

**CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN DOS PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE Y UN GRUPO CONTROL
SANO EN EL HOSPITAL DE NIÑOS DE CÓRDOBA**

Miranda, Nadia Soledad¹

Pereira, Beatriz María Inés¹

Blanco, Adolfo²

Skrie, Víctor²

Orellana, Julio César²

Cassinerio, Adriana Isabel¹

¹Laboratorio de Inmunología – Hospital de Niños de la Santísima Trinidad – Córdoba –
Argentina

²Servicio de Alergia e Inmunología – Hospital de Niños de la Santísima Trinidad – Córdoba –
Argentina

Correspondencia: Nadia Soledad Miranda. Laboratorio de Inmunología, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Bajada Pucará y Av. Ferroviarios, Córdoba (CP 5000), Argentina. Tel: 0351-4586475 – nadmir@hotmail.com

Aceptado para su publicación: 2/2/18.

RESUMEN

La inmunodeficiencia común variable (IDCV) es una de las Inmunodeficiencias Primarias (IDP) que cursa con alteraciones en el sistema inmunológico ocasionando hipogamaglobulinemia. Esto predispone a los pacientes a distintas manifestaciones clínicas que involucran por lo general al tracto respiratorio y gastrointestinal. Afecta principalmente a adultos pero también es detectada en niños siendo complicado establecer un diagnóstico (Dx) temprano. Para contribuir a ello y predecir complicaciones en quienes ya presentan un Dx, se evalúan las subpoblaciones de linfocitos B (Li B). El consenso EUROclass propone la clasificación de pacientes adultos con IDCV según los valores de las distintas subpoblaciones de Li B con subgrupos clínicos para adaptar terapias individuales, predecir el riesgo de complicaciones y contribuir a la interpretación de su patogenia.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las subpoblaciones de Li B de dos pacientes pediátricos con IDCV del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba en comparación con 10 pacientes de un grupo control sano. En ambos grupos se evaluaron porcentajes de Li B totales, Li B *naive*, Li B de memoria (Li Bm) con switch, Li Bm sin switch y Li B CD21^{low}. No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de las células analizadas de los dos grupos de pacientes. Los resultados obtenidos en pacientes con IDCV no revelaron diferencias frente a pacientes normales. Se concluye que los resultados podrían deberse al pequeño tamaño muestral o a la imposibilidad de aplicar la clasificación en niños propuesta para adultos. Por lo tanto, se debe continuar analizando las subpoblaciones de Li B en pacientes que presenten Dx de IDCV para poder ampliar los resultados y predecir futuras complicaciones clínicas.

Palabras clave: Inmunodeficiencia, Linfocitos B, Anticuerpos, Niños.

INTRODUCCIÓN

La inmunodeficiencia común variable (IDCV), que pertenece al grupo de las Inmunodeficiencias Primarias (IDP), es un grupo heterogéneo de alteraciones que afectan al sistema inmunológico, caracterizadas principalmente por hipogamaglobulinemia. Esta afección se asocia a una producción defectuosa de anticuerpos (Acs) específicos y susceptibilidad aumentada a infecciones crónicas y recurrentes, generalmente del tracto respiratorio y gastrointestinal por bacterias encapsuladas (1-7).

La IDCV afecta en igual proporción a hombres y mujeres. La prevalencia estimada es de 1:25.000 a 1:66.000 en la población general (8). La IDCV es la IDP más común en los adultos, habitualmente se da entre la segunda y tercera década de la vida, pero también se detecta en niños (2,9,10). Se manifiesta generalmente de manera esporádica, sólo un 10-20% de los casos tienen alguna asociación familiar (11). Esta patología se puede heredar de manera autosómica dominante, aunque también se describe la herencia autosómica recesiva (12).

Entre las manifestaciones clínicas se incluyen diversas infecciones ya que los pacientes presentan aumento de la susceptibilidad frente a patógenos. Entre las infecciones más comunes se destacan las que involucran a las vías respiratorias como sinusitis, bronquitis, neumonías y bronquiectasias. Un 10-20% de los pacientes presentan enfermedad granulomatosa pulmonar. Las complicaciones gastrointestinales están dadas por infecciones causadas por *Giardia lamblia* y *Campilobacter jejuni* (2).

Los procesos autoinmunes también se presentan en los pacientes con IDCV, tales como púrpura trombocitopénica idiopática y anemia hemolítica autoinmune, ambas asociadas al desarrollo de esplenomegalia (2,3,5). En la mayoría de los pacientes las manifestaciones autoinmunes se presentan antes del diagnóstico (Dx) de IDCV (13).

Los pacientes con IDCV tienen mayor riesgo de desarrollar linfoproliferación y procesos malignos (2). Las neoplasias más frecuentes son linfoma y cáncer de estómago (11).

La multiplicidad de manifestaciones clínicas lleva a retardar el diagnóstico (Dx) con tiempos que van entre 2 a 10 años desde el comienzo de los síntomas (2,3,14,15). El tiempo que transcurre entre el inicio de los mismos y el Dx es menor cuando los síntomas aparecen antes de los 10 años de edad (14). La demora en establecer el Dx es frecuente y está asociada a mayor morbilidad (16).

En los pacientes con IDCV se describen alteraciones fenotípicas y anomalías funcionales tanto en el sistema inmune adaptativo (SIA) como en el sistema inmune innato (7, 17). Dentro del SIA afectado en esta patología, los Linfocitos B (Li B) juegan un papel preponderante, sin embargo, los pacientes con IDCV tienen también compromiso de las células T (8, 17–19).

En cuanto a la patogenia, la generación de Li B en la médula ósea (MO) es aparentemente normal pero la diferenciación a células plasmáticas secretoras de Acs está disminuida (1). Los Li B se generan en MO a partir de la *Stem Cell* pluripotente. Durante el proceso de maduración transita distintos estadios: células pro B, células pre B, linfocitos B transicionales (Li Bt), los cuales emigran de MO para culminar su maduración en el bazo. A partir de los Li Bt se generan células B de la zona marginal del bazo (BZM) y Li B foliculares (Li Bf) (9).

En sangre periférica (SP), 15 a 20 % son BZM y el resto son Li Bf, llamados también Li B maduros vírgenes o *naive* y están en constante circulación. Cuando contactan con el antígeno (Ag) se activan y se diferencian a Li B de memoria (Li Bm) o células plasmáticas. En los Li Bm, luego del contacto con el antígeno (Ag), se produce el proceso de *switch* o cambio de isotipo de inmunoglobulina de superficie. Así, se pueden diferenciar dos grupos de Li Bm: uno **sin switch** que expresa inmunoglobulina D (IgD) de superficie, y otro **con switch** que no presenta IgD de superficie (9). El Li B expresa en su membrana de superficie diversos marcadores que lo identifican, entre ellos el CD21, que forma un complejo con CD19 y CD81 actuando como correceptor del Li B (20).

La sospecha diagnóstica de IDCV tiene que ser tenida en cuenta en niños a partir de 2 años de edad, sin embargo, para establecer el Dx probable de IDCV es necesario que el paciente sea mayor de 4 años de edad (17).

La fenotipificación de las subpoblaciones de Li B para pacientes con IDCV fue planteada por diferentes sistemas de clasificación para relacionar los valores de las distintas subpoblaciones de Li B con subgrupos clínicos, y en base a ello, poder adaptar terapias individuales, predecir el riesgo de complicaciones y también contribuir a la interpretación de su patogenia (2).

Si bien la disminución de los Li Bm no es una característica específica relacionada a la IDCV, se la puede usar para clasificar a los pacientes clínica e inmunológicamente en subgrupos más homogéneos (2). Teniendo en cuenta la determinación de las subpoblaciones de Li B, se plantean diferentes sistemas de clasificación para agrupar pacientes con el objetivo de predecir futuras complicaciones (21, 22). La inmunofenotipificación de Li B por citometría de flujo es una herramienta clave en este aspecto. La clasificación EUROclass surgida en el año 2008, agrupa

a los pacientes con IDCV unificando las clasificaciones de *Freiburg* y de *Paris* propuestas en años anteriores (3, 21, 21). El consenso *EUROclass* propone la determinación de las siguientes subpoblaciones de Li B:

- ✓ Células B totales
- ✓ Células de memoria con *switch*
- ✓ Células B transicionales
- ✓ Células B CD21 *low*

En este consenso se concluye que, tanto la reducción severa relativa de Li Bm con *switch* (menos del 2% del total de Li B), como la expansión de Li B CD21 *low* está asociado a un mayor riesgo de esplenomegalia y enfermedad granulomatosa (3). Niveles bajos de Li B con *switch* también estarían asociados a infecciones frecuentes del tracto respiratorio (16).

Además se describe que las citopenias autoinmunes están asociadas con disminución de Li Bm con *switch*, expansión de la población de Li B CD21 *low* (2).

Estos sistemas de clasificación en base a las subpoblaciones de Li B están diseñados para ser interpretados únicamente en pacientes adultos (3, 21, 22). Considerando las diferencias significativas entre los valores normales de Li B en sus distintos estadios de maduración, y a su vez entre las distintas edades de los pacientes, es probable que los sistemas de clasificación no sean directamente aplicables a la población pediátrica (23, 24).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil de subpoblaciones de Li B de dos pacientes pediátricos con IDCV que están en seguimiento en el Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba en comparación con un grupo control sano de la misma Institución.

MATERIALES Y METODOS

Muestra y tipo de estudio

Es un estudio prospectivo, de corte transversal, descriptivo y analítico de casos y controles. Se incluyeron dos pacientes con Dx de IDCV de 4 y 16 años de edad que fueron citados por los médicos especialistas para su evaluación. Los 2 pacientes estudiados presentaron infecciones respiratorias graves a muy temprana edad (15 días y 15 meses de vida). Tenían también valores disminuidos de IgG (138 y 388 mg/dl) y de IgA (9 y 17 mg/dl). Estos pacientes recibieron

tratamiento con gammaglobulina y presentaron afecciones intestinales a partir de los 3 y 5 años de vida (gastropatía con hipertrofia linfoidea y alteraciones intestinales tales como diarrea y vómitos). Cuando estos pacientes cumplieron 4 años fueron reevaluados y diagnosticados con IDCV según los criterios de ESID (*European Society for Immunodeficiencies*) (17). Como grupo control, se incluyeron 10 pacientes mayores a 4 años de edad, que concurrieron al Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba con solicitud de análisis prequirúrgicos, sin ninguna patología asociada al sistema inmune, con parámetros hematológicos dentro de los rangos de referencia normales para la edad. Se excluyó a aquellos pacientes que presentaban antecedentes de IDP u otras enfermedades que afectan al sistema inmune.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les solicitó consentimiento y asentimiento informado según correspondía con la edad.

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud (C.I.E.I.S. del Niño y del Adulto) de la Provincia de Córdoba, Argentina.

Análisis por Citometría de Flujo de las subpoblaciones linfocitarias

Se tomaron muestras de sangre por punción venosa con EDTA.

Para el estudio de subpoblaciones linfocitarias T (LiT) y B se utilizaron anticuerpos monoclonales (Acm) marcados con diferentes fluorocromos por Citometría de flujo (FACS) con un Citómetro *Coulter Epics XL*, programa *System II*, y una Plataforma Dual o Múltiple (CDC 1997).

De la muestra obtenida se tomaron 400 µl, se lavaron las células a marcar con PBS y se distribuyeron 50 µl por cada tubo de citómetro para su marcación. Se utilizó la siguiente combinación de Acm (combinación de 3 marcadores por tubo) para cada individuo:

Tubo 1: control de autofluorescencia

Tubo 2: CD8 (FITC)/ CD4 (PE)/ CD3 (PCy5) (*Trichrome, Coulter Immunotech*),

Tubo 3: IgD (FITC)/ CD27 (PE)/ CD19 (PCy5) (*Coulter Immunotech*)

Tubo 4: CD21 (FITC)/ CD10 (PE)/ CD19 (PCy5) (*Coulter Immunotech*).

Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad, luego se lisaron los glóbulos rojos con Cloruro de Amonio durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad; y

finalmente los tubos fueron adquiridos y analizados en el citómetro. Se identificaron los linfocitos de acuerdo a su posición en un gráfico de tamaño (*forward scatter* –FS-) versus °granularidad (*side scatter* –SS-). Se contaron 5000 elementos en la ventana (*gate*) de linfocitos (para el tubo 2) o de Li B (CD19+, para los tubos 3 y 4). El recuento celular se expresó en porcentajes. Se identificaron fenotípicamente las siguientes poblaciones celulares:

- ✓ Li T (CD3⁺/ CD19⁻)
- ✓ Li T cooperadores (CD3⁺/CD4⁺)
- ✓ Li T citotóxico/supresores (CD3⁺/CD8⁺)
- ✓ Li B (CD3⁻/ CD19⁺)
- ✓ Li B *naive*/vírgenes(CD19⁺/ IgD⁺/CD27⁻)
- ✓ Li B m sin *switch* (CD19⁺/ IgD⁺/CD27⁺)
- ✓ Li B m con *switch* (CD19⁺/ IgD⁻/CD27⁺)
- ✓ LiB CD21^{low} (CD19⁺/CD21⁺)

Análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico IBM SPSS *Statistics*23. Dado que el tamaño muestral fue pequeño, los datos no presentaron una distribución normal. Por lo tanto, como test no paramétrico se utilizó la prueba estadística U de Mann Whitney, para poder realizar la comparación de los valores de las subpoblaciones de Li B entre los dos grupos de pacientes.

RESULTADOS

Se analizaron las subpoblaciones de Li B de 2 pacientes pediátricos con Dx de IDCv y del grupo control formado por 10 pacientes considerados sanos.

Para completar el análisis de las subpoblaciones linfocitarias fue necesario establecer los valores de las subpoblaciones de Li T. En la tabla 1 se observan dichos valores dentro de los valores de referencia normales para la edad.

Tabla 1: Valores de subpoblaciones de linfocitos T.

	Linfocitos T totales		Linfocitos T cooperadores		Linfocitos T citotóxicos/supresores	
	Media (%)	Rango (%)	Media (%)	Rango (%)	Media (%)	Rango (%)
Control	69,7	(57,0 - 81,0)	35,9	(24,0 - 48)	27,7	(17 - 37)
IDCV	71,0	(70 - 72)	44,0	(44,0 - 44,0)	18,5	(16 - 21)

En las Figuras I y II se muestran los gráficos de las subpoblaciones de Li B obtenidos por citometría de flujo de un control sano y un paciente con IDCV.

Figura I: Grupo control. a) *Gate* de Li B a partir de SS vs CD19+. b) *Dot plot* IgD vs CD27, identificación de Li Bm sin *switch*, Li Bm con *switch* y Li B *naive*. c) *Dot plot* CD21 vs CD19, identificación de Li B CD21low.

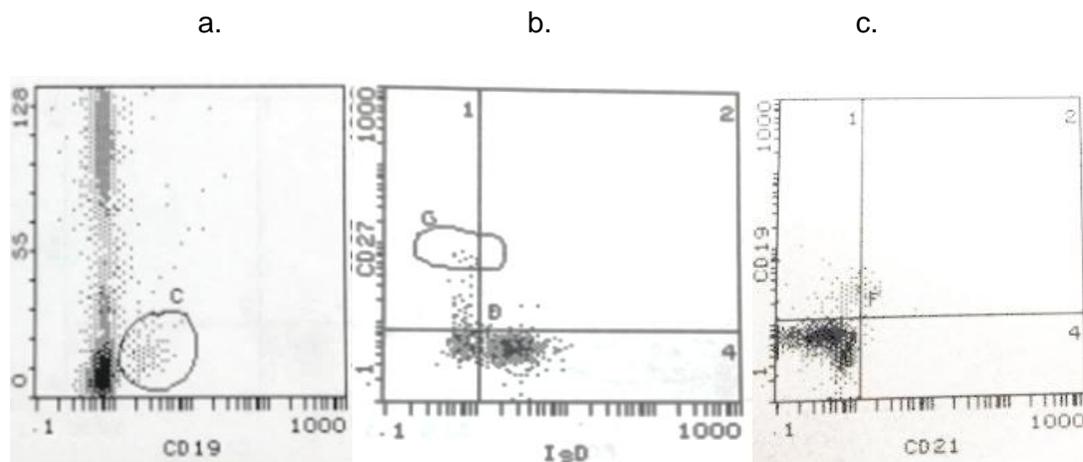
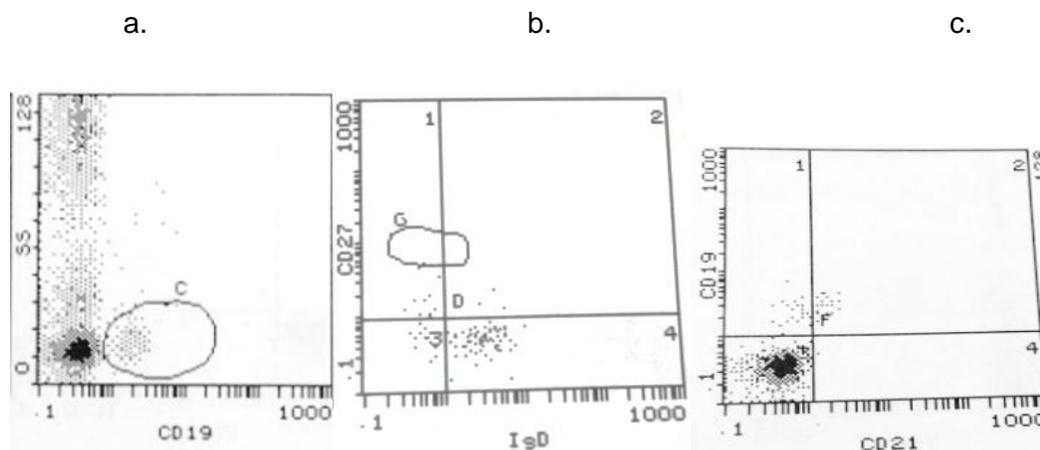


Figura II: Paciente con Dx de IDCV. a) Selección de Li B a partir de SS vs CD19+. b) *Dot plot* IgD vs CD27, identificación de Li Bm sin *switch*, Li Bm con *switch* y Li B *naive*. c) *Dot plot* CD21 vs CD19, identificación de Li B CD21low.



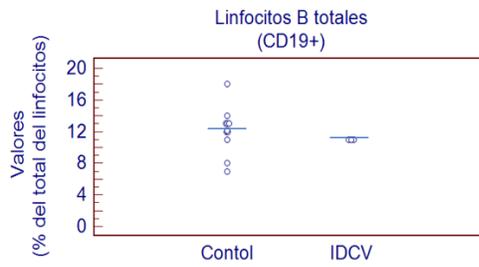
Al analizar los valores de las distintas subpoblaciones de Li B de 2 pacientes con IDCV se observa que no hay diferencia significativa en cuanto a los valores de Li B totales, Li B *naive*, Li Bm sin *switch*, Li Bm con *switch* y Li B CD21low (p valor >0,05) al comparar con el grupo control. Esto indicaría que probablemente el porcentaje de estas células sea similar en ambos grupos. Tabla 2. Figura III (A – E).

Tabla 2. Valores de subpoblaciones de linfocitos B.

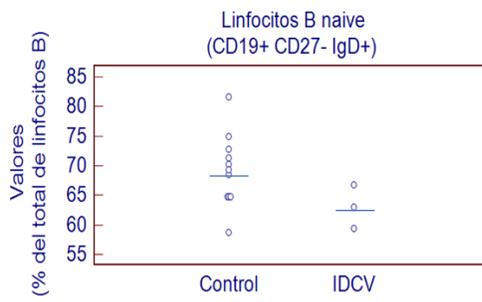
Células analizadas	Grupos	Media (% del total de linfocitos)	Rango (%)
Linfocitos B	Grupo Control	12,10	(7-18)
	IDCV	11,00	(11-11)
Células analizadas	Grupos	Media (% del total de linfocitos B)	Rango (% del total de linfocitos B)
Células B <i>naive</i>	Grupo Control	69,28	(58,8-81,7)
	IDCV	63,10	(59,4-66,8)
Linfocitos B memoria sin <i>switch</i>	Grupo Control	2,40	(0,97-3,55)
	IDCV	1,41	(1,20-1,61)
Linfocitos B de memoria con <i>switch</i>	Grupo Control	11,98	(6,97-15,6)
	IDCV	8,80	(8,43-9,16)
Células B CD21low	Grupo Control	4,11	(2,71-6,19)
	IDCV	3,37	(1,85-4,89)

Figura III

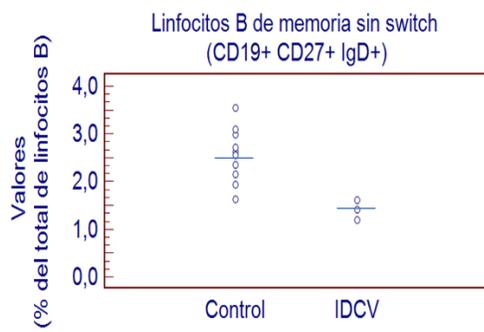
A.



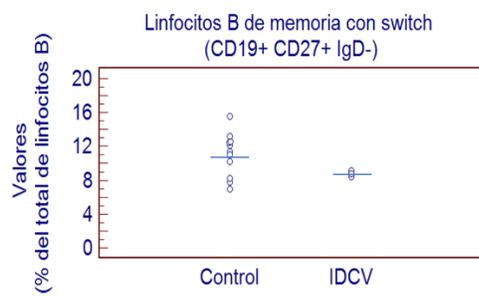
B.



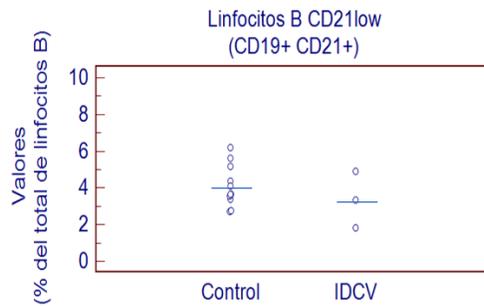
C.



D.



F.



DISCUSION

En base a los resultados de este estudio podemos decir que, comparando los distintos tipos de subpoblaciones de Li B de dos pacientes con Dx de IDCV con un grupo control, no encontramos diferencias significativas en los porcentajes de Li B totales, Li B *naive*, Li Bm con y sin *switch* y Li B CD21 *low*.

La bibliografía menciona que los pacientes adultos con IDCV presentan ciertas diferencias en los porcentajes de Li B, principalmente de Li Bm con *switch* y Li CD21 *low*. Sin embargo, los valores de estas células en los 2 pacientes estudiados resultaron similares a los valores del grupo control (2, 21, 22, 25, 26). Posiblemente, si se incluyera un mayor número de casos de pacientes pediátricos con IDCV, el estudio podría mostrar alguna tendencia diferente a la encontrada.

Los pacientes con IDCV pueden cursar con valores normales o disminuidos de Li B totales: en un 40-50% están ligeramente reducidos, mientras que un 13% de los mismos tienen menos del 3% de Li B en SP (2, 17). En este trabajo ambos pacientes presentaron Li B normales (según los valores de referencia para la edad) arrojando un valor medio de 11%.

Existen publicaciones que describen aumento de las células CD21 *low* en algunos pacientes con IDCV, indicando que el aumento de las células B CD21 *low* se asociaría a una gran proliferación, lo que sugiere un retardo en el desarrollo (arresto madurativo) más que aumento de producción en MO (3, 18, 26). También se menciona que la expansión de las CD21 *low* representa el marcador asociado a esplenomegalia (17). En nuestro caso las células CD21 *low* de los 2 pacientes resultaron con valores similares a los del grupo control.

Las diferencias encontradas entre el presente trabajo y lo que se menciona en diversas publicaciones podrían estar asociadas al tamaño muestral, siendo nuestra población de estudio muy pequeña. Esto se debe tanto al difícil Dx de esta patología, como a los pocos pacientes que la padecen dada su baja prevalencia y a las dificultades que presentaron los médicos de nuestra institución para que más pacientes registrados con esta patología concurrieran a la consulta en tiempo y forma.

La hipogamaglobulinemia y la falta de respuesta de Acs específicos se asocian a una disminución en la diferenciación del Li B a Li Bm y célula plasmática. Los Li Bm con *switch* están disminuidos en un 80-90% de los pacientes con IDCV (2). La disminución de los Li Bm con *switch* en SP es un indicador de alteración a nivel del centro germinal (5, 27). El porcentaje de Li Bm con *switch* es importante también para el Dx de pacientes con IDCV ya que su disminución está incluida dentro de los criterios diagnósticos de esta patología. Pacientes con Li Bm con *switch* bajas tendrían mayor predisposición al desarrollo de bronquiectasia y procesos autoinmunes (4). Sin embargo, los 2 casos con IDCV estudiados resultaron con valores de Li Bm con *switch* similar al grupo control.

A su vez, la activación y diferenciación del Li B depende de la interacción con los Li T, por lo que se plantea un importante rol de las células T en este aspecto (14, 19, 27). Ello sugiere evaluar también el porcentaje y la funcionalidad de estas últimas. En los 2 pacientes estudiados, el porcentaje de células T se encontró dentro de los rangos de referencia normales para la edad.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, edad al Dx y la importancia de realizar la evaluación de las subpoblaciones de Li B, se puede agregar que, el Dx de IDCV en una edad avanzada se ha visto relacionado a pacientes con complicaciones leves o ausentes, comparado a pacientes que se diagnostican a una edad media con las complicaciones típicas de la enfermedad. Esto confirmaría la experiencia reportada que, niños con IDCV tienen mayor incidencia de complicaciones asociadas a la enfermedad, lo que demuestra la importancia del fenotipo clínico para predecir evolución (10).

La determinación del inmunofenotipo de subpoblaciones de Li B, está siendo cada vez más utilizado para clasificar pacientes con IDCV en distintos grupos con diferente pronóstico clínico. Debido a la inmadurez que presenta el SI en los niños, las clasificaciones que se describen hasta la actualidad no podrían ser aplicables a este grupo etario debido a que los valores de referencia en los distintos estadios del Li B varían mucho en la población pediátrica. Con lo cual

se plantea la necesidad de elaborar alguna clasificación específica para ser aplicada en niños (24).

CONCLUSION

En este estudio se podría concluir que los valores de Li B, Li B *naive*, Li B m sin *switch*, con *switch* y Li B CD21^{low} de 2 pacientes con IDCV no presentaron diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de estas células respecto al grupo control. Estos resultados no permitieron clasificar a estos 2 pacientes pediátricos tal como mencionan gran parte de las publicaciones para pacientes adultos. Hasta el momento no hay trabajos publicados que apliquen estos sistemas de clasificación a pacientes pediátricos con IDCV. La evaluación de las subpoblaciones de Li B para el Dx y clasificación de pacientes con IDCV se podría realizar a través de estudios multicéntricos ampliando la posibilidad de incluir mayor número de casos, debido a la baja prevalencia de esta patología y su difícil Dx en la población pediátrica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berglund L, Wong S, Fulcher D, et al. B-cell maturation defects in common variable immunodeficiency and association with clinical features. *Pathology*. 2008; 40:288-94.
2. Salzer U, Warnatz K, Hans Hartmut P, et al. Common variable immunodeficiency- an update. *Arthritis research and therapy*. 2012; 14:223.
3. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, et al. The Euroclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008; 111:77-86.
4. Vodjgani M, Aghamohammadi A, Samadi M, et al. Analysis of class-switched memory B cells in patients with common variable immunodeficiency and its clinical implications. *J Investing Allergol Clin Immunol*. 2007; 17:321-8.
5. Mouillot G, Carmagnat M, Gerard L, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol*. 2010; 30:746-55.
6. Urschel S, Kayikci L, Wintergerst U, et al. Common variable immunodeficiency disorders in children: delayed diagnosis despite typical clinical presentation. *J Pediatr*. 2009; 154:888-94.
7. Primary Immunodeficiency Diseases. Definition, diagnosis and management. Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo L. Editors 2008. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
8. Ogershok P, Beth Hogan M, Welch J, et al. Spectrum of illness in pediatric common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006; 97:653-56.
9. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Clinical Cytometry*. 2008; 74B:261-71.
10. Chapel H, Lucas M, Lee M, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008; 112:277-86.
11. Saikia B, Gupta S. Common variable immunodeficiency. *Indian J Pediatr*. 2016; 1-7.
12. Yazdani R, Hakemi M, Sherkat R, et al. Genetic defects and the role of helper T-cells in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Advance Biomedical Research*. 2014; 3:2.
13. Haymore B, Mikita C, Tsokos G, et al. Common variable immune deficiency (CVID) presenting as an autoimmune disease: role of memory B cells. *Autoimmunity Reviews*. 2008; 7:309-12.
14. Bonilla F, Barlan I, Chapel H, et al. International consensus document (ICON): common variable immunodeficiency disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 4:38-59.

15. Van de ven A, van de Corput L, van de Tilburg C, et al. Lymphocyte characteristics in children with common variable immunodeficiency. *Clinical Immunology*. 2010; 135:63-71.
16. Ballegaard V, Permin H, Katzenstein T, et al. Long-term follow-up on affinity maturation and memory B-cell generation in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2013; 33:1067-77.
17. Bonilla F, Khan D, Ballas Z, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 136:1186-205.
18. Vlková M, Fronková E, Kanderová V, et al. Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naïve human B cells marked by CD24 expression. *The Journal of immunology*. 2010; 185:6431-38.
19. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine M, et al. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood*. 2014; 104:2441-3.
20. Thorarinsdottir K, Camponeschi A, Cavallini N, et al. CD21-/low B cells in human blood are memory cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2016; 185:252-62.
21. Warnatz K, Denz A, Druger R, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+ IgM- IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002; 99:1544-51.
22. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *Journal of Clinical Immunology*. 2003; 23:385-400.
23. Piatosa B, Malgorzata P, Siewiera K, et al. Common variable immune deficiency in children – clinical characteristics varies depending on defect in peripheral B cell maturation. *J Clin Immunol*. 2013; 33:731-41.
24. Schatorjé E, Gemen E, Driessen G, et al. Age-matched reference values for B-lymphocyte subpopulations and CVID classifications in children. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2011. 72:502-10.
25. ESID – Working definitions for clinical diagnosis for PID. ESID registry, 2014. 1-15.
26. Ameratunga R, Woon S, Gillis D, et al. New diagnostic criteria for CVID. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014; 10:183-6.
27. Bateman E, Ayres L, Sadler R, et al. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: association with clinical phenotypes in comparison with

other groups with recurrent infections. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012; 170:202-11.