Günlük Klinik Rutinde Sık Kullanılan Basit Laboratuvar Testlerinden**(Primer) İmmün Yetmezlik Hastalığına Yaklaşım****Approach to Primary Immunodeficiency Disease from Frequently used Simple Laboratory Tests in a Daily Clinic Routine**

Öner Özdemir

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eğitim-Araştırma Hastanesi, Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları Bölümü, Sakarya, Türkiye

ÖZ

Primer immünyetmezlik hastalığı (PİYH) bağışıklık sisteminin değişik unsurlarının doğumsal bozukluklarına bağlı meydana gelen bozukluklardır. PİYH enfeksiyona eğilimle sonuçlanır ve sıklıkla otoimmüniteye ve/veya immünregülasyon bozukluğu yatkınlığa eşlik eder. Üç yüz otuzdan daha fazla PİYH tanımlanmıştır ve bunların 320'den fazlasının moleküler temeli belirlenmiştir. İçlerinde primer antikor eksiklikleri en sık rastlanan gruptur ve yaklaşık PİYH'nin yarısından fazlasında bulunur. Artan oranda geç başlangıçlı vakalar tanınmasına rağmen, PİYH klinik bulguları tipik olarak yaşamın erken döneminde görülmektedir. Hastalar klinikte genellikle tekrarlayan, ciddi enfeksiyonlar veya her ikisiyle beraber ve değişik PİYH ilişkili otoimmünite gelişimiyle karşımıza çıkar. Zamanında teşhis hastanın özel tedavi merkezlerine gönderilmesi ve kök hücre transplantasyonu dahil uygun tedavinin hemen başlaması için kaçınılmazdır. Sonuçta, PİYH'in erken teşhisi optimal bakım ve düzelmiş sürvi (sonuçlar) için esastır. Bu derlemede, en sık görülen PİYH'lerin araştırılması için temel bir yaklaşım, tipik bazı klinik bulgular ve en uygun laboratuvar tetkikleri basit tam kan sayımından ileri nesil dizileme gibi genetik testlere kadar, anlatılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Primer immünyetmezlik hastalığı, kombine immünyetmezlik, ağır kombine immünyetmezlik, teşhis, tedavi.

SUMMARY

Primary immune deficiency disease (PIDD) is a hereditary disorder, attributable to inherent defects in diverse elements of the immune system. PIDD causes susceptibility to infections and is frequently associated with a tendency to autoimmunity and/or immune dysregulation. Up-to-date, more than 330 PIDD have been defined and the molecular (genetic) origins for more than 320 of them are described. In this group, primary antibody deficiencies are the most common group and approximately 50% of PIDD patients have this defect. Clinical findings of PIDD typically appear early in life, although cases with delayed onset are progressively more documented. Affected PIDD patients usually manifest in clinic with recurrent infections, severe infections, or both, plus autoimmunity development that are accompanied with most of the PIDD. Timely diagnosis is indispensable for transferring patients to specialized centers and the commencement of proper treatment including stem cell transplantation. Consequently, the prompt diagnosis of PIDD is necessary for best possible management and better outcomes. In this review, a basic approach for the exploration of the most common PIDDs is described, outlining some of the typical clinical findings and most appropriate laboratory investigations from simple complete blood count to advanced genetic tests such as next generation sequencing.

Keywords: Primary immunodeficiency disease, combined immunodeficiency, severe combined immunodeficiency, diagnosis, treatment.

GİRİŞ

Primer İmmün Yetmezlik Hastalığı Primer immün yetmezlik hastalığı (PİYH) doğal ve edinsel immün sistemin, makalenin yazıldığı sırada, 330'ye yakın kalıtsal bozukluklarını içeren bir hastalık grubudur (1,2). Kişinin öyküsü (hikaye) ve öyküsündeki enfeksiyon hastalıkları çeşitliliğinin bilinmesi, olası immün yetmezliğin tipi için çoğu zaman ip ucu verir. Bu aşamada anamnez doğrultusunda laboratuvar testlerinin doğru istenmesi ve yorumlanması da tanıya yardımcı olacaktır.

Dünya'da Primer İmmün Yetmezlik Hastalık Sıklığı: Dünya' daki sıklığının, selektif immunoglobulin A (IgA) eksikliği hariç tutulduğunda, 1-5 /10.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir (3-5). Türkiye'de bir çalışmada sıklığı 3/10.000 olarak tespit edilmiştir (6). Jeffrey-Modell Vakfı'nın web sitesinde ise bilinen bir PİYH'na 1/500 kişide rastlanıldığı bildirilmekle beraber bu selektif IgA eksikliğini de içermektedir (7). Süt çocukluğunda erkek cinsiyet ağırlıklı (5/1) olan bu hastalıkta, ergen ve erişkinlerde ise erkek ve kızda eşit oranda rastlanılmaktadır (3,5,8).

Tüm Dünya'da olduğu gibi, ülkemizde de antikora bağlı (humoral immün sistem) bozuklukların PİYH içindeki sıklığı Doğu'dan Batı'ya %72-92 arasında değişmekle beraber, ağır kombine immün yetmezlik (AKİY) oranı ise %2-5 arasındadır (9-12). Primer antikor eksiklikleri Kuzey ve Güney Amerika, Türkiye ve Rusya gibi ülkelerde daha sık iken; Arabistan, Hindistan, Çin gibi ülkelerde de kombine immün yetmezlikler daha sık görünürler (13).

Anamnez ve Fizik Muayeneden Primer İmmün Yetmezlik Hastalıklarına Genel Yaklaşım: Her hastalıkta olduğu gibi klinik özelliklere anamnez ve fizik muayene esnasında dikkat edilmelidir. Daha sonra istenecek ilk (tarama) ve ileri aşama laboratuvar testleri (basit bir hemogramdan genetik incelemeye uzanan) ile teşhise ulaşmaya çalışılmalıdır. Başaramazsak, ileri aşama testlerin çoğu belli merkezlerde yapıldığından hastanın o merkeze ulaşmasını sağlanmalıdır.

Anamnez ve fizik muayene- Hikâye (öykü) Yenidoğan dönemi ve sonrasında anneden geçen antikorların etkisi ile özellikle antikor eksikliğine bağlı immün yetmezliğin bebeğin 6. ayının sonrasında bulgu verebileceğini unutulmamalıdır. Kombine immün yetmezlik (KİY) hastalıkları ve AKİY'de ise ilk aylarda hastalık bulguları ve enfeksiyonların başlayabileceğini bilinmelidir. Bu yüzden, bebekte lenfopeni varsa, anneden geçebilecek HIV enfeksiyonu mutlaka sorgulanmalı ve testlerle dışlanmalıdır. Hastanın öyküsünde, rekürren otit, sinüzit, pnömoni, sellülit, osteomyelit, menenjit vb. enfeksiyon hastalıklarını geçirip geçirmediği de sorgulanmalıdır (1,4). Yine bazı tekrarlayan spesifik viral (Enterovirüs, Herpes vb.) ya da bakteriyel (Meningokok, Serratia vb.) enfeksiyonlara dikkat edilmelidir. Yenidoğan döneminde konvülziyona rastlanması durumunda DiGeorge Sendromu (DGS) düşünülmelidir. Sonuçta, öykü ve fizik muayene sonucunda, Jeffrey Modell Vakfı tarafından ortaya atılan ve PİYH' leri düşündüren 10 klinik bulgu / işaret mutlaka sorgulanmalıdır. On bulgudan 2 ya da daha fazlasına sahip olanlar, PİYH açısından değerlendirilmek üzere immünoloji polikliniği bulunan merkezlere gönderilmelidir (7). Bir çalışmada gösterildiği gibi,

bu tür sık hastalanan çocukların incelenmeleri sonucunda %50'si sağlıklı, %30'u allerjik, %10'u nonimmünolojik ciddi hastalık ve %10'u primer/sekonder immün yetersizlik tanısı almaktadır (6,9-12).

Fizik Muayene: Detaylı ve iyi yapılmış bir fizik muayenede, ağız- boğaz incelemesinde mutlaka tonsiller kontrol edilmelidir. Lenf nodlarının ve tonsillerin yokluğu daha çok Bruton hastalığı gibi agammaglobulinemik durumları akla getirmelidir. Ağız içinde dirençli monilyazise, tekrarlayan otit ve sinüzit gibi hastalıkların muayene bulgularına dikkat edilmelidir. Ciltte fronkül, abse ya da cilt ve tırnaklarda mantar enfeksiyonu bulgularına bakılmalıdır. Dermatit ve egzama gibi hastalıkların da immün yetmezliklerle (Wiskott-Aldrich ve Hiper IgE sendromları v.b.) beraber olabileceği düşünülmelidir. Ciltte kanamaya eğilim (peteşi, ekimoz vb.) Wiskott-Aldrich, Chediak Higashi sendromlarını düşündürmelidir. Muayene esnasında görülen ataksi, derideki ve oküler telenjiektazi ataksi-telenjiektaziye akla getirmelidir. Kısmi albinizmlili hasta Chediak- Higashi, açık kül rengi saçlı hasta Griselli sendromu açısından değerlendirilmelidir. Ayrıca, lenfadenopati (LAP) ve hepatosplenomegali (HSM)'nin varlığı da immün regülasyonun bozulduğu PİYH tiplerinde önemlidir. Büyüme- gelişmenin değerlendirilmesi de unutulmamalıdır. Gerilik varsa, daha çok AKİY'i düşündürür. Ayrıca, boy kısalığı ve büyüme hormon eksikliği ile giden hipogammaglobulinemik bozukluklar da bildirilmiştir. Di George sendromlu hastadaki gibi sendromik ya da atipik yüz görünümüne (düşük kulak, kısa filtrum, mandibular hipoplazi, hipertelorizm, bifid uvula, anti-mongoloid) dikkat edilmelidir.

Klinikte Sık ve Daha Nadir Kullanılan Laboratuvar Testlerinden Primer İmmün Yetmezlik Hastalıklarının Teşhisine Yaklaşım: Günlük klinikte rutin kullandığımız en basit test olan tam kan sayımından (hemogram) başlayıp, en az kullandığımız ya da isteyebildiğimiz enzim ya da genetik testlerine kadar bilinen tetkikleri PİYH'na yaklaşım açısından anlatılacaktır. Bu testler en basitinden en zoruna doğru basamaksal yaklaşım halinde aşağıda anlatılmaya çalışılmıştır.

Tam kan sayımı: *Lökosit (beyaz küre) sayısı:* Hemogramda lökopeni mevcutsa, retiküler disgenezi'ye bağlı PİYH düşünülmelidir (14). Aksine, hastanın klinik durumu ve diğer laboratuvar parametrelerine uymayan sürekli bir lökositoz ve nötrofili varsa, lökosit adhezyon defekti (LAD) düşünülmelidir (15). *Lenfopeni:* Tam kan sayımında lenfopeni olup olmadığına karar verilmelidir. Lenfopeni, lenfosit sayısının yenidoğanda: $<2.000/\text{mm}^3$, 1 yaş altı: $<3.000/\text{mm}^3$ ve 1 yaş üstü: $<1.500/\text{mm}^3$ olması olarak tanımlanmaktadır (16). Lenfopeninin HIV'e bağlı olmadığı ortaya konulduktan sonra, hastanın tipik/klasik AKİY vakası olup olmadığına öncelikle karar verilmelidir. Çünkü AKİY bir pediatrik acildir. AKİY tanısı alan hastanın acilen transplantasyonun yapılabileceği merkezlere yönlendirilmesi gerekmektedir. Eğer bu lenfopenik durumda: CD3+-T hücre sayısı $<300/\text{mm}^3(\mu\text{l})$ olup, i-) mitojen (PHA) ile T hücre proliferasyonu $\leq\%10$ veya ii-) hücreler anne kaynaklı hafıza -CD45RO- T hücresi ise bu hastanın AKİY olabileceği düşünülmelidir (17). Buna rağmen, normal lenfosit sayısının da KİY'i ekarte ettirmediği akılda tutulmalıdır. Normal T hücre sayısı, KİY'e rağmen, maternal (anne kaynaklı) T-hücre engraftmanı veya rezidüel otolog T-hücreler nedeniyle görülebilir (5,17).

Nötropeni: İkinci öncelikle hemogramda bakılması gereken lökosit alt grubu nötrofillerin sayısıdır. Kan tablosunda nötropeni'nin olup olmadığına bakılmalıdır. Nötropeni'ye yenidoğan döneminde: $<3.500/\text{mm}^3$ ile, yenidoğan dönemi dışında: $<1.500/\text{mm}^3$ ve ağır nötropeniye ise $<500/\text{mm}^3$ nötrofil sayısı ile karar verilir (3,4,18). Nötropeni konjenital ise, ağır konjenital nötropeni (Kostmann sendromu) ve retiküler disgenezi öncelikle akla gelmelidir. Ağır nötropeni çok derin bir lenfopeni ve sensörinöral sağırlıkla beraberse çok nadir görülen retiküler disgenezi ön planda akla gelmelidir (14). Kıkırdak saç hipoplazisi, WHIM sendromu, hiper-IgM sendromu (CD40L eksikliği), Shwachman-Bodian-Diamond sendromu, siklik nötropeni, X-bağlı nötropeni, ilaç nötropenisi, otoimmün/alloimmün nötropeni ve Clericuzio sendromu (nötropeni ile giden Poikiloderma) gibi bozuklukları düşünmek gereklidir (4,16).

Eozinofili : Hemogramda dikkat edilmesi gereken ve diğerlerinden farklı olarak artışıyla dikkati çeken lökosit alt grubu eozinofillerdir. Netherton, Omenn sendromu, DOCK8 eksikliği, WAS (Wiskott-Aldrich sendromu), CD25 eksikliği gibi immün yetmezlikler; GVHD, PCP (pnömosistis carinii pnömonisi), tümör, allerji, parazit gibi nedenler düşünülmelidir (5). Aydın ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; hem serum IgE değeri 5.000 IU/ml 'nin hem de eozinofili $2.500/\text{mm}^3$ üzerinde ise aksi ispat edilene kadar hiperimmünoglobulin E sendromu (HIES) öncelikle düşünülüp tanıdan dışlanılmalıdır (19).

Trombositopeni: Hemogramda bakılması gereken ve azalmayla giden diğer bir unsur da plateletler / trombositlerdir. Normal MPV değeri sağlıklı kişilerde $7.1-10.5 \text{ fL}$ arasındadır (4,5). Bir çok laboratuarda bu değer $7.5-11.5$ arası kabul edilir. Trombositopeni konjenital ve özellikle MPV: $<6 \text{ fl}$ değeri düşükse öncelikle WAS düşünülmelidir. WAS olan kişilerde ise, MPV: $3.8-5.0$ arasında ve homojen şekilde MPV hep düşüktür (4,5). Ayrıca hemogram cihazlarının ölçümleri her zaman doğru olmayabilir, bazı durumlarda mikroskopik inceleme ile trombosit büyüklüğüne bakmak gerekir (20). Erişkinde MPV değeri $<7 \text{ fl}$ ise, düşük kabul edilmektedir (21). İmmün trombositopeni gibi başka hastalıklarda da MPV bazen düşse de homojen şekilde her bir trombositte düşük değildir. Diğer trombositopeni yapan nedenler arasında, WIP (WAS protein-interacting protein) eksikliği, retiküler disgenezi, hiper-IgM sendromu, Bruton (XLA), TAR (trombositopeni ve radius aplazisi) sendromu ön planda akla gelmelidir. Yine sekonder olarak, CMV enfeksiyonu, Omenn sendromu ve PİYH'e bağlı splenomegali ve otoimmünite gelişimi gibi nedenlerden dolayı trombositopeninin meydana gelebileceği akılda tutulmalıdır (5).

Anemi: Primer immün yetmezlik hastalığı düşünülen bir hastada anemi mevcutsa kıkırdak-saç hipoplazisini veya diseritropoietik anemi ve kronik rekürren multifokal osteomyeliti olan hastada Majeeed sendromunu düşünülmelidir (5). Yine sideroblastik anemi, ateş, sensorinöral işitme kaybı, kardiyomyopati, santral sinir sistemi anomalileri ve gelişme geriliğiyle beraber giden immün yetmezlik (SIFD) de akılda tutulmalıdır (22). Megaloblastik anemi de PİYH'nı düşündüren bulguları olan hastalarda folat ve B12 vitamini metabolizması bozukluklarına bağlı olabilir (23,24). Hemolize bağlı anemi de gelişen otoimmüniteye bağlı olarak değişik PİYH' da meydana gelebilir.

Periferik yayma: Yaymada görülen parçalanmış eritrositler G-6PD (glukoz-6 fosfat dehidrogenaz) eksikliğini, nötrofil granüllerindeki birikimler Chediak-Higashi sendromunu, Howell-Jolly cisimcikleri de aspleniye bağlı gelişebilecek immün yetmezlikleri düşündürür. Aspleni konjenital ya da sekonder olabilmektedir. Yine izole ya da konjenital kalp hastalığı ile beraber sendromik (Ivemark sendromu) de karşımıza çıkmakta ve çoğu zaman dikkatten kaçabilmektedir (5).

Kemik İliği Aspirasyon ve Biyopsisi : Yapılmış kemik iliği biyopsisinde saptanan hemofagositoz bulgusu hemofagositik lenfositiositozu (HLH), myelokatheksis WHIM sendromunu, myelodisplazi (hipogammaglobulinemiyle beraber) monosomi 7 veya trisomi 8 sendromlarını düşündürür (5). Monositopeni ile myelodisplazi GATA2 (GATA-binding protein 2) gen mutasyonuna bağlı CVID' yi düşündürmelidir (25). PGM3 mutasyonuna bağlı HİES ve immuno-osseöz displazide, nötropenik sendromlarda, CVID ve diskleratozis konjenita gibi PİYH'de de kemik iliğinin tutulduğu ve yapısının bozulduğu izlenir (5,26).

Tam Biyokimya: Klinikte rutin istediğimiz testlerden biri olan biokimyasal incelemede (γ)–globulin düzeylerine bağlı değişimler ve bunun total protein seviyesine yansımaları dikkati çekecektir. Hipogammaglobulinemik /agammaglobulinemik ya da kompleman eksiklikleri olan hastalarda globulin ve dolayısıyla serum total protein düzeylerinde azalmaya rastlanabilir. Yine, malnütrisyon, böbrek ya da bağırsaktan protein kaybı gibi sekonder yetmezliklerde de globulin/total protein düzeylerinde azalma görülür. Otoimmün hastalıklar, miyelom, HIV ya da kronik enfeksiyonlar gibi durumlarda da artmış globulin seviyeleri görülebilir (5). Yine nadir de olsa istenen vitamin B12 ve folat düzeylerinde düşüklük bunlara bağlı gelişecek PİYH teşhisi açısından yardımcı olabilir. Bu hastalar karşımıza süt çocukluğunda AKİY'i düşündürecek şekilde lenfopeni, hipogammaglobulinemi, PCP, ağır CMV tabloları ile çıkabilir (23,24).

Serolojik incelemeler : Otoantikor ve spesifik antikorların varlığı önemlidir. Sitokin otoantikorlarının (anti-GM-CSF, anti-IFN- γ , anti-IL-17, anti-IL-22 vb.) varlığı bize otoantikor-ilişkili immün yetmezlik grubunu (PİYH fenokopileri) düşündürmelidir. Örneğin, anti-IL-17 ve anti-IL-22 gibi otoantikorların varlığında, CMCC/APECED tablosunun olduğu bildirilmiştir (1,2). Anti-HIV dışında, daha önce geçirilmiş enfeksiyonlara antikor cevabının gelişip gelişmediğini gösteren anti-CMV, anti-EBV, anti-HSV-1 vb. antikorlar da kişinin bağışıklık geliştirebilme kapasitesini önemlidir. Yine yapılan aşılardan sonraki gelişen anti-HBs, anti-Rubella vb. antikorlar dışında spesifik antikorlar dediğimiz protein (tetanoz, difteri, Hib, konjuge aşılardan vb.) ve polisakkarit bakterisi (pnömokok) aşılardan cevapların değerlendirilmesi gerekir (27). Bunların öncelikle serum koruyucu titrelerine bakılmalı ve yetersizse rapel (booster) yapılarak en geç 4 hafta içinde 4 kata kadar titrede artış olup olmadığına değerlendirilmelidir (5). Yine serum izohemagglütinini ABO kan grubu ve barsaktaki polisakkarit antijenlerine karşı spontan / doğal olarak oluşan spesifik antikorlardır. İlk 12 ay içinde izohemagglütinin titrelerine çok güvenilemez. On yaşına kadar, $\geq 1/4$ 'lük anti-A ve/veya anti-B titreleri, 10 yaş ve üstünde ise $\geq 1/10$ 'luk titre yeterli kabul edilmektedir. (4,16,28,29). (Tablo 1)

Tablo 1. Yaşa göre izohemagglütinin titre düzeyleri ve nasıl değerlendirileceği gösterilmiştir (kaynak 28'den uyarlanmıştır).

Yaş	Anti-A titresi	Anti-B titresi
0-6 ay	Bilinmiyor (?)	Bilinmiyor (?)
6 ay – 2 yaş	$\geq 1/4$	$\geq 1/4$
2 – 10 yaş	$\geq 1/4$	$\geq 1/16$
> 10 yaş	$\geq 1/4$	$\geq 1/4$
Adolesan/Erişkin	$\geq 1/10$	$\geq 1/10$

X-ray Röntgen incelemesi : Akciğer filmindeki timik gölgenin özellikle yenidoğan bebekte cerrahi girişim ve enfeksiyon gibi stres unsurları karşısında erkenden küçülebileceği ve görünmez hale gelebileceği akılda tutulmalıdır. Yine lenfoid dokunun bir unsuru olan, adenoid vejetasyonun boyun lateral (nazofarenks) grafisinde görülmesi önemlidir (4,29).

Kemik Grafisi/Sintigrafisi: Majeed Sendromunda anemi ile beraber kemik lezyonlarına rastlanabilir. Yine osteomyelit gibi enfeksiyonlar da değişik PİYH'da bildirilmiştir. Ayrıca, interlökin-1 reseptör antagonist (IL-1RA) veya interlökin-36 reseptör antagonist (IL-36RA) eksikliklerinde (sırasıyla, DIRA ve DITRA) ciltte püstül, osteopeni ve litik kemik lezyonu bildirilmiştir (30,31). Immuno-osseöz (iskelet) displazi ise; kıkırdak-saç hipoplazisi, Schimke sendromu ve PGM3 mutasyonuna bağlı bozukluklarda gösterilmiştir (5,26).

Radyografik panoramik görüntüleme: Bununla diş anomalileri ile giden bazı PİYH'nı tanıyabiliriz. Süt dişlerinin düşmemesi ve alttan gelen kalıcıların çıkmaya çalıştığı ve yüz görünümünün bozulduğu HIES, panoramik grafide çarpıcı görünüme yol açar. Yine 'cherubism: şerubizm' çocuklarda bilateral, simetrik, ağrısız olarak yanak ve çene kemiklerinin büyümesi ile giden ve 2-7 yaş arasında görülen nadir kemik displazisidir. Çoğu vaka pubertede spontan olarak gerileyebilir bazen de erişkinde devam edip düzeltici cerrahi gerektirebilir. Fibro-osseöz kitleler oküler küreyi yerinden oynatıp gözde yukarıya doğru bir bakışa yol açar. Kaburga kemiklerinde kistik değişiklikler meydana gelir. Diş gelişiminde de süt dişlerinin erken düşmesine ve kalıcı dişlerin anormal çıkmasına yol açar (32).

Gecikmiş Tip Hipersensitivite (Aşırı duyarlık) Deri Testleri: Daha önce karşılaşılan mikroorganizmanın antijenini 25-27 numara iğne ile 0.1mL miktarında intrakütanöz enjeksiyon şeklinde vererek bu testler gerçekleştirilir. Tüberkülin de denilen PPD testi, 1:100 olarak sulandırılan Candida albicans ile yapılan Candidin testi, 1:100 sulandırılan tetanus toksoid ve 1:30 sulandırılan Trichophyton ile yapılan deri testleri hücrel immünitenin yeterli olup olmadığını ölçmede fikir

verecektir. Çocuk hastalarda 2 mm kadar, erişkinlerde 5 mm civarında test sonrası 48-72 saat sonrası meydana gelen endüasyon pozitiflik için yeterli kabul edilmektedir (29).

Flow sitometrik incelemeler: Bu inceleme türü lenfositlerin alt gruplarını ayırmada (immünfenotipleme) faydalı olacağı gibi, B (naif, değişmiş hafıza hücreleri) ve T (naif, hafıza ve aktif hücreler) lenfositlerinin alt gruplarını incelemede de değerlidir. İmmünfenotipleme yapılarak KİY fenotipleri belirlenir. Yine bazı hücre yüzey, adhezyon moleküllerinin ve intrasitoplazmik protein, sitokin ve bazı enzimlerin ölçümünde faydalıdır (33). Periferik kan mononükleer hücreleri olan lenfosit ve monositlerde BTK enzim ekspresyonuna bakılarak XLA tanısı konulabilmektedir (34). Ayrıca, WAS proteinine T-B lenfosit ve monositlerde, stimüle edilen T hücrelerde CD40L ekspresyonuna bakılarak sırasıyla hastanın WAS ve hiperimmunoglobulin M sendromu olup olmadığına karar verilebilir (35,36).

Flow Sitometrik Hücre-aracılı (NK) Sitotoksite Testi: Hemofagositik lenfositiositoz ve NK hücrelerinde sayısal ve işlevsel bozukluklarla giden immün yetmezliklerde kullanılan bu test hücrel sitotoksiteyi ölçmede yardımcıdır. Bununla ilgili tarafımızdan geliştirilen bir yöntem de mevcuttur. Bu yöntem hücre dışı ligand ve hücre içi granüllerdeki enzimatik medyatörlerle oluşan hücre-aracılı sitotoksiteyi ölçmektedir (37).

Spesifik enzim incelemeleri: Adenozin deaminaz (ADA), pürin nükleozid fosforilaz (PNP), myeloperoksidaz ve G-6PD eksikliğinde yapılacak enzimatik incelemeler ile PİYH tipine tanı konulmuş olur (5). Türkiye’de bu tetkiklerin bir kısmı yapılamamakta fakat yurt dışındaki merkezlerden destek alınabilmektedir. Enzim incelemesi yapılamayan bozukluklarda genetik (G-6PD), histokimyasal ya da immunoblotting yöntemleri ile (myeloperoksidaz vb.) tetkikler de yapıp bu enzimlerin eksikliklerine bakılabilir (38).

Genetik Tanı Yöntemleri: Önceden bildiğimiz ve artık daha basit bir test gibi kalan karyotip ile sitogenetik anormalliklerin, kromozomal translokasyonlar ve kromozom fragilitésinin (kırıkları vb.) saptanması Ataksi-Telenjektazi (AT) ve diğer kromozomal onarım bozukluklarının teşhisinde yardımcıdır (16). Yine kromozomlar incelenerek sentromerik instabilite gösterilerek ICF sendromunu (immunodeficiency with centromeric instability and facial anomalies: sentromerik instabilite ve yüz anomalileri ile giden immün yetmezlik), yine hipogammaglobulinemi ile giden trisomi 21, trisomi 8 ve monosomi 7 sendromlarının tanısı konulabilir (4,5,39). Fluorescence in situ hybridization (FISH) tekniği de özellikle DGS (22q11 mikrodelsiyonu) ve CHARGE sendromunu göstermede kullanılır (4,5,20,40). Kromozomlar sonrası genomları değerlendirmek için ise, bilinen klasik DNA dizileme yöntemleri olan Sanger (dideoksi) sekanslama ve mikroyarray yöntemi (varyant kopya sayısı analizi) delesyon ve duplikasyonları göstermede kullanılır. Örneğin LRBA ve DOCK8 eksikliği tanıları bu metotlarla kullanılabilir (41,42).

İleri nesil dizileme analizleri (next generation sequencing): Son zamanlarda geliştirilen bu metotlardan ‘target panel’ seçilmiş genlerin analizi, WES (whole exome sequence) tüm ekzom dizi

analizi, WGS (whole genome sequence) tüm genom dizi analizi yapmak için kullanılmaktadır (43,44). Bu yöntemlerin birbiriyle karşılaştırılması tabloda görülmektedir. (Tablo 2) .

Tablo 2. İleri nesil dizileme analiz (next generation sequencing) yöntemlerinin birbiriyle karşılaştırılması görülmektedir (kaynak 43'den uyarlanmıştır).

	Target Panel (Hedef panel)	Whole Exome Sequence (Tüm ekzom sekansı)	Whole Genome Sequence (Tüm genom sekansı)
Analiz tekniği	300 genom	%2 (tüm genomun)	Tüm genom
Fiyatı	375\$	800\$	1.500\$
Varyantlar	Değişken	~20.000	~4.000.000
Üstünlükleri	<ul style="list-style-type: none"> - Ayarlanabilir - En ucuz 	<ul style="list-style-type: none"> - Yeni genleri saptama (kodlanan bölgede) - Düşük maliyet 	<ul style="list-style-type: none"> - Yeni genleri saptama (kodlanan ve kodlanmayan bölgelerde) - DNA yapısal varyantlarını bulur
Kısıtlılıkları	<ul style="list-style-type: none"> - Sadece hedef paneldeki varyantları saptar - Panellerin bazen yeniden güncellemesi gereklidir - DNA yapısal varyantlarını bulmaz 	<ul style="list-style-type: none"> - Dizileme kalitesinde değişkenlik (yetersiz saptama) - DNA yapısal varyantlarını bulamaz - Kodlanmayan bölgeleri saptamaz 	<ul style="list-style-type: none"> - En kompleks analiz - En çok veri elde edilir - En yüksek maliyet

Prenatal Dönemde Teşhiste Laboratuvar Yöntemleri: Yukarıda bahsedilen bu tetkiklerden bir kısmı bebek doğmadan anne karnında, prenatal olarak, yapıp PİYH tespit edilebilmektedir. Koryon villüs örnekleme (CVS) ADA eksikliği, amniotik hücrelerin incelenmesiyle PNP eksikliği ve transkobalamin II eksikliği' nin tanıları rahatlıkla konulabilmektedir. Yine fetüs kanında NBT (CGD teşhisinde), btk ekspresyonu (XLA), TREC incelemesi (AKİY ve diğer KİY'ler) yapılabilmektedir (5,29,45,46).

Neonatal Dönemde Teşhiste Tarama Testleri: Rutin olarak uygulanan yenidoğan metabolik tarama testlerine ilave edilen ve ülkemizde Ankara'da pilot çalışma olarak başlayan Guthrie kağıdından bakılabilen TREC (T hücre reseptörünün koparılmış DNA halkaları) testi, özellikle AKİY hastasını erkenden teşhis edilebilmesi amacıyla geliştirilmiştir (47). Bu yöntem test edilen bebekte naif T

hücresinin yeterli miktarda üretilip üretilmediğini gösterir. TREC testinin ADA enzim eksikliği gibi bilinen bir AKİY hastalığını yakalayamaması dışında bazı KİY 'lerin (AT, DGS vb.) erken saptanabilmesine katkısı bilinmektedir. Yine bu yöntemin yetersizlikleri dışında, pozitiflik için cut-off değerinin ne olması gerektiği konusunda da fikir birliği halen yoktur (47). Bu yöntemle aynı anda alınan periferik kanda B hücrelerinin olup olmadığı da KREC (48) testi ile bakılabilmektedir. Tarama testi olarak bazı ülkelerde TREC ile aynı anda bakılmaktadır.

Sonuç : Yukarıda anlatıldığı gibi öncelikle bir klinisyen olarak her gün kullandığımız basit testlerden daha az istenen ve değerlendirmesi zor genetik testlere kadar tüm testlerin nerede, ne zaman isteneceğini ve nasıl yorumlanacağını iyi bilinmelidir.

KAYNAKLAR

- 1- Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Ailal F, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. The 2017 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. J Clin Immunol 2018; 38(1):129-43.
- 2- Parvaneh N, Casanova JL, Notarangelo LD, Conley ME. Primary immunodeficiencies: a rapidly evolving story. J Allergy Clin Immunol 2013;131(2):314-23.
- 3- Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(2 Suppl 2): S182-94.
- 4- Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. Ann Allergy Asthma Immunol 2005; 94(5 Suppl 1):S1-63.
- 5- Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2015; 136(5): 1186-205.e1-78.
- 6- Kilic SS, Ozel M, Hafizoglu D, Karaca NE, Aksu G, Kutukculer N. The prevalences [correction] and patient characteristics of primary immunodeficiency diseases in Turkey--two centers study. J Clin Immunol 2013; 33(1):74-83.
- 7- 10 Warning Signs - JMF - Jeffrey Modell Foundation Medical advisory Board. Available from: URL: <http://www.info4pi.org/library/educational-materials/10-warning-signs>
- 8- Chinen J, Paul ME, Shearer WT. Approach to the Evaluation of the immunodeficient patient. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW Jr, Frew A, Weyand C, editors. Clinical immunology: principles and practice. London: Elsevier; 2012. pp. 1-31.
- 9- Kılıç M, Taşkın E, Selmanoğlu A. Primer İmmün yetmezlikli olgularımızın retrospektif değerlendirilmesi. Fırat Tıp Derg 2015; 20(1): 37-42.
- 10- Aldırmaz S, Yücel E, Kıyıkım A, Çokuğraş H, Akçakaya N, Camcıoğlu Y. Profile of the patients who present to immunology outpatient clinics because of frequent infections. Turk Ped Archiv 2014;

49:210-6.

11- Uygun DFK, Hafizoğlu D. Primer immün yetmezlik hastalarımızın primer immune yetmezlik hastalarımızın retrospektif değerlendirilmesi; Erzurum deneyimi retrospektif değerlendirilmesi; Erzurum deneyimi. *Asthma Allergy Immunol* 2015; 13:90-3.

12- Misirlioğlu ED, Tayfur G, Doğru M, Duman H, Özmen S, Aytekin C, et al. Allerji kliniğinde izlenen hastalarda primer antikor eksiklikleri. *Türkiye Çocuk Hast Derg* 2010; 4(4): 219-23.

13- Nima Rezaei, Asghar Aghamohammadi, Luigi D. Notarangelo (Eds.) *Primary Immunodeficiency Diseases*. Berlin: Springer; 2008.

14- Pannicke U, Honig M, Hess I, Friesen C, Holzmann K, Rump EM, et al. Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. *Nat Genet* 2009;41:101-5.

15- Harris ES, Weyrich AS, Zimmerman GA. Lessons from rare maladies: leukocyte adhesion deficiency syndromes. *Curr Opin Hematol* 2013;20:16-25.

16- Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S297-305.

17- Shearer WT, Dunn E, Notarangelo LD, Dvorak CC, Puck JM, Logan BR, et al. Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: the primary immune deficiency treatment consortium experience. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1092-8.

18- Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, et al. (International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies). Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1161-78.

19- Kıyıkım A, Yüce EG, Barış E, Nain E, Keleş S, Aktürk H, et al. Serum IgE düzeyi ve eozinofil sayısı ile atopik hastalıklar hiper IgE sendromu'ndan ayırt edilebilir mi? *Asthma Allergy Immunol* 2017;15:73-81.

20- Routes J, Abinun M, Al-Herz W, Bustamante J, Condino-Neto A, De La Morena MT, et al. ICON: the early diagnosis of congenital immunodeficiencies. *J Clin Immunol*. 2014; 34(4): 398-424.

21- Ochs HD, Slichter SJ, Harker LA, Von Behrens WE, Clark RA, Wedgwood RJ. The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* 1980; 55(2):243-52.

22- Chakraborty PK, Schmitz-Abe K, Kennedy EK, Mamady H, Naas T, Durie D, et al. Mutations in TRNT1 cause congenital sideroblastic anemia with immunodeficiency, fevers, and developmental delay (SIFD). *Blood* 2014;124:2867-71.

23-Trakadis YJ, Alfares A, Bodamer OA, Buyukavci M, Christodoulou J, Connor P, et al. Update on transcobalamin deficiency: clinical presentation, treatment and outcome. *J Inherit Metab Dis* 2014; 37:461-73.

24- Kishimoto K, Kobayashi R, Sano H, Suzuki D, Maruoka H, Yasuda K, et al. Impact of folate

therapy on combined immunodeficiency secondary to hereditary folate malabsorption. Clin Immunol 2014;153:17-22.

25- Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. Blood 2011;118: 2653-5.

26- Sassi A, Lazaroski S, Wu G, Haslam SM, Fliegau M, Mellouli F, et al. Hypomorphic homozygous mutations in phosphoglucomutase 3 (PGM3) impair immunity and increase serum IgE levels. J Allergy Clin Immunol 2014;133:1410-9, e1-13.

27- Balloch A, Licciardi PV, Tang ML. Serotype-specific anti-pneumococcal IgG and immune competence: critical differences in interpretation criteria when different methods are used. J Clin Immunol. 2013; 33(2):335-41.

28- Fong SW, Quaundah BY, Taylor WF. Transfusion 1974; 14: 551-9.

29- Shearer WT, Buckley RH, Engler RJM, Finn AF, Fleisher TA, Freeman TM, et al. (CLIC-AAAAI Members). Practice parameters for the diagnosis and management of immuno-deficiency. Ann Allergy Asthma Immunol 1996; 282-94.

30- Aksentijevich I, Masters SL, Ferguson PJ, Dancey P, Frenkel J, van Royen-Kerkhoff A, et al. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1receptor antagonist. N Engl J Med 2009; 360:2426-37.

31- Marrakchi S, Guigue P, Renshaw BR, Puel A, Pei XY, Fraitag S, et al. Interleukin36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. N Engl J Med 2011; 365: 620-8.

32- Papadaki ME, Lietman SA, Levine MA, Olsen BR, Kaban LB, Reichenberger EJ. Cherubism: best clinical practice. Orphanet J Rare Dis 2012;7(suppl 1):S6.

33- Özdemir Ö, Karavaizoğlu Ç. Akım sitometrinin immünolojik ve allerjik hastalıklarda kullanımı. Asthma Allergy Immunol 2016;14:117-28

34-Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. Blood 1998; 91(2):595-602.

35- Qamar N, Fuleihan RL. The hyper IgM syndromes. Clin Rev Allergy Immunol 2014; 46:120-30.

36- Ochs HD, Filipovich AH, Veys P, Cowan MJ, Kapoor N. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, clinical and laboratory manifestations, and treatment. Biol Blood Marrow Transplant 2009;15:84-90.

37- Ozdemir O, Ravindranath Y, Savaşan S. Cell-mediated cytotoxicity evaluation using monoclonalantibody staining for target or effector cells with annexinV/ propidium iodide colabeling by fluorosphere-adjusted counts on three-color flow cytometry. Cytometry A. 2003; 56(1):53-60.

38- Nauseef WM. Diagnostic assays for myeloperoxidase and myeloperoxidase deficiency. Methods Mol Biol 2014;1124:537-46.

- 39- Hagleitner MM, Lankester A, Maraschio P, Hulten M, Fryns JP, Schuetz C, et al. Clinical spectrum of immunodeficiency, centromeric instability and facial dysmorphism (ICF syndrome). *J Med Genet* 2008; 45:93-9.
- 40- Devriendt K, Swillen A, Fryns JP. Deletion in chromosome region 22q11 in a child with CHARGE association. *Clin Genet* 1998; 53(5):408-10.
- 41- Alroqi FJ, Charbonnier LM, Keles S, Ghandour F, Mouawad P, Sabouneh R, et al. DOCK8 Deficiency Presenting as an IPEX-Like Disorder. *J Clin Immunol* 2017;37(8):811-9.
- 42- Bayer DK, Martinez CA, Sorte HS, Forbes LR, Demmler-Harrison GJ, Hanson IC, et al. Vaccine-associated varicella and rubella infections in severe combined immunodeficiency with isolated CD4 lymphocytopenia and mutations in IL7R detected by tandem whole exome sequencing and chromosomal microarray. *Clin Exp Immunol* 2014;178(3):459-69.
- 43- Seleman M, Hoyos-Bachiloglu R, Geha RS, Chou J. Uses of next-generation sequencing technologies for the diagnosis of primaryimmunodeficiencies. *Front Immunol* 2017; 8: 847.
- 44- Conley ME, Casanova JL. Discovery of single-gene inborn errors of immunity by next generation sequencing. *Curr Opin Immunol* 2014; 30:17-23.
- 45- Stiehm ER. Immunodeficiency disorders: general considerations. In: Stiehm ER, ed. *Immunologic Disorders in Infants and Children*. Philadelphia: W B Saunders Co., 1989:157–95.
- 46- Hirschorn R. Adenosine deaminase deficiency. *Immunodef Rev* 1990; 2:175–98.
- 47- Özdemir O. Neonatal screening test for severe combined immunodeficiency of primary immunodeficiency diseases: TREC assay and its limitations. *MOJ Immunol* 2016; 3(6): 00107.
- 48- King JR, Hammarström L. Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: history, current and future practice. *J Clin Immunol* 2018; 38(1):56-66.