

Tesi Doctoral

Diagnòstic de dèficit de producció d'anticossos específics. Eficàcia del tractament amb immunoglobulines en el control de l'afectació pulmonar.

Montserrat Vendrell Relat

Director de la tesi: Dr Javier de Gracia Roldán

Tutor: Dr Ferran Morell Brotad



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina. Facultat de Medicina

Juliol 2004

---

Al pare i a la mare pel seu esforç i recolzament continu, a l'avi Josep Maria que de manera inconscient i involuntària em va transmetre la vocació per la professió, al Javier, al Joan, al Josep Maria, a tota la meva família i a totes les persones que m'han donat el seu suport en les situacions adverses.

---

## **Agraïments**

Aquesta tesi és el resultat final d'una feina feta en equip, als membres del qual vull agrair individualment:

Al Dr Javier de Gracia, director d'aquesta tesi, per encaminar-me a la recerca, per inculcar-me el valor de la feina ben feta, pel seu esperit crític, per la seva capacitat de treball, per la seva experiència en el camp de les immunodeficiències primàries, per la seva amistat i per la pacient ajuda en la realització d'aquesta tesi.

Al Dr Ferran Morell, per facilitar-me la formació com a Pneumòleg, pel seu recolzament constant, pel seu optimisme extraordinari i la seva coherència .

A la Dra M<sup>a</sup> José Rodrigo, per la precisió en el treball, per la seva feina i la seva ajuda.

Al Dr Marc Miravittles, per haver compartit els inicis de la recerca, per la seva racional interpretació del dia a dia i per la seva amistat.

A la M<sup>a</sup> Jesús Cruz per la seva feina, bona predisposició, dedicació i bon humor.

A tots els membres que han format part del Servei de Pneumologia de l'Hospital Vall d'Hebron durant el període de realització d'aquesta tesi, especialment al Xavi Muñoz, a la Cristina Mayordomo i al Toni Álvarez pel seu ajut i la seva amistat.

A la Merche Catalan, a la infermeria de la Unitat d'Immunologia i a la Yolanda per la seva col.laboració.

A tots els voluntaris que de manera totalment desinteressada han col.laborat en aquesta tesi.

A la Carmen i la M<sup>a</sup> dels Àngels Codina pel seu ajut amb el català, al Barry Kench pel seu ajut amb l'anglès, a la Maria Garcia i a la Tina Guerrero pel seu ajut amb l'estadística .

## Abreviacions

ABPA	aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica
AID	deficiència de citidina deaminasa d'activació induïda
D $\alpha$ 1AT	dèficit d'alfa 1 antitripsina
ELISA	enzimoimmunoanàlisi
FEV <sub>1</sub>	volum forçat espiratori en el primer segon.
FQ	fibrosi quística
FVC	capacitat vital forçada
HboHA	antígens oligosacàrids de l'Hib conjugats a albúmina sèrica humana
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipus b
IC	interval de confiança.
ICV	immunodeficiència comuna variable
IRR	infeccions respiratòries de repetició
MPC	malaltia pulmonar crònica
PRP	poliribosilribitol fosfat
REDIP	registre espanyol d'immunodeficiències primàries.
TACAR	tomografia computoritzada d'alta resolució
VIH	virus de la immunodeficiència humana

# Índex

1. INTRODUCCIÓ .....	7
1.1 Avaluació de la immunitat humoral	
1.2 Immunodeficiències predominantment d'anticossos	
1.3 Bronquièctasis	
1.4 Tractament amb immunoglobulines	
2. OBJECTIUS DE L'ESTUDI .....	15
3. RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	16
3.1 Estandarització tècnica d'ELISA.	
3.2 Valors de referència d'anticossos contra l'Hib en població sana.	
3.3 Criteri de resposta a la vacuna de l'Hib	
3.4 Utilitat de la vacuna conjugada de l'Hib	
3.5 Producció d'anticossos específics en bronquièctasi d'etiologia no coneguda	
3.6 Eficàcia del tractament amb immunoglobulines.	
4. CONCLUSIONS .....	48
5. BIBLIOGRAFIA .....	50
6. ARTICLES ORIGINALS .....	58

- 6.1 Rodrigo MJ, Vendrell M, Cruz MJ, Miravittles M, Pascual C, Morell F, De Gracia J. Utility of the antibody response to a conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine for diagnosis of primary humoral immunodeficiency. **Am J Respir Crit Care Med** 2000;162:1462-1465.  
(Factor d'impacte: 6,57 segons ISI del 2002)
- 6.2 Vendrell M, de Gracia J, Rodrigo MJ, Cruz MJ, Alvarez A, Garcia M, Miravittles M, Morell F. Antibody production deficiency with normal IgG levels in bronchiectasis of unknown etiology. **Chest** ( en premsa).  
(Factor d'impacte: 2,97 segons ISI del 2002)
- 6.3 De Gracia, Vendrell M, Álvarez A, Pallisa E, Rodrigo MJ, de la Rosa D, Mata F, Andreu J, Morell F. Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with common variable immunodeficiency. **Int Immunopharmacol** 2004 ;4(6) :745-53.  
(Factor d'impacte: 1,65 segons ISI del 2002)

# 1. Introducció

Les immunodeficiències primàries es caracteritzen per defectes en el desenvolupament i la maduració del sistema immunològic que incrementen la susceptibilitat a presentar infeccions. Són malalties poc freqüents i poc conegudes que han estat durant molts anys infradiagnosticades o amb un retard considerable en el seu diagnòstic. Encara que en algunes immunodeficiències s'ha pogut determinar una causa genètica, en la majoria la causa roman desconeguda. La constitució d'un registre espanyol d'immunodeficiències primàries (REDIP) ha contribuït a un millor coneixement d'aquestes malalties en el nostre entorn, però en l'actualitat encara continuen sent infradiagnosticades<sup>1</sup>.

Les immunodeficiències primàries més freqüents són les immunodeficiències predominantment d'anticossos<sup>1,2</sup> (taula 1).

---

Taula 1. Clasificació de les immunodeficiències primàries predominantment d'anticossos<sup>2</sup> :

1. Agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X
  2. Agammaglobulinèmia autosòmica recessiva
  3. Deleccions del gen de les cadenes pesades de les immunoglobulines
  4. Dèficit de cadena  $\kappa$
  5. Dèficit selectiu de Ig:
    - a. Dèficit subclasses IgG
    - b. Dèficit IgA
  6. Dèficit d'anticossos amb immunoglobulines normals o elevades
  7. Immunodeficiència comuna variable
  8. Hipogammaglobulinèmia transitòria de la infància
  9. Deficiència de citidina deaminasa d'activació induïda (AID)
-

Els anticossos són components essencials de les defenses de l'hoste. Els anticossos isotípus IgG recobreixen els microorganismes, s'uneixen als receptors Fc presents en la membrana dels polimorfonuclears i els macròfags, i en faciliten la fagocitosi. Els anticossos són efectius contra els patògens extracel·lulars com l'*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* i els virus, abans que la infecció intracel·lular tingui lloc.

La IgM, IgG i la IgA són les tres classes d'immunoglobulines principals i cadascuna d'elles té unes propietats especials en la defensa de l'hoste. La IgM és la primera immunoglobulina que es desenvolupa, per la seva mida més gran només es troba en l'espai vascular i representa la producció d'anticossos inicial en la resposta immunològica primària a un nou antigen. La IgG és la immunoglobulina present en major quantitat en l'espai intravascular i extravascular, és important en la resposta d'anticossos secundària, de la memòria immunològica i de la protecció a llarg termini contra les infeccions. La IgG està formada per 4 subclasses que es diferencien en la seva estructura, concentració i funció (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>). La IgA és la immunoglobulina present en les secrecions, principalment del tracte gastrointestinal i respiratori; la seva funció principal és prevenir l'entrada d'antígens a través de les superfícies mucoses.<sup>3</sup>

### **1.1 Avaluació de la immunitat humoral.**

L'espectre de les immunodeficiències primàries predominantment d'anticossos va des de dèficits en la capacitat de produir totes les immunoglobulines, a dèficits selectius de producció d'anticossos específics contra antígens determinats que cursen amb nivells d'immunoglobulines normals. Quan el dèficit afecta la producció de gran part de les immunoglobulines és més fàcil sospitar-lo i fer el diagnòstic, però quan el dèficit és més selectiu el diagnòstic és més difícil i és necessiten proves més específiques.



Quan una història clínica detallada ens fa sospitar la possibilitat d'una immunodeficiència primària predominantment d'anticossos, disposem de diferents proves de laboratori per estudiar-ho:

- Proteinograma: una disminució en la banda gamma del proteïnograma ens pot ajudar a sospitar una hipogammaglobulinèmia.
- Quantificació de les immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE en sèrum. No es pot utilitzar com a únic criteri per diagnosticar una immunodeficiència primària perquè les immunoglobulines poden estar disminuïdes per un increment en la pèrdua o en el catabolisme <sup>2</sup>.
- Quantificació de les subclasses IgG en sèrum: per la homologia en la seva estructura han de quantificar-se en laboratoris que utilitzin tècniques de mesura sensibles i específiques i que disposin d'uns valors de referència establerts. Un mínim de dues determinacions son necessàries abans de confirmar el dèficit quantitatiu. Nivells baixos han estat descrits en individus sans <sup>4</sup>.
- Determinació de la capacitat de produir anticossos específics: es pot determinar la capacitat de producció d'anticossos davant d'antígens proteics o antígens polisacàrids.
- Quantificació dels limfòcits B i T en sang perifèrica. L'absència de limfòcits B pot ser un indicatiu d'agammaglobulinèmia.
- Avaluació de les subpoblacions limfocitàries i de la funció limfocitària.
- Estudi de defectes genètics i moleculars.

## **1.2 Immunodeficiències predominantment d'anticossos.**

De les immunodeficiències primàries predominantment d'anticossos, especialment la immunodeficiència comuna variable (ICV), el dèficit de AID, el dèficit d'IgA, el dèficit de subclasses d'IgG i el dèficit d'anticossos amb immunoglobulines normals poden manifestar-

se en l'edat adulta com infeccions respiratòries de repetició generalment per gèrmen capsulats. No obstant, aquests pacients poden presentar altres infeccions (otitis, sinusitis, sepsis, meningitis, infeccions gastrointestinals,...), quadres de malabsorció, malalties autoimmunes, i una incidència superior de neoplàsies. L'evolució natural de les formes més greus d'aquestes immunodeficiències primàries és cap a l'aparició de lesions cròniques pulmonars, especialment bronquièctasis, que condicionen el pronòstic de la malaltia per l'evolució a la insuficiència respiratòria, que és la causa de mort més freqüent <sup>5,6</sup>. Un diagnòstic precoç és molt important perquè en la majoria dels casos es pot indicar un tractament amb gammaglobulines que redueix el número d'infeccions, redueix el risc d'aparició de lesions cròniques i millora el pronòstic <sup>5,7,8</sup>.

La ICV es caracteritza per un defecte en la formació d'anticossos que cursa amb disminució dels nivells d'IgG i IgA, i sovint també d'IgM <sup>6</sup>. El dèficit de AID es caracteritza també per un defecte en la formació d'anticossos però amb una producció normal d'IgM; cursa amb nivells normals o elevats d'IgM i nivells baixos d'IgG i IgA <sup>2</sup>. El dèficit d'IgA es defineix per l'absència d'IgA en el sèrum; en la majoria dels casos els pacients romanen asimptomàtics però també poden presentar clínica d'infeccions, especialment quan s'associen a nivells baixos de subclasses d'IgG <sup>9,10</sup>. El dèficit de subclasses d'IgG es defineix per la presència de nivells baixos d'una o més de les subclasses de la IgG. El dèficit de subclasse relacionat amb una major susceptibilitat a la infecció és el de IgG<sub>2</sub>, el qual s'associa sovint amb una incapacitat de produir anticossos específics contra antígens polisacàrids<sup>2</sup>. Encara que la determinació de les immunoglobulines i subclasses ajudan en el diagnòstic d'aquestes immunodeficiències, és insuficient per establir un diagnòstic definitiu ja que nivells baixos d'immunoglobulines i subclasses IgG poden trobar-se en individus sans <sup>4</sup> o quan hi ha un increment en la pèrdua o en el seu consum<sup>2</sup>. És necessari, per tant, demostrar que s'acompanyen d'un defecte en la producció d'anticossos, especialment contra antígens

polisacàrids, com la vacuna del pneumococ o de l'*H.influenzae* tipus b (Hib), per confirmar el diagnòstic i poder valorar la indicació d'un tractament amb gammaglobulines <sup>2</sup>.

El dèficit d'anticossos amb immunoglobulines normals o elevades es caracteritza per un defecte en la producció d'anticossos contra antígens específics (generalment polisacàrids), és d'etiologia desconeguda i s'ha descrit en pacients amb infeccions respiratòries de repetició<sup>11,12,13</sup>. No hi ha dades suficients que permetin conèixer la incidència d'aquesta immunodeficiència; la manca de valors de referència de la resposta d'anticossos contra aquest antígens en adults, i d'un criteri de resposta a les vacunes consensuat, en dificulta la interpretació i molt probablement estigui infradiagnosticada.

Simultàniament a l'inici d'aquesta tesi es va estandarditzar una tècnica d'enzimoinmunoanàlisi (ELISA) per quantificar la IgG específica antipneumococ i les seves subclasses. Es va estudiar la producció d'anticossos contra la vacuna polisacàrida del pneumococ en una població de 40 voluntaris adults sans (20 dones i 20 homes, 21-48 anys, edat mitjana 29,5 anys) i es va establir un criteri de resposta normal a la vacuna. El criteri de resposta normal a la vacuna es va definir com l'increment mínim d'un valor arbitrari. Aquest valor corresponia al límit inferior de l'interval de probabilitat del 90% dues cues, dels nivells d'anticossos específics post-immunització de la població sana. El valor d'anticossos específics mínim a incrementar per considerar un individu responent va ser de 395 U/ml per la IgG, 0,350 A<sub>450</sub>U per la IgG<sub>1</sub> i 0,314 A<sub>450</sub>U per la IgG<sub>2</sub>. Els resultats d'aquest estudi van mostrar que un 20% dels individus sans no va respondre a la vacuna del pneumococ amb la IgG específica i un 10% no va respondre amb cap de les subclasses específiques. Encara que la vacuna del pneumococ és una vacuna polisacàrida i clàssicament s'ha acceptat que la resposta a aquest tipus d'antigen és principalment amb la IgG<sub>2</sub>, el 67,5% dels individus va respondre amb la IgG<sub>1</sub> i un 10% exclusivament amb aquesta subclasse; per contra un 72,5% va respondre amb la IgG<sub>2</sub> però cap no ho va fer exclusivament amb aquesta subclasse <sup>14</sup>.

Per un altra banda, estudis publicats mostraven que en alguns casos un defecte en la producció d'anticossos a vacunes polisacàrides podia ser solventat amb l'administració de vacunes polisacàrides conjugades a una proteïna<sup>15,16,17,18,19,20</sup>.

Tot això va fer que ens plantegéssim com havíem d'interpretar una manca de resposta a la vacuna del pneumococ, com havíem de fer el diagnòstic de dèficit de producció d'anticossos, i quan havíem d'indicar-ne l'estudi.

Els objectius del primer treball d'aquesta tesi doctoral van ser estudiar la resposta de producció d'anticossos contra un altre antigen polisacàrid, l'Hib, però conjugat a una proteïna; establir el criteri de resposta a aquest antigen en la població sana; i valorar si l'estudi simultani de la producció d'anticossos contra antigens polisacàrids de l'Hib i del pneumococ permetia diferenciar la població normal de la d'immunodeficiències primàries. Per això es van estudiar 59 voluntaris sans i 22 pacients amb immunodeficiències primàries humorals conegudes ( 18 ICV, 2 immunodeficiències amb timoma, 2 agammaglobulinèmies lligades al cromosoma X).

### **1.3 Bronquièctasis**

Les bronquièctasis són l'estadi final comú a diferents etiologies<sup>21,22</sup>. Durant moltes dècades, l'etiologia infecciosa va ser la més important, però el millor control i tractament de la tuberculosi, les campanyes de vacunació infantil i la disponibilitat d'antibiòtics eficaços han fet que aquesta etiologia hagi disminuït de manera important. Actualment, altres causes extrínseques no infeccioses o altres defectes intrínsecs que predisposen a la inflamació bronquial o a la infecció respiratòria estan assolint més protagonisme. No obstant, malgrat els avenços en el coneixement de la patogènia de les bronquièctasis, en aproximadament el 50% dels casos no es coneix l'etiologia<sup>23,24</sup>.

Per altre part, les bronquièctasis són una complicació freqüent en pacients amb defectes de producció d'anticossos com la agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X i la immunodeficiència comuna variable <sup>2,6,25</sup>. Defectes més selectius de la immunitat humoral com el dèficit de subclasses de la IgG, han estat associats a bronquièctasis amb una prevalença variable depenent del criteri de selecció de la població d'estudi, dels valors de referència utilitzats i de la tècnica de quantificació utilitzada <sup>26,27,28</sup>. En la nostra experiència, un 48% dels pacients amb bronquièctasis d'etiologia desconeguda tenia associat nivells baixos d'una o més subclasses d'IgG, sent el de IgG2 el més freqüent <sup>26</sup>.

Per investigar si un dèficit d'anticossos amb nivells normals d'IgG podia estar associat a bronquièctasis, en el segon treball d'aquesta tesi vam estudiar la resposta de producció d'anticossos específics contra la vacuna polisacàrida del pneumococ i la conjugada de l'Hib en pacients amb bronquièctasis valorats ambulatoriament en un període de 7 anys, en els quals s'havia descartat de manera acurada una causa coneguda.

#### **1.4 Tractament amb immunoglobulines.**

El tractament amb immunoglobulines per via endovenosa disminueix la incidència i la gravetat de les infeccions en pacients afectes d'hipogammaglobulinèmia primària <sup>2,5,7,8,29,30,31,32,33,34</sup>. La seva indicació està ben establerta<sup>2</sup> però encara hi ha controvèrsies respecte a quina és la dosi més eficaç, a la periodicitat de l'administració i als paràmetres a considerar per avaluar-ne l'eficàcia. La majoria dels estudis avaluen només el control de les infeccions amb diferents dosis obtenint resultats diferents. Dosis de 400-600mg/Kg/mes no s'han mostrat més eficaces que dosis de 100-200mg/Kg/mes en el control de les infeccions en alguns estudis<sup>8,31,32</sup>, però sí en d'altres <sup>33,34</sup>.

Pocs estudis han avaluat de manera prospectiva l'eficàcia del tractament en relació a la progressió de l'afectació pulmonar. Roifman i Col <sup>8</sup> van mostrar que, durant un període de 6

mesos, una dosi d'immunoglobulines de 600mg/Kg/mes va ser més efectiva que 200mg/Kg/mes per prevenir la disminució de la funció pulmonar en pacients amb hipogammaglobulinemia i malaltia pulmonar crònica, encara que no hi va haver diferències significatives en el número d'infeccions. Més recentment, amb la tomografia computoritzada d'alta resolució (TACAR) del tòrax s'ha observat que l'afectació pulmonar pot progressar, fins i tot en pacients asimptomàtics i sense canvis en els valors de l'espirometria <sup>35,36</sup>.

L'objectiu del tercer treball d'aquesta tesi doctoral va ser valorar de manera prospectiva l'evolució de l'afectació pulmonar de pacients adults diagnosticats d'ICV que van iniciar tractament amb immunoglobulines amb dosis necessàries per mantenir uns nivells residuals estables d'IgG superiors a 600mg/dl, durant un període de 2 anys.

## 2. Objectius de l'estudi

Els objectius d'aquesta tesi van ser:

1. Estandarditzar una tècnica d'ELISA per mesurar els anticossos específics sèrics contra l'Hib.
2. Establir els valors de referència de la producció d'anticossos específics contra l'Hib en la població sana.
3. Calcular el valor mínim d'anticossos específics a incrementar per considerar una resposta a la vacuna de l'Hib adequada.
4. Avaluar la utilitat de la vacuna conjugada de l'Hib juntament amb la polisacàrida del pneumococ, per establir el diagnòstic de dèficit de producció d'anticossos.
5. Estudiar si un dèficit de producció d'anticossos amb IgG normal pot estar associat a bronquièctasis d'etiologia no coneguda.
6. Valorar de manera prospectiva l'eficàcia del tractament amb immunoglobulines, per via endovenosa a les dosis necessàries per mantenir nivells residuals estables d'IgG superiors a 600mg/dl, en el control de l'afectació pulmonar de pacients diagnosticats de ICV.
7. Valorar els paràmetres òptims per monitoritzar l'afectació pulmonar en aquests pacients.
8. Analitzar les diferències entre els pacients en tractament amb immunoglobulines amb malaltia pulmonar crònica i sense.

### **3. Resum dels resultats i discussió**

#### **3.1. Estandardització d'una tècnica d'ELISA per mesurar els anticossos específics sèrics contra l'Hib.**

La quantificació de la IgG específica contra l'Hib i les seves subclasses es va realitzar per una tècnica d'ELISA basada en el mètode descrit per Metzger<sup>37</sup> i col.laboradors modificat<sup>14</sup>, utilitzant com antígens oligosacàrids de l'Hib conjugats a albúmina sèrica humana (HboHA). Els resultats es van expressar en  $\mu\text{g/ml}$  segons un estàndard de referència de la FDA ( preparat a partir d'un pool de plasma humà) amb una concentració d'IgG total específica de  $70 \mu\text{g/ml}$ , d'IgG<sub>1</sub> de  $30,9 \mu\text{g/ml}$  i d'IgG<sub>2</sub> de  $16,1 \mu\text{g/ml}$ . En l'actualitat hi ha kits comercials que permeten quantificar els anticossos específics contra l'Hib, no obstant és aconsellable que cada laboratori estableixi els seus propis valors de referència ja que hi ha moltes variables tècniques<sup>38,39</sup> i genètiques que poden influir en els resultats.

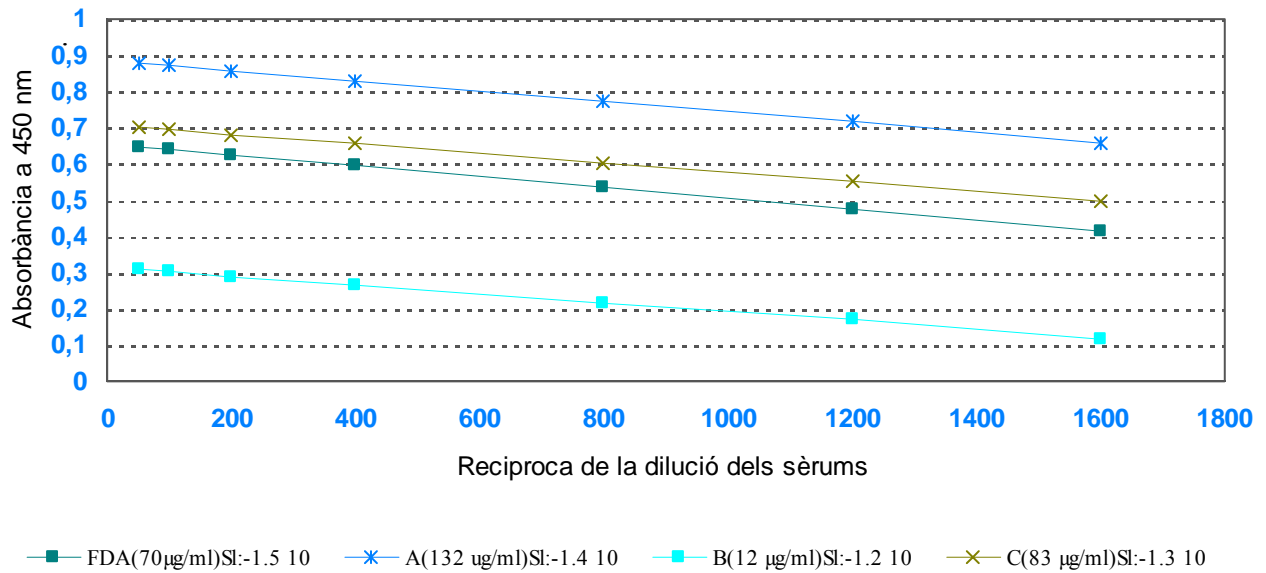
##### 3.1.1 Linealitat de la tècnica d'ELISA.

Per demostrar que tant el sèrum de referència com els sèrums a diferents concentracions es comportaven de la mateixa manera, es van realitzar dilucions seriades de diversos sèrums amb concentracions diferents d'anticossos específics i del sèrum de referència. Es van fer rectes de regressió dels resultats obtinguts, expressant en l'eix de la Y els valors de DO obtinguts i en el de la X l'invers de la dilució. El comportament dels sèrums a diferents concentracions va ser similar al sèrum de referència tant per la IgG, IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub> específiques (fig 1). No es van observar diferències significatives en els pendents de les línies per l'anàlisi de la covariància (ANCOVA).

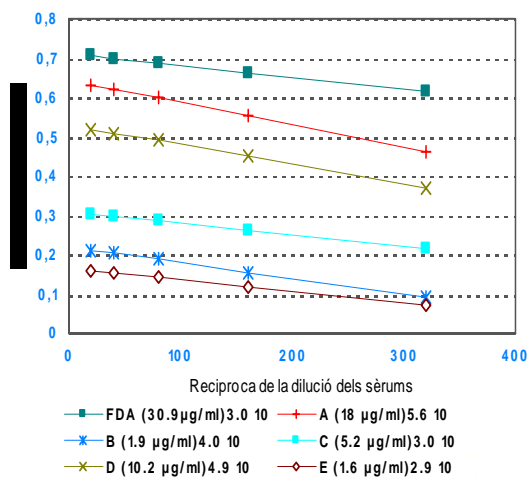


Figura 1. Línies de regressió per mostres de sèrum amb concentracions diferents de IgG (1a), IgG<sub>1</sub> (1b) i IgG<sub>2</sub> (1c) específiques i el sèrum de referència.

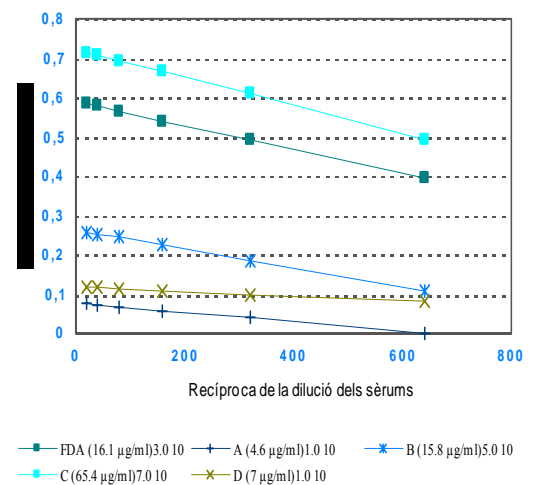
1a



1b



1c



### 3.1.2 Especificitat de la tècnica.

Per demostrar l'especificitat de la tècnica es van realitzar els següents experiments:

#### a) Experiments d'absorció amb el PRP, Hbo-HA i l'albumina humana:

Per comprovar que els anticossos mesurats eren específics contra l'Hib es va incubar un pool de sèrums post-vacuna ( amb una concentració d'IgG específica de 86,7 µg/ml) a una dilució 1/50 amb concentracions creixents de Hbo-HA (polisacàrid conjugat amb albumina humana), PRP (polisacàrid de l'Hib) i albumina humana durant 1 hora a 30°C; es va centrifugar a 3.000 rpm durant 15 minuts; en el sobrenedant es va repetir la determinació d'IgG específica per triplicat. En centrifugar el sèrum, els anticossos específics que s'han unit l'antigen es dipositen en el fons del tub i en el sobrenedant la concentració d'anticossos anti-Hib va disminuint a mesura que s'augmenta la concentració d'antigen amb què incubem el sèrum.

En la figura 2 es mostra que en els sèrums incubats amb PRP i Hbo-HA l'absorbància disminueix a mesura que s'augmenta la concentració d'antigen, però no en els incubats amb albumina humana. Això demostra que els anticossos mesurats són específics contra el polisacàrid i que l'albumina humana no interfereix en la determinació.

#### b) Reaccions creuades amb *S.pneumoniae*:

Per comprovar que tampoc hi havia reaccions creuades amb altres antigens polisacàrids es va realitzar l'experiment anterior incubant el pool de sèrums amb PRP i amb antigen polisacàrid del *S.pneumoniae*. L'experiment es va fer amb sèrums amb dues concentracions (86,7 µg/ml i 7,2 µg/ml). En la figura 3 es mostra el descens de l'absorbància en incubar amb PRP però no amb l'extracte antigènic del *S.pneumoniae*.

Figura 2. Efecte de l'absorció amb: PRP, Hbo-HA, i albúmina humana.

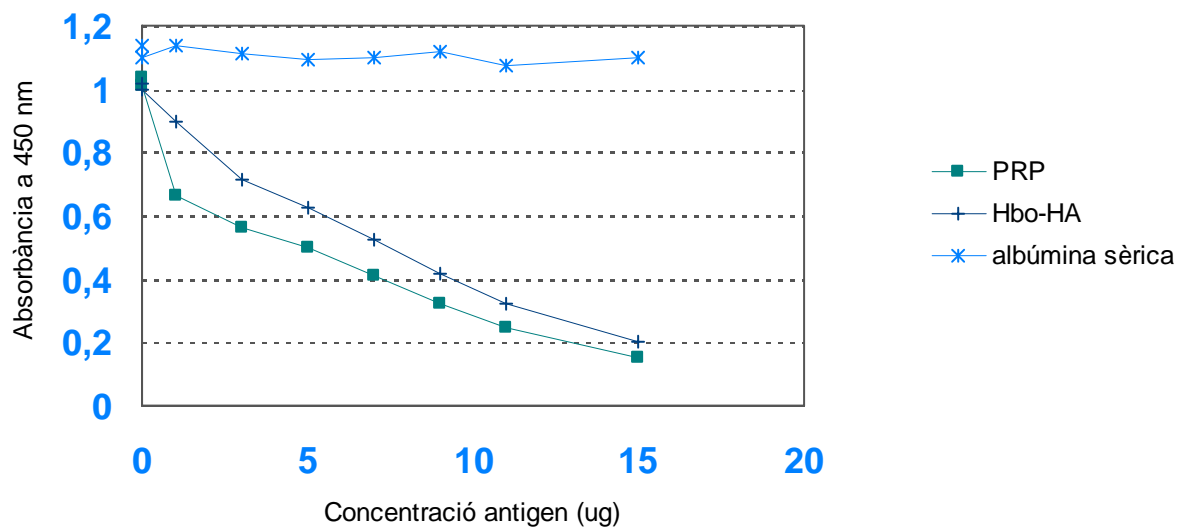
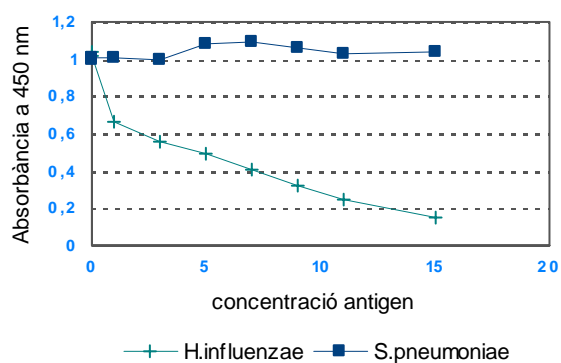
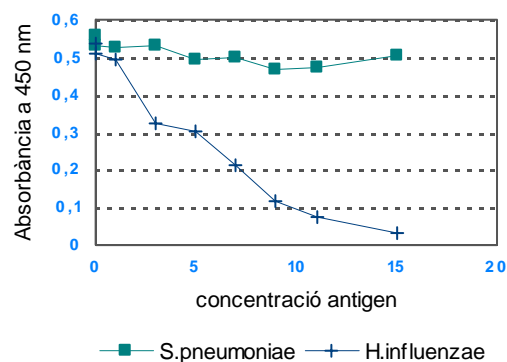


Figura 3. Absència de reaccions creuades entre els anticossos anti *H.influenzae* i anti *S.pneumoniae*.



Pool de sèrum amb IgG específica de 86.7 µg/ml

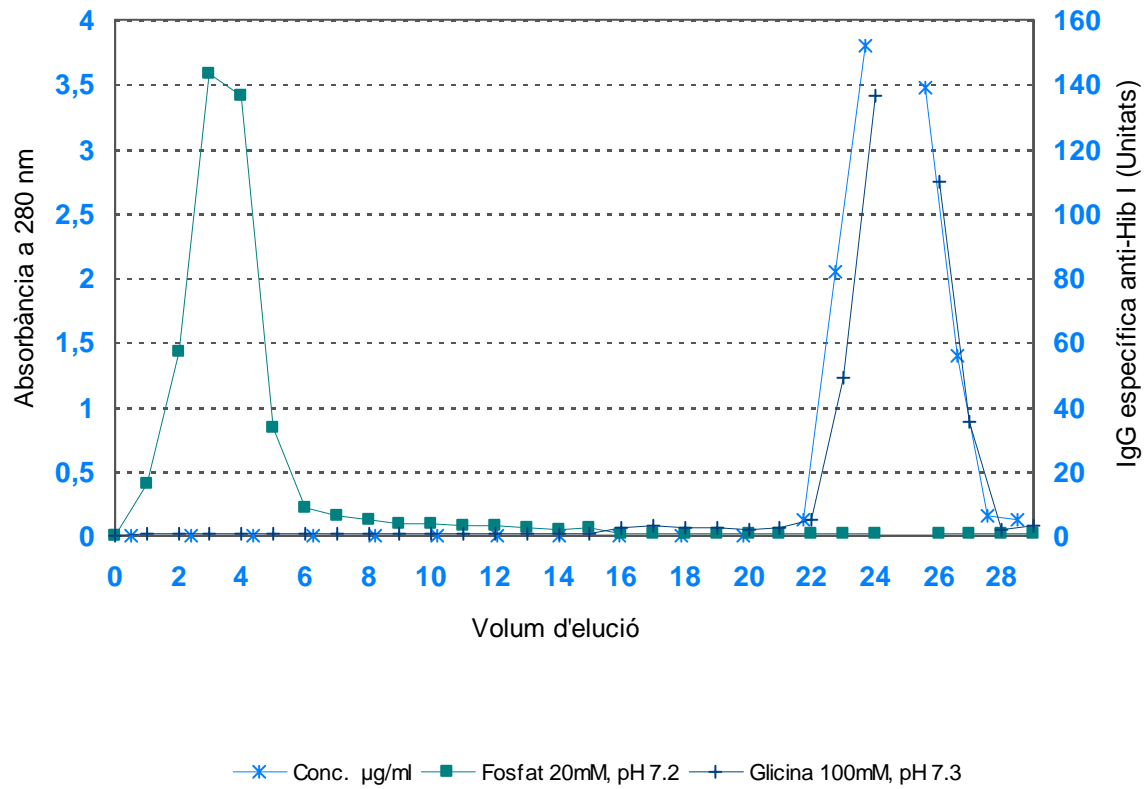


Pool de sèrum amb IgG específica de 7.2 µg/ml

c) Anticossos específics de classe IgG.

Per demostrar que les immunoglobulines IgA i IgM no interfereixen en la valoració dels anticossos específics de classe IgG, es va obtenir una preparació enriquida d'IgG mitjançant la cromatografia d'afinitat amb sefarosa CL-4B amb proteïna A (Pharmacia, Diagnostics). La proteïna A és una proteïna bacteriana del *Staphylococcus* que s'uneix específicament a la regió Fc dels anticossos IgG policlonals i monoclonals; s'utilitza per la purificació d'anticossos de classe IgG i les seves subclasses. La columna de 5 ml es va equilibrar amb tampó fosfat 20mM, pH 7,2. Un pool de mostres post-vacuna de 5 sèrums normals (IgG 932 mg/dl, IgA 212 mg/dl, IgM 136 mg/dl, IgG<sub>1</sub> 588 mg/dl, IgG<sub>2</sub> 492 mg/dl, IgG<sub>3</sub> 98 mg/dl, IgG<sub>4</sub> 72 mg/dl i IgG específica contra l'Hib de 278 µg/ml) va ser carregat a la columna i rentat amb el tampó d'equilibri. Les proteïnes unides al fons van ser separades amb un tampó glicina 100mM, pH3. Es van obtenir dos eluits formats cadascun per les alíquotes amb lectures superiors a 0,200 de DO a 280 nm. En els dos es va determinar les immunoglobulines, les subclasses d'IgG i la IgG específica contra l'Hib. En la figura 4 es mostra el patró d'elució obtingut amb la cromatografia d'afinitat. En el primer pic, que correspon a les fraccions amb un volum d'elució entre 1 i 9 ml, es van obtenir els següents resultats: IgG 33 mg/dl, IgA 105 mg/dl, IgM 30 mg/dl, IgG<sub>1</sub> <5 mg/dl, IgG<sub>2</sub> <5 mg/dl, IgG<sub>3</sub> 20 mg/dl, IgG<sub>4</sub> <5 mg/dl, IgG específica contra l'Hib <0,027 µg/ml. En el segon pic, que correspon a les fraccions amb un volum d'elució d'entre 20 i 28 ml, es van obtenir els següents resultats: IgG 630 mg/dl, IgA 7 mg/dl, IgM 20 mg/dl, IgG<sub>1</sub> 360 mg/dl, IgG<sub>2</sub> 250 mg/dl, IgG<sub>3</sub> <5 mg/dl, IgG<sub>4</sub> 35 mg/dl, IgG específica contra l'Hib 193,8 µg/ml.

Figura 4. Patrons d'elució obtinguts amb la cromatografia d'afinitat.



### 3.2. Valors de referència de la producció d'anticossos específics contra l'Hib en la població sana.

La resposta de producció d'anticossos específics contra l'Hib es va estudiar en 59 voluntaris sans adults (30 dones, edat 20-59 anys, edat mitjana 32 anys). Cap d'ells no tenia antecedents d'infeccions greus, d'immunodeficiència secundària, malalties autoimmunes o altres malalties o tractaments que podien afectar la producció d'anticossos específics. Tampoc tenien evidència d'infecció durant el mes previ a la vacunació. Tots tenien nivells d'immunoglobulines i subclasses d'IgG normals en el sèrum. L'espirometria, hemograma, funció renal i hepàtica eren normals. Es va fer una determinació d'anticossos específics basals i una altra als 21 dies d'administrar la vacuna conjugada de l'Hib (IgG, IgG1 i IgG2 específiques). Donat que els nivells d'anticossos no seguien una distribució normal es va fer una transformació logarítmica i es van expressar com la mitjana i l'interval de confiança del 95%. Els valors obtinguts es mostren en la taula 2.

---

Taula 2. Concentració sèrica d'anticossos específics contra l'*Haemophilus influenzae* tipus b en la població adulta sana.

Ig	n	Prevacuna*	Postvacuna*	Diferència*
IgG	59	2,2 (1,7-2,8)	15 (11-21)	11 (7,9-16)
IgG <sub>1</sub>	59	0,8 (0,60-1,0)	4,7 (3,5-6,3)	2,8 (1,8-4,2)
IgG <sub>2</sub>	59	0,8 (0,6-1,1)	4,7 (3,1-7,2)	2,2 (1,2-4,2)

\* Dades expressades com mitjana (95%IC) µg/ml

---

Els nivells basals d'anticossos específics contra l'Hib i la producció després de la vacunació en adults sans mostren una gran variabilitat. La comparació amb altres estudis és difícil per diferències en la població estudiada, en el tipus de vacuna utilitzada, i en la metodologia de la mesura. La majoria d'estudis s'han fet en població infantil <sup>40</sup>, la qual pot presentar un retard fisiològic en la maduració de la resposta d'anticossos o tenir una exposició menor prèvia a l'antigen. En els estudis previs s'han utilitzat vacunes polisacàrides i vacunes conjugades, amb diferents concentracions de polisacàrid <sup>41,42,43,44,45</sup>. El polisacàrid de la vacuna es va conjuguar amb una proteïna per convertir-lo en un antigen timus-depenent amb l'objectiu d'estimular la resposta d'anticossos en nens menors de dos anys. La vacuna conjugada induïx una resposta d'anticossos superior a la no conjugada en adults <sup>42,46</sup> però no està clar si manté les característiques de la resposta polisacàrida. En aquest sentit en l'estudi de Mäkelä <sup>43</sup> es mostra que els anticossos induïts per la vacuna conjugada en adults tenen la mateixa composició de subclasses de la IgG que els induïts per la vacuna polisacàrida. A més a més, encara que la resposta de la IgG als antigens polisacàrids en adults ha estat descrita principalment com IgG<sub>2</sub> <sup>47,48</sup>, estudis posteriors indiquen que tant la IgG<sub>1</sub> com la IgG<sub>2</sub> contribueixen a la resposta d'anticossos <sup>14,42,46,49,50</sup>, sent la IgG<sub>1</sub> en ocasions l'isotip predominant <sup>14,46,51</sup>.

### **3.3. Criteri de resposta a la vacuna de l'Hib.**

Per calcular el valor mínim d'anticossos específics a incrementar per considerar una resposta a la vacuna de l'Hib adequada, es va aplicar el mateix criteri que amb la vacuna del Pneumococ<sup>14</sup>. Es va calcular l'interval de probabilitat del 90% dues cues de la IgG, IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub> específica postimmunització de la població sana. Aquest valor va ser de 2,28 µg/ml per la IgG, 0,74 µg/ml per la IgG<sub>1</sub> i 0,34 µg/ml per la IgG<sub>2</sub>. Els individus amb un increment en el nivell d'anticossos específics igual o superior a aquests valors van ser considerats

responedors. Aquest valor correspon a la concentració mínima dels anticossos específics postimmunització assolits per el 95% de la població sana.

El criteri de resposta a les vacunes no ha estat ben definit i per tant el dèficit de producció d'anticossos es pot infradiagnosticar o sobrediagnosticar. El criteri utilitzat per molts autors<sup>40,41</sup> de multiplicar un número de vegades un valor basal (duplicar, triplicar, etc) pot ser enganyós, perquè depèn de la concentració d'anticossos abans de la immunització, i per tant es necessita un increment superior en individus amb nivells elevats d'anticossos preimmunització que en aquells amb nivells inferiors. El criteri de resposta utilitzat en aquest estudi no està influenciat pels nivells d'anticossos preimmunització, pot ser utilitzat en l'estudi de la resposta a diferents vacunes<sup>14</sup> i permet comparar diferents poblacions.

### 3.4. Utilitat de la vacuna conjugada de l'Hib juntament amb la polisacàrida del pneumococ per establir el diagnòstic de dèficit de producció d'anticossos.

#### a) Resposta d'anticossos a la vacuna de l'Hib:

El 85% de la població sana va respondre amb la IgG específica, però el 3,4 % no va respondre ni amb la IgG específica ni amb les subclasses específiques (figura 5).

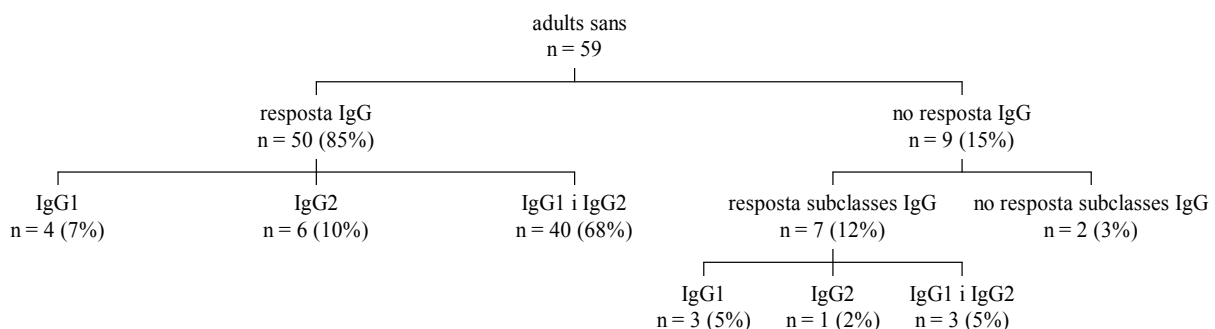


Fig 5. Distribució de la resposta d'anticossos IgG, IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub> contra l'*Haemophilus influenzae* en la població sana.



D'altra banda, cap dels 22 pacients amb immunodeficiències primàries va respondre amb la IgG específica. Les concentracions d'anticossos específics en aquests pacients van ser significativament inferiors a la de la població sana (taula 3).

b) Resposta d'anticossos a la vacuna del pneumococ:

Dels 20 individus sans que van rebre també la vacuna del pneumococ, cinc (25%) no van respondre amb la IgG específica. Cap dels 9 pacients amb immunodeficiències primàries va respondre amb la IgG específica.

c) Resposta d'anticossos a les dues vacunes:

Els 20 adults sans que van rebre les dues vacunes van respondre al menys a una d'elles amb la IgG específica. Però cap dels pacients amb immunodeficiències primàries que va rebre les dues vacunes no va respondre a cap d'elles.

Els resultats d'aquest estudi mostren que no tots els adults sans responen a una vacuna, inclòs quan s'estudia la resposta de les subclasses de la IgG específica, però la possibilitat de no respondre a dues vacunes es redueix considerablement. En canvi, cap dels pacients amb immunodeficiències primàries humorals estudiats no va respondre a cap vacuna. Aquests resultats suggereixen que la utilització d'una sola vacuna polisacàrida com a prova diagnòstica d'un defecte de la producció d'anticossos pot ser insuficient. Per una altra banda, estudis previs mostren que la manca de resposta a una vacuna polisacàrida pot ser solventada amb l'administració d'una vacuna polisacàrida conjugada amb una proteïna <sup>15,16,17,18,19,20,52</sup>. Per tant, l'avaluació conjunta de la resposta immunològica contra una vacuna polisacàrida i una vacuna conjugada permetria completar l'estudi i identificar els veritables no responedors, que serien en els que s'hauria de plantejar la indicació d'un tractament amb gammaglobulines.

Taula 3. Concentracions sèriques d'anticossos específics contra l'Hib i el *S.pneumoniae* en la població sana i en els pacients amb immunodeficiències humorals\*

	<b>Població sana</b>	<b>Immunodeficiències</b>	<b>P</b>
Anticossos anti Hib	(n = 59)	(n = 22)	
IgG total			
Preimmunització (µg/ml)	2.2 (1.7-2.8)	0.8 (0.5-1.4)	<0.0001
Postimmunització (µg/ml)	15 (11-21)	0.7 (0.4-1.3)	<0.0001
Diferència (µg/ml)	11 (7.9-16)	0.3 (0.2-0.4)	<0.0001
Increment	5.0 (3.5-7.0)	1.1 (0.6-1.5)	<0.0001
IgG1			
Preimmunització (µg/ml)	0.8 (0.6-1.0)		
Postimmunització (µg/ml)	4.7 (3.5-6.3)		
Diferència (µg/ml)	2.8 (1.8-4.2)		
Increment	3.7 (2.5-5.6)		
IgG2			
Preimmunització (µg/ml)	0.8 (0.6-1.1)		
Postimmunització (µg/ml)	4.7 (3.1-7.2)		
Diferència (µg/ml)	2.2 (1.2-4.2)		
Increment	6.6 (3.6-1.3)		
Anticossos anti <i>S. Pneumoniae</i>	(n = 20)	(n = 9)	
IgG total			
Preimmunització (unitats/ml)	657 (456-858)	254 (105-402)	< 0.16
Postimmunització (unitats/ml)	2,606 (1,425-3,786)	217 (65-369)	< 0.0001
Diferència (unitats/ml)	1,949 (873-3,025)	-37(-146-71)	< 0.0001
Increment	4.7 (2.7-6.6)	0.9 (0.6-1.2)	< 0.0001

\*Dades expressades com mitjana (95% IC)

### **3.5. Estudi de la producció d'anticossos específics en pacients amb bronquièctasis d'etiologia no coneguda.**

Des de Gener del 1994 fins l'octubre del 2001 es van estudiar de manera consecutiva tots els pacients amb bronquièctasis valorats en una consulta especialitzada. En tots ells es va investigar de manera acurada la causa de les bronquièctasis. Es van excloure els pacients que tenien alguna causa coneguda: història de tuberculosi pulmonar, aspiració, inhalació de tòxics o irritants, abcés pulmonar, infeccions a la infantesa amb afectació pulmonar (tos ferina, xarrampió); evidència de fibrosi quística ( prova de la suor i estudi genètic<sup>53</sup>), aspergil·lasi broncopulmonar al·lèrgica, dèficit d'alfa 1 antitripsina, síndrome de Kartagener, síndrome de Young, alteracions congènites respiratòries, obstrucció bronquial, hipogammaglobulinèmia, immunodeficiències secundàries, qualsevol malaltia o ingesta de fàrmacs que poden afectar la producció d'anticossos, o altres malalties sistèmiques associades a bronquièctasis ( malaltia inflamatòria intestinal, artritis reumatoide,...). Tots els pacients seleccionats van rebre la vacuna polisacàrida del pneumococ i la conjugada de l'Hib. Els resultats es van comparar amb el grup control. El dèficit de producció d'anticossos es va definir com la manca de resposta a les dues vacunes.

Durant el període d'estudi es van seleccionar 173 pacients amb bronquièctasis d'etiologia no coneguda. Seixanta sis pacients va ser exclosos per immunització prèvia a les vacunes, dades insuficients o negativa a participar (46 dones, edat 15-82 anys, edat mitjana 44,4 anys). Cent set pacients van ser finalment inclosos en l'estudi ( 63 dones, edat 16-77 anys, edat mitjana 46,3 anys).

Dotze dels 107 pacients (11%) no van respondre a cap de les vacunes i es van diagnosticar d'un dèficit de producció d'anticossos específics. Els pacients amb dèficit de producció d'anticossos van presentar de manera significativa una major incidència d'otitis mitjana, nivells baixos de IgG<sub>2</sub> i nivells basals d'anticossos contra el pneumococ i l'Hib

inferiors. No es van trobar diferències significatives entre els pacients amb dèficit i sense en la resta de paràmetres clínics, immunològics, microbiològics i de funció pulmonar (taula 4 i 5).

Els pacients amb història d'otitis mitjana tenien una probabilitat de tenir un dèficit de producció d'anticossos superior. Això suggereix la presència d'una predisposició sistèmica a la infecció i no només a nivell respiratori, ja que aquesta infecció es freqüent en pacients amb hipogammaglobulinèmia primària<sup>6,25</sup> però no en pacients amb bronquièctasis causades per una alteració o un defecte a nivell del tracte respiratori. D'altra banda, no es van observar diferències en la incidència d'altres infeccions que són freqüents en pacients amb hipogammaglobulinèmia com sinusitis, infeccions respiratòries de repetició o pneumònies de repetició, probablement perquè els pacients amb bronquièctasis poden tenir una predisposició a les infeccions en tot el tracte respiratori independentment de la seva etiologia<sup>54</sup>.

La probabilitat de tenir un dèficit de producció d'anticossos era superior quan, a més de tenir una història d'otitis mitjana, tenien uns nivells baixos de IgG<sub>2</sub>. Els nivells baixos de IgG<sub>2</sub> s'han relacionat amb un increment en la susceptibilitat a la infecció i sovint s'associa amb una incapacitat de produir anticossos contra antígens polisacàrids<sup>2</sup>. En aquest estudi el 50% dels pacients amb dèficit de producció d'anticossos tenien nivells baixos de IgG<sub>2</sub>, però no tots els pacients amb nivells baixos de IgG<sub>2</sub> tenien un dèficit de producció d'anticossos, com ja havia estat observat prèviament en la població sana<sup>4</sup> (taula 6). Això probablement en part és perquè la resposta de la IgG als antígens polisacàrids no es limita a la IgG<sub>2</sub>, sinó que també pot ser amb la IgG<sub>1</sub><sup>14,43,46</sup>. A més a més, en aquest estudi no vam observar una bona correlació entre les nivells de IgG<sub>2</sub> i la producció d'anticossos contra antígens polisacàrids. Per tant, encara que els pacients amb nivells baixos de IgG<sub>2</sub> tenen una probabilitat superior de tenir un dèficit de producció d'anticossos, se'ls ha de realitzar un estudi de la producció d'anticossos abans de poder valorar la indicació d'un tractament amb gammaglobulines. Per un altra banda, la

presència de nivells baixos de IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub> va ser similar en els pacients amb dèficit d'anticossos o sense, i el seu paper en la predisposició a la infecció no està clar<sup>55</sup>.

Encara que els pacients amb bronquièctasis amb un sistema immunològic normal presenten sovint nivells superiors de IgG, IgA i subclasses de la IgG per un estímul antigènic repetit<sup>26,27,28,56</sup>, no es van observar diferències en els nivells d'anticossos específics contra el pneumococ i l'Hib en pacients amb bronquièctasis sense dèficit de producció d'anticossos i la població sana (taula 7). Probablement això s'explica per la gran variabilitat observada en els nivells basals d'anticossos i en la resposta d'anticossos tant en la població sana com en pacients amb bronquièctasis que probablement està en relació amb el grau d'exposició prèvia dels pacients amb aquests gèrmens. D'altra banda, els nivells d'anticossos específics dels pacients amb dèficit de producció d'anticossos eren similars als observats en els pacients amb immunodeficiències humorals conegudes.

La gran variabilitat en els nivells basals d'anticossos específics i la manca d'una bona correlació entre els nivells pre immunització i post immunització d'anticossos específics observats dificulten la possibilitat d'establir un nivell d'anticossos per sota del qual estaria indicada la vacunació. En aquest treball es va calcular el valor òptim de tall del nivell d'anticossos específics preimmunització que tingués la màxima probabilitat de predir una resposta a la vacuna, aquest valor va ser de 434 U/ml i 2.2 µg/ml per *S.pneumoniae* i Hib, respectivament. Aquests valors són propers al percentil 50 dels nivells d'anticossos específics preimmunització en la població sana per les dues vacunes (575 U/ml i 2.3 µg/ml per *S.pneumoniae* i Hib, respectivament). La sensibilitat del percentil 50 dels nivells d'anticossos específics preimmunització com a valor de tall va ser de 84% per *S.pneumoniae* i 80% per Hib (fig 6 i 7). Per tant, encara que el percentil 25 ha estat utilitzat per altres autors<sup>23</sup>, creiem que el percentil 50 pot ser més adequat.

El percentatge de pacients que no va respondre només a una vacuna (el 19% a la vacuna del pneumococ i el 14% a la vacuna conjugada del Hib) va ser similar a l'observat en la població sana ( el 20% a la vacuna del pneumococ i el 15% a la de l'Hib). Això recolza la idea que la incapacitat de produir anticossos contra una sola vacuna no es suficient per diagnosticar una immunodeficiència humoral.

Els anticossos específics en pacients amb bronquièctasis han estat estudiats en dos treballs previs<sup>23,28</sup>. Els resultats son difícils de comparar per les diferències en la selecció de la població d'estudi, en la indicació de vacunació, en el criteri de resposta a les vacunes i en el criteri diagnòstic d'immunodeficiència humoral. Les diferències es mostren en la taula 8. A diferència dels estudis previs, en aquest treball es van seleccionar pacients amb bronquièctasis en els quals s'havien descartat la majoria de les etiologies conegudes, i aquest va ser l'únic criteri de selecció. Es va avaluar la resposta a dues vacunes (una polisacàrida i una polisacàrida conjugada a una proteïna) en tots els pacients. El criteri de resposta a cada vacuna va ser establert en funció dels resultats obtinguts en la població sana. El criteri diagnòstic de dèficit de producció d'anticossos específics va ser establert en funció dels resultats obtinguts en la població sana i en la de pacients amb una immunodeficiència primària coneguda, tots obtinguts en el mateix laboratori. A més a més, aquest es el primer estudi on es mostren les característiques clíniques i immunològiques dels pacients amb dèficit de producció d'anticossos i bronquièctasis, i on s'ha calculat un valor òptim de tall dels nivells específics d'anticossos preimmunització que millor predigui la resposta a la vacuna.

Si considerem la població amb bronquièctasis com a grup, es podria estimar una incidència de dèficit de producció d'anticossos del 5-6%, ja que en aproximadament el 50% dels casos l'etiologia es desconeguda<sup>23,24</sup>. Per tant l'estudi de la producció d'anticossos no sembla justificat com a prova rutinària en els pacients amb bronquièctasis.

Els resultats d'aquest estudi mostren que el dèficit de producció d'anticossos pot estar associat a bronquièctasis; que és recomanable avaluar la producció d'anticossos contra la vacuna conjugada de l'Hib i la polisacàrida del pneumococ en pacients amb bronquièctasis en els quals les causes conegudes han estat raonablement descartades, especialment en aquells amb història d'otitis mitjana, nivells baixos de IgG2 i nivells baixos d'anticossos específics. En el futur s'hauran de realitzar estudis per determinar l'efectivitat del tractament amb gammaglobulines en aquests pacients.

Taula 4. Característiques dels pacients amb bronquièctasis amb dèficit de producció d'anticossos o sense.

Característiques	No dèficit d'anticossos (n=95)	Dèficit d'anticossos (n=12)	p
edat — anys *	46 (42-49)	49 (37-61)	ns
edat inici símptomes — anys*	21 (17-25)	21 (9-34)	ns
dones — n (%)	55 (58)	7 (58)	ns
fumadors o ex fumadors — n (%)	27 (28)	5 (42)	ns
Otitis mitjana — n (%)	14 (15)	6 (50)	0.01
sinusitis — n (%)	24 (26)	5 (42)	ns
pneumònia — n (%)	52 (55)	7 (58)	ns
pneumònia de repetició — n (%)	28 (29)	5 (42)	ns
IRR — n (%)	21 (22)	4 (33)	ns
Immunoglobulines mg/dl *			
IgG	1,086 (1,012-1,160)	1,024 (783-1,264)	ns
IgG <sub>1</sub>	644 (586-700)	673 (479-866)	ns
IgG <sub>2</sub>	317 (286-347)	161 (87-235)	0.001
IgG <sub>3</sub>	55 (46-63)	55 (32-78)	ns
IgG <sub>4</sub>	31 (24-39)	39 (<5-81)	ns
IgA	206 (179-233)	158 (73-243)	ns
IgM	141 (117-165)	121 (40-202)	ns
IgG contra Hib-PRP — µg/ml †			
Preimmunització	2.1 (1.8-2.5)	1.2 (0.9-1.5)	<0.0001
Postimmunització	21.5 (15.5-29.6)	1.5 (1.1-2.0)	<0.0001
IgG contra <i>S.pneumoniae</i> — U/ml †			
Preimmunització	469 (369-596)	219 (119-403)	0.03
Postimmunització	1,772 (1,408-2,230)	376 (247-567)	<0.0001

Abreviacions: IRR= infeccions respiratòries de repetició ( tres o més episodis de bronquitis aguda per any amb febre > 37.5°C); Hib-PRP = *H. influenzae* polyribosylribitol phosphate; ns = no-significatiu.

\* Dades expressades com mitjana (95% IC) i † mitjana geomètrica (95% IC).



Taula 5. Característiques dels pacients amb bronquièctasis amb dèficit de producció d'anticossos o sense.

Característiques	No dèficit d'anticossos (n=95)	Dèficit d'anticossos (n=12)
Corticoesteroids — n (%)		
No tractament	33 (35)	4 (33)
Inhalat	57 (60)	7 (59)
Oral	5 (5)	1 (8)
Cultius esput — n (%)		
Negatiu	49 (52)	8 (67)
<i>H.influenzae</i>	15 (16)	3 (25)
<i>S.pneumoniae</i>	6 (6)	0
<i>P.aeruginosa</i>	20 (21)	1 (8)
<i>S.aureus</i>	2 (2)	0
altres	3 (3)	0
Extensió bronquièctasis— n (%)		
1 lòbul	20 (21)	1 (8)
2 lòbuls	11 (11)	4 (34)
Bilaterals	46 (48)	6 (50)
Més de tres lòbuls	18 (20)	1 (8)
Funció pulmonar *		
FVC — % de referència	77 (73-81)	76 (65-88)
FEV <sub>1</sub> — % de referència	72 (67-78)	68 (53-83)

Abreviacions: FVC= capacitat vital forçada; FEV<sub>1</sub>= volum forçat espiratori en el primer segon;

\* Dades expressades com mitjana (95% IC)

Tabla 6. Frequència de nivells baixos de subclasses de la IgG i dèficit d'IgA en pacients amb bronquièctasis d'etiologia no coneguda.\*

	Pacients			p
	Tots (n=107)	No dèficit d'anticossos (n=95)	Dèficit d'anticossos (n=12)	
Nivells baixos de SIgG	46 (43)	35 (37)	11 (92)	0.0008
IgG <sub>2</sub>	11 (10)	5 (5)	6 (50)	0.0001
Només IgG <sub>2</sub>	4	1	3	
IgG <sub>2</sub> -IgG <sub>3</sub>	2	2	0	
IgG <sub>2</sub> -IgG <sub>4</sub>	4	1	3	
IgG <sub>2</sub> -IgG <sub>3</sub> -IgG <sub>4</sub>	1	1	0	
IgG <sub>3</sub>	12 (11)	11 (12)	1 (8)	ns
IgG <sub>4</sub>	20 (19)	17 (18)	3 (25)	ns
IgG <sub>3</sub> -IgG <sub>4</sub>	3 (3)	2 (2)	1(8)	ns
Dèficit IgA	15 (14)	12 (13)	3 (25)	ns

*Abreviacions:* SIgG = subclasses de la IgG

\*Valors expressats com dada (%).

Tabla 7. Concentracions sèriques d'anticossos específics contra l'Hib i el *S.pneumoniae* en la població sana i en els pacients amb bronquièctasis d'etiologia no coneguda.\*

	Població sana	Pacients
Nivells d'anticossos específics		
IgG contra Hib-PRP	(n = 59)	(n=107)
Preimmunització – µg/ml	2.2 (1.7-2.8)	2.05 (1.8-2.4)
Postimmunització – µg/ml	15 (11-21)	16.3 (11.7-22.6)
Diferència– µg/ml	11 (7.9-16)	12.3 (8.6-17.6)
Increment	5.0 (3.5-7.0)	6.4 (4.6-8.8)
IgG contra <i>S. pneumoniae</i>	(n = 40 )	(n = 107)
Preimmunització – U/ml	508 (407-645)	433 (344-539)
Postimmunització – U/ml	1,686 (1,274-2,230)	1,480 (1,188-1,863)
Diferència – U/ml	812 (441-1,495)	804 (608-1,075)
Increment	3.0 (2.2-4.0)	2.8 (2.3-3.4)

Abreviacions: Hib-PRP = *H.influenzae* polyribosylribitol phosphate; IgG = immunoglobulina G.

\* Dades expressades com mitjana geomètrica (IC 95% ).

Tabla 8. Dèficit de producció d'anticossos en pacients amb bronquièctasis. Comparació dels diferents estudis

	Vendrell	Pasteur *	Stead *
Població d'estudi	Bronquièctasis etiologia no coneguda	Bronquièctasis de qualsevol etiologia	Bronquièctasis. no FQ, ABPA o D $\alpha$ 1AT
Nº pacients	107	150	56
<b>Vacuna Pneumococ</b>			
Pacients			
Criteri de selecció	Bronquièctasis etiologia no coneguda	Nivell d'anticossos específics basals < 25 <sup>th</sup> percentil	Nivell anticossos específics basals <95 <sup>th</sup> centils
Nº pacients amb el criteri	107	41	6
Nº pacients vacunats	107	34	3
Grup control			
No immunitzats	-	72	240
Immunitzats	40	-	-
Criteri de resposta normal	increment $\geq$ 395 U/ml	duplicar el valor	multiplicar per deu i superar el valor normal
<b>Vacuna conjugada de l'Hib</b>			
Pacients			
Criteri de selecció	Bronquièctasis etiologia no coneguda	-	Nivell anticossos específics basals indetectable
Nº pacients amb el criteri	107	-	26
Nº pacients vacunats	107	-	11
Grup control			
No immunitzats	-	-	168
Immunitzats	59	-	-
Criteri de resposta normal	increment $\geq$ 2.28 ug/ml	-	multiplicar per deu i superar 1 $\mu$ g/ml
<b>Immunodeficiència humoral</b>			
Criteri diagnòstic	No resposta a la vacuna de l'Hib i pneumococ	No resposta a la vacuna del pneumococ	No resposta a la vacuna de l'Hib o del pneumococ
Nº de diagnòstics	12	10	1

\* cites 23,28.

Abreviacions: FQ= fibrosi quística; ABPA = aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica; D $\alpha$ 1AT=dèficit  $\alpha_1$ -antitripsina; Hib = *H. influenzae* tipus b.

Figura 6. Nivells d'anticossos preimmunització contra l'*H.influenzae* tipus b en la població sana, en pacients responedors i no responedors a la vacuna de l'*H.influenzae* tipus b. Els valors dels percentils 25 i 50 son dels nivells específics preimmunització en la població sana.

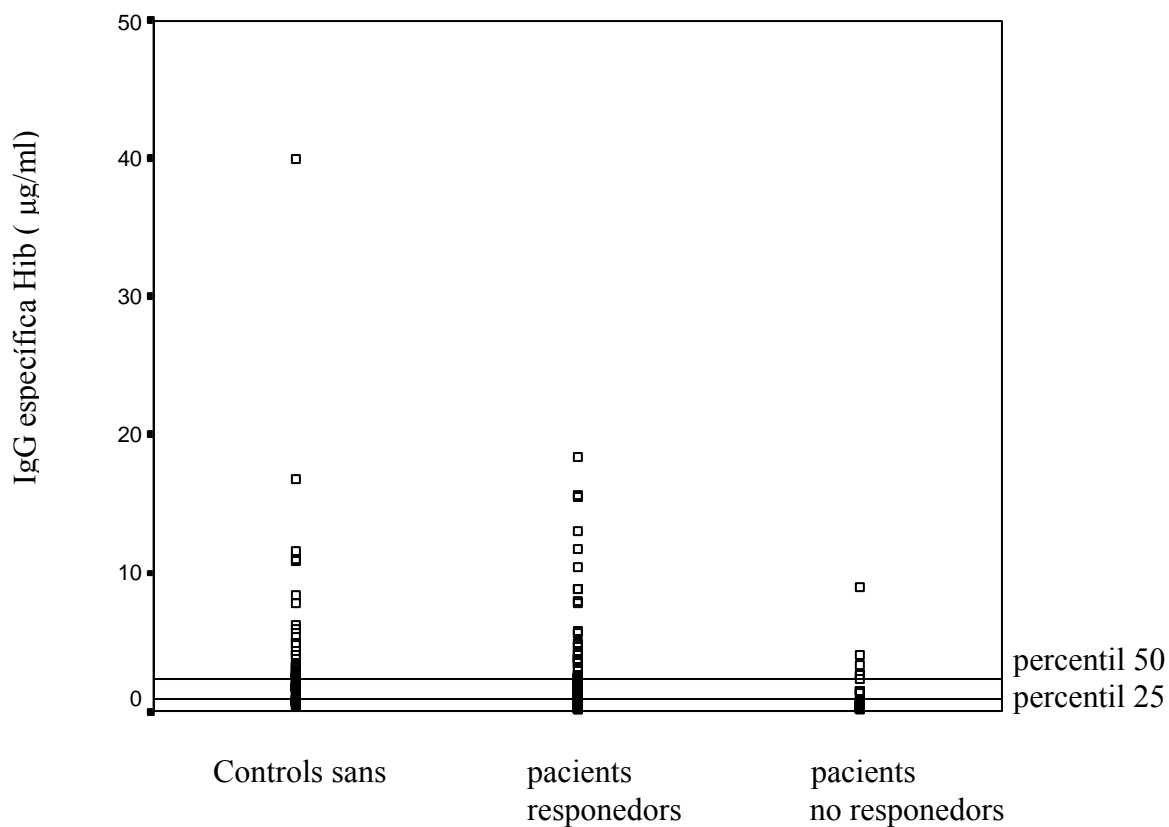
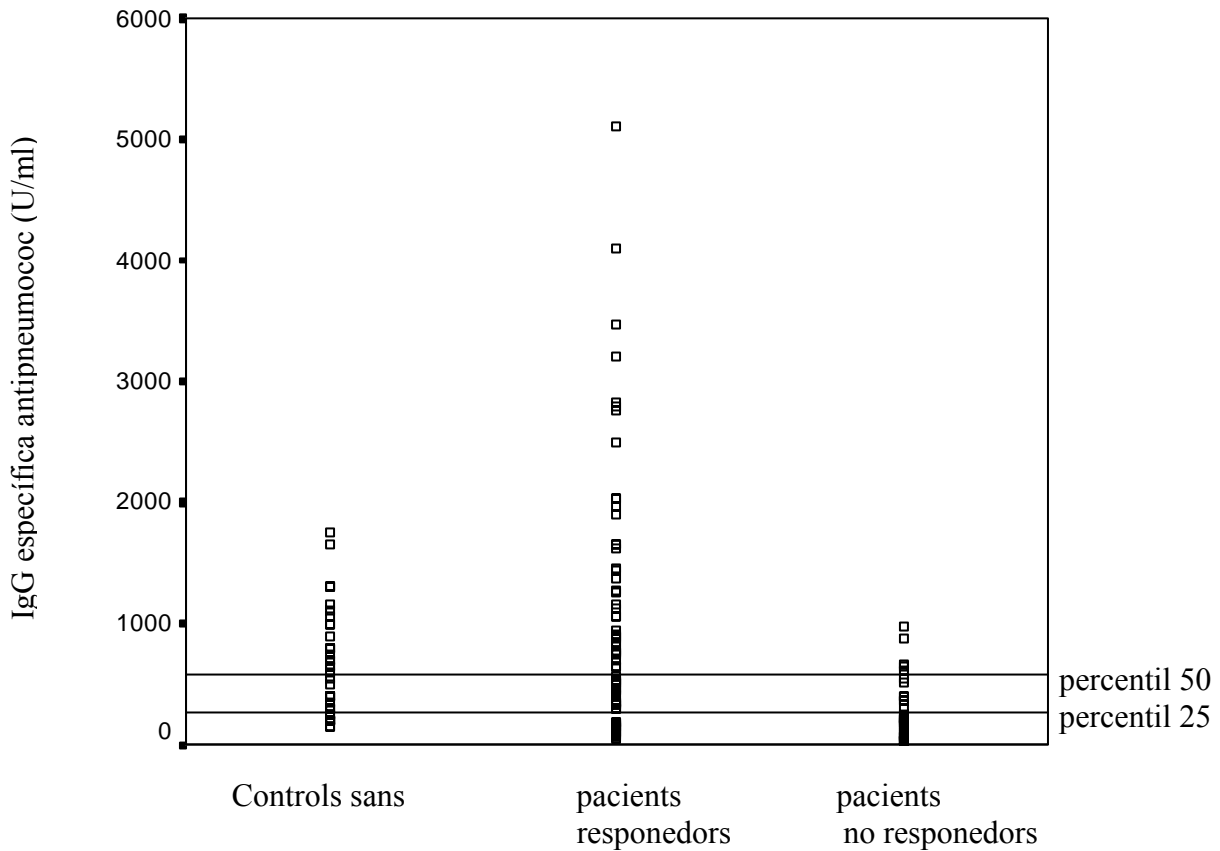


Figura 7. Nivells d'anticossos preimmunització contra *S.pneumoniae* en la població sana, en pacients resonedors i no resonedors a la vacuna de *S.pneumoniae*. Els valors dels percentils 25 i 50 son dels nivells específics preimmunització en la població sana.



### **3.6. Eficàcia del tractament amb immunoglobulines en el control de l'afectació pulmonar en pacients adults diagnosticats d'ICV. Monitorització de l'evolució de l'afectació pulmonar.**

#### 3.6.1. Pacients:

Des de l'octubre del 1994 fins al juny del 2001 es va estudiar 24 pacients adults (14 dones, edat 19-71 anys, edat mitjana 45 anys) diagnosticats de d'ICV de manera consecutiva en una consulta especialitzada, i es van seguir durant un període mínim de 2 anys. Tots els pacients tenien nivells baixos de com a mínim dos isotips d'immunoglobulines sèriques, nivells sèrics d'IgG < 550 mg/dl, i eren no responedors a la vacuna de l'Hib i a la de *S.pneumoniae*. Cap d'ells no havia rebut tractament amb immunoglobulines prèviament. A tots els pacients se'ls va iniciar tractament a l'hospital amb 7S-immunoglobulina pasteuritzada intravenosa (Flebogamma ® 5%, Instituto Grifols) a les dosis de 200-300 mg/kg de pes per setmana durant les primeres tres setmanes i posteriorment cada 21 dies. L'objectiu d'administrar una dosi setmanal durant les tres primeres setmanes era aconseguir, en el menor temps possible, concentracions sèriques d'immunoglobulines similars a les normals després de produir-se la redistribució de la IgG entre els espais intravascular i extravascular, tal com vam observar en estudis previs<sup>5</sup>. A partir dels 3 primers mesos de tractament es va considerar incrementar la dosi d'immunoglobulines si els nivells d'IgG totals sèrics eren inferiors a 600 mg/dl, si persistien les infeccions bacterianes o hi havia un deteriorament de la funció pulmonar.

A tots els pacients se'ls va realitzar una història clínica completa amb especial referència als antecedents d'infeccions greus ( pneumònia, sepsis, meningitis, abcès pulmonar) i infeccions lleus (bronquitis aguda amb febre, otitis mitjana, sinusitis o

episodis de febre  $>38^{\circ}\text{C}$ ) en els dos anys previs al diagnòstic. Posteriorment van ser avaluats clínicament cada 6 mesos. Les proves practicades abans d'iniciar el tractament i la periodicitat amb què es van realitzar van ser: determinacions d'immunoglobulines cada 3 mesos; anàlisi completa i proves de funció respiratòria en fase estable cada 6 mesos; TACAR de tòrax als 24 mesos; determinacions de transaminases abans de cada infusió d'immunoglobulines; determinació de virus de la immunodeficiència humana (VIH), virus de la hepatitis B i C anuals o sempre que els nivells de transaminases fossin elevats.

Les característiques dels pacients es mostren en la taula 9. En el moment del diagnòstic 9 pacients (45%) tenien una malaltia pulmonar crònica (MPC) definida com: bronquièctasis diagnosticades per TACAR amb una disminució de la funció pulmonar superior a un 15% dels valors de referència. En aquests pacients es va valorar la indicació de fisioteràpia respiratòria, tractament amb broncodilatadors, corticoesteroids inhalats i antibiòtics.

En aquests estudis, a diferència dels estudis prèviament publicats, no vam considerar la mateixa dosi d'immunoglobulines per a tots els pacients, sinó que vam ajustar les dosis per aconseguir nivells sèrics residuals d'IgG total superiors a 600 mg/dl i un control clínic apropiat per a cada pacient. Als 6 mesos d'iniciar el tractament amb immunoglobulines tots els pacients van assolir nivells residuals sèrics d'IgG  $> 600$  mg/dl i de subclasses d'IgG (IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub>) en els valors de referència (IgG:  $750 \pm 153$  mg/dl, IgG<sub>1</sub>:  $390 \pm 96$  mg/dl, and IgG<sub>2</sub>:  $190 \pm 89$  mg/dl). Es va observar una àmplia variabilitat en les dosis d'immunoglobulines requerides (205-372 mg/kg/21 dies, o 273-496 mg/Kg/mes) per assolir aquests nivells.

A més, els pacients amb MPC van requerir dosis superiors d'immunoglobulines per mantenir nivells sèrics residuals d'IgG per sobre de 600 mg/dl ( $p=0.002$ ). Tot i així,



al final de l'estudi els nivells sèrics residuals d'IgG van ser inferiors en aquests pacients respecte als que no tenien MPC ( $p=0.006$ ) (taula 10). Sis dels 9 pacients amb MPC van requerir incrementar aproximadament 25 mg/Kg/21 dies les dosis inicials d'immunoglobulines i en quatre casos l'increment va ser superior al 20% de la dosi inicial. El fet que els pacients amb MPC requerissin dosis superiors d'immunoglobulines pot estar en part relacionat amb un consum més ràpid d'immunoglobulines per la presència d'inflamació i d'infecció bronquial en les zones amb bronquièctasis. Aquesta variabilitat en les dosis requerides està relacionada amb les variacions individuals dels nivells d'IgG a nivell plasmàtic i les necessitats de consum individuals, i implica la necessitat d'individualitzar el tractament en cada pacient per mantenir nivells adients i evitar infractar als pacients quan una dosi fixa d'immunoglobulines és administrada.

Durant el període de tractament i mantenint aquests nivells residuals d'IgG  $>600$  mg/dl, es va observar una disminució significativa del número d'infeccions, tant de les greus com les lleus (taula 11). No es va observar canvis significatius en els paràmetres de funció respiratòria (taula 9), excepte en els pacients amb MPC en els quals el FEV1 va millorar al final del període de seguiment ( $p=0,004$ ) (taula 10). Aquesta millora del FEV1 en els pacients amb bronquièctasis probablement té relació amb la millora del procés inflamatori a nivell de la paret bronquial, ja que el grau d'obstrucció bronquial en aquests pacients s'ha correlacionat amb el grau d'engruiximent bronquial<sup>57</sup>.

### 3.6.2. Resultats de la TACAR de tòrax.

Els resultats es mostren en la taula 12. Tots els pacients van mostrar algun tipus d'alteració en més d'un lòbul pulmonar. Es va observar una correlació negativa entre el valor del FEV<sub>1</sub> i cada escore de l'examen de la TACAR a l'inici de l'estudi (bronquièctasis, correlació de Pearson  $r: -0.845$ ,  $p = 0.02$ ; inflamació,  $r = -0.802$ ,  $p =$

0.01; infiltrats,  $r = -0.792$ ,  $p = 0.04$ ; escore total,  $r = -0.822$ ,  $p = 0.003$ ). No obstant, al final de l'estudi només es va observar una dèbil correlació entre FEV<sub>1</sub> i l'escore total ( $r = -0.624$ ,  $p = 0.045$ ), probablement per la disminució de la inflamació a nivell de la paret bronquial.

Els pacients amb MPC van presentar millora significativa dels escors de la TACAR al final de l'estudi, excepte de l'escore dels infiltrats pulmonars. Sis d'aquests pacients van presentar una millora del 15% en el FEV<sub>1</sub> sense canvis en els altres paràmetres de funció respiratòria. En els pacients sense MPC no es va observar variacions significatives en els escores de la TACAR al final de l'estudi, però dos pacients van presentar un increment del 15% en l'escore total sense que presentessin ni clínica ni disminució dels paràmetres de funció pulmonar que ho suggerís. La TACAR de tòrax pot ajudar a detectar en alguns casos la progressió de les lesions pulmonars silents des del punt de vista clínic i funcional, com ha estat recentment suggerit en dos estudis<sup>35,36</sup>. No obstant, aquest fet també ha estat observat en pacients amb bronquièctasis sense immunodeficiències i en pacients amb MPOC que tenien inflamació o infecció bronquial crònica<sup>58</sup>. Per tant, és difícil atribuir la progressió de l'alteració pulmonar exclusivament a un tractament inadequat amb immunoglobulines en aquests pacients. La instauració de tractaments addicionals contra la inflamació i la infecció bronquial, com els antibiòtics, macròlids (com agents antiinflamatoris), corticoesteroids inhalats, antiinflamatoris no esteroïdals, broncodilatadors, mucolítics, i tècniques de fisioteràpia respiratòria que facilitin l'eliminació de secrecions poden minimitzar l'aparició i progressió de l'afectació pulmonar<sup>59</sup>.

### 3.6.3. Seguretat.

Tots els pacients van tolerar bé el tractament amb gammaglobulines. Efectes adversos menors van ser detectats durant 61 de les 888 infusions (6,8%); cap d'ells no va requerir interrompre la infusió. La monitorització dels enzims hepàtics i del virus de VIH, virus de la hepatitis C i B, no van mostrar cap evidència de transmissió vírica.

Les diferències en el disseny dels estudis publicats, en la dosi d'immunoglobulines i en els criteris de valoració de l'eficàcia del tractament utilitzats dificulten el poder establir unes pautes de tractament. En lloc de recomanar dosis fixes d'immunoglobulines, creiem que amb els coneixements actuals s'ha d'ajustar la dosi d'immunoglobulines per aconseguir nivells sèrics estables d'IgG total plasmàtica superiors a 600 mg/dl, juntament amb el tractament de la patologia crònica associada des de l'inici (bronquièctasis o MPC). La incidència d'infeccions, les proves de funció respiratòria i la TACAR de tòrax semblen adequades per controlar l'eficàcia del tractament, fins i tot en aquells pacients amb progressió asimptomàtica.

Taula 9. Característiques dels pacients, dosis d'immunoglobulines, paràmetres immunològics i proves de funció respiratòria a l'inici i després de dos anys de tractament\*.

Característiques	Inici	2 anys	p
<b>Gènere</b>			
Dones — n.	14		
Homes — n.	10		
Edat — anys (rang)	45 ± 18 (19-71)		
Pes — kg (rang)	60 ± 10 (40-81)		
Malaltia respiratòria crònica — n.	9		
<b>Tractament</b>			
Seguiment — mesos (n)		24	
Infusions totals per pacient — n.		37	
Dosi — mg/kg pes/21 dies (rang)	244 ± 41 (190-320)†	255 ± 50 (205-372)	0.051
<b>Paràmetres immunològics</b>			
IgA — mg/dl (rang)	7.7 ± 12 (1-48)		
IgM — mg/dl (rang)	19 ± 9 (5-35)		
IgG — mg/dl (rang)	239 ± 138 (33-544)	806 ± 167 (568-1116)	< 0.0001
IgG <sub>1</sub> — mg/dl (rang)	174 ± 95 (5-371)	445 ± 118 (232-646)	< 0.0001
IgG <sub>2</sub> — mg/dl (rang)	43 ± 33 (5-110)	214 ± 79 (88-383)	< 0.0001
Cèl.lules B (%)	6.5 ± 3.8 (1-14)		
Cèl.lules T CD4 / T CD8	0.89 ± 0.78 (0.2-3.8)		
<b>Funció pulmonar ‡</b>			
FVC — litres (rang)	2.9 ± 1.2 (1.0-5.5)	2.9 ± 1.1 (1.2-5.1)	0.4
FVC — % referència (rang)	77 ± 21 (29-107)	78 ± 17 (35-104)	0.81
FEV <sub>1</sub> — litres (rang)	2.3 ± 1.2 (0.7-5.4)	2.3 ± 1.1 (0.9-4.7)	0.52
FEV <sub>1</sub> — % referència (rang)	75 ± 23 (26-123)	78 ± 20 (35-112)	0.36

\* Valors expressats com mitjana ± desviació estàndard.

† Dosi a l'inici és la dosi després de les tres dosis inicials setmanals

‡ FVC capacitat vital forçada. FEV<sub>1</sub> volum forçat espiratori en el primer segon.

Taula 10. Característiques dels pacients amb afectació pulmonar crònica o sense.\*

Característiques	Pacients amb MPC † (N=9)	Pacients sense MPC (N=15)	p
Edat — anys (rang)	48 ± 19 (24-71)	44 ± 19 (19-70)	0.6
Pes — kg (rang)	55 ± 8 (40-67)	65 ± 10 (52-81)	0.08
<b>Dosi final d'immunoglobulines</b>			
Dosi — mg/kg pes/21 dies (rang)	285 ± 53 (220-372)	222 ± 23 (205-261)	0.002
Diferències entre dosi inicial i final — mg/kg pes/21 dies (rang)	-10.9 ± 14 (-24.2- 13.6)	1.5 ± 14 (-14.1-25.2)	0.045
<b>Immunoglobulines</b>			
Inicial IgG — mg/dl (rang)	214 ± 144 (33-472)	254 ± 137 (51-544)	0.7
Final IgG — mg/dl (rang)	718 ± 142 (568-981) p < 0.0001	853 ± 164 (602-1162) p < 0.0001	0.006
Inicial IgG <sub>1</sub> — mg/dl (rang)	157 ± 104 (5-277)	183 ± 90 (52-371)	0.4
Final IgG <sub>1</sub> — mg/dl (rang)	396 ± 121 (262-626) p = 0.002	471 ± 111 (232-646) p < 0.0001	0.065
Inicial IgG <sub>2</sub> — mg/dl (rang)	37 ± 37 (5-98)	46 ± 32 (5-110)	0.5
Final IgG <sub>2</sub> — mg/dl (rang)	192 ± 61 (130-294) p < 0.0001	226 ± 86 (88-386) p < 0.0001	0.1
<b>Funció pulmonar ‡</b>			
Inicial FVC — % referència (rang)	60 ± 19 (29-92)	87 ± 14 (66-107)	0.001
Final FVC — % referència (rang)	67 ± 17 (35-89) p = 0.11	84 ± 15 (51-104) p = 0.5	0.02
Inicial FEV <sub>1</sub> — % referència (rang)	54 ± 13 (26-67)	88 ± 17 (65-123)	0.001
Final FEV <sub>1</sub> — % referència (rang)	61 ± 13 (35-76) p = 0.004	89 ± 16 (47-112) p = 0.9	0.001
<b>Infeccions</b>			
Infeccions greus — n (rang) §	0.3 ± 0.7 (0-2)	0.1 ± 0.3 (0-1)	0.4
Incidència d'infeccions greus (rang)	0.08 ± 0.1 (0-0.4)	0.03 ± 0.07(0-0.2)	0.3
Incidència d'infeccions lleus (rang) ¶	2,1 ± 2,4 (0-8)	2,3 ± 1.8 (0-6)	0.7

\* Valors expressats com mitjana ± desviació estàndard.

† MPC: malaltia pulmonar crònica;

‡ FVC capacitat vital forçada. FEV<sub>1</sub> volum forçat espiratori en el primer segon;

§ Infeccions greus: pneumònia, sepsis, meningitis i/o abscess pulmonar;

|| Infeccions / pacient-anys;

¶ Infeccions lleus: episodis de bronquitis, otitis, sinusitis o febre per any.

Taula 11. Infeccions greus i lleus abans i durant el tractament \*

Característiques	Pre-tractament	Últim seguiment	p †
Infeccions greus— no. ‡			
mitjana ± DS	1.3 ± 1.2	0.2 ± 0.5	0.001
mediana (rang)	1.5 (0-4)	0 (0-2)	
Incidència d'infeccions greus §			
mitjana ± DS	0.48 ± 0.45	0.047 ± 0.15	0.001
mediana (rang)	0.5 (0-1.5)	0 (0-0.4)	
Incidència d'infeccions lleus			
mitjana ± DS	4.9 ± 4.1	2.2 ± 2.0	0.01
mediana (rang)	4 (0-13)	2 (0-8)	

\* Valors expressats com mitjana ± desviació estàndard.

† Wilcoxon rank sum test (dues-cues);

‡ Infeccions greus: pneumònia, sepsis, meningitis i/o abscess pulmonar;

§ Infeccions / pacient-anys;

|| infeccions lleus: episodis de bronquitis, otitis, sinusitis o febre per any

Taula 12. Escors de la TACAR de tòrax \*

Característiques	Tots els pacients (n=24) escore §	Pacients amb MPC† (n=9) escore §	Pacients sense MPC (n=15) escore §	p‡
<b>Alteracions de les vies aèries</b>				
Bronquièctasis inicials	8.9 ± 9.0 (0-30)	18.0 ± 9.7 (5-30)	4.4 ± 4.4 (0-16)	0.01
Bronquièctasis finals	9.1 ± 9.1 (0-30) p = 0.9	16.8 ± 10.3 (2-30) p = 0.03	5.1 ± 5.6 (0-17) p = 0.23	0.02
Inflamació inicial	6.4 ± 6.9 (0-21)	12.8 ± 7.4 (2-11)	3.14 ± 3.7 (0-14)	0.012
Inflamació final	5.1 ± 5.1 (0-19) p = 0.3	7.4 ± 6.5 (2-19) p = 0.032	4.3 ± 4.3 (0-13) p = 0.28	0.2
<b>Infiltrats pulmonars</b>				
Canvis fibròtics inicials	5.2 ± 6.0 (0-22)	10.1 ± 67.7 (0-22)	2.8 ± 3.1 (0-10)	0.047
Canvis fibròtics finals	5.5 ± 6.2 (0-22) p = 0.9	9.6 ± 7.9 (0-22) p = 0.8	2.9 ± 3.3 (0-13) p = 0.2	0.06
<b>Escore total</b>				
Inicial	20.5 ± 21.5 (2-70)	51.0 ± 24.1 (7-70)	10.3 ± 10.1 (2-38)	0.01
Final	19.9 ± 18.7 (6-58) p = 0.56	34.8 ± 22.9 (4-63) p = 0.03	12.1 ± 11.6 (1-42) p = 0.3	0.04

\* Valors expressats com mitjana ± desviació estàndard (rang)

† MPC: malaltia pulmonar crònica;

‡ valor de la p entre pacients amb MPC i sense;

§ Màxim escore possible: bronquièctasis: 36; inflamació: 36; canvis fibròtics: 30; escore general: 102

## 4. Conclusions

1. El mètode d'ELISA utilitzat és útil per la mesura dels anticossos específics contra l'Hib.
2. S'han establert els valors de referència de la producció d'anticossos específics contra l'Hib en una població sana i s'ha definit el criteri de resposta a la vacuna.
3. La demostració del dèficit de producció d'anticossos específics contra una sola vacuna pot no ser suficient pel diagnòstic de dèficit de producció d'anticossos.
4. L'avaluació conjunta de la resposta d'anticossos contra la vacuna polisacàrida del *S.pneumoniae* i la conjugada de l'Hib pot facilitar el diagnòstic d'immunodeficiències primàries de tipus humoral i facilitar també la indicació del tractament amb immunoglobulines.
5. El dèficit de producció d'anticossos amb nivells d'IgG normal pot estar associat amb bronquièctasis.
6. L'estudi de la producció d'anticossos específics contra l'Hib i *S.pneumoniae* hauria de valorar-se en pacients amb bronquièctasis d'etiologia no coneguda, especialment en aquells pacients amb antecedents d'otitis mitjana, nivells baixos d'IgG2 o nivells basals d'anticossos específics baixos (inferiors al percentil 50 dels nivells de la població sana de referència).
7. Les dosis requerides per mantenir nivells estables de IgG sèrica són molt variables i una dosi estàndard no ha de ser recomanada. El manteniment de nivells sèrics d'IgG total residuals superiors a 600 mg/dl en pacients afectes d'ICV s'ha mostrat apropiat per controlar les infeccions i les complicacions pulmonars.



8. Les manifestacions clíniques, les proves de funció respiratòria i la TACAR de tòrax, al menys cada dos anys, són aconsellables per detectar la progressió de l'afectació pulmonar.
9. Els pacients amb MPC tendeixen a requerir dosis superiors d'immunoglobulines per assolir nivells estables d'IgG.

## 5. Bibliografía

---

- <sup>1</sup> Matamoros N, Milá J, Pons J. Inmunodeficiencias primarias en España. Datos del registro español de inmunodeficiencias primarias. REDIP 1980-1999. Med Clin (Barc) 2000;114:96-100.
- <sup>2</sup> Chapel H, Geha R, Rosen F, for the IUIS PID Classification Committee. Primary Immunodeficiency Diseases: an update. Clin Exp Immunol 2003;132:9-15.
- <sup>3</sup> Sorensen RU, Moore C. Antibody deficiency syndromes. Pediatr Clin North Am 2000; 47:1225-1252.
- <sup>4</sup> Nahm MH, Macke K, Kwon O, Madassery JV, Sherman LA, Scott MG. Immunologic and clinical status of blood donors with subnormal levels of IgG2. J Allergy Clin Immunol 1990; 85; 769-777.
- <sup>5</sup> De Gracia J, Vendrell M, Guarner L, Vidal R, Miravittles M, Mayordomo C, and Morell F. Utilización de gammaglobulina humana en el tratamiento de la inmunodeficiencia común variable. Med Clin ( Barc) 1995;104:201-206.
- <sup>6</sup> Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. Clin Immunol 1999;92:34-48.
- <sup>7</sup> Buckley RH and Schiff RI. The use of intravenous immune globulin in immunodeficiency diseases. N Engl J Med 1991;325:110-117.
- <sup>8</sup> Roifman CM, Levison H, Gelfand EW. High-dose versus low- dose intravenous immunoglobulin in hypogammaglobulinaemia and chronic lung disease. Lancet 1987;1: 1075-1077.
- <sup>9</sup> De Gracia J, Morell F, Bofill JM, Rodrigo MJ, Coscolluela C. Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 or IgG3. N Engl J Med 1986; 314:925-926.

---

<sup>10</sup> De Gracia J, Miravittles M, Vendrell M, Rodrigo MJ, Codina R, Morell F. Estudio de las subclases de la IgG en pacientes con déficit de IgA sintomáticos. *Med Clin (Barc)* 1995; 104:708-31

<sup>11</sup> Ambrosino DM, Siber GR, Chilmonczyk BA, Jernberg JB and Finberg RW. An immunodeficiency characterized by impaired antibody responses to polysaccharides. *N Engl J Med* 1987; 26:790-793.

<sup>12</sup> Sanders LAM, Rijkers GT, Kuis W, Tenbergen-Meekes AJ, Graeff-Meeder BR, Hiemstra I, Zegers BJM. Defective antipneumococcal polysaccharide antibody response in children with recurrent respiratory tract infections. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:110-119.

<sup>13</sup> Miravittles M, de Gracia J, Rodrigo MJ, Cruz MJ, Vendrell M, Vidal R, Morell F. Specific antibody response against the 23-valent pneumococcal vaccine in patients with  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency with and without bronchiectasis. *Chest* 1999;116:946-952.

<sup>14</sup> Rodrigo MJ, Miravittles M, Cruz MJ, De Gracia J, Vendrell M, Pascual C, Morell F. Characterization of specific immunoglobulin G (IgG) and its subclasses (IgG1 and IgG2) against the 23-valent pneumococcal vaccine in a healthy adult population: proposal for response criteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:168-172.

<sup>15</sup> Schneider LC, Insel RA, Howie G, Madore DV, Geha RS. Response to a *Haemophilus influenzae* type b diphtheria CRM197 conjugate vaccine in children with a defect of antibody production to a *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:948-953.

<sup>16</sup> Herrod HG, Gross S, Insel R. Selective antibody deficiency to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccination in children with recurrent respiratory tract infection. *J Clin Immunol* 1989; 9: 429-434.

---

<sup>17</sup> Zielen S, Büring I, Strand N, Reichenbach J, Hofmann D. Immunogenicity and tolerance of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in nonresponders to the 23-valent pneumococcal vaccine. *Infection and Immunity* 2000;68:1435-1440.

<sup>18</sup> Insel RA, Anderson PW. Response to oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Haemophilus influenzae* b in two patients with IgG<sub>2</sub> deficiency unresponsive to capsular polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1986; 315: 499-503.

<sup>19</sup> Musher DM, Groover JE, Watson DA, Rodriguez-Barradas MC, Baughn RE. IgG responses to protein-conjugated pneumococcal capsular polysaccharides in persons who are genetically incapable of responding to unconjugated polysaccharides. *Clin Infectious Dis* 1998;27:1487-90.

<sup>20</sup> Sorensen RU, Leiva LE, Giangrosso PA, Butler B, Javier III FC, Sacerdote DM, Bradford N, Moore C. Response to a heptavalent conjugate *Streptococcus pneumoniae* vaccine in children with recurrent infections who are unresponsive to the polysaccharide vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:685-691.

<sup>21</sup> De Gracia J, Vendrell M, Villarino MA, Mayordomo C, Alvarez A. Bronquiectasias. En: Caminero JA, Fernández Fau L, editores. *Manual de Neumología y Cirugía Torácica*. SEPAR. Madrid: Editores Médicos SA, 1998 ; 1197-1216.

<sup>22</sup> Vendrell M, De Gracia J, Alvarez A. Bronquiectasias. *Arch Bronconeumol* 2000; 36 (Supl 4): 3-12.

<sup>23</sup> Pasteur MC, Helliwell SM, Houghton SJ , Webb SC, Foweraker JE, Coulden RA, Flower CD, Bilton D, Keogan MT. An investigation into causative factors in patients with bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1277-1284.

<sup>24</sup> Alvarez A, Vendrell M, De Gracia J, Mayordomo C, Catalan E, Morell F. Etiology of adult bronchiectasis. *Eur Respir J* 1997; 10 (Supl 25):201s.

- 
- <sup>25</sup> Hermaszewski RA, Webster ADB. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Quarterly Journal of Medicine* 1993;86:31-42.
- <sup>26</sup> De Gracia J, Rodrigo MJ, Morell F, Vendrell M, Miravittles M, Cruz MJ, Codina R Bofill JM. IgG subclass deficiencies associated with bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:650-655.
- <sup>27</sup> Hill SL, Mitchell JL, Burnett D, Stockley RA. IgG subclasses in the serum and sputum from patients with bronchiectasis. *Thorax* 1998;53:463-468.
- <sup>28</sup> Stead, A, Douglas JG, Broadfoot CJ, Kaminski ER, Herriot R. Humoral immunity and bronchiectasis. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:325-330.
- <sup>29</sup> Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:1001-4.
- <sup>30</sup> Pirofsky B. Intravenous immune globulin therapy in hypogammaglobulinaemia. A Review. *Am J Med* 1984;76(3A):53-60.
- <sup>31</sup> Pruzanski W, Sussman G, Dorian W, Van T, Ibañez D, Redelmeier D. Relationship of dose of intravenous gammaglobulin to the prevention of infections in adults with common variable immunodeficiency. *Inflammation* 1996;20:353-359.
- <sup>32</sup> Ochs HD, Fisher SH, Wedgwood RJ, Wara DW, Cowan MJ, Ammann AJ et al. Comparison of high-dose and low-dose intravenous immunoglobulin therapy in patients with primary immunodeficiency disease. *Am J Med* 1984;76(3A):78-82.
- <sup>33</sup> Bernatowska E, Madalinski K, Janowicz W, Weremowicz R, Gutkowski P, Wolf HM et al. Results of a prospective controlled two-dose crossover study with intravenous immunoglobulin and comparison with plasma treatment. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;43:153-162.

- 
- <sup>34</sup> Eijkhout HW, van der Meer JWM, Kallenberg CGM, Weening RS, van Dissel JT, Sanders LAM et al. The effect of two different dosages of intravenous immunoglobulin on the incidence of recurrent infections in patients with primary hypogammaglobulinemia. A randomised, double-blind, multicenter crossover trial. *Ann Intern Med* 2001; 135:165-174.
- <sup>35</sup> Kainulainen L, Varpula M, Liippo K, Svedstrom E, Nikoskelainen J, Ruuskanen O. Pulmonary abnormalities in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1031-1036.
- <sup>36</sup> Manson D, Reid B, Dalal I, Roifman CM. Clinical utility of high-resolution pulmonary computed tomography in children with antibody deficiency disorders. *Pediatr Radiol* 1997;27:794-798.
- <sup>37</sup> Metzger WJ, Butler JE, Swanson D, Reinders E, Richardson HB. Amplification of the enzyme-linked immunosorbent assay for measuring allergen-specific IgE and IgG antibody. *Clin Allergy* 1981; 11:523-531.
- <sup>38</sup> Herrmann DJ, Hamilton RG, Barington T, Frasc CE, Arakere G, Mäkelä O et al. Quantitation of human IgG subclass antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J Immunol Methods* 1992;148:101-114.
- <sup>39</sup> Madore DV, Anderson P, Baxter BD, Carlone GM, Edwards KM, Hamilton RG et al. 1996. Interlaboratory study evaluating quantitation of antibodies to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*.3:84-88.
- <sup>40</sup> Käyhty H, Peltola H, Eskola J. Immunogenicity and reactogenicity of four *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccines in Finnish 24-month-old children. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:574-577.
- <sup>41</sup> Ambrosino DM, Schiffman G, Gotschlich EC, Schur PH, Rosenberg GA, DeLange

---

GG, van Loghem E, Siber GR. Correlation between G2m(n) immunoglobulin allotype and human antibody response and susceptibility to polysaccharide encapsulated bacteria. *J Clin Invest* 1985.; 75:1935-1942.

<sup>42</sup> Parkkali T, Käyhty H, Ruutu T, Volin L, Eskola J, Ruutu P. A comparison of early and late vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate and pneumococcal polysaccharide vaccines after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18:961-967.

<sup>43</sup> Mäkelä O, Mattila P, Rautonen N, Seppälä I, Eskola J and Käyhty. Isotype concentrations of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide (Hib) in young adults immunized with the polysaccharide as such or conjugated to a protein (Diphtheria Toxoid). *J Immunol* 1987;139:1999-2004.

<sup>44</sup> Käyhty H, Eskola J, Peltola H, Rönberg PR, Kela E, Karanko V, Saarinen L. Antibody responses to four *Haemophilus influenzae* type conjugate vaccines. *Am J Dis Child* 1991; 145:223-227.

<sup>45</sup> Lucas AH, Granoff DN. Functional differences in idiotypically-defined IgG1 anti-polysaccharide antibodies elicited by vaccination with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J Immunol* 1995; 154:4195-4202.

<sup>46</sup> Shackelford PG, Granoff DM, Nelson SJ, Scott MG, Smith DS, and Nahm MH. Subclass distribution of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J Immunol* 1987;138:587-592.

<sup>47</sup> Barret DJ and Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol* 1986; 63:127.

<sup>48</sup> Siber GR, Schur PH, Aisenberg AC, Weitzman SA and Schiffman G. Correlation between serum IgG2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med* 1980; 303:178-182.

---

<sup>49</sup> Rautonen N, Pelkonen J, Sipinen S, Käyhty H and Mäkelä O. Isotype concentrations of human antibodies to group A meningococcal polysaccharide. *J Immunol* 1986.;137:2670-2675.

<sup>50</sup> Barra A, Bremard-Oury C, Bajart A, Griscelli C, Fritzell B, Preud'homme JL. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and its tetanus toxoid conjugate in patients with recurrent infections or humoral immunodeficiency. *Int J Clin Lab Res* 1992.; 21:231-234.

<sup>51</sup> Oldfield, S. Class and subclass anti-pneumococcal antibody response in splenectomized patients. *Clin Exp Immunol* 1985; 61:664-673.

<sup>52</sup> Vendrell M, De Gracia J, Rodrigo MJ, Cruz MJ, Miravittles M, Alvarez T, Mayordomo C, Morell F. 1998. Antibody response to conjugate vaccine in patients with IgG2 deficiency and pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:A174.

<sup>53</sup> Rosenstein BJ, Cutting GR, for the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr* 1998;132:589-95.

<sup>54</sup> Cole P. Bronchiectasis. In : Brewis RAL, Corrin B, Geddes DM, Gibson GJ. *Respiratory Medicine.* WB Saunders Company Ltd. London 1995, p 1286-1316.

<sup>55</sup> Beck CS, Heiner DC. Selective immunoglobulin G4 deficiency and recurrent infections of the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1981;124:94-96.

<sup>56</sup> Wilson CB, Jonea PW, O'Leary CJ et al. Systemic markers of inflammation in stable bronchiectasis. *Eur Respir J* 1998;12:820-824.

<sup>57</sup> Thompson AB, Huerta G, Robbins RA, Sisson JH, Spurzem JR, Von Essen S et al. The bronchitis index. A semiquantitative visual scale for the assessment of airways inflammation. *Chest* 1993;103:1482-1488.



---

<sup>58</sup> Munro NC, Han LY, Curie DC, Strickland B, Cole PJ. Radiological evidence of progression of bronchiectasis. *Respir Med* 1992;86:397-401.

<sup>59</sup> Thickett KM, Kumararatne DS, Banerjee AK, Dudley R, Stableforth DE. Common variable immune deficiency: respiratory, pulmonary function and high-resolution scan findings. *QJM* 2002; 95:655-662.

# Utility of the Antibody Response to a Conjugated *Haemophilus influenzae* Type B Vaccine for Diagnosis of Primary Humoral Immunodeficiency

MARÍA-JOSÉ RODRIGO, MONTSERRAT VENDRELL, MARÍA-JESÚS CRUZ, MARC MIRAVITLLES, CARLOS PASCUAL, FERRAN MORELL, and JAVIER DE GRACIA

Departments of Pneumology and Biochemistry (Immunology Unit), Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; and Department of Pneumology, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain

Antibody response to an *Haemophilus influenzae* type b (Hib)-conjugated vaccine was studied in 59 healthy adults (mean age: 32 yr) and 22 patients with humoral immunodeficiencies (mean age: 32 yr) to determine its usefulness in the diagnosis of defective antibody formation. Twenty of the healthy adults and nine of the patients were also immunized with a pneumococcal vaccine. Serum specific antibodies were measured by ELISA. Adequate response to both vaccines was defined using the lower limit of the two-tailed 90% probability interval of postimmunization specific IgG of the healthy adults. By using this cutoff, responders were considered to be those with an absolute increase in anti-Hib IgG titers higher than 2.28  $\mu\text{g/ml}$ , and in anti-*Streptococcus pneumoniae* IgG higher than 395 arbitrary units/ml. With these criteria, 85% (50 of 59) of the healthy adults responded with anti-Hib IgG and 75% (15 of 20) with anti-pneumococcal IgG. All healthy adults receiving both vaccines responded to at least one. None of the patients with humoral immunodeficiencies responded to either vaccine. Evaluation of the antibody response to both the Hib and pneumococcal vaccines may facilitate the diagnosis of humoral immunodeficiency and selection of patients to receive immunoglobulin therapy.

Primary immunodeficiencies are one of the diagnoses to be considered in patients with increased susceptibility to respiratory infection. Of these immunodeficiencies, those with predominant antibody defects such as common variable immunodeficiency (1, 2), selective immunoglobulin G (IgG) subclass deficiency (1, 3, 4), and selective antibody deficiency with normal immunoglobulins (1, 5), may present initially in adult life. An early diagnosis is highly important because in most cases immunoglobulin therapy is indicated, thereby improving long-term prognosis (1). Though the measurement of serum immunoglobulins and IgG subclasses greatly helps in indicating the possible presence of these entities, it is insufficient to establish a definitive diagnosis as low levels have been described in healthy adults (6). It is therefore necessary to demonstrate a defect in specific antibody response, particularly to polysaccharide antigens such as the pneumococcal or *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine, to establish a definitive diagnosis and indicate immunoglobulin therapy (1), which is costly and not without risk (7, 8). However, the present lack of reference values of specific antibody response against these anti-

gens in adults, together with a uniform normal response criterion, renders its interpretation difficult (9–11).

We previously standardized an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to quantify IgG and its subclasses against the 23-valent pneumococcal vaccine and established a criterion for a normal response to the vaccine in healthy adults (12, 13). However, the results showed that not every healthy adult responded to the vaccine (12). The aim of this study was to evaluate the Hib-conjugated vaccine in addition to the pneumococcal vaccine in the diagnosis of humoral immunodeficiency in adults.

## METHOD

### Study Population

This was a cross-sectional study of the specific antibody response to a conjugated Hib vaccine in a group of healthy adults and a group of patients with humoral immunodeficiencies.

Fifty-nine healthy adult volunteers (30 women; age range: 20–59 yr; mean age: 32 yr) were studied. None had a history of recurrent or severe infections, acute or chronic pulmonary disease, primary or secondary immunodeficiency, autoimmune systemic disorder, or any disease or intake of drugs that might affect antibody production. They had not suffered any infection during the month preceding the vaccination. Forced spirometry, white cell count, creatinine, transaminases, and serum total immunoglobulin levels were within normal range.

Twenty-two patients with humoral immunodeficiencies characterized by defective antibody formation (17 men; age range: 17–64 yr; mean age: 32 yr) were also studied. Eighteen suffered from common variable immunodeficiency, two immunodeficiency with thymoma, and two X-linked agammaglobulinemia. The diagnosis was made according to the diagnostic criteria of the World Health Organization (WHO) immunodeficiency group (1). Twelve of these patients were receiving intravenous immunoglobulin therapy.

This study was approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron Hospitals.

### Immunization

All healthy adults and patients with humoral immunodeficiencies were immunized intramuscularly in the buttock with a single injection of Hib-conjugated vaccine composed of 15  $\mu\text{g}$  of Hib polyribosylribitol phosphate (Hib-PRP) linked to an outer membrane protein complex of *Neisseria meningitidis* (PedvaxHIB; Merck Sharp & Dohme, West Point, PA). Twenty of the healthy adults and nine of the patients were also immunized intramuscularly in the deltoids with 0.5 ml of PNU-Immune 23 polyvalent pneumococcal vaccine (Lederle Laboratories Division, Pearl River, NY).

Blood samples were drawn immediately before and 21 d after vaccination. These samples were centrifuged at 3,000 rpm for 15 min and the sera obtained were stored in aliquots frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until testing. In patients receiving intravenous immunoglobulins, the treatment was suspended 1 mo prior to vaccination and resumed after the second blood extraction.

### Immunoglobulin Quantification

Serum total IgG, IgA, and IgM levels were measured by kinetic nephelometry. IgG subclasses were measured by ELISA (3, 14).

(Received in original form October 21, 1999 and in revised form May 16, 2000)

The first two authors contributed equally to the design of the study and writing of the manuscript.

This research was supported by a Grant from "Fundació Catalana de Pneumologia 1994" and from the "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (FIS) (Exp. No. 97/0925).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Dr. Montserrat Vendrell, Ps Canalejas n<sup>o</sup>1 esc 3 3<sup>o</sup>1<sup>a</sup>, Girona 17001, Spain. E-mail: med003674@nacom.es

Am J Respir Crit Care Med Vol 162, pp 1462–1465, 2000  
Internet address: www.atsjournals.org

### Specific IgG and IgG Subclasses to *H. influenzae* Type B

Specific IgG, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub> to Hib were determined by ELISA based on a previous method described by Rodrigo and coworkers (3, 12) using an antigen of Hib oligosaccharides conjugated to human serum albumin (HbO-HA) kindly donated by Dr. P. Anderson (University of Rochester Medical Center, Rochester, NY). Results were expressed as  $\mu\text{g/ml}$  using a reference serum of 70, 30.9, and 16.1  $\mu\text{g/ml}$  of specific IgG, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub> against Hib, respectively, from the Center of Biological Evaluation and Review (CBER), U.S. Food and Drug Administration (FDA). Within-run coefficients of variation (CV) were 9.1%, 12.2%, and 9.5%, and day-to-day CV were 12%, 14%, and 11.3% for specific IgG, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub>, respectively. The minimal amount of antibody detectable by this assay was 0.027, 0.05, and 0.1  $\mu\text{g/ml}$  for specific IgG, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub>, respectively. To study the linearity of sera compared with reference serum, we performed titrations of five sera with anti-Hib IgG antibody levels between 5 and 132  $\mu\text{g/ml}$ , IgG<sub>1</sub> between 1.6 and 18  $\mu\text{g/ml}$ , and IgG<sub>2</sub> between 4.6 and 65.4  $\mu\text{g/ml}$ . The curves obtained from the sera and reference serum were plotted for linear regression analysis.

### Specific IgG to Pneumococcal Vaccine

Specific IgG to pneumococcal vaccine was measured by ELISA using the pneumococcal vaccine as antigen, as previously described (12).

### Specificity of the Antibodies to Hib Vaccine

*Inhibition experiments.* Increasing concentrations of soluble PRP, HbO-HA, and human albumin, ranging from 0 to 15  $\mu\text{g/ml}$ , were incubated with 1 ml of a 1:50 dilution of a pool of sera with specific IgG concentration of 86.70  $\mu\text{g/ml}$  for 2 h at 37° C. After centrifugation, the amount of specific IgG to Hib in the supernatant was measured by the same ELISA.

*Cross-reactivity between anti-Hib and anti-S. pneumoniae antibodies.* Two pools of sera with specific IgG concentrations to Hib of 7.2 and 86.7  $\mu\text{g/ml}$  were incubated with increasing concentrations of pneumococcal vaccine and PRP ranging from 0 to 15  $\mu\text{g/ml}$ , and the same ELISA was carried out.

*Purified IgG antibodies.* IgG-purified antibody preparations were obtained by affinity chromatography with protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Diagnostics, Sweden). A sera pool (IgA 212 mg/dl, IgM 136 mg/dl, IgG 932 mg/dl, IgG<sub>1</sub> 588 mg/dl, IgG<sub>2</sub> 492 mg/dl, IgG<sub>3</sub> 98 mg/dl, IgG<sub>4</sub> 72 mg/dl, and specific IgG to Hib 278  $\mu\text{g/ml}$ ) was loaded into the column and the fractions were collected from the maximum peak (higher than 0.200 A<sub>280</sub>) of the two elutes obtained. IgG, IgA, IgM, IgG subclasses and specific IgG to Hib were determined in each elute.

### Statistical Analysis

Antibody titers, as well as changes in titers, were transformed to their natural logarithms to meet the assumption of normality and were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI). Whenever the difference between post- and preimmunization titers was negative or the ratio was < 1, the lowest value of the variable was assigned. An arbitrary value, corresponding to the lower limit of the two-tailed 90% probability interval of postimmunization specific IgG, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub> of the healthy adults, was defined as the minimum significant increase for an adequate response. All subjects showing an increase in specific antibody titers equal to or greater than this value were considered to be responders. In the case of pneumococcal vaccine this value was 395 U/ml, as described elsewhere (12).

Statistical significance of differences among mean antibody values between the study populations was determined by Student's unpaired *t* test. The level of significance was  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Linearity of the ELISA Method for Anti-Hib Antibodies

No significant differences in the slopes of the lines were obtained by analysis of covariance (ANCOVA,  $F_{3,23} = 0.96$  for IgG,  $F_{5,35} = 1.83$  for IgG<sub>1</sub>, and  $F_{4,29} = 1.07$  for IgG<sub>2</sub>). We may therefore assume that the behavior of the reference and test sera was similar.

### Specificity of the Antibodies to the Hib Vaccine

*Effect of absorption with the PRP, HbO-HA, and human albumin.* Results of the specificity study of antibodies with soluble PRP or HbO-HA added to the sera showed a decrease in absorbance values of the ELISA to background levels, indicating effective competition with the coated HbO-HA antigen for antibody binding. Soluble HA added to the serum did not decrease absorbance.

*Cross-reactivity experiment.* Soluble pneumococcal polysaccharide added to the sera did not decrease the absorbance of specific IgG to Hib before or after incubation with pneumococcal vaccine.

*Purified IgG antibodies.* Elution patterns obtained from affinity chromatography were as follows: in the first peak the results were IgG 33 mg/dl, IgA 105 mg/dl, IgM 30 mg/dl, IgG<sub>1</sub> < 5 mg/dl, IgG<sub>2</sub> < 5 mg/dl, IgG<sub>3</sub> 20 mg/dl, IgG<sub>4</sub> < 5 mg/dl, and specific IgG to Hib < 0.027  $\mu\text{g/ml}$ . The results in the second peak were IgG 630 mg/dl, IgA 7 mg/dl, IgM 20 mg/dl, IgG<sub>1</sub> 360 mg/dl, IgG<sub>2</sub> 250 mg/dl, IgG<sub>3</sub> < 5 mg/dl, IgG<sub>4</sub> 35 mg/dl, and specific IgG to Hib 193.8 mg/dl.

### Antibody Response to the Hib Vaccine

Concentrations of specific total IgG, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub> against Hib in the healthy adults pre- and postimmunization are shown in Table 1. To define the response in this population, we calculated the two-tailed 90% probability interval (PI) of the log-transformed titers of the total IgG, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2</sub> in postimmunization sera. The lower PI limit was 2.28  $\mu\text{g/ml}$  for total IgG, 0.74  $\mu\text{g/ml}$  for IgG<sub>1</sub>, and 0.34  $\mu\text{g/ml}$  for IgG<sub>2</sub>. We considered as a responder a person who suffered an increase in antibody titers equal to or greater than these values.

Fifty of the 59 (85%) healthy adults met the response criteria for specific total IgG. When the specific response of IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> was studied, three of the nonresponders with specific total IgG responded with specific IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub>, three with specific IgG<sub>1</sub>, and one with specific IgG<sub>2</sub>, but two (3.4%) presented no response with any of the subclasses tested (Figure 1).

None of the 22 patients with humoral immunodeficiencies met the response criteria for specific total IgG. Specific IgG concentrations against Hib-PRP in these patients were significantly lower than in the healthy adults, both in pre- and postimmunization titers as well as in the increases ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ , and  $p < 0.0001$ , respectively) (Table 1).

### Antibody Response to the Pneumococcal Vaccine

Five of the 20 healthy adults (25%) who received the pneumococcal vaccine failed to respond with specific total IgG. None of the nine patients with humoral immunodeficiencies vaccinated with the pneumococcal vaccine responded with specific total IgG.

### Antibody Response to Both Vaccines

All 20 healthy adults (100%) who received the two vaccines responded to at least one with specific IgG. None of the nine patients with humoral immunodeficiencies who received the two vaccines responded to either.

## DISCUSSION

Uniform guidelines on the interpretation of normal antibody response remain to be adequately defined, and over- or underdiagnosis of defects in response may occur. The fold-rise in antibody titers is often used as a measure of the response (15, 16), but may be misleading, as it depends on the concentration of antibodies before immunization. This implies that a higher absolute increase is required in patients with higher preimmu-

TABLE 1  
SERUM-SPECIFIC ANTIBODY CONCENTRATIONS TO HIB-PRP AND TO *S. pneumoniae* IN THE HEALTHY ADULTS AND IN PATIENTS WITH HUMORAL IMMUNODEFICIENCIES\*

	Healthy Adults	Immunodeficiency Patients	p Value
Specific antibody titers to Hib-PRP	(n = 59)	(n = 22)	
Total IgG			
Preimmunization, $\mu\text{g/ml}$	2.2 (1.7–2.8)	0.8 (0.5–1.4)	< 0.0001
Postimmunization, $\mu\text{g/ml}$	15 (11–21)	0.7 (0.4–1.3)	< 0.0001
Increase, $\mu\text{g/ml}$	11 (7.9–16)	0.3 (0.2–0.4)	< 0.0001
Fold-increase	5.0 (3.5–7.0)	1.1 (0.6–1.5)	< 0.0001
IgG <sub>1</sub>			
Preimmunization, $\mu\text{g/ml}$	0.8 (0.6–1.0)		
Postimmunization, $\mu\text{g/ml}$	4.7 (3.5–6.3)		
Increase, $\mu\text{g/ml}$	2.8 (1.8–4.2)		
Fold-increase	3.7 (2.5–5.6)		
IgG <sub>2</sub>			
Preimmunization, $\mu\text{g/ml}$	0.8 (0.6–1.1)		
Postimmunization, $\mu\text{g/ml}$	4.7 (3.1–7.2)		
Increase, $\mu\text{g/ml}$	2.2 (1.2–4.2)		
Fold-increase	6.6 (3.6–1.3)		
Specific antibody titers to <i>S. pneumoniae</i>	(n = 20)	(n = 9)	
Total IgG			
Preimmunization, arbitrary U/ml	657 (456–858)	254 (105–402)	< 0.16
Postimmunization, arbitrary U/ml	2,606 (1,425–3,786)	217 (65–369)	< 0.0001
Increase, arbitrary U/ml	1,949 (873–3,025)	–37 (–146–71)	< 0.0001
Fold-increase	4.7 (2.7–6.6)	0.9 (0.6–1.2)	< 0.0001

Definition of abbreviations: Hib-PRP = *Haemophilus influenzae* polyribosylribitol phosphate; IgG = immunoglobulin G.

\* Data expressed as mean (95% CI)

nization levels than those with lower levels. In this study we used an arbitrary value as the minimum significant increase (MSI) to consider response to the vaccine as normal. MSI corresponds to the minimum concentration of postimmunization antibodies reached by 95% of the healthy adults. This value is not influenced by preimmunization antibody titers; it may be applied in the study of response to different vaccines (12), and permits direct comparisons between different populations.

The results of this study would indicate that not all healthy adults respond to one vaccine, even with the study of specific IgG subclasses. The possibility of none responding to two vaccines, however, is considerably reduced. On the other hand, none of the patients with humoral immunodeficiencies studied responded to either vaccine. In our opinion, therefore, the use of only one vaccine as a diagnostic test of a defective antibody formation may be insufficient and would require the study of another antigen. When primary immunodeficiency disease is suspected in patients with recurrent pyogenic sinopulmonary infections, the sequential study of serum immunoglobulins, IgG subclasses, and specific IgG antibody responses to at least two polysaccharide antigens would, in the proposed strategy, permit more selective diagnostic criteria to be established.

Antibody response to Hib vaccine among healthy adults varies widely. Comparison of results in different studies is difficult owing to differences in response criteria, population studied, type of vaccine used, and technical aspects. Most studies have been conducted in children (17), who may be af-

ected by a physiological delay in antibody response maturation or may have lower previous exposure to the antigen. Pure polysaccharide and conjugated vaccines, both with different concentrations of the polysaccharide, have been used in studies elsewhere (15, 16, 18–20). The polysaccharide of the vaccine was conjugated to a carrier protein, converting it into a thymus-dependent antigen with the aim of stimulating the antibody response in children under 2. The conjugated vaccine elicits a greater antibody response than the nonconjugated form in adults (18, 21), but whether it still maintains many of the characteristics of a polysaccharide response remains unclear (1). In this respect, Mäkelä and coworkers (18) showed that anti-Hib antibodies induced by the conjugated vaccine had, in adults, the same IgG subclass composition as the ones induced by the polysaccharide. Furthermore, although the IgG response to polysaccharide antigens in adults has been described mainly as being mediated by IgG<sub>2</sub> (22, 23), later reports indicate that both IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> contribute to the antibody response (12, 18, 22, 24, 25), at times even with IgG<sub>1</sub> being the predominant isotype (12, 22, 26). This would suggest that the immunoregulatory pathways that define isotype restriction patterns are complex and no single pattern can be unequivocally defined (27).

The production of antibodies to unconjugated and conjugated vaccines in patients with common variable immunodeficiency is undetectable, as we show in our study. In contrast, some patients diagnosed with more selective immunodeficien-

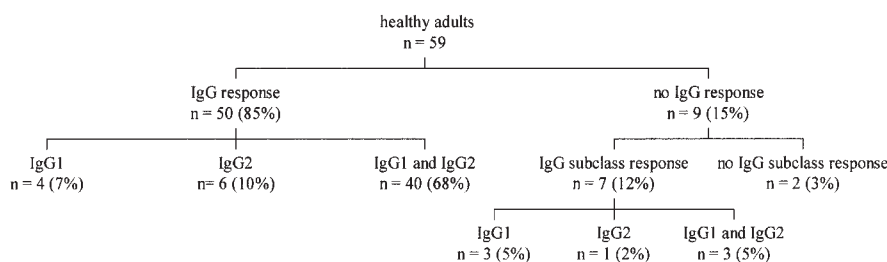


Figure 1. Distribution of the specific total IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, antibody responses against Hib in the healthy adult population. The number and percentage of individuals meeting response criteria for IgG and its subclasses are expressed.

cies, such as the selective deficiency of IgG<sub>2</sub>, particularly in the young, may respond to the conjugated vaccine, but not to the polysaccharide (28, 29). The possibility of an immunoregulation defect has been suggested here (28). Therefore, the unconjugated vaccine might on occasions be insufficient to establish the diagnosis of antibody deficiency while the conjugated vaccine could complete the study and identify which are the true nonresponders who in the end will require immunoglobulin therapy.

In this study, we described an ELISA that uses Hib oligosaccharides covalently linked to HbO-HA as an antigen for quantification of specific IgG and its subclasses to Hib. Low background, better sensitivity than a radiolabeled antigen binding assay (30), and high specificity have been obtained with this method. In addition, no cross-reactions existed with other polysaccharide antigens such as *Streptococcus pneumoniae*. The calibrated human reference serum approved by the FDA and used in this study allows the results to be expressed in mass per volume units and is the standard used in many of the published studies. Different studies carried out to evaluate the total contents of IgG anti-Hib in the reference serum (CBER, FDA 1983) using different assays and calibration systems showed differences in their concentration, ranging from values of 21.9 to 60.9 µg/ml (10). Commercially available kits that permit measurement of specific antibodies to Hib are now available; nevertheless, each laboratory should establish its own reference values, since there are many technical and genetic variables that may affect the results.

We conclude that this ELISA method and Hib-conjugated vaccine may be useful for studying specific antibody response. Evaluation of the antibody response to both the Hib and pneumococcal vaccines may facilitate the diagnosis of humoral immunodeficiency and selection of patients to receive immunoglobulin therapy.

**Acknowledgment:** The authors are grateful to Edelia Catalan, member of the nursing staff, to Tina Guerrero for help with statistical analyses, and to Barry Kench and Christine O'Hara for help with the English translation of the manuscript.

## References

1. Primary Immunodeficiency Diseases. 1999. Report of an IUIS Scientific Committee. *Clin Exp Immunol* 118(Suppl. 1):1-28.
2. Cunningham-Rundles, C. 1989. Clinical and immunological analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 9:22-33.
3. De Gracia, J., M. J. Rodrigo, F. Morell, M. Vendrell, M. Miravittles, M. J. Cruz, R. Codina, and J. M. Bofill. 1996. IgG subclass deficiencies associated with bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153:650-655.
4. De Gracia, J., F. Morell, J. M. Bofill, M. J. Rodrigo, and C. Coscolluela. 1986. Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 or IgG3. *N. Engl. J. Med.* 314:925-926.
5. Ambrosino, D. M., G. R. Siber, B. A. Chilmonezyk, J. B. Jernberg, and R. W. Finberg. 1987. An immunodeficiency characterized by impaired antibody responses to polysaccharides. *N. Engl. J. Med.* 26:790-793.
6. Nahm, M. H., K. Macke, O. Kwon, J. V. Madassery, L. A. Sherman, and M. G. Scott. 1990. Immunologic and clinical status of blood donors with subnormal levels of IgG2. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85:769-777.
7. Buckley, R. H., and R. I. Schiff. 1991. The use of intravenous immune globulin in immunodeficiency diseases. *N. Engl. J. Med.* 325:110-117.
8. De Gracia, J., M. Vendrell, L. Guarner, R. Vidal, M. Miravittles, C. Mayordomo, and F. Morell. 1995. Utilización de globulina gamma humana en el tratamiento de la inmunodeficiencia común variable. *Med. Clin. (Barc.)* 104:201-206.
9. Go, E. S., Z. K. Ballas. 1996. Anti-pneumococcal antibody response in normal subjects: a meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:205-215.
10. Herrmann, D. J., R. G. Hamilton, T. Barington, C. E. Frasch, G. Arakere, O. Mäkelä, L. A. Mitchell, J. Nagel, G. T. Rijkers, B. Zegers, et al. 1992. Quantitation of human IgG subclass antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide: results of an international collaborative study using enzyme immunoassay methodology. *J. Immunol. Methods* 148:101-114.
11. Madore, D. V., P. Anderson, B. D. Baxter, G. M. Carlone, K. M. Edwards, R. G. Hamilton, P. Holder, H. Käyhty, D. C. Phipps, C. C. Peeters, et al. 1996. Interlaboratory study evaluating quantitation of antibodies to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:84-88.
12. Rodrigo, M. J., M. Miravittles, M. J. Cruz, J. De Gracia, M. Vendrell, C. Pascual, and F. Morell. 1997. Characterization of specific immunoglobulin G (IgG) and its subclasses (IgG1 and IgG2) against the 23-valent pneumococcal vaccine in a healthy adult population: proposal for response criteria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:168-172.
13. Miravittles, M., J. de Gracia, M. J. Rodrigo, M. J. Cruz, M. Vendrell, R. Vidal, and F. Morell. 1999. Specific antibody response against the 23-valent pneumococcal vaccine in patients with  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency with and without bronchiectasis. *Chest* 116:946-952.
14. Rodrigo, M. J., R. Codina, J. De Gracia, F. Morell, and C. Pascual. 1992. Valores normales de las subclases de la inmunoglobulina G en una población de adultos: su importancia en el estudio de los déficits de las mismas. *Med Clin (Barc)* 98:166-170.
15. Ambrosino, D. M., G. Schiffman, E. C. Gotschlich, P. H. Schur, G. A. Rosenberg, G. G. DeLange, E. van Loghem, and G. R. Siber. 1985. Correlation between G2m(n) immunoglobulin allotype and human antibody response and susceptibility to polysaccharide encapsulated bacteria. *J. Clin. Invest.* 75:1935-1942.
16. Parkkali, T., H. Käyhty, T. Ruutu, L. Volin, J. Eskola, and P. Ruutu. 1996. A comparison of early and late vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate and pneumococcal polysaccharide vaccines after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 18:961-967.
17. Käyhty, H., H. Peltola, and J. Eskola. 1988. Immunogenicity and reactivity of four *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccines in Finnish 24-month-old children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7:574-577.
18. Mäkelä, O., P. Mattila, N. Rautonen, I. Seppälä, J. Eskola, and H. Käyhty. 1987. Isotype concentrations of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide (Hib) in young adults immunized with the polysaccharide as such or conjugated to a protein (Diphtheria Toxoid). *J. Immunol.* 139:1999-2004.
19. Käyhty, H., J. Eskola, H. Peltola, P. R. Rönnerberg, E. Kela, V. Karanko, and L. Saarinen. 1991. Antibody responses to four *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Am. J. Dis. Child.* 145:223-227.
20. Lucas, A. H., and D. N. Granoff. 1995. Functional differences in idiotypically-defined IgG1 anti-polysaccharide antibodies elicited by vaccination with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J. Immunol.* 154:4195-4202.
21. Shackelford, P. G., D. M. Granoff, S. J. Nelson, M. G. Scott, D. S. Smith, and M. H. Nahm. 1987. Subclass distribution of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J. Immunol.* 138:587-592.
22. Barret, D. J., and E. M. Ayoub. 1986. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin. Exp. Immunol.* 63:127.
23. Siber, G. R., P. H. Schur, A. C. Aisenberg, S. A. Weitzman, and G. Schiffman. 1980. Correlation between serum IgG2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N. Engl. J. Med.* 303:178-182.
24. Rautonen, N., J. Pelkonen, S. Sipinen, H. Käyhty, and O. Mäkelä. 1986. Isotype concentrations of human antibodies to group A meningococcal polysaccharide. *J. Immunol.* 137:2670-2675.
25. Barra, A., C. Bremond-Oury, A. Bajart, C. Griscelli, B. Fritzell, and J. L. Preud'homme. 1992. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and its tetanus toxoid conjugate in patients with recurrent infections or humoral immunodeficiency. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 21:231-234.
26. Oldfield, S. 1985. Class and subclass anti-pneumococcal antibody response in splenectomized patients. *Clin. Exp. Immunol.* 61:664-673.
27. Mond, J. J., A. Lees, and C. M. Snapper. 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* 13:655-692.
28. Insel, R. A., and P. W. Anderson. 1986. Response to oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Haemophilus influenzae* b in two patients with IgG<sub>2</sub> deficiency unresponsive to capsular polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* 315:499-503.
29. Vendrell, M., J. De Gracia, M. J. Rodrigo, M. J. Cruz, M. Miravittles, T. Alvarez, C. Mayordomo, and F. Morell. 1998. Antibody response to conjugate vaccine in patients with IgG2 deficiency and pulmonary disease (abstract). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:A174.
30. Phipps, D. C., J. West, R. Eby, M. Koster, D. V. Madore, and S. A. Quartaert. 1990. An ELISA employing a *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-human serum albumin conjugate correlates with the radioantigen binding assay. *J. Immunol. Methods* 135:121-128.

**Antibody production deficiency with normal IgG levels in bronchiectasis of unknown etiology**

**Authors\*:** Montserrat Vendrell, MD† , Javier de Gracia, MD, PhD ‡, María-José Rodrigo, MD, PhD §, María-Jesús Cruz, MB §, Antonio Alvarez, MD ‡, Maria Garcia, MD, PhD ll, Marc Miravittles, MD, PhD ‡.

**Center:** Departments of †Pneumology (Predoctoral fellow, Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona) and ll Biostatistics, Hospital Josep Trueta, Girona. Departments of ‡Pneumology and § Immunology, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. Spain.

**Address:** Dr Montserrat Vendrell  
Ps Canalejas nº1 esc 3 3º1ª  
Girona 17001, Spain  
e-mail: mont2188@separ.es  
tel: (34) 972 21 19 88  
FAX: (34) 93 274 60 83

\*The first two authors contributed equally to the design of the study and writing of the manuscript

This work was supported by a grant from the " Fundació Catalana de Pneumologia 1994" , "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (FIS) (Exp. No. 97/0925), and "Fundación Respira 2003".

## ABSTRACT

**Background:** No defined cause of bronchiectasis is currently found in approximately 50% of cases. Bronchiectasis is a common long-term complication in patients with primary hypogammaglobulinemia.

**Study objectives:** To ascertain whether antibody production deficiency with normal total serum IgG levels is associated with bronchiectasis.

**Design:** Antibody response to a pneumococcal unconjugate vaccine and an *H.influenzae* type b conjugate vaccine was prospectively studied in all consecutive adult patients with bronchiectasis of unknown etiology that were assessed in our chest outpatient clinic from January 1994 to October 2001. Serum-specific antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and the results compared with those obtained in a healthy adult control group. Antibody production deficiency was defined as a failure to respond to either vaccine.

**Results:** One hundred and seven patients were included in the study (mean age: 46.3 years). Antibody production deficiency was diagnosed in 12 patients (11%). A significantly higher incidence of otitis media, lower serum IgG<sub>2</sub> subclass levels, and lower preimmunization antibody levels to *S.pneumoniae* and *H.influenzae* type b were observed in patients with antibody production deficiency. The probability of antibody production deficiency in patients with a history of otitis media was 20%, in those with low IgG<sub>2</sub> subclass levels 26%, and in those with both 58%.

**Conclusions:** Antibody production deficiency with normal IgG levels may be associated with bronchiectasis, making it advisable to evaluate the antibody response to both the *H.influenzae* and pneumococcal vaccines in patients with bronchiectasis of unknown etiology, particularly in those with a history of otitis media, low IgG<sub>2</sub> subclass levels and low levels of baseline specific antibodies.

**KEYWORDS**

Bronchiectasis; antibody deficiency; primary immunodeficiency; *H.influenzae* type b vaccine; pneumococcal vaccine.



## ABBREVIATIONS

ABPA: Allergic bronchopulmonary aspergillosis.

$\alpha_1$ -ATD:  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency.

CI: Confidence Interval.

CF: Cystic fibrosis.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

FEV<sub>1</sub> : Forced expiratory volume in one second.

FVC : Forced vital capacity.

Hib : *Haemophilus influenzae* type b.

Hib-PRP: *Haemophilus influenzae* polyribosylribitol phosphate.

Ig : Immunoglobulin .

ns : Non-significant.

RRI : Recurrent respiratory infections.

## INTRODUCTION

Bronchiectasis represents the end stage of a variety of pathologic processes. With the decline in incidence of postinfectious conditions, other extrinsic insults or intrinsic defects that predispose to bronchial inflammation or respiratory infection are likely to be more significant in the etiology of bronchiectasis. However, no defined cause is currently found in approximately 50 percent of cases (1).

Bronchiectasis is a common long-term complication in patients with primary hypogammaglobulinemia, such as X-linked agammaglobulinemia (2) and common variable immunodeficiency (3). The diagnosis of these immunodeficiencies can be readily suspected from a serum electrophoresis, and early diagnosis has significant implications for prognosis and management since immunoglobulin-replacement therapy may prevent progression of lung damage (4,5). Other more selective defects of the humoral system, such as selective immunoglobulin (Ig) G subclass deficiency (6), have been associated with bronchiectasis (1,7,8,9). However, since low levels of IgG subclasses have also been described in healthy adults (10), additional evaluation of antibody production is recommended to facilitate the diagnosis of humoral immunodeficiency and selection of patients to receive immunoglobulin therapy (11).

On the other hand, failure to produce antibodies to polysaccharide vaccines has been reported in a healthy population (12) and in patients with recurrent respiratory infections and normal serum IgG levels (13,14,15). In some cases, however, this lack of response can be overcome by administration of a polysaccharide-protein conjugate vaccine (16,17,18,19,20,21). For this reason, the joint evaluation of immune response to a polysaccharide vaccine and a polysaccharide conjugate vaccine appears to be more appropriate to complete the screening for antibody production deficiency (22).

To ascertain whether antibody production deficiency with normal total serum IgG levels is associated with bronchiectasis, we studied the antibody response to both the pneumococcal unconjugate vaccine and the *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccine in adult patients with bronchiectasis of unknown etiology .

## METHODS AND MATERIALS

From January 1994 to October 2001, we studied all consecutive adult patients with bronchiectasis that were assessed in our chest outpatient clinic. A questionnaire was completed for every patient, providing information on smoking habits, drugs used in treatment and history of infectious and pulmonary diseases. Patients were excluded if they had any recognized cause of bronchiectasis: a history of pulmonary tuberculosis, aspiration or inhalation injury, lung abscess or childhood respiratory infections (pertussis, measles); evidence of cystic fibrosis (CF) (sweat test and CF transmembrane conductance regulator gene analysis by PE Applied Biosystems) (23), allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA),  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency ( $\alpha_1$ -ATD), Kartagener's syndrome, Young's syndrome, congenital defects, bronchial obstruction, hypogammaglobulinemia, secondary immunodeficiencies, any disease or drug intake that might affect antibody production, or other systemic diseases associated with bronchiectasis (24).

Bronchiectasis was diagnosed clinically and by high-resolution computed tomography. The presence and extent of bronchiectasis were graded as: involvement of one lobe, two lobes, bilateral involvement and involvement of more than three lobes.

Patients were immunized intramuscularly with Hib-conjugate vaccine (PedvaxHIB; Merck Sharp & Dohme, West Point, PA) and polyvalent pneumococcal vaccine (PNU-Immune 23; Lederle Laboratories Division, Pearl River, NY) (12,22). Blood samples were drawn immediately before and 21 days after vaccination. Patients were required to have no evidence of exacerbations during the month preceding vaccination. This study was approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron Hospitals.

Serum total IgG, IgA and IgM levels were measured by kinetic nephelometry and IgG subclasses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (7,25). Reference values in adults were 850-1,600 mg/dl for IgG, 261-1,081 mg/dl for IgG<sub>1</sub>, 112-408 mg/dl for IgG<sub>2</sub>, 22-

288 mg/dl for IgG<sub>3</sub> and 5-156 mg/dl for IgG<sub>4</sub> (7,25). Hypogammaglobulinemia was defined as a serum IgG level < 400mg/dl, IgA deficiency as undetectable IgA serum concentrations (<7 mg/dl) and low levels of IgG subclasses as serum levels below reference values (7).

Antibodies to pneumococcal and Hib antigens were measured by ELISA, as previously described (12,22); the pneumococcal vaccine and an Hib oligosaccharide conjugated to human serum albumin were used as antigens (12,22).

The control group was made up of 79 prospectively enrolled healthy adult volunteers, forty of whom (mean age: 29.5 years) were studied to establish a criterion for a normal response to the pneumococcal vaccine, and 59 (mean age: 32 years) to establish a criterion for a normal response to the Hib-conjugate vaccine as we published previously (12,22). Twenty of the 79 healthy adults received both vaccines (22). None had a history of recurrent or severe infections, acute or chronic pulmonary disease, primary or secondary immunodeficiency, autoimmune systemic disorder or any disease or intake of drugs that might affect antibody production. They had not suffered any infection during the month preceding the vaccination. Forced spirometry, white-cell count, creatinine, transaminases and serum total immunoglobulin levels were within normal range. An arbitrary value, corresponding to the lower limit of the two-tailed 90% probability interval of postimmunization specific IgG of the healthy adults, was defined as the minimum significant increase for an adequate response. All subjects showing an increase in specific antibody titers equal to or greater than this value were considered to be responders. In the case of pneumococcal vaccine this value was 395 arbitrary units/ml, and in the case of Hib 2.28 µg/ml, as described elsewhere (12,22). To determine a diagnostic criterion of antibody production deficiency, we studied specific antibody response to pneumococcal and Hib-conjugate vaccine in the 20 of the 79 healthy adults that received the two vaccines, and the results were compared with those obtained in 22 patients ( mean age: 32 years) with humoral immunodeficiencies characterized by defective

antibody formation (18 common variable immunodeficiency, two immunodeficiency with thymoma and two X-linked agammaglobulinemia) (22). Antibody production deficiency was defined as a failure to respond to either vaccine (22). At the beginning of the study sera from the control group and from the bronchiectasis patients were simultaneously obtained. Sera from the patients were stored in aliquots frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the assay method to quantify specific antibodies was standardized, normal antibody response to both vaccines established, and antibody production deficiency defined, then they were tested. From then on, all sera obtained from patients were sent immediately for testing.

Sputum specimens for bacteria culture were obtained. Pulmonary function parameters studied were forced expiratory volume in one second ( $\text{FEV}_1$ ), and forced vital capacity (FVC). Predicted values were taken from Roca (26).

### **Statistical Analysis**

Categorical variables are shown as percentages, and continuous variables as a mean and 95% confidence interval (CI). Specific antibody titers were transformed to their natural logarithms to meet the assumption of normality and expressed as the geometric mean and 95% CI. Bivariate analyses for continuous variables were made with Student's *t* test or Mann-Whitney U test, as appropriate. Chi-square and Fisher's exact test were used for comparison of categorical variables and Spearman's test for correlations. The probability of antibody production deficiency was calculated by logistic regression, including significant clinical and immunoglobulin variables in bivariate analyses. We calculated the cut-off values (27) of preimmunization specific antibody levels that provide the maximum probability of a correct prediction of the response to a vaccine. Significance level was 5% (two-tailed). The statistical package used was SPSS 10.0.6 (SPSS Inc, Chicago, IL) (28).

## RESULTS

A total of 173 consecutive clinically-stable adult patients with bronchiectasis of unknown etiology were assessed during the study period. Sixty-six patients were excluded (46 females and 20 males; age range: 15 - 82 years; mean age: 44.4 years) owing to previous pneumococcal or Hib immunization, insufficient data or their not wishing to take part.

One hundred and seven patients were finally included in the study (63 females and 44 males; age range: 16 - 77 years; mean age: 46.3 years). Twelve of the 107 patients (11%) failed to respond to either of the vaccines and an antibody production deficiency was diagnosed. In addition, 15 (14%) of the patients failed to respond to the Hib-conjugate vaccine only, and 20 (19%) to the pneumococcal unconjugate vaccine only.

No significant differences were detected in specific antibody levels to Hib and *S.pneumoniae* between healthy control subjects and patients with bronchiectasis (Table 1). Nor were differences found between the two groups when patients with antibody production deficiency were excluded.

Patient characteristics according to antibody deficiency are summarized in tables 2 and 3. A significantly higher incidence of otitis media ( $p=0.01$ ), lower serum IgG<sub>2</sub> subclass levels ( $p=0.001$ ) and lower preimmunization antibody levels to *S.pneumoniae* and Hib ( $p=0.03$  and  $p<0.0001$ , respectively) were observed in patients with antibody production deficiency. No significant differences were found between the two groups in the remaining clinical, immunological, microbiological and pulmonary function parameters. According to logistic regression, the probability of antibody production deficiency in patients with a history of otitis media was 20%, in those with low IgG<sub>2</sub> subclass serum levels 26%, and in those with both 58%.

Low levels of any of the IgG subclasses were observed in 46 (43%) of the patients with bronchiectasis, with the greater incidence being found in patients with antibody

production deficiency ( $p=0.0008$ ), although only for IgG<sub>2</sub> subclass was the difference significant ( $p= 0.0001$ ) (Table 4).

Moderate correlations were observed between pre- and postimmunization IgG levels to *S.pneumoniae* ( $r = 0.7$ ) and also between pre- and postimmunization IgG to Hib ( $r = 0.5$ ). Low correlations were found between baseline IgG<sub>2</sub> levels and both pre- and postimmunization IgG to *S.pneumoniae* ( $r= 0.4$  and  $r= 0.41$ , respectively). A low correlation between baseline IgG<sub>2</sub> levels and preimmunization IgG to Hib ( $r= 0.3$ ) was observed but none between the former and postimmunization IgG to Hib.

The optimal cut-off values of the preimmunization specific antibody levels that provide the maximum probability of a correct prediction of the response to a vaccine were 434 U/ml and 2.2 µg/ml for *S.pneumoniae* and Hib, respectively. These values were close to the 50<sup>th</sup> percentile of preimmunization specific antibody levels in healthy controls for both vaccines (575 U/ml and 2.3 µg/ml for *S.pneumoniae* and Hib, respectively). The sensitivity of the preimmunization specific antibody level when the 50<sup>th</sup> percentile was chosen as a cut-off value was 84% for *S.pneumoniae* and 80% for Hib (Fig 1 and 2).



## DISCUSSION

This study showed an antibody production deficiency with normal IgG levels in 11% of adult patients with bronchiectasis, in whom most of the known causes had been ruled out. Patients with antibody production deficiency presented a significantly higher incidence of otitis media, lower serum IgG<sub>2</sub> subclass levels and lower preimmunization antibody levels to *S.pneumoniae* and Hib.

The immune response to specific antigens should be tested to diagnose an antibody production deficiency. Identification of this underlying defect may have major implications for management, since immunoglobulin therapy might prevent progression of lung damage, as in other antibody deficiencies (4,5). However, uniform guidelines on such a diagnosis have yet to be adequately defined. This is probably due to the paucity of studies on antibody production in the healthy adult population and lack of a uniform criterion for vaccine response. Furthermore, since a proportion of the healthy population may not respond to a vaccine (12,22), the inability to produce a satisfactory response to immunization with a single vaccine may not suffice to diagnose humoral immunodeficiency and the evaluation of at least two vaccines is advisable. In fact, the percentage of patients with bronchiectasis failing to respond to only one of the vaccines (19% to *S.pneumoniae* vaccine and 14% to Hib conjugate vaccine) in the present study was similar to that observed in the healthy population (20% to *S.pneumoniae* and 15% to Hib-conjugate vaccine) (12,22); however, none of the healthy population who received the two vaccines failed to respond to both (22), and none of the patients with primary humoral immunodeficiencies responded to either of the vaccines (22).

Specific antibody levels in patients with bronchiectasis were investigated in two previous studies (1,9). However, since considerable differences exist regarding criteria for study population selection, vaccination indication, response to a vaccine, and humoral

immunodeficiency diagnosis, the results are difficult to compare (Table 5). In this work, as distinct from the previous studies, we assessed bronchiectasis patients in whom a comprehensive study had failed to establish a cause. The only criterion for the selection of the study population was to have bronchiectasis of unknown etiology, without establishing any other immunological criterion that had not been previously demonstrated. The response to two vaccines (a polysaccharide and a polysaccharide conjugate vaccine) was evaluated in all the patients. The criteria of response to each vaccine were based on the results obtained in the healthy adult population; the values used as a measure of the response were not influenced by preimmunization antibody titers and may be applied in the study of response to different vaccines as well as permitting direct comparisons between different populations (12,22). The diagnosis criterion of antibody production deficiency was based on the results obtained in both healthy control group and patients with known humoral primary immunodeficiency (12,22), all in the same laboratory. Furthermore, this is the first study in which the clinical and immunological characteristics of patients with antibody production deficiency and bronchiectasis have been reported, and in which the optimal cut-off values of the preimmunization specific antibody levels that provide the maximum probability of a correct prediction of the response to a vaccine were calculated. The great variability in baseline specific antibody levels and the lack of a good correlation between pre- and postimmunization specific antibody levels observed in our study render it difficult to establish a value below which vaccination should be indicated to complete the evaluation of antibody-mediated immunity. Although the values of the 25<sup>th</sup> percentile of the normal range used by Pasteur et al (1) may be useful, the 50<sup>th</sup> percentile could be more appropriate to avoid underdiagnosis, as shown in this study.

We found that patients with a history of otitis media were more likely to have an antibody production deficiency; since this is a common infection in patients with primary

hypogammaglobulinemia (2,3) but not in patients with bronchiectasis, a systemic predisposition to the infection, and not just at respiratory level, is suggested. No significant differences in the incidence of other infections also common in patients with primary hypogammaglobulinemia, such as sinusitis, recurrent lower respiratory tract infection or recurrent pneumonia (2,3) were observed between patients with and without antibody production deficiency. This might be due to the fact that many patients with bronchiectasis may have a tissue predisposition of the whole respiratory tract to development of recurrent infection regardless of their etiology (29).

On the other hand, low IgG subclass levels have been associated with increased susceptibility to respiratory infections and bronchiectasis with variable prevalence depending on selection criteria of the study population, normal reference values, and measurement techniques used (1,7,8,9). The subclass deficiency related to a greater susceptibility to infection is that of IgG<sub>2</sub>, which is often associated with an inability to produce antibodies to polysaccharide antigens (11). In this study, 50% of patients with antibody production deficiency had low IgG<sub>2</sub> subclass levels. However, not all patients with low IgG<sub>2</sub> levels had antibody production deficiency, as had already been observed in a healthy population by Nahm et al (10). This may be due, in part, to the fact that the IgG response to polysaccharide antigens is not limited to IgG<sub>2</sub>, but may also be due to IgG1 (12,22,30,31). Therefore, IgG<sub>2</sub> levels are probably not predictive of specific antibody levels (32) and antibody response (11), as shown by the scant correlation found in this study. Thus, although patients with low IgG<sub>2</sub> subclass levels were more likely to have an antibody production deficiency, a study of antibody production should be made before immunoglobulin treatment can be recommended. On the other hand, the finding of low IgG<sub>3</sub> levels or undetectable levels of IgG<sub>4</sub> was similar in patients with or without antibody production deficiency and its role in predisposition to infection remains unclear (33).

Although bronchiectasis elicits a hyperimmune response in patients with normal immunological status, with IgA, IgG and IgG subclass serum levels often being increased (7,8,9,34), no differences were observed in specific antibody levels to Hib and to *S.pneumoniae* between patients with bronchiectasis without antibody deficiency and healthy adults. This may be due to the great variability in basal specific antibody levels and antibody response in both populations. On the other hand, specific antibody levels in the patients with antibody production deficiency were similar to those observed in patients with known humoral immunodeficiencies (22).

Based on the results of our study, a 5-6% incidence of antibody production deficiency should be expected if the bronchiectasis population is considered as a whole, since in approximately 50% of patients the etiology is unknown (1). Thus, the determination of antibody production does not appear to be warranted in the routine assessment of patients with bronchiectasis, and a guide for study indication would be appropriate. The results of this study showed that antibody production deficiency with normal IgG may be associated with bronchiectasis, making it advisable to evaluate the antibody response to both the Hib conjugate and pneumococcal unconjugate vaccines in patients with bronchiectasis in whom other known causes have been reasonably ruled out, particularly in those with a history of otitis media, low IgG<sub>2</sub> subclass serum levels and low levels of baseline specific antibodies. Future studies should be done to determine the effectiveness of immunoglobulin therapy in such patients.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to Edelia Catalan, member of the nursing staff; and to Barry Kench and Christine O'Hara for help with the English translation of the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Pasteur MC, Helliwell SM, Houghton SJ et al. An investigation into causative factors in patients with bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1277-1284.
- 2 Hermaszewski RA, Webster ADB. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Quarterly Journal of Medicine* 1993;86:31-42.
- 3 Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999;92:34-48.
- 4 De Gracia J, Vendrell M, Guarner L et al. Utilización de gammaglobulina humana en el tratamiento de la inmunodeficiencia común variable. [ The use of human gammaglobulin in the treatment of common variable immunodeficiency ]. *Med Clin ( Barc)* 1995;104:201-206.
- 5 Roifman CM, Levison H, Gelfand EW. High-dose versus low-dose intravenous immunoglobulin in hypogammaglobulinaemia and chronic lung disease. *Lancet* 1987;1:1075-1077.
- 6 De Gracia J, Morell F, Bofill JM et al. Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 or IgG3. *N Engl J Med* 1986;314:925-926.
- 7 De Gracia J, Rodrigo MJ, Morell F et al. IgG subclass deficiencies associated with bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:650-655.
- 8 Hill SL, Mitchell JL, Burnett D et al. IgG subclasses in the serum and sputum from patients with bronchiectasis. *Thorax* 1998;53:463-468.
- 9 Stead A, Douglas JG, Broadfoot CJ et al. Humoral immunity and bronchiectasis. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:325-330.
- 10 Nahm MH, Macke K, Kwon O et al. Immunologic and clinical status of blood donors with subnormal levels of IgG2. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85; 769-77.
- 11 Primary Immunodeficiency Diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. *Clin Exp Immunol* 1999;118 (Suppl 1):1-28.

12 Rodrigo MJ, Miravittles M, Cruz MJ et al. Characterization of specific immunoglobulin G (IgG) and its subclasses (IgG1 and IgG2) against the 23-valent pneumococcal vaccine in a healthy adult population: proposal for response criteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:168-172.

13 Ambrosino DM, Siber GR, Chilmonczyk BA et al. An immunodeficiency characterized by impaired antibody responses to polysaccharides. *N Engl J Med* 1987; 26:790-793.

14 Sanders LAM, Rijkers GT, Kuis W et al. Defective antipneumococcal polysaccharide antibody response in children with recurrent respiratory tract infections. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:110-119.

15 Miravittles M, de Gracia J, Rodrigo MJ et al. Specific antibody response against the 23-valent pneumococcal vaccine in patients with  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency with and without bronchiectasis. *Chest* 1999;116:946-952.

16 Schneider LC, Insel RA, Howie G et al. Response to a *Haemophilus influenzae* type b diphtheria CRM197 conjugate vaccine in children with a defect of antibody production to a *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:948-953.

17 Herrod HG, Gross S, Insel R. Selective antibody deficiency to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccination in children with recurrent respiratory tract infection. *J Clin Immunol* 1989; 9: 429-434.

18 Zielen S, Buring I, Strand N et al. Immunogenicity and tolerance of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in nonresponders to the 23-valent pneumococcal vaccine. *Infection and Immunity* 2000;68:1435-1440.

19 Insel RA, Anderson PW. Response to oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Haemophilus influenzae* b in two patients with IgG<sub>2</sub> deficiency unresponsive to capsular polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1986; 315: 499-503.

- 20 Musher DM, Groover JE, Watson DA et al. IgG responses to protein-conjugated pneumococcal capsular polysaccharides in persons who are genetically incapable of responding to unconjugated polysaccharides. *Clin Infectious Dis* 1998;27:1487-90.
- 21 Sorensen RU, Leiva LE, Giangrosso PA et al. Response to a heptavalent conjugate *Streptococcus pneumoniae* vaccine in children with recurrent infections who are unresponsive to the polysaccharide vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:685-691.
- 22 Rodrigo MJ, Vendrell M, Cruz MJ et al. Utility of the antibody response to a conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine for diagnosis of primary humoral immunodeficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1462-1465.
- 23 Rosenstein BJ, Cutting GR, for the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr* 1998;132:589-95.
- 24 Cohen M, Sahn SA. Bronchiectasis in systemic diseases. *Chest* 1999;116:1063-1074.
- 25 Rodrigo MJ, Codina R, De Gracia J et al. Valores normales de las subclases de la inmunoglobulina G en una población de adultos. Su importancia en el estudio de los déficits de las mismas. [Normal values of the IgG subclasses in an adult population and their importance in a study of the deficits of it]. *Med Clin. (Barc)* 1992; 98:166-170.
- 26 Roca J, Sanchís JA, Agustí-Vidal A et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986;22:217-224.
- 27 Robert C, Vermont J, Bosson JL. Formulas for threshold computations. *Computer and biomedical research* 1991; 24:514-529.
- 28 Armitage P, Berry G. *Statistical methods in medical research*. Blackwell Scientific Publications; 1987.
- 29 Cole P. Bronchiectasis. In : Brewis RAL, Corrin B, Geddes DM, Gibson GJ. *Respiratory Medicine*. WB Saunders Company Ltd. London 1995, p 1286-1316.
- 30 Shackelford PG, Granoff DM, Nelson SJ et al. Subclass distribution of human antibodies to

*Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. J Immunol 1987;138:587-592.

31 Mäkelä O, Mattila P, Rautonen N et al. Isotype concentrations of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide (Hib) in young adults immunized with the polysaccharide as such or conjugated to a protein (Diphtheria Toxoid). J Immunol 1987;139:1999-2004.

32 Hazlewood M, Nusrat R, Kumararatne DS et al. The acquisition of anti-pneumococcal capsular polysaccharide *Haemophilus influenzae* type b and tetanus toxoid antibodies, with age, in the UK. Clin Exp Immunol 1993;93: 157-164.

33 Beck CS, Heiner DC. Selective immunoglobulin G4 deficiency and recurrent infections of the respiratory tract. Am Rev Respir Dis 1981;124:94-96.

34 Wilson CB, Jonea PW, O'Leary CJ et al. Systemic markers of inflammation in stable bronchiectasis. Eur Respir J 1998;12:820-824.



## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Preimmunization antibody levels to *H.influenzae* type b in healthy control subjects, in responding and nonresponding patients to *H.influenzae* vaccine. The 25<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> percentiles are those of preimmunization specific antibody levels in healthy control subjects.

Figure 2: Preimmunization antibody levels to *S.pneumoniae* in healthy control subjects, in responding and nonresponding patients to *S.pneumoniae* vaccine. The 25<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> percentiles are those of preimmunization specific antibody levels in healthy control subjects

Table 1. Serum-specific antibody concentrations to Hib-PRP and *S.pneumoniae* in healthy control subjects and patients with bronchiectasis of unknown etiology\*

	Healthy Controls †	Patients
Specific antibody titers		
Total IgG to Hib-PRP	(n = 59)	(n=107)
Preimmunization – µg/ml	2.2 (1.7-2.8)	2.05 (1.8-2.4)
Postimmunization – µg/ml	15 (11-21)	16.3 (11.7-22.6)
Increase – µg/ml	11 (7.9-16)	12.3 (8.6-17.6)
Fold-increase	5.0 (3.5-7.0)	6.4 (4.6-8.8)
Total IgG to <i>S. pneumoniae</i>	(n = 40 )	(n = 107)
Preimmunization – U/ml	508 (407-645)	433 (344-539)
Postimmunization – U/ml	1,686 (1,274-2,230)	1,480 (1,188-1,863)
Increase – U/ml	812 (441-1,495)	804 (608-1,075)
Fold-increase	3.0 (2.2-4.0)	2.8 (2.3-3.4)

\* Data expressed as geometric mean (95% CI).

† See references (12,22).

Table 2. Characteristics of patients with bronchiectasis according to antibody deficiency

Characteristics	No antibody deficiency (n=95)	Antibody deficiency (n=12)	p Value
Age — years *	46 (42-49)	49 (37-61)	ns
Age at onset of symptoms — years*	21 (17-25)	21 (9-34)	ns
Female — n (%)	55 (58)	7 (58)	ns
Smoker or ex-smoker — n (%)	27 (28)	5 (42)	ns
Otitis media — n (%)	14 (15)	6 (50)	0.01
Sinusitis — n (%)	24 (26)	5 (42)	ns
Pneumonia — n (%)	52 (55)	7 (58)	ns
Recurrent pneumonia — n (%)	28 (29)	5 (42)	ns
RRI — n (%)	21 (22)	4 (33)	ns
Immunoglobulins mg/dl *			
IgG	1,086 (1,012-1,160)	1,024 (783-1,264)	ns
IgG <sub>1</sub>	644 (586-700)	673 (479-866)	ns
IgG <sub>2</sub>	317 (286-347)	161 (87-235)	0.001
IgG <sub>3</sub>	55 (46-63)	55 (32-78)	ns
IgG <sub>4</sub>	31 (24-39)	39 (<5-81)	ns
IgA	206 (179-233)	158 (73-243)	ns
IgM	141 (117-165)	121 (40-202)	ns
IgG to Hib-PRP — µg/ml †			
Preimmunization	2.1 (1.8-2.5)	1.2 (0.9-1.5)	<0.0001
Postimmunization	21.5 (15.5-29.6)	1.5 (1.1-2.0)	<0.0001
IgG to <i>S.pneumoniae</i> — U/ml †			
Preimmunization	469 (369-596)	219 (119-403)	0.03
Postimmunization	1,772 (1,408-2,230)	376 (247-567)	<0.0001

RRI= recurrent respiratory infections ( three or more episodes of acute bronchitis per year with fever above 37.5°C); Hib-PRP = *H. influenzae* polyribosylribitol phosphate; ns = non-significant.

\* Data expressed as mean (95% CI) and †geometric mean (95%CI).

Table 3. Characteristics of patients with bronchiectasis according to antibody deficiency

Characteristics	No antibody deficiency (n=95)	Antibody deficiency (n=12)
Use of steroids — n (%)		
Not used	33 (35)	4 (33)
Inhaled	57 (60)	7 (59)
Oral	5 (5)	1 (8)
Sputum microbiology — n (%)		
Negative	49 (52)	8 (67)
<i>H.influenzae</i>	15 (16)	3 (25)
<i>S.pneumoniae</i>	6 (6)	0
<i>P.aeruginosa</i>	20 (21)	1 (8)
<i>S.aureus</i>	2 (2)	0
Others	3 (3)	0
Extent of bronchiectasis — n (%)		
1 lobe	20 (21)	1 (8)
2 lobes	11 (11)	4 (34)
Bilateral	46 (48)	6 (50)
More than 3 lobes	18 (20)	1 (8)
Pulmonary function *		
FVC — % of predicted	77 (73-81)	76 (65-88)
FEV <sub>1</sub> — % of predicted	72 (67-78)	68 (53-83)

\* Data expressed as mean (95% CI)

Table 4. Frequency of low levels of immunoglobulin G (IgG) subclasses and IgA deficiency in patients with bronchiectasis of unknown etiology.\*

	Patients			p Value
	All (n=107)	No antibody deficiency (n=95)	Antibody deficiency (n=12)	
Low levels of IgG Subclasses	46 (43)	35 (37)	11 (92)	0.0008
IgG <sub>2</sub>	11 (10)	5 (5)	6 (50)	0.0001
Isolated IgG <sub>2</sub>	4	1	3	
IgG <sub>2</sub> -IgG <sub>3</sub>	2	2	0	
IgG <sub>2</sub> -IgG <sub>4</sub>	4	1	3	
IgG <sub>2</sub> -IgG <sub>3</sub> -IgG <sub>4</sub>	1	1	0	
IgG <sub>3</sub>	12 (11)	11 (12)	1 (8)	ns
IgG <sub>4</sub>	20 (19)	17 (18)	3 (25)	ns
IgG <sub>3</sub> -IgG <sub>4</sub>	3 (3)	2 (2)	1(8)	ns
IgA deficiency	15 (14)	12 (13)	3 (25)	ns

\*Values are expressed as data (%).

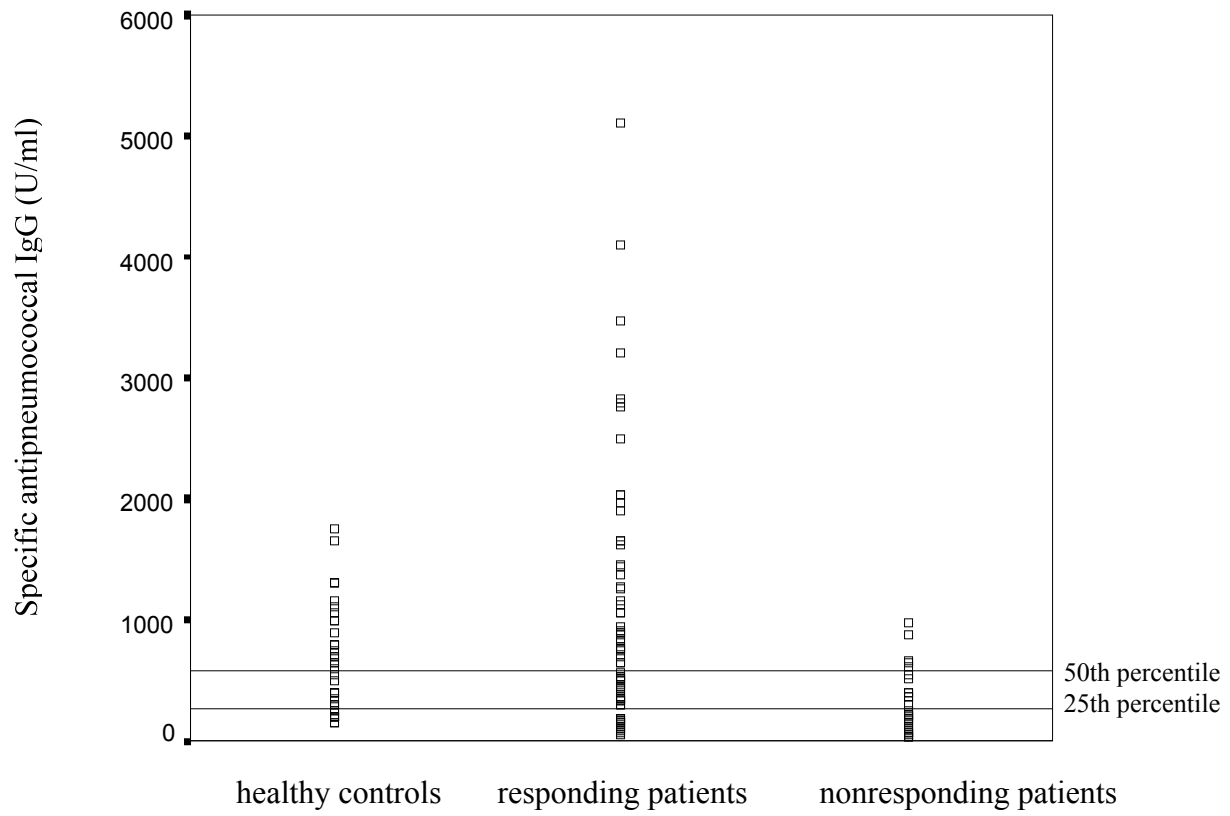
Table 5. Antibody production deficiency in patients with bronchiectasis. Vaccination indication, diagnostic criteria, and the results in different studies.

	Vendrell	Pasteur *	Stead *
Study population	Bronchiectasis of unknown etiology	Bronchiectasis of any etiology	Bronchiectasis. No CF, ABPA or $\alpha_1$ -ATD
N° patients	107	150	56
<b>Pneumococcal Vaccine</b>			
Patients			
Selection criteria	Bronchiectasis of unknown etiology	Baseline specific antibody level < 25 <sup>th</sup> percentile of normal range	Baseline specific antibody level <95 <sup>th</sup> centiles of normal range
N° patients with criteria	107	41	6
N° patients vaccinated	107	34	3
Control Groups			
Unimmunized population	-	72	240
Immunized population	40	-	-
Normal response criteria	increase $\geq$ 395 U/ml	a two-fold rise	a ten-fold rise and above normal range
<b>Hib conjugate vaccine</b>			
Patients			
Selection criteria	Bronchiectasis of unknown etiology	-	Undetectable baseline specific antibody level
N° patients with criteria	107	-	26
N° patients vaccinated	107	-	11
Control Groups			
Unimmunized population	-	-	168
Immunized population	59	-	-
Normal response criteria	increase $\geq$ 2.28 ug/ml	-	a ten-fold rise and above 1 $\mu$ g/ml
<b>Humoral immunodeficiency</b>			
Diagnostic criteria	No response to Hib and pneumococcal vaccine	No response to pneumococcal vaccine	No response to Hib or pneumococcal vaccine
N° of diagnoses	12	10	1

\* See references (1, 9).



Figure 2







ELSEVIER

International Immunopharmacology 4 (2004) 745–753

---



---

International  
Immunopharmacology

---



---

www.elsevier.com/locate/intimp

## Immunoglobulin therapy to control lung damage in patients with common variable immunodeficiency<sup>☆</sup>

Javier de Gracia<sup>a,\*</sup>,<sup>1</sup>, Montserrat Vendrell<sup>b,1</sup>, Antonio Álvarez<sup>a</sup>, Esther Pallisa<sup>c</sup>,  
 Maria-José Rodrigo<sup>d</sup>, David de la Rosa<sup>a</sup>, Fernando Mata<sup>a</sup>,  
 Jordi Andreu<sup>c</sup>, Ferran Morell<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pneumology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Roger de Flor 235 bajos 2<sup>a</sup>, 08025 Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Department of Pneumology, Hospital Josep Trueta, Girona (Predoctoral Fellow, Department of Medicine UAB), Spain

<sup>c</sup>Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>d</sup>Department of Biochemistry (Immunology Unit), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Received 2 January 2004; received in revised form 17 February 2004; accepted 25 February 2004

---

### Abstract

**Background:** Lung damage progression is the most frequent condition in patients with common variable immunodeficiency (CVID). Appropriate immunoglobulin dose adjustments and follow-up guidelines to evaluate this have not been well established. **Objective:** To assess the evolution of lung damage once stable residual serum levels of IgG over 600 mg/dl had been achieved. **Methods:** A prospective study was conducted in 24 adult patients consecutively diagnosed with CVID, with no previous intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment. IVIG dose, total serum IgG level, bacterial infection rate, pulmonary function tests (PFTs) and high resolution computed tomography (HRCT) of the thorax were monitored over 2 years. Moreover, outcome data were determined by measurement of chronic pulmonary disease (CPD). **Results:** IVIG dose variability (205–372 mg/kg/21 days) to obtain the required serum IgG levels was determined. Patients with CPD needed higher doses than those without CPD ( $p=0.045$ ). A significant reduction in severe and mild infections/patient-year was observed during treatment. Overall, there were no changes in PFTs and HRCT scores in patients without CPD, but both improved in patients with CPD. An increase of over 15% in overall HRCT score was detected in two patients without evidence of impairment in either clinical status or PFT values. **Conclusions:** Residual levels of total IgG over 600 mg/dl may help prevent progression of lung damage in patients with CVID. Levels of IgG, clinical manifestations and PFTs seem sufficient for routine follow-up. HRCT examination of the thorax, at least biennially, may help to identify patients in whom lung injury is progressing even though they may remain symptom-free and with stable PFTs.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Common variable immunodeficiency, IgG deficiency; Antibody deficiency; Intravenous immunoglobulin

---

**Abbreviations:** ALT, alanine transferase; CPD, chronic pulmonary disease, CVID, common variable immunodeficiency. FEV1, forced expiratory volume in 1 s, FVC, forced vital capacity; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; HRCT, high resolution computed tomography; IVIG, intravenous immunoglobulin; PFT, pulmonary function test

<sup>☆</sup> This work was partially supported by a grant from the "Fundación Respira 2003"

\* Corresponding author. Tel.: +34-932746138; fax: +34-932746083

E-mail address: jgracia@vhebron.net (J. de Gracia)

<sup>1</sup> The first two authors have contributed equally to the design of the study and the writing of the manuscript.

## 1. Introduction

Primary immunodeficiencies are a group of disorders characterised by low levels of serum immunoglobulin and impaired antibody responses, of which common variable immunodeficiency (CVID) is one of the most widespread [1]. Bacterial infections, especially of the respiratory tract (pneumonia, sinusitis, and bronchitis), the development of chronic pulmonary disease (CPD), and progressive deterioration of pulmonary function are the most frequently associated conditions and the main cause of hospitalization and death in the natural course of CVID [2].

There is a strong body of evidence documenting that intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy, at variable doses and in variable follow-up periods, reduces the incidence and severity of infections in this group of patients [1–10] and its use is universally recommended [1,2,11]. However, few studies have also evaluated the effectiveness of the treatment regarding evolution of lung damage. Roifman et al. [10] showed that a dose of 600 mg/kg/month was more effective than 200 mg/kg to help prevent impairment of pulmonary function in patients with severe CPD and hypogammaglobulinemia after 6 months, although the incidence of infections did not differ greatly. More recently, high resolution computed tomography (HRCT) of the thorax demonstrated that progression of pulmonary damage is possible even in patients with stable spirometry values [12,13].

Since no prospective studies regarding evolution of lung damage (pulmonary function tests (PFTs) and HRCT) with a longer follow-up period have been reported, a prospective study was conducted in IVIG-naïve adult patients with newly diagnosed CVID. The aim was to assess evolution of lung damage in patients receiving a dose of IVIG treatment sufficient to maintain stable serum residual levels of total IgG of at least 600 mg/dl over 2 years. Differences between patients with and without CPD in relation to clinical evolution and IVIG dose required [14] were also analyzed.

## 2. Methods

### 2.1. Patients

From October 1994 to June 2001, consecutive adult patients diagnosed with CVID were included

in the study and followed-up for at least 2 years. The diagnosis was made according to the diagnostic criteria of the World Health Organization immunodeficiency group [1]. All patients were immunized intramuscularly in the buttock with a single injection of Hib-conjugated vaccine PedvaxHIB and in the deltoids with PNU-Immune 23 polyvalent pneumococcal vaccine to test the immune response [15,16]. Exclusion criteria were previous IVIG treatment, pregnancy, lactation, any diagnosis of malignancy, and secondary cause of hypogammaglobulinemia.

At the time of diagnosis, standard questionnaires were completed for each patient to provide information on the nature, number, duration and severity of infections (as defined by the Infectious Diseases Society of America [17]). Special reference was made to serious infections (pneumonia, sepsis, meningitis or pulmonary abscess) and mild infections (bronchitis with fever, otitis media, sinusitis or fever >38 °C) during the two previous years. The questionnaire was completed every 6 months until the end of the study. Full blood count, coagulation studies, routine biochemistry and PFTs were carried out at diagnosis and every 6 months thereafter in all patients while clinically stable. HRCT of the thorax at the time of diagnosis and 24 months after treatment were performed in all patients. Moreover, chest and sinus X-ray films and PFTs were carried out when necessary.

All patients gave their informed written consent prior to enrolling in the study.

### 2.2. Pulmonary function tests

Pulmonary function parameters studied were forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>), forced vital capacity (FVC) and the FEV<sub>1</sub>/FVC ratio (FEV<sub>1</sub>%). Predicted values for forced expiration were taken from Roca et al. [18].

The diagnosis of CPD was made when both bronchiectasis was detected on the HRCT of thorax and pulmonary function testing fell at least 15% below predicted values.

### 2.3. High resolution computed tomography

The criteria for the diagnosis and classification of bronchiectasis were similar to those previously de-

scribed [19,20]. The presence of alterations of the airway (bronchiectasis and bronchial thickening or inflammation) and of the pulmonary parenchyma (pulmonary infiltrates) in each of the six pulmonary lobes was assessed. Bronchiectasis was rated as 0 if it did not exist and as 1, 2 or 3 based on whether its diameter was 1.5, 2 or 3 times greater than the diameter of the accompanying bronchial artery, respectively. Thickening (inflammation) was rated as normal=0, mild=1, moderate=2 and severe=3. Pulmonary infiltrates were defined as area of increased density of the pulmonary parenchyma (atelectasis, overt infection or scars) and were rated as non-existent=0, linear=1 or triangular=2. Moreover, each of the findings (bronchiectasis, thickenings and infiltrates) was quantified from 0 to 3 according to the extent of the lesions in each of the pulmonary lobes as no condition=0, less than 20% of the lobe=1, between 20% and 50%=2, and above 50%=3. The overall score was defined as the sum of all previous scores, with a range of 0 to 102 for each patient.

At the end of the study, HRCT of the thorax was reviewed by two chest radiologists independently of each other. They were aware of the clinical diagnosis of immunodeficiency, but had no knowledge of any other data regarding the patient's condition or the study. A score was obtained for each HRCT of the thorax and consensus was reached when the interpretation varied.

#### 2.4. Immunologic testing

Serum IgG, IgA and IgM levels were quantified by nephelometry (reference values in adults were 850–1600 mg/dl for IgG, 75–350 mg/dl for IgA, and 58–250 mg/dl for IgM). IgG subclasses were quantified by ELISA (reference values in adults were 261–1081 mg/dl for IgG1, 112–408 mg/dl for IgG2, 22–288 mg/dl for IgG3, and 5–156 mg/dl for IgG4) [21]. Residual total serum IgG and IgG subclass levels were measured prior to the first IVIG infusion and troughs were checked every 3 months thereafter.

IgG pneumococcal serotypes were measured by ELISA using the 23-valent pneumococcal vaccine [16]. Specific IgG to Hib was measured by ELISA using the Hib conjugated vaccine [15]. An increase

in specific antibody titers that did not reach at least 395 U/ml for *S. pneumoniae* and 2.28 µg/ml for Hib was considered an inadequate response [15,16].

#### 2.5. Treatment with IVIG

##### 2.5.1. Doses

All patients were given close to 200–300 mg/kg body weight of pasteurized intravenous 7S-immunoglobulin (Flebogamma® 5%, Instituto Grifols, Spain) weekly for the first 3 weeks and each 3 weeks thereafter. After 3 months of treatment, an additional dose of IVIG was considered if residual total serum IgG levels were below 600 mg/dl, or if bacterial infections persisted, or pulmonary function deteriorated. Postural drainage and chest percussion, bronchodilators, inhaled steroids, and the use of antibiotics were considered [22] if presence of CPD was noted.

##### 2.5.2. Viral safety

Levels of alanine transferase (ALT) were evaluated before the beginning of treatment and at each therapy session. Infection by human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV) (genomic amplification technique) and hepatitis B virus (HBV) surface antigen were evaluated prior to treatment, on a yearly basis, and if high ALT levels were detected. For each sample, a serum aliquot was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

##### 2.5.3. Adverse events

All patients received the infusions in the hospital. During and after each infusion of intravenous immunoglobulin, they were monitored for vital signs (blood pressure, heart rate, breathing rate and temperature) and for any adverse events.

#### 2.6. Statistical analysis

The distribution of quantitative variables was examined to detect significant departures from normality by means of a Shapiro–Wilks test.

Statistical significance of differences among mean values was determined by Student's unpaired or paired *t*-test for independent comparisons or longitudinal observations of the same patient, respectively. Non-parametric tests (Mann–Whitney *U* and Wil-

coxon signed-rank tests) were also used when the variable did not follow normal distribution. The linear association between PFT values and HRCT examination of the thorax scores was evaluated by estimating the Pearson correlation coefficient.

The level of significance was  $p < 0.05$  and all directional  $p$  values were two-tailed. Unless otherwise noted, data are presented as the mean  $\pm$  S.D.

### 3. Results

#### 3.1. Patients

Twenty-four adult patients were included in the study: 14 females and 10 males, aged 19 to 71 years (mean age  $\pm$  S.D.:  $45 \pm 18$ ). All subjects had reduced serum levels of at least two Ig isotypes, total serum IgG  $< 550$  mg/dl, and were non-responders to *Haemophilus influenzae* type B and pneumococcal antigen.

Table 1 shows patient characteristics. Nine of them (45%) suffered from CPD, diagnosed on the basis of impaired PFTs and bronchiectasis. Residual serum levels of IgG over 600 mg/dl, and subclasses of IgG (IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub>) within the reference values were reached 6 months after initiating treatment with IVIG (IgG:  $750 \pm 153$  mg/dl, IgG<sub>1</sub>:  $390 \pm 96$  mg/dl, and IgG<sub>2</sub>:  $190 \pm 89$  mg/dl). A wide variability in the required doses of 205 to 372 mg/kg/21 days (consumption of 273 to 496 mg/kg/month) was observed. During the treatment period, a significant reduction was observed in serious and mild infectious processes (Table 2), and no significant changes were observed in pulmonary function parameter values (Table 1).

Despite the fact that patients with associated CPD required higher doses of IVIG to maintain residual serum levels of IgG over 600 mg/dl ( $p = 0.002$ ). At the end of the study, residual serum levels of IgG were lower in patients with CPD versus those without CPD ( $p = 0.006$ ). Six of the nine patients with CPD needed an increase in titrations of the initial doses of IVIG of close to 25 mg/kg/21 days. In four cases increases of 20% above the initial dose were required. No differences were observed between groups in relation to serious or mild bacterial infection rate (Table 3).

Table 1

Patient characteristics and dose, immunological parameters and pulmonary function tests at baseline and after 2 years of treatment<sup>a</sup>

Characteristic	Baseline	Last follow-up	$p$ value
Gender			
Female—no.	14		
Male—no.	10		
Age—years	$45 \pm 18$		
(range)	(19–71)		
Weight—kg	$60 \pm 10$		
(range)	(40–81)		
Chronic pulmonary disease—no.	9		
Treatment			
Follow-up—months (no.)		24	
Total infusions per patient—no.		37	
Dose—mg/kg weight/21 days (range)	$244 \pm 41$ (190–320) <sup>b</sup>	$255 \pm 50$ (205–372)	0.051
Immunologic parameters			
IgA—mg/dl (range)	$7.7 \pm 12$ (1–48)		
IgM—mg/dl (range)	$19 \pm 9$ (5–35)		
IgG—mg/dl (range)	$239 \pm 138$ (33–544)	$806 \pm 167$ (568–1116)	$< 0.0001$
IgG <sub>1</sub> —mg/dl (range)	$174 \pm 95$ (5–371)	$445 \pm 118$ (232–646)	$< 0.0001$
IgG <sub>2</sub> —mg/dl (range)	$43 \pm 33$ (5–110)	$214 \pm 79$ (88–383)	$< 0.0001$
B cells (%)	$6.5 \pm 3.8$ (1–14)		
CD4 T cells/CD8 T cells	$0.89 \pm 0.78$ (0.2–3.8)		
Pulmonary function <sup>c</sup>			
FVC—litres (range)	$2.9 \pm 1.2$ (1.0–5.5)	$2.9 \pm 1.1$ (1.2–5.1)	0.4
FVC—predicted % (range)	$77 \pm 21$ (29–107)	$78 \pm 17$ (35–104)	0.81
FEV <sub>1</sub> —litres (range)	$2.3 \pm 1.2$ (0.7–5.4)	$2.3 \pm 1.1$ (0.9–4.7)	0.52
FEV <sub>1</sub> —predicted % (range)	$75 \pm 23$ (26–123)	$78 \pm 20$ (35–112)	0.36

<sup>a</sup> Plus–minus values are mean  $\pm$  S.D.

<sup>b</sup> Dose at baseline means dose after the initial weekly dose

<sup>c</sup> FVC denotes forced vital capacity, and FEV<sub>1</sub> forced expiratory volume in 1 s.

Although PFTs did not deteriorate, a significant improvement of FEV<sub>1</sub> as the percentage of predicted value ( $p = 0.004$ ) was detected in patients with CPD at the end of the study (Table 3).

Table 2  
Serious and mild infections before and during the treatment<sup>d</sup>

Characteristic	Pre-treatment	Last follow-up	<i>p</i> <sup>b</sup> value
<i>Serious infections—no<sup>c</sup></i>			
Mean ± S.D.	1.3 ± 1.2	0.2 ± 0.5	0.001
Median (range)	1.5 (0–4)	0 (0–2)	
<i>Rate of serious infections<sup>d</sup></i>			
Mean ± S.D.	0.48 ± 0.45	0.047 ± 0.15	0.001
Median (range)	0.5 (0–1.5)	0 (0–0.4)	
<i>Rate of mild infections<sup>c</sup></i>			
Mean ± S.D.	4.9 ± 4.1	2.2 ± 2.0	0.01
Median (range)	4 (0–13)	2 (0–8)	

<sup>a</sup> Plus–minus values are mean ± S.D.

<sup>b</sup> Wilcoxon rank sum test (two-tailed).

<sup>c</sup> Serious infections denote pneumonia, sepsis, meningitis and/or pulmonary abscess.

<sup>d</sup> Infections/patient-years.

<sup>e</sup> Rate of mild infections denotes episodes of bronchitis, otitis, sinusitis or fever per year.

### 3.2. HCRT examination of thorax results

Outcome data are shown in Table 4. All patients presented with some kind of abnormality in more than one pulmonary lobe. A negative correlation was detected between FEV<sub>1</sub> value (percentage of predicted) and each HRCT examination of the thorax score at the beginning of the study (bronchiectasis, Pearson correlation  $r = -0.845$ ,  $p = 0.02$ ; inflammation,  $r = -0.802$ ,  $p = 0.01$ ; infiltration,  $r = -0.792$ ,  $p = 0.04$ ; overall score,  $r = -0.822$ ,  $p = 0.003$ ). However, at the end of the study, there was only a weak correlation between FEV<sub>1</sub> and the overall score ( $r = -0.624$ ,  $p = 0.045$ ).

In patients with associated CPD, all HRCT scores improved at the end of the study, but only inflammation and overall score improvements were significant ( $p = 0.032$  and  $p = 0.03$ , respectively). Six of these patients showed a FEV<sub>1</sub> improvement of 15% above

#### Notes to Table 3:

<sup>a</sup> Plus–minus values are mean ± S.D.

<sup>b</sup> CPD denotes chronic pulmonary disease.

<sup>c</sup> FVC denotes forced vital capacity, and FEV<sub>1</sub> forced expiratory volume in 1 s

<sup>d</sup> Serious infections denote pneumonia, sepsis, meningitis and or pulmonary abscess.

<sup>e</sup> Infections patient-years.

<sup>f</sup> Rate of mild infections denotes episodes of bronchitis, otitis, sinusitis or fever per year.

Table 3  
Patient characteristics according to pulmonary disease<sup>a</sup>

Characteristic	Patients with CPD <sup>b</sup> (N=9)	Patients without CPD (N=15)	<i>p</i> value
Age—years (range)	48 ± 19 (24–71)	44 ± 19 (19–70)	0.6
Weight—kg (range)	55 ± 8 (40–67)	65 ± 10 (52–81)	0.08
<i>Gamma globulin final dose</i>			
Dose—mg/kg weight/21 days (range)	285 ± 53 (220–372)	222 ± 23 (205–261)	0.002
Difference between initial and final dose—mg/kg weight/21 days (range)	-10.9 ± 14 (-24.2–13.6)	1.5 ± 14 (-14.1–25.2)	0.045
<i>Immunoglobulins</i>			
Initial IgG—mg/dl (range)	214 ± 144 (33–472)	254 ± 137 (51–544)	0.7
Final IgG—mg/dl (range)	718 ± 142 (568–981)	853 ± 164 (602–1162)	0.006
	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	
Initial IgG <sub>1</sub> —mg/dl (range)	157 ± 104 (5–277)	183 ± 90 (52–371)	0.4
Final IgG <sub>1</sub> —mg/dl (range)	396 ± 121 (262–626)	471 ± 111 (232–646)	0.065
	$p = 0.002$	$p < 0.0001$	
Initial IgG <sub>2</sub> —mg/dl (range)	37 ± 37 (5–98)	46 ± 32 (5–110)	0.5
Final IgG <sub>2</sub> —mg/dl (range)	192 ± 61 (130–294)	226 ± 86 (88–386)	0.1
	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	
<i>Pulmonary function<sup>c</sup></i>			
Initial FVC—predicted % (range)	60 ± 19 (29–92)	87 ± 14 (66–107)	0.001
Final FVC—predicted % (range)	67 ± 17 (35–89)	84 ± 15 (51–104)	0.02
	$p = 0.11$	$p = 0.5$	
Initial FEV <sub>1</sub> —predicted % (range)	54 ± 13 (26–67)	88 ± 17 (65–123)	0.001
Final FEV <sub>1</sub> —predicted % (range)	61 ± 13 (35–76)	89 ± 16 (47–112)	0.001
	$p = 0.004$	$p = 0.9$	
<i>Infections</i>			
Serious infections—no. (range) <sup>d</sup>	0.3 ± 0.7 (0–2)	0.1 ± 0.3 (0–1)	0.4
Rate of serious infections (range) <sup>e</sup>	0.08 ± 0.1 (0–0.4)	0.03 ± 0.07 (0–0.2)	0.3
Rate of mild infections (range) <sup>f</sup>	2.1 ± 2.4 (0–8)	2.3 ± 1.8 (0–6)	0.7

Table 4  
High resolution computed tomography of the thorax scores<sup>a</sup>

Characteristic	All patients (N=24) Score <sup>b</sup>	Patients with CPD <sup>c</sup> (N=9) Score <sup>b</sup>	Patients without CPD (N=15) Score <sup>b</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup> value
<i>Airway alterations</i>				
Initial bronchiectasis	8.9±9.0 (0–30)	18.0±9.7 (5–30)	4.4±4.4 (0–16)	0.01
Final bronchiectasis	9.1±9.1 (0–30)	16.8±10.3 (2–30)	5.1±5.6 (0–17)	0.02
	<i>p</i> =0.9	<i>p</i> =0.03	<i>p</i> =0.23	
Initial Inflammation	6.4±6.9 (0–21)	12.8±7.4 (2–11)	3.14±3.7 (0–14)	0.012
Final Inflammation	5.1±5.1 (0–19)	7.4±6.5 (2–19)	4.3±4.3 (0–13)	0.2
	<i>p</i> =0.3	<i>p</i> =0.032	<i>p</i> =0.28	
<i>Pulmonary infiltrates</i>				
Initial fibrosis-like changes	5.2±6.0 (0–22)	10.1±6.7 (0–22)	2.8±3.1 (0–10)	0.047
Final fibrosis-like changes	5.5±6.2 (0–22)	9.6±7.9 (0–22)	2.9±3.3 (0–13)	0.06
	<i>p</i> =0.9	<i>p</i> =0.8	<i>p</i> =0.2	
<i>Overall score</i>				
Initial	20.5±21.5 (2–70)	51.0±24.1 (7–70)	10.3±10.1 (2–38)	0.01
Final	19.9±18.7 (6–58)	34.8±22.9 (4–63)	12.1±11.6 (1–42)	0.04
	<i>p</i> =0.56	<i>p</i> =0.03	<i>p</i> =0.3	

<sup>a</sup> Plus–minus values are mean±S.D. (range).

<sup>b</sup> Maximum score possible bronchiectasis: 36; inflammation: 36; fibrosis-like changes 30; general score: 102

<sup>c</sup> CPD denotes chronic pulmonary disease

<sup>d</sup> *p* value between patients with and without CPD.

the baseline values without significant changes of other parameters. In patients without associated CPD, no variations were observed in HRCT scores at the end of the study. However, an increase of over 15% in overall HRCT score was detected in two patients without evidence of impairment in either clinical status or PFT values.

### 3.3. Safety

Treatment was well tolerated by all patients. Minor and expected adverse events were detected in 61 out of 888 (6.8%) infusions. None were serious enough to discontinue infusions. Regular monitoring of liver enzymes and HIV, HCV and HBV in the patients

gave no indication of the transmission of viral hepatitis or HIV.

## 4. Discussion

There has never been a controlled study of the use of immunoglobulin in primary antibody deficiency diseases because patients receiving replacement therapy have dramatically better outcomes in bacterial infection rate than historical controls, and withholding IVIG therapy is deemed unethical. Therefore, IVIG therapy in patients with primary antibody deficiency has been well accepted [1,9]. However, some controversy exists over critical questions such as IVIG dose and control parameters.

In this study, patients with associated CPD required higher regular doses of IVIG than those without associated CPD to maintain stable trough serum levels of total IgG (Table 3). This may be related, at least in part, to more rapid consumption of immunoglobulin due to chronic bronchial inflammation/infection if CPD was present. Bronchiectasis is a chronic infective/inflammatory disorder with structural derangement of the bronchial wall that is characterised by airway dilation and bronchial wall thickening, and chronic airflow limitation is frequent. The process is generally considered to be the result of epithelial injury and weakening of the airway, primarily as a result of the release of neutrophil proteinases on the structural proteins, such as elastin, that support the airway [23]. This leads to a damaged dilated airway prone to chronic recurrent infection [24]. This process is initiated by the inability to efficiently kill bacteria in patients with primary antibody deficiency. In the respiratory tract, imbalance between host immunity defences and microbial pathogenesis should be improved with appropriate immunoglobulin replacement therapy, to limit the respiratory tract inflammation. Since pulmonary function parameters, especially FEV<sub>1</sub>, are sensitive to bronchial mucosa inflammatory changes [25,26], a favorable outcome in patients with CPD or without CPD may be expected if adequate IVIG therapy is given.

This prospective study evaluated pulmonary function and the rate of bacterial infections following initiation of IVIG in adult patients with newly diagnosed common variable immune deficiency. Our

study shows that stable residual levels of total IgG over 600 mg/dl reduce the rate of bacterial infections, and prevent deterioration of pulmonary function in patients with CVID. HRCT of the thorax was also helpful in some cases to uncover a silent lung injury progression.

The significant negative correlation between all HRCT scores and FEV<sub>1</sub> at the beginning but not at the end of the study (Table 4) can be accounted for by the successful impact of IVIG therapy on the bronchial inflammation/infection process. Thus, both pulmonary function tests (spirometry) and bacterial infection rate seem to be good parameters in evaluating the success of IVIG therapy.

In spite of this, an increase of over 15% in the HRCT overall score, which denotes progressive lung injury, was observed in two patients without evidence of impairment in either clinical status or PFT values. Symptom-free progression of pulmonary changes detected by HRCT in patients with primary hypogammaglobulinemia has been recently suggested in two studies [12,13]. However, this feature has also been observed in immunocompetent hosts with bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) if inflammation or chronic bronchial infection was associated [27]. For this reason, it is difficult to attribute all progression of lung disease to inadequate treatment with IVIG in patients with primary antibody deficiency syndromes. Additional therapy strategies against the process of inflammation/infection [28], such as antibiotics [29], macrolides (as anti-inflammatory agents) [30], inhaled corticosteroids [31], non-steroidal anti-inflammatory drugs [30,32], bronchodilators, mucolytic agents [33], and physical or mechanical aids to airway clearance may also play important adjunctive roles to minimize the occurrence and progression of lung damage.

In most studies, only bacterial infection rate is specified to evaluate the effectiveness of different dosages of IVIG, with conflicting results. While some reports conclude that the optimal dose of IVIG is 150–200 mg/kg/month [5] or 250 mg/kg/21 days [34], others suggest that a monthly dose of 500 mg/kg is more efficient than 150 mg/kg [35]. Another report points out that a dose of 400 mg/kg/month tends to be more effective than 200 mg/kg/month, although the differences are not statistically significant [6]. Even increasing the dose to 600 mg/kg/

month did not result in better protection. Recently, a multicenter, double-blind, randomized, crossover study including 43 patients who received alternative 9-month periods of IVIG of 300 vs. 600 mg/kg every 4 weeks (adults) and 400 vs. 800 mg/kg every 4 weeks (children) showed that high doses of IVIG significantly reduce the number and duration of infections [9]. However, at the end of the study, the mean residual serum levels of total IgG were  $6.6 \pm 1.6$  g/l (no range shown) when low-dose therapy was administered. It is probable that sufficient residual serum levels of total IgG were not reached in some patients. It is likely for these reasons that optimal dosages and treatment schedules have not been established, and only doses of 300–500 mg/kg/month can be suggested based on general experience [1]. In this study we did not consider the same IVIG dose for all patients. In contrast, initial doses of IVIG were changed until residual serum levels of total IgG over 600 mg/dl and appropriate clinical control were achieved in each patient. A wide variability in the required doses of 205 to 372 mg/kg/21 days (consumption of 273 to 496 mg/kg/month) was observed. These data are consistent with the individual variations in IgG circulating blood levels, and the need for individualizing therapy to avoid undertreatment when a pre-established dose of IVIG is administered.

The variations in study design, immunoglobulin dosages and successful therapy criteria used in the different reports make it difficult to establish treatment schedules. Instead of recommending a fixed IVIG dose, with current knowledge it is possible to propose adjusting the IVIG dose sufficiently to obtain stable serum IgG levels of about 600 mg/dl combined with treatment of associated chronic pathology (such as CPD or bronchiectasis) from the beginning. In addition, the use of infectious disease incidence, PFTs (spirometry) and HRCT examination of the thorax as therapy success criteria may help to detect in which patients the IVIG dose needs to be increased.

In conclusion, our study shows evidence that residual serum levels of total IgG over 600 mg/dl appear to be suitable for controlling bacterial infections and pulmonary complications. Residual levels of total IgG, clinical manifestations and PFTs seem sufficient for routine monitoring of lung disease in patients with primary antibody deficiency. HRCT of the thorax, at

least biennially, may help to identify patients in whom lung injury is progressing even though they remain symptom-free and with stable PFTs.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Cristina Mayordomo, MD, Esther Rodriguez, MD and Edelia Catalan, NS for their help with the treatment evaluation of the patients included in this study, and Mr. Francis McCabe for help with the English version of the manuscript.

### References

- [1] Chapel H, Geha F. Primary immunodeficiency diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 2003;132:9–15.
- [2] Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:1001–4.
- [3] Buckley RH, Schiff RI. The use of intravenous immune globulin in immunodeficiency diseases. *N Engl J Med* 1991;325:110–7.
- [4] De Gracia J, Vendrell M, Guamer ML, Vidal R, Miravittles M, Mayordomo C, et al. Utilización de gammaglobulina humana en el tratamiento de la inmunodeficiencia común variable (The use of human gamma globulin in the treatment of common variable immunodeficiency). *Med Clin (Barc)* 1995;104:201–6.
- [5] Pirofsky B. Intravenous immune globulin therapy in hypogammaglobulinaemia. A Review. *Am J Med* 1984;76(3A):53–60.
- [6] Pruzanski W, Sussman G, Dorian W, Van T, Ibañez D, Redelmeier D. Relationship of dose of intravenous gammaglobulin to the prevention of infections in adults with common variable immunodeficiency. *Inflammation* 1996;20:353–9.
- [7] Ochs HD, Fisher SH, Wedgwood RJ, Wara DW, Cowan MJ, Ammann AJ, et al. Comparison of high-dose and low-dose intravenous immunoglobulin therapy in patients with primary immunodeficiency disease. *Am J Med* 1984;76(3A):78–82.
- [8] Bernatowska E, Madalinski K, Janowicz W, Weremowicz R, Gutkowski P, Wolf HM, et al. Results of a prospective controlled two-dose crossover study with intravenous immunoglobulin and comparison with plasma treatment. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;43:153–62.
- [9] Eijkhout HW, van der Meer JWM, Kallenberg CGM, Weening RS, van Dissel JT, Sanders LAM, et al. The effect of two different dosages of intravenous immunoglobulin on the incidence of recurrent infections in patients with primary hypogammaglobulinemia. A randomised, double-blind, multicenter crossover trial. *Ann Intern Med* 2001;135:165–74.
- [10] Roifman CM, Levison H, Gelfand EW. High-dose versus low-dose intravenous immunoglobulin in hypogammaglobulinemia and chronic lung disease. *Lancet* 1987;1(8541):1075–7.
- [11] Availability of immune globulin intravenous for treatment of immune deficient patients—United States, 1997–1998. *MMWR* 1999;48:159–62.
- [12] Kamulainen L, Varpula M, Lippo K, Svedstrom E, Nikoskelainen J, Ruuskanen O. Pulmonary abnormalities in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1031–6.
- [13] Manson D, Reid B, Dalal I, Roifman CM. Clinical utility of high-resolution pulmonary computed tomography in children with antibody deficiency disorders. *Pediatr Radiol* 1997;27:794–8.
- [14] EMEA. Core SPC for human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg). CPMP/BPWG/859/95 rev.1, 2000.
- [15] Rodrigo MJ, Vendrell M, Cruz MJ, Miravittles M, Pascual C, Morell F, et al. Utility of the antibody response to conjugated *Haemophilus influenzae* Type B vaccine for diagnosis of primary humoral immunodeficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1462–5.
- [16] Rodrigo MJ, Miravittles M, Cruz MJ, De Gracia J, Vendrell M, Pascual C, et al. Characterization of specific IgG and its subclasses (IgG1 and IgG2) against the 23-valent pneumococcal vaccine in a healthy adult population. Proposal of a response criteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:168–72.
- [17] Beam Jr TR, Gilbert DN, Kunin CM. General guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drug products. *Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. Clin Infect Dis* 1992;15(Suppl. 1):S5–32.
- [18] Roca J, Sanchís JA, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986;22:217–24.
- [19] Naidich DP, McCauley DI, Khouri NF, Stitik FP, Siegelman SS. Computed tomography of bronchiectasis. *J Comput Assist Tomogr* 1982;6:437–44.
- [20] Reid L. Reduction in bronchial subdivision in bronchiectasis. *Thorax* 1950;5:233–47.
- [21] Rodrigo MJ, Codina R, De Gracia J, Morell F, Pascual C. Valores normales de las subclases de la IgG en una población de adultos. Su importancia en el estudio de los déficits de las mismas (Normal values of the immunoglobulin G subclasses in an adult population. Importance in a study of their deficiency). *Med Clin (Barc)* 1992;98:166–70.
- [22] Barker AF. Bronchiectasis. *N Engl J Med* 2002;346:1383–93.
- [23] Hill A, Gompertz S, Stockley R. Factors influencing airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2000;55:970–7.
- [24] Hansell DM. Bronchiectasis. *Radiol Clin North Am* 1998;36:107–28.
- [25] Thompson AB, Huerta G, Robbins RA, Sisson JH, Spurzem JR, Von Essen S, et al. The bronchitis index. A semiquantitative visual scale for the assessment of airways inflammation. *Chest* 1993;103:1482–8.
- [26] Loukides S, Horvath I, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ



- Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:991–4
- [27] Munro NC, Han LY, Cune DC, Strickland B, Cole PJ. Radiological evidence of progression of bronchiectasis. *Respir Med* 1992;86:397–401.
- [28] Thickett KM, Kumararatne DS, Bancrjee AK, Dudley R, Stableforth DE. Common variable immune deficiency: respiratory, pulmonary function and high-resolution scan findings. *QJM* 2002;95:655–62.
- [29] Barker AF, Couch L, Fiel SB, Gotfried MH, Ilowite J, Meyer KC, et al. Tobramycin solution for inhalation reduces sputum *Pseudomonas aeruginosa* density in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:481–5.
- [30] Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Sautebin L, Rombola L, Carnuccio R, et al. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:156–63.
- [31] Kolbe J, Wells A, Ram FS. Inhaled steroids for bronchiectasis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2 [CD000996].
- [32] Llewellyn-Jones CG, Johnson MM, Mitchell JL, Pye A, Okafor VC, Hill SL, et al. In vivo study of indomethacin in bronchiectasis: effect on neutrophil function and lung secretion. *Eur Respir J* 1995;8:1479–87.
- [33] Wills P, Greenstone M. Inhaled hyperosmolar agents for bronchiectasis (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2001;2 [CD002996].
- [34] Quartier P, Debré M, De Blic J, de Sauverzac R, Sayegh N, Jabado N, et al. Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J Pediatr* 1999;134:589–96.
- [35] Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:581–91.