviratne SL, Sheaff M, Vaitla PM, Walters GI, Whitehouse JL, Wright PA, Condcliffe AM. British Lung Foundation/United Kingdom Primary Immunodeficiency Network Consensus Statement on the Definition, Diagnosis, and Management of Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease in Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017 Jul-Aug;5(4):938-945. doi: 10.1016/j.jaip.2017.01.021.
91. Hutchinson JP, Fogarty AW, McKeever TM, Hubbard RB. In-Hospital Mortality after Surgical Lung Biopsy for Interstitial Lung Disease in the United States. 2000 to 2011. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 May 15;193(10):1161-7. doi: 10.1164/rccm.201508-1632OC.
92. Inaoka PT, Shono M, Kamada M, Espinoza JL. Host-microbe interactions in the pathogenesis and clinical course of sarcoidosis. *J Biomed Sci*. 2019 Jun 11;26(1):45. doi: 10.1186/s12929-019-0537-6.
93. Janssen LMA, van der Flier M, de Vries E. Lessons Learned From the Clinical Presentation of Common Variable Immunodeficiency Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol*. 2021 Mar 23;12:620709. doi: 10.3389/fimmu.2021.620709.
94. Jolles S, Carne E, Brouns M, El-Shanawany T, Williams P, Marshall C, Fielding P. FDG PET-CT imaging of therapeutic response in granulomatous lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 2017 Jan;187(1):138-145. doi: 10.1111/cei.12856. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27896807; PMCID: PMC5167039.
95. Jolles S, Sleasman JW. Subcutaneous immunoglobulin replacement therapy with Hizentra, the first 20% SCIG preparation: a practical approach. *Adv Ther*. 2011 Jul;28(7):521-33. doi: 10.1007/s12325-011-0036-y.
96. Jørgensen SF, Fevang B, Aukrust P. Autoimmunity and Inflammation in CVID: a Possible Crosstalk between Immune Activation, Gut Microbiota, and Epigenetic Modifications. *J Clin Immunol*. 2019 Jan;39(1):30-36. doi: 10.1007/s10875-018-0574-z.
97. Jørgensen SF, Reims HM, Frydenlund D, Holm K, Paulsen V, Michelsen AE, Jørgensen KK, Osnes LT, Bratlie J, Eide TJ, Dahl CP, Holter E, Tronstad RR, Hanevik K, Brattbakk HR, Kaveh F, Fiskerstrand T, Kran AB, Ueland T, Karlsen TH, Aukrust P, Lundin KE, Fevang B. A Cross-Sectional Study of the Prevalence of Gastrointestinal Symptoms and Pathology in Patients With Common Variable Immunodeficiency. *Am J Gastroenterol*. 2016 Oct;111(10):1467-1475. doi: 10.1038/ajg.2016.329.

98. Jørgensen SF, Trøseid M, Kummen M, Anmarkrud JA, Michelsen AE, Osnes LT, Holm K, Høivik ML, Rashidi A, Dahl CP, Vesterhus M, Halvorsen B, Mollnes TE, Berge RK, Moum B, Lundin KE, Fevang B, Ueland T, Karlsen TH, Aukrust P, Hov JR. Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal Immunol.* 2016 Nov;9(6):1455-1465. doi: 10.1038/mi.2016.18.
99. Kainulainen L, Vuorinen T, Rantakokko-Jalava K, Osterback R, Ruuskanen O. Recurrent and persistent respiratory tract viral infections in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Jul;126(1):120-6. doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.016.
100. Kellner ES, Fuleihan R, Cunningham-Rundles C; USIDNET Consortium; Wechsler JB. Cellular Defects in CVID Patients with Chronic Lung Disease in the USIDNET Registry. *J Clin Immunol.* 2019 Aug;39(6):569-576. doi: 10.1007/s10875-019-00657-w. Epub 2019 Jun 27.
101. Kiaee F, Azizi G, Rafiemanesh H, Zainaldain H, Sadaat Rizvi F, Alizadeh M, Jamee M, Mohammadi S, Habibi S, Sharifi L, Jadidi-Niaragh F, Haghi S, Yazdani R, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Malignancy in common variable immunodeficiency: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019 Oct;15(10):1105-1113. doi: 10.1080/1744666X.2019.1658523.
102. Kim D, Kim WU. Editorial: Can *Prevotella copri* Be a Causative Pathobiont in Rheumatoid Arthritis? *Arthritis Rheumatol.* 2016 Nov;68(11):2565-2567. doi: 10.1002/art.39807.
103. Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF, Thompson RA. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinaemia. *Lancet.* 1985 Feb 2;1(8423):263-6. doi: 10.1016/s0140-6736(85)91037-2
104. Koleba T, Ensom MH. Pharmacokinetics of intravenous immunoglobulin: a systematic review. *Pharmacotherapy.* 2006 Jun;26(6):813-27. doi: 10.1592/phco.26.6.813.
105. Kuehn HS, Nunes-Santos CJ, Rosenzweig SD. Germline *IKZF1* mutations and their impact on immunity: IKAROS-associated diseases and pathophysiology. *Expert Rev Clin Immunol.* 2021 Apr;17(4):407-416. doi: 10.1080/1744666X.2021.1901582.
106. Lamers OAC, Smits BM, Leavis HL, de Bree GJ, Cunningham-Rundles C, Dalm VASH, Ho HE, Hurst JR, IJspeert H, Prevaes SMPJ, Robinson A, van Stigt AC, Terheggen-Lagro S, van de Ven AAJM, Warnatz K, van de Wijgert JHHM, van Montfrans J. Treatment Strategies for GLILD in Common Variable Immunodeficiency: A Systematic Review. *Front Immunol.* 2021 Apr 15;12:606099. doi: 10.3389/fimmu.2021.606099.
107. Li G, Zan H, Xu Z, Casali P. Epigenetics of the antibody response. *Trends Immunol.* 2013 Sep;34(9):460-70. doi: 10.1016/j.it.2013.03.006.
108. Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun.* 2020 Jul 14;11(1):3514. doi: 10.1038/s41467-020-17041-7.
109. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, Zhang Y, Liu Z, Fritz JM, Marsh R, Husami A, Kissell D, Nortman S, Chaturvedi V, Haines H, Young LR, Mo J, Filipovich AH, Bleesing JJ, Mustillo P, Stephens M, Rueda CM, Chougnet CA, Hoebe K, McElwee J,

- Hughes JD, Karakoc-Aydiner E, Matthews HF, Price S, Su HC, Rao VK, Lenardo MJ, Jordan MB. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*. 2015 Jul 24;349(6246):436-40. doi: 10.1126/science.aaa1663.
110. López-Rocha E, Rodríguez-Mireles K, Segura-Méndez NH, Yamazaki-Nakashimada MA. Prevalencia de cáncer en pacientes adultos con inmunodeficiencia común variable [Malignancies in adult patients with common variable immunodeficiency]. *Rev Alerg Mex*. 2015 Jan-Mar;62(1):22-7. Spanish.
111. Lucas M, Lee M, Lortan J, Lopez-Granados E, Misbah S, Chapel H. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jun;125(6):1354-1360.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2010.02.040.
112. Macpherson ME, Halvorsen B, Yndestad A, Ueland T, Mollnes TE, Berge RK, Rashidi A, Otterdal K, Gregersen I, Kong XY, Holven KB, Aukrust P, Fevang B, Jørgensen SF. Impaired HDL Function Amplifies Systemic Inflammation in Common Variable Immunodeficiency. *Sci Rep*. 2019 Jul 1;9(1):9427. doi: 10.1038/s41598-019-45861-1.
113. Macpherson ME, Hov JR, Ueland T, Dahl TB, Kummen M, Otterdal K, Holm K, Berge RK, Mollnes TE, Trøseid M, Halvorsen B, Aukrust P, Fevang B, Jørgensen SF. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Associates With Inflammation in Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol*. 2020 Sep 16;11:574500. doi: 10.3389/fimmu.2020.574500.
114. Macpherson ME, Skarpengland T, Hov JR, Ranheim T, Vestad B, Dahl TB, Fraz MSA, Michelsen AE, Holven KB, Fevang B, Berge RK, Aukrust P, Halvorsen B, Jørgensen SF. Increased Plasma Levels of Triglyceride-Enriched Lipoproteins Associate with Systemic Inflammation, Lipopolysaccharides, and Gut Dysbiosis in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2023 Mar 30. doi: 10.1007/s10875-023-01475-x.
115. Malamut G, Verkarre V, Suarez F, Viallard JF, Lascaux AS, Cosnes J, Bouhnik Y, Lambotte O, Béchade D, Zioli M, Lavergne A, Hermine O, Cerf-Bensussan N, Cellier C. The enteropathy associated with common variable immunodeficiency: the delineated frontiers with celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2010 Oct;105(10):2262-75. doi: 10.1038/ajg.2010.214.
116. Malbrán A, Juri MC, Fernández Romero DS. Common variable immunodeficiency and granulomatosis treated with infliximab. *Clin Immunol*. 2010 Mar;134(3):359-60. doi: 10.1016/j.clim.2009.11.014.
117. Malphettes M, Gérard L, Carmagnat M, Mouillot G, Vince N, Boutboul D, Bérezné A, Nove-Josserand R, Lemoing V, Tetu L, Viallard JF, Bonnotte B, Pavic M, Haroche J, Larroche C, Brouet JC, Fermanand JP, Rabian C, Fieschi C, Oksenhendler E; DEFI Study Group. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clin Infect Dis*. 2009 Nov 1;49(9):1329-38. doi: 10.1086/606059.
118. Mannina A, Chung JH, Swigris JJ, Solomon JJ, Huie TJ, Yunt ZX, Truong TQ, Brown KK, Achcar RD, Olson AL, Cox CW, Kligerman SJ, Curran-Everett D, Fernández Pérez ER. Clinical Predictors of a Diagnosis of Common Variable Immunodeficiency-related

- Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Jul;13(7):1042-9. doi: 10.1513/AnnalsATS.201511-728OC.
119. Matson EM, Abyazi ML, Bell KA, Hayes KM, Maglione PJ. B Cell Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency Interstitial Lung Disease. *Front Immunol*. 2021 Feb 5;11:622114. doi: 10.3389/fimmu.2020.622114.
 120. Meerburg JJ, Hartmann IJC, Goldacker S, Baumann U, Uhlmann A, Andrinopoulou ER, Kemner V/D Corput MPC, Warnatz K, Tiddens HAWM. Analysis of Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease Using Two Scoring Systems for Computed Tomography Scans-A Retrospective Cohort Study. *Front Immunol*. 2020 Oct 30;11:589148. doi: 10.3389/fimmu.2020.589148.
 121. Menéndez E, Delgado E, Fernández-Vega F, Prieto MA, Bordiú E, Calle A, Carmena R, Castaño L, Catalá M, Franch J, Gaztambide S, Gírbés J, Goday A, Gomis R, López-Alba A, Martínez-Larrad MT, Mora-Peces I, Ortega E, Rojo-Martínez G, Serrano-Ríos M, Urrutia I, Valdés S, Vázquez JA, Vendrell J, Soriguer F. Prevalence, Diagnosis, Treatment, and Control of Hypertension in Spain. Results of the Di@bet.es Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016 Jun;69(6):572-8. English, Spanish. doi: 10.1016/j.rec.2015.11.034.
 122. Morimoto Y, Routes JM. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005 Sep;5(5):370-5. doi: 10.1007/s11882-005-0008-x.
 123. Mormile I, Punziano A, Riolo CA, Granata F, Williams M, de Paulis A, Spadaro G, Rossi FW. Common Variable Immunodeficiency and Autoimmune Diseases: A Retrospective Study of 95 Adult Patients in a Single Tertiary Care Center. *Front Immunol*. 2021 Jul 5;12:652487. doi: 10.3389/fimmu.2021.652487.
 124. Moschen AR, Gerner RR, Wang J, Klepsch V, Adolph TE, Reider SJ, Hackl H, Pfister A, Schilling J, Moser PL, Kempster SL, Swidsinski A, Orth Höller D, Weiss G, Baines JF, Kaser A, Tilg H. Lipocalin 2 Protects from Inflammation and Tumorigenesis Associated with Gut Microbiota Alterations. *Cell Host Microbe*. 2016 Apr 13;19(4):455-69. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.007.
 125. Mrusek S, Marx A, Kummerle-Deschner J, Tzaribachev N, Enders A, Riede UN, Warnatz K, Dannecker GE, Ehl S. Development of granulomatous common variable immunodeficiency subsequent to infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol*. 2004 Sep;137(3):578-83. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02558.x.
 126. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe*. 2019 Jan 9;25(1):13-26. doi: 10.1016/j.chom.2018.12.006.
 127. Nöltner C, Bulashevskaya A, Hübscher K, Haberstroh H, Grimbacher B, Proietti M. Fecal Immunoglobulin Levels as a Modifier of the Gut Microbiome in Patients with Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2023 Mar 24. doi: 10.1007/s10875-023-01469-9.
 128. Ochs HD, Gupta S, Kiessling P, Nicolay U, Berger M; Subcutaneous IgG Study Group. Safety and efficacy of self-administered subcutaneous immunoglobulin in patients with primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol*. 2006 May;26(3):265-73. doi: 10.1007/s10875-006-9021-7.

129. Odnoletkova I, Kindle G, Quinti I, Grimbacher B, Knerr V, Gathmann B, Ehl S, Mahlaoui N, Van Wilder P, Bogaerts K, de Vries E; Plasma Protein Therapeutics Association (PPTA) Taskforce. The burden of common variable immunodeficiency disorders: a retrospective analysis of the European Society for Immunodeficiency (ESID) registry data. *Orphanet J Rare Dis*. 2018 Nov 12;13(1):201. doi: 10.1186/s13023-018-0941-0.
130. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin O, O'Hara PB et al. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>.
131. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, Viallard JF, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P, Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Théodorou I, Rabian C, Debré P; DEFI Study Group. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2008 May 15;46(10):1547-54. doi: 10.1086/587669.
132. Oraei M, Aghamohammadi A, Rezaei N, Bidad K, Gheflati Z, Amirkhani A, Abolhassani H, Massoud A. Naive CD4+ T cells and recent thymic emigrants in common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(3):160-7.
133. Orange JS, Ballou M, Stiehm ER, Ballas ZK, Chinen J, De La Morena M, Kumararatne D, Harville TO, Hesterberg P, Koleilat M, McGhee S, Perez EE, Raasch J, Scherzer R, Schroeder H, Seroogy C, Huissoon A, Sorensen RU, Katial R. Use and interpretation of diagnostic vaccination in primary immunodeficiency: a working group report of the Basic and Clinical Immunology Interest Section of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Sep;130(3 Suppl):S1-24. doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.002.
134. Orange JS, Grossman WJ, Navickis RJ, Wilkes MM. Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: A meta-analysis of clinical studies. *Clin Immunol*. 2010 Oct;137(1):21-30. doi: 10.1016/j.clim.2010.06.012.
135. Park J, Munagala I, Xu H, Blankenship D, Maffucci P, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, Cunningham-Rundles C. Interferon signature in the blood in inflammatory common variable immune deficiency. *PLoS One*. 2013 Sep 17;8(9):e74893. doi: 10.1371/journal.pone.0074893.
136. Park SY, Hwang BO, Lim M, Ok SH, Lee SK, Chun KS, Park KK, Hu Y, Chung WY, Song NY. Oral-Gut Microbiome Axis in Gastrointestinal Disease and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 28;13(9):2124. doi: 10.3390/cancers13092124.
137. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front Immunol*. 2020 Jun 9;11:906. doi: 10.3389/fimmu.2020.00906.
138. Patuzzo G, Barbieri A, Tinazzi E, Veneri D, Argentino G, Moretta F, Puccetti A, Lunardi C. Autoimmunity and infection in common variable immunodeficiency (CVID). *Autoimmun Rev*. 2016 Sep;15(9):877-82. doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.011.
139. Pecoraro A, Crescenzi L, Galdiero MR, Marone G, Rivellese F, Rossi FW, de Paulis A, Genovese A, Spadaro G. Immunosuppressive therapy with rituximab in common variable immunodeficiency. *Clin Mol Allergy*. 2019 May 6;17:9. doi: 10.1186/s12948-019-0113-3.

140. Pellerin L, Jenks JA, Bégin P, Bacchetta R, Nadeau KC. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunol Res.* 2014 May;58(2-3):358-68. doi: 10.1007/s12026-014-8512-5.
141. Perez EE, Orange JS, Bonilla F, Chinen J, Chinn IK, Dorsey M, El-Gamal Y, Harville TO, Hossny E, Mazer B, Nelson R, Secord E, Jordan SC, Stiehm ER, Vo AA, Ballow M. Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Mar;139(3S):S1-S46. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.023.
142. Piquer Gibert M, Alsina L, Giner Muñoz MT, Cruz Martínez O, Ruiz Echevarria K, Dominguez O, Plaza Martín AM, Arostegui JI, de Valles G, Juan Otero M, Martin-Mateos MA. Non-Hodgkin lymphoma in pediatric patients with common variable immunodeficiency. *Eur J Pediatr.* 2015 Aug;174(8):1069-76. doi: 10.1007/s00431-015-2508-6.
143. Ponsford M, Carne E, Kingdon C, Joyce C, Price C, Williams C, El-Shanawany T, Williams P, Jolles S. Facilitated subcutaneous immunoglobulin (fSCIg) therapy--practical considerations. *Clin Exp Immunol.* 2015 Dec;182(3):302-13. doi: 10.1111/cei.12694.
144. Poto R, Ianiro G, de Paulis A, Spadaro G, Marone G, Gasbarrini A, Varricchi G. Correction to: Is there a role for microbiome-based approach in common variable immunodeficiency? *Clin Exp Med.* 2023 Mar 14. doi: 10.1007/s10238-023-01032-1.
145. Pulvirenti F, Cinetto F, Pecoraro A, Carrabba M, Crescenzi L, Neri R, Bonanni L, Fabio G, Agostini C, Spadaro G, Tabolli S, Farrugia A, Quinti I, Milito C. Health-Related Quality of Life in Patients with CVID Under Different Schedules of Immunoglobulin Administration: Prospective Multicenter Study. *J Clin Immunol.* 2019 Feb;39(2):159-170. doi: 10.1007/s10875-019-0592-5.
146. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219.
147. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, Claudio P, Franco D, Maria Pesce A, Borghese F, Guerra A, Rondelli R, Plebani A; Italian Primary Immunodeficiency Network. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2007 May;27(3):308-16. doi: 10.1007/s10875-007-9075-1.
148. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science.* 2011 Apr 29;332(6029):600-3. doi: 10.1126/science.1202947.
149. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org/>.
150. Ramírez-Vargas N, Arabin-Oropeza SE, Mojica-Martínez D, Yamazaki-Nakashimada MA, de la Luz García-Cruz M, Terán-Juárez LM, Cortés-Grimaldo RM, Torres-Lozano C, Madrigal-Beas I, Ortega-Cisneros M, Vargas-Camaño ME, Staines-Boone T, Pietropaolo-Cienfuegos D, Berrón-Ruiz L, Espinosa-Rosales FJ, Guevara-Cruz M, Blancas-Galicia L. Clinical and immunological features of common variable immunodeficiency in Mexican

- patients. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014 May-Jun;42(3):235-40. doi: 10.1016/j.aller.2013.01.007.
151. Ramzi N, Jamee M, Bakhtiyari M, Rafiemanesh H, Zainaldain H, Tavakol M, Rezaei A, Kalvandi M, Zian Z, Mohammadi H, Jadidi-Niaragh F, Yazdani R, Abolhassani H, Aghamohammadi A, Azizi G. Bronchiectasis in common variable immunodeficiency: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol*. 2020 Feb;55(2):292-299. doi: 10.1002/ppul.24599.
152. Rao N, Mackinnon AC, Routes JM. Granulomatous and lymphocytic interstitial lung disease: a spectrum of pulmonary histopathologic lesions in common variable immunodeficiency--histologic and immunohistochemical analyses of 16 cases. *Hum Pathol*. 2015 Sep;46(9):1306-14. doi: 10.1016/j.humphath.2015.05.011.
153. Rao VK, Webster S, Šedivá A, Plebani A, Schuetz C, Shcherbina A, Conlon N, Coulter T, Dalm VA, Trizzino A, Zharankova Y, Kulm E, Köhrholz J, Lougaris V, Rodina Y, Radford K, Bradt J, Kucher K, Relan A, Holland SM, Lenardo MJ, Uzel G. A randomized, placebo-controlled phase 3 trial of the PI3K δ inhibitor leniolisib for activated PI3K δ syndrome. *Blood*. 2023 Mar 2;141(9):971-983. doi: 10.1182/blood.2022018546.
154. Rensing-Ehl A, Warnatz K, Fuchs S, Schlesier M, Salzer U, Draeger R, Bondzio I, Joos Y, Janda A, Gomes M, Abinun M, Hambleton S, Cant A, Shackley F, Flood T, Waruiri C, Beutel K, Siepermann K, Dueckers G, Niehues T, Wiesel T, Schuster V, Seidel MG, Minkov M, Sirkiä K, Kopp MV, Korhonen M, Schwarz K, Ehl S, Speckmann C. Clinical and immunological overlap between autoimmune lymphoproliferative syndrome and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*. 2010 Dec;137(3):357-65. doi: 10.1016/j.clim.2010.08.008.
155. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012 Feb 16;119(7):1650-7. doi: 10.1182/blood-2011-09-377945.
156. Ricci A, Pagliuca A, Vermi M, Pizzirusso D, Innammorato M, Sglavo R, Scarso F, Salemi S, Laganà B, Di Rosa R, D'Ascanio M. The Role of Lung Colonization in Connective Tissue Disease-Associated Interstitial Lung Disease. *Microorganisms*. 2021 Apr 27;9(5):932. doi: 10.3390/microorganisms9050932.
157. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder H, Frew AJ, Weyand CM, editors. *Inmunología clínica*. 5th ed. España: Elsevier; 2019.
158. Rizvi FS, Zainaldain H, Rafiemanesh H, Jamee M, Hossein-Khannazer N, Hamedifar H, Sabzevari A, Yazdani R, Abolhassani H, Aghamohammadi A, Azizi G. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2020 Dec;16(12):1227-1235. doi: 10.1080/1744666X.2021.1850272.
159. Rosier BT, Buetas E, Moya-Gonzalez EM, Artacho A, Mira A. Nitrate as a potential prebiotic for the oral microbiome. *Sci Rep*. 2020 Jul 30;10(1):12895. doi: 10.1038/s41598-020-69931-x.
160. Russell MA, Pigors M, Houssen ME, Manson A, Kellsell D, Longhurst H, Morgan NG. A novel de novo activating mutation in STAT3 identified in a patient with common variable

- immunodeficiency (CVID). Clin Immunol. 2018 Feb;187:132-136. doi: 10.1016/j.clim.2017.11.007.
161. Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J, Holm A, Franco JL, Plebani A, Hammarstrom L, Skrabl A, Schwinger W, Grimbacher B. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. Clin Immunol. 2004 Dec;113(3):234-40. doi: 10.1016/j.clim.2004.07.002.
162. Savola P, Martelius T, Kankainen M, Huuhtanen J, Lundgren S, Koski Y, Eldfors S, Kelkka T, Keränen MAI, Ellonen P, Kovanen PE, Kytölä S, Saarela J, Lähdesmäki H, Seppänen MRJ, Mustjoki S. Somatic mutations and T-cell clonality in patients with immunodeficiency. Haematologica. 2020 Dec 1;105(12):2757-2768. doi: 10.3324/haematol.2019.220889.
163. Schussler E, Beasley MB, Maglione PJ. Lung Disease in Primary Antibody Deficiencies. J Allergy Clin Immunol Pract. 2016 Nov-Dec;4(6):1039-1052. doi: 10.1016/j.jaip.2016.08.005.
164. Schütz K, Alecsandru D, Grimbacher B, Haddock J, Bruining A, Driessen G, de Vries E, van Hagen PM, Hartmann I, Fraioli F, Mito C, Mitrevski M, Quinti I, Serra G, Kelleher P, Loebinger M, Litzman J, Postranecka V, Thon V, Babar J, Condiffe AM, Exley A, Kumararatne D, Scream N, Jones A, Bondioni MP, Lougaris V, Plebani A, Soresina A, Sirignano C, Spadaro G, Galal N, Gonzalez-Granado LI, Dettmer S, Stirling R, Chapel H, Lucas M, Patel S, Farber CM, Meyts I, Banerjee AK, Hackett S, Hurst JR, Warnatz K, Gathmann B, Baumann U; Chest CT in Antibody Deficiency Group. Imaging of Bronchial Pathology in Antibody Deficiency: Data from the European Chest CT Group. J Clin Immunol. 2019 Jan;39(1):45-54. doi: 10.1007/s10875-018-0577-9. Epub 2018 Dec 13. Erratum in: J Clin Immunol. 2019 Feb;39(2):225-227.
165. Schütz K, Alecsandru D, Grimbacher B, Haddock J, Bruining A, Driessen G, de Vries E, van Hagen PM, Hartmann I, Fraioli F, Mito C, Mitrevski M, Quinti I, Serra G, Kelleher P, Loebinger M, Litzman J, Postranecka V, Thon V, Babar J, Condiffe AM, Exley A, Kumararatne D, Scream N, Jones A, Bondioni MP, Lougaris V, Plebani A, Soresina A, Sirignano C, Spadaro G, Galal N, Gonzalez-Granado LI, Dettmer S, Stirling R, Chapel H, Lucas M, Patel S, Farber CM, Meyts I, Banerjee AK, Hackett S, Hurst JR, Warnatz K, Gathmann B, Baumann U; Chest CT in Antibody Deficiency Group. Imaging of Bronchial Pathology in Antibody Deficiency: Data from the European Chest CT Group. J Clin Immunol. 2019 Jan;39(1):45-54. doi: 10.1007/s10875-018-0577-9. Epub 2018 Dec 13. Erratum in: J Clin Immunol. 2019 Feb;39(2):225-227.
166. Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, van Montfrans J, Scheible R, Rusch S, Gasteiger LM, Grimbacher B, Mahlaoui N, Ehl S; ESID Registry Working Party and collaborators. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. J Allergy Clin Immunol Pract. 2019 Jul-Aug;7(6):1763-1770. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.004.
167. Shulzhenko N, Dong X, Vyshenska D, Greer RL, Gurung M, Vasquez-Perez S, Peremyslova E, Sosnovtsev S, Quezado M, Yao M, Montgomery-Recht K, Strober W, Fuss IJ, Morgun A. CVID enteropathy is characterized by exceeding low mucosal IgA levels and interferon-driven inflammation possibly related to the presence of a pathobiont. Clin Immunol. 2018 Dec;197:139-153. doi: 10.1016/j.clim.2018.09.008.

168. Simón-Soro A, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res.* 2013 Jul;92(7):616-21. doi: 10.1177/0022034513488119.
169. Skarpengland T, Macpherson ME, Hov JR, Kong XY, Bohov P, Halvorsen B, Fevang B, Berge RK, Aukrust P, Jørgensen SF. Altered Plasma Fatty Acids Associate with Gut Microbial Composition in Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2022 Jan;42(1):146-157. doi: 10.1007/s10875-021-01146-9.
170. So-Armah K, Benjamin LA, Bloomfield GS, Feinstein MJ, Hsue P, Njuguna B, Freiberg MS. HIV and cardiovascular disease. *Lancet HIV.* 2020 Apr;7(4):e279-e293. doi: 10.1016/S2352-3018(20)30036-9.
171. Tak Manesh A, Azizi G, Heydari A, Kiaee F, Shaghaghi M, Hossein-Khannazer N, Yazdani R, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Epidemiology and pathophysiology of malignancy in common variable immunodeficiency? *Allergol Immunopathol (Madr).* 2017 Nov-Dec;45(6):602-615. doi: 10.1016/j.aller.2017.01.006.
172. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck J, Torgerson TR, Casanova JL, Sullivan KE. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2020 Jan;40(1):24-64. doi: 10.1007/s10875-019-00737-x.
173. Thaïss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature.* 2016 Jul 7;535(7610):65-74. doi: 10.1038/nature18847.
174. Ucar R, Arslan S, Turkmen K, Caliskaner AZ. Accelerated atherosclerosis in patients with common variable immunodeficiency: Is it overlooked or absent? *Med Hypotheses.* 2015 Oct;85(4):485-7. doi: 10.1016/j.mehy.2015.07.002.
175. Unger S, Seidl M, van Schouwenburg P, Rakhmanov M, Bulashevskaya A, Frede N, Grimbacher B, Pfeiffer J, Schrenk K, Munoz L, Hanitsch L, Stumpf I, Kaiser F, Hausmann O, Kollert F, Goldacker S, van der Burg M, Keller B, Warnatz K. The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN- γ -associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Feb;141(2):730-740. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.041.
176. Uzzan M, Ko HM, Mehandru S, Cunningham-Rundles C. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD). *Curr Gastroenterol Rep.* 2016 Apr;18(4):17. doi: 10.1007/s11894-016-0491-3.
177. Vajdic CM, Mao L, van Leeuwen MT, Kirkpatrick P, Grulich AE, Riminton S. Are antibody deficiency disorders associated with a narrower range of cancers than other forms of immunodeficiency? *Blood.* 2010 Aug 26;116(8):1228-34. doi: 10.1182/blood-2010-03-272351.
178. van Schewick CM, Nöltner C, Abel S, Burns SO, Workman S, Symes A, Guzman D, Proietti M, Bulashevskaya A, Moreira F, Soetedjo V, Lowe DM, Grimbacher B. Altered Microbiota, Impaired Quality of Life, Malabsorption, Infection, and Inflammation in CVID Patients With Diarrhoea. *Front Immunol.* 2020 Jul 31;11:1654. doi: 10.3389/fimmu.2020.01654.

179. van Stigt AC, Dik WA, Kamphuis LSJ, Smits BM, van Montfrans JM, van Hagen PM, Dalm VASH, IJspeert H. What Works When Treating Granulomatous Disease in Genetically Undefined CVID? A Systematic Review. *Front Immunol.* 2020 Dec 17;11:606389. doi: 10.3389/fimmu.2020.606389.
180. Varricchi G, Poto R, Ianiro G, Punziano A, Marone G, Gasbarrini A, Spadaro G. Gut Microbiome and Common Variable Immunodeficiency: Few Certainties and Many Outstanding Questions. *Front Immunol.* 2021 Aug 2;12:712915. doi: 10.3389/fimmu.2021.712915.
181. Venhoff N, Emmerich F, Neagu M, Salzer U, Koehn C, Driever S, Kreisel W, Rizzi M, Effelsberg NM, Kollert F, Goldacker S, Voll RE, Warnatz K, Thiel J. The role of HLA DQ2 and DQ8 in dissecting celiac-like disease in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2013 Jul;33(5):909-16. doi: 10.1007/s10875-013-9892-3.
182. Verma N, Grimbacher B, Hurst JR. Lung disease in primary antibody deficiency. *Lancet Respir Med.* 2015 Aug;3(8):651-60. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00202-7.
183. Vieira DG, Costa-Carvalho BT, Hix S, da Silva R, Correia MSG, Sarni ROS. Higher Cardiovascular Risk in Common Variable Immunodeficiency and X-Linked Agammaglobulinaemia Patients. *Ann Nutr Metab.* 2015;66(4):237-241. doi: 10.1159/000435818.
184. Wainwright CE, Vidmar S, Armstrong DS, Byrnes CA, Carlin JB, Cheney J, Cooper PJ, Grimwood K, Moodie M, Robertson CF, Tiddens HA; ACFBAL Study Investigators. Effect of bronchoalveolar lavage-directed therapy on *Pseudomonas aeruginosa* infection and structural lung injury in children with cystic fibrosis: a randomized trial. *JAMA.* 2011 Jul 13;306(2):163-71. doi: 10.1001/jama.2011.954.
185. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Böhm J, Kienzler AK, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Rakhmanov M, Schlesier M, Grimbacher B, Peter HH, Eibel H. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 18;106(33):13945-50. doi: 10.1073/pnas.0903543106.
186. Warnatz K, Voll RE. Pathogenesis of autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Front Immunol.* 2012 Jul 18;3:210. doi: 10.3389/fimmu.2012.00210.
187. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood.* 2008 Jan 1;111(1):77-85. doi: 10.1182/blood-2007-06-091744.
188. Weifenbach N, Schneckenburger AAC, Lötters S. Global Distribution of Common Variable Immunodeficiency (CVID) in the Light of the UNDP Human Development Index (HDI): A Preliminary Perspective of a Rare Disease. *J Immunol Res.* 2020 Sep 1;2020:8416124. doi: 10.1155/2020/8416124.

189. Wheat WH, Cool CD, Morimoto Y, Rai PR, Kirkpatrick CH, Lindenbaum BA, Bates CA, Ellison MC, Serls AE, Brown KK, Routes JM. Possible role of human herpesvirus 8 in the lymphoproliferative disorders in common variable immunodeficiency. *J Exp Med*. 2005 Aug 15;202(4):479-84. doi: 10.1084/jem.20050381.
190. Woodward J, Gkrania-Klotsas E, Kumararatne D. Chronic norovirus infection and common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2017 Jun;188(3):363-370. doi: 10.1111/cei.12884.
191. Xiao X, Miao Q, Chang C, Gershwin ME, Ma X. Common variable immunodeficiency and autoimmunity--an inconvenient truth. *Autoimmun Rev*. 2014 Aug;13(8):858-64. doi: 10.1016/j.autrev.2014.04.006.
192. Yazdani R, Abolhassani H, Asgardoost MH, Shaghaghian M, Modaresi M, Azizi G, Aghamohammadi A. Infectious and Noninfectious Pulmonary Complications in Patients With Primary Immunodeficiency Disorders. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(4):213-224. doi: 10.18176/jiaci.0166.
193. Yazdani R, Habibi S, Sharifi L, Azizi G, Abolhassani H, Olbrich P, Aghamohammadi A. Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020;30(1):14-34. doi: 10.18176/jiaci.0388.
194. Yong PF, Thaventhiran JE, Grimbacher B. "A rose is a rose is a rose," but CVID is Not CVID common variable immune deficiency (CVID), what do we know in 2011? *Adv Immunol*. 2011;111:47-107. doi: 10.1016/B978-0-12-385991-4.00002-7.
195. Young RP, Hopkins RJ, Marsland B. The Gut-Liver-Lung Axis. Modulation of the Innate Immune Response and Its Possible Role in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016 Feb;54(2):161-9. doi: 10.1165/rcmb.2015-0250PS
196. Zainaldain H, Rizvi FS, Rafiemanesh H, Alizadeh M, Jamee M, Mohammadi S, Kiaee F, Mohammadi H, Babaie F, Yazdani R, Abolhassani H, Aghamohammadi A, Azizi G. Infectious Complications Reporting in Common Variable Immunodeficiency: A Systematic Review and Meta-analysis. *Oman Med J*. 2020 Jul 30;35(4):e157. doi: 10.5001/omj.2020.64.
197. Zhang Y, Yu X, Ichikawa M, Lyons JJ, Datta S, Lamborn IT, Jing H, Kim ES, Biancalana M, Wolfe LA, DiMaggio T, Matthews HF, Kranick SM, Stone KD, Holland SM, Reich DS, Hughes JD, Mehmet H, McElwee J, Freeman AF, Freeze HH, Su HC, Milner JD. Autosomal recessive phosphoglucomutase 3 (PGM3) mutations link glycosylation defects to atopy, immune deficiency, autoimmunity, and neurocognitive impairment. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133(5):1400-9, 1409.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2014.02.013.
198. Zou H, Hastie T. Regularization and Variable Selection via the Elastic Net. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol*. 2005;67(2):301-20. doi: 10.1111/j.1467-9868.2005.00503.x.

ANEXOS

10.1. Persistent SARS-CoV-2 infection with repeated clinical recurrence in a patient with Common Variable Immunodeficiency

Clinical Microbiology and Infection 28 (2022) 308–310



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



Letter to the Editor

Persistent SARS-CoV-2 infection with repeated clinical recurrence in a patient with common variable immunodeficiency

Marta Dafne Cabañero-Navalon¹, Victor Garcia-Bustos^{1,*}, Paula Ruiz-Rodriguez²,
Iñaki Comas^{3,4}, Mireia Coscollá², Llúcia Martínez-Priego⁵, José Todolí¹,
Pedro Moral Moral¹

¹ Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

² Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), University of Valencia-CSIC, Valencia, Spain

³ Biomedical Institute of Valencia IBV-CSIC, Valencia, Spain

⁴ CIBER of Epidemiology and Public Health, Madrid, Spain

⁵ Servicio de Secuenciación, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad valenciana (FISABIO), Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2021

Received in revised form

14 October 2021

Accepted 28 October 2021

Available online 10 November 2021

Editor: M. Cevik

To the Editor,

A 22-year-old man with common variable immunodeficiency complicated by granulomatous–lymphocytic interstitial lung disease previously treated with azathioprine and a 4-weekly course of rituximab 3 years earlier who was receiving subcutaneous immunoglobulin replacement therapy was diagnosed with coronavirus disease 2019 (COVID-19) using an RT-PCR for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) of a nasopharyngeal swab specimen after a 4-day history of fever. He quarantined at home but was later admitted to the hospital with COVID-19 bilateral pneumonia and hypoxaemia on day 20. He was treated with ceftriaxone, dexamethasone and an extra dose of subcutaneous immunoglobulin replacement therapy, and was discharged on day 27 with positive RT-PCR assay of a nasopharyngeal swab (Ct value 30.1, Figs. 1b and 2b). The patient did not develop a serological response at any time.

On day 38, he was readmitted for relapsing fever and dyspnoea. A SARS-CoV-2 RT-PCR assay was negative, so he was diagnosed

with nosocomial pneumonia and received treatment with piperacillin-tazobactam for 7 days. However, on day 55, hypoxaemia and new bilateral pulmonary infiltrates developed, requiring hospital admission and supplemental oxygen. A bronchoalveolar lavage specimen on day 57 revealed an RT-PCR Ct value of 27.2 (Fig. 1b). A transbronchial biopsy was performed, detecting tissue SARS-CoV-2 RNA. After treatment with piperacillin-tazobactam, azithromycin and dexamethasone, he was discharged without the need for supplemental oxygen and with infiltrate resolution.

The last admission for fever, radiological progression and mild hypoxaemia was on day 72, and showed another positive RT-PCR assay of a sputum specimen on day 77. The patient received a 10-day course of remdesivir, convalescent plasma therapy, dexamethasone and meropenem, with complete clinical and radiographic resolution. Subsequent RT-PCR assays were negative in both upper and lower respiratory samples. No anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies were available.

Samples on days 4, 26 and 57 were sequenced given the suspected relapse or re-infection. Phylogenetic analysis confirmed persistent infection after a single infection event with clinical relapse. All three isolates belonged to lineage B.1.416.1 and formed a common clade. They showed seven mutations with respect to the reference sequence, including one non-coding mutation, one synonymous single nucleotide polymorphism (SNP), and five non-synonymous SNPs in nsp6, nsp12 and spike (Fig. 1b, Table S4). Intra-host dynamics were revealed by 19 SNPs that varied in frequency between sampling times where all but one SNP showed intermediate frequencies in at least one of the samples (Fig. 1b). The temporal dynamics observed were not compatible with increased diversity corresponding to higher viral load, as previously described in individuals with secondary humoral immunocompromise [1], because sampling points 2 and 3 showed a higher number of polymorphic sites and higher Ct values (Figs. 1b and 2a). Two of the SNPs in the spike gene arising in the second sampling

* Corresponding author. V. Garcia-Bustos.

E-mail address: victorgarciabustos@gmail.com (V. Garcia-Bustos).

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.021>

1198-743X/© 2021 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

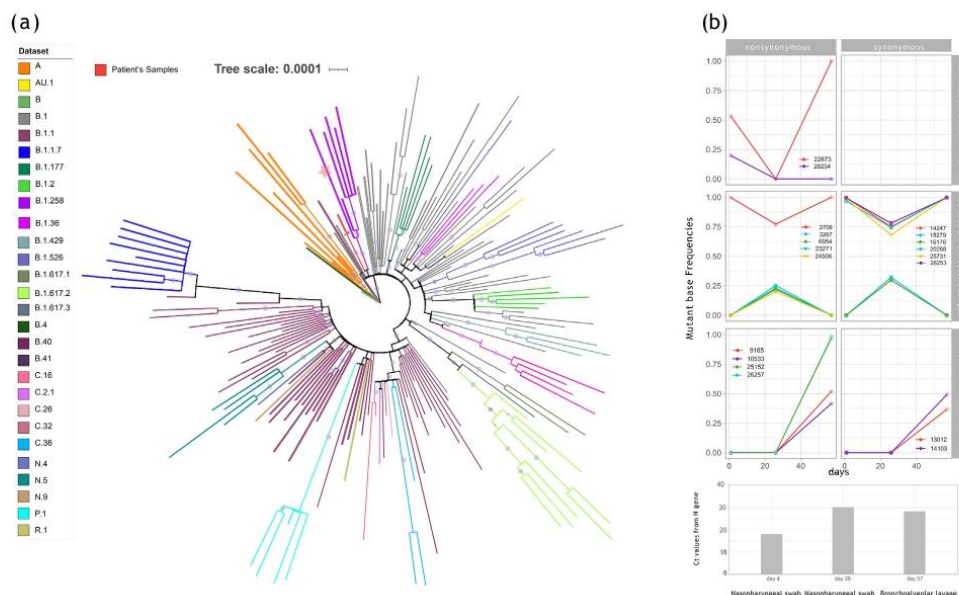


Fig. 1. Whole-genome viral sequencing of subsequent severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) patient's isolates during hospital admissions. (a) Maximum-likelihood phylogeny of 191 SARS-CoV-2 genomes rooted with reference sequence from Wuhan. Bootstrap values ranging from 70 to 100 are represented in nodes as circles whose size is proportional to the value. Branches are coloured by identified PANGO lineages. Branches leading to the three sequences of interest are coloured red and marked with a red star. The scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. (b) Intra-host variation along three sampling times and its corresponding Cycle threshold (Ct) values detected for N gene. Non-synonymous changes are plotted in panels on the left and synonymous changes on the right. Upper panel shows non-fixed single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the first sample, middle panel shows non-fixed SNPs in the second sample, and lower panel shows non-fixed and fixed SNPs in the third sample.

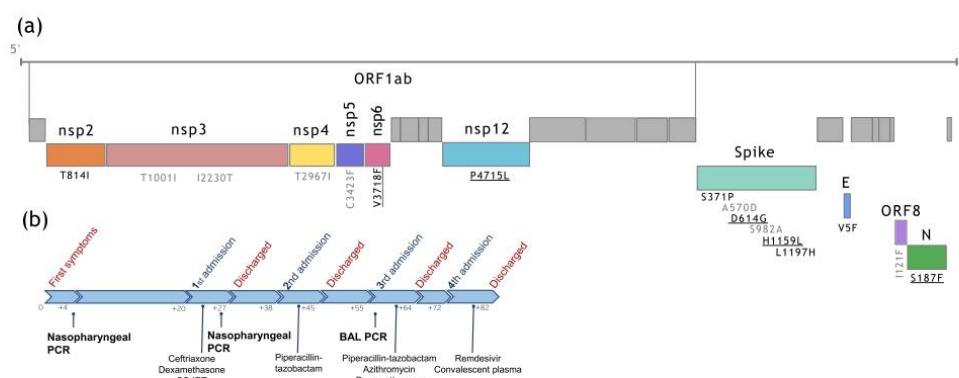


Fig. 2. Amino acid replacements in the sequenced samples and timeline of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection course in our patient. (a) Amino acid replacements found in at least one of three analysed samples indicated on a graphical representation of the SARS-CoV-2 genome. Amino acid replacements in black indicate those fixed in at least one of the samples, in grey those that only appeared transiently but did not get fixed. Underlined amino acid replacements are the ones shared by all three sampling points. (b) Timeline of patient's clinical evolution, hospital admissions, virological studies and treatments. BAL, bronchoalveolar lavage.

time have been also described in the lineage B.1.1.7 (Alpha) but they did not become fixed in the population. The sequence on day 57 had the largest number of fixed changes. Plasma immunoglobulin levels were normal (Fig. S1C), but virus-induced low B-cell and T-cell counts (Table S3) were revealed by flow cytometry analysis.

Interestingly, accelerated viral evolution was observed in this case as previously described in individuals with secondary humoral

immunocompromise [1–4], as a result of mutations without recombination evidence seen in other coronaviruses such as HCoV-OC43. This fact may advocate for immunocompromised patients as important contributors in generating viral genetic diversity and the emergence of new variants, especially after confirming its selective active persistence in the lower respiratory tract with negative nasopharyngeal swab samples, as recently suggested in a report of a patient

with X-linked agammaglobulinaemia [5]. Furthermore, the clinical relapses of this patient without detectable SARS-CoV-2 in the upper airways may imply that standard nasopharyngeal swab samples are not adequate in patients with primary immunodeficiencies and, perhaps, also in secondarily immunocompromised patients. Despite plasma RT-PCR not being routinely performed, it should be considered in B-cell-depleted patients, especially after Hueso et al. [5] effectively monitored RNAemia and correlated it with clinical improvement after early convalescent plasma therapy. Additionally, treatment with the combination of remdesivir and hyperimmune plasma was able to finally eradicate this reservoir, as also reported by Palomba et al. [6]. However, the selection pressure after plasma therapy in patients with primary immunodeficiencies with reduced inherent clearance capability could potentially give rise to escape mutations with reduced susceptibility to polyclonal neutralizing antibodies [2]. However, early plasma therapy should be considered in patients unable to elicit a specific humoral response against SARS-CoV-2 as previously demonstrated in B-cell-depleted patients with protracted COVID-19 [5]. Further information is needed on viral intra-host dynamics in immunocompromised patients with prolonged viral shedding for clinical management and public health purposes, as well as for understanding the appearance of new variants of concern.

This report highlights the potential capability of SARS-CoV-2 for causing prolonged relapsing infections in patients with treated primary immunodeficiency and its associated accelerated within-host genomic evolution, as well as the role of the combination of remdesivir and convalescent plasma therapy in eliminating its reservoir in the lower respiratory tract [3–5].

Transparency declaration

The authors report no conflicts of interest for the present work. Funding: This work was co-financed by the European Union through the Operational Programme of the European Regional Development Fund of Valencia Region (Spain) 2014–2020.

Author contributions

MDCN, VGB and PMM conceived the idea, searched the bibliographic materials, reviewed the existing literature and wrote the article. PRR, IC and MC developed the figures, aided in the search of the bibliographic materials and contributed to the writing of the article. LMP sequenced the samples. JTP reviewed the literature and contributed to the writing of the article. VGB and PMM were responsible for the care of the patient during hospital admissions. PMM supervised the work. All authors provided critical feedback and helped to shape the final version of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.021>.

References

- [1] Choudhary MC, Crain CR, Qiu X, Hanage W, Li JZ. SARS-CoV-2 sequence characteristics of COVID-19 persistence and reinfection. *Clin Infect Dis* 2021; ciab380.
- [2] Kemp SA, Collier DA, Datir RP, Ferreira IATM, Gayed S, Jahun A, et al. SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature* 2021;592:277–82.
- [3] Sepulcri C, Dentone C, Mikulska M, Bruzzone B, Lai A, Fenoglio D, et al. The longest persistence of viable SARS-CoV-2 with recurrence of viremia and relapsing symptomatic COVID-19 in an immunocompromised patient—a case study. *Open Forum Infect Dis* 2021;8:ofab217.
- [4] Choi B, Choudhary MC, Regan J, Sparks JA, Padera RF, Qiu X, et al. Persistence and evolution of SARS-CoV-2 in an immunocompromised host. *N Engl J Med* 2020;383:2291–3.
- [5] Hueso T, Poudereux C, Péré H, Beaumont AL, Raillon LA, Ader F, et al. Convalescent plasma therapy for B-cell-depleted patients with protracted COVID-19. *Blood* 2020;136:2290–5.
- [6] Palomba E, Carrabba M, Zuglian G, Alagna L, Saltini P, Fortina V, et al. Treatment of SARS-CoV-2 relapse with remdesivir and neutralizing antibodies cocktail in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *Int J Infect Dis* 2021;S1201–9712: 338–40.

Supplementary appendix

1. Material and methods.
2. Supplemental information regarding patient's previous history.
3. Supplemental results.
4. Figure S1: Laboratory values over time.
5. Table S1: Vital constants at the time of hospital admission.
6. Table S2: Laboratory parameters evolution at the time of hospital admission.
7. Table S3: Viral-induced changes on major leukocyte subpopulations.
8. Table S4: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) found in the sequenced samples.
9. Table S5: GISAID (<https://www.gisaid.org>) accession numbers.

Material and methods

Genomic sequences derived from the three RNA samples discarded from the diagnostic procedure were obtained as described by López et al. (2021).¹

RNA samples were retro-transcribed into cDNA. SARS-CoV-2 complete genome amplification was performed in two multiplex PCR, according to the protocol developed by the ARTIC network², using the V3 multiplex primers scheme.³ From this step, two amplicon pools were prepared, combined, and used for library preparation. The genomic libraries were constructed with the Nextera DNA Flex Sample Preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol, with 5 cycles for indexing PCR. Whole-genome sequencing was performed in the MiSeq platform (2×200 cycles paired-end run; Illumina).

Reads obtained were processed through a bioinformatic pipeline based on iVar (Grubaugh),⁴ available at <https://gitlab.com/fisabio-ngs/sars-cov2-mapping>. The first step in the pipeline removed human reads with Kraken;⁵ then fastq files were filtered using fastp⁶ v 0.20.1 (arguments employed: --cut tail, --cut-window-size, --cut-mean-quality, -max_len1, -max_len2). Finally, mapping, and variant calling were performed with iVar v 1.2, and quality control assessment was carried out with MultiQC.⁷

Maximum-likelihood phylogeny was reconstructed using with IQ-TREE⁸ v 1.6.12 for the three samples of interest together with the reference sequence⁹ and 188 sequences downloaded from GISAID that are representative of different lineages. Option for the phylogenetic reconstruction were: 1000 replicates bootstrap, GTR as model of evolution, collapsing near-zero branches and using a masked alignment¹⁰ obtained with MAFFT.¹¹ The phylogeny was annotated and visualized with iTOL v 4.¹²

Supplemental information regarding patient's previous history

In February 2006, the patient developed an episode of autoimmune haemolytic anaemia (AHA) with warm IgG antibodies for which he received treatment with glucocorticoids and intravenous immunoglobulins (IVIG), with several mild relapses after therapy. Nevertheless, in May 2007 he showed immune thrombocytopenia and was diagnosed of Evans syndrome. He received glucocorticoid and treatment IVIG treatment. Antiplatelet antibodies, autoimmunity tests, viral antibody testing, and a blood marrow aspiration showed no alterations. Mild hypogammaglobulinemia was seen but was not furtherly studied.

In April 2010 severe thrombocytopenia relapsed and four doses of rituximab therapy were administered (375 mg/m² IV once weekly for 4 weeks). After a new relapse of the Evans syndrome in 2011, romiplostim was initiated and weekly IRT was continued.

In 2017, a lung biopsy was performed after documenting interstitial lung disease in a high-resolution CT scan. Histology was compatible with autoimmune lymphoproliferative syndrome or granulomatous lung interstitial lung disease (GLILD), but autoimmunity tests and genetic testing for immunodeficiencies were negative. Marked IgG, IgM, and IgA hypogammaglobulinemia was seen with no antibody response to vaccines. Persistent low CD4+ T-cell count (≈ 300 cells/ μ l) was identified in flow cytometry analyses. Diagnosis of common variable immunodeficiency^{13,14} complicated with GLILD¹⁵ was made. He received treatment with azathioprine and a 4-weekly course of rituximab.

Supplemental results

During subsequent hospital admissions, other infectious aetiologies of bilateral pneumonia were ruled out. Repeatedly, sputum Gram staining and bacteriological, fungal and *Nocardia* spp. cultures were negative. The pneumococcal and *Legionella* urine antigen test showed no positivity.

Coexistence with other respiratory viral infections was studied by means of both the Filmarray™ respiratory panel and multiplex polymerase-chain-reaction (PCR) from nasopharyngeal swab specimens in all hospital admissions. Samples from bronchoalveolar lavage (BAL) and tissue biopsy were also screened for viral aetiologies. These tests were negative for DNA of adenovirus, coronavirus 229E, coronavirus HKU1, coronavirus OC43, coronavirus NL63, human metapneumovirus, human rhinovirus, human enterovirus, influenza A, influenza A/H1, influenza A/H1-2009, influenza A/H3, influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, parainfluenza 4, respiratory syncytial virus, *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*.

Mycobacterial infections were also studied. A tuberculosis interferon-gamma release assay (QuantiFERON-TB Gold) was negative, as well as the detection by PCR of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in samples taken from nasopharyngeal swab, sputum, BAL, and lung biopsy. No acid-fast organisms were seen in the Ziehl-Neelsen staining nor mycobacteria grew in the Lowenstein-Jensen culture of those samples.

Serological blood tests were negative for immunoglobulins M and G (IgM and IgG) of *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila* and anti-phase I and anti-phase II *Coxiella burnetii* antibodies.

Repeated blood cultures were also negative, and the patient presented undetectable blood viral load of herpes simplex, herpesvirus 6, parvovirus B19, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus, determined by quantitative real-time PCR (qPCR).

Figure S1. Laboratory values over time. (A) C-reactive protein (CRP). (B) Absolute lymphocyte count. Note the ascending trend of lymphocyte values during clinical evolution. (C) Immunoglobulin G levels.

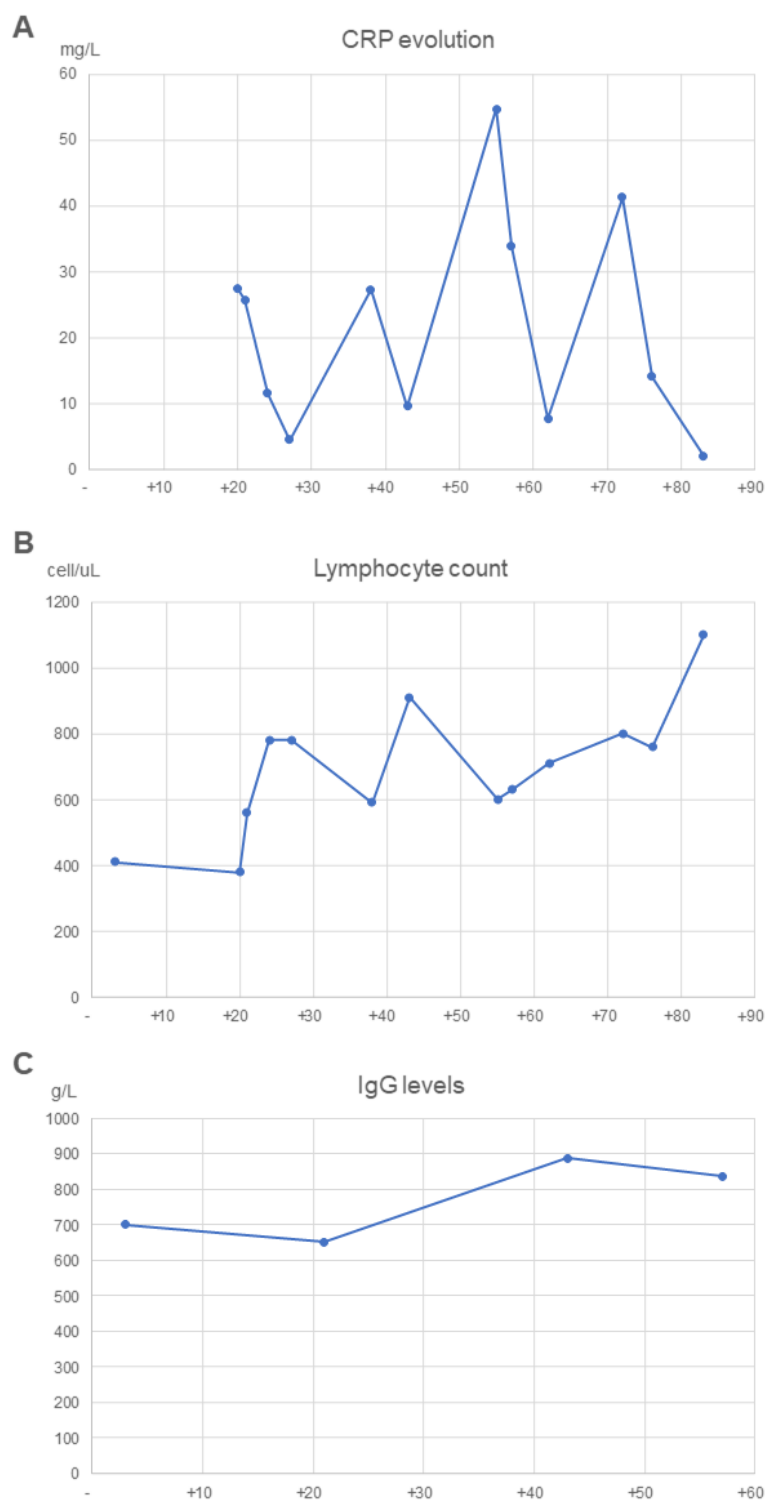


Table S1. Vital constants at the time of hospital admission

	Blood oxygen saturation	Blood arterial pressure	Heart rate	Axillary temperature
Day +20 1st admission	92% (FiO2 21%)	124/78 mmHg	106 bpm	38.7°C
Day +38 2nd admission	96% (FiO2 21%)	126/76 mmHg	110 bpm	38.3°C
Day +55 3rd admission	96% (FiO2 21%)	134/77 mmHg	110 bpm	38°C
Day +72 4th admission	96% (FiO2 21%)	126/83 mmHg	75 bpm	37.1°C

Bpm: beats per minute. FiO2: fraction of inspired oxygen.

10.2. Norovirus infection as a model of chronic or recurrent infection in Common Variable Immunodeficiency



Official journal
of the Spanish Society
of Chemotherapy

ISSN: 0214-3429 / ©The Author 2022. Published by Sociedad Española de Quimioterapia. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Approach to infection in immunosuppressed patients

Pedro Moral Moral¹
Dafne Cabañero-Navalon¹
Victor García-Bustos¹
María Núñez Beltrán¹
Miguel Salavert Lletí²

Norovirus infection as a model of chronic or recurrent infection in common variable immunodeficiency

¹Primary Immunodeficiencies Unit. Internal Medicine Section. University and Polytechnic Hospital La Fe. Valencia, Spain

²Infectious Diseases Unit. University and Polytechnic Hospital La Fe. Valencia, Spain

Revista Española de Quimioterapia
doi:10.37201/req/s03.14.2022

ABSTRACT

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most frequent symptomatic primary immunodeficiency (PID) in general population. PID are genetic diseases that share a dysfunction in the immune system entailing a greater risk of both chronic and recurrent infections. These patients can also develop chronic gastrointestinal infections caused by norovirus with persistent viral dissemination, which can be detected months after primo-infection. Additionally, a proportion of CVID patients show a typical severe enteropathy presenting with recurrent diarrhoea, intestinal malabsorption, inflammatory lesions, and villous atrophy. Some studies have related this enteropathy with chronic intestinal infection caused by norovirus.

Keywords: common variable immunodeficiency, Norovirus, enteropathy

INTRODUCTION

Primary immunodeficiencies constitute a heterogeneous group of more than 450 genetic diseases that share a deficient production in the components of innate and/or adaptive immune system. These disorders entail a higher susceptibility of developing infections which can sometimes be severe, chronic, recurrent, and may be caused by opportunistic agents. Nevertheless, in the last two decades, genomic, biochemical, and cellular analysis have demonstrated that the clinical characteristics of PID are wider than initially thought, and are not only restricted to infections. The immune system dysregulation has been described in many PID and can cause multiple autoim-

mune disorders, lymphoproliferative diseases, and neoplasms which, when not promptly suspected and diagnosed, will negatively impact the patient prognosis [1,2].

CVID is the most common symptomatic PID, with an estimated prevalence of 1:25.000 to 1:50.000 individuals. It is characterised by decreased blood levels of at least two immunoglobulin (Ig) isotypes (IgG, IgA and/or IgM) together with decreased or absent production of specific antibodies. Diagnosis is made when excluding secondary causes of hypogammaglobulinemia and other well-defined PID, including combined immunodeficiencies with decreased number of CD4 T-cells. CVID patients share a central alteration in the B-cell differentiation to plasmatic Ig secretory cells, and, despite the fact that CVID is classified as a PID with B-cell defect, in the last years a large number of other cellular defects have been discovered. Although the clinical spectrum of CVID is wide, two main phenotypes can be found: a first group of CVID patients that show recurrent infections, and a second group which develops autoimmune/inflammatory manifestations [3]. Within this second phenotype, a small proportion of patients (5-15%) may develop a typical severe enteropathy (called CVID-related enteropathy) of unknown cause. It might present as recurrent diarrhoea, intestinal malabsorption, inflammatory lesions, and villous atrophy in the patients' intestinal mucosa.

The most common infectious manifestations in CVID patients are recurrent airway infections, especially acute bronchitis, sinusitis, and pneumonias. Infections may also less frequently affect the CNS, gastrointestinal tract, and skin and soft tissue. In a subsection of CVID patients, chronic diarrhoea can be the main symptom of disease. Some parasites such as *Giardia intestinalis* can be responsible for the recurrent diarrhoea, but the villous atrophy or the intestinal inflammatory lesions that are seen in these patients have been related to the chronic or recurrent intestinal infection caused by norovirus [4].

Correspondence:
Pedro Moral Moral
Primary Immunodeficiencies Unit. Internal Medicine Section. University and Polytechnic Hospital La Fe. Valencia, Spain
E-mail: pedromoralmoral@hotmail.com

NOROVIRUS INFECTION AND CVID-RELATED ENTEROPATHY

Norovirus is the most common agent of gastroenteritis described both in isolated cases and in outbreaks all along the world. It is a non-enveloped RNA virus of the *Caliciviridae* family. Although it is a unique species, norovirus is divided into six genogroups (GI-GVI) that are subdivided into more than 40 genotypes. Among them, only GI, GII, and GIV can infect humans, being the strain GII.4 the most frequent one, causing more than 80% of intestinal infections worldwide. This virus has faecal-oral transmission, but it can also be transmitted by direct contact or by contaminated water or food. It is highly infectious as very few viral particles are able to cause the disease. Norovirus infection in immunocompetent patients is characterized by intense vomiting, followed by at least 4 days of diarrhoea, reaching the peak of viral excretion in 1 to 3 days after the disease onset. Up to 32% of the infected patients will develop an asymptomatic infection [5]. PID patients infected by norovirus may present the same initial symptoms. Nevertheless, 5 to 20% of these patients can develop severe and prolonged diarrhoea which can last for more than 4 months due to their diminished viral clearance. In addition, the disease can worsen, entailing a higher mortality rate [6]. It is not clear whether the prolonged symptoms are owed to a chronic norovirus infection or to a repeated series of infections, as the incomplete immune response of PID patients imply a higher susceptibility to recurrent infections in all age groups. Despite the cause of the disease, CVID patients develop viral persistent dissemination which can be detected between 9 months to 1 year after the primoinfection. Furthermore, there is no evidence that specific strains are responsible for this persistent infection in human hosts, as the most common genotype in immunosuppressed patients is the strain G-II which is also the predominant genotype in general population [7].

The histopathological findings of the CVID-related enteropathy are similar to those found in coeliac disease: increased number of intraepithelial lymphocytes, severe villous atrophy, crypt hyperplasia and lymphocyte infiltration of the lamina propria. Nevertheless, plasmatic cells may be absent, and, in some severe cases, enterocytes can show important degeneration and vacuolization. In fact, gluten abstinence is rarely beneficial, and most of the patients do not show class II HLA variants (DQ2 or DQ8). It has been recently demonstrated that norovirus infection provokes pathological changes in the duodenal mucosa of immunocompetent patients that resemble those pathological findings of coeliac disease, including villous atrophy, increase of intraepithelial lymphocytes, and permeability increase [8].

In a well-known patient series with CVID-related enteropathy, Woodward et al. [9] proposed that chronic norovirus infection could play an important role in the aetiology of this severe enteropathy. The 8 identified patients of this retrospective series

were positive for norovirus in faecal samples, and, interestingly, 3 patients showed clinical resolution and an improvement of villous duodenal atrophy after achieving viral clearance when treated with ribavirin for several months. On the contrary, many patients with this chronic enteropathy seemed to symptomatically respond to immunosuppressor treatment, which included steroids and anti-TNF antibodies, despite the fact no significant histological changes were observed in the intestinal biopsies after this therapy. These findings support a possible role of cytotoxic aberrant immune response to the chronic infection caused by norovirus, and maybe to other enteric infections, in the aetiology of the CVID-related enteropathy.

IMMUNE RESPONSE TO NOROVIRUS IN IMMUNODEFICIENT PATIENTS

When talking about the immune response in CVID patients to norovirus infection and the presence of chronic enteropathy, it is essential to understand two main facts: which the mechanisms that eliminate norovirus from the host are, and which the pathogenicity of the villous atrophy and the inflammation of the intestinal mucosa is. According to the established hypothesis based on experimental animal and human models, norovirus mainly infects antigen-presenting cells (APCs), B-lymphocytes and epithelial cells, where it can produce direct toxicity. The infected cells release type I and type III interferon (IFN). The norovirus antigen is then presented by the infected cells through type I major histocompatibility complex to CD8 T-lymphocytes, or through type II major histocompatibility complex in B-cells and in APCs to CD4 T-lymphocytes. The expression of IL-15, specially in epithelial cells can increase the activation of T-cells. CD8 T-lymphocytes exert their cytotoxic role as intraepithelial lymphocytes, inducing apoptosis of mucosal epithelial cells through the release of granzyme and perforin, union of Fas/Fas ligand, and through the interaction with group 2D natural killer cells. CD4 T-lymphocytes proliferate and release cytokines which improve the activity of APCs, the cytotoxicity induced by CD8 T-lymphocytes, and the antibody production exerted by B-cells and plasmatic cells. This coordinated immune response is able to eliminate norovirus in immunocompetent hosts. Contrarily, in immunodeficiencies such as CVID, B-cell differentiation to plasmatic cells is compromised, and thus, the production of neutralizing antibodies, the interaction among T-cells and B-cells, and the release of cytokines from CD4 T-lymphocytes are impaired. As a result, norovirus clearance is altered, and a persistent and uncontrolled CD8 T-cell response produces epithelial damage and, in the end, causes the typical villous mucosal atrophy [5] (Figure 1).

DIAGNOSIS AND TREATMENT OF NOROVIRUS IN IMMUNODEFICIENT PATIENTS

In the majority of cases, norovirus infection is diagnosed by detecting the presence of viral RNA though PCR in faecal

P. Moral Moral, et al.

Norovirus infection as a model of chronic or recurrent infection in common variable immunodeficiency

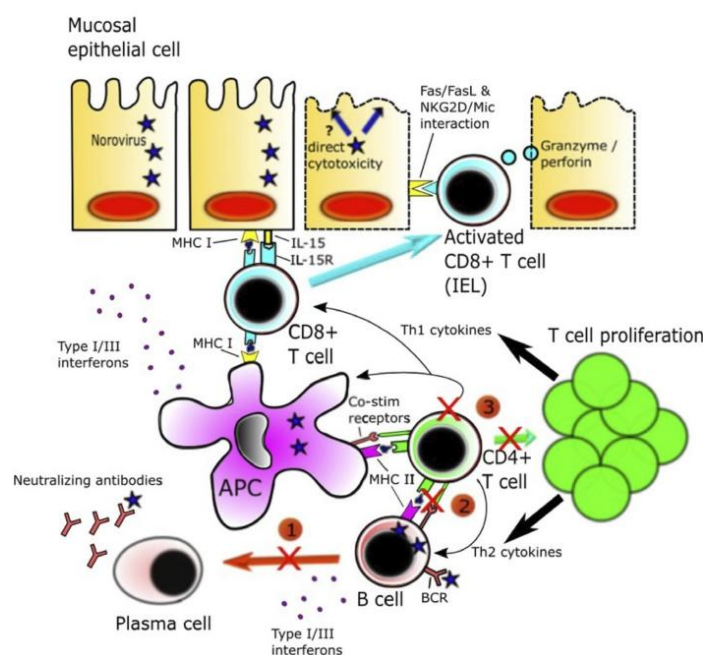


Figure 1 Pathogenesis of chronic intestinal infection by norovirus [5]

Used with permission of John Wiley & Sons, Ltd from Norovirus infection in primary immune deficiency, Rev Med Virol. 2017;27(3):e1926.; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

samples. The sample must be processed within the first 48 to 72h after the beginning of the symptoms. Nevertheless, the PCR can still detect viral RNA in faeces during weeks or months after the resolution of the symptoms, especially in patients with PID. This PCR analysis can also genetically classify norovirus strains, which is helpful for epidemiological research.

Nowadays, there is an active debate on whether the presence of norovirus itself implies the need of treatment, whether it is just an innocent spectator, or whether the treatment of norovirus infection should be restricted to the use of immunomodulator agents. Treatment of acute norovirus infection is mainly addressed to the patients' symptoms, and is focussed on fluid therapy for dehydration. To the moment, there are no available vaccines or antiviral targeted therapy. Treatment for patients with chronic infection caused by norovirus remains a therapeutical challenge. There are cases where the use of antivirals, specifically ribavirin and favipiravir, have achieved viral clearance measured through faecal PCR, together with clinical

resolution, and improved histopathologic findings [8]. Immunomodulation with oral Ig [10] and breastmilk [11] have also shown some benefits. In addition, several antiparasitic agents such as nitazoxanide have demonstrated antiviral properties with transient benefit [12]. Finally, the use of immunomodulators such as mTOR inhibitors (sirolimus or everolimus) have proved a significant increase in the antiviral properties of the host that should be furtherly and deeply studied [13].

Recently, a unique association *Clostridioides difficile* coinfection has been observed in patients with chronic norovirus infection [14]. This fact has shed light on the role that microbiome modification may play in facilitating enteric replication of the virus and its establishment as a chronic infection. Some works in experimental animal models suggest that commensal bacteria, which are reduced as a consequence of antibiotic treatment, can counter the innate immune response to norovirus, which limits their efficacy in preventing new infections. Another hypothesis is that commensal bacteria may help norovirus in infecting specific cells of the intestinal mucosa [15].

P. Moral Moral, et al.

Norovirus infection as a model of chronic or recurrent infection in common variable immunodeficiency

CONCLUSIONS

CVID is the most frequent symptomatic PID in the population, and it is characterized by a dysfunction of the humoral component of the adaptive immune system which leads to a higher risk of repeated, chronic and/or recurrent infections. CVID patients may occasionally develop chronic intestinal norovirus infections with persistent viral shedding that can be detected months after the initial infection. This chronic infection has been related with the presence of a specific enteropathy characterized by an increase in intraepithelial lymphocytes, villous atrophy, crypt hyperplasia, and lymphocytic infiltration of the lamina propria, together with an absence of plasma cells, which poses a differential diagnosis with celiac disease. To date, no effective medical treatment has been described to treat this type of chronic infection.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest

REFERENCES

1. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2020 Jan;40(1):24-64.
2. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018 Sep 12;14(Suppl 2):61.
3. Ho HE, Cunningham-Rundles C. Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis. *Front Immunol*. 2020 Feb 7;11:149.
4. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaus-saud R, Viallard JF, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P, Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Théodorou I, Rabian C, Debré P; DEFI Study Group. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2008 May 15;46(10):1547-54.
5. Brown LK, Clark I, Brown JR, Breuer J, Lowe DM. Norovirus infection in primary immune deficiency. *Rev Med Virol*. 2017 May;27(3):e1926.
6. Khodadad A, Aghamohammadi A, Parvaneh N, et al. Gastrointestinal manifestations in patients with common variable immunodeficiency. *Dig Dis Sci*. 2007; 52:2977 - 2983.
7. Hartono S, Bhagia A, Joshi AY. No! When the immunologist becomes a virologist: Norovirus - an emerging infection in immune deficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2016 Dec;16(6):557-564.
8. Woodward JM, Gkrania-Klotsas E, Cordero-Ng AY, Aravinthan A, Bandoh BN, Liu H, Davies S, Zhang H, Stevenson P, Curran MD, Kumararatne D. The role of chronic norovirus infection in the enteropathy associated with common variable immunodeficiency. *Am J Gastroenterol*. 2015 Feb;110(2):320-7.
9. Woodward J, Gkrania-Klotsas E, Kumararatne D. Chronic norovirus infection and common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2017 Jun;188(3):363-370. doi: 10.1111/cei.12884. Epub 2016 Nov 16.
10. Florescu DF, Hermesen ED, Kwon JY, et al. Is there a role for oral human immunoglobulin in the treatment for norovirus enteritis in immunocompromised patients? *Pediatr Transplant* 2011; 15:718 - 721.
11. Khodayar-Pardo P, Martinez-Costa C, Carmona-Vicente N, Buesa J. Norovirus GII.4 antibodies in breast milk and serum samples: their role preventing virus-like particles binding to their receptors. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33:554 - 559.
12. Siddiq DM, Koo HL, Adachi JA, Viola GM. Norovirus gastroenteritis successfully treated with nitazoxanide. *J Infect* 2011; 63:394 - 397.
13. Engelen MA, Gunia S, Stypmann J. Elimination of norovirus in a chronic carrier under immunosuppression after heart transplantation - effect of everolimus. *Transpl Int* 2011; 24:e102 - e103.
14. Ludwig A, Sato K, Schirmer P, et al. Concurrent outbreaks with co-infection of norovirus and *Clostridium difficile* in a long-term-care facility. *Epidemiol Infect* 2013; 141:1598 - 1603.
15. Newman KL, Leon JS. Norovirus immunology: Of mice and mechanisms. *Eur J Immunol*. 2015 Oct;45(10):2742-57.

