



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**



**PRİMER İMMÜN YETMEZLİĞİ OLAN HASTALARDA  
AKIM SİTOMETRİSİNİN TANIDAKİ YERİ VE ÖNEMİ**

**Dilara BEŞLİ ÇELİK**

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Kamile Aydan İKİNCİOĞULLARI**

**ANKARA**

**2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**PRİMER İMMÜN YETMEZLİĞİ OLAN HASTALARDA  
AKİM SİTOMETRİSİNİN TANIDAKİ YERİ VE ÖNEMİ**

**Dilara BEŞLİ ÇELİK**

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Kamile Aydan İKİNCİOĞULLARI**

**ANKARA**

**2022**

## ETİK BEYAN

**Ankara Üniversitesi**  
**Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,**

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Primer immün yetmezliği olan hastalarda akım sitometrisinin tanıdaki yeri ve önemi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından, 13.02.2020 tarihinde, İ1-62-20 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

**Öğrencinin Adı Soyadı:** Dilara BEŞLİ ÇELİK

**Tarih:**

**İmza:**

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**TEZ SINAVI TUTANAĞI**

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr. Dilara BEŞLİ ÇELİK	Sınav tarihi: 28/04 / 2022
Anabilim/Bilim Dalı	: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Aydan İKİNCİOĞULLARI	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Primer immün yetmezliği olan hastalarda akım sitometrisinin tanıdaki yeri ve önemi	
Tezin Niteliği:	<input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	<input type="checkbox"/> 1 <input checked="" type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
<input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne	
<input type="checkbox"/> Reddine	
<input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
<input checked="" type="checkbox"/> Oy birliği <input type="checkbox"/> Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

**Jüri Başkanı**  
**Unvanı, Adı, Soyadı**  
Prof. Dr. Aydan İKİNCİOĞULLARI

**Jüri Üyesi**  
**Unvanı, Adı, Soyadı**  
Prof. Dr. Figen DOĞU

**Jüri Üyesi**  
**Unvanı, Adı, Soyadı**  
Doç. Dr. Şule HASKOLOĞLU

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimi aldığım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nı daha üst seviyelere getirmeyi kendine görev edinen, bilgi ve tecrübelerinden yaralandığım, her konuda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm değerli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Saadet Arsan'a ve onun nezdinde mesleki deneyimlerini sabır ve hoşgörü ile bizlerle paylaşan tüm hocalarıma,

Ulusal ve uluslararası çalışmalarıyla çocuk immünolojinin gelişimine büyük katkılar sunan, uzmanlık tezimi hazırlama aşamasında bana bilgi birikimi, tecrübesi ve yetenekleriyle yol gösteren, akademik ve insani yönleri ile her zaman örnek aldığım değerli tez danışmanım Prof. Dr. Kamile Aydan İkinciogulları'na,

Bilgisi, deneyimi, güler yüzü ve anlayışıyla immünolojiye değer katan kıymetli hocam Prof. Dr. Figen Doğu'ya,

Tez sürecinin her aşamasında yanımda olan, desteklerini sonsuz hissettiğim ve her zaman örnek aldığım Doç. Dr. Şule Haskoloğlu'na,

Uz. Dr. Kübra Baskın ve Uz. Dr. Nazlı Deveci başta olmak üzere, tüm uzman ağabey ve ablalarıma, asistan arkadaşlarıma, Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı çalışanlarına, hemşirelere ve sağlık personellerine,

Hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen aileme, en çok da varlıklarıyla bana her zaman güç veren canım annem, babam ve kardeşim Tolunay'a,

Her zaman yanımda olan, sevgilim, eşim Utkum'a,

Ve son olarak da gelmesini sabırsızlıkla beklediğim miniğime...

En içten teşekkürlerimle.

**Dr. Dilara BEŞLİ ÇELİK**

**Ankara 2022**

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN .....	ii
ÖZGÜNLÜK RAPORU .....	iii
KABUL ONAY SAYFASI .....	iv
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>5</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>7</b>
4.1. İmmün sistem ve hücreleri.....	7
4.2. Primer immün yetmezlikler .....	8
4.2.1. Tanım .....	8
4.2.2. Tarihçe-Epidemiyoloji .....	9
4.2.3. Sınıflandırma.....	9
4.2.4. Klinik.....	11
4.2.5. Laboratuvar incelemeleri .....	14
4.2.5.1.Tarama testleri .....	15
4.2.5.2. İleri immünolojik incelemeler .....	15
4.2.5.3. Genetik incelemeler.....	16
4.3. Akım Sitometrisi.....	17
4.3.1. Tarihçe.....	17
4.3.2. Genel bilgiler.....	17
4.3.3. Primer immün yetmezliklerde akım sitometrisinin kullanım alanları.....	20
4.3.3.1. Lenfosit alt grupları (Fenotipik sitometri).....	22
4.3.3.2. Spesifik antijenlerin (proteinlerin/moleküllerin) tayini.....	25
4.3.3.3. Fonksiyonel testler (Fonksiyonel sitometri).....	26
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>29</b>
5.1. Çalışmada yer alan hastalar .....	29
5.2. Çalışmanın yöntemi .....	29
5.3. Verilerin değerlendirilmesi ve sunumu.....	30

5.4. Etik kurul onayı .....	30
5.5. İstatistik analiz .....	30
<b>6. BULGULAR .....</b>	<b>31</b>
6.1. Hastaların genel özellikleri ve klinik bulguları.....	31
6.2. PİY’de akım sitometrisi kullanımı ve tanıya katkısı .....	36
6.2.1. Fenotipik sitometri .....	36
6.2.2. Spesifik antijenlerin (proteinlerin/moleküllerin) tayini .....	38
6.2.3. Fonksiyonel sitometri.....	39
<b>7. TARTIŞMA.....</b>	<b>46</b>
<b>8. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>59</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>61</b>



## KISALTMALAR

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>ADA</b>	: Adenozin deaminaz
<b>AKİY</b>	: Ağır kombine immün yetmezlik
<b>ALPS</b>	: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom
<b>ASYE</b>	: Alt solunum yolu enfeksiyonu
<b>AT</b>	: Ataksi-Telenjektazi
<b>BAFF-R</b>	: B hücresi aktive edici faktör reseptörü
<b>BCG</b>	: Bacille Calmette-Guerin
<b>BTK</b>	: Bruton tirozin kinaz
<b>CD</b>	: Cluster of differentiation
<b>CD40L</b>	: CD40 ligand
<b>CTLA-4</b>	: Sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4
<b>DHR</b>	: Dihidrorodamin
<b>DNT</b>	: Çift negatif T
<b>DOCK8</b>	: Deducator of cytokinesis-8
<b>EBV</b>	: Epstein-Barr Virüs
<b>ESID</b>	: European Society for Immunodeficiencies
<b>FACS</b>	: Fluorescence activated cell sorter
<b>FHL</b>	: Familyal hemofagositik lenfohistiyositoz
<b>FS</b>	: Forward scatter
<b>GvHH</b>	: Graft versus host hastalığı
<b>HİES</b>	: Hiper-IgE sendromu
<b>HİGM</b>	: Hiper-IgM sendromu
<b>HKHN</b>	: Hematopoetik kök hücre nakli

<b>HLH</b>	: Hemofagositik lenfohistiyositozis
<b>ICOS</b>	: İndüklenebilir ko-stimülatör
<b>IPEX</b>	: X'e bağlı immüendisregülasyon enteropati poliendokrinopati
<b>IRAK4</b>	: İnterlökin-1 reseptörle ilişkili kinaz 4
<b>ITK</b>	: İndüklenebilir T-hücre kinaz
<b>IUIS</b>	: International Union of Immunological Societies (Uluslararası İmmünoloji Dernekler Birliği)
<b>iNKT</b>	: invaryant natural killer T
<b>JAK3</b>	: Janus kinaz 3
<b>KGH</b>	: Kronik granüloamatöz hastalık
<b>KİY</b>	: Kombine immün yetmezlik
<b>KMCK</b>	: Kronik mukokutanöz kandidiyazis
<b>LAD</b>	: Lökosit adezyon defekti
<b>LRBA</b>	: LPS-responsive beige-like anchor protein
<b>MHC</b>	: Major histocompatibility complex
<b>MSMD</b>	: Mikobakteriyel enfeksiyonlara Mendelyen yatkınlık
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NBT</b>	: Nitroblue tetrazolium
<b>NK</b>	: Natural killer (doğal öldürücü)
<b>OR</b>	: Otozomal resesif
<b>PHA</b>	: Fitohemaglütinin
<b>PİY</b>	: Primer immün yetmezlik
<b>PMA</b>	: Forbol miristat asetat
<b>PMT</b>	: Photo multiplier tubes
<b>RCS</b>	: Rapid cell spectrophotometer
<b>RD</b>	: Retiküler disgenezi
<b>RTE</b>	: Recent tymphic emigrants (yeni timik göçmenler)

<b>SAP</b>	: Sinyal aktivasyon molekül ilişkili protein
<b>SÇGH</b>	: Süt çocuğunun geçici hipogamaglobulinemisi
<b>SPSS</b>	: Statistical package for the social sciences
<b>SS</b>	: Side scatter
<b>STAT</b>	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
<b>Tc</b>	: Sitotoksik T hücreler
<b>TCR</b>	: T hücre reseptörü
<b>TEMRA</b>	: Terminal diferansiye efektör bellek T hücreler
<b>Th</b>	: Yardımcı T hücreler
<b>WAS</b>	: Wiskott-Aldrich sendromu
<b>WASp</b>	: Wiskott-Aldrich sendromu proteini
<b>XIAP</b>	: X'e bağlı apoptozis inhibitörü
<b>XLP</b>	: X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom
<b>YDİY</b>	: Yaygın değişken immün yetmezlik
<b>ZAP70</b>	: $\zeta$ -zinciri ilişkili protein kinaz-70

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa numarası

Şekil 4.1. Hematopoetik kök hücrenin farklılaşma aşamaları .....	7
Şekil 4.2. T ve B lenfositlerin kemik iliği ve timusda geçirdikleri farklılaşma aşamaları ve bu aşamalarda ortaya çıkan defektlerin neden olduğu immün yetmezliklerden bazıları .....	8
Şekil 4.3. IUIS raporlarına göre tanımlanan genetik defekt sayısının yıllara göre dağılımı ...	10
Şekil 4.4. Akım sitometrisi cihazının çalışma .....	18
Şekil 4.5. FS/SS ve CD45/SS grafiğinde periferik kan hücrelerinin dağılımı .....	19
Şekil 4.6. AKİY'in immünojik sınıflandırması.....	23
Şekil 4.7. T-B+NK+ AKİY tanısıyla izlenen hastanın lenfosit alt grup analizi.....	24
Şekil 4.8. Sağlıklı kontrol ve IL-7RA eksikliği olan bir hastada CD127 (IL-7R $\alpha$ ) ekspresyonunun akım sitometri incelemesiyle değerlendirilmesi .....	24
Şekil 4.9. Sağlıklı kontrol ve hasta BTK ekspresyonunun akım sitometri incelemesiyle değerlendirilmesi .....	26
Şekil 4.10. DHR123 oksidasyon testi. Uyarılmamış (A), uyarılmanın ardından azalmış oksidatif patlama gösteren KGH tanıli hasta (C) ve sağlıklı birey (B) .....	27
Şekil 6.1. Akım sitometrisiyle tanı alan hastaların gruplandırılması .....	36
Şekil 6.2. AKİY hastalarının immünofenotipik sınıflandırılması .....	37

## TABLolar DİZİNİ

	Sayfa numarası
<b>Tablo 4.1.</b> Primer immün yetmezliği olan hastalarda fizik muayene bulguları .....	14
<b>Tablo 4.2.</b> PİY tanısında laboratuvar incelemeleri .....	16
<b>Tablo 4.3.</b> Akım sitometrisi ile saptanabilen bazı lenfosit alt grupları.....	19
<b>Tablo 4.4.</b> Bazı PİY'lerin değerlendirilmesinde akım sitometrisi uygulamaları .....	20
<b>Tablo 4.5.</b> Fenotipik sitometri ve olası tanılar .....	22
<b>Tablo 6.1.</b> Hastaların IUIS PİY sınıflamasına göre gruplandırılması.....	32
<b>Tablo 6.2.</b> Hastaların demografik özellikleri .....	33
<b>Tablo 6.3.</b> Hastaların başvuru yakınmaları .....	34
<b>Tablo 6.4.</b> Hastaların başvuru anındaki en sık fizik muayene bulguları.....	35
<b>Tablo 6.5.</b> Hasta alt gruplarına göre semptom başlangıç yaşı, tanı yaşı ve akım sitometrik tanı özelliklerinin değerlendirilmesi.....	41
<b>Tablo 6.6.</b> Hastaların PİY alt gruplarına göre fenotipik sitometri, proteine özgü testler ve fonksiyonel sitometri yapılma ve tanı alma oranları .....	42
<b>Tablo 6.7.</b> Hastaların akım sitometri ve genetik analiz sayıları ile akım sitometri tanı tarihi ve genetik analiz sonuç tarihi arasındaki zaman farkı.....	43
<b>Tablo 6.8.</b> Hastalık alt gruplarına göre akım sitometrisi ile tanı alan hasta grupları.....	44
<b>Tablo 6.9.</b> Hastalık alt gruplarına göre akım sitometrik inceleme ile tanı alan hastalar ve tanı yöntemleri.....	45

## 1. ÖZET

**Amaç:** Primer immün yetmezlikler (PİY), bağışıklık sisteminin farklı bileşenlerini etkileyen, enfeksiyon, otoimmünite, otoinflamasyon, alerji ve malignite ile karakterize klinik, immünolojik ve genetik olarak çeşitlilik gösteren bir grup kalıtsal hastalıktır. Klinik bulgular ve fizik muayene, PİY şüphesi uyandırdığında yapılan temel laboratuvar testler hastalığı tanımlamada her zaman yeterli olmayabilir. İmmün sistemin detaylı incelemesi akım sitometrisi aracılığıyla periferik kan lenfositlerinin hem sayısal hem de fonksiyonel olarak değerlendirilmesi ve spesifik molekül ekspresyon analizi ile yapılır. PİY tanısında genetik analizde büyük gelişmelere rağmen, akım sitometrisi, immün yetmezliklerin hızlı tanısı ve yeni tanımlanmış genetik kusurların fenotipik bulgularının belirlenmesi için ana dayanak olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada, akım sitometrisinin PİY'lerin erken ve doğru tanısı ile genetik tanıya katkısının belirlenmesinin yanı sıra, tanısal yolda ne kadar zaman kazandırdığının saptanması amaçlanmıştır.

**Gereç ve yöntem:** Bu çalışmada, 2010–2020 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'nda PİY tanısı olarak izlenmiş ve/veya izlenmekte olan; dosya, bölüm ve/veya hastane kayıt sistemleri taranarak ulaşılan PİY tanılı hastaların klinik ve akım sitometrik verileri retrospektif olarak değerlendirildi. Tüm hastaların akım sitometrisi incelemeleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştı.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen 1407 hastada en sık saptanan PİY alt grubu 954 (%67,8) hasta ile antikor eksiklikleri olduğu bulundu. Bunu sırasıyla 171 hasta (%12,2) ile kombine T ve B hücre yetmezlikleri, 106 hasta (%7,5) ile sendromik özellik gösteren kombine immün yetmezlikler izledi. Hastaların %85,6'sında enfeksiyon, %24,2'sinde alerji, %6,1'inde lenfoproliferasyon veya malignite, %5,5'inde otoimmünite ve %3,4'ünde inflamasyon bulgularına rastlandı. Hastaların 996'sına (%70,8) akım sitometrisi analizi yapıldı ve 229 hastaya (%23,0) tanı konuldu. Akım sitometrisi ile kesin tanı konulma oranları ağır kombine immün yetmezlik (AKİY) (%100), fagositler sistem fonksiyon bozuklukları (%95,6) ve AKİY dışı KİY'lerde (%82,8) en yüksek iken; sendromik KİY'ler, doğal immün sistem defektleri, kompleman eksiklikleri, otoinflamatuvar hastalıklar ve kemik iliği yetmezliklerinde çok düşük ve sadece olası tanısal yönlendirmeler şeklinde idi. Fenotipik sitometri yapılan hastaların %16,2'sine (162/996), spesifik protein ekspresyon incelemesi yapılanların %50,9'una (79/155) ve fonksiyonel inceleme yapılan hastaların %12'sine (101/836) bu

yöntemlerle kesin tanı konulduğu görüldü. Hasta başvurusu ile akım sitometrik tanı arasında geçen ortalama süre 4 gün idi. Antikor eksiklikleri grubundaki hastalar hariç neredeyse tüm hastalık alt gruplarının başvuru ile akım sitometrik tanı arasındaki süre ortancası birkaç gün ile sınırlı iken; antikor eksiklikleri grubunda bu süre yaklaşık 8 aydı. Çalışmamızda akım sitometri ile genetik tanı arasındaki ortalama sürenin 48,6 ay ile en uzun AKİY grubunda; 3 ay ile en kısa olacak şekilde sendromik KİY grubunda olduğu hesaplandı. Hastaların akım sitometrik tanı tarihi ve genetik analiz sonuçlanma tarihi arasındaki ortalama süre ise 12,4 (0,3-152,8) ay idi.

**Sonuç:** Bu retrospektif çalışmada, 2010–2020 dönemini içeren 10 yıllık sürede, kliniğimizde PİY tanısı alan 1407 hastadan yaklaşık 1/4'ünün akım sitometrisi uygulamaları sayesinde erken ve doğru tanıya, genetik inceleme öncesinde hızlıca ulaştırıldığı belirlendi. Akım sitometrisinin erken tanının küratif tedavi ve prognozda en önemli faktör olduğu PİY hastalıklarında çok değerli bir tanısal araç olduğu objektif veriler ile ortaya konuldu. Daha detaylı ve ileri akım sitometrisi uygulamalarının rutin PİY değerlendirme protokollerine eklenmesi, tanı ve prognozda iyileşmeye katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** akım sitometrisi, erken tanı, primer immün yetmezlik

## 2. ABSTRACT

**Aim:** Primary immunodeficiencies (PIDs) are a group of inherited diseases that affect different components of the immune system and are characterized by infection, autoimmunity, autoinflammation, allergy, and malignancy and showing clinical, immunological, and genetic diversity. Clinical findings and physical examination can raise the suspicion of PID, however basic laboratory tests are not always be sufficient to identify the disease. In these cases, detailed examination of the immune system is measured by both quantitative and functional evaluation of peripheral blood lymphocytes by means of flow cytometry and specific molecule expression analysis. Despite major advances in genetic analysis in the diagnosis of PIDs, flow cytometry remains the mainstay for rapid diagnosis of immunodeficiencies and the identification of phenotypic manifestations of newly identified genetic defects. In this study, it was aimed to determine the contribution of flow cytometry to the early and accurate diagnosis of PIDs and genetic diagnosis, as well as to determine how much time it saves in the diagnostic pathway.

**Materials and methods:** In this study, clinical and flow cytometric data of patients with PID who were diagnosed and/or followed-up in Ankara University School of Medicine, Department of Pediatrics, Division of Pediatric Immunology and Allergy Diseases between 2010 and 2020, collected from patients' hospital records, department and/or hospital registry systems, were evaluated retrospectively. Flow cytometric analysis of patients were performed in Ankara University School of Medicine Pediatric Immunology Laboratory.

**Results:** Antibody deficiencies were found to be the most common PID subgroup in 1407 patients included in the study, with 954 (67.8%) patients. This was followed by combined T and B cell deficiencies in 171 patients (12.2%), and combined immunodeficiencies with syndromic features in 106 patients (7.5%). Infection were found in 85.6% of the patients, allergy in 24.2%, lymphoproliferation or malignancy in 6.1%, autoimmunity in 5.5% and inflammation in 3.4%. Flow cytometric analysis was performed in 996 (70.8%) of the patients, and a definitive diagnosis was made in 229 (23.0%) patients. While the rates of definitive diagnosis by flow cytometry are higher in severe combined immunodeficiency (SCID) (100%), defects of phagocyte function (95.6%), and other CIDs (82.8%); in CID with associated or syndromic features, defects in intrinsic and innate immunity, complement deficiencies, autoinflammatory disorders, and bone marrow failures, the diagnostic value of flow cytometry was very low and it provided only guide for the diagnosis. Definitive diagnosis was made in 16.2% (162/996) of patients who underwent phenotypic cytometry,

50.9% (79/155) of those who underwent specific protein expression analysis, and 12% (101/836) of patients who underwent functional analysis. The median time between patient admission and flow cytometric diagnosis was 4 days. The median time between admission and flow cytometric diagnosis in almost all disease subgroups, except the patients in the antibody deficiencies group, is limited to a few days; in the antibody deficiencies group, this period was approximately 8 months. In this study, the longest time interval between flow cytometry and genetic diagnosis was in the SCID group with 48.6 months and the shortest time interval was in the combined immunodeficiencies with syndromic features, with 3 months. The median time interval between the patients' flow cytometric diagnosis and the genetic analysis results was 12.4 (0.3-152.8) months.

**Conclusions:** In this retrospective study, it was determined that approximately one-fourth of 1407 patients diagnosed with PID in the 10-year period of 2010–2020 and patients were quickly provided early and accurate diagnosis before genetic analysis thanks to current cytometry applications. It was revealed with objective data that flow cytometry is an invaluable diagnostic tool in PID diseases, where early diagnosis is the most important factor in curative treatment and prognosis. Adding more detailed and advanced flow cytometry assays to routine PID evaluation protocols will contribute to the improvement in diagnosis and prognosis.

**Key Words:** early diagnosis, flow cytometry, primary immunodeficiency

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Primer immün yetmezlikler (PİY), ya da yeni terminoloji ile doğuştan bağışıklık hataları; doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin farklı bileşenlerini etkileyen, enfeksiyon, otoimmünite, otoinflamasyon, alerji ve malignite ile karakterize olabilen klinik, immünolojik ve genetik olarak çeşitlilik gösteren bir grup kalıtsal hastalıktır (1). Günümüzde artan farkındalık ve teknolojik gelişmeler sayesinde tanımlanan PİY sayısı 456 olarak bildirilmekte olup her yıl tanımlanan 20 kadar yeni gen defekti listeye eklenmektedir. Uluslararası İmmünoloji Dernekler Birliği (*International Union of Immunological Societies*; IUIS) tarafından yapılan en son sınıflamada PİY'ler on ayrı kategoride ele alınmaktadır (2, 3). Genel popülasyondaki PİY prevalansı 1:2.000-1:10.000 olarak bildirilmektedir (4-6). Ülkemizdeki PİY prevalansı ise sadece iki merkez verilerine göre bile çok daha sık olarak; 30.5:100.000'dir (7). Tüm dünyada PİY'ler arasında en sık görülen ve 1:300-700 olarak bildirilen selektif IgA eksikliği ve prognozu en ağır olup bir pediatrik acil tablo olarak kabul edilen, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1:58.000 olarak raporlanmış olan, ağır kombine immün yetmezlik (AKİY) insidansları ülkemizde sırası ile 1:188 ve 1:10.000'dir (8-11).

Hastalar asemptomatik veya geçici klinik tablodan ciddi semptomatik klinik tabloya kadar çok geniş bir yelpazede karşımıza gelebilir. Tanı ve tedavi sorunu yaygın olup özellikle ağır prognoza sahip PİY hastalıklarında yaşamsaldır. Erken ve doğru tanı ile etkin tedavi, hemen tüm PİY'lerde yaşam kalitesini olumlu etkileyen en önemli kriter ve hatta hayat kurtarıcı özelliktir. Bu nedenle PİY hastalarında erken tanıya ulaşmak ilk ve en değerli hedefimizdir. Erken tanının ön koşulu ise hastalıktan şüphe etmektir. Hastalıktan şüphelenerek ayrıntılı öykü almak, öz ve soy geçmiş özellikleri ve tam bir fizik muayene ile hastayı bir bütün olarak değerlendirmek en önemli aşamadır.

Tanı için kullanılan laboratuvar testleri ise günlük pratikte çok sık kullandığımız tam kan sayımından genetik ve fonksiyonel analizlere kadar uzanmaktadır (12). Birinci basamak tarama testleri tam kan sayımı, izohemaglutininin titresi, immünglobulin düzeyleri gibi tetkikleri içerirken; immün sistemin detaylı incelemesi akım sitometrisi aracılığıyla periferik kan lenfositlerinin hem sayısal hem de fonksiyonel olarak değerlendirilmesi ve spesifik molekül ekspresyon analizi ile yapılır. Günümüzde çok çeşitli yöntemlerle ulaşılabilen genetik tanı sayesinde hatalı genler tanımlanabilmekte ve bu sayede de etkin ve küratif tedavi yöntemleri ile hastalar sağaltılabilmektedir. Ancak genetik tanı bazen uzun zaman gerektirmekte ve yüksek maliyetli olmaktadır.

Akım sitometrisi PİY'lerin tanısı için oldukça hassas bir yöntemdir (12, 13). Hücreleri tek tek değerlendirerek birçok hücrenin biyofiziksel ve biyokimyasal yönleri ile hızlı, çok parametrelili ve korele şekilde incelenmesine imkân veren bir tekniktir. Hücrelerin yüzeyindeki veya intraselüler yerleşimli antijenik yapıların florokrom işaretli monoklonal antikorlar kullanılarak tanımlanması ve kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanır (14). Genel olarak akım sitometrisi, hücrelerin yüzey antijenlerinin belirlenmesi, B ve T hücre alt gruplarının tayini, nötrofil fonksiyonları (fagositoz, solunumsal patlama ve kemotaksi), hücrelerin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi (hücre aktivasyonu, proliferasyonu) ve hücre içi sitokin tayini gibi çok geniş bir alanda kullanılmaktadır (15).

PİY tanısında genetik analizlerdeki büyük gelişmelere rağmen, akım sitometrisi, immün yetmezliklerin hızlı tanısı ve yeni tanımlanmış genetik kusurların fenotipik bulgularının belirlenmesi için ana dayanak olmaya devam etmektedir. PİY'lerin erken tanı ve tedavisi, ölüm ve komplikasyon riskinin azaltılabilmesi için çok önemlidir. Bu nedenle akım sitometrisi aracılığıyla konulacak erken tanı hayati önem taşımaktadır (16).

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalı'nda, Ocak 2010–Ocak 2020 tarihleri arasında PİY tanısı ve tedavisi olarak izlenmiş ve/veya izlenmekte olan hastalarda akım sitometrisinin tanıdaki yerinin ve öneminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. PİY ön tanısıyla başvuran hastalarda, kliniğe başvuru ile tanı arasında geçen sürenin belirlenmesi, akım sitometrisi ile elde edilen sonuçların genetiği ne ölçüde doğru yansıttığı ve akım sitometrisinin tanıda ne kadar zaman kazandırdığının saptanması hedeflenmiştir. Ayrıca bu hasta kohortuna ait demografik verilerin ve klinik özelliklerin retrospektif olarak gözden geçirilmesi ile ülkemizde bir PİY referans merkezi olan kliniğimiz hastalarının PİY altgrupları bakımından taşıdıkları özelliklerin belirlenmesi de hedeflenmiştir.

PİY'ler, nötrofil, makrofaj, dentritik hücre, kompleman proteinleri, NK hücresi, T ve B lenfositleri gibi doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin farklı bileşenlerini etkileyen, enfeksiyonlara yatkınlığın arttığı, otoimmün hastalıklar ile otoinflamasyon, alerji ve malignite oluşumuna yatkınlıkla karakterize klinik, immünolojik ve genetik olarak heterojen bir grup kalıtsal hastalıktır (1).

#### 4.2.2. Tarihçe-Epidemiyoloji

PİY'lerin tanımladığı ilk hasta raporları 20. yüzyılın başlarına dayanmakta olup 1922'de agranülositoz, 1926'da ataksi-telenjektazi (AT), 1937'de Wiskott-Aldrich Sendromu (WAS) olan hasta raporları yazılmıştır (20, 21). Ancak 1952 yılında Ogden Bruton'un, 8 yaşında tekrarlayan pnömokok sepsisi geçiren bir hastada gammaglobülin yokluğunu göstererek tanımladığı X'e bağlı agammaglobulinemi (Bruton hastalığı) tarihteki ilk PİY hastalığı olarak kabul görmektedir (22). Günümüzde ise tanımlanmış 450'den fazla PİY mevcuttur (2).

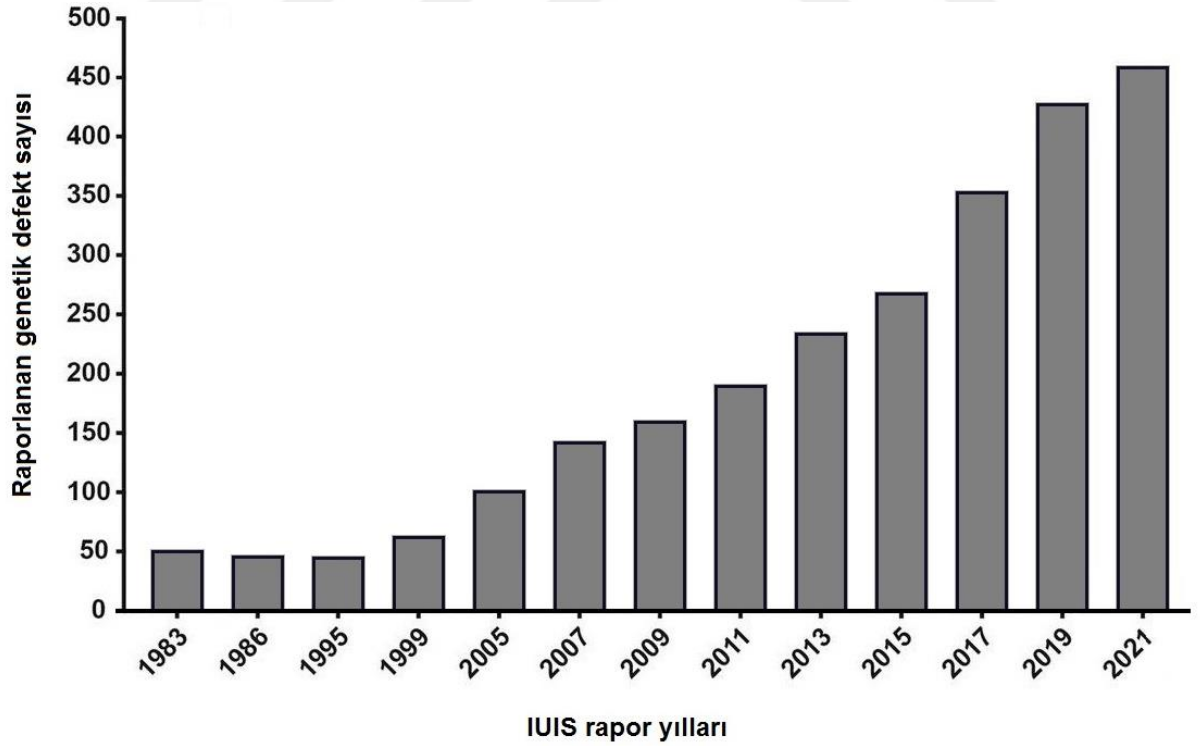
PİY, sanıldığı kadar aksine son derece sık karşılaşılan bir hastalık grubudur. Son yıllarda artan farkındalık ve tanı yöntemlerindeki teknolojik gelişmelerin de katkısıyla nadir hastalıklar olmadığı daha da iyi kanıtlanmıştır. 2007 yılında Boyle ve ark. (6) tarafından yapılan prevalans çalışmasında PİY sıklığı yaklaşık 1:2.000 olarak rapor edilmiştir. Türkiye'de ise 2004–2010 yılları arasında iki merkezin ortak yürüttüğü bir çalışmada PİY prevalansının 30,5:100.000 olduğu gösterilmiştir (7). Ancak ülkemizde PİY hastalarının ulusal kayıt sistemi bulunmadığı için veriler merkez kliniklerin yayınladıkları rapor düzeyinde kalmakta, ülkedeki gerçek prevalansı tam anlamıyla yansıtamamaktadır. Çoğu otozomal resesif (OR) geçiş gösteren tek gen hastalığı olup, ülkemizde akraba evliliğinin fazla olması nedeniyle görülme sıklığı oldukça yüksektir. Ayrıca ülkemizde kombine immün yetmezlik (KİY) oranı batı ülkelerine kıyasla oldukça fazladır. Türkiye'deki bölgesel bir pilot çalışmada AKİY insidansının 1:10.000 olduğu bulunmuştur. ABD'de bu oran 1:58.000 olarak raporlanmıştır. Tüm dünyada PİY'ler arasında en sık görülen ve 1:300-700 olarak bildirilen selektif IgA eksikliğinin insidansı ise ülkemizde 1:188'dir (8-11).

#### 4.2.3. Sınıflandırma

Günümüzde 450'den fazla PİY ve bu çeşitli fenotiplerin altında yatan 456 farklı genetik defekt tanımlanmıştır (Şekil 4.3). Bu hızlı artış tanı koymada birtakım zorlukları beraberinde getirmiştir. Bu karmaşanın önüne geçmek, kesin tanı ve tedaviyi kolaylaştırmak amacıyla

sınıflandırma gereksinimleri ortaya çıkmıştır. Dünya Sağlık Örgütü, 1970 yılında PİY’i tanımlamak ve sınıflandırmak için uzmanlar komitesi oluşturmuş ve çeşitli toplantılarda hastalık sınıflandırması güncellenmiştir. 1996 yılından sonra yapılan toplantılar IUIS ile birlikte düzenlenmiştir ve yapılan en son sınıflamada PİY, on ayrı kategori altında ele alınmıştır (2, 3). Bu kategoriler şunlardır:

1. Kombine T ve B hücre yetmezlikleri
2. Sendromik veya ek özelliklerle birlikte olan kombine immün yetmezlikler
3. Antikor eksiklikleri
4. İmmüdisregülasyon hastalıkları
5. Fagositer sistem sayı ve/veya fonksiyon bozuklukları
6. Doğal immün sistem defektleri
7. Otoinflamatuvar hastalıklar
8. Kompleman eksiklikleri
9. Kemik iliği yetmezlikleri
10. PİY fenokopyaları



Şekil 4.3. IUIS raporlarına göre tanımlanan genetik defekt sayısının yıllara göre dağılımı (2)

Avrupa İmmün Yetmezlikler Birliği (*European Society for Immunodeficiencies; ESID*) en son verilerine göre Avrupa genelinde en sık görülen PİY alt grubunu %50,6 oran ile antikor eksiklikleridir. Diğer iyi tanımlanmış immün yetmezlikler %15,1, KİY'ler %10,3, fagositer sistem sayı ve/veya fonksiyon bozuklukları %8,2 ve immüdisregölasyon hastalıkları %5,7 oranında görölmektedir (23).

Kliniğimizde 2002–2012 yılları arasında yapılan bir çalışmada PİY tanısı konulan 821 hasta, PİY alt gruplarına göre sınıflandırıldığında; antikor eksiklikleri %56,3, KİY'ler %17,3, sendromik KİY'ler %11,3, fagositer sistem sayı ve/veya fonksiyon bozuklukları %6,7 ve immüdisregölasyon bozuklukları %4,2 olarak saptanmıştır (24).

#### **4.2.4. Klinik**

PİY tanısında enfeksiyonlar en sık bulgu olup, öyküde en önemli kısmı oluşturur. Hastalarda ciddi ve tekrarlayan enfeksiyonlar henüz ortaya çıkmadan morbidite ve mortalitenin önlenmesi ve aileye erken genetik danışma verilebilmesi adına erken tanı çok önemlidir. Bu nedenle hastalıktan erken dönemde şüphelenmek ve etraflı anamnez alarak hastanın öyküsünü, öz ve soy geçmişini değerlendirmek PİY tanısında en önemli aşamadır. Elde edilen bu bilgileri hastaların fizik muayene bulgularıyla birlikte ele alarak tanıyı netleştirecek laboratuvar tetkiklerini planlamak hekimi doğru PİY tanısına ulaştırır. Bu yüzden günlük pratikte immün yetmezlikten şüphelenmemizi gerektiren 10 uyarıcı işaret 1993 yılında ile Jeffrey Modell Vakfı tarafından tanımlanmıştır (25). Bunlar:

1. Yılda 4 veya daha fazla otit
2. Yılda 2 veya daha fazla sinüzit
3. 2 ay veya daha fazla süren antibiyotik ilaç kullanımı
4. Yılda 2 veya daha fazla pnömoni
5. Büyüme ve gelişme geriliği
6. Tekrarlayan doku ve organ apseleri
7. Uzun süre devam eden oral moniliazis ve ciltte mantar enfeksiyonu
8. Enfeksiyonu iyileştirmek için intravenöz antibiyotik kullanımı
9. 2 veya daha fazla derin doku yerleşimli enfeksiyon
10. Ailede primer immün yetmezlik öyküsü

Bu 10 uyarıcı işaretten en az ikisi varsa PİY açısından hasta mutlaka değerlendirilmelidir. Ayrıca, enfeksiyonların erken başlangıçlı veya ağır seyirli olması, tedaviye iyi yanıt vermemesi ve komplikasyonlarla seyretmesi, fırsatçı mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların görülmesi de PİY tanısı için önemlidir. Enfeksiyona neden olan mikroorganizmanın tipi, PİY alt grubu hakkında ipucu sağlayabilir. Örneğin, tekrarlayan viral, fungal, mikobakteriyel ya da protozoal enfeksiyonlar, T hücre defektlerini desteklerken; B hücre defektlerinde kapsüllü bakteriler ilişkili enfeksiyonlara, fagositer sistem defektlerinde ise katalaz pozitif mikroorganizmalar kaynaklı enfeksiyonlara sık rastlanır. Ayrıca son yıllarda, etkene spesifik immün yetmezlikler olarak adlandırılan, genellikle bir mikroorganizma ile tekrarlayan enfeksiyonların görüldüğü (örneğin; EBV'ye yakınlıkla seyreden X'e bağlı lenfoproliferatif hastalık, kandida enfeksiyonuna yakınlıkla giden kronik mukokütanoz kandidiazis) hastalık alt grupları da tanımlanmıştır. Enfeksiyonun başlangıç zamanı da tanıda önemli ipuçları sağlar. Örneğin, AKİY'li olgularda enfeksiyonlar yaşamın erken döneminde ortaya çıkarken; agamaglobulinemi, tipik olarak anneden geçen pasif antikörlerin kaybolmaya başladığı, altıncı aydan sonra semptom vermeye başlar (26).

Ancak unutulmamalıdır ki tekrarlayan enfeksiyonlar her zaman klinik seyrin bir parçası olmayabilir. Hastalık, enfeksiyona yakınlık olmaksızın alerji, otoimmünite, otoinflamasyon veya malignite ile seyreden bir klinikle prezente olabilir. Bu gibi durumlarda sadece 10 uyarıcı işaretin kullanılması tanıyı geciktirebilir. Bu nedenle PİY tanısında bazı ek uyarıcı işaretlere gereksinim duyulduğuna ait veriler artmaktadır. Dur ve ark. (27) tarafından sık hastalanma şikayetiyle başvuran hastaların 10 uyarıcı işaret sorgulanarak değerlendirildiği çalışmada büyüme ve gelişme geriliği ve aile öyküsü varlığı PİY hastalarında anlamlı derecede yüksek bulunmuş; ancak PİY tanısı konulan hastaların %46,3'ünde 10 uyarıcı işaretin bulunmadığı saptanmıştır. Yine bu çalışmada, ishal, otoimmünite, organomegali gibi ek uyarıcı işaretlerin de PİY tanısı konulan hasta grubunda yüksek saptandığı vurgulanmıştır. Bu nedenle, canlı aşı sonrası komplikasyonlar (BCGitis), kronik ishal, nedeni bilinmeyen ve uzun süren egzama, otoimmün hastalıklar, sitopeni, atipik mikobakterilere ikincil oluşan hastalıklar, P. jirovecii pnömonisi, açıklanamayan bronşektazi, hemofagositik sendrom, lenfoproliferatif hastalıklar, bazı maligniteler, granülomatöz hastalıklar, ebeveyn akrabalığı ve kardeş ölüm öyküsü gibi immün yetmezlikten şüphe etmemizi sağlayacak 10 uyarıcı işaret dışındaki bulgular da mutlaka öyküde sorgulanmalı ve gözden kaçırılmamalıdır (28).

Otoimmün ve otoinflamatuvar belirtiler, PİY hastalarının önemli bir kısmında immün sistemin anormal bir şekilde düzenlenmesine bağlı olarak ortaya çıkar. Örneğin; X'e bağlı immüdisregülasyon enteropati poliendokrinopati (IPEX) sendromu, düzenleyici T hücrelerin

eksikliğinden kaynaklanır ve şiddetli otoimmün enteropati, tiroid hastalığı ve diyabet gibi endokrinopatiler, otoimmün sitopeniler ve egzama ile seyreder. Kaplan ve ark.'nın (29) 1036 PİY hastasında yaptığı çalışmada hastaların %10,1'inde otoimmün ve otoinflamatuar bulgular gözlenmiş olup, en sık otoimmün hematolojik (%51,8) ve endokrin hastalıklar (%26,5) görülmüştür. Fischer ve ark. (30) tarafından yapılan bir çalışmada ise bu oranın %26,2' ye kadar arttığı saptanmıştır.

Yaygın alerjik reaksiyonlar, altta yatan bir PİY'in belirtisi olabilen aşırı immün yanıtlardır. Örneğin; egzama, WAS, özellikle ağır olduğunda DOCK8 eksikliği ve hiper IgE sendromları açısından uyarıcı bulgulardır. Selektif IgA eksikliği, astım, alerjik rinit, atopik dermatit, konjunktivit, ürtiker ve egzama gibi alerjik hastalıkların sıklıkla ilk başvuru yakınması olduğu bir PİY hastalık alt grubu olup; alerjinin gerçek prevalansı ve alerjinin bir komorbidite mi yoksa hastalığın bir sonucu mu olduğu konusunda tartışmalar hala devam etmektedir. Çalışmalarda %13–84 arasında değişen bir prevalans görülmüştür (31). Aytekin ve ark.'nın (32) selektif IgA eksikliği tanısıyla izlediği 118 Türk çocuğunda yaptığı çalışmada en sık klinik bulguların enfeksiyon (%83,9), alerji (%43,2) ve otoimmünite (%17) olduğu saptanmıştır.

Özellikle erken yaşta gelişen, ailevi ve ağır seyirli, tedaviye dirençli malignitelerde, EBV enfeksiyonu birlikteliğinde, eşlik eden lenfoproliferasyon ve otoimmünite varlığında hastalar PİY açısından değerlendirilmelidir. PİY'lerde görülen malignitelerin 2/3'ünü lenfomalar oluşturmakta, sıklıkla da nonHodgkin lenfomalar görülmektedir. En sık malignite ilişkili PİY'ler arasında ataksi-telenjiektazi, AKİY, yaygın değişken immün yetmezlik (YDİY) ve WAS gelmektedir (33). Tanyıldız ve ark.'nın (34) kliniğimizde daha önce yaptığı bir çalışmada, lenfoma gelişen PİY'li 17 hasta değerlendirilmiş olup hastalardan 7'sine ataksi-telenjiektazi, 2'sine YDİY, 2'sine selektif IgA eksikliği, 1'ine X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom (XLP), 1'ine WAS, 1'ine EBV ilişkili lenfoproliferatif hastalık, 1'ine interlökin-2 ile indüklenebilir T-hücre kinaz (ITK) eksikliği ve 1'ine otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) tanısı konulmuştur.

Hastaların fizik muayenesinde birçok bulgu immün yetmezlikten şüphelenmemizi sağlayabilir ve hatta immün yetmezliğin tipi hakkında ipuçları verebilir. Örneğin büyüme gelişme geriliği özellikle T hücre yetmezliklerinde, lenfoid doku veya tonsil yokluğu B hücre yetmezliklerinde uyarıcı muayene bulguları olabilir. Hastalığa özel bazı fizik muayene bulguları Tablo 4.1'de gösterilmiştir (35-38).

**Tablo 4.1.** Primer immün yetmezliği olan hastalarda fizik muayene bulguları (39)

<b>Klinik özellik</b>	<b>Hastalık</b>
Egzama	WAS, IPEX, IgA eksikliği, HİGM, HİES
Seyrek veya hipopigmente saç	Kıkırdak-saç hipoplazisi, Griscelli sendromu, Chediak-Higashi sendromu
Oküler ve dermal telenjektazi	Ataksi-telenjektazi
Okülokütanöz albinizm	Chediak-Higashi sendromu
Şiddetli dermatit	Omenn sendromu, HİES
Eritrodermi	Omenn sendromu, AKİY, GvHH, Netherton sendromu
Tekrarlayan cilt ve organ apseleri	KGH, lökosit adezyon defekti
Kütanöz granülomlar	Ataksi-telenjektazi, AKİY, YDİY
Oral ülserler	KGH, AKİY, konjenital nötropeni
Periodontit, gingivit, stomatit	Kronik nötropeniler
Oral veya tırnak kandidiyazisi	KİY, AKİY, mukokütanöz kandidiyazisi, HİES
Vitiligo, alopesi	B-hücre immün defektleri, mukokütanöz kandidiyazisi
Çomak parmak	Antikor eksiklikleri, KGH, KİY gibi tüm ciddi PİY'lerde gelişebilen kronik akciğer hastalığı veya bronşiektazi
Artrit	Antikor eksiklikleri, WAS, HİGM
Kısa ekstremiteli cücelik	T veya B hücre immün defektleriyle beraber olan kısa ekstremiteli cücelik
Kemik displazisi	ADA eksikliği, kıkırdak-saç hipoplazisi

ADA, adenozin deaminaz; AKİY, ağır kombine immün yetmezlik; GvHH, graft versus host hastalığı; HİES, hiper-IgE sendromu; HİGM, hiper-IgM sendromu; IPEX, X'e bağlı immüdisregülasyon enteropati poliendokrinopati; KGH, kronik granümatöz hastalık; WAS, Wiskott-Aldrich sendromu; YDİY, yaygın değişken immün yetmezlik

#### **4.2.5. Laboratuvar incelemeleri**

PİY tanısında kullanılmakta olan laboratuvar incelemelerini 3 grup altında toplamaktayız:

- Tarama testleri
- İmmünolojik incelemeler
- Genetik incelemeler

#### 4.2.5.1.Tarama testleri

Öykü ve fizik muayene bulgularıyla immün yetmezlikten şüphelenildiğinde yapılması gereken ilk inceleme tam kan sayımıdır. Periferik kanda bulunan üç hücre serisine ait tüm parametrelerin dikkatle değerlendirilmesi, hücre absolü sayılarının normal dışı değerlerinin varlığının saptanması hekimi hemen daima çok değerli sonuçlara ulaştırır. Lenfosit değeri yaşa göre normal (1 yaş altı  $\geq 3000/\text{mm}^3$ , 1 yaş üstü  $\geq 1500/\text{mm}^3$ ) olmalıdır. Onun dışında örneğin WAS'da görülen mikrotrombositopeni, lökosit adezyon defektinde (LAD) görülen enfeksiyon olmadığı halde yüksek nötrofil sayıları, hiper IgE sendromlarında eozinofili bizi tanıya götüren önemli ipuçlarıdır (38). T hücre defekti veya KİY'lerde yaşamın ilk aylarında akciğer grafisinde timus gölgesinin görülmemesi, B hücre yetmezliklerinde immünglobulin düzeylerindeki yaşa göre düşüklük saptanması ve izohemaglutinin yanıtının (1 yaş üzerinde ve AB kan grubu dışında kan grubuna sahip bireylerde bakılmalı, antikor titresinin 1/8 ve üzerinde olması normal kabul edilmelidir) ve spesifik antikor yanıtlarının (difteri, tetanoz, Hib, pnömokok aşısı yanıtı) olmaması, kompleman defektlerinde görülen CH50 düşüklüğü PİY tanısı için hemen daima uyarıcıdır Ancak bu testler genellikle tanı koymak için tek başına yeterli değildir. İleri immün testlere ihtiyaç vardır. İmmün sisteminin anlaşılmasındaki son gelişmeler, bu bozuklukların teşhisine yardımcı olmak için yeni immünolojik tetkiklerin geliştirilmesine yol açmıştır (Tablo 4.2) (40).

#### 4.2.5.2. İleri immünolojik incelemeler

Akım sitometrisi, son birkaç on yılda kaydettiği ilerlemelerle beraber immün sistemin hem sayısal hem de fonksiyonel olarak değerlendirilmesinde önemli bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Klasik olarak lenfosit alt gruplarını değerlendirmek için kullanılan akım sitometrik testler, immün hücre fonksiyonunu (örneğin, nötrofil oksidatif patlaması), hücre içi sitokin üretimini (örneğin, Th17 üretimi), hücresel sinyal yollarını (örneğin, STAT fosforilasyon yolağı) ve spesifik molekül ekspresyonunu (örneğin, BTK, MHC sınıf I ve II, LRBA, DOCK8, FOXP3) değerlendirmek için de kullanılmaktadır. PİY'lerin bu tür immünofenotipik ve fonksiyonel değerlendirmesi, sadece teşhis için değil, aynı zamanda PİY'lerin sınıflandırılması, hastaların izlenmesi ve monitorizasyonu, tedavi yanıtının değerlendirilmesi (kök hücre nakli sonrası immün yapılanma ve hedeflenmiş tedavilere yanıt gibi) ve yeni tanımlanmış genetik kusurların immünolojik öneminin belirlenmesi için de yararlıdır (16, 40, 41).

### 4.2.5.3. Genetik incelemeler

PİY'lerin kesin tanısı için altta yatan genetik kusurun tanımlanması gerekir. Genetik testler gün geçtikçe genişlemekte; teknolojik gelişmeler, yeni bozuklukların tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Tek gen dizi analizi, yeni nesil dizi analizi, tüm ekzom dizi analizi veya tüm genom dizi analizi gibi genetik yöntemlerin kullanımını son yıllarda katlanarak artmıştır. Genetik kusurları belirlemek için moleküler testlerin hızla ilerleme kaydetmesine rağmen, bu kusurların fenotipik sonuçları, PİY'lerde klinik tablonun çeşitliliği göz önüne alındığında, hastanın kliniği ve immünolojik testlerle birlikte değerlendirilmelidir. Ayrıca genetik testlerin uzun zaman gerektirdiği ve maliyetinin yüksek olduğu dikkate alındığında, hızlı ve hassas bir yöntem olan akım sitometrisinin PİY tanısındaki önemi daha net anlaşılmaktadır (13, 16, 40).

**Tablo 4.2.** PİY tanısında laboratuvar incelemeleri (40)

Tarama testleri	İmmünolojik incelemeler
<b>B hücre eksikliği</b>	
IgG, IgM, IgA ve IgE düzeyleri	T/B hücre (CD19 veya CD20) B lenfosit alt grupları
İzohemaglutininin (Anti-A, Anti-B) titreleri	
Geçirilmiş mikroorganizma ve aşı antijenlerine antikor yanıtı (tetanoz, polio, pnömokok, difteri, <i>H. influenzae</i> )	Rapeller veya yeni aşilar ile antikor yanıtları
<b>T hücre eksikliği</b>	
Tam kan sayımı, total lenfosit, nötrofil, eozinofil, monosit sayıları, trombosit sayısı ve ortalama trombosit volümü	T/B/NK hücre ve alt grupları (CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD16/56, CD19/20), T ve B lenfosit alt grupları
Timus boyutu için akciğer grafisi (infantlarda)	Mitojen ve antijenlere aktivasyon yanıtı ve lenfoproliferatif yanıtlar ( <i>in-vitro</i> fonksiyon)
Timopoezin değerlendirilmesi (RTE) (CD4+CD45RA+CD31+) BCG gibi deri testlerine 48-72. saatte endürasyon yanıtı ( <i>in-vivo</i> T lenfosit fonks.)	22q11.2 delesyon analizi
<b>Fagositer defekt</b>	
Tam kan sayımı, lökosit sayısı, total nötrofil sayısı, morfoloji	Adezyon molekül ekspresyonları (örn; CD11b/CD18, CD15)
NBT	DHR123 testi ile fagositoz ve oksidatif patlama
<b>Kompleman eksikliği</b>	
CH <sub>50</sub> ve AH <sub>50</sub> aktivitesi	Kompleman proteinleri

DHR123, dihidrorodamin-123; NBT, nitroblue tetrazolium; RTE, recent tymic emigrants (yeni timik göçmenler)

### 4.3. Akım Sitometrisi

#### 4.3.1. Tarihçe

1968 yılında, floresan boya kullanarak ölçüm yapan ilk akım sitometrisini (ICPII) Alman bilim insanı Wolfgang Göhde geliştirmiştir. ABD’de ise Lou Kametsky ve Myron Melamed kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırmak üzere absorpsiyon ve ışık saçılımı değişikliklerini baz alarak çalışan nükleik asit içeriği ve hücre boyutunu ölçen “*rapid cell spectrophotometer* (RCS)” adını verdikleri bir sistem geliştirmiştir. Şimdi kullandığımız BD BioSciences sistemlerinin öncüllerini geliştiren Leo Herzenberg ise RCS sistemini temel olarak floresan ve rodaminle işaretlenmiş hücrelerin argon lazerle gösterdikleri floresansa göre ayrıştırılabileceğini göstermiş ve bu sisteme “*fluorescence activated cell sorter* (FACS)” adını vermiştir. Bu terim günümüzde akım sitometrisi sistemleri için genel bir isim olarak kullanılmaktadır (42).

#### 4.3.2. Genel bilgiler

Akım sitometrisi, süspansiyon halinde bulunan hücreleri, bir akış kanalı boyunca lazer önünden geçerken yansıyan foton enerjisinin elektrik enerjisine çevrilmesi ile; tek tek, büyüklük (0.2-150 µm), granülarite ve floresans özelliklerine göre kantitatif olarak ölçen ve araştırma olanağı sağlayan bir cihazdır (15). Bu cihaz üç ana sistemden oluşmaktadır (Şekil 4.4):

- Hidrolik sistem: Akış sistemidir, partiküllerin lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem olarak görev yapar.
- Optik sistem: Lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan saçılımın çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak fotodedektöre aktarılmasında rol alır.
- Elektronik sistem: Elde edilen optik sinyalin “*photo multiplier tubes* (PMT)” ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevrilmesini ve analiz yapılması için bilgisayara aktarılmasını sağlar.

### 4.3.3. Primer immün yetmezliklerde akım sitometrisinin kullanım alanları

Akım sitometrisi, immün sistemin güvenilir bir şekilde incelenmesine olanak tanıyan ve birçok PİY hastalığının hızlı tanısına katkı sağlayan bir yöntemdir (13, 44). PİY'li hastalarda kesin tanı genetik analize dayanmasına rağmen, şüpheli hastaların immünolojik olarak değerlendirilmesi de önemlidir ve çoğu zaman daha seçici ve verimli bir genetik inceleme konusunda yol göstericidir. Rutin immünofenotiplendirme ile immün sistem hücrelerinin sayı ve fonksiyonlarındaki anormallikler belirlenir. Ayrıca yeni genetik varyantların fonksiyonel olarak doğrulanmasına ve immün sisteminin karmaşık bozukluklarının haritalanmasına olanak tanır (41, 44). Bu nedenle, genetik bir kusur, klinik fenotip veya aile öyküsünden açıkça öngörülse dahi, hastanın immün durumunu belirlemek için akım sitometrisi ile immünolojik değerlendirme yapılmalıdır (45). PİY'de akım sitometrisi temel olarak hastalara tanı koymak, hastalığı sınıflamak, izlemek ve prenatal tanı oluşturmak amaçlı kullanılır. Fenotipik sitometri, spesifik antijenlerin tayini ve fonksiyonel sitometri başlıkları altında toplanabilir.

Periferik kan lökositlerinde genetik hatalara bağlı olarak ortaya çıkan ve akım sitometrisi ile saptanan anormallikler başlıca; spesifik hücre grup veya altgruplarda rölatif ya da mutlak azalma, spesifik moleküllerin kaybı ya da anormal ifadesi, fonksiyon kaybı ya da bozukluğu şeklindedir (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Bazı PİY'lerin değerlendirilmesinde akım sitometrisi uygulamaları (13)

<b>PİY'ler ve Akım Sitometrisi Uygulamaları</b>	
<b>Spesifik hücre grup ve alt gruplarının değerlendirilmesi</b>	
X'e bağlı agamaglobulinemi	B hücrelerinin yokluğu
AKİY	T hücrelerinin yokluğu, B ve NK hücreleri üzerinde değişken etki (defekte bağlı olarak)
XLP1	Belirgin olarak azalmış iNKT hücreleri
ALPS	Artmış $\alpha/\beta$ TCR çift negatif (CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> ) T hücreleri
HİES ve KMKK	Azalmış Th17 hücreleri
<b>Spesifik hücre yüzeyi proteinlerinin değerlendirilmesi</b>	
YDİY	CD19 (B hücreleri), BAFF (B hücreleri)
X'e bağlı HİGM	CD40L (aktive T hücreleri)
Otozomal resesif HİGM	CD40 (B hücreleri)
MSMD	IFN- $\gamma$ R1 (monositler), IL-12R $\beta$ 1 (aktive T hücreleri)
LAD-I	CD18 (granülositler)

X'e bağlı AKİY (IL2RG defekti) OR AKİY (IL7R defekti)	CD132 (lenfositler) CD127 (lenfositler)
gp91-phox ve p22-phox eksikliği olan KGH	Sitokrom b558 (granüositler ve B hücreleri)
<b>Spesifik hücre içi proteinlerin değerlendirilmesi</b>	
X'e bağlı agamaglobulinemi	BTK (monositler ve trombositler)
WAS ve X'e bağlı trombositopeni	WASp (lenfositler ve miyeloid hücreler)
XLP1	SAP (CD8 <sup>+</sup> T hücreleri ve NK hücreler)
XLP2	XIAP (lenfositler)
FHL2	Perforin (CD8 <sup>+</sup> T hücreler ve NK hücreler)
FHL3	Munc13-4 (trombositler)
ZAP70 eksikliği	ZAP70 (T hücreleri)
p47-phox ve p67-phox eksikliği olan KGH	p47-phox ve p67-phox protein (granüositler)
DOCK8 eksikliği	DOCK8 (lenfositler)
CTLA-4 eksikliği	CTLA-4 (CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> T hücreleri)
LRBA eksikliği	LRBA (lenfositler)
<b>Spesifik nükleer proteinlerin değerlendirilmesi</b>	
IPEX	FOXP3 (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T hücreleri)
<b>Biyolojik etkilerin değerlendirilmesi</b>	
YDİY	İzotip dönüşümü yapan hafıza B hücrelerinde azalma
Omenn sendromu	Sınırlı T hücre repertuarı, spontan aktive T hücreler (HLA-DR+)
Matrenal engrafmanlı AKİY	T hücre diskordansı, bellek T hücre artışı (CD45RO+)
X'e bağlı HİGM	Azalmış hafıza B ve hafıza CD4 <sup>+</sup> T hücreleri
<b>Fonksiyonel değerlendirme</b>	
MSMD	IFN-γ'ya yanıt olarak STAT1 fosforilasyonu (monositler)
KMKK (STAT1'de fonk. kazanımı)	IFN-γ'ya yanıt olarak STAT1 fosforilasyonu (monositler)
FHL3/4/5, Chediak Higashi sendromu ve Griscelli sendromu	CD107a ekspresyonu (NK hücreler ve sitotoksik T lenfositler)
XLP2	Muramil dipeptitlere yanıt olarak TNF-α (monositler)
KGH	DHR123 testi (granüositler, monositler ve B hücreleri)
X'e bağlı AKİY ve JAK3 eksikliği olan AKİY	Sitokin stimülasyonuna yanıt olarak STAT fosforilasyonu (lenfositler)
X'e bağlı HİGM	CD40L ve CD40-Ig bağlanma olmaması
IRAK4 ve MyD88 eksikliği	Lipopolisakkaritlere yanıt olarak TNF-α (monositler)
IL-10R eksikliği	IL-10'a yanıt olarak STAT3 fosforilasyonu (lenfositler)

İnfanıl başlangıçlı multisistemik otoimmün hastalık 1 (STAT 3'te fonksiyon kazandırıcı heterozigot mutasyon)	Artmış STAT3 fosforilasyonu
--	-----------------------------

AKİY, ağır kombine immün yetmezlik; ALPS, otoimmün lenfoproliferatif sendrom; BAFF-R, B hücresi aktive edici faktör reseptörü; BTK, Bruton tirozin kinaz; CTLA-4, sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4; DHR123, dihidrorodamin-123; DOCK8, dedicator of cytokinesis-8; FHL, familyal hemofagositik lenfohistiyositoz; HİES, hiper-IgE sendromu; HİGM, hiper-IgM sendromu; ICOS, indüklenebilir ko-stimülatör; IPEX, X'e bağılı immüdisregülasyon enteropati poliendokrinopati; IRAK4, interlökin-1 reseptörle ilişkili kinaz 4; İNKT, invariyant natural killer T; JAK3, Janus kinaz 3; KGH, kronik granümatöz hastalık; KMKK, kronik mukokutanöz kandidiyazis; LAD, lökosit adezyon defekti; MSMD, mikobakteriyel enfeksiyonlara Mendelyen yatkınlık; NK, natural killer (doğal öldürücü); OR, otozomal resesif; SAP, sinyal aktivasyon molekül ilişkili protein; STAT, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü; TCR, T hücre reseptörü; WASp, Wiskott-Aldrich sendrom proteini; XIAP, X'e bağılı apoptozis inhibitörü; XLP, X'e bağılı lenfoproliferatif sendrom; YDİY, yaygın değışken immün yetmezlik; ZAP70, ζ-zinciri ilişkili protein kinaz-70

#### 4.3.3.1. Lenfosit alt grupları (Fenotipik sitometri)

Hücre yüzeyindeki antijenik yapılar CD (*cluster of differentiation*) molekülleri olarak isimlendirilmekte, bu nomenklatür farklı özelliklere sahip hücrelerin periferik kan ve vücut sıvılarında tanımlanmasında kullanılmaktadır. Akım sitometrisi ile bu moleküllere özgün olarak geliştirilmiş monoklonal antikolar sayesinde bu antijeni taşıyan hücreler oransal ve sayısal olarak belirlenebilir. Esasen periferik kan lenfosit subgruplarının sayısal ve oransal olarak değışlendirilmesi amaçlanır. Bu parametreler yaşla birlikte fizyolojik anlamda değışiklik gösterdiğinden; sonuçlar yaşa uygun referans değışleri ile kıyaslanmalıdır. Fenotipik sitometri ile incelenen hücreler ve tanı alabilen PİY'ler Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.5.** Fenotipik sitometri ve olası tanıları

Fenotipik sitometri (Lenfosit alt grupları)
T / B / NK hücreleri (AKİY / KİY tanı ve fenotip)
Timopoezis (RTE)
Tregs (IPEX)
Th17 T hücreleri (HİES ve KMKK)
DNT hücreleri (ALPS)
NKT hücreleri (XLP)
B lenfosit alt grup analizi
T lenfosit alt grup analizi

AKİY, ağır kombine immün yetmezlik; ALPS, otoimmün lenfoproliferatif sendrom; HİES, hiper-IgE sendromu; IPEX, X'e bağılı immüdisregülasyon enteropati poliendokrinopati; KİY, kombine immün yetmezlik; KMKK, kronik mukokutanöz kandidiyazis; RTE, recent tymic emigrants; XLP, X'e bağılı lenfoproliferatif sendrom

YDİY olan hastaların sınıflandırma ve prognostik değerlendirmesinde ise B hücre alt kümesi fenotiplemesi büyük önem taşır. B hücresi alt küme analizi, özellikle bellek B hücrelerinin ve izotip dönüşümü yapmış bellek B hücrelerinin değerlendirilmesi, YDİY tanısında önemli olup, izotip dönüşümü yapmış hafıza B hücre (IgM-, IgD-, CD27+) sayısının düşük olması hastalığın yeni tanı kriterlerine dahil edilmiştir (13, 16, 45, 47).

İmmüfenotipleme kandaki hemen hemen her hücre alt kümesinde akım sitometrisi ile gerçekleştirilebilir. Örneğin, IPEX periferik toleranstan sorumlu timus kaynaklı düzenleyici T hücresi (Treg) gelişimi ve fonksiyonu için gerekli olan *FOXP3* genindeki mutasyonların neden olduğu, X'e bağlı bir hastalıktır. Şiddetli enteropati, endokrinopatiler (diyabet, tirodit gibi) ve egzama ile karakterize bir PİY'dir. IPEX hastalarının çoğunda CD4+CD25+FOXP3+ veya CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> Treg hücreleri yoktur veya sayıları azalmıştır (13, 44, 48, 49).

İmmüfenotipik incelemeyle tanı alan bir başka hastalık alt grubu olan ALPS, lenfosit homeostazındaki defekt sonucu ortaya çıkan kronik ve malign olmayan lenfoproliferasyon, bozulmuş lenfosit apoptozisi, lenfoma riskinde artış ve otoimmün sitopenilerle seyreden bir PİY'dir. Normal veya artmış lenfosit sayısı ile birlikte CD3+TCRαβ+CD4-CD8- çift negatif T (DNT) hücrelerinin sayısında artışla karakterizedir. DNT'ler, immüfenotipleme ile tespit edilebilir. (16, 50, 51).

#### 4.3.3.2. Spesifik antijenlerin (proteinlerin/moleküllerin) tayini

İleri immünolojik bir test olarak spesifik protein ekspresyonunu değerlendirmenin mümkün olduğu birçok PİY vardır. Birçok hücre proteini, florokrom ile etiketlenmiş ilgili bir antikör kullanılarak akım sitometrisi ile incelenebilir. Protein mevcut olduğunda, floresan emisyonu ile pozitif bir sinyal elde edilir ve protein olmadığında floresan sinyali görülmez. Yüzey proteinlerinin gösterilmesi, hücre geçirgenliği sürecini gerektiren intrasitoplazmik proteinlerden daha kolaydır. Doğru yorumlama için, özellikle intrasitoplazmik proteinleri gösterirken izotopik bir kontrol kullanılması önerilir (52). Spesifik protein ekspresyon analizi yapılarak akım sitometrisi ile kesin tanı konulabilen hastalık örnekleri;

- AKİY'de CD132 ve CD127 ekspresyonu
- XLA'da Bruton tirozin kinaz (BTK) ekspresyonu (Şekil 4.9) (13, 16)
- DOCK8 eksikliğinde DOCK8 ekspresyonu (13, 16)
- Major histocompatibility complex (MHC) sınıf II eksikliğinde HLA-DR ekspresyonu (16, 41)

IFN- $\gamma$ /IL-12 sinyal yollarını etkileyen genlerdeki kusurlar, özellikle BCG aşısı suşu ve diğer mikobakteriyel türlere karşı artmış duyarlılığa neden olur. IFN $\gamma$ R1, IFN $\gamma$ R2 ve IL12R $\beta$ 1 kusurlarının hızlı analizi, periferik kan monositleri üzerinde IFN $\gamma$ R'nin ve PHA ile indüklenen T hücreleri patlamaları üzerinde IL-12R $\beta$ 1'in akım sitometrisiyle tespiti ile gerçekleştirilir. IFN $\gamma$ R'nin fenotipik analizi, hücre yüzeyinde çok az proteinin saptandığı veya hiç saptanamadığı durumlarda OR tam kusurlarının teşhisi için yararlıdır. Bununla birlikte, OD kısmî IFN $\gamma$ R1 eksikliğinde, IFN $\gamma$ R1, reseptörün kusurlu geri dönüşümü nedeniyle aşırı eksprese edilebilir ve hücre yüzeyinde saptanabilir. Bu nedenle, hücreleri IFN- $\gamma$  ile uyararak ve ardından fosforile STAT1 için hücre içi boyama yaparak IFN $\gamma$ R'nin işlevselliğini değerlendirmek önemlidir. IL-12R $\beta$ 1'in fonksiyonelliği ise, STAT-4'ün IL-12 ile indüklenen fosforilasyonu ile değerlendirilir (13, 16). Viral ve hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara karşı artan yatkınlık ile karakterize STAT1 fonksiyon kaybettirici mutasyonları ise, IFN- $\gamma$  ile stimülasyonun ardından STAT1'in fosforilasyonunun olmadığını veya azaldığının gösterilmesiyle değerlendirilir (16).

STAT1 fonksiyon kazanımı ve IL-17RA eksikliği mukokutanöz kandidiyazis enfeksiyonlarına karşı artan yatkınlıkla sonuçlanır. Alınan periferik kan mononükleer hücrelerinde, STAT1 fonksiyon kazanımı, IFN- $\gamma$  ve IFN- $\alpha$  ile uyarılmasının ardından STAT1'in düşük fosforilasyonu ve IL-17RA eksikliği, IL-17RA ekspresyonunun azalmasının akım sitometrisi aracılığıyla gösterilmesiyle değerlendirilir (13, 16).

Otozomal dominant hiper-IgE sendromunda (OD-HİES) STAT3 fosforilasyonunun değerlendirilmesi tanıda önemli ipuçları sağlar. Ancak sadece STAT3 proteini ekspresyonunda değil, aynı zamanda JAK-STAT3 sinyal yolu aracılığıyla Th17 gelişiminde de bozulma vardır. HİES hastalarında genellikle, hücre içi sitokin boyaması ile tespit edilebilen IL-17 üreten T hücrelerinin (Th17 hücreleri) sayısı azalmıştır. Yani immünofenotiplemeyle gösterilen azalmış Th17 hücreleri de ilgili klinik özellikler mevcut olduğunda tanıya yardımcı olur (13, 16, 50, 58).

Sonuç olarak; PİY'lerin spektrumu genişledikçe, sadece klinik ve temel laboratuvar yöntemlere dayanarak tanı koymak olanaksız hale gelmiştir. Genetik analiz ile PİY kesin tanısı konulabilir, ancak bu pahalı ve zaman alıcıdır. Akım sitometrisi ise son yıllarda meydana gelen gelişmelerle birlikte, PİY tanı ve öntanısı için çok önemli ve immün sistemin değerlendirilmesi için vazgeçilmez bir araç olmaya devam etmektedir (13, 41).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1. Çalışmada yer alan hastalar

Bu çalışmada, Ocak 2010 ile Ocak 2020 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'nda PİY tanısı olarak izlenmiş ve/veya izlenmekte olan; dosya, bölüm ve/veya hastane kayıt sistemleri taranarak ulaşılan 1407 PİY tanılı hastanın verileri retrospektif olarak değerlendirildi.

PİY tanısı, ESID kriterlerine göre konulan hastalar (51), IUIS'ın 2019 yılında güncellediği kılavuza göre PİY alt gruplarına dâhil edildi (2, 3). Çalışmanın gerçekleştirildiği zaman diliminde kayıtlarına ulaşılan toplam 1567 hastadan parsiyel IgA eksikliği tanısı ile izlenen 160 hasta, güncel sınıflandırmada bu tanının yer almaması nedeniyle çalışma dışında bırakıldı.

### 5.2. Çalışmanın yöntemi

Hastaların yaş, cinsiyet, yaşadığı şehir gibi demografik özellikleri; ebeveyn akrabalığı, ailede benzer hastalık ve kardeş ölümü öyküsü gibi soy geçmiş verileri; semptomlarının başladığı yaş, başvuru yakınmaları, fizik muayene bulguları dikkate alındı. Bunların yanı sıra, hasta ilk başvuru kayıtlarından elde edilen temel ve ileri immünolojik incelemelerden (tam kan sayımı, immünglobulin düzeyleri, kan grubu, izohemaglutinin titreleri geçirilmiş hastalıklara ve aşılara antikor yanıtları; akım sitometrisi ile ölçülen periferik kan lenfosit alt grupları, B ve T lenfosit alt grupları, *in-vitro* lenfosit aktivasyon testleri ve fagositer hücre fonksiyonları ile spesifik molekül ekspresyon analizleri) elde edilmiş olan laboratuvar sonuçları ve hastaların kliniğimize başvurusundan akım sitometrisi aracılığı ile tanı koyulmasına kadar geçen süre veri toplama formlarına kaydedildi. Ayrıca başvuru zamanından genetik tanıya kadar geçen süreler de kayıt altına alındı.

Akım sitometrisi incelemeleri tüm hastalarda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'nda NAVIOS (Beckman Coulter, Marsille, France) ya da FACS Canto II (Beckton Dickinson, Miami, ABD) cihazlarında en az 2, en çok 10 renkli; sıklıkla 8 renkli yüzey ve hücre içi boyama yapılarak gerçekleştirildi. Tüm akım sitometrisi analizlerinde Kaluza 1,3 Software (BeckmanCoulter) veya FACS Diva Software (Beckton

Dickinson) analiz programları kullanıldı. Periferik kan lenfosit alt gruplarının yaşa göre normal değerleri için İkinciöğulları ve ark.'nın (60) çalışması temel alındı.

### 5.3. Verilerin değerlendirilmesi ve sunumu

Hastalardan elde edilen tüm veriler iki temel başlık altında incelenerek sunulmaktadır:

1. Tüm hastaların (n=1407) demografik özellikleri, başvuru yakınmaları, fizik muayene bulguları ve PİY alt gruplarına göre dağılımı,
2. Akım sitometrisi incelemeleri yapılan (n=996) ve bu sayede tanı alan hastalarda (n=229) belirlenen özellikler (immünfenotip, fonksiyonel sitometri ve spesifik molekül ekspresyonları) ile akım sitometrisi verilerinin tanı ve tedaviye sağladığı katkı.

Bu çalışmada hastalara uygulanan akım sitometrisi incelemeleri:

- a) Fenotipik sitometri (immün fenotipik incelemeler: periferik kanda T, B, NK hücreler ile detaylı hücre altgrup incelemeleri)
- b) Fonksiyonel sitometri
  - PHA'ya ve anti-CD3'e *in-vitro* T lenfosit aktivasyon yanıtları
  - Fagositer hücre fonksiyonları (DHR123 testi ile fagositoz ve oksidatif patlama)
- c) Hastalığa özgü molekül (protein) ekspresyonları olmak üzere 3 grupta ele alınmıştır.

### 5.4. Etik kurul onayı

Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (başvuru numarası: İ1-62-20).

### 5.5. İstatistik analiz

Verilerin analizi SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 16.0 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler dağılımı normal olan değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için ortanca (minimum – maksimum) ve nominal değişkenler için vaka sayısı ve frekans (%) olarak gösterildi.

## 6. BULGULAR

Ocak 2010 ile Ocak 2020 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'nda PİY tanısı olarak izlenmiş ve/veya izlenmekte olan; dosya, bölüm ve/veya hastane kayıt sistemleri taranarak ulaşılan 1407 PİY tanılı hastanın verileri retrospektif olarak değerlendirildi.

Hastalardan elde edilen veriler iki temel başlık altında incelenerek sunuldu. İlk olarak tüm hastaların (n=1407) PİY alt gruplarına göre dağılımı, demografik özellikleri, başvuru yakınmaları ve fizik muayene bulguları incelendi; ardından akım sitometrisi incelemeleri yapılan (n=996) ve bu sayede tanı alan hastalar (n=229) ayrıntıları ile paylaşıldı.

Akım sitometrisi incelemeleri ise 3 grupta ele alındı:

- Fenotipik sitometri (immün fenotipik incelemeler: periferik kanda T, B, NK hücreler ile detaylı hücre altgrup incelemeleri)
- Hastalığa özgü molekül (protein) ekspresyonları
- Fonksiyonel sitometri (PHA'ya ve anti-CD3'e *in-vitro* T lenfosit aktivasyon yanıtları ve fagositer hücre fonksiyonları (DHR123 testi ile fagositoz ve oksidatif patlama))

### 6.1. Hastaların genel özellikleri ve klinik bulguları

Hastaların 906'sı (%64,4) erkek olup, 501'i (%35,6) kızdı. Hastaların semptomlarının başlama yaşı ortanca 8 (0-378) ay olup; hastanemize başvuru yaşı ortanca 2,6 yaş (3 gün-35 yaş) idi. Hastalar IUIS sınıflamasına göre gruplandırıldığında en sık görülen alt grubun %67,8 oranıyla antikör eksikliğinin ön planda olduğu immün yetmezlikler olduğu, bunu %12,2 oranıyla KİY'lerin izlediği görüldü (Tablo 6.1). Hastaların %32,8'inde ebeveyn akrabalığı, %13'ünde ailede benzer hastalık ve %8,3'ünde ise kardeş ölüm öyküsü mevcuttu (Tablo 6.2).

Hastaların %85,6'sında enfeksiyon, %24,2'sinde alerji, %6,1'inde lenfoproliferasyon veya malignite, %5,5'inde otoimmünite ve %3,4'ünde enflamasyon bulgularına rastlandı. Hastalarda en sık görülen başvuru yakınmaları sırasıyla tekrarlayan alt solunum yolu enfeksiyonu (ASYE) (%54,4), tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonu (%49,2), egzama/dermatit (%18,9), gastroenterit (%15,5) ve büyüme/gelişme geriliği (%12,4) idi (Tablo 6.3).

**Tablo 6.1.** Hastaların IUIS PİY sınıflamasına göre gruplandırılması

PİY Grupları	n (%)
Antikor eksiklikleri	954 (%67,8)
Kombine T ve B hücre yetmezlikleri	171 (%12,2)
Sendromik veya ek özelliklerle birlikte olan kombine immün yetmezlikler	106 (%7,5)
Fagositer sistem sayı ve/veya fonksiyon bozuklukları	89 (%6,3)
İmmüdisregülasyon hastalıkları	60 (%4,3)
Doğal immün sistem defektleri	12 (%0,9)
Kompleman eksiklikleri	7 (%0,5)
Otoinflamatuvar hastalıklar	6 (%0,4)
Kemik iliği yetmezlikleri	2 (%0,1)
Primer immün yetmezlik fenokopyaları	-

Hastaların ilk başvuru anındaki fizik muayene bulguları değerlendirildiğinde en sık rastlanan bulguların sırasıyla büyüme gelişme geriliği (%16,6), egzama/dermatit (%13,1), hepatomegali (%8,9), lenfadenopati (%6,8) ve dismorfik bulgular (%5,3) ve solunum sistemi bulguları (%5,3) olduğu görüldü. Hastaların PİY alt gruplarına göre fizik muayene bulguları Tablo 6.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 6.2.** Hastaların demografik özellikleri

<b>PIY alt grupları</b>	<b>Cinsiyet (Kız/Erkek) n (%)</b>	<b>Ebeveyn akrabalığı n (%)</b>	<b>Ailede benzer hastalık n (%)</b>	<b>Kardeş ölümü n (%)</b>
Antikor eksiklikleri	322/632 (33,8/66,2)	188 (19,7)	48 (5,0)	20 (2,1)
Kombine T ve B hücre yetmezlikleri				
- AKİY	37/47 (44,0/56,0)	58 (69,0)	24 (28,6)	28 (33,3)
- AKİY dışı KİY	33/54 (37,9/62,1)	70 (80,5)	37 (42,5)	27 (31,0)
Sendromik özellik gösteren KİY	30/76 (28,3/71,7)	44 (41,9)	23 (21,9)	10 (9,4)
İmmüdisregülasyon hastalıkları	20/40 (33,3/66,7)	36 (60,0)	19 (31,7)	12 (20,0)
Fagositer sistem bozuklukları	46/43 (51,7/48,3)	41 (46,1)	25 (28,1)	16 (18,0)
Doğal immün sistem bozuklukları	4/8 (33,3/66,7)	7 (58,3)	2 (16,7)	1 (8,3)
Kompleman eksiklikleri	4/3 (57,1/42,9)	3 (42,9)	1 (14,3)	1 (14,3)
Otoinflamatuvar hastalıklar	5/1 (83,3/16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)
Kemik iliği yetmezlikleri	0/2 (0/100)	2 (100)	2 (100)	-
<b>Tüm hastalar</b>	<b>501/906 (35,6/64,4)</b>	<b>451 (32,8)</b>	<b>182 (13,0)</b>	<b>117 (8,3)</b>

AKİY, ağır kombine immün yetmezlik; KİY, kombine immün yetmezlik

**Tablo 6.3.** Hastaların başvuru yakınmaları

<b>PİY alt grupları</b>	<b>Enfeksiyon n (%)</b>	<b>Alerji n (%)</b>	<b>LP / Malignite n (%)</b>	<b>Otoimmünite n (%)</b>	<b>Enflamasyon n (%)</b>	<b>BGG n (%)</b>
Antikor eksiklikleri	831 (87,6)	228 (24,1)	20 (2,1)	32 (3,4)	27 (2,8)	78 (8,2)
Kombine T ve B hücre yetmezlikleri						
- AKİY	79 (95,2)	12 (14,4)	2 (2,4)	2 (2,4)	1 (1,2)	13 (15,6)
- AKİY dışı KİY	74 (89,2)	25 (30,1)	7 (8,4)	8 (9,6)	4 (4,8)	23 (27,7)
Sendromik özellik gösteren KİY	67 (67,0)	34 (34,0)	6 (6,0)	7 (7,0)	2 (2,0)	30 (28,3)
İmmüdisregülasyon hastalıkları	37 (63,8)	13 (22,4)	30 (51,3)	15 (25,9)	7 (12,1)	7 (12,1)
Fagositer sistem bozuklukları	78 (87,7)	15 (16,9)	16 (18,0)	7 (7,9)	3 (3,4)	15 (16,9)
Doğal immün sistem bozuklukları	11 (91,6)	2 (16,6)	2 (16,6)	1 (8,3)	-	2 (16,6)
Kompleman eksiklikleri	6 (85,7)	2 (28,6)	-	1 (14,3)	-	1 (14,3)
Otoenflamatuvar hastalıklar	4 (66,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	3 (50,0)	3 (50,0)	1 (16,7)
Kemik iliği yetmezlikleri	1 (50,0)	-	-	-	-	2 (100)
<b>Tüm hastalar</b>	<b>1188 (85,6)</b>	<b>335 (24,2)</b>	<b>84 (6,1)</b>	<b>76 (5,5)</b>	<b>47 (3,4)</b>	<b>172 (12,4)</b>

AKİY, ağır kombine immün yetmezlik; BGG, büyüme gelişme geriliği; KİY, kombine immün yetmezlik; LP, lenfoproliferasyon

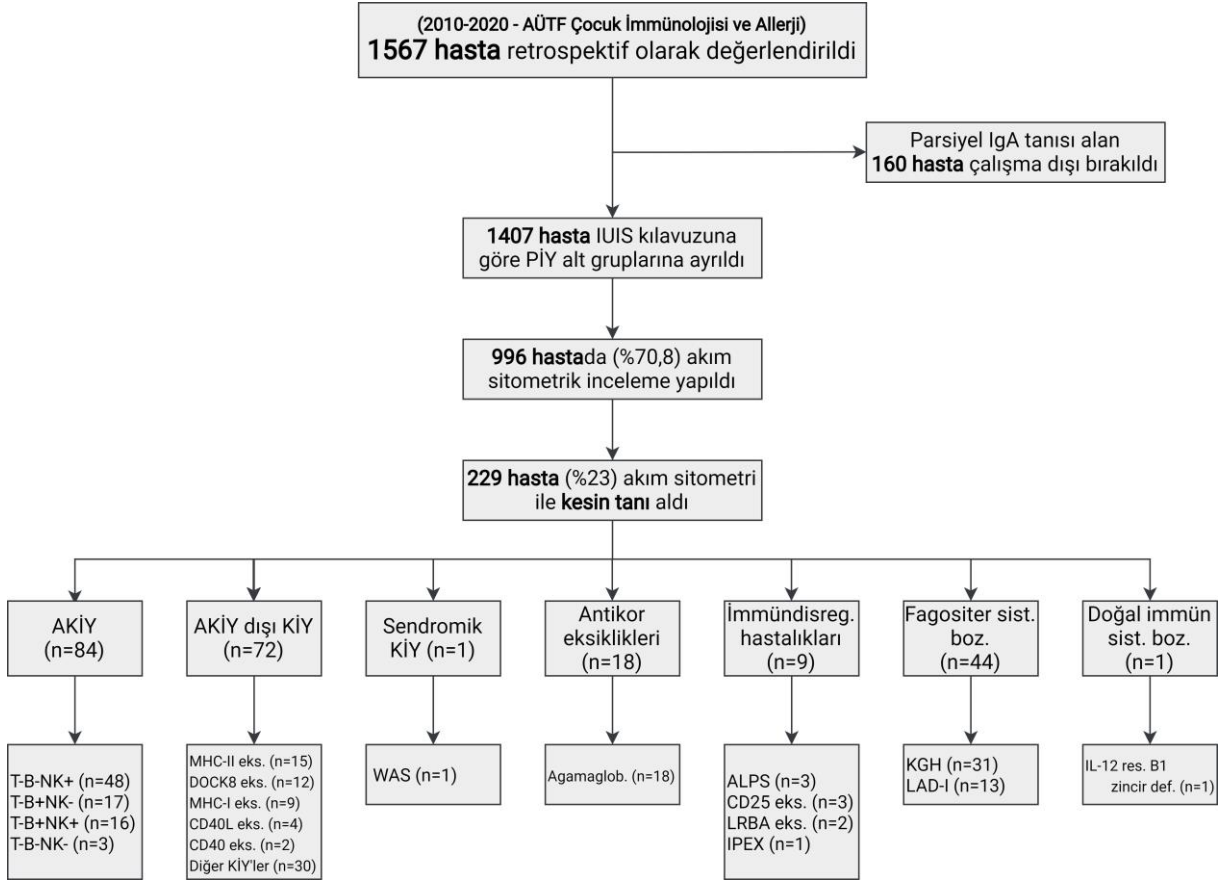
**Tablo 6.4.** Hastaların başvuru anındaki en sık fizik muayene bulguları

<b>PİY alt grupları</b>	<b>BGG n (%)</b>	<b>Egzama Dermatit n (%)</b>	<b>HM n (%)</b>	<b>LAP n (%)</b>	<b>Dismorfik bulgular n (%)</b>	<b>SSB n (%)</b>	<b>SM n (%)</b>	<b>Moniliazis n (%)</b>	<b>Tonsil yokluğu n (%)</b>
Antikor eksiklikleri	98 (10,3)	91 (9,6)	17 (1,8)	32 (3,4)	21 (2,2)	32 (3,4)	3 (0,3)	20 (2,1)	6 (0,6)
Kombine T ve B hücre yetmezlikleri									
- AKİY	24 (29,2)	17 (21,0)	27 (33,3)	1 (1,2)	1 (1,2)	17 (21,0)	10 (12,3)	21 (25,9)	17 (21,0)
- AKİY dışı KİY	30 (36,1)	24 (28,9)	27 (32,5)	10 (12,0)	2 (2,4)	10 (12,0)	13 (15,7)	5 (6,0)	1 (1,2)
Sendromik özellik gösteren KİY	42 (41,5)	27 (26,7)	15 (14,9)	11 (10,9)	34 (33,7)	6 (5,9)	7 (6,9)	4 (4,0)	2 (2,0)
İmmüdisregülasyon hastalıkları	10 (17,2)	5 (8,6)	20 (34,5)	29 (50,0)	7 (12,1)	1 (1,7)	18 (31,0)	3 (5,2)	-
Fagositer sistem bozuklukları	20 (22,7)	15 (17,0)	15 (17,0)	9 (10,2)	6 (6,8)	7 (8,0)	11 (12,5)	6 (6,8)	-
Doğal immün sistem bozuklukları	4 (33,3)	2 (16,7)	2 (16,7)	-	1 (8,3)	-	1 (8,3)	3 (25,0)	1 (8,3)
Kompleman eksiklikleri	1 (14,3)	-	-	1 (14,3)	-	-	-	-	-
Otoenflamatuar hastalıklar	1 (16,7)	1 (16,7)	-	1 (16,7)	1 (16,7)	-	-	-	-
Kemik iliği yetmezlikleri	1 (50,0)	-	-	1 (50,0)	-	-	-	-	1 (50,0)
<b>Tüm hastalar</b>	<b>231 (16,6)</b>	<b>182 (13,1)</b>	<b>123 (8,9)</b>	<b>95 (6,8)</b>	<b>73 (5,3)</b>	<b>73 (5,3)</b>	<b>63 (4,5)</b>	<b>62 (4,5)</b>	<b>28 (2)</b>

AKİY, ağır kombine immün yetmezlik; BGG, büyüme gelişme geriliği; HM, hepatomegali; KİY, kombine immün yetmezlik; LAP, lenfadenopati; SSB, solunum sistemi bulguları (takipne, retraksiyon, hipoksi, ral, ronküs vb.); SM, splenomegali

## 6.2. PİY’de akım sitometrisi kullanımı ve tanıya katkısı

Çalışmamıza dahil edilen 1407 hastadan 996’sına akım sitometrisi incelemeleri yapıldı. Hastalardan 229’una akım sitometrisi ile kesin tanı konuldu (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Akım sitometrisiyle tanı alan hastaların gruplandırılması

Hastaların akım sitometrisi incelemeleri sonuçları fenotipik sitometri, hastalığa özgü molekül (protein) ekspresyonları ve fonksiyonel sitometri olmak üzere 3 ana başlık altında sunulacaktır.

### 6.2.1. Fenotipik sitometri

Çalışmamızda 996 hastaya fenotipik sitometrik değerlendirme yapılmış olup; 162 hastaya (%16,2) kesin tanı konuldu. Hastalardan 108’i (%10,8) ise PİY tanısıyla takibe alınarak kesin tanı için ileri incelemelere yönlendirildi.

Çalışmamızda AKIY hastalarının hepsi periferik lenfosit alt grup analizi ile T, B, NK hücrelerinin detaylı incelenmesiyle tanı almıştır. Toplamda 84 hasta AKIY tanısı almış olup

Agamaglobulinemi tanısı alan 20 hastanın 18'inde immünofenotipik incelemeyle CD19 ve CD20 düşüklüğü gösterildi. Ortanca CD19 yüzdesi %0,22 (0-3) ve CD20 yüzdesi %0,05 (0-3) olarak sonuçlandı. Hastaların 8'inde akım sitometrisiyle BTK ekspresyonu değerlendirilmiş olup 7'sinde molekül ekspresyonu düşük saptanarak XLA tanısı kesinleştirildi. Çalışmamızda YDİY ile izlenen 39 hasta mevcut olup B lenfosit alt grup analizi yapılan 35 hastanın %68,6'sında izotip dönüşümü yapmış hafıza B hücrelerinde (IgM-, IgD-, CD27+) düşüklük saptandı. ALPS tanısı almış olan 3 hastanın ise tanısı yine immünofenotipik incelemeyle CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- DNT hücre sayısında artış olduğu saptanarak konuldu.

### 6.2.2. Spesifik antijenlerin (proteinlerin/moleküllerin) tayini

Hastalardan 155'ine spesifik protein ekspresyon incelemeleri yapıldı ve %50,9'una (n=79) kesin tanı konuldu. Bu yöntemle tanı alan hastalık alt gruplarına örnek olarak DOCK8 eksikliği, MHC sınıf II ve sınıf I eksikliği, CD40L ve CD40 eksikliği, WAS, XLA, LRBA eksikliği, CD25 eksikliği, LAD-I ve IL12RB1 zincir defektinden bahsedilecektir.

En sık görülen AKİY dışı KİY alt grubu DOCK8 eksikliği idi (n=20). Bu hastalardan 13'üne akım sitometrisi ile spesifik molekül ekspresyon analizi yapıldı ve 12 hastanın DOCK8 ekspresyonu düşük olduğu gösterilerek tanı konuldu. Ayrıca hastaların %50'sinde (10/20) CD3+ T hücre sayısında ve %55'inde (11/20) CD4+ T hücre sayısında düşüklük saptandı. İkinci sıklıkla görülen AKİY dışı KİY alt grubu MHC sınıf II eksikliği idi (n=15). Hastalardan hepsinin akım sitometrisi ile periferik kan lenfosit alt grup analizinde CD4+ T hücre sayısının düşük, CD8+ T hücre sayısının normal veya yüksek olduğu görüldü. Tüm hastalarda HLA DR yokluğu/düşüklüğü görülerek akım sitometrisi aracılığıyla hastaların tanısı konuldu. Dokuz hastada MHC sınıf I eksikliği tanısı konuldu. Tüm hastalara akım sitometrisi ile periferik kan lenfosit alt grupları değerlendirildi ve hastaların CD8+ T hücre sayısının %66,6 hastada düşük olduğu, tüm hastaların CD4+ T hücre sayısının normal veya yüksek olduğu görüldü. Hastaların hepsinde akım sitometrisi aracılığıyla HLA ABC düşüklüğü gösterilerek tanı konuldu. CD40L eksikliği tanısı alan 5 hasta mevcuttu. Hastalardan hepsine akım sitometrisi ile CD40L ekspresyonu çalışılmış olup 4'üne CD40L ekspresyonu düşük olduğu gösterilerek tanı konuldu. Hastalardan 2'sine genetik analiz yapılmış olup *CD40L* gen defekti saptandı. Dört hasta CD40 eksikliği tanısı aldı. Hastalardan 2'sine akım sitometrisi ile CD40 ekspresyonu çalışılmış olup her ikisine de düşük olduğu

gösterilerek tanı konuldu. Hastaların hepsinde de genetik analiz yapılarak *CD40* gen mutasyonu gösterildi.

WAS tanısıyla izlenen 20 hasta vardı. 4 hastada akım sitometrisi ile WASp ekspresyonu değerlendirildi; 3 hastada normal, yalnızca bir hasta düşük saptandı. Tüm hastalarda genetik analiz yapılmış olup hepsinde WAS gen mutasyonu gösterildi.

XLA tanısı alan 15 hasta olup hastaların 8'ine akım sitometrisiyle BTK ekspresyonu değerlendirildi ve 7'sinde molekül ekspresyonu düşük saptanarak tanı konuldu.

LRBA eksikliği tanısı alan 8 hastadan 5'inde akım sitometrisiyle spesifik molekül ekspresyonu değerlendirilmiş olup hastaların 2'sinde LRBA ekspresyonu düşük saptanarak tanı konuldu. CD25 eksikliği olan 3 hastanın tanısı akım sitometrisi ile düzenleyici T (Treg) hücrelerinde CD 25 ekspresyonu yokluğu gösterilerek konuldu.

Toplamda 15 hasta LAD tanısı aldı. 14 hastanın göbeğin geç düşmesi, 12 hastada omfalit öyküsü vardı. Tüm hastalarda tam kan sayımı analizinde lökositöz saptandı. Hastaların hepsinde akım sitometrisi analizi yapıldı. On hastanın CD18 ekspresyonu %2'nin altında saptandı ve hastalara ağır LAD-I tanısı konuldu. Üç hastanın ise CD18 ekspresyonu %2-30 arasında saptandı ve hafif-orta ağırlıkta LAD-I olarak değerlendirildi. CD18 ekspresyonu normal olan 2 hasta ise genetik analiz sonucu *FERMIT3* mutasyonu saptanarak LAD-III tanısı aldı.

IL12RB1 zincir defekti tanısı olan 2 hastaya akım sitometrisi ile CD212 ekspresyon analizi yapılmış olup hastalardan birinin tanısı T hücresi aktivasyonunu takiben CD212 ekspresyon düşüklüğü gösterilerek genetik tanı öncesi konuldu.

### **6.2.3. Fonksiyonel sitometri**

Hastalardan 836'sına ise fonksiyonel incelemeler yapıldı ve %12'sine (n=101) kesin tanı konuldu. %7,7'sine (n=64) ise bu yöntemle PİY tanısı alarak kesin tanı için ileri incelemelere yönlendirildi.

Fonksiyonel sitometrinin tanıda önemli olduğu hastalıkların başında yine AKİY gelmektedir. Çalışmamızda da mitojen ve antijenlere lenfosit aktivasyon yanıtında hastaların %90,5'inde PHA yanıtı ve %91,5'inde anti CD3 yanıtı düşük saptanmış ve 69 AKİY hastası bu yöntemle tanı almıştır.

Fonksiyonel sitometrinin tanısal olduğu bir diğer hasta grubu KGH'dir. Çalışmamızda KGH tanısı almış 31 hasta değerlendirildi. Tanı tüm hastalara DHR123 oksidasyon testi ile konuldu. Tanı sonrası 15 hastanın genetik analizi yapılmış olup; 6 hastada *CYBA* gen defekti (OR), 4 hastada *CYBB* gen defekti (X'e bağlı) ve 2 hastada *NCF2* gen defekti (OR) saptandı.

Toplamda hastaların 996'sına (%70,8) akım sitometrisi analizi yapıldı. Bu oran sıklıkla klinik ve laboratuvarla tanı alan antikör eksikliklerini çıkardığımızda %96,7'ye ulaşmaktaydı. Kombine T ve B hücre yetmezlikleri, immüdisregölasyon hastalıkları, doğal immün sistem defektleri, otoinflamatuvar hastalıklar ve kemik iliği yetmezlikleri grubundaki hastaların tümüne akım sitometrik değerlendirme yapıldı. 229/996 (%23,0) hastaya akım sitometrisi ile kesin tanı konuldu (Tablo 6.5). Fenotipik sitometri ile 162/996 hastaya (%16,2), spesifik protein ekspresyon incelemeleri ile 79/155 hastaya (%50,9) ve fonksiyonel incelemeler ile 101/836 hastaya (%12) kesin tanı konuldu. Hastaların PİY alt gruplarına göre fenotipik sitometri, proteine özđü testler ve fonksiyonel sitometri yapılma ve tanı alma oranları Tablo 6.6'da gösterilmiştir.

Hastaların akım sitometrik tanı tarihi ve genetik analiz sonuçlanma tarihi arasındaki süre ortanca 12,4 (0,3-152,8) ay idi. Hastaların PİY alt gruplarına göre akım sitometri analizi ve genetik analiz yapılma durumları, bu yöntemlerle tanı alma oranları ile akım sitometrik tanı tarihi ve genetik analiz sonuçlanma tarihi arasındaki süre Tablo 6.7'de gösterilmiştir.

**Tablo 6.5.** Hasta alt gruplarına göre semptom başlangıç yaşı, tanı yaşı ve akım sitometrik tanı özelliklerinin değerlendirilmesi

<b>PİY alt grupları</b>	<b>Semptomların başlangıç yaşı (ay)</b>	<b>Tanı anındaki hasta yaşı (ay)</b>	<b>Akım sitometrisi ile tanı alan hastalar, n (%)</b>	<b>Başvuru ile akım sitometrik tanı arasında geçen süre (ay)</b>
Antikor eksiklikleri	12 (0,1–192)	51,6 (1–217)	18/557 (3,2)	8 ay (0–169,6)
Kombine T ve B hücre yetmezlikleri				
- AKİY	1,5 (0–60)	4,0 (0–84)	84/84 (100)	0 gün (0–5,8 )
- AKİY dışı KİY	5 (0,1–120)	37,9 (0,3–419)	72/87 (82,8)	7 gün (0–125,9)
Sendromik özellik gösteren KİY	2 (0–86)	35,6 (0,7–258)	1/98 (1,0)	-
İmmüdisregülasyon hastalıkları	21 (0,2–168)	51,2 (2,2–222)	9/60 (15,0)	6 gün (0–119,7)
Fagositer sistem bozuklukları	2 (0,1–240)	9,2 (0,3–239)	44/89 (51,1)	4 gün (0–55,6)
Doğal immün sistem bozuklukları	5 (1–96)	122 (63–203)	1/12 (8,3)	-
Kompleman eksiklikleri	12 (4–72)	104,8 (50–151)	-	-
Otoinflamatuar hastalıklar	13,5 (1–378)	122,5 (97-168)	-	-
Kemik iliği yetmezlikleri	75 (54–96)	144,5 (124–162)	-	-
<b>Tüm hastalar</b>	<b>8 ay (0 gün–31,5 yaş)</b>	<b>4,1 yaş (0,1 ay–34,9 yaş)</b>	<b>229 (23,0)</b>	<b>4 gün (0–169,6 ay)</b>

AKİY, ağır kombine immün yetmezlik; KİY, kombine immün yetmezlik

**Tablo 6.7.** Hastaların akım sitometri ve genetik analiz sayıları ile akım sitometri tanı tarihi ve genetik analiz sonuç tarihi arasındaki zaman farkı

PİY grupları	Akım sitometrisi analizi		Genetik analiz		Akım sitometri ile genetik tanı arasındaki süre (ay)
	İncelenen hasta sayısı	Tanı alanlar (Kesin/Olası) n (%)	İncelenen hasta sayısı	Tanı alanlar n (%)	
Antikor eksiklikleri (n = 954)	557	18 (3,2) / 13 (2,3)	59	19 (32,2)	26,1 (1,2–122,6)
Kombine T ve B hücre yetmezlikleri					
AKİY (n = 84)	84	84 (100) / -	62	58 (93,5)	48,6 (0,8–152,8)
AKİY dışı KİY (n = 87)	87	72 (82,8) / 3 (3,4)	69	58 (84,1)	11,0 (0,3–125,0)
Sendromik KİY (n = 106)	98	1 (1,0) / 48 (49,0)	94	89 (94,7)	3,0 (0,7–92,4)
İmmüdisregülasyon hastalıkları (n = 60)	60	9 (15) / 25 (41,6)	54	39 (72,2)	11,5 (0,8–42,9)
Fagositer sistem bozuklukları (n = 89)	86	44 (51,1) / 17 (19,7)	57	41 (71,9)	9,9 (0,5–118,0)
Doğal immün sistem defektleri (n = 12)	12	1 (8,3) / 5 (41,6)	12	11 (91,7)	38,2 (2,2–115,8)
Kompleman eksiklikleri (n = 7)	4	- / 2 (50,0)	2	2 (100)	-*
Otoinflamatuvar hastalıklar (n = 6)	6	- / 2 (33,3)	6	6 (100)	-*
Kemik iliği yetmezlikleri (n = 2)	2	- / 1 (50,0)	2	2 (100)	-*

AKİY, ağır kombine immün yetmezlikler; KİY, kombine immün yetmezlikler; PİY, primer immün yetmezlik

\* Bu gruplardaki tüm hastalar kesin tanıyı genetik analizle aldığı için akım sitometrik tanı tarihi ile genetik analiz sonuçlanma tarihi arasındaki zaman fark hesaplanmamıştır

Tablo 6.8’de hastalık alt gruplarının akım sitometri ile tanı alma, akım sitometri ile tanı aldıktan sonra genetik analizle doğrulanma ve akım sitometri öncesi genetikle tanı alma sayıları verilmiştir. Tablo 6.9’da ise hastalık alt gruplarına göre akım sitometrik inceleme ile tanı alan hastalar ve tanı yöntemleri gösterilmiştir.

**Tablo 6.8.** Hastalık alt gruplarına göre akım sitometrisi ile tanı alan hasta grupları

Hastalık	Genetik çalışmadan önce AS ile tanı alan	AS sonrası genetik tanı ile doğrulanan	AS’den önce genetik tanı alan
<b>AKİY</b>	84	58	-
<b>AKİY dışı KİY</b>			
DOCK8 eksikliği (n = 20)	12	10	7
MHC sınıf II eksikliği (n = 15)	15	2	-
MHC sınıf I eksikliği (n = 9)	9	8	-
CD40L eksikliği (n = 5)	4	1	1
CD40 eksikliği (n = 4)	2	2	2
<b>Sendromik KİY’ler</b>			
WAS (n = 20)	1	1	19
<b>Antikor eksiklikleri</b>			
Agamaglobulinemi (n = 20)	18	12	-
<b>İmmüdisregülasyon hastalıkları</b>			
LRBA eksikliği (n = 8)	2	2	6
CD25 eksikliği (n = 3)	3	2	-
IPEX (n = 1)	1	-	-
ALPS (n = 3)	3	1	-
<b>Fagositer sistem bozuklukları</b>			
KGH (n = 31)	31	15	-
LAD-I (n = 13)	13	6	-
<b>Doğal immün sistem defektleri</b>			
IL12RB1 zincir defekti (n =2)	1	1	1

AKİY, ağır kombine immün yetmezlikler; ALPS, otoimmün lenfoproliferatif sendrom; CD40L, CD40 ligand; DOCK8, Dedicator of cytokinesis-8; IPEX, X’e bağlı immüdisregülasyon enteropati poliendokrinopati; KGH, kronik granümatöz hastalık; KİY, kombine immün yetmezlikler; LAD, lökosit adezyon defekti; LRBA, LPS-responsive beige-like anchor protein; MHC, Major histocompatibility complex; PİY, primer immün yetmezlik; WAS, Wiskott-Aldrich sendromu; XLA, X’e bağlı agamaglobulinemi

**Tablo 6.9.** Hastalık alt gruplarına göre akım sitometrik inceleme ile tanı alan hastalar ve tanı yöntemleri

Hastalık	Akım sitometrisi çalışılan hasta sayısı	Tanı alan hasta sayısı	Yöntem (Feno/Prot/Fonk)
<b>AKİY</b>	84	84 (%100)	84 / 7 / 69
<b>AKİY dışı KİY</b>			
DOCK8 eksikliği (n = 20)	20	12 (%60)	- / 12 / -
MHC sınıf II eksikliği (n = 15)	15	15 (%100)	- / 15 / -
MHC sınıf I eksikliği (n = 9)	9	9 (%100)	- / 9 / -
CD40L eksikliği (n = 5)	5	4 (%80)	- / 4 / -
CD40 eksikliği (n = 4)	2	2 (%100)	- / 2 / -
Diğer KİY'ler (n = 34)	34	30 (%88,2)	30 / - / -
<b>Sendromik KİY'ler</b>			
WAS (n = 20)	4	1 (%25)	- / 1 / -
<b>Antikor eksiklikleri</b>			
Agamaglobulinemi (n = 20)	18	18 (%100)	18 / 7 / -
<b>İmmüdisregülasyon hastalıkları</b>			
LRBA eksikliği (n = 8)	5	2 (%40)	- / 2 / -
CD25 eksikliği (n = 3)	3	3 (%100)	- / 3 / -
IPEX (n = 1)	1	1 (%100)	1 / - / -
ALPS (n = 3)	3	3 (%100)	- / 3 / -
<b>Fagositer sistem bozuklukları</b>			
KGH (n = 31)	31	31 (%100)	- / - / 31
LAD-I (n = 13)	13	13 (%100)	- / 13 / -
<b>Doğal immün sistem defektleri</b>			
IL12RB1 zincir defekti (n =2)	2	1	- / 1 / -

AKİY, ağır kombine immün yetmezlikler; ALPS, otoimmün lenfoproliferatif sendrom; CD40L, CD40 ligand; DOCK8, Dedicator of cytokinesis-8; Feno, Fenotipik sitometri; Fonk, Fonksiyonel sitometri; IPEX, X'e bağlı immüdisregülasyon enteropati poliendokrinopati; KGH, kronik granümatöz hastalık; KİY, kombine immün yetmezlikler; LAD, lökosit adezyon defekti; LRBA, LPS-responsive beige-like anchor protein; MHC, Major histocompatibility complex; PİY, primer immün yetmezlik; Prot, Protein ekspresyonu; WAS, Wiskott-Aldrich sendromu; XLA, X'e bağlı agamaglobulinemi

## 7. TARTIŞMA

PİY'ler, immün sistemin çeşitli bileşenlerini etkileyen 456 farklı genetik bozukluğu içerir. Klinik, immünolojik ve genetik olarak heterojen bir hastalık grubudur. Her yıl, PİY'lerle ilişkili en az 20 yeni genetik kusur tanımlanmaktadır (2, 45); bu da bağışıklık sistemini kantitatif ve işlevsel olarak analiz etmek, yeni genetik bulguları doğrulamak ve klinik fenotip ve genotip ile korelasyon için ileri immünolojik testlerin yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Bir hastanın klinik sunumu her zaman tek bir genetik kusurdan kaynaklanmamaktadır ve bu nedenle, potansiyel genetik kusurları ortaya koyabilmek için sıklıkla temel tanısal bir immünolojik değerlendirme şarttır. Klinik fenotip veya aile öyküsünden genetik bir kusur aşikâr olsa bile, hastanın immünfenotipini belirlemek için neredeyse her zaman immünolojik bir değerlendirme yapılması gerekmektedir (13, 45). Akım sitometrisi, PİY'lerin teşhisi ve sınıflandırılması için hızlı ve hassas bir tetkik olmakla birlikte; bu grup hastalıkların değerlendirilmesinde ilk aşamada veya sonraki yönetiminde uygulanabilir. Bu hastalıkların patogenezi ve yönetimi konusundaki bilgilerimiz arttıkça, bu testler tanı laboratuvarında kolaylıkla yapılabilmektedir.

Yapılan en son sınıflamada PİY on ayrı kategori altında ele alınmaktadır (2, 3). Bu hastalıkların çoğu için laboratuvar düzeyindeki teşhis, standart biyokimyasal testler ve genetik analizin yanı sıra, genellikle ya hastalığa özgü bir değerlendirmede ya da daha geniş olarak immünfenotip ve fonksiyonun ölçülmesinde akım sitometrisi ile yapılan değerlendirmeleri içerir. Genetik araştırmalar, PİY'lerin tanısı için kullanılan tetkiklerdir; ancak, genetik analiz zaman alır ve pahalıdır. Buna karşılık, lazerlerden geçirilen sıvı fazda floresan etiketli parçacıkların fiziksel ve kimyasal özelliklerini kullanan teknolojiler, deneyimli ve yetenekli araştırmacılara ihtiyaç duymalarına rağmen gen analizinden daha ucuzdur. Böylece akım sitometrisi, tek hücre analizine dayalı multiparametrik değerlendirmeyle hızlı ve doğru sonuçlar sunarak temel laboratuvar testler ile genetik analiz arasında bir köprü görevi görebilir (13, 61). Çalışmamızın amacı üçüncü basamak sağlık hizmeti sunan bir üniversite hastanesinin tek merkez verilerine dayanarak PİY hastalığının tanısında immünfenotipleme, spesifik molekül ekspresyonu ve fonksiyonel testler için hızlı bir tanı aracı olan akım sitometrisinin tanıdaki yeri ve önemini retrospektif olarak incelemektir.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalı'nda 2010–2020 yılları arasında PİY tanısıyla izlenen toplam 1407 hasta IUIS kılavuzu ile hastalık alt gruplarına ayrıldığında (2, 3); en sık görülen grubun antikör eksiklikleri (n=954, %67,8) olduğu görüldü. Bu grubu, sıklık sırasına göre, kombine T

ve B hücre yetmezlikleri (n=171, %12,2), sendromik özelliklerle birlikte olan kombine immün yetmezlikler (n=106, %7,5), fagositer sistem sayı ve/veya fonksiyon bozuklukları (n=89, %6,3), immüdisregülasyon hastalıkları (n=60, %4,3), doğal immün sistem defektleri (n=12, %0,9), kompleman eksiklikleri (n=7, %0,5), otoinflamatuvar hastalıklar (n=6, %0,4) ve kemik iliği yetmezliklerinin (n=2, %0,1) takip ettiği saptandı.

ESID'in sürekli güncellenen son verilerine göre Avrupa genelinde de en sık görülen PİY alt grubu, çalışmamızdaki benzer şekilde, antikor eksiklikleri (%50,6) olup; bunu sırasıyla diğer iyi tanımlanmış immün yetmezlikler (%15,1), kombine T ve B hücre yetmezlikleri (%10,3) ve fagositer sistem bozuklukları (%8,2) izlemektedir (23). İtalya ve Almanya'dan yayınlanan ülke raporlarında da en sık görülen grup sırasıyla %63 ve %57 oranıyla antikor eksiklikleri iken (62, 63); Kuveyt ve Tunus gibi Afrika ve Ortadoğu ülkelerinde yayınlanan geniş ölçekli çalışmalarda ise kombine B ve T hücre yetmezlikleri en sık görülen PİY alt grubu idi (sırasıyla, %31,8 ve %28,6) (64, 65). Ülkemizde daha önce Yorulmaz ve ark.'nın (9) ve Kılıç ve ark.'nın (7) yapmış olduğu çalışmalarda da, yine mevcut çalışmamıza paralel şekilde, sırasıyla %92,8 ve %73,9 oranlarında en sık görülen PİY alt grubunun antikor eksiklikleri olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda saptanan antikor eksiklikleri oranı Avrupa ile benzer şekilde olup, kombine B ve T hücre defektleri Avrupa ülkelerine göre daha yüksek, Ortadoğu ülkelerine kıyasla ise daha düşük orandadır (64). Ülkelere göre PİY alt gruplarındaki bu dağılım farklılığı toplumların sosyokültürel özellikleri, özellikle de akraba evliliği oranları ile açıklanabilir.

İmmün sistemin temel fizyolojik görevi, enfeksiyonların önüne geçmek ve oluşan enfeksiyonları sonlandırmak olduğundan, en sık görülmesi beklenen PİY bulgusu enfeksiyondur. Çalışmamızda da beklenildiği üzere tüm PİY hastalarımızın başvuru yakınmaları içinde enfeksiyon %85,6 ile ilk sırada yer almaktaydı. Bunu takiben sırasıyla hastaların %24,2'sinde alerji, %6,1'inde lenfoproliferasyon ve/veya malignite, %5,5'inde otoimmünite ve %3,4'ünde enflamasyon bulgularına rastlandı. Almanya'da yapılan bir çalışmada da en sık klinik bulgu %74 oranıyla enfeksiyon olup bunu %22 oranıyla immüdisregülasyon izlemekteydi (63). İngiltere'den yayınlanan ülke raporunda ise %76,8 hastada en sık başvuru yakınmasının enfeksiyon olduğu; PİY alt gruplarına göre değerlendirildiğinde ise en sık %94,3 oranıyla antikor eksikliklerinin, ikinci sıklıkla da %88,1 oranıyla doğal immün sistem defektlerinin enfeksiyonla başvurduğu görüldü (66). Çalışmamızda hastalar PİY alt gruplarına göre değerlendirildiğinde %95,2 oranıyla AKİY ve bunu takiben %91,6 oranıyla doğal immün sistem defektleri, en sık enfeksiyon ile başvuran iki alt gruptu. Çalışmamızda alerjinin en sık başvuru yakınmalarından biri olmasının

muhtemelen nedenleri antikor eksikliklerinin en sık görülen PİY alt grubu olması, özellikle süt çocuğunun geçici hipogamaglobulinemisi (SÇGH) ve selektif IgA eksikliği gibi hastalık gruplarının sıklıkla alerjik semptomları taklit etmesi ya da bunlara eşlik etmesidir. Ayrıca merkezimizin immünolojinin yanı sıra alerji hastalıklarına da bakan bir kurum olmasının da bu durumun sebeplerinden biri olabileceği kanaatindeyiz (31, 32, 67). Altun ve ark.'nın (67) 2013–2016 yıllarında yaptığı çalışmada ise alerji semptomlarının oranı SÇGH'de %64,9, selektif IgA eksikliğinde ise %67 olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda hastaların ortanca semptom başlama yaşı 8 ay (0 gün–31,5 yaş) iken; bu süre AKİY grubundaki hastalarda 1,5 ay, kemik iliği yetmezliği görünen hastalarda ise 75 aydı. Tanı anındaki hasta yaşları da semptom yaşlarıyla orantılı olup ortanca 4,1 yaş (0,1 ay–34,9 yaş) idi. Bu süre en erken AKİY, en geç ise otoinflamatuar hastalıklar ve kemik iliği yetmezliği alt grubundaki hastalarda hesaplandı. Yunanistan'dan bildirilen ülke raporunda semptomların başlangıcında ve tanı anında hastaların ortanca yaşı sırasıyla 0,5 yaş ve 2 yaş olarak bulunmuştu (68). Yirmi iki Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkesinin değerlendirildiği başka bir çalışmada (69) semptomların başlangıcında ortanca hasta yaşı 36 ay olup Almanya'da yapılan bir çalışmada ise yaş aralığı 0-88 yaş arasında değişmekteydi (63).

PİY'lerin aşamalı immünolojik tanı prosedürü klinik, laboratuvar ve genetik tanı olmak üzere üç önemli aşamadan oluşur. Tanı için kullanılan laboratuvar testleri ise tam kan sayımından ileri immünolojik testlere kadar uzanmaktadır (12). Akım sitometrisi, aradan geçen on yıllarda önemli teknolojik gelişmeler ile yarım yüzyıl önceki keşfinden bu yana sürekli olarak gelişen bir metodolojiyi temsil eder ve kan, vücut sıvısı, doku ve kemik iliği gibi herhangi bir hücresel kaynak üzerinde kullanılabilir. Bu testler, kalitatif veya kantitatif olabileceği gibi spesifik hücre popülasyonlarını hem fenotipik hem de fonksiyonel olarak tanımlayabilir. Ayrıca sitometrik inceleme ile spesifik protein ekspresyonu, hücre canlılığı, apoptoz ve hücresel etkileşimler değerlendirilebilmektedir. Bu özellikler akım sitometrisi ile yapılan incelemeleri PİY'lerin tarama ve teşhisinde kullanılan ideal ve hassas bir araç haline getirir (45). Genetik analiz, PİY'ler için kesin bir tanı sağlasa da yine bir gen mutasyonunun immünofenotipini doğrulamak için akım sitometrisi gereklidir. Ayrıca, akım sitometrisi, çalışmamızda da görüldüğü üzere henüz genetik test yapılmadan önce, çok daha kolay ve hızlı bir şekilde birçok PİY tanısının konulmasında veya tanıya yönlendirilmesinde rol oynar (16, 50).

Periferik kan lenfosit alt kümelerinin fenotipik analizinin birçok PİY için tanısız ve prognostik açıdan yararlı olduğu gösterilmiştir. Bu hastalıkların başında AKİY gelmektedir. İmmünofenotipleme kandaki hemen hemen her hücre alt grubunda akım sitometrisi ile

gerçekleştirilebilir. Temel olarak fenotipin belirlenmesi ve izleminde AKİY’de T, B, NK hücreleri, YDİY’de izotip dönüşümü yapmış hafıza B hücreleri, IPEX sendromunda Treg hücreleri ve ALPS’te DNT hücrelerinin ölçümü kullanılır (45). Çalışmamızda fenotipik sitometrik değerlendirme yapılan 996 hastanın 162’sine (%16,2) kesin tanı konuldu. Hastalardan 108’i (%10,8) ise PİY tanısıyla takibe alınarak kesin tanı için ileri incelemelere yönlendirildi.

Çalışmamızda AKİY hastalarının hepsi fenotipik sitometri ile tanı almıştır. AKİY erken dönemde tanı konulmazsa mortalite ve ağır morbidite ile seyreden bir hastalık olup, erken tanı prognozda en önemli aşamadır. Bu da oldukça hızlı tanı konulmasını sağlayan akım sitometrisinin hastalık tanısındaki önemini artırmaktadır. Hastalık, ciddi lenfopeni ve fonksiyon eksikliği ile karakterize olup tanı için akım sitometrisi ile periferik kan T lenfosit ve alt grupları ile B lenfosit ve NK hücre düzeyleri ölçülmeli, naif ve hafıza T hücrelerinin fenotipleri bakılmalıdır. Çalışmamızda tüm hastalara periferik kan lenfosit alt grup analizi yapıldı ve hastaların hepsinde T lenfosit yokluğu veya düşüklüğü saptandı. Tüm hastaların CD3+ T lenfosit değerleri düşük saptandı. Ayrıca tüm hastaların CD4+CD45RA+CD31+ (RTE) hücre düzeyinde düşüklük mevcuttu (ortanca %3).

Fenotipik sitometrinin yanında fonksiyonel sitometrinin de AKİY tanısında önemi büyüktür. Çalışmamızda da mitojen ve antijenlere lenfosit aktivasyon yanıtında hastaların %90,5’inde PHA yanıtı ve %91,5’inde anti CD3 yanıtı düşük saptandı. Maternal engraftman olan bazı hastalarda aktivasyon yanıtının normal olduğu görüldü. Ayrıca 9 hastada spesifik molekül ekspresyon analizi ile CD127 ve CD132 ekspresyonu değerlendirilmiş olup 7 hastanın CD127 ekspresyonu düşük saptandı. Çalışmamızda da görüldüğü gibi AKİY tanısında hem fenotipik ve fonksiyonel sitometrinin hem de spesifik molekül ekspresyon analizinin yeri önemlidir.

Vignesh ve ark.’nın (70) 2020 yılında Hindistan’da yaptıkları çok merkezli bir çalışmada akım sitometrisi yapılan 254 AKİY hastasında immünofenotipleme ile 84 hastaya T–B–NK+ AKİY, 67 hastaya T–B+NK– AKİY, 33 hastaya T–B+NK+ AKİY ve 32 hastaya T–B–NK– AKİY tanısı koydukları; 20 hastanın Omenn sendromu tanısı aldığı ve 2 hastada ise transplasental edinilmiş anne T-hücresi engraftmanı geliştiği gösterilmiştir. Ayrıca X’e bağlı AKİY’den şüphelenilen 8 çocukta akım sitometrisi ile lenfosit veya monositlerde CD132 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Genetik tanı konulan 162 hastada en sık saptanan defektler; *IL2RG* (%22,2), *RAG1* (%16,0) ve *ADA* (%11,7) mutasyonlarıdır.

AKİY kalıtım paterni bölgelere ve ırklara göre farklılık göstermektedir. Dünyada en yaygın fenotip T-B+NK- iken ülkemizde en yaygın fenotipin T-B-NK+ olduğu bilinmektedir (8). Bu durumun altında yatan neden ise batı toplumlarında X'e bağlı geçiş gösteren fenotiplerin daha sık olmasına karşın ülkemiz gibi akraba evliliğinin yüksek olduğu ülkelerde OR geçiş gösteren AKİY tiplerinin daha sık görülmesidir. İran'da 242 AKİY hastasında yapılan bir çalışmada hastaların çoğunda T-B-NK+ fenotipi (%34,3) olduğu ve genetik analiz yapılan hastalarda en sık *RAG1* ve *RAG2* gen defektleri (%32,0) saptandığı görüldü (71). İncioğulları ve ark.'nın (8) 2019 yılında ülkemizde yaptığı geniş çaplı bir çalışmada, %42,3 hastada AKİY'in genetik nedeni saptanırken; en sık olarak *RAG1* (%9,8), *RAG2* (%5,6), *Artemis* (%5,6) ve *JAK3*'te (%6,8) OR mutasyonları tespit edildi. Bayram ve ark.'nın (72) 2007-2017 yılları arasında kliniğimizde 72 AKİY hastasında yapmış oldukları çalışmada ise AKİY'in genetik nedeni %41,6 hastada tanımlanmış ve en sık *RAG1/RAG2* (n=7; %9,7) ve *ADA* (n=6; %8,3) gen defektleri saptanmıştır. Çalışmamızda da literatürle uyumlu şekilde en yaygın fenotipin %57,1 oranıyla T-B-NK+ AKİY olduğu ve en sık görülen gen defektlerinin ise bu immünofenotipe yol açan *RAG1* ve *RAG2* (%24,2) ve *Artemis* (*DCLRE1C*) (%19,4) olduğu görüldü. Bunu ise X'e bağlı geçiş *IL2RG* gen defekti (%14,5) izlemekteydi.

Akım sitometrisi ayrıca, AKİY hastalarından gönderilmesi planlanan genetik analiz konusunda da yol göstericidir. B ve NK hücresi durumuna göre T-B-NK-, T-B-NK+, T-B+NK-, T-B+NK+ olmak üzere 4 immünofenotipe ayrılan hastalarda, henüz genetik analiz sonuçlanmadan genetik sonuçlar hakkında tahmin yürütme imkânı sağlanmış olur. Ancak çalışmamızda genetik tanının akım sitometrisi ile öngörülen alt gruptan farklı olduğu birtakım örnekler mevcuttur. *ADA* gen defekti normalde T-B-NK- AKİY grubundadır. Ancak çalışmamızda *ADA* gen defekti tanısı alan 6 hastanın 3'ünde akım sitometrik analiz sonucu T-B-NK+ AKİY ile uyumlu saptandı. *IL2RG* gen defekti normalde T-B+NK- AKİY olmasına rağmen 9 hastadan 5'inde akım sitometrik analiz sonucu T-B+NK+ AKİY ile uyumluydu. AK2 eksikliği ise T-B-NK- AKİY grubunda olmasına rağmen çalışmamızdaki hastanın akım sitometrisi T-B+NK- AKİY ile uyumlu sonuçlandı.

Hastaların semptomlarının başlangıç yaşı 1,5 (0-60) ay olup tanı anındaki hasta yaşı ortanca 4,0 (0-84) ay idi. Hastaların akım sitometrik tanı tarihi ve genetik analiz sonuçlanma tarihi arasındaki süre ortanca 48,6 (0,8-152,8) ay idi. Bu süre tüm PİY alt grupları arasındaki en uzun süre olup bu durumun altında yatan nedenin tüm AKİY hastalarının akım sitometrisi ile tanı almış olması olduğunu düşünmekteyiz.

AKİY pediatrik acil bir durum olduğundan bu hastalıktan şüphelenmek ve yüksek farkındalık ile hastaların henüz ciddi enfeksiyon geçirmeden ve organ hasarı gelişmeden önce tanı alması ve tedavinin genel sonucunun optimal olduğu bir zamanda uygun immün yeniden yapılandırma tedavisinin hemen başlatılması, prognozda en önemli faktördür. Bu nedenle akım sitometrisi aracılığıyla konulan erken tanı hayati önem taşımaktadır. Çalışmamızda da hastaların %84,6'sına henüz genetik analiz sonuçlanmadan önce akım sitometrisi sonuçları ile AKİY tanısı konularak nakil yapıldığı görüldü.

Akım sitometrik incelemeler aynı zamanda tarama amaçlı olarak da kullanılabilir. AKİY için yenidoğan taraması şu anda ABD'deki çoğu eyalette gerçekleştirilmektedir (11, 73).

Düşük immünoglobulin seviyeleri olan hastalar, fenotipik sitometriyle B hücre sayıları açısından değerlendirilmeli ve bebeklik veya erken çocukluk çağında B hücre sayısı düşükse (< %2), XLA veya OR konjenital agamaglobulinemiden şüphelenilmelidir. Bu durumda kesin tanı spesifik molekül ekspresyon analizi ile BTK ekspresyonundaki düşüklüğün gösterilmesine veya tipik olarak agamaglobulinemi ve B hücreli lenfopeni ile ilişkili bir genetik mutasyonun tanımlanmasına bağlı olacaktır. B hücre sayısı, daha ileri yaşlarda hipogamaglobulinemi ile başvuran hastalarda hala faydalı olabilir, ancak genellikle tanıyı koymada doğrudan etkisi sınırlıdır. Daha geç başlangıçlı hipogamaglobulineminin, YDİY ile ilişkili olduğu ve hastalarda B hücre alt gruplarındaki özellikle izotip dönüşümü yapmış hafıza B hücrelerinin düşük olmasıyla bağlantılı olduğu bulunmuştur. Akım sitometrisi ile B lenfosit analizi tek başına YDİY için tanısal olmasa da hastalığın ciddiyetini ve granümatöz hastalık, splenomegali ve lenfoproliferatif hastalık gibi komplikasyonlara ilerleme olasılığını belirlemeye yardımcı olabilir, böylece hastalığın yönetimine veya izlenmesine yardımcı olur (73). Çalışmamızda akım sitometri analizlerinde B lenfosit alt grup analizi değerlendirilen 35 YDİY tanılı hastanın %68,6'sında izotip dönüşümü yapmış hafıza B hücrelerinde (IgM-, IgD-, CD27+) düşüklük saptandı. Warnatz ve ark.'nın (74) 30 YDİY hastasında yapmış oldukları çalışmada da hastaların %77'sinde izotip dönüşümü yapmış hafıza B hücrelerinde düşüklük görülmüştü. Ayrıca, CD19 ve B hücresi aktive edici faktör reseptörü (BAFF-R) kodlayan genlerdeki mutasyonlar, YDİY hastalarının alt grubunda yer alır ve bu moleküllerin B hücrelerinin yüzeyinde ekspresyonunun azalmasına neden olabilir. Bu hastalar akım sitometrisi ile taranabilir (13, 16). Çalışmamızda da bir hastada akım sitometrisinde BAFF-R ekspresyon analizi yapılmış, ancak normal saptanmıştır. Yani YDİY tanısında hem fenotipik sitometri hem de spesifik molekül ekspresyon analizi yol göstericidir.

Akım sitometrisi ile CD4+CD25+FOXP3+ veya CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> Treg hücrelerinin yokluğu/düşüklüğünün gösterilmesi tanıda IPEX düşündürür. Ayrıca FOXP3, IPEX’li hastalarda işlevsel değildir. Yani hem fenotipik hem de fonksiyonel sitometri IPEX tanısında önemli yer tutar (13, 16, 44, 49, 75). Çalışmamızda IPEX tanısı ile izlenen bir hasta olup, hasta başka bir merkezde nakil yapıldıktan sonra takip amacıyla tarafımıza başvurduğu için nakil öncesi akım sitometrisi sonuçlarına ulaşamadı.

Periferik kan ve lenfoid dokularda CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- DNT hücrelerinin sayısının yükselmesi (CD3+ lenfosit sayısının >%6’sı), ALPS düşündürür (51). DNT’ler, akım sitometrisi analiziyle kolayca tespit edilebilir ve diğer klinik kriterler karşılandığında ALPS’in hızlı teşhisi sağlanır (16, 50, 76). Çalışmamızda ALPS tanısı ile izlenen 3 hastanın da akım sitometrik analizinde CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- DNT hücre sayısında artış mevcuttu. Cerinic ve ark.’nın (77) yaptığı otoimmün ve otoinflamatuar bulguları olan 475 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada hastaların %3,3’üne akım sitometrisi ile DNT artışı gösterilerek ALPS tanısı konulduğu saptandı.

Akım sitometrisi, hücre yüzeyi ve hücre içi proteinlerinin ekspresyonundaki kusurlarla ilişkili immün yetmezliklerin tanısında faydalı olabilir. Çalışmamızda hastalardan 155’ine spesifik protein ekspresyon incelemeleri yapıldı ve %50,9’una (n=79) kesin tanı konuldu. Hücre yüzeyi proteinlerinin ekspresyonundaki kusurlarla ilişkili immün yetmezliklere örnek CD40L ve CD40 eksikliği verilebilir. Bu hastalıklarda sırasıyla aktive edilmiş T lenfositlerinde CD40L ekspresyonunda ve B hücrelerinde CD40 ekspresyonunda defekt vardır. Hastalara akım sitometrisi ile protein ekspresyonunun olmadığı gösterilerek kesin tanı konulabilir (13, 16, 73). Çalışmamızda da 9 hastadan 6’sında spesifik molekül ekspresyon analizinde düşüklük olduğu görülmüştür. Unutulmamalıdır ki akım sitometrisi ile CD40L veya CD40 ekspresyonunda düşüklüğün gösterilmesi tanısaldır. Ancak normal saptanması fonksiyonel defekti dışlayamayacağı için hastalığı ekarte ettirmez. Bu nedenle klinik olarak hastalıktan şüphe edilen durumlarda mutlaka genetik analiz yapılmalıdır.

Yüzey protein ekspresyon analizinin tanıda faydalı olabileceği diğer PİY örnekleri MHC sınıf II ve sınıf I eksikliğidir (73). Çalışmamızdaki MHC sınıf II eksikliği (n=15) ve MHC sınıf I eksikliği (n=9) tanılarıyla takip edilen tüm hastaların kesin tanıları akım sitometrisiyle konuldu. Periferik kan lenfosit alt grup analizinde MHC sınıf II eksikliğinde CD4+ T hücre sayısı düşüklüğü, MHC sınıf I eksikliğinde ise CD8+ T hücre sayısı düşüklüğü önemli tanısal ipuçları olmakla birlikte HLA DR yokluğu/düşüklüğü ve HLA ABC düşüklüğü gösterilerek tüm hastaların kesin tanısı konuldu. Aluri ve ark.’nın (78) MHC sınıf II eksikliği tanısı olan 5 hastalık vaka serisinde hastaların hepsinde HLA DR ekspresyonu yokluğu

gösterilerek tanı konulmuştur. Ouederni ve ark.'nın (79) MHC sınıf II eksikliği olan 35 hastada yapmış oldukları çalışmada ise hastaların hepsinde HLA DR ekspresyonu saptanmadığı raporlanmıştır. Özellikle klinik olarak şüphelenilen hastalarda (MHC sınıf II eksikliği AKİY kliniği ile başvururken; MHC sınıf I eksikliği sıklıkla ASYE ve cillte granülömler ile başvurur) akım sitometrisi panelinde HLA DR ve HLA ABC'nin değerlendirilmesi hastalığın tanısının gözden kaçırılmaması için büyük önem taşımaktadır.

LAD-I, hücre yüzeyi proteinlerinden CD18'in varlığı değerlendirilerek, LAD-II ise CD15'lerin (Sialyl Lewis X antijeni) ekspresyonunun başarısızlığının gösterilmesiyle teşhis edilebilir (73). Çalışmamızda LAD-II tanısı alan hasta olmayıp, 13 hasta LAD-I ve 2 hasta LAD-III tanısı almıştı. LAD-I en sık görülen form olup Wolach ve ark.'nın (80) 29 hastada yaptığı çok merkezli çalışmada 18 hastada LAD-I, 6 hastada LAD-II, 5 hastada ise LAD-III tanısı konulmuştur. LAD'da OR kalıtım paterni olması nedeniyle beklendiği gibi çalışmamızda tüm hastalarda ebeveyn akrabalığı mevcuttu. Çalışmamızda LAD-I tanısı alan tüm hastaların tanısı akım sitometrisi ile periferik kanda CD18 molekül ekspresyonunun yokluğu/düşüklüğü gösterilerek konuldu. Kwon ve ark.'nın (50) yaptığı çalışmada da LAD-I tanısı olan yalnızca 3 hasta olmakla birlikte hastaların hepsinin akım sitometrisi ile CD18 molekül ekspresyonunun yokluğu gösterilerek tanıları konulmuştu. Ancak klinik bulguları LAD ile uyumlu olup CD18 molekül ekspresyonunun normal olduğu hastaların, CD18'in fonksiyonel olmadığı LAD-I veya özellikle kanama öyküsü olan hastalarda LAD-III olabileceği unutulmamalıdır (50, 56, 81). Çalışmamızda da göbeğin geç düşmesi, omfalit, erken yaşta başlayan enfeksiyon öyküsü olup, tam kan sayımı analizinde lökositozu olan, hatta hastalardan birinde kanama diyatezi öyküsü olan 2 hastaya genetik analiz yapılarak *FERMIT3* mutasyonu gösterilmiş ve hastalara LAD-III tanısı konulmuştur.

Kusurlu hücre içi protein ekspresyonu ile seyreden birkaç PİY vardır ve seçilmiş bozukluklarda spesifik molekül ekspresyon analizi ile tanı konulabilir. Bu grup hastalıklara örnek olarak XLA verilebilir. Yukarıda bahsedildiği gibi, XLA'da, BTK'yı saptamak için bir monoklonal antikor kullanılır, ancak hastalarda B hücresi bulunmadığından hedef ya monositler ya da trombositler olmalıdır. Bu tetkik aynı zamanda XLA taşıyıcılarının tespiti için de kullanılabilir. BTK ekspresyonunun azalması güçlü bir şekilde XLA tanısı koydurur ancak XLA'lı bazı hastalar normal miktarda ancak fonksiyonel olmayan BTK proteini eksprese ettiğinden normal BTK miktarı tanıyı dışlamaz. Bu nedenle klinik olarak şüphelenilen ancak BTK ekspresyonu normal olan hastalarda genetik analiz yapılmalıdır (13, 16). Çalışmamızda akım sitometrisiyle BTK ekspresyonu değerlendirilen 8 hastadan 7'sinde düşüklük gösterilerek tanı konulmuş olup; normal saptanan hastanın ise klinik ve laboratuvar

özellikleri XLA tanısını desteklediği için fonksiyon defekti olabileceği düşünülerek yapılan genetik analizle *BTK* gen defekti gösterilerek tanı doğrulanmıştır. Kwon ve ark.'nın (50) yaptığı çalışmada *BTK* mutasyonu gösterilerek XLA tanısı konmuş; 11 hastadan 5'ine öncesinde lenfosit alt grup analizi yapılarak hepsinde neredeyse hiç CD19+ B hücresi olmadığı ve 2'sinde *BTK* protein ekspresyonunun azaldığı gösterilerek tanı konulmuştur.

Kusurlu hücre içi protein ekspresyonu ile seyreden bir başka hastalık örneği olarak WAS verilebilir. WAS tanısında akım sitometrisiyle WASp ekspresyonu düşüklüğünün gösterilmesi tanısal olmakla birlikte, normal saptanması fonksiyonel olmayan WASp ekspresyonunu dışlayamayacağından tanınıyı ekarte ettirmez (73). Çalışmamızda 4 hastada akım sitometrisi ile WASp ekspresyonu değerlendirilmiş; 3 hastada normal, yalnızca bir hasta düşük saptanmıştır. Tüm hastalarda genetik analiz yapılmış olup hepsinde *WAS* gen mutasyonu gösterilerek kesin tanıya ulaşılmıştır. X'e bağlı geçişli bir hastalık olması nedeniyle çalışmamızdaki WAS tanısıyla izlenen 20 hastanın hepsi erkekti. Beklendiği üzere en sık başvuru yakınmaları egzama/dermatit (%85) ve tekrarlayan enfeksiyonlar (%55) idi. Tüm hastalarda trombositopeni olup hastaların yaklaşık üçte ikisinde mikrotrombositopeni mevcuttu. Chiang ve ark.'nın (54) genetik tanısı olan 49 WAS hastasında yapmış olduğu değerlendirmede, hastalardan 41'inde WASp ekspresyonunda düşüklük olduğu tespit edilmiştir. Bu oran çalışmamızdakine oranla oldukça yüksektir.

DOCK8 eksikliğinde, akım sitometrisiyle hücre içi DOCK8 ekspresyonunun değerlendirilmesi, bu hastaların çoğunda proteinin olmadığını veya azaldığını gösterir (73). Literatürde, AKİY dışı KİY hastalarında en sık alt grubun DOCK8 eksikliği olduğu saptanmış olup çalışmamızda da benzer şekilde DOCK8 eksikliği (n=20, %23) en sık görülen gruptu (82). Akım sitometrisi ile spesifik molekül ekspresyon analizi yapılan 13 hastadan 12'sinde DOCK8 ekspresyonu düşük, 1 hastada ise normal saptandı. Ancak bazı hastalar normal miktarda ancak fonksiyonel olmayan DOCK8 molekülü eksprese edebileceğinden, kliniği DOCK8 eksikliği ile uyumlu olan hastanın tanısı genetik analiz ile doğrulandı. Daha önce kliniğimizde Haskoğlu ve ark.'nın (83) DOCK8 eksikliği tanısı olan 20 hastada yapmış oldukları çalışmada, 4 hastanın DOCK8 ekspresyonu hem nakil öncesi hem de sonrası akım sitometrisi ile incelenerek tüm hastalarda nakilden sonra T hücrelerinde DOCK8 ekspresyonunda önemli bir artış olduğu tespit edilmişti. Bu da akım sitometrisinin sadece tanıda değil, tedavi sonrası izlemde de yol gösterici olduğunu göstermektedir.

Treg bozukluğu ile seyreden hastalıklardan IPEX'in tanısının fenotipik veya fonksiyonel sitometri aracılığıyla Treg hücrelerinin yokluğu/düşüklüğünün veya FOXP3'teki fonksiyon defektinin gösterilmesiyle konulabileceğinden daha önce bahsetmiştik. Bu gruptaki

diğer 3 hastalığın (LRBA eksikliği, CD25 eksikliği, CTLA-4 eksikliği) tanısında ise spesifik molekül ekspresyon analizi büyük rol oynar. (16). Çalışmamızda LRBA eksikliği tanısı alan 8 hastadan 5'ine akım sitometrisiyle spesifik molekül ekspresyonu ölçülmüş olup 2'sinin LRBA ekspresyonu düşük sonuçlandı. Ancak klinik olarak LRBA eksikliği düşünülen diğer hastalarda da fonksiyonel bozukluk olma ihtimali göz önünde bulundurularak hastaların tanıları genetik analizle doğrulandı. CD25 eksikliği olan hastalarda T hücre proliferasyonunda bozukluk vardır, Treg hücre sayısı normal veya hafif düşük olabilir (13, 16). Çalışmamızda da CD25 eksikliği olan 3 hastanın tümünde IPEX ön tanısıyla CD4+CD25+FOXP3+ analizi yapıldı ve tesadüfen CD25 düşüklüğü saptanan hastalara spesifik molekül ekspresyon analizi yapılarak Treg hücrelerinde CD 25 ekspresyonu yokluğu gösterilerek hastaların kesin tanıları konuldu. Sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) eksikliği olan hastalarda ise, CD4+FOXP3+ T hücrelerinde CTLA-4 ekspresyonu azalmıştır (13, 16). Çalışmamızda CTLA-4 eksikliği tanısı alan bir hasta olup merkezimizde akım sitometrisiyle CTLA-4 ekspresyonu değerlendirilemediğinden hastaya klinik tanı konulmuş ve genetik ile tanı doğrulanmıştır.

Son olarak, XLP1 ve XLP2 kusurlu hücre içi protein ekspresyonu ile seyreden hastalıklara örnek verilebilir. Hem XLP1 (SAP eksikliği) hem de XLP2 (XIAP eksikliği)'nin klinik özellikleri, hemofagositik lenfositosis (HLH) ve hipogamaglobulinemi ile sonuçlanan EBV enfeksiyonuna karşı uygun olmayan immün yanıtı içerir. XLP1 hastaları lenfoma dâhil olmak üzere lenfoproliferatif hastalık ile başvurabilirken, XLP2 hastaları sıklıkla inflamatuvar bağırsak hastalığı ile kendini gösterir. Hücre içi SAP ve XIAP proteinlerindeki azalmanın akım sitometrisi ile gösterilmesi, klinik kriterleri karşılayan hastalarda tanısaldır (13, 16, 44). Çalışmamızda XIAP eksikliği tanısı olan bir hasta vardı. Merkezimizde akım sitometrisi ile lenfositlerde XIAP ekspresyonu değerlendirilemediği için klinik bulguları EBV ilişkili lenfoproliferatif hastalık ile uyumlu olan hastanın kesin tanısı genetik analiz ile konuldu.

Tüm bu yüzey ve hücre içi protein değerlendirmelerinde, protein ekspresyonunun düşük saptanması hastalık tanısını koydururken; normal saptanması fonksiyonel olmayan protein ekspresyonunu dışlayamayacağından tanıyı ekarte ettirmez. Ayrıca bir gendeki fonksiyon kaybına neden olan mutasyon amorfik ise protein sentezini tamamen engellerken; hipomorfik mutasyon proteinin kısmi sentezine izin verebilir.

Belirli fonksiyonel özellikleri değerlendirmek için kullanılan akım sitometrik testler, PİY'lerin teşhisinde faydalı uygulamalardır. Çalışmamızda 836 hastaya fonksiyonel incelemeler yapıldı ve %12'sine (n=101) kesin tanı konuldu. Hastalardan %7,7'sine (n=64)

ise bu yöntemle PİY tanısı olarak kesin tanı için ileri incelemelere yönlendirildi. Daha önce de belirttiğimiz gibi fonksiyonel sitometrinin tanıda önemli olduğu hastalıkların başında bir pediatrik acil olan AKİY gelir. Çalışmamızda da 84 AKİY hastasından %93,2'sine PHA yanıtı ve/veya anti CD3 yanıtında düşüklük saptanarak tanı konulmuştu.

Yaygın olarak kullanılan fonksiyonel testlerden bir diğeri, DHR123 ile granülosit aktivasyonunu takiben oksidatif patlamanın değerlendirilmesidir. DHR123 oksidasyon testi, KGH'nin X'e bağlı veya OR formlarının ve ayrıca X'e bağlı formunun taşıyıcılarının ayırt edilmesini sağlayabilmesi nedeniyle tanıda altın standart yöntemdir. Çalışmamızda KGH tanısıyla izlenen 31 hastanın hepsine akım sitometrisi aracılığıyla DHR123 oksidasyon testinde düşüklük gösterilerek tanı konulmuştur. Kwon ve ark.'nın (50) yaptığı çalışmada da çalışmamıza benzer şekilde hastaların hepsine (n=11) DHR123 oksidasyon testinde neredeyse hiç solunum patlaması aktivitesi olmadığı gösterilerek tanı konulmuştu. OR formlar, X'e bağlı forma kıyasla biraz daha yüksek miktarlarda artık süperoksit aktivitesine sahip olabilir. Bu nedenle OR kusurlarının doğrulanması, NADPH oksidaz kompleksinin membranla ilişkili gp22 veya hücre içi gp47 ve gp67 alt birimlerinin akım sitometrisi aracılığıyla tespiti ile de gerçekleştirilebilir (41, 58, 84).

Familyal hemofagositik lenfohistiyositoz (FHL) ile ilişkili kusurlar genellikle anormal NK hücre fonksiyonu ile ilişkilidir. FHL2, CD56+CD16+ NK hücreleri ve CD8+T hücrelerinde perforin ekspresyonu ve FHL3, trombositlerde Munc13-4 ekspresyonu değerlendirilerek taranabilir. Ayrıca, CD107a'nın NK veya sitotoksik T hücreleri tarafından yüzey ekspresyonunun ölçülmesiyle sitolitik granüllerin salınımının değerlendirilmesi, FHL3'ün tanısında yardımcıdır. Bu testin aynı zamanda granül aracılı sitotoksik yollarda ortak kusurlara sahip olan FHL4, FHL5, Chediak-Higashi sendromu ve Griscelli sendromunun tanısında kullanımı da önerilmektedir (13, 16, 50). Çalışmamızda FHL tanısıyla izlenen 4 hasta olup klinik olarak FHL tanısı alan hastalardan 3'ünde genetik analizde *UNC13D* gen defekti saptanarak FHL3 tanıları konuldu. FHL3 tanısında yol gösterici olan, akım sitometrisi ile trombositlerde Munc13-4 ve CD107a ekspresyon analizi merkezimizde değerlendirilemediği için hastalara akım sitometrik kesin tanı konulamadı. Shabrish ve ark.'nın (85) 2021 yılında yaptığı ve 101 FHL hastanın değerlendirildiği çalışmada perforin ekspresyonu, 50 FHL2 hastasından 40'ında ve 51 FHL3, FHL4 ve FHL5 hastalarından 30'unda akım sitometrisi ile değerlendirilmiş ve FHL2 hastalarından 38'inde (%95) NK hücrelerinde önemli ölçüde daha düşük perforin ekspresyonu olduğu saptanmıştır. CD107a degranülasyon testi ise 50 FHL2 hastasının 20'sinde, 35 FHL3 hastasının 18'inde, 7 FHL4 hastasının 5'inde ve 9 FHL5 hastasının 4'ünde gerçekleştirilmiş olup FHL4 ve FHL5

hastalarının tümünde (%100) ve FHL3 hastalarının %79'unda degranülasyon testi bozuk saptanmıştır. Bu da göstermektedir ki literatürde FHL, çalışmamızın aksine, akım sitometrisi aracılığıyla yüksek tanı alma oranlarına sahiptir.

Mikobakteriyel enfeksiyonlara yatkınlıkla seyreden IL-12 R $\beta$ 1 zincirini etkileyen defekt akım sitometrisi ile değerlendirilebilir, ancak bu protein T hücreleri tarafından yapısal olarak eksprese edilmediğinden sadece T hücresi aktivasyonunu takiben değerlendirilebilir (73). Çalışmamızda *IL12RB1* gen defekti tanısı olan hastalardan birinin tanısı genetik tanı öncesi akım sitometrisiyle CD212 ekspresyon düşüklüğü gösterilerek konulmuştur.

Çalışmamızda literatürdeki mevcut çalışmalardan farklı olarak, bazı PİY alt gruplarının tanı, takip ve tedavisinde avantaj sağladığına inandığımız akım sitometrik tanı tarihi ile genetik analiz sonuç tarihi arasındaki zaman farkı incelenmiştir. Akım sitometri ile genetik tanı arasındaki sürenin 48,6 (0,8-152,8) ay ile en uzun AKİY grubunda ve 3 (0,7-92,4) ay ile en kısa olacak şekilde sendromik KİY grubunda olduğu hesaplandı. Bunun altında yatan nedenin ise genetik analizin rutin olarak yapılmaması, AKİY hastalarının tamamına akım sitometrisiyle tanı konulabilmesi ve sendromik KİY tanısında akım sitometrisinin katkısının sınırlı olması ile bu hastaların tanımlayıcı klinik bulgularının olması nedeniyle spesifik olarak genetik analize yönlendirilmesi olduğunu düşünmekteyiz.

Antikor eksiklikleri grubundaki hastalar hariç neredeyse tüm hastalık alt gruplarının başvuru ile akım sitometrik tanı arasındaki süre ortancası birkaç gün ile sınırlı iken; antikor eksiklikleri grubunda bu süre yaklaşık 8 aydı. Akım sitometrik incelemelerin kesin tanıya götürme oranları AKİY (%100), AKİY dışı KİY (%82,8) ve fagositer sistem fonksiyon bozukluklarında (%95,6) oldukça yüksek iken; sendromik KİY'ler, doğal immün sistem defektleri, kompleman eksiklikleri, otoinflamatuar hastalıklar ve kemik iliği yetmezliklerinde çok düşük ve sadece olası tanısall yönlendirmeler şeklinde idi. Madkaikar ve ark.'nın (41) yapmış olduğu değerlendirmede, son 10 yılda, immünofenotipleme, spesifik protein analizi ve fonksiyonel incelemeler dahil olmak üzere akım sitometrik testler kullanarak 753 PİY hastası teşhis edilmiş ve bu hastaların 319'u moleküler olarak karakterize edilebilmiştir. FHL-2, LAD-I ve KGH'yi akım sitometrisine dayalı analizlerin altta yatan genetik kusur için doğrudan bir ipucu sağladığı PİY'ler olarak saptanmıştır. Ayrıca lenfosit alt kümesi analizi, T hücresi proliferasyonu ve naif T hücresi belirteçleri AKİY hastalarının tanısını koymaya yardımcı olsa da bozukluğa neden olan spesifik genleri tanımlamak için yeterli olmadığı vurgulanmıştır.

Akım sitometrisi PİY tanısındaki öneminin yanı sıra tedavi yanıtını izlemek için de kullanılabilir. HKHN'den sonra immün yapılanmanın değerlendirilmesinde son derece önemlidir. Belirli bir hücre alt kümesinin veya fonksiyonel moleküllerin restorasyonu, başarılı tedavinin kanıtı olabilir (50). Ayrıca, özellikle pozitif aile öyküsüne sahip hastalarda, AKİY, LAD, MHC sınıf II eksikliği ve KGH gibi belirgin ve iyi karakterize edilmiş birçok PİY, 18. gebelik haftasında alınan kordosentez örnekleriyle doğum öncesi teşhis edilebilir. Akım sitometrisi bu hastalıkların doğum öncesi teşhisi için hızlı ve hassas bir tekniktir (86).

Akım sitometrisi, klinik kullanıma girmesinden bu yana çok yol kat etmiştir. Tek renkli analizlerden çok renkli analizlere geçilmiş; maliyet ve verimlilik açısından daha uygun hale getirilmiştir. Öyle ki akım sitometrisi artık tüm dünyada hem klinik hem de araştırma alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. İnceleme sırasında kullanılan belirteç sayılarındaki artış ile laboratuvarlarda neredeyse her türlü belirteç kombinasyonu aynı anda kullanılabileninden, bu durum büyük standartlaştırılmış paneller oluşturmak için yeni bir potansiyel sağlayacaktır (45).

## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

PİY hastalarının tanısında akım sitometrisinin yerini ve önemini değerlendirmeyi amaçlayan bu çalışmada; 2010–2020 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Bilim Dalı'nda PİY tanısı olarak takip edilmiş 1407 hastanın verileri retrospektif olarak değerlendirilmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Tıp alanındaki gelişmeler ile PİY'lerin spektrumu her geçen gün genişlemekte; bu yüzden yalnızca klinik ve geleneksel laboratuvar bulgularına dayanarak PİY tanısı koymak giderek zorlaşmaktadır. Genetik analizler moleküler bir tanının ayırt edilmesini kolaylaştırabilse de patolojik tabloyu immünolojik olarak karakterize etmeye ve moleküler etiyojolojiyi klinik fenotipin yanı sıra fonksiyon ve immünofenotipteki anormalliklerle ilişkilendirmeye şüphesiz ihtiyaç vardır. Akım sitometrisi, son yıllarda kaydettiği ilerlemelerle birlikte, bağışıklık hücrelerinin analizi ve karakterizasyonu için vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Bazı durumlarda, spesifik bir tanıyı koymaya yardımcı olurken, bazen de altta yatan immünolojik kusur hakkında klinik kararları destekleyerek klinik sonucu iyileştirecek faydalı bilgiler sağlamaktadır.
2. Bu çalışmada, 1407 hastanın 996'sına akım sitometrisi incelemeleri yapılmış olup bu hastalardan 229'una (%23) akım sitometrisi ile kesin tanı konuldu. Hasta başvurusu ile akım sitometrik tanı arasında geçen ortalama süre 4 gün olarak hesaplandı. Antikor eksiklikleri grubundaki hastalar hariç neredeyse tüm hastalık alt gruplarının başvuru ile akım sitometrik tanı arasındaki ortalama süresi birkaç gün ile sınırlı iken; antikor eksiklikleri grubunda bu süre yaklaşık 8 aydı. Akım sitometri ile genetik tanı arasındaki sürenin ortalama 48,6 ay ile en uzun AKİY grubunda; 3 ay ile en kısa olacak şekilde sendromik KİY grubunda olduğu hesaplandı. Pediatrik bir acil olan AKİY'de, hastaların %84,6'sına henüz genetik analiz sonuçlanmadan önce akım sitometrisi sonuçları ile tanı konularak nakil yapıldığı görüldü. Tüm bu veriler göstermektedir ki, akım sitometrisi PİY tanısında oldukça hızlı bir yöntemdir. Erken tanı ve henüz morbiditeler gelişmeden yapılan tedavinin prognozda en önemli faktör olduğu bu hastalarda, akım sitometrisi ile konulan erken tanı hayati öneme sahiptir.
3. Akım sitometrisi ile kesin tanı konulma oranları AKİY (%100), fagositer sistem fonksiyon bozuklukları (%95,6) ve AKİY dışı KİY'de (%82,8) oldukça yüksek iken; sendromik KİY'ler, doğal immün sistem defektleri, kompleman eksiklikleri,

otoinflamatuvar hastalıklar ve kemik iliği yetmezliklerinde çok düşük ve sadece olası tanısal yönlendirmeler şeklinde idi. Akım sitometri teknolojisindeki gelişmeler ve artan çalışmalar ile birlikte akım sitometrisinin tanıda sınırlı olduğu hastalık gruplarında da tanı koyma yeteneğinde artma olacağı inancındayız.

4. Özetle, bu retrospektif çalışmada, 10 yıllık sürede, kliniğimizde PİY tanısı alan hastaların yaklaşık 1/4'ünün akım sitometrisi uygulamaları sayesinde erken ve doğru tanıya, genetik inceleme öncesinde hızlıca ulaştırıldığı belirlendi. Akım sitometrisinin, erken tanının küratif tedavi ve prognozda en önemli faktör olduğu PİY hastalıklarında çok değerli bir tanısal araç olduğu objektif veriler ile ortaya konuldu. Daha detaylı ve ileri akım sitometrisi uygulamalarının rutin PİY değerlendirme protokollerine eklenmesi, tanı ve prognozda iyileşmeye katkı sağlayacaktır.



## 9. KAYNAKLAR

1. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clinical Immunology*. 2018; 14(Suppl 2): 61.
2. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A ve ark. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology*. 2020;40(1):24-64.
3. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T ve ark. Human inborn errors of immunity: 2019 update of the IUIS phenotypical classification. *Journal of Clinical Immunology*. 2020; 40 (1): 66-81.
4. Hartog NL, Williams KW, Abraham RS. "The State of the Union": Current and future perspectives on patient-centric care for primary immunodeficiencies and immune dysregulatory diseases. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1783.
5. Yüksek M, İkinciöğullari A, Doğu F, Elhan A, Yüksek N, Reisli I ve ark. Primary immune deficiency disease awareness among a group of Turkish physicians. *Turkish Journal of Pediatrics*. 2010; 52 (4): 372-377.
6. Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *Journal of Clinical Immunology*. 2007; 27 (5): 497-502.
7. 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. *Journal of Clinical Immunology*. 2013; 33 (1): 74-83.
8. İkinciogullari A, Cagdas D, Dogu F, Tugrul T, Karasu G, Haskologlu S ve ark. Clinical features and HSCT outcome for SCID in Turkey. *Journal of Clinical Immunology*. 2019; 39 (3): 316-323.
9. Yorulmaz A, Artaç H, Kara R, Keleş S, Reisli İ. Primer immün yetmezlikli 1054 olgunun retrospektif değerlendirilmesi. *Astım Allerji İmmünoloji*. 2008; 6: 127-134.
10. Baştürk B, Sari S, Aral A, Dalgiç B. Prevalence of selective immunoglobulin A deficiency in healthy Turkish school children. *Turkish Journal of Pediatrics*. 2011; 53 (4): 364-368.
11. Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, Andruszewski K, Abbott JK ve ark. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA*. 2014; 312 (7): 729-738.

12. Illoh OC. Current applications of flow cytometry in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2004; 128 (1): 23-31.
13. Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H ve ark. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergology international*. 2018; 67 (1): 43-54.
14. İkinciöğulları A, Bolkent MG, Güloğlu D. Primer İmmün Yetmezliklerin Tanı ve İzleminde Akan Hücre Ölçer Testlerinin Yeri. In: Deniz G, Yanıkkaya Demirel G, editors. *Akan Hücre Ölçer*. 1. İstanbul: Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık; 2014. p. 111-129.
15. Bilgiç Gazioğlu S. Genel Bilgiler. In: Deniz G, Yanıkkaya Demirel G, editors. *Akan Hücre Ölçer*. 1. İstanbul: Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık; 2014. p. 9-13.
16. Knight V. The utility of flow cytometry for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2019; 41 Suppl 1: 63-72.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier; 2020.
18. Kumar V, Abbas A, Aster J. Diseases of white blood cells, lymph nodes, spleen, and thymus. In: Kumar V, Abbas A, Aster J, editors. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 10 ed. Philadelphia: Elsevier; 2021. p. 583-634.
19. Kumar V, Abbas A, Aster J. Diseases of the immune system. In: Kumar V, Abbas A, Aster J, editors. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 10 ed. Philadelphia: Elsevier; 2021. p. 189-266.
20. Stiehm ER, Johnston RB, Jr. A history of pediatric immunology. *Pediatric Research*. 2005; 57 (3): 458-467.
21. Ochs HD, Hitzig WH. History of primary immunodeficiency diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 12 (6): 577-587.
22. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics*. 1952; 9 (6): 722-728.
23. ESID Registry Network Reporting Tool European Society for Immunodeficiencies: ESID; [<https://cci-reporting.uniklinik-freiburg.de/#/>, erişim tarihi: 26.04.2022]
24. Odek C, Kendirli T, Doğu F, Yaman A, Vatanserver G, Cipe F ve ark. Patients with primary immunodeficiencies in pediatric intensive care unit: outcomes and mortality-related risk factors. *Journal of Clinical Immunology*. 2014; 34 (3): 309-315.

25. Jeffrey Model Foundation; [<https://www.info4pi.org/library/educational-materials/10-warning-signs>, erişim tarihi: 26.04.2022]
26. Fleisher TA. Back to basics: primary immune deficiencies: windows into the immune system. *Pediatrics in Review*. 2006; 27 (10): 363-372.
27. Dur Ö. Primer immün yetmezlik tanısında 10 uyarıcı işaretin önemi: Ankara Üniversitesi; 2015.
28. Arkwright PD, Gennery AR. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1238: 7-14.
29. Kaplan MY, Ozen S, Akcal O, Gulez N, Genel F. Autoimmune and inflammatory manifestations in pediatric patients with primary immunodeficiencies and their importance as a warning sign. *Allergologia et Immunopathologia*. 2020; 48 (6): 701-710.
30. Fischer A, Provot J, Jais JP, Alcais A, Mahlaoui N. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 140 (5): 1388-1393.e8.
31. Cinicola BL, Pulvirenti F, Capponi M, Bonetti M, Brindisi G, Gori A ve ark. Selective IgA deficiency and allergy: a fresh look to an old story. *Medicina (Kaunas)*. 2022; 58 (1).
32. Aytakin C, Tuygun N, Gokce S, Dogu F, İkinciogullari A. Selective IgA deficiency: clinical and laboratory features of 118 children in Turkey. *Journal of Clinical Immunology*. 2012; 32 (5): 961-966.
33. Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D, Khosravi A, Garssen J, Velayati A ve ark. Cancers related to immunodeficiencies: update and perspectives. *Frontiers in Immunology*. 2016; 7: 365.
34. Tanyildiz HG, Dincaslan H, Yavuz G, Unal E, İkinciogulları A, Dogu F ve ark. Lymphoma secondary to congenital and acquired immunodeficiency syndromes at a Turkish pediatric oncology center. *Journal of Clinical Immunology*. 2016; 36 (7): 667-676.
35. Olmez U. Definition and clinical findings of immunodeficiency. *Türkiye Klinikleri Journal of Immunology and Allergy-Special Topics*. 2016; 9 (2): 1-5.
36. Sütçü M, Somer A. Çocuklarda immün yetmezliklere yaklaşım. *Çocuk Dergisi*. 2014; 14 (2): 62-65.
37. Aydoğmuş Ç, Şiraneci R. İmmün yetersizlikte tanısai yaklaşım. *Jinekoloji Obstretrik Pediatri Dergisi*. 2010; 2 (2): 52-54.
38. Baskın K, Doğu F. Primer immün yetmezliklere tanısai yaklaşım. In: Akelma Z, editor. *Pediatric İmmünoloji*. 1. Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitapevleri; 2021. p. 341-346.

39. Sullivan KE, Buckley RH. Immunology. In: Kliegman RM, St Geme JW, Blum NJ, Shah SS, Tasker RC, Wilson KM, editors. Nelson: Textbook of Pediatrics. 21. Philadelphia: Elsevier; 2021. p. 1097-1102.
40. Locke BA, Dasu T, Verbsky JW. Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2014; 46 (2): 154-168.
41. Madkaikar MR, Shabrish S, Kulkarni M, Aluri J, Dalvi A, Kelkar M ve ark. Application of flow cytometry in primary immunodeficiencies: experience from India. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1248.
42. Yanıkkaya Demirel G. Tarihçe. In: Deniz G, Yanıkkaya Demirel G, editors. *Akan Hücre Ölçer*. 1. İstanbul: Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık; 2014. p. 5-8.
43. Olmez U. Laboratory assesment of immunodeficiency. *Turkiye Klinikleri Journal of Immunology and Allergy-Special Topics*. 2016;9(2):50-55.
44. Salzer U, Sack U, Fuchs I. Flow cytometry in the diagnosis and follow up of human primary immunodeficiencies. *EJIFCC*. 2019; 30 (4): 407-422.
45. Abraham RS, Aubert G. Flow cytometry, a versatile tool for diagnosis and monitoring of primary immunodeficiencies. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2016; 23 (4): 254-271.
46. İslamoğlu C, İkinciogulları A. Kombine immün yetmezlikler. In: Akelma Z, editor. *Pediatric İmmünoloji*. 1. Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitapevleri; 2021. p. 346-351.
47. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*. 2008; 74 (5): 261-271.
48. Barzaghi F, Passerini L, Gambineri E, Ciullini Mannurita S, Cornu T, Kang ES ve ark. Demethylation analysis of the FOXP3 locus shows quantitative defects of regulatory T cells in IPEX-like syndrome. *Journal of Autoimmunity*. 2012; 38 (1): 49-58.
49. Gambineri E, Ciullini Mannurita S, Hagin D, Vignoli M, Anover-Sombke S, DeBoer S ve ark. Clinical, immunological, and molecular heterogeneity of 173 patients with the phenotype of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 2411.
50. Kwon WK, Choi S, Kim HJ, Huh HJ, Kang JM, Kim YJ ve ark. Flow cytometry for the diagnosis of primary immunodeficiency diseases: a single center experience. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2020; 12 (2): 292-305.
51. Working definitions for clinical diagnosis of PID: European Society for Immunodeficiencies; [<https://esid.org/Working-Parties/Registry-Working-Party/Diagnosis-criteria>, erişim tarihi: 26.04.2022]
52. Ramalingam TR. Role of flow cytometry in the diagnosis of inborn errors of immunity. *Journal of Pediatric Infectious Disease*. 2022; 17 (1): 1-10.

53. Freyer DR, Gowans LK, Warzynski M, Lee WI. Flow cytometric diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome: application of an accurate and convenient procedure. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2004; 26 (6): 363-370.
54. Chiang SCC, Vergamini SM, Husami A, Neumeier L, Quinn K, Ellerhorst T ve ark. Screening for Wiskott-Aldrich syndrome by flow cytometry. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018; 142 (1): 333-335.e8.
55. Haskaloğlu ZŞ, Köstel Bal S, İslamoğlu C, Baskın AK, Beşli Çelik D, Aytekin C ve ark. Lökosit adezyon defekti (tip I ve tip III) tanısıyla izlenen 14 hastanın klinik, immünolojik özellikleri ve tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi. *Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi*. 2020; 14 (4): 286-294.
56. Almarza Novoa E, Kasbekar S, Thrasher AJ, Kohn DB, Sevilla J, Nguyen T ve ark. Leukocyte adhesion deficiency-I: A comprehensive review of all published cases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2018; 6 (4): 1418-1420.e10.
57. Aytekin C, İkinciogulları A. Lökosit adezyonu ve lökosit adezyon defekti sendromları. *Astım Allerji İmmünoloji*. 2004; 2 (3): 157-66.
58. Ma CS, Tangye SG. Flow cytometric-based analysis of defects in lymphocyte differentiation and function due to inborn errors of immunity. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 2108.
59. El Hawary R, Meshaal S, Deswarte C, Galal N, Abdelkawy M, Alkady R ve ark. Role of flow cytometry in the diagnosis of chronic granulomatous disease: the Egyptian experience. *Journal of Clinical Immunology*. 2016; 36 (6): 610-618.
60. İkinciogulları A, Kendirli T, Dogu F, Egin Y, Reisli I, Cin S ve ark. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *Turkish Journal of Pediatrics*. 2004; 46 (2): 125-30.
61. Takashima T, Okamura M, Yeh TW, Okano T, Yamashita M, Tanaka K ve ark. Multicolor flow cytometry for the diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Journal of Clinical Immunology*. 2017; 37 (5): 486-495.
62. Lougaris V, Pession A, Baronio M, Soresina A, Rondelli R, Gazzurelli L ve ark. The Italian registry for primary immunodeficiencies (Italian Primary Immunodeficiency Network; IPINet): twenty years of experience (1999-2019). *Journal of Clinical Immunology*. 2020; 40 (7): 1026-1037.
63. El-Helou SM, Biegner AK, Bode S, Ehl SR, Heeg M, Maccari ME ve ark. The German national registry of primary immunodeficiencies (2012-2017). *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1272.

64. Al-Herz W, Al-Ahmad M, Al-Khabaz A, Husain A, Sadek A, Othman Y. The Kuwait national primary immunodeficiency registry 2004-2018. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1754.
65. Mellouli F, Mustapha IB, Khaled MB, Besbes H, Ouederni M, Mekki N ve ark. Report of the Tunisian registry of primary immunodeficiencies: 25-years of experience (1988-2012). *Journal of Clinical Immunology*. 2015; 35 (8): 745-753.
66. Shillitoe B, Bangs C, Guzman D, Gennery AR, Longhurst HJ, Slatter M ve ark. The United Kingdom primary immune deficiency (UKPID) registry 2012 to 2017. *Clinical and Experimental Immunology*. 2018; 192 (3): 284-291.
67. Altun D, Akpınar M, Haskoloğlu ZŞ, Köste Bal S, Kavgacı A, Doğu EF ve ark. İmmünglobulin izotip eksikliği ile allerjik hastalıkların birlikteliği. *Astım Allerji İmmünoloji*. 2016; 14 (3): 164-169.
68. Michos A, Raptaki M, Tantou S, Tzanoudaki M, Spanou K, Liatsis M ve ark. Primary immunodeficiency diseases: a 30-year patient registry from the referral center for primary immunodeficiencies in Greece. *Journal of Clinical Immunology*. 2014; 34 (7): 836-843.
69. Aghamohammadi A, Rezaei N, Yazdani R, Delavari S, Kutukculer N, Topyildiz E ve ark. Consensus Middle East and North Africa registry on inborn errors of immunity. *Journal of Clinical Immunology*. 2021; 41 (6): 1339-1351.
70. Vignesh P, Rawat A, Kumrah R, Singh A, Gummadi A, Sharma M ve ark. Clinical, immunological, and molecular features of severe combined immune deficiency: a multi-institutional experience from India. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 619146.
71. Shahbazi Z, Yazdani R, Shahkarami S, Shahbazi S, Hamid M, Sadeghi-Shabestari M ve ark. Genetic mutations and immunological features of severe combined immunodeficiency patients in Iran. *Immunology Letters*. 2019; 216: 70-78.
72. Bayram O, Haskologlu S, Bayrakoğlu D, Bal SK, Islamoglu C, Cipe FE ve ark. Single-center study of 72 patients with severe combined immunodeficiency: clinical and laboratory features and outcomes. *Journal of Clinical Immunology*. 2021; 41 (7): 1563-1573.
73. Fleisher TA, Madkaikar M, Rosenzweig SD. Application of flow cytometry in the evaluation of primary immunodeficiencies. *Indian Journal of Pediatrics*. 2016; 83 (5): 444-449.
74. Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G ve ark. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002; 99 (5): 1544-1551.

75. Hauck F, Bangol B, Rakhmanov M, Klein H-G, Klein C. Rational laboratory diagnostics of primary immunodeficiency disorders. *Journal of Laboratory Medicine*. 2015; 39: 343-354.
76. Bride K, Teachey D. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. *F1000Res*. 2017; 6: 1928.
77. Cerinic CM, Mendonca LO, Miano M, Ternaova P, Casabona F, Bustaffa M ve ark. Early diagnosis of the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in patients with undefined autoinflammatory or autoimmune disorders: the practical role of a flow cytometry panel. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2020; 79 (1): 489.
78. Aluri J, Gupta M, Dalvi A, Mhatre S, Kulkarni M, Hule G ve ark. Clinical, immunological, and molecular findings in five patients with major histocompatibility complex class II deficiency from India. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 188.
79. Ouederni M, Vincent QB, Frange P, Touzot F, Scerra S, Bejaoui M ve ark. Major histocompatibility complex class II expression deficiency caused by a RFXANK founder mutation: a survey of 35 patients. *Blood*. 2011; 118 (19): 5108-5118.
80. Wolach B, Gavrieli R, Wolach O, Stauber T, Abuzaitoun O, Kuperman A ve ark. Leucocyte adhesion deficiency-a multicentre national experience. *European Journal of Clinical Investigation*. 2019; 49 (2): e13047.
81. van de Vijver E, van den Berg TK, Kuijpers TW. Leukocyte adhesion deficiencies. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2013; 27 (1): 101-116, viii.
82. Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, Freeman AF, Jing H, Favreau AJ ve ark. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361 (21): 2046-2055.
83. Haskologlu S, Kostel Bal S, Islamoglu C, Aytekin C, Guner S, Sevinc S ve ark. Clinical, immunological features and follow up of 20 patients with dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2020; 31 (5): 515-527.
84. Marciano BE, Zerbe CS, Falcone EL, Ding L, DeRavin SS, Daub J ve ark. X-linked carriers of chronic granulomatous disease: Illness, lyonization, and stability. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018; 141 (1): 365-371.
85. Shabrish S, Kelkar M, Yadav RM, Bargir UA, Gupta M, Dalvi A ve ark. The spectrum of clinical, immunological, and molecular findings in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: experience from India. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 612583.
86. Yadav RM, Gupta M, Dalvi A, Bargir UA, Hule G, Shabrish S ve ark. Prenatal diagnosis for primary immunodeficiency disorders-an overview of the Indian scenario. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 612316.