



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

PRİMER İMMÜN YETMEZLİK HASTALIKLARININ PCR İLE YENİDOĞANLARDA TARAMA İLE ERKEN TEŞHİSİ

DOKTORA TEZİ

Medine KARADAĞ ALPASLAN

**Samsun
Temmuz-2018**



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

PRİMER İMMÜN YETMEZLİK HASTALIKLARININ PCR İLE YENİDOĞANLARDA TARAMA İLE ERKEN TEŞHİSİ

DOKTORA TEZİ

Medine KARADAĞ ALPASLAN

Danışman
Prof. Dr. M. Gönül OĞUR
II. Danışman
Prof. Dr. Alişan YILDIRAN

Samsun
Temmuz-2018

TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD'na geldiğimden beri benden her türlü desteğini esirgemeyen, hem bilimsel hem akademik anlamda yanımda olan OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD başkanı değerli danışman hocam Prof. Dr. M. Gönül OĞUR'a,

Bu tezin hazırlanmasında büyük rolü ve emeği olan, çalışmalarımın her anında desteğini ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen, sunduğu bilimsel destek ve kıymetli önerileriyle örnek alacağım danışman hocam OMÜ Tıp Fakültesi Çocuk İmmünolojisi ve Allerji Bilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Alişan YILDIRAN'a,

Çalışmaların yürütülmesinde her açıdan bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, paylaşılan ve destek olan sevgili hocam OMÜ Tıp Fakültesi Neonatoloji Bilim dalı başkanı Prof. Dr. Canan AYGÜN'e,

Tezime sunduğu öneri ve katkılarından dolayı OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bilim dalı başkanı Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e,

Tezin işleyişi esnasında benden bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Şeyhan KUTLUĞ'a, yardımlarından dolayı Uzm. Dr. S. Elif ÖZYAZICI ÖZKAN'a, Uzm. Dr. Didem C. YEŞİLIRMAK'a, ilk demo çalışmasını gelip laboratuvarımızda uygulayan Dr. Stephane BORTE'e, doktora eğitimim boyunca yanımda olan değerli arkadaşlarım Melek YÜCE, Elza BALAKİŞİYEVA ve Şükran KOÇ ALAÇAM'a, tüm OMÜ Tıbbi Genetik-Çocuk Genetik ailesine,

Son olarak desteklerini ömür boyu arkamda hissettiğim ve hissedeceğim sevgili annem, babam ve kardeşlerime, daha da önemlisi varlığıyla beni hep motive eden çok sevdiğim biricik eşim Emre ALPASLAN'a, hayatımın küçük filizleri canlarım, oğullarım Samet Furkan ALPASLAN ve Umut Çınar ALPASLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez desteğim, umudum, dünüm, bugünüm ve yarınım olan annem, babam, kardeşlerim ile benim için mutluluğun resmi olan canım eşim ve çocuklarıma ithaf edilmiştir.

Bu çalışma MZM Sağlık Ürünleri ve Laboratuvar Hizmetleri Sanayi ve Ticaret LTD. ŞTİ. tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

PRİMER İMMÜN YETMEZLİK HASTALIKLARININ PCR İLE YENİDOĞANLARDA TARAMA İLE ERKEN TEŞHİSİ

Amaç: Primer immün yetmezlikler (PİY) 300’den fazla çeşidi olan heterojen bir hastalık grubudur. Yenidoğan taramalarında kullanılan Wilson-Jugner kriterlerini karşılayan PİY hastalıkları birçok ülkede tarama programlarına dâhil edilmektedir. Türkiye gibi akraba evliliklerinin sık görüldüğü ülkelerde PİY hastalıklarının insidansı mutlaka bilinmelidir. Bu çalışmada; TRECs ve KRECs biyobelirteçleri kullanılarak yenidoğanlarda PİY taranması amaçlandı.

Materyal ve Metot: Bu çalışmaya Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Medikalpark Samsun Hastanesinde Ekim-2015 ve Aralık-2016 tarihleri arasında dünyaya gelen ve ailelerinden muvafakat formu alınan tüm yenidoğanlar dâhil edilmiştir. Yenidoğandan alınan topuk kanlarından elde edilen DNA’dan Real-Time çoklu PCR metodolojisi ile TRECs ve KRECs kuantifikasyonu yapılmıştır.

Bulgular: Toplam 1960 kan örneği çalışıldı. Patolojik olan 75 yenidoğan retrospektif olarak değerlendirildi. Bunlardan preterm ya da çoklu gebelik olan 16, eksternal kontrol (daha önceden teşhisi konulan PİY’li hastalar) 4 idi. Ulaşılamayan 35 yenidoğan değerlendirmeden çıkarıldı. Kalan 20 yenidoğanın bulguları ile şüpheli primer immün yetmezlik oranı yüzde bir olarak belirlendi.

Sonuç: Türkiye’de ilk defa yapılan bu yerel çalışma, şüpheli primer immün yetmezlik oranını %1 gibi çok yüksek bir oranda bulunmasından dolayı bu testin yenidoğan tarama programına dahil edilmesinin gerekliliği, sendromik bebeklerde immünolojik değerlendirmenin önemi ve böyle bir saha çalışmasında rastlanabilecek güçlükler ve öneriler vurgulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: KRECs; Primer immün yetmezlikler; TRECs; Yenidoğan tarama testleri

Medine KARADAĞ ALPASLAN, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz-2018

ABSTRACT

EARLY DIAGNOSIS OF PRIMARY IMMUNE DEFICIENCY DISEASES BY SCREENING WITH PCR IN NEWBORNS

Aim: Primary immunodeficiencies (PIDs) are heterogeneous group of diseases with more than 300 types. PID diseases that meet the Wilson-Jugner criteria for newborn screening have been included in screening programs in many countries. The incidence of PID disorders must be known especially in countries in which consanguineous marriages are frequent such as Turkey. In this study, it is aimed to perform neonatal PIDs screening by using biomarkers such as TRECs and KRECs.

Material and Method: All newborns born in Samsun Ondokuz Mayıs University Medical Faculty Hospital and Medikalpark Samsun Hospital between October-2015 and December-2016 were included in this study. Consent forms were signed by newborns' parents. DNA was extracted from the heel blood samples of newborns and then TRECs and KRECs were quantified by multiplex real-time PCR methodology.

Results: A total of 1960 blood samples were studied. Seventy-five newborns that found pathological were evaluated. Of them 16 were preterm or multiple pregnancies, 4 external control (PIY patients with previous diagnosis). Unreachable 35 newborns were excluded from the study. The findings of 20 newborns were demonstrated. The suspicious primary immunodeficiency rate was determined as 1%.

Conclusion: This local study conducted for the first time in Turkey illustrated that suspicious PIDs rate was found as 1%. On this basis TRECs-KRECs screening test should be included in newborn screening test in Turkey. The importance of immunological evaluation in syndromic infants is also were emphasized. Furthermore, the difficulties that may be encountered in such a field study and recommendations were mentioned.

Keywords: KRECs; Newborn screening tests; Primer immunodeficiency; TRECs

**Medine KARADAĞ ALPASLAN, PhD Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, July-2018**

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACTB	: β -aktin
ADA	: Adenozin deaminaz
B7	: Biyotin
BTK	: Bruton tirozin kinaz
CFTR	: Kistik fibröz transmembran konduktans regülatör
CGD	: Kronik granüloamatöz hastalık
CHARGE	: Koloboma, kalp anomalisi, kohanal atrezi, retardasyon, genital ve kulak anomalileri
CLOVES	: Konjenital lipomatoz, aşırı büyüme, vasküler malformasyon, epidermal nevi, spinal/iskelet anomalileri ve/veya skolyoz
CRP	: C-reaktif protein
D	: Çeşitli
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DOCK8	: Sitokinez 8 belirteci
ECC	: Ektodermal dizplazi, ektodaktili ve yarıklanma
EDA	: Anhidrotik ektodermal displazi
EDA-ID	: Ektodermal dizplazi ilişkili immün yetmezlik
FACS	: Floresan aktive edilmiş hücre sıralama
FAM	: Fluorescein amidite
FKÜ	: Fenilketonüri
HIV	: İnsan immünyetmezlik virüsü
HLA	: İnsan lökosit antijeni
HSCT	: Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
Ig	: İmmünoglobulin
IGK	: Ig hafif kappa zincir genleri
IGKC	: IGK lokusu sabit K-gen segmenti
IRT	: İmmün reaktif tripsinojen
ITP	: İmmün trombositopenik purpura
IUIS	: Uluslararası İmmün Yetmezlik Derneği
IVIG	: İntravenöz İmmünoglobulin
J	: Katılım

Kde	: K-silici element
KRECs	: Kappa silici rekombinasyon ekzisyon halkaları
L	: Lider
MHC	: Major Doku Uygunluk Kompleksi
NED	: 1-Naphthyl ethylenediamine
NFQ	: Nonfluorescent quencher
NGS	: Yeni nesil dizileme
NK HÜCRE	: Natural killer (doğal katil) hücresi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PİY	: Primer immün yetmezlikler
RAG1	: Rekombinasyon aktive edici gen-1
RAG2	: Rekombinasyon aktive edici gen-2
ROX	: 6-Carboxyl-X-Rhodamine
RSS	: Rekombinasyon sinyal dizileri
SCID	: Ağır kombine immün yetmezlik
SPSS	: Sosyal bilimler için istatistik programı
TAR	: Trombositopeni ve önkol kemiği eksikliği
TCR	: T hücre reseptörü
TdT	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
TRECs	: T-hücre reseptör ekzisyon halkaları
TSH	: Troid stimulan hormon
V	: Değişken
VIC	: 2'-chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein
WAS	: Wiskott Aldrich Sendromu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XLA	: X-bağlı agammaglobulinemia

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vis
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarama Testleri	3
2.1.1. Yenidoğan Taraması	4
2.2. Kanın Hücresel Bileşenleri	6
2.2.1. Kemik İliği ve Timusta Lenfositlerin Üretilmesi	7
2.2.2. V(D)J Rekombinasyonu	8
2.2.3. B Hücre İmmünoglobulin Zincir Rekombinasyonları	9
2.2.4. T Hücre Reseptör Yeniden Düzenlenimleri	10
2.2.5. Mekanizma	11
2.3. TRECs ve KRECs	14
2.4. Primer İmmün Yetmezlikler	18
2.4.1. Tarihçe	19
2.4.2 Sınıflandırma	20
2.4.3. Epidemiyoloji	20
2.4.4. Teşhis	21
2.4.5. Hastalık Geçmişi ve Fiziksel Muayene	22
2.4.6. Laboratuvar İncelemeleri	22
2.4.7. PİY Hastalıklarının Taranması	23
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. Çalışma Popülasyonu ve Örnek Toplama	30
3.2. Topuk Kanlarından DNA Saflaştırılması	31
3.3. Real-Time Kuantitatif Multipleks PCR	32
3.4. Kalite Kontrolleri	34
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	35
3.6. Sonuçların Yorumlanması	38

4. BULGULAR	43
4.1. Örneklerin Klinik ve Demografik Özellikleri	43
4.2. Veriler	43
4.3. Verilerin İstatiksel Testlerle Değerlendirilmesi	50
4.3.1. Term ve Preterm Yenidoğanların Karşılaştırılması.....	50
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	61
EKLER	69
ÖZGEÇMİŞ	77



1. GİRİŞ

Yenidoğan tarama programları tüm dünyada gerek gelişmiş gerekse gelişmekte olan ülkelerde uygulanan halk sağlığı programları içerisinde çok önemli bir yeri olan koruyucu sağlık hizmetlerinden biridir. Yenidoğanların tedavi edilebilir hastalıklar açısından taranması hastalığa erken müdahale etme ve sağ kalımı artırma açısından önemlidir (Chan ve Puck, 2005).

Primer immün yetmezlikler (PİY) 300'den fazla çeşidi olan heterojen bir hastalık grubudur. Kliniği hafif bulgulardan hayati tehlikeye varan bulgulara kadar değişkenlik gösterir. Yenidoğan döneminde bu hastalıkların erken teşhisi çok önemlidir ve tüm dünya bu konuda büyük gayret sarf etmektedir.

PİY hastalıklarının ağır formları için etkili tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Agammaglobülinemia için immünoglobülin replasmanı, ağır kombine immün yetmezlik (SCID) için hematopoetik kök hücre transferi (HSCT) ya da gen terapisi gibi tedavi edici yöntemler mevcuttur. Hastalıkların erken tanı alması tedavi ve önleyici yaklaşımlar hastaların yaşam kalitesini artırıp hayatta kalma sürelerini uzatır (Olbrich ve ark., 2014).

Yenidoğanların aşı yapılmadan önce teşhisi, aşı nedeniyle hastalanmalarından ötürü ayrıca önemlidir. Bu nedenle, doğumdan sonra yapılan yenidoğan tarama programları ile uyumlu olarak, topuk kanından alınan birkaç damla kan ile yapılabilen bir tetkike ihtiyaç vardır. Bu tetkiklerin ucuz, güvenilir ve hızlı olması da gereklidir.

T-hücre reseptör ekzisyon halkaları (TREC's) ve Kappa silici rekombinasyon ekzisyon halkaları (KREC's), T ve B hücrelerin timus ve kemik iliğindeki olgunlaşma sürecinde üretilen dairesel deoksiribo nükleik asit (DNA) parçacıklarıdır. Gutrie kâğıdına alınan topuk kanından real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) metodu ile bu DNA parçacıklarının sayısına bakılabilmektedir. Sayıların yetersiz bulunması PİY hastalıklarını düşündürür. Örneğin, KREC's biyobelirteci X-bağlı agammaglobulinemia (XLA) hastalarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Olbrich ve ark., 2014).

Primer immün yetmezliklerin ülkemizde erken teşhisi ile gereksiz tetkik ve uzayan komplikasyonların önleneceğini düşünmekteyiz. Bu şekilde ülke ekonomisine katkı sağlanacaktır. Üstelik ülkemizde primer immün yetmezlikler batılı ülkelere göre daha sık görülmektedir.

Bu çalışma ile Türkiye'de daha önce hiç yapılmamış bir testi kullanarak yenidoğanlarda PİY taraması yapmak ve sıklığını belirlemek amaçlanmaktadır. Bunun

için yenidoğanlardan tarama testleri için örnek alınırken ayrı bir Gutrie kâğıdına birkaç damla daha topuk kanı alınıp, elde edilen DNA'lerden real time PCR ile TRECs ve KRECs kopya sayılarına bakılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarama Testleri

Tarama testleri; herhangi bir belirti oluşmadan spesifik bir hastalığı tanımlayabilen testlerdir. Bu testler sayesinde spesifik bir hastalığın gelişme olasılığı ve riskleri hakkında bilgi sahibi olunur. Bu testlerin diğer bir faydası ise taranacak hastalığın erken ve tedavi edilebilir evrelerini saptamayabilmesidir. Çünkü hastalık geliştikten sonra yapılan çoğu tedavi hastalığı iyileştirici değil semptomlarını hafifleştirici yöndedir. Son olarak tarama testleri pozitif olan vakalar ikinci bir test ile desteklenmelidir. Çünkü tarama testleri birer tanı testi değildir. Dolayısıyla yapılacak ikinci test tanıda daha hassas olmalıdır. Tarama testleri erişkin, yenidoğan ve prenatal gruplara ayrılabilir. Erişkinlere uygulanan tarama testleri yaklaşık 30 yaş sonrasında yapılan kanser tarama testleri olup meme, kolon, rahim ağzı ve prostat kanseri taramalarıdır. Prenatal taramalar ise gebeliğin belli haftalarında yapılan taramalardır (Özaltun ve ark., 2015; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Public Health England).

Her ülke kendi standartlarına göre bir tarama paneli oluşturmaktadır. Bu panellere yeni testlerin eklenmesinden önce ele alınması gereken pek çok bilimsel, teknik, etik ve politika sorunları vardır. Genel olarak, tarama programına bir hastalığı dâhil etmek için benimsenen ortak Wilson-Jungner kriterleri şunlardır:

1. Taranacak hastalık önemli bir sağlık problem olmalı
2. Hastalık tanı aldığında kabul edilmiş bir tedavi yöntemi olmalı
3. Tanı ve tedavi için uygun imkânlar olmalı
4. Hastalığın latent ya da erken semptomlarının olduğu faz olmalı
5. Hastalık için uygun testler olmalı
6. Test popülasyon tarafından kabul edilebilir olmalı
7. Hastalık hakkında detaylı bilgi sahibi olunmalı
8. Kimlerin tedavi edileceği ile ilgili fikir birliği olmalı
9. Hastalığın erken tanısı ekonomik açıdan karlı olmalı
10. Tarama programı devamlı olmalı (hastalık bitmemeli) (Wilson ve Jungner, 1968).

2.1.1. Yenidoğan Taraması

1958'de, 15 aylık bir kıza, potansiyel olarak hayatı tehdit eden ve metabolik bir hastalık olan fenilketonüri (FKÜ) teşhisi konulmuş, birkaç yıl sonra bu kızın amcası bir Amerikan mikrobiyoloğu olan Dr. Robert Guthrie, bakteriyel inhibisyon analizi ve kurutulmuş kan numuneleri kullanarak FKÜ için kitle taramasının fizibilitesi üzerine bir makale yayınlamıştır. Bu yenilik, yenidoğan taramasının başlangıcı olarak kabul edilmiştir. Son 60 yılda, yenidoğan tarama programı çok başarılı olmuştur ve binlerce çocuk, doğuştan gelen metabolik bozuklukların, konjenital endokrinopatilerin, hemoglobinoopatilerin ve diğer genetik bozuklukların zorlu, rahatsız edici etkilerinden korunmuştur. Dünya genelinde birçok ülke yenidoğan taramasını zorunlu kılmıştır (Usha ve Ranjan, 2010).

Yenidoğan taramalarının amacı yenidoğanlarda pre-septomatik olan; ancak potansiyel olarak ciddi ve ölümcül olabilen hastalıkların bu dönemde tanı alıp, başarılı bir şekilde tedavi edilip, hastalık oranı ve ölüm sayısını azaltmaktır. Yenidoğan taraması ilk defa 1960'lı yılların başında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) halk sağlığı programına dâhil edilip dünyaya yayılmıştır. 1963'den sonra yenidoğan taraması hızla ilerlemiştir; çünkü bu dönemde Guthrie ve Susi filtre kâğıdındaki kuru kan örneklerinin postnatal dönemde kullanılarak fenilketonüri bozukluğu bulunmuştur. Son zamanlarda geliştirilen tekniklerle yenidoğan taramalarında çok sayıda hastalık taranabilmektedir (Chiarini ve ark., 2013).

Yenidoğan taramaları, akraba evliliğinin dünyadaki diğer bölgelere göre yüksek olduğu ve buna bağlı olarak kalıtsal hastalıkların arttığı Türkiye gibi ülkelerde ayrıca önemlidir.

Türkiye'de yenidoğanlara uygulanan 3 farklı tarama programı vardır. Bunlar Yenidoğan İşitme Programı, Yenidoğan Tarama Programı (Konjenital hipotiroidi, Fenilketonüri, Biyotidinaz eksikliği, Kistik Fibrozis) ve Gelişimsel Kalça Displazisi Erken Tanı ve Tedavi Programı şeklindedir (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu).

Yenidoğan Tarama Programı

Türkiye'de uygulanan yenidoğan tarama programları aşağıda açıklanmış olup Tablo 1'de özetlenmiştir.

I.Fenilketonüri: Türkiye’de ilk defa 1986 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Sağlık Bakanlığı işbirliği ile fenilketonüri tarama programı 7 il merkezinde başlatılmış, ardından 26 il merkezinde uygulanmaya başlanmıştır. 1990 yılında ise tarama programı bütün il merkezlerini kapsayacak şekilde genişletilmiştir. FKÜ doğuştan gelen bir enzim eksikliği olup otozomal resesif geçişlidir. Türkiye FKÜ’nün sık görüldüğü bir ülkedir. Sıklığı dünyada 1/15.000, ülkemizde ise yaklaşık 1/2600’dir. Taşıyıcı sıklığı dünyada 1/50, ülkemizde 1/25’dir. Bu hastalık çocukta ağır zekâ geriliğine neden olmaktadır. Tedavisinde uygulanan diyet ile hayat boyu sağlıklı bir yaşam sürülebilir. Tarama testi için ilk 72 saat içinde alınan topuk kanından fenilalanin düzeyine bakılır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu).

II. Doğumsal Hipotiroidi: Doğumsal hipotiroidinin ülkemizde görülme sıklığı 1/1.800-3.800 arasındadır. Tedavi edilmeyen olgularda başta zekâ geriliği olmak üzere boy kısalığı ve gelişme geriliği gibi birçok sorunlar görülür. Tedavisi ise ömür boyu hormon replasman terapisisidir. Tarama testi için ilk 72 saat içinde alınan topuk kanından troid stimulan hormon (TSH) değerine bakılır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu).

Tablo 1. Türkiye’de yenidoğan tarama programında yapılan testler

Tarama Testinin adı	Sıklığı	Örnek Zamanı ve Tipi	Bakılan Parametre	Tedavi Yöntemi
Fenilketonüri	1/2600	İlk 72 saat- Topuk kanı	Fenilalanin	Diyet
Doğumsal Hipotiroidi	1/1.800-3.800	İlk 72 saat- Topuk kanı	TSH	Hormon Replasmanı
Biyotidinaz Eksikliği	1/11.000	İlk 72 saat- Topuk kanı	Biyotin	Biyotin Vitamini
Kistik Fibrozis	1/3000	İlk 72 saat- Topuk kanı	IRT	Semptomatik İlaçlar

III. Biyotidinaz Eksikliği: Biyotidinaz enziminin eksikliğine bağlı olarak biyotin (B7) vitamininin işlenmesinde görülen bozukluktur. Türkiye’ de biyotidinaz enzim eksikliğinin görülme sıklığı dünya ortalamasının yaklaşık 8 katı olup, bu rakam yenidoğanlarda 1/11.000 olarak bildirilmiştir. Biyotidinaz eksikliği erken dönemde

görme ve işitme kaybına, kas koordinasyon bozukluğuna neden olur. Geç dönemde ise zihinsel gerilik, koma ve ölüme neden olur. Tarama programı için ilk 72 saat topuk kanından biyotin seviyesine bakılır. Tedavisinde ise biyotin vitamini oral olarak verilir (Baykal ve ark., 1998; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu).

IV. Kistik Fibrozis: Kistik fibrosis, kistik fibröz transmembran konduktans regülatör (CFTR) genindeki mutasyonlara bağlı olarak klor kanallarında meydana gelen bozukluk olarak tanımlanır. Ülkemizdeki görülme sıklığı 1/3.000 olarak belirlenmiştir. Tarama programına en son katılan hastalıktır (01.01.2015). Taraması ilk 72 saatte alınan topuk kanından IRT ile yapılır (Özaltun ve ark., Türkiye Halk Sağlığı Kurumu).

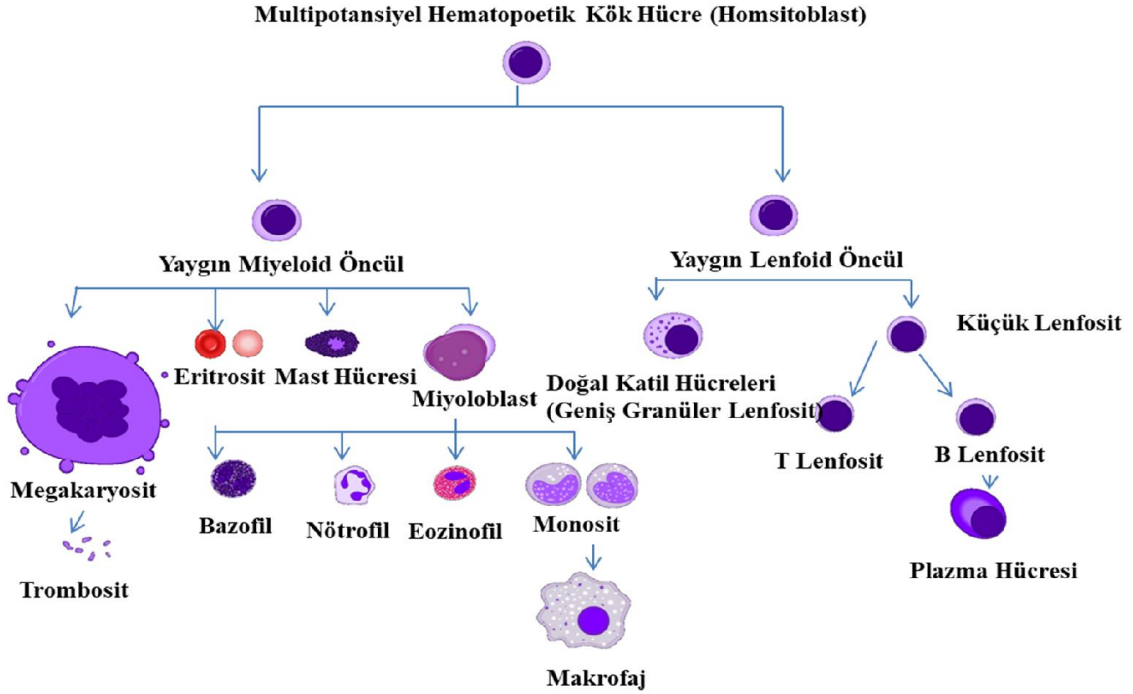
Amerika’da yenidoğan taraması esnasında 29 genetik bozukluğa bakılabilmektedir. Bunlar konjenital sağırılık, kan hücresi bozuklukları (orak hücre anemisi, HB S/beta talasemi), yenidoğan aminoasit metabolizma bozukluğu (trozinemia 1, arjino süksinik asidüri, sitrulinemia, fenilketonüri, maplesyrupürine hastalığı ve homosistinüri), yenidoğan organik asit metabolizma bozukluğu (glutarik asidemi tip 1, hidroksimetilglutarilliyaz eksikliği, metil-malonil-CoA mutaz eksikliği, metilmalonikasidüri, cbIA ve cbIB formları, beta-ketotiolaz eksikliği, propionik asidemi ve multipl-CoA karboksilaz eksikliği), yenidoğan yağ asidi metabolizma bozukluğu (uzun-zincir hidroksiaçıl-CoA dehidrogenaz eksikliği, orta-zincir açıl-CoA dehidrogenaz eksikliği, çok-uzun-zincir açıl-CoA dehidrogenaz eksikliği, trifonksiyonel protein eksikliği, ve karnitin alma bozukluğu) değişik multisistemik hastalıklar (kistik fibrozis, konjenital hipotroidizm, biotinaz eksikliği, konjenital adrenal hiperplazi, ve klasik galaktozemi). Bunlara ilaveten ABD’de farklı eyaletlerde genişletilmiş tarama testleri uygulanmaktadır ki bazı programlarda 50 parametre bakılabilmektedir. Avrupa’da bazı ülkeler 1 ya da 2 parametre tararken bazıları ise onlarca parametreye bakmaktadır. İtalya’da bölgeler arası bile farklılıklar vardır (Chiarini ve ark., 2013).

Yenidoğan taramalarının büyük bir çoğunluğu topuk kanından çalışılmaktadır. Bu şekilde tek bir örnek ile birden çok parametre çalışılabilmektedir.

2.2. Kanın Hücresel Bileşenleri

Kanın hücresel bileşenleri eritrositler (kırmızı kan hücreleri), lökositler (beyaz kan hücreleri) ve trombositleri içerir. Normal insan kanında 4,8 – 5,2 milyon eritrosit / μ l ve 4000 - 10.000 lökosit / μ l bulunur. Lökositler boyanırlarken morfolojik ve renk

özelliklere göre beş sınıfa ayrılır. Lökositlerin beş sınıfı şunlardır: Nötrofiller (% 40 -% 75), eozinofiller (% 1-% 6), bazofiller (% 1'den az), monositler (% 2 -% 10) ve lenfositler (% 20-45) {%25 B Hücre %75 T Hücre} (Şekil 1).



Şekil 1. Kanın hüresel bileşenleri (National Cancer Institute, 2009)

2.2.1. Kemik İliği ve Timusta Lenfositlerin Üretilmesi

Memelilerdeki lenfosit gelişmesinin büyük bir kısmı merkezi lenfoid organların özel ortamlarında; B hücreleri için kemik iliğinde (fetüste karaciğer) ve T hücreleri için timusta olur. Fetüste ve erken erişkin dönemde, bu dokular yeni lenfosit kaynağıdır. Olgun bireylerde timusta yeni T hücrelerinin gelişimi yavaşlar ve merkezi lenfoid organların dışındaki olgun T hücrelerinin bölünmesiyle T hücre sayıları korunur. Öte yandan yeni B hücreleri, yetişkinlerde kemik iliğinden sürekli olarak üretilir (Janeway ve ark., 2001).

Antijen reseptör genlerinin somatik yeniden düzenlenmesi ile düzenlenen lenfosit gelişimi, özel ortamlarda oluşur: Bazı temel ilkeler, öncül hücrelerin antijen spesifik reseptörleri (immüoglobulinler ve T-hücre reseptörleri) eksprese eden B veya T hücrelerine dönüştüğü süreç için geçerlidir. Hem insanlarda hem de farelerde lenfosit farklılaşma süreci düzenli aşamalarda gerçekleşir. Bunlar antijen-reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesinde ve diğer hücreye özgü hücre yüzey ve hücre içi proteinleri de

içeren protein ürünlerinin ekspresyonundaki değişiklikleri içeren başarılı basamaklardan oluşur. Bu içsel gelişim programının başarıyla uygulanması, lenfositlerin geliştiği özel mikro ortamlardan gelen özel sinyalleri gerektirir. Bu dokular, gelişmekte olan lenfositlerle yakından etkileşime giren, salgılanan büyüme faktörleri ve lenfosit prekürsör hücrelerindeki reseptörlere bağlanan hücre yüzey molekülleri aracılığıyla sinyal sağlayan özel lenfoid olmayan bir stromal hücreler ağı oluştururlar (Janeway ve ark., 2001).

2.2.2. V(D)J Rekombinasyonu

V(D)J rekombinasyonu bir somatik rekombinasyon olup, bağışıklık sisteminin iki temel lenfosit olan B hücrelerinde immünoglobulin (Ig) ve T hücrelerinde T hücre reseptörlerinin (TCR) üretiminin erken evrelerindeki genetik rekombinasyon mekanizmalarından biridir. V(D)J rekombinasyonu B hücreleri için kemik iliği ve T hücreleri için timüs olan birincil lenfoid organlarda meydana gelir (Abbas ve Lichtman, 2003).

V(D)J rekombinasyonu esnasında omurgalıların **V**: değişken **D**: çeşitli **J**: katılım gen kısımları rastgele birleştirilir ve farklı genlerin seçilmesindeki bu rastgelelik yüzünden, parazitler, virüs ve bakteri işlevsiz tümör hücreleriyle polenlerden gelen antijenlerle eşleşecek olan proteinlerin farklı şekillerde kodlanmaları mümkündür (Abbas ve Lichtman, 2003).

Her bir lenfositin antijen özgülüğü, antijen-reseptör değişken (V) bölgesini kodlayan yeniden düzenlenmiş V genlerini oluşturmak üzere V, D ve J gen bölümlerinin toplanmasıyla belirlenir. Tam bir antijen reseptör ekspresyonu, antijen reseptörünün protein zincirlerini oluşturmak için iki farklı genetik lokusun başarılı bir şekilde yeniden düzenlenmesini gerektirir (immünoglobülinlerin ağır ve hafif zincirleri veya T hücre reseptörü α ve β zincirleri (veya γ ve δ zincirleri)). Bununla birlikte, tüm gen düzenlenme olayları başarılı değildir. Rekombinasyon sürecindeki kesinsizlik nedeniyle, tüm düzenlenmeler proteine dönüştürülebilir tam bir DNA dizi çerçevesi üretmez. Bir V bölgesinin başarılı bir şekilde birleştirilmesi, her lokus için gözlemlenir ve lenfosit gelişiminin farklı aşamalarını tanımlar. Üretken bir yeniden düzenleme olarak adlandırılan başarılı bir gen yeniden düzenlenmesi, protein ürününün sentezine yol açar ve bu durum, hücrenin bir sonraki gelişim evresine geçme sinyali olur (Janeway ve ark., 2001).

2.2.3. B Hücre İmmüoglobulin Zincir Rekombinasyonları

İmmüoglobulin Ağır Zincir Rekombinasyonu

İmmüoglobulin ağır ve hafif zincir organizasyonları Şekil 2'de gösterilmiştir. λ hafif zincir içi genetik lokus (kromozom 22) yaklaşık 30 fonksiyonel $V\lambda$ gen segmentine, dört çift fonksiyonel $J\lambda$ gen segmentine ve C genine sahiptir. κ lokusu (kromozom 2), beş $J\kappa$ gen segmenti, tek bir $C\kappa$ geni ile birlikte, yaklaşık 40 fonksiyonel $V\kappa$ gen segmenti ile benzer bir şekilde organize edilir. Bireylerin yaklaşık % 50'sinde, tüm κV gen segmenti dublikasyonla artışa gitmişlerdir. Ağır zincir lokusu (kromozom 14), yaklaşık 65 fonksiyonel VH gen segmentine ve bu VH gen bölümleri ile altı JH gen segmenti arasında uzanan yaklaşık 27 D gen segmentine sahiptir.

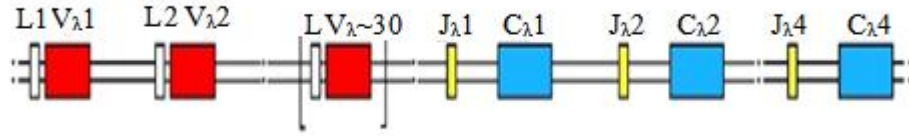
B hücrelerinin gelişim aşamasında, ilk rekombinasyon, ağır zincir lokusunun bir D ve bir J gen bölümünde oluşur. Bu iki gen arasında herhangi bir DNA bölgesi silinir. Bu D-J rekombinasyonu yeni oluşan DJ kompleksinin üst kısmında bir bölgeye bir V geninin katılmasıyla ve düzenlenmiş yeni VDJ geninin oluşumuyla tamamlanır. Yeni VDJ geninin V ve D parçaları arasındaki tüm genler hücrenin genomundan artık silinebilir (Abbas ve Lichtman, 2003).

İmmüoglobulin Hafif Zincir Rekombinasyonu

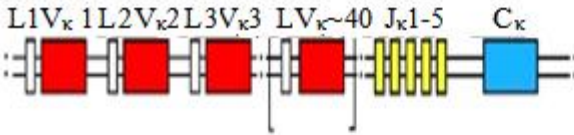
İmmüoglobulin hafif zincirinin lokusunun Kappa (κ) ve Lambda (λ) zincirleri, D bölgesine sahip olmayan bir hafif zincir farkı dışında, oldukça benzer bir süreçle üretilir. Başka bir deyişle, hafif zincirlerin rekombinasyonu için ilk basamak, birinci transkripsiyon esnasında V ve J zincirlerinin VJ kompleksi oluşturmak üzere değişmez diziden önce eklenmesi şeklindedir (Abbas ve Lichtman, 2003).

Kappa ya da lambda zincirlerin her ikisi için de, splaylanmış mRNA'nın translasyonu, $Ig\kappa$ ya da $Ig\lambda$ hafif zincir proteinlerinin oluşmasıyla sonuçlanır. $Ig\mu$ ağır zincirinin ve hafif zincirlerden birinin kuruluşunda, olgun B hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen membrana bağlı IgM 'nin oluşumu görülür (Abbas ve Lichtman, 2003).

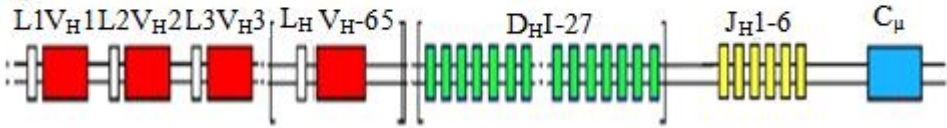
λ hafif -zincir lokusu



κ hafif -zincir lokusu



Ağır -zincir lokusu



Şekil 2. İnsan genomunda immünoglobulin ağır ve hafif zincir lokuslarının germline organizasyonu (Janeway ve ark., 2001)

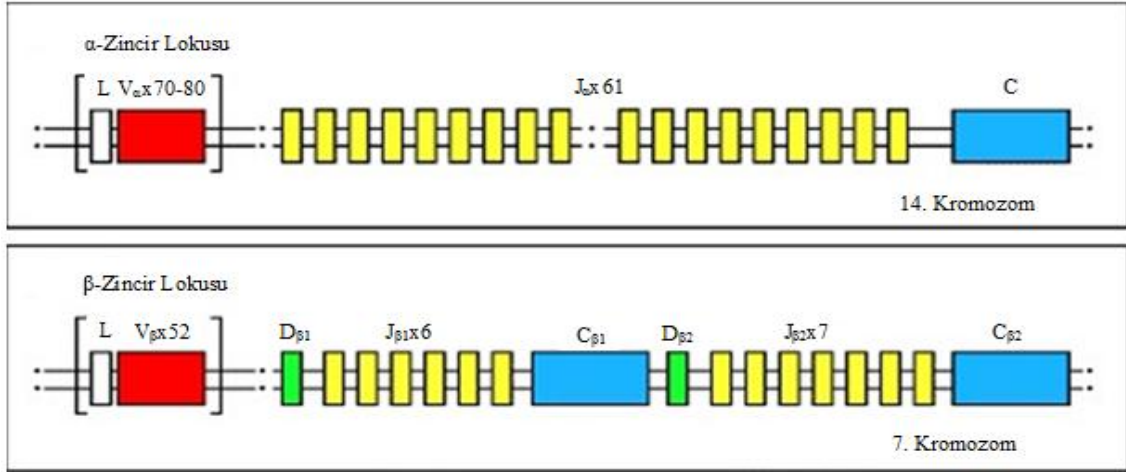
2.2.4. T Hücre Reseptör Yeniden Düzenlenimleri

T hücre reseptör gen düzenlenimi Şekil 3'te gösterilmiştir. TCR gen bölümlerinin düzenlenmesi, değişken (V), çeşitli (D), birleşim (J) gen bölümleri ve sabit (C) genleri olan immünoglobülin lokusundaki dizilişine benzemektedir. TCR α lokusu (kromozom 14) 70-80 V α gen bölümünden oluşur ve bunların her biri lider diziyi (L) kodlayan bir ekzonu takip eder. Bu V α gen bölümlerinden kaçının işlevsel olduğu tam olarak bilinmemektedir. 61 J α gen bölümünden oluşan bir küme, V α gen bölümlerinden önemli bir mesafe uzaklıkta bulunur. J α gen bölümlerini, sabit ve hinge domainleri için ayrı ekzonlar ve zar-zar ve sitoplazmik bölgeleri kodlayan tek bir ekzon içeren tek bir C geni izlemektedir. TCR β lokusu (kromozom 7), altı veya yedi J gen segmenti ve tek bir C geni ile birlikte her biri tek bir D gen segmenti içeren, iki ayrı kümeden uzakta bulunan ve 52 fonksiyonel V β gen bölümünden oluşan farklı bir küme organizasyona sahiptir. Her TCR β C geni, sabit alanı, hinge domaini, transmembran bölgeyi ve sitoplazmik bölgeyi kodlayan ayrı ekzonlara sahiptir. TCR α lokusu, J ve V gen bölümleri arasında yer alan ve başka bir T hücresi reseptör lokusu olan TCR δ lokusu tarafından kesilir (Janeway ve ark., 2001).

Timosit gelişimi sırasında, TCR zincirleri, immünoglobülinler için tarif edilenlerle aynı sıralı rekombinasyon olaylarına tabi tutulur. D-J rekombinasyonu, önce TCR'nin β zincirinde meydana gelir. Bu işlem ya D β 1 gen bölümünün altı J β 1

bölümünden birine katılmasını ya da D β 2 gen bölümünü yedi J β 2 bölümünden birine katılmasını içerebilir. DJ rekombinasyonu V β -to-D β J β düzenlemeleri ile takip edilir. Yeni oluşan kompleksdeki V β -D β -J β genleri arasındaki tüm genler silinir ve sabit gen domainini (V β -D β -J β -C β) içeren birincil transkript sentezlenir. mRNA transkripsiyonu ile ara diziler çıkarılır ve TCR C β zinciri için tam uzunluktaki proteinin translasyonuna izin verilir (Abbas ve Lichtman, 2003).

TCR'nin α zincirinin yeniden düzenlenmesini, β zincirinin yeniden düzenlenmesi takip eder. Bu durum Ig hafif zincirler için tarif edilen V'den J'ye yapılan yeniden düzenlemeye benzemektedir. β - ve α -zincirlerinin bir araya getirilmesi, T hücrelerinin çoğunluğunda eksprese edilen $\alpha\beta$ -TCR'nin oluşumuyla sonuçlanır (Abbas ve Lichtman, 2003).



Şekil 3. T hücre reseptörü gen düzenlemesi (Janeway ve ark., 2001)

2.2.5. Mekanizma

Rekombinasyon sinyal dizileri

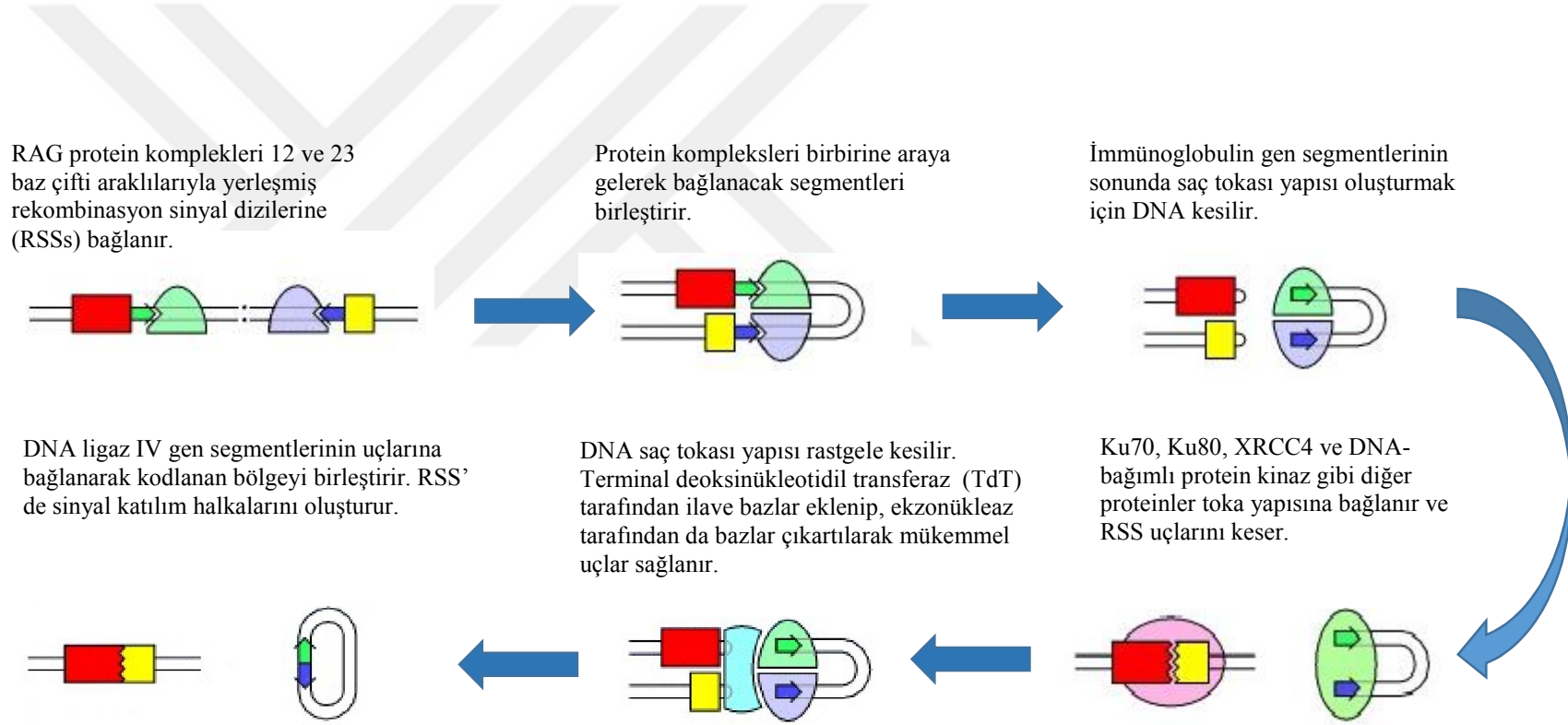
Bölgesel genler (V, D, J), topluca VDJ rekombinaz olarak bilinen bir grup enzim tarafından tanınan Rekombinasyon Sinyal Dizileri (RSS'ler) ile çevrelenmiştir. RSS'ler, gen kodlayan dizinin yanında bulunan ve ardından korunan bir nonamer (9 baz çifti) izleyen bir spacer (12 veya 23 korunmamış nükleotidleri içeren) yedi korunmuş nükleotidden (heptamer) oluşur. RSS'lar, bir V bölgesinin 3' tarafında (downstream) ve J bölgesinin 5' yanında (upstream) bulunur. Bunlar birleşmenin olacağı bölgelerdir. Sadece bir çift benzersiz ara RSS'lar verimli bir şekilde birleştirilir (yani, 12 nükleotidin bir ara

parçası, 23 nükleotid içeren bir ara parçası ile rekombine olur). Bu, rekombinasyonun 12/23 kuralı (veya "bir dönüş / iki tur" kuralı) olarak bilinir (Abbas ve Lichtman, 2003).

VDJ Rekombinaz

VDJ rekombinaz, bazıları lenfositte spesifik olan ve bazıları birçok hücre tipinde ifade edilen enzimlerin bir koleksiyonudur. VDJ rekombinasyonunun ilk basamakları rekombinasyon aktive edici gen-1 ve -2 (RAG1 ve RAG2) olarak adlandırılan kritik lenfosit spesifik enzimler tarafından gerçekleştirilir ve basamaklar şeklinde ilerler (Şekil 4) (Abbas ve Lichtman, 2003).

Artemis'in saç tokası döngüsünün kesin olarak bölünme pozisyonundaki değişkenliği ve ayrıca Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) tarafından rastgele nükleotid ilavesi nedeniyle, nihai DNA sekansı ve dolayısıyla ortaya çıkan antikorun sekansı son derece değişkendir. Aynı iki V, D veya J segmentleri birleştirildiğinde bile dizi değişkendir. Bu büyük çeşitlilik VDJ rekombinasyonunun organizmanın veya atalarının hiç karşılaşmadığı mikroplar için bile antikor üretmesine izin vermektedir (Abbas ve Lichtman, 2003).



Şekil 4. İmmüoglobülin gen segmentlerinin yeniden düzenlenimindeki enzimatik basamaklar (RAG-1 ve RAG-2 yeşil ve mor, Ku70:Ku80 mavi, TdT ve ekzonükleaz pembe renk ile gösterilmiştir)(Janeway ve ark., 2001)

2.3. TRECs ve KRECs

Farklılaşmamış hematopoietik prekürsörlerden yeni T ve B hücresi üretimi için birincil anatomik bölgelerin timus ve kemik iliği olduğunu daha önce belirtmiştik. Bu süreçte, elde edilen hücrelerin çok çeşitli antijenik uyarılara yanıt vermesine olanak sağlayan oldukça heterojen bir lenfosit repertuarı üretilir. Fizyolojik olarak timustaki T hücresi olgunlaşması, fenotipik olarak tanımlanan T hücre reseptörü ve CD4 ile CD8 ortak reseptörlerinin ifadesi ile farklı aşamalar boyunca ilerlemektedir. Farklı hücre yüzey belirteçlerinin programlı ifadesi ve ardışık gen düzenlenmelerine dayanarak, timositler son aşamaya gelmeden önce farklı olgunlaşma basamaklarından geçerler.

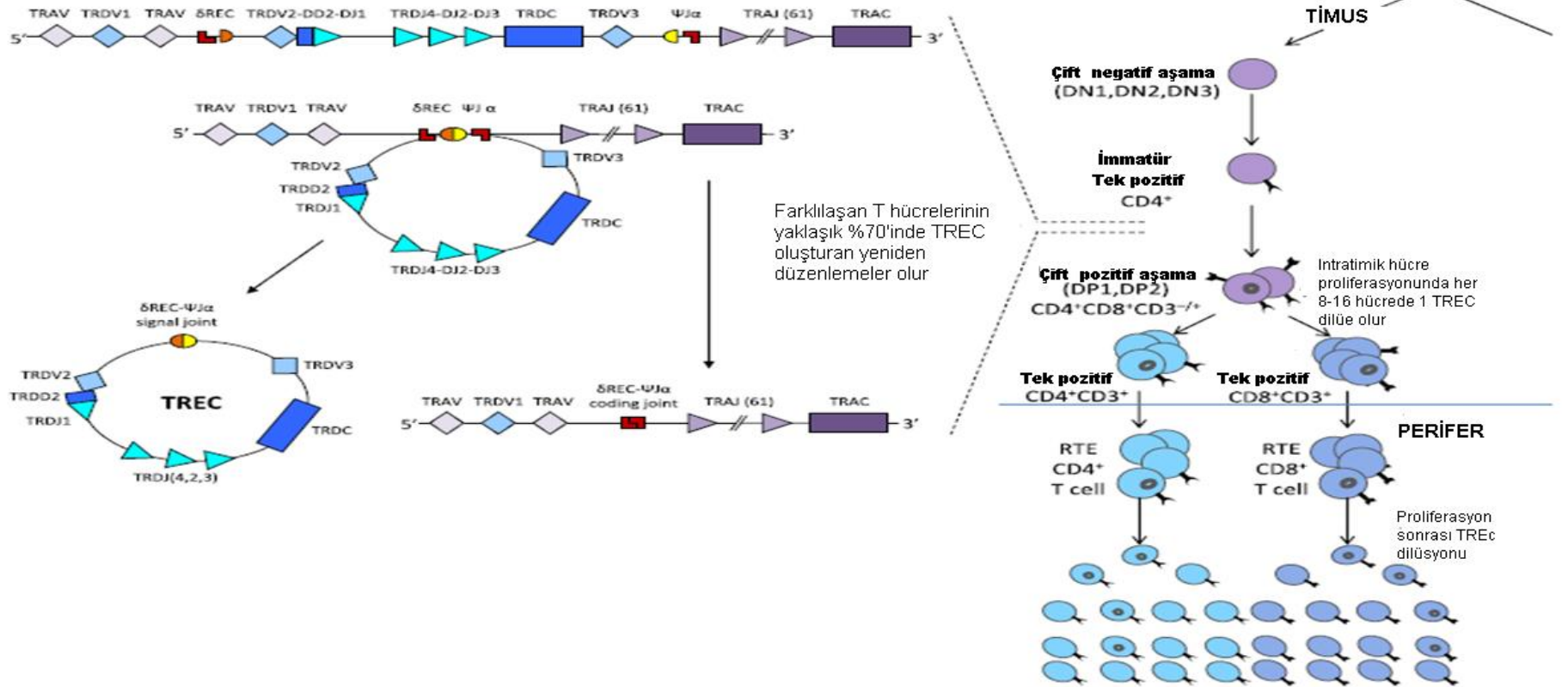
TRECs ve KRECs T ve B lenfositlerin maturasyonu sırasında genlerin yeniden düzenlenmeleri ile oluşan halka şeklinde epizomal DNA fragmanlarıdır (Lee ve ark., 2014). Ekzisyon halkaları mitoz boyunca replike olmazlar bu nedenle dilüsyon paterni gösterip hücre replikasyonunun kuantitatif sayısı hakkında bilgi verirler (Olbrich ve ark., 2014; Tessitore ve ark., 2017).

Yaklaşık olarak T hücrelerin %70'i TREC oluştururlar. TRECs için bazı özellikler belirlenmiş olup bunların timus için bir biyobelirteç olmasını sağlamıştır: Stabil moleküllerdir, zamanla kolayca degrade olmazlar, hücreler bölündüğü zaman replike olmazlar, ve nerdeyse tamamıyla timus orijinlidir (Chiarini ve ark., 2013). TREC'lerin sayısı, özellikle 0 ile 3-4 yıl arasında, timik involüsyon nedeniyle çok keskin bir şekilde azalmaktadır. Yetişkinlerde, TREC sayısı cinsiyetle de ilişkilidir, çünkü erkeklerde kadınlardan daha hızlı azalmaktadır. (Sottini ve ark., 2014; Zhang ve Bhandoola, 2012).

T hücre reseptör (TCR) alfa (TCRA) zincirinin yeniden düzenlenmesi gamma/delta T hücrelerinin delta zincirini kodlayan ve kesilip çıkarılan delta segmentlerini içerir ki bu kısım TCRA lokusunda değişken (V) ve katılım (junctional) (J) gen segmentleri arasında yer alır, TCRA zinciri oluşturmak için kesilip çıkarılması lazımdır (Van Zelm ve ark., 2012). Farklı antijen spesifitesinde antijen oluşturmak için T hücreler normal timus maturasyonu esnasında T hücre antijen reseptör genlerini kodlayan DNA'sının kesilip birleştirilmesi gerekir. Bu rekombinasyon sonrası yan ürün olarak kesilen DNA parçaları epizomal TREC'leri oluştururlar (Şekil 5). $\alpha\beta$ TCRs eksprese eden %70 insan T-hücrelerinde bunların bir türü olan δ Rec- ϕ J α TREC üretilir.



T Hücre Farklılaşması ve TREC Oluşumu



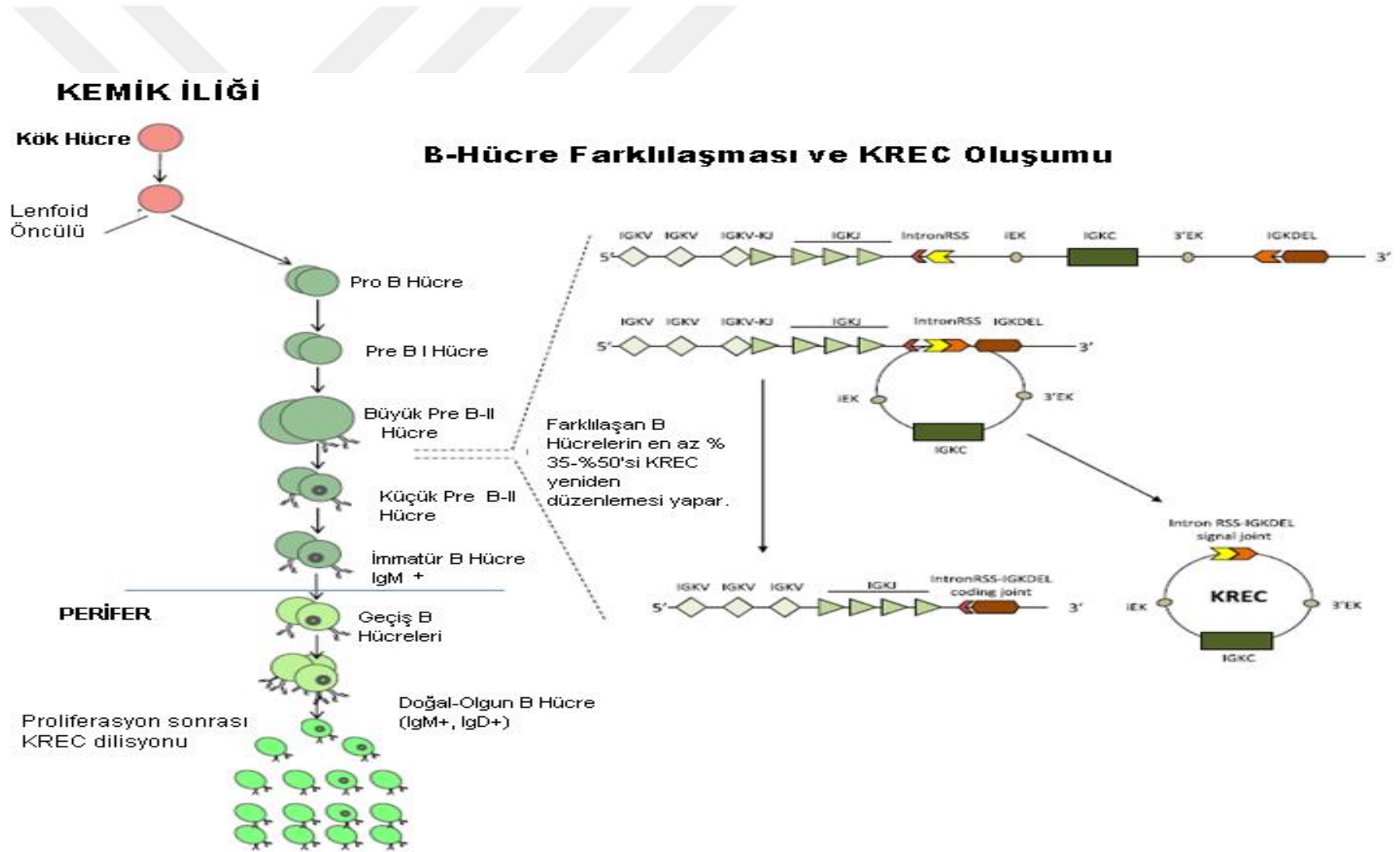
Şekil 5. Kemik iliğinden TREC oluşumu (Serana ve ark., 2013)

δ Rec- ϕ J α TREC'lerin kuantitatif PCR ampliconları periferik kanda yeni oluşmuş T-hücreleri gösterir (Chan ve Puck, 2005).

TREC'lerin tanımlanmasından sonra KREC'lerin de tanımlanması ile B hücrelerinin replikasyon tarihçesine bakılabilecek metotlar geliştirilmiştir (Nakagawa ve ark., 2011). Yakın zamanda ki amaç ise yenidoğanlarda B hücre maturasyon eksikliğinin taranmasıdır. B hücre maturasyon sürecinde, KRECs Kappa zincirin alelik ve izotipik kesilip çıkarılmasıyla belirlenen rekombinasyon olaylarından oluşur. KREC'ler de stabil moleküllerdir, kolayca degrade olmayıp, hücre bölünmelerinde replike olmazlar (Chiarini ve ark., 2013).

B hücre gelişimi sürecinde Ig ağır zincir yeniden düzenlenmesinin başarısızlığı sonucunda Ig hafif kappa zincir genleri (IGK) bir ya da iki alelde yeniden düzenlenemez. Bu hücrelerde rekombinasyon sinyal dizisi içeren ve IGK lokusu sabit K-gen segmentinin (IGKC) 24 kb aşağısında kalan K-silici element (Kde) ile IGCK rekombinasyona uğrararak IGKC delete olur. Bu rekombinasyon olayları esnasında bir kısım DNA silinir, çıkarılan rekombinasyon sinyal dizileri halka DNA elementlerini oluşturur ki bunlara KRECs adı verilir (Chiarini ve ark., 2013, Borte ve ark., 2013) (Şekil 6).

Kısacası TRECs ve KRECs fonksiyonel olmayan DNA halkalarıdır. Lenfosit hücrelerin sitoplazmasında yer alırlar. Stabil olmaları, replike olmamaları nedeniyle her hücre bölünmesinden sonra sayıları azalır. Bu nedenle kandaki seviyeleri timus ve kemik iliğinin T ve B lenfosit üretimi hakkında bilgi verir (Nourizadeh ve ark.,2015; Sottini ve ark., 2014; Puck 2012; Borte ve ark., 2011).

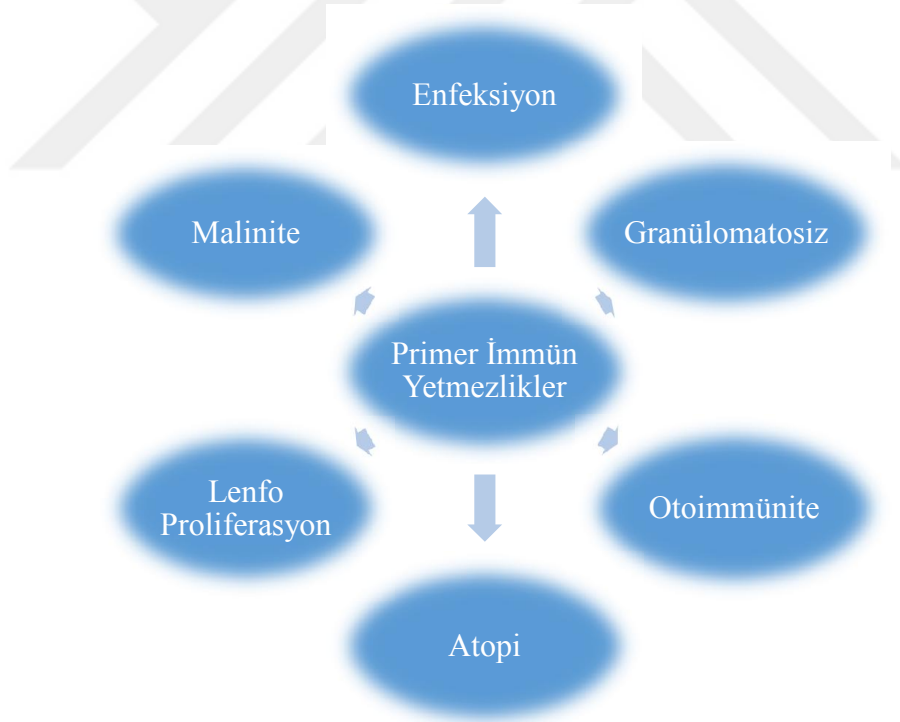


Şekil 6. Kemik iliğinden KREC oluşumu (Serana ve ark., 2013)

2.4. Primer İmmün Yetmezlikler

PİY immün sistemin kalıtsal hastalıklarıdır. Genetik olarak belirlenip yalnız ya da bir sendroma bağlı olarak oluşabilirler. Değişik tipde PİY hastalıkları tanımlanmıştır. Genellikle infantil ya da çocukluk döneminde manifeeste olup sık tekrarlayan enfeksiyonlar olarak kendini gösteren immün sistemdeki bozukluklardır. 1952 yılında Bruton'un agammaglobülinemi vakasını sunduğundan bu yana 300'den fazla PİY formu tanımlanmıştır (Chiarini ve ark., 2013).

Geçmişte PİY hastalıkları enfeksiyon riskini artıran immün sistemde bir ya da birden fazla eksikliğin neden olduğu hastalık grubu olarak tanımlanmıştır. PİY immün sistem anomalisi ile karakterize heterojen bir hastalık grubu olup çok çeşitli ve farklı klinik bulgulara yol açabilmektedir. Örneğin olarak tekrarlayan enfeksiyonlar, otoimmünite, lenfoproliferasyon, granulomatöz süreç, atopi ve malinite gibi değişik klinik bulgular sergileyebilir (Şekil 7). Bu sebeple toplumda PİY insidansının tahmin edilenden çok daha fazla olduğu düşünülmektedir (Raje ve Dinakar, 2015).



Şekil 7. Primer immün yetmezliklerin genel özellikleri (Raje ve Dinakar, 2015)

PİY hastalarının büyük bir çoğunluğu T ve B hücre sayısında azalma gösterir ve bu durum bağışıklık sisteminin düzgün çalışmasını engeller. B hücre eksikliği antikor

eksikliğine neden olur. Bruton Tirozin Kinaz (BTK) genindeki mutasyon sonucu oluşan X'e bağlı agammaglobülinemia (XLA) altgrup hastalarında kemik iliğindeki B hücre farklılaşması durdurulur bunun sonucunda serumda olgun B hücre ve antikoları oluşmaz. Bu hastaların %30'undan fazlası çocuklukta ya da erken yetişkin dönemde çoğunlukla akciğerlerde olmak üzere geri dönüşümü olmayan organ hasarı geliştirirler. Non-XLA hastaları BTK gen mutasyonu olmaksızın hipogammaglobulinemi ile karakterize düşük sayıda B hücre sayısına (%2 den daha az olgun B hücre) sahiptirler. Hem XLA hem de non-XLA hastalarında tekrarlayan enfeksiyonlar 3 ve 18 aylık dönemlerde başlarken tanı ise ortalama 3 yaş civarında konulur. Tanının geç konmasına bağlı olarak bu hastalar ölümcül olabilen pnömöni, sepsis, menenjit diğer bakteriyel enfeksiyonlar geçirip sık sık hastaneye yatarlar ve intravenöz antibiyotik alırlar. Bu nedenle bu hastalarda erken tanı ve tedavi hastaların yaşam kalitesini ve prognozlarını geliştirmek açısından önemlidir. Çünkü bu hastalar tanı aldıklarında düzenli olarak Ig replasman terapisi alabilirler (Chiarini ve ark., 2013).

2.4.1. Tarihçe

20. yüzyılın başlarında Ataksiya telenjektizi (1926) ve Wiskott Aldrich sendromu (1937) gibi birkaç immün sistem hastalığı keşfedilmiştir. Ancak, PİY'lerin tarihindeki simgesel yapı, 1952'de Albay Ogden Bruton tarafından agammaglobulineminin keşfiyle başlamıştır. 1950'de, Eduard Glanzmann ve Paul Riniker, Candida albicans enfeksiyonlarının lenfosit yokluğu ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Ochs ve Hitzig, 2012). Bern ve Zürih'teki iki İsviçreli grup (Hassig Cottier, R.Tobler ve Walter Hitzig), 1958'de benzer hastaları keşfetmiş ve bunu bir immün yetmezlik olarak kabul etmişlerdir. Başlangıçta İsviçre tipi agammaglobulinemi olarak adlandırılan bu durum, 1970 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ağır kombine immün yetmezlik olarak yeniden adlandırılmıştır (Ochs ve Hitzig, 2012). 1954'te Robert Good, artık kronik granümatöz hastalık (CGD) olarak bilinen bir ölümcül granümatöz hastalığı keşfetmiştir (Ochs ve Hitzig, 2012). Son 65 yılda, PİY'lerin alanı hızla ilerlemiştir. En yeni genetik teknolojilerin ortaya çıkmasıyla birlikte 300'den fazla PİY keşfedilmiş ve bu sayı halen artmaya devam etmektedir (Al-Herz ve ark., 2014; Raje ve Dinakar, 2015).

2.4.2. Sınıflandırma

İmmün yetmezlikler birincil veya ikincil olarak tanımlanabilir. Birincil immün yetmezlikler, bağışıklık sisteminin işlev bozukluğundan kaynaklanırken ve etiyojisinde esas olarak genetik bir neden varken, ikincil immün yetmezliklerin altyapısında farklı nedenler vardır.

PİY'ler için çeşitli sınıflamalar önerilmiştir. 2017 Uluslararası İmmün Yetmezlik Derneği (IUIS), PİY'leri immün yetmezliğin tipine göre dokuz kategoriye ayırmaktadır

I. Hücresel ve hümorale bağışıklığı etkileyen immün yetmezlikler

II. Sendromik özellikli kombine immün yetmezlikler

III. Ağırlıklı antikor eksiklikleri

IV. İmmün sistem düzensizliği

V. Konjenital fagosit sayısı ve/veya fonksiyonu kusurları

VI. İçsel ve doğuştan gelen bağışıklıktaki kusurlar

VII. Otoinflamatuar bozukluklar

VIII. Komplemant eksiklikleri

IX. PİY fenokopileri (Bousfiha ve ark., 2018)

PİY'lerin bazıları bu kategorilerin birden fazlası için uygundur (Al-Herz ve ark., 2014; Raje ve Dinakar, 2015).

Ağır kombine immün yetmezlik, lenfosit gelişimi ve işlevinin yokluğuna yol açan çeşitli genetik bozukluklardan kaynaklanan ve yaşamı tehdit eden bağışıklık sistemi bozukluklarından biridir. SCID tanısı, pediatrik acil bir durumdur, çünkü etkilenen çocuklar, küratif tedavi olmaksızın yaşamın ilk 1-2 yılında ölümcül olan bakteriyel, viral, fungal ve fırsatçı enfeksiyonlara karşı aşırı duyarlılığa sahiptir (Van Zelm ve ark., 2011) Çoğu durumda, SCID'li çocuklar doğumda iyi görünürler ve 3-6 ay içinde pasif olarak aktarılan koruyucu maternal immünoglobulinler azaldıkça tekrarlayan ciddi enfeksiyonlar ile hayatta kalmaları zorlaşır (Verbsky ve Routes, 2014; Rivers ve Gaspar, 2015)

2.4.3. Epidemiyoloji

PİY prevalansı, immün yetmezliğin tipine bağlı olarak değişir. Selektif IgA eksikliği sık görülürken (1/223'den 1/1000'e kadar) (Yel, 2010), ağır kombine immün yetmezlik gibi diğer immün yetmezlikler nadir görülür (58.000'de 1) (Kwan ve ark.,2014). Yeni immün yetmezlikler sürekli olarak keşfedildiğinden, hastalığın

prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte düşünülenden fazla olduğu tahmin edilmektedir (Raje ve Dinakar, 2015).

Kaliforniyada yapılan bir yenidoğan taraması gösteriyor ki SCID prevalansı her canlı doğumda 1/70.000. Önceki tahminler ise 1/100.000- 1/150.000 şeklinde idi (Olbrich ve ark., 2014). Suudi Arabistan'da da yenidoğan tarama yöntemi ile gerçek SCID insidansını bulmak için pilot bir çalışma gerçekleştirmektedir (Al-Mousa ve Al-Saud, 2017).

Türkiye'de PİY hastalıkları açısından yapılan çalışmalar nadirdir. Nitekim Yorulmaz ve arkadaşlarının 2001-2006 yılları arasında tanı koydukları PİY hastaları ile yaptığı çalışma Türkiye'de PİY hastalıklarının sıklığı açısından özgün bir çalışma olup; burada verilen değerler de önemli ve anlamlıdır. Bu çalışmada Konya ilinde SCID sıklığının 1/10.000 şeklinde olduğu vurgulanmaktadır. Çalışmada beş yıllık periyotta, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı genel polikliniğe gelip tanı alan 1054 vaka olduğu belirtilmektedir. Hastaların %92,8'i antikor eksikliğine bağlı gelişen immün yetmezlik oluştururken, %2,4'ü SCID, %1,7'si diğer iyi tanımlanmış immün yetmezlik sendromları, %0,9'u immün sistemin regülasyon bozuklukları, %0,2'si fagositik sistem bozuklukları, %0,1'i kompleman eksiklikleri ve %1,8'i diğer immün yetmezlikler şeklinde ifade edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen diğer önemli bir bulgu ise tanı alan hastaların anne ve babalarının %37,5'inde akrabalık ilişkisi olduğudur. Daha da önemlisi SCID'li hasta grubunun %84'ü akraba evliliğinden doğan çocuklardır (Yorulmaz ve ark., 2008).

PİY sıklığı ile ilgili Türkiye'de yapılan diğer bir çalışma ise Bursa ve İzmir'de yapılan altı yıllık bir hasta grubunu kapsamaktadır. 2004-2010 yılları arasında bu merkezlerde tanı alan hasta sayısı 1435'dir. Bu iki merkezin yaptığı çalışma sonucunda PİY hastalık sıklığı ortalama 3/10.000 olarak belirtilmiştir. Bu çalışmalarda da antikor eksiklikleri %73,9 sıklıkta bulunup en sık rastlanan PİY tipi olmuştur. Kombine B ve T hücre eksikliği ise %2 olarak bulunmuştur (Kılıç SS ve ark., 2013).

2.4.4. Teşhis

SCID ve benzeri PİY hastalıklarınının erken tanısı önemlidir özellikle bu hastalara canlı aşular verilmemesi, kök hücre transferi, enzim replasman terapisi ya da gen tedavisi hayat kurtarır. Ancak bu hastalar doğumda normal olup herhangi bir aile geçmişleri de yoktur. Bu nedenle birçoğu ciddi enfeksiyonlara yakalanmadan tanı

almazlar. Bu durum çok önemlidir, çünkü hastalık ne kadar erken tanı alırsa yaşam kalitesi ve prognoz da o derece iyi olur. Yine SCID erken tanı almazsa hastalar uygun ve başarılı bir terapi alamadıklarından dolayı aşı, graft-versus-host hastalığı ya da enfeksiyonlara bağlı olarak hayatlarını kaybederler (Chiarini ve ark., 2013).

PİY'lerin tanısı birçok nedenden ötürü zorlayıcıdır. Bu nedenlerden bazıları:

- PİY'ler nadir görüldüğü için, yüksek bir şüphe gereksinimi vardır.
- Aynı PİY'li bireyler farklı tezahürlere sahip olabilir ve çoğu PİY hastaları hastalığın belirtilerinden yoksundur.

- Aynı genlerinde hasar bulunan bireyler farklı sunumlara sahip olabilirler.
- Tarama testleri spesifik değildir.
- Tarama testinin normal sonuçları PİY'yi dışarıda bırakmaz.

2.4.5. Hastalık Geçmişi ve Fiziksel Muayene

PİY'leri teşhis etmek için titiz bir hastalık geçmişi ve kapsamlı bir fizik muayene önemlidir. Tekrarlayan enfeksiyon öyküsü, etkilenen aile üyelerinin varlığı, büyüme ve gelişme ile ilgili fiziksel bulgular ve periferik lenf dokusunun varlığı ya da yokluğu doğru tanının konması için gerekli olan ipuçları arasında yer alabilir. Jeffery Modell Vakfı tarafından yayınlanan 10 uyarıcı madde, bu kriterlerin karşılaşıldığı durumlarda taramanın başlatılmasını sağlayarak klinisyenleri uarmaya yardımcı olur (Raje ve Dinakar, 2015).

İlaçlar, HIV, yetersiz beslenme ve protein kaybetme gibi koşullarla oluşan sekonder PİY 'lerin nedenleri dışlanmalıdır. Tekrarlayan enfeksiyonlara maruz bırakan diğer durumlar ayırıcı tanıda akılda tutulmalıdır. Örneğin, tekrarlayan sinopulmoner enfeksiyonlar; kistik fibroz, primer siliyer diskinezi, bronşektazi veya çevresel alerjilerin bir özelliği olabilir. Benzer şekilde tekrarlayan cilt enfeksiyonları atopik dermatite sekonder olabilir (Raje ve Dinakar, 2015).

2.4.6. Laboratuvar İncelemeleri

PİY şüphesi olan hastaların laboratuvar değerlendirmesi tipik olarak iki veya üç aşamalı olup, tarama laboratuvarlarından başlayarak kesin tanı ve moleküler testlerin yapıldığı laboratuvarlar takip eder. Yararlı, ancak çoğu zaman unutulmuş testler arasında periferik kan yayması, sedimentasyon ve c-reaktif protein (CRP) bulunur. Son 10 yılda,

TREC'lerin uygulamaya girmesi yenidoğan tarama paradigmasını da değiştirmiştir (Locke ve ark., 2014).

2.4.7. PİY Hastalıklarının Taranması

Ağır T ve/veya B hücre lenfopenisi olan PİY hastalıklı çocukların hiç bir aile geçmişi olmayıp bu bebekler hayatlarının ilk haftalarında herhangi bir belirti göstermezler. Bu nedenle bu hastaların tanı alması gecikmekte olup hastalık oranı ve ölüm sayısı artmaktadır (Olbrich ve ark., 2014).

SCID doğumda belli olmayıp erken tanısı da hayat kurtardığı için uzun zamandır yenidoğan tarama programlarının aday hastalığı olmuştur (Modell ve ark., 2014). Ayrıca Yenidoğan ve Çocuklarda Kalıtsal Bozukluklar Genel Sekreterlik Danışma Kurulu tarafından SCID'in yenidoğan taramalarında uygulanması için yeterli kriterleri sağladığını vurgulanmıştır (Chiarini ve ark., 2013). Bu kriterler:

- 1- Hastalığın popülasyonda görülme sıklığı tarama yapılması için yeterli yükseklikte olması
- 2- Hastalığın tedavi edilmemiş doğal tarihçesi çok iyi bilinmeli
- 3- Hastalığın tedavi edilmemesi hastalık oranı ve ölüm oranını artırmalı
- 4- Hastalık tedavi edilebilir olmalı ve tedavi sonuçları iyi olmalı
- 5- Hastalığın test edilmesi güvenilir, basit ve tüm vakaları yakalamada yeterince hassas olmalı
- 6- Hastalık test edildikten sonra spesifik konfirme testler olmalı
- 7- Hastalığın test edilip, tedavi edilmesinde kar-zarar oranı iyi olmalı

SCID doğumda asemptomatik olup, tedavi edilmediğinde ölümcül olabilir, etkili tedavi yöntemleri mevcut olup erken tedavi sonuçları çok iyidir. Enfeksiyon gelişmeden tanı alıp kemik iliği transferi olan infantlar geç tanı alanlara nazaran daha ucuz maliyetle daha uzun süre yaşayabilmektedirler Yukarıdaki kriterler de dikkate alındığında; SCID'in yenidoğan tarama programının birçok kriterini karşıladığını görürüz. (Chan ve Puck, 2005).

SCID'in yenidoğan taramasında olmamasının nedeni ise sıklığının tam olarak bilinmemesi ile göreceli olarak az olması ve 2000'li yıllara kadar tarama programı için pratik bir testinin olmamasıdır. Bir çok ülkede SCID'in gerçek insidansı ise bilinmemektedir. 1/100.000 olarak tahmin edilip hastalık tanısı almadan *ex* olan hastalar bunun dışında kalmaktadır. Galaktozami ve biyotinaz eksikliğinin insidansı ise sırasıyla

1/60.000 ve 1/80.00'dir. Bu nedenle SCID tanısı için ucuz hızlı bir laboratuvar tekniği gerekmekte olup bu testin SCID'in değişik formlarını da bulması beklenmektedir. SCID'li hastalarının farklı genotipleri için karakteristik lenfosit özellikleri vardır. Bu karakteristik özellikler uygun bir test bulmada ideal bir yol olarak kullanılır (Chan ve Puck, 2005).

Normal T hücre gelişimi için uygun bir biyobelirteç ve SCID yenidoğan taramasına izin veren yöntemler için uzun süredir devam eden araştırmalar yapılmıştır. SCID'in yenidoğan döneminde taraması ilk defa 1990'larda önerilmiştir. Bu yöntemin tam kan sayımına bakılarak ve kandaki azalmış lenfosit sayısı bulunarak, hastalığın teşhisine yardımcı olabileceği düşünülmüştür. Ancak, yöntem taze kan örneklerinin kullanımına dayandığından büyük ölçekli uygulamayı önlemiştir. Ek olarak bu yöntemle, yüksek sayıda B veya Doğal Katil (NK) hücresi olan, SCID'in T – B + NK + formlarına yanlış negatif test sonuçları verilebilir. SCID taramasında Interleukin-7 için ELISA-benzeri immünolojik testler önerilmiş olsa da, inferior örnek stabilitesi ve zor protein saflaştırması ile ilgili teknik meseleler daha geniş uygulamalarını önlemiştir (McGhee ve ark., 2005). Benzer şekilde, T-hücre reseptörü-CD3 kompleksi ve CD45 için boncuk yakalama deneyleri geliştirilmiştir, ancak maternal engraftman veya oligoklonal T hücrelerinin genişlemesi ile SCID hastalarında yanlış negatif sonuçlara rastlanmış, böylece bu teknik de uygulamadan çıkarılmıştır (Janik ve ark., 2010).

Bu nedenle 2005 yılına kadar T hücre lenfopenisine bakan tarama testi yoktu. 2005 yılında real-time PCR tabanlı TRECs kuantifikasyonunu yapan testler bulunmuş ve popülasyon taramasına dahil edilmiştir (Chiarini ve ark., 2013; Hammarström, 2014).

Bundan sonra ABD'de 1960'lı yılların başında başlayan fenilketonüri yenidoğan taraması SCID'li hastalarda T hücre lenfopenisine bakılacak duruma kadar ilerlemiştir. (Chiarini ve ark., 2013).

TREC testinin SCID'li hastaları genetik nedenden bağımsız olarak bulduğunun gösterilmesinden sonra kuru kan örneklerinden popülasyon taraması amaçlı testler geliştirilmiştir. Yenidoğan tarama programlarında SCID açısından TRECs tespitine dayanan bir test ile 2008'dan beri taramalar yapılabilmektedir (Kwan ve ark., 2014). Bu aşamada ABD'de bazı eyaletlerde pilot çalışmalar yapılmıştır. 2008 yılında yenidoğan taramasında T hücre eksikliğine bakılmasına karar veren ilk Amerikan eyaleti Wisconsin olmuş bunu 2009 Şubatında Massachusetts sonrasında NewYork, Navajo Nation,

Kaliforniya, Puerto Rico ve Louisiana takip etmiştir. Bunlardan sadece Kaliforniya’da TREC analiz kitleri tıbbi medikal bir şirket tarafından üretilirken, diğer bölgelerde ev yapımı modifiye TREC testleri uygulanmaktadır. Nisan 2011’in sonunda 961.925 yenidoğanda pilot çalışma yapılmış, 14 SCID vakası, 6 SCID varyantı ve 40 SCID ile alakalı olmayan T-hücre lenfopenisi olan vaka bulunmuştur. Wisconsin ve Massachusetts’ de tanı alan tüm infantlar transplantasyon ya da enzim replasman tedavisine gitmiş ve herhangi bir ölüm bildirilmemiştir. Şu anda, ABD’de 26 eyalette bu tekniğin hızlı bir şekilde benimsenip kullanılmasıyla başarılı bir tedavi süreci amaçlanmaktadır (Chiarini ve ark., 2013).

ABD’deki 11 tarama programının ilk 5 yıl aralığındaki 3 milyon yenidoğana ait mevcut verilerine göre, SCID için genel sağkalım % 87 ve 58.000 canlı doğumda 1 sıklıkta görüldüğü bildirmiştir. Olguların çoğu tipik SCID (42/52 SCID), 10/52 bebekte sızıntılı SCID ve 1/52 Omenn sendromudur. İlk TREC taraması ile hiçbir SCID vakası kaçırılmamış, ancak daha sonra tespit edilmiştir. Kemik iliği nakli, gen terapisi veya enzim replasmanı alan SCID’li tanımlanmış bebeklerin sağkalımı % 92 olarak bulunmuştur. Testin spesifitesi % 99,8’den yüksek bulunmuş, ayrıca tipik SCID, sızıntılı SCID ve Omenn sendromunun 52 vakasına ek olarak, SCID olmayan ağır T-hücre lenfopenisi olan vakalar da saptanmıştır. SCID olmayan ağır T hücre lenfopenisinin tanımlanması, canlı aşularının önlenmesini ve uygun enfeksiyon profilaksisi ile takibin yapılmasına olanak sağlar (Bayer ve ark., 2014; Marciano ve ark., 2014; Patel ve ark., 2015).

Amerika’da geç tanı alan bir SCID’li hastanın toplam sağlık hizmeti masrafı 6 milyon dolar iken, aynı hastanın erken tanı alarak aldığı sağlık hizmeti 1,39 milyon dolardır. Bu fiyat farkına bakıldığında yenidoğan döneminde tarama testinin uygulanmasının daha faydalı olduğu görülmektedir (Olbrich ve ark., 2014).

Avrupa’da da SCID açısından tarama testleri desteklenmektedir. İsveç ve Alman çocuklarından elde edilen 20 bin anonim gutrie kartlarından yapılan tarama testi TRECs ve KRECs değerleri için PİY açısından uygun bir eşik değeri elde edilmesini sağlamıştır. 2013 yılında İsviçre’de 3 yıl sürecek prospektif bir pilot çalışma başlatılmış olup İsviçre’deki yenidoğanların 1/3’nü kapsayacak tarama programı başarılı olduğu takdirde ülke genelinde uygulanacaktır (Hammarström, 2014). İspanya’da yenidoğanlar lethal

olan immün sistem hastalıkları açısından rutin olarak taranmaktadır (Olbrich ve ark., 2014).

Çoğu hastada yaşamı tehdit eden enfeksiyonların başlamasından önce SCID'i saptamanın tek yolu nüfus tabanlı tarama programlarıdır, çünkü SCID'li hastaların % 80'inden fazlası pozitif bir aile öyküsüne sahip değildir. Ayrıca SCID, popülasyon çapında yenidoğan taramalarında taranıp tedavisi olan ilk durumdur (Chan ve Puck, 2005; Chan ve ark., 2011).

TREC taraması ile saptanan ciddi T hücre eksikliği olan ve SCID olmayan hastalıklar ve TREC testinin kullanıldığı durumlar aşağıdaki gibidir:

- Otoimmün bozuklukların aktivitesinin değerlendirilmesi
- Kemik iliği transplantasyonlarından sonra immün sistemin yapılanması
- Normal ve anormal yaşlanma süreçleri
- Normal T hücre gelişiminin incelenmesi
- HIV tedavisine cevap
- T hücre bozukluğu olan konjenital sendromlar
- Varyant SCID
- Tanımlanmamış T hücreli lenfopeni
- 22q delesyon sendromu
- Kombine immün yetmezlik
- Ataksiya telenjektazi
- Sitokinez 8 belirteci (DOCK 8) eksikliği
- Ektodermal dizplazi ilişkili immün yetmezlik (EDA-ID)
- Trizomi 21
- Trizomi 18
- Kabuki Sendromu
- Koloboma, kalp anomalisi, kohanal atrezi, retardasyon, genital ve kulak anomalileri (CHARGE) Sendromu
- Noonan Sendromu
- Jacobsen Sendromu
- Nijmegen Kırık Sendromu
- Fryns Sendromu

- Schimke immüno-osseous dizplazi
- Kartilaj saç hipoplazisi
- Konjenital lipomatoz, aşırı büyüme, vasküler malformasyon, epidermal nevi, spinal/iskelet anomalileri ve/veya skolyoz (CLOVES)
- Ektodermal dizplazi, ektodaktili ve yarıklanma (ECC)
- Rac2 eksikliği
- Renpenning sendromu
- Trombositopeni ve önkol kemiği eksikliği (TAR)
- Diğer sitogenik bozukluklar
- 6p delesyonu,
- Halka kromozom 14
- Halka kromozom 17
- Kromozom 17p duplikasyonu
- 14q mikrodelsyonu

TRECs düşüklüğünde akla gelebilecek ikincil nedenler ise erken doğum, konjenital kalp hastalığı, çoklu konjenital anomali, gastrointestinal anomali, şilotoraks, neonatal lösemi, maternal otoimmün hastalığı, maternal HIV enfeksiyonu, maternal immün baskılayıcılar ve bazı ilaçlar şeklindedir (King ve Hammarström, 2018).

ABD'den alınan rapora göre, SCID olmayan T hücreli lenfopeni insidansı 1/14.000'dir (erken doğmuş bebekler hariç 1500 den fazla T-hücre / μ L tanımını kullanarak) (Kwan ve ark., 2014). T hücre lenfopati ve SCID olmayan bebeklerin % 33'ünde doğuştan gelen ve T-hücre lenfopenisi ile ilişkili olduğu bilinen sendromlar görülmüştür: % 57'sinde DiGeorge sendromu / kromozom 22q11.2 delesyonu, % 15'inde trizomi 21, % 3'ünde ataksiya telenjektazi veya trizomi 18 ve % 2'sinde CHARGE sendromu olduğu belirtilmiştir. SCID olmayan T hücre lenfopenilerin % 28'i ise diğer medikal koşullara bağlanmış, bunların % 26'sında doğuştan kalp hastalığı olduğu, bunu birden fazla başka konjenital anomaliler, vasküler sızıntı ya da gastrointestinal anomaliler izlemiştir (Borte ve Reichenbach, 2015).

Yaşlanma iyi tanımlanmış bir ikincil immün yetmezlik durumudur. Bu ilişki için olası bir açıklama, yaşa bağlı timik involüsyon nedeniyle timik aktivite azalmaktadır (Mitchell ve ark., 2010) Bu nedenle yaşlılarda TREC'lerin sayısının, esas olarak olgun T

lenfositlerin TREC içeriğini azaltan periferik hücre bölünmesi ve düşük timik aktivite nedeniyle düşük olduğu düşünülmektedir.

Otoimmünitede T hücre homeostazının değerlendirilmesi, TREC düzeylerinin ve TCR klonalitesinin paralel tespiti ile mümkündür (Lima ve ark., 2010). Bu durum, juvenil idiyopatik artrit, aktif sistemik lupus eritematozus ve primer progresif multipl skleroz gibi aktif otoimmün hastalıkları olan hastalarda neden TREC düzeylerinin azaldığını açıklar. Juvenil idiyopatik artritli pediatrik hastalarda sinovyal sıvıdaki T hücre kısmını tanımlamak için TREC seviyeleri kullanılmıştır. Sinovyal sıvıda T hücrelerinde bir değişiklik olduğunu gösterilmiş, bu da artmış proliferasyon, klonal TCR kısıtlamasına ve indirgenmiş T hücre üretimine sekonder olarak kabul edilip hastalık fenotipi ile korele edilmiştir (Amariglio ve ark., 2011).

TREC ölçümü ayrıca kemik iliği naklinden sonra T hücre immün rekonstitüsyonunu izlemek için kullanılır. Kemik iliği transplantasyonu sonrası immün rekonstrüksiyonu test etmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. TREC'lerin ölçümü ve TCR repertuarının analizleri bu amaçla kullanılan en gelişmiş testlerdir. TREC'lerin transplantasyondan hemen sonra varlığı, kemik iliği transplantasyon prosedürünün sonucunu tahmin edebilecek en iyi erken belirteç olarak bulunmuştur (Amariglio ve ark., 2011). RAG2 eksikliği olan SCID hastalarında kemik iliği transplantasyonu sonrası hücre immün iyileşmesi; TREC ve KREC seviyelerine bakılarak erken T ve B hücre kinetiğinin izlenmesini sağlamıştır. Bu nedenle bu testlerin, kemik iliği nakli yapılmış hastaların sonuçlarını izlemek ve spesifik tedaviyi uyarlamak için kullanılması önerilmektedir (Lev ve ark., 2012).

HIV enfeksiyonu timusun disfonksiyonuna neden olarak yayılmasına neden olur. Bu nedenle, HIV hastalarında TREC ölçümleri tedaviden önce ve tedavi sırasında oldukça faydalıdır. HIV'li çocukların, HIV'li yetişkinlerden daha iyi bir timik fonksiyona sahip oldukları gösterilmiştir, bu da artmış timik fonksiyonunun, en azından çocuklarda bağışıklık sisteminin yeniden yapılandırılmasında baskın bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Birlikte ele alındığında, bu bulgular TREC seviyesinin HIV ile enfekte hastalarda timik fonksiyonun yararlı bir biyobelirteci olabileceğini göstermektedir (Hansen ve ark., 2009).

TREC ölçümü, timik aktivite ve T hücre sayılarını doğru bir şekilde tahmin edebildiğinden, T hücre immünesinin etkilendiği bilinen birçok birincil veya ikincil

immün yetmezlik hastalıklarında kullanılması önerilmiştir. SCID veya başka bir T hücresi lenfopenisi olan bir hastanın herhangi bir rutin immünolojik çalışmasında TREC seviyelerine bakılmalıdır (Amariglio ve ark., 2010). Yukarıda açıklanan nedenlerden dolayı TREC yenidoğan taramalarında ağır T hücre lenfopenisi için en iyi tarama testi olarak kabul edilmektedir.

Yenidoğan taramasında maliyet-etkinlik kavramının geliştirilmesi ile TREC tarama programına ilaveten popülasyon ölçekli tarama programlarına dahil edilebilecek uygun olan hastalıkların belirlenmesinde kullanılacak farklı biyo-belirteçler ile çoğaltılması önerilmiştir. Primer agammaglobulinemilerin klinik teşhisine benzeyen B-hücrelerinin yokluğu ile karakterize olan ağır doğuştan gelen immün yetmezlik hastalıkları, TREC'lerle birlikte bir multipleks qPCR reaksiyonuyla KREC'lerin ölçülmesi sırasında tespit edilebilir. Her iki biyobelirteç aynı kurutulmuş kan örneği örneğinde değerlendirilebileceğinden, çoğu alt yapı ve teknik kaynaklar, multipleks testi yapıldığında ek çaba veya harcama olmaksızın kullanılabilir. KREC değerlendirmesinin ek teknik maliyeti, toplam tahlil maliyetlerinin % 6'sından daha azdır. Bununla birlikte, yenidoğan taraması için bir araç olarak, kurutulmuş kan örneğindeki KREC kopya sayılarının analizi, geniş uygulama beklenmeden önce yeterli hassasiyet ve özgüllüğün sağlanması için daha fazla doğrulama gerektirir (Borte ve Reichenbach, 2015).

KRECs düşüklüğünde akla gelebilecek birincil primer immün yetmezlikler:

- SCID (T-B-)
- XLA
- XLA-benzer bozukluklar
- Nijmegen kırık sendromu

şeklinde olup, maternal immünoşüpresyon, ritodrine gibi diğer maternal ilaçlar KRECs düşüklüğünde akla gelebilecek ikincil nedenlerdir (King ve Hammarström, 2018).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışma Popülasyonu ve Örnek Toplama

Çalışmaya başlamadan önce Ondokuzmayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 09.06.2016 tarihli ve B.30.2.ODM.0.20.08/368 sayılı Primer immün yetmezlik hastalıklarının PCR ile yenidoğanlarda tarama ile erken teşhisi başlıklı OMÜ KAEK 2014/678 karar nosu ile etik kurul olur yazısı alındı (Ek 1). Ayrıca T.C. Sağlık Bakanlığına bağlı, Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu, Samsun İli Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliğinden Samsun ilindeki tüm hastanelerden örnek toplanması için 54103609/604.02 sayılı yazı ile (Ek 2) izin alındı. Ancak ortaya çıkan insan kaynaklı sorunlardan dolayı bu çalışmaya sadece Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Medikalpark Samsun Hastanesinde Ekim-2015 ve Aralık-2016 tarihleri arasında dünyaya gelen tüm yenidoğanlar dâhil edildi.

Çalışmada kullanılan malzeme ve kitler MZM Sağlık Ürünleri ve Laboratuvar Hizmetleri Sanayi ve Ticaret LTD. ŞTİ tarafından hibe edilmiştir (Ek 3).

Ailelerinden muvafakat formu (Ek 4) alındıktan sonra ilk 72 saatte Türkiye’de uygulanan tarama programları için topuk kanı örneği alınırken bebeklere zarar vermeden birkaç damla topuk kanı ayrı bir Guthrie kâğıdına emdirildi (Ek 5).

Topuk kanı alınırken ilk önce gutrie kağıdı kaydedildi. Yenidoğanlar için demografik ve klinik veriler elde edildi. Topuk kanı örnekleri doğumdan sonraki ilk 3 gün içinde alındı. Bunun için yenidoğan topuğu alkolle silindi. İlk damla kan boşa akitildi. Daha sonra gelen damlalar gutrie kâğıdına halkayı taşırmayacak şekilde emdirildi. Alınan örnekler oda ısısında, ışıktan uzak bir şekilde 4-5 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler +4°C’de muhafaza edildi. Örnekler daha sonra OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalında bulunan Moleküler Genetik laboratuvarında saklandı.

Toplam 1960 örnek çalışıldı. Bu örneklerin kayıtlanma sırasına göre ilk 571 tanesi 2 defa çalışıldı. Sonuç elde edilemeyen örnekler ikinci defa çalışıldı. İki çalışma sonucunda da başarısız olan örnekler çalışmadan çıkarıldı. İlk çalışma sonucunda TRECs ve KRECS değerleri düşük bulunan örneklerin aynı gutrie kağıdından ikinci bir örnek alınarak testleri tekrar edildi. İkinci örneklerde de sonuçları düşük bulunan örnekler patolojik olarak değerlendirildi ve klinik verileri incelendi. Dört tane tanısı önceden bilinen patolojik örnekler de çalışmanın güvenilirliğini test etmek için kullanıldı. Erken doğum ve çoklu gebelikler ayrıca değerlendirildi.

3.2. Topuk Kanlarından DNA Saflaştırılması

- Bu çalışmada 1-2015-TK ürün numaralı Mabtech diagnostic ‘SCREEN-ID primer immün yetmezlik hastalıkları için yenidoğan tarama kiti’ kullanıldı.
- Çalışma 96’lık hazır plaklar ile yapıldı.
- Çalışmaya başlarken ilk önce filtre plağı alınıp alt tarafı elüsyon bandı ile kapatıldı.
- Her bir numuneden 3,2 mm’lik disk şeklinde örnek delgeç yardımı ile 96’lık filtre plağına alındı.
- Bu aşamada A1-A12 kuyucukları boş bırakıldı çünkü ileride bu kuyucuklar standart olarak kullanıldı.
- Yine filtre plağında ilgili kuyucuklarına kontrol örnekleri kondu.
- Daha sonra üzerlerine 150 µl Screen-ID yıkama solüsyonu konulup, plak filtre bandı kapatıldı.
- Hazırlanan filtre plağı ters çevrilerek 200g’de 30 saniye Nüve-NF 400 plate santrifüjü (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret AŞ.) ile santrifüj edildi.
- Buradan Euroclone T-shaker çalkalama cihazına alınıp 650 rpm’de 20 dakika çalkalandı.
- Daha sonra plağın alt tarafındaki elüsyon bandı çıkarıldı.
- Filtre plağı 96’lık toplama plağına üzerine alındı.
- Nüve-NF 400 plak santrifüjü aracılığı ile 1850 g’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Sonra filtre bandı çıkarıldı ve plaklar tekrar 1850 g’de 1 dakika santrifüj edildi.
- -20°C’de muhafaza edilen elüsyon plağı alındı ve oda ısısına getirilip 1850 g’de 10 saniye santrifüj edildi.
- Ardından elüsyon plağının üzerine filtre plağı ters çevrilerek konuldu.
- Örnekler 96’lık elüsyon plağına 2500 g’de 2 dakika çevrilerek aktarıldı.
- Elüsyon plağının üstü elüsyon bandı ile kapatıldı.
- Filtre plağının kapağı kapatılarak kenarda bekletildi.
- Elüsyon plağı kısaca vorteks ve santrifüj edildi.
- Daha sonra elüsyon plağı AppliedBiosystems 2720 Thermal Cycler’da 99 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Buradan çıkan plak 1850 g’de 30 saniye santrifüj edildi.

- -20°C'de muhafaza edilen quantitative PCR (qPCR) plağı alındı. Oda ısısına getirildi.

- 1850 g'de 30 saniye santrifüj edildi.

- Filtre plağı qPCR plağının üzerine konuldu.

- Elsüyon plağında ters çevrilerek filtre plağı üzerine konulup plaklar sıkıca birleştirildi.

- Sonra 1850 g'de 2 dakika santrifüj edilip elde edilen DNA örneği 96'lık hazır qPCR plağına aktarıldı.

- qPCR plağının üzeri optik qPCR bandı ile kapatılıp, 200 g'de 30 saniye santrifüj edildi.

3.3. Real-Time Kuantitatif Multipleks PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilen devrim niteliğindeki bir yeniliktir. Bu zamandan beri, az miktarda DNA ile spesifik dizileri çoğaltıp, tespit edebildiğinden başta biyomedikal araştırmalar olmak üzere bir çok alanda kullanılmaktadır. Örneğin az bir miktarda mRNA örneğinden komplementer DNA elde edilip PCR ile çoğaltarak anlamlı veriler elde edilir. Amplifikasyon ürünlerinin (amplikonlar) artmış seviyelerine ek olarak, özellikle yöntem klinik bir ortamda gerçekleştirilecekse farklı laboratuvarlar arasındaki ölçümlerin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği önemlidir. Bu durum, sağlık hizmetleri maliyetlerinin azaltılmasının yanı sıra hasta sonuçları için de kritik bir öneme sahiptir çünkü tıbbi bakım bütçelerinin yaklaşık üçte biri, teşhis ile ilgili ölçümlerden ve testlerden kaynaklanmaktadır (Hawkins ve Guest, 2017).

Kuantitatif PCR'da kullanıcılar bir PCR reaksiyonunun ilerlemesini gerçek zamanlı olarak izlemelerine olanak sağlar. Kısaca, bu yöntemde DNA tabanlı diziyeye özgü bir prob olan ve bir ucunda floresan veren bir molekül ve diğer ucunda bu floresanı emen bir molekül kullanılır. Floresan yayan molekülün floresan emen moleküle olan yakınlığı, floresanın tespit edilmesini önler. Taq polimerazın 5' - 3' ekzonükleaz aktivitesi ile floresan emen prob kesilir ve floresan yayan molekül ışımaya yapar. Böylelikle, her bir PCR döngüsü sırasında floresan yayan prob tarafından hedeflenen cDNA amplikonundaki artış, probun ayrılmasına ve floresan yayan probun serbest bırakılmasına bağlı olarak floresanda orantılı bir artışa yol açar (Hawkins ve Guest, 2017).

Mevcut floresan yayan moleküller arasında, SYBR® Green (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, ABD), veya diziye özgü problemler olan Molecular Beacons (Newark, NJ, ABD), Scorpions (DxS Ltd) ve TaqMan® Problemleri (Roche Molecular Diagnostics; Basel, İsviçre) gibi çift iplikli DNA'ya bağlanan boyalar bulunur (Hawkins ve Guest, 2017).

Standart PCR'da olduğu gibi, qPCR'da replikasyonun eritme, yapıştırma ve uzatıp çoğaltma aşamalarına sağlayan, numuneleri hızla ısıtabilen ve soğutabilen bir termal döngüleyiciye ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, qPCR durumunda, probun uyarılmasından sonra yayılan flüoresansın saptanması için termal döngüleyici, her bir numuneyi spesifik ışık dalgaları ile aydınlatılabilme kabiliyetine sahip olmalıdır (Hawkins ve Guest, 2017).

PCR normal olarak yaklaşık 30 kez tekrarlanan bir dizi sıcaklık değişikliklerinden oluşur. Her döngü iki veya üç adımdan oluşur. Üç kademeli döngü yaklaşımında, ilk aşama, çift sarmallı nükleik asit zincirlerinin (denatürasyon) ayrılmasına izin veren yaklaşık olarak 95 ° C'de gerçekleştirilir. İkinci aşama primerlerin DNA / cDNA şablonuna bağlanmasını sağlamak için 55 ° C civarında gerçekleşen fazdır (yapışma). Son olarak üçüncü adım, DNA polimerazın (uzatma) kabiliyetinin polimerizasyonu kolaylaştırmak için 72 ° C'de gerçekleştirilir. İki adımlı döngüleme yönteminde, yapışma ve uzatma aşamaları yapışma sıcaklığında birleştirilir (Hawkins ve Guest, 2017).

qPCR'de, yaklaşık 40 döngü gerçekleşip, her döngüde kullanılan sıcaklıklar ve ilişkili zamanlar, kullanılan polimeraz, deoksiribonükleotidlerin (dNTP'ler) konsantrasyonu ve primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Hawkins ve Guest, 2017).

Genel olarak, qPCR'de iki analiz yöntemi kullanılır: göreceli kuantifikasyon ve mutlak kuantifikasyon. Göreceli kuantifikasyon miktar, oranmetrik farkların ölçülmesi için numune içindeki standart DNA / cDNA'larla karşılaştırmaya dayanmaktadır. Mutlak kuantifikasyon yaklaşımı, bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak bu eğrinin DNA standartları ile karşılaştırılması ile ortaya çıkan ampliconların kesin sayısını verir. Bu yöntemde, numunedeki DNA / cDNA ve standartların PCR'larının aynı amplifikasyon verimliliğine sahip olmasını gerektirir (Hawkins ve Guest, 2017).

qPCR; araştırma çalışmalarında yaygın kullanıma ek olarak, klinik çalışmalarda, hastalık ilerlemesinin veya tedaviye yanıtın izlenmesi için belli kanser durumunun değerlendirilmesi gibi biyobelirteçlerin keşfine yönelik birçok çalışma alanında uygulanmıştır (Hawkins ve Guest, 2017).

Real-Time PCR Protokolü

- Real-time PCR için 96'lık plaklar ile uyumlu olarak çalışabilen AppliedBiosystems 7500 FastStart Real-time PCR cihazı kullanıldı.

- TaqMan solüsyonları için Standart eğri tipi çalışma seçildi. qPCR standart döngü modunda uygulandı.

- Yazılım programı 7500 Software v.2.0.6 kullanıldı. Hedef ve pasif referans işaretlemeleri için;

FAM (NFQ-MGB): TRECs

VIC (NFQ-MGB): KRECs

NED (NFQ-MGB): β -aktin (ACTB)

ROX: Pasif Referans problemleri kullanıldı.

Standart eğrinin belirlenmesi için kitin çalışma protokolüne göre;

A1-A2 kuyucukları: STD#5 100.000 kopya TREC ve KREC, 2.000.000 kopya ACTB

A3-A4 kuyucukları: STD#4 10.000 kopya TREC ve KREC, 200.000 kopya ACTB

A5-A6 kuyucukları: STD#3 1.000 kopya TREC ve KREC, 20.000 kopya ACTB

A7-A8- A9 kuyucukları: STD#2 100 kopya TREC ve KREC, 2.000 kopya ACTB

A10-A11-A12 kuyucukları: STD#1 10 kopya TREC ve KREC, 200 kopya ACTB

olarak tayin edildi (Şekil 8).

Reaksiyon hacmi 96'lık plaklarda hazır geldiği için 20 μ l olarak belirlendi.

Çalışma PCR koşulları Tablo 2'de belirtilip Şekil 9'da gösterildi.

3.4. Kalite Kontrolleri

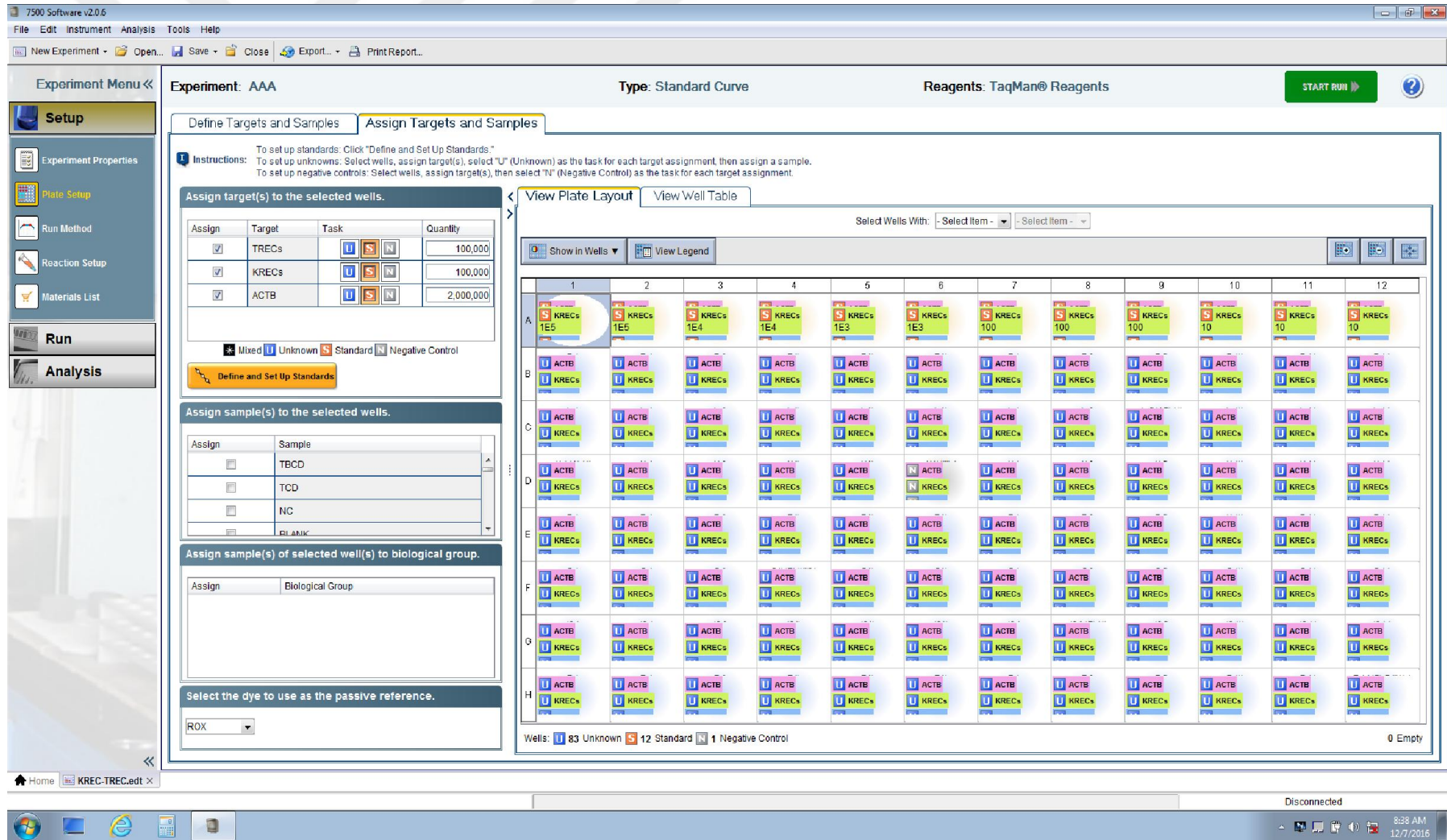
Plazmitlerden elde edilen ve kopya sayısını bildiğimiz 5 farklı standart, ayrıca T hücre, B hücre ve her ikisinin de eksikliği bilinen örnekler ile boş bir gutrie kâğıdı ve içerisinde örnek bulundurmayan bir plak kuyucuğu iç kontrol olarak kullanıldı. Son olarak, tanısı daha önceden konulan dört örnek de pozitif kontrol olarak kullanıldı

Tablo 2: Real-Time PCR koşulları

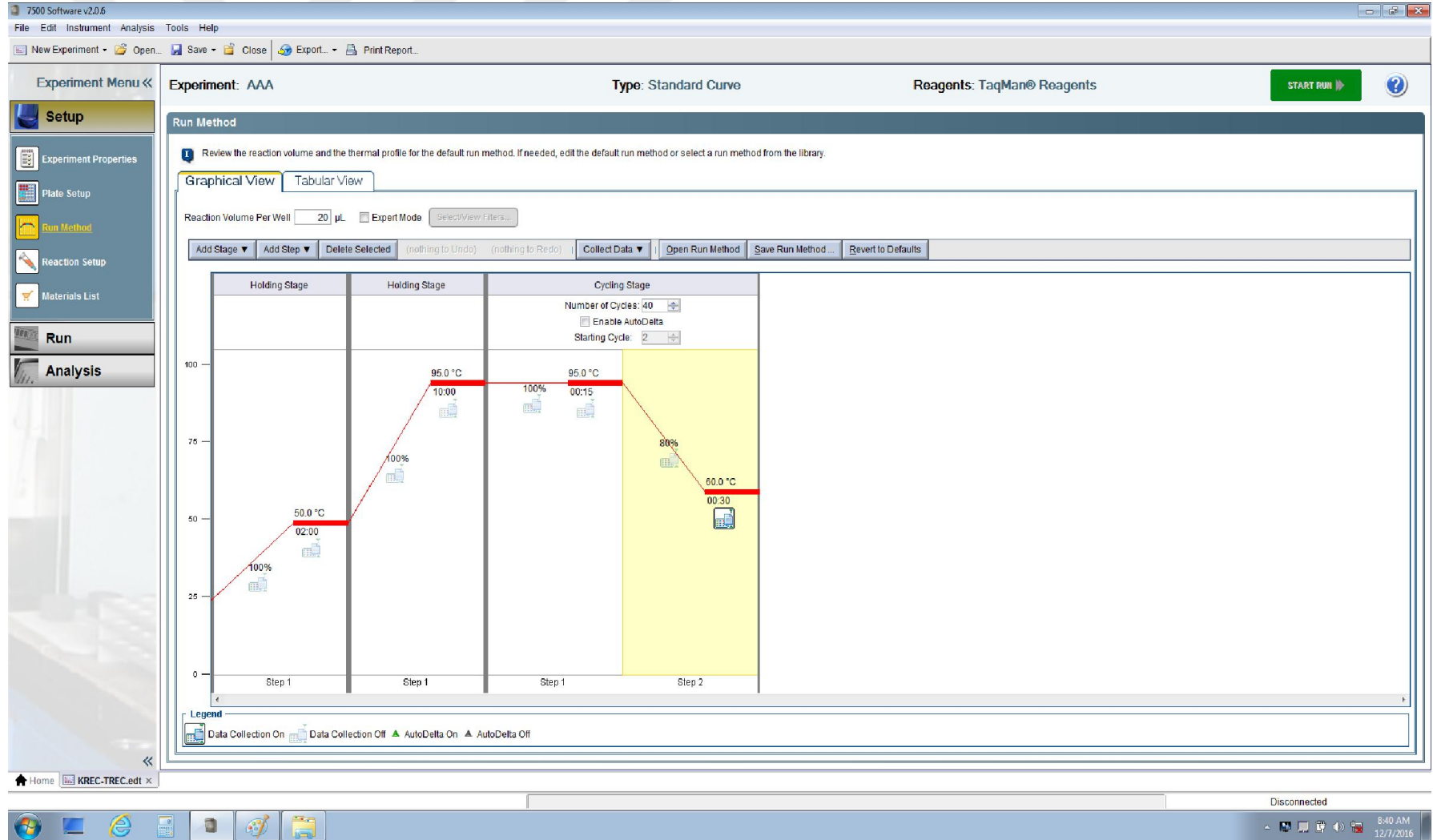
Basamak Adı	Isı	Süre	Isı Artış Hızı	Döngü
Bekleme Basamağı	50°C	2 dakika	2,5°C/sn	---
Bekleme Basamağı	95°C	10 dakika	2,5°C/sn	---
PCR Basamağı	95°C	15 saniye	2,5°C/sn	40
PCR Basamağı	60°C	30 saniye	1,98°C/sn	40

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm istatistiksel hesaplamalar IBM SPSS v20 yazılımı (SPSS v20, inc. Chicago, IL, USA) kullanılarak yapıldı. Çalışmanın analizi yapılırken iki defa çalışma yapılmasına rağmen Tablo 3'e göre gerek ACTB gerek KREC ve TREC kopya sayıları belirtilen referans aralığının altında olan örnekler çalışmadan çıkarıldı. Örnekler 2 grupta analiz edildi. Birinci grupta duplike örnekler, ikinci grupta ise term ve preterm örnekler analiz edildi. Tüm yapılan istatistiksel testler tabloları ve değerlendirme sonuçları bulgular kısmında paylaşılmıştır.



Şekil 8. 7500 Applied Biosystems FastStart Software çalışma ana ekranı



Şekil 9. Real-Time PCR koşulları ekran görüntüsü

3.6. Sonuçların Yorumlanması

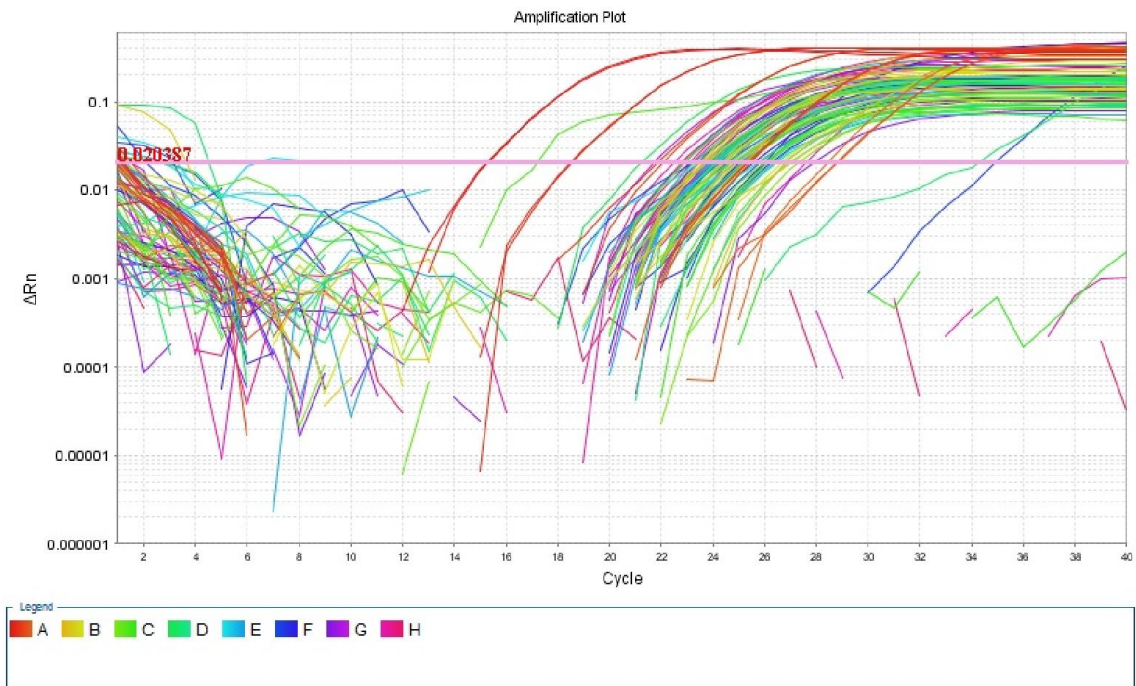
RT-PCR çalışması bittikten sonra (Şekil 10) örnekler, 7500 Software v.2.0.6' da örneklerin kopya sayısına göre analiz edildi. Bitmiş bir çalışmada örneklerin, standartların ve kontrollerin ACTB, TRECs ve KRECs açısından amplifikasyon grafikleri ve standart eğrileri Şekil 11 ve 12'de gösterildi. Örneklerin kopya sayıları çalışmada kullanılan standartlar dikkate alınarak otomatik olarak belirlendi. ACTB kopya sayısı, DNA eldesinin başarısını yansıtmak için internal kontrol olarak kullanıldı. Eğer ACTB kopya sayısı 1000/ μ l altında ise çalışma başarısız sayıldı. Buna göre; ACTB > 1000/ μ l olmak şartıyla TRECs < 7/ μ l ve KRECs < 7/ μ l düşük olması şüpheli PIY hastalığı olarak kabul edildi (Tablo 3).

Tablo 3. Real-Time PCR sonuçlarının yorumlanması

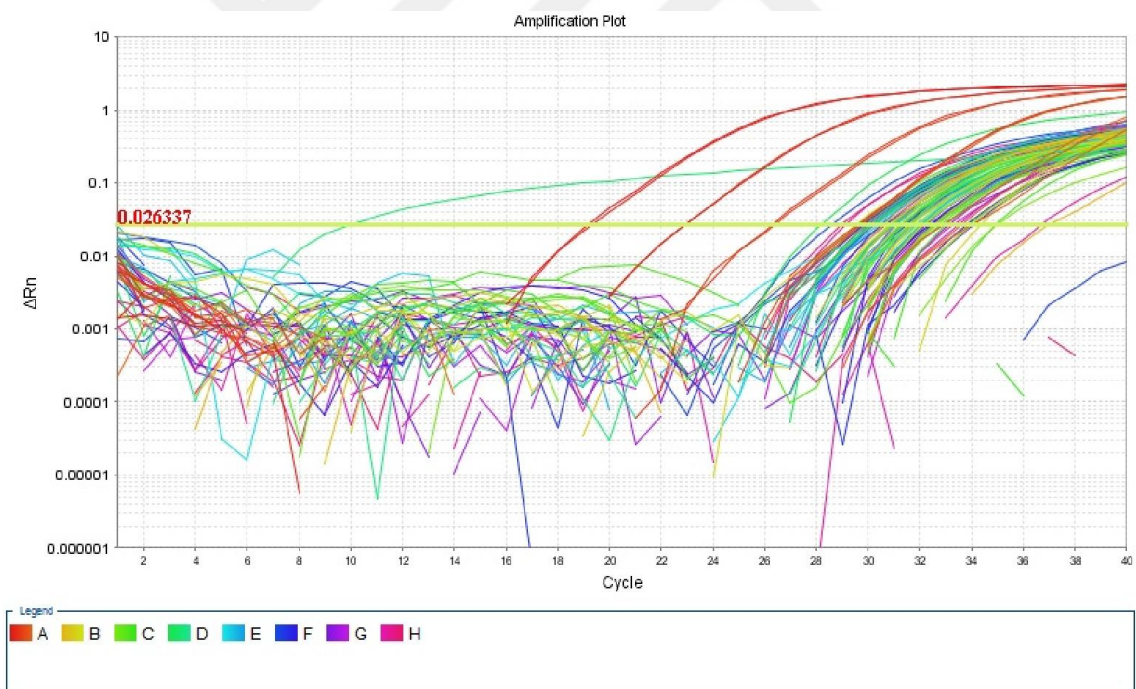
ACTB Kopyası	TRECs Kopyası	KRECs Kopyası	Sonuçların Yorumlanması
$\geq 1000/\mu\text{l}$	$> 7/\mu\text{l}$	$> 7/\mu\text{l}$	Normal
$< 1000/\mu\text{l}$	$> 7/\mu\text{l}$	$> 7/\mu\text{l}$	Normal
$< 1000/\mu\text{l}$	$< 7/\mu\text{l}$	$< 7/\mu\text{l}$	Başarısız
$< 1000/\mu\text{l}$	$< 7/\mu\text{l}$	$> 7/\mu\text{l}$	Başarısız
$< 1000/\mu\text{l}$	$> 7/\mu\text{l}$	$< 7/\mu\text{l}$	Başarısız
$\geq 1000/\mu\text{l}$	$> 7/\mu\text{l}$	$< 7/\mu\text{l}$	Düşük KRECs kopya sayısı
$\geq 1000/\mu\text{l}$	$< 7/\mu\text{l}$	$< 7/\mu\text{l}$	Düşük TRECs ve KRECs kopya sayıları
$\geq 1000/\mu\text{l}$	$< 7/\mu\text{l}$	$> 7/\mu\text{l}$	Düşük TRECs kopya sayısı



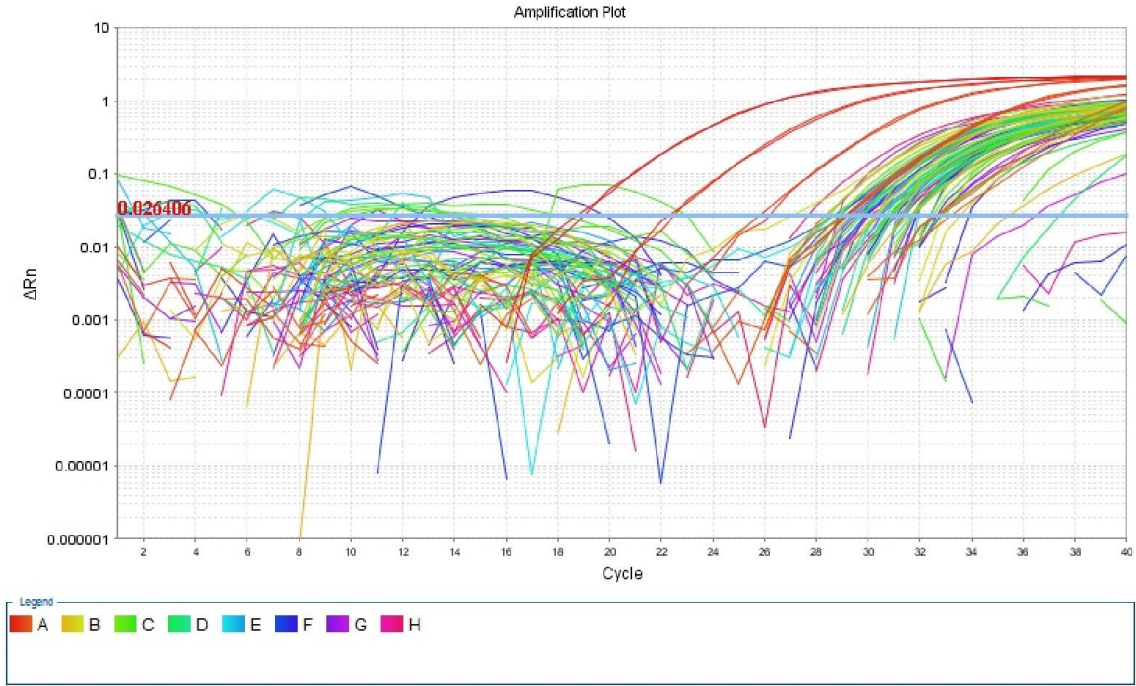
Şekil 10. Bitmiş bir çalışmanın ekran görüntüsü



(a)

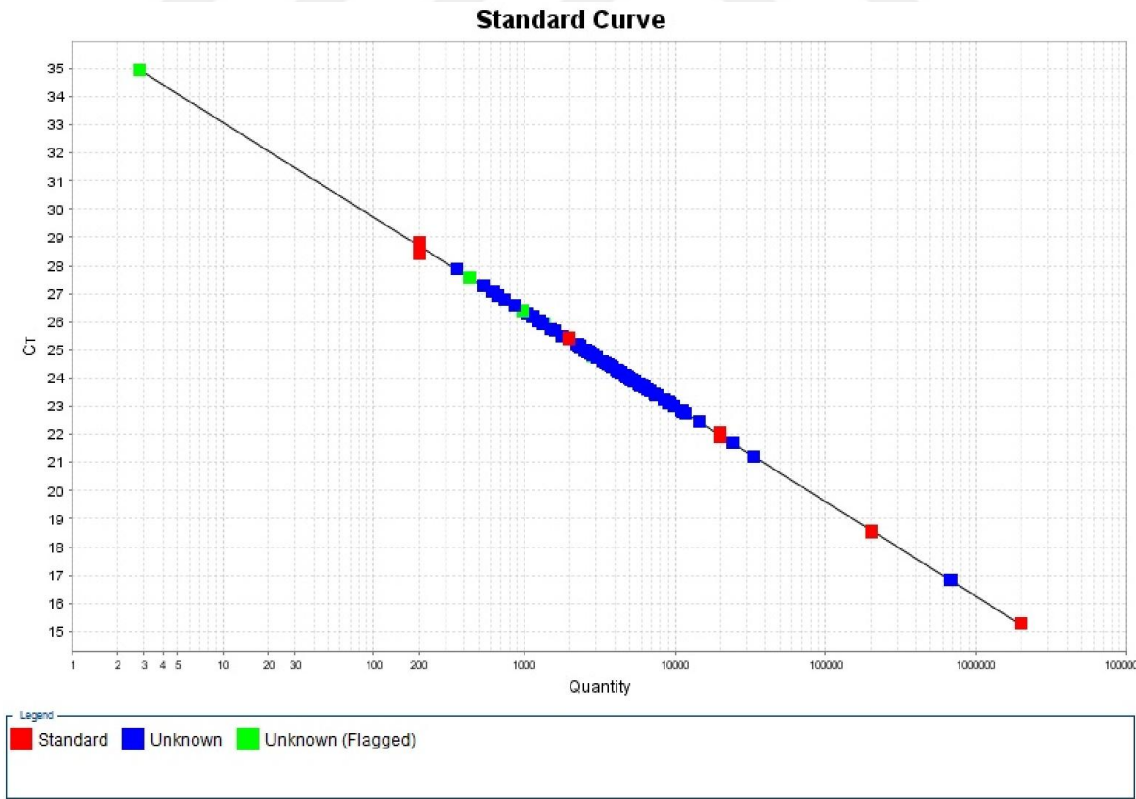


(b)

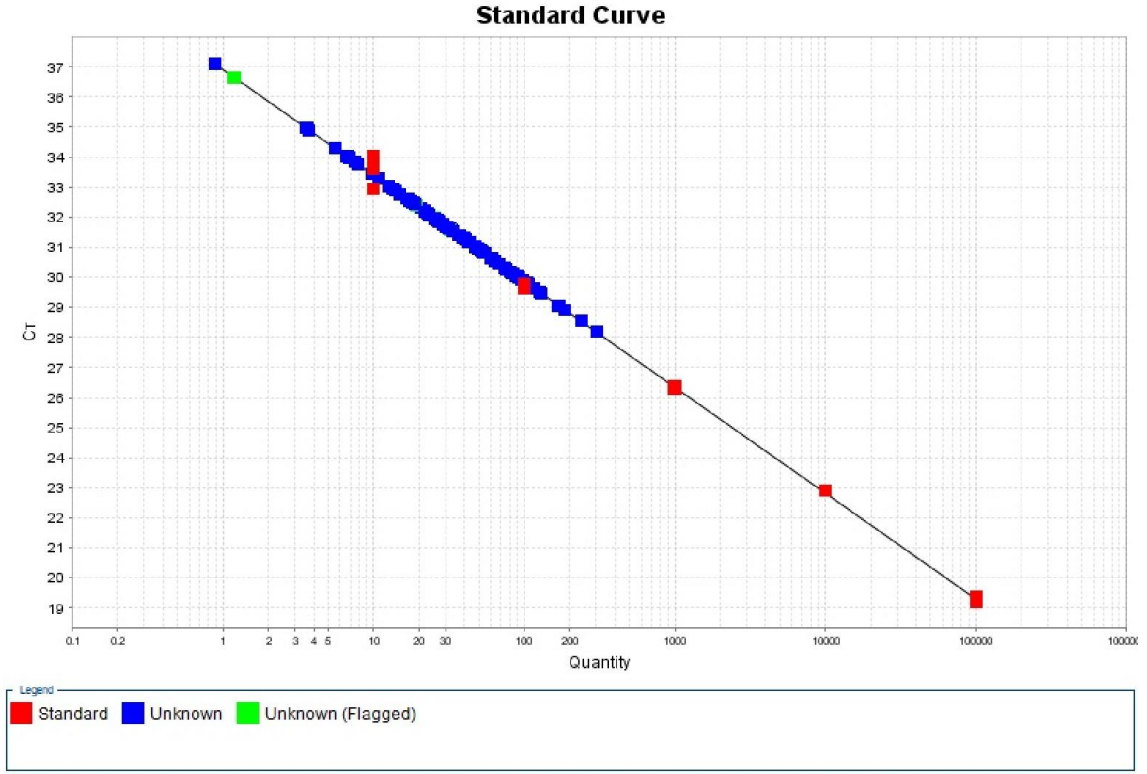


(c)

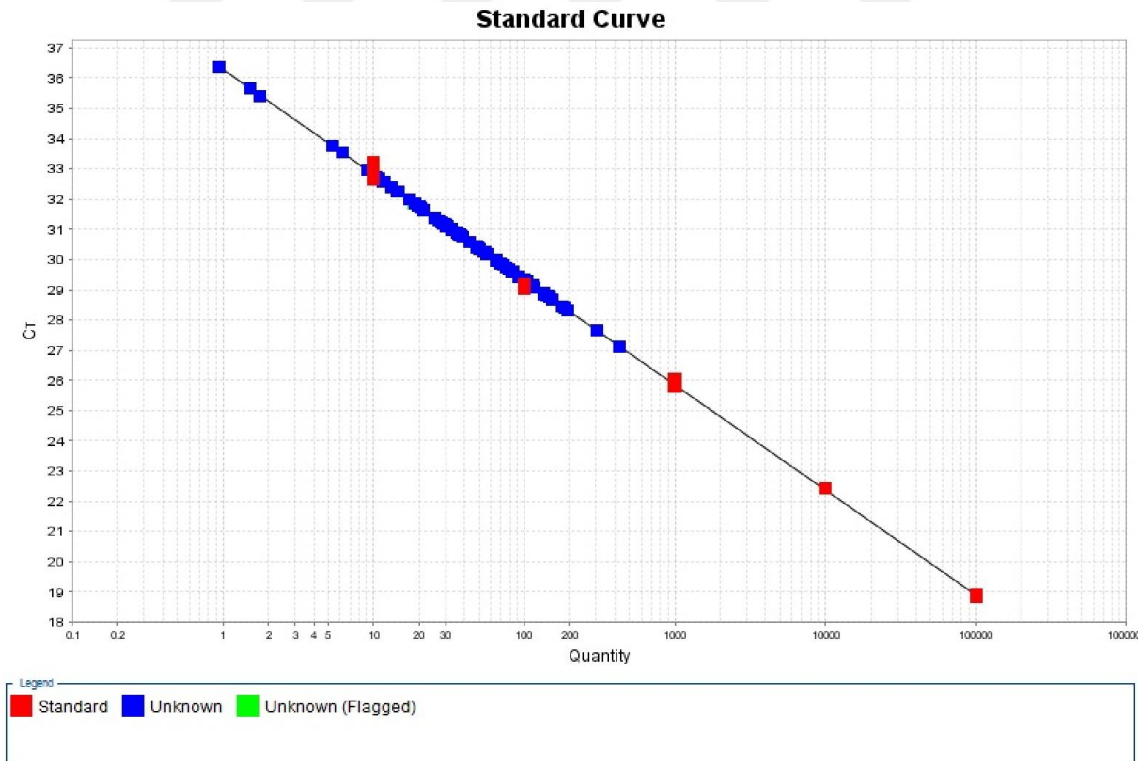
Şekil 11. Bitmiş bir çalışmanın amplifikasyon grafikleri (a) ACTB, (b) KRECs, (c) TRECs



(a)



(b)



(c)

Şekil 12. Bitmiş bir çalışmanın standart eğri grafikleri (a) ACTB, (b) KRECs, (c) TREC's

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Klinik ve Demografik Özellikleri

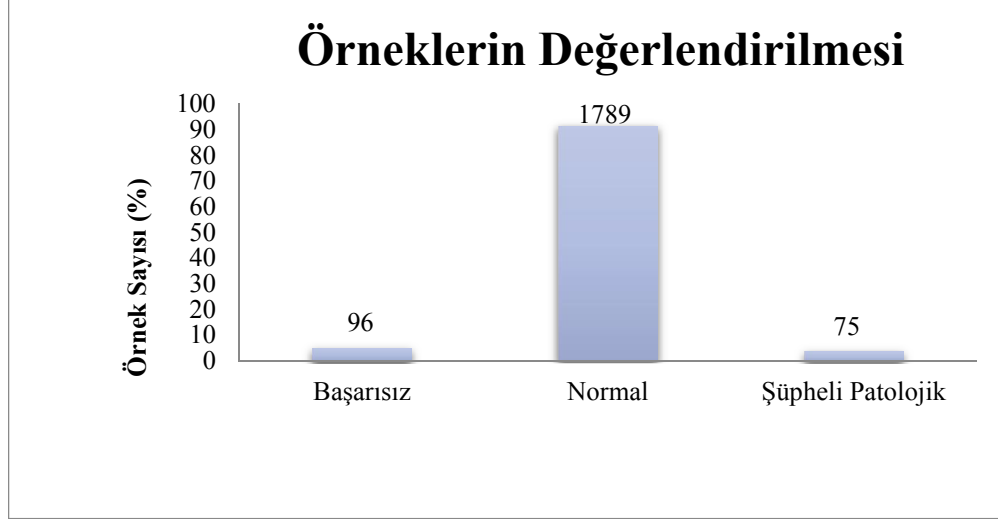
Test edilen örneklerin %52'si erkek (1007) ve %48'i kız (953) idi. Örneklerin %47'si OMÜ Tıp Fakültesi Hastanesinde (916), %53'ü ise Medikal Park (MP) hastanesinde (1044) dünyaya geldi. Çalışılan örneklerin %13'ünü (247) preterm, %87'sini (1713) ise term bebekler oluşturuyordu (Tablo 4).

Tablo 4. Örneklerin demografik ve klinik verileri

		Sayı	Yüzde
Cinsiyet	Erkek	1007	52
	Kız	953	48
	Toplam	1960	100
Doğum Yeri	OMÜ	916	47
	Medikalpark	1044	53
	Toplam	1960	100
Gebelik Yaşı	Term	1713	87
	Preterm	247	13
	Toplam	1960	100

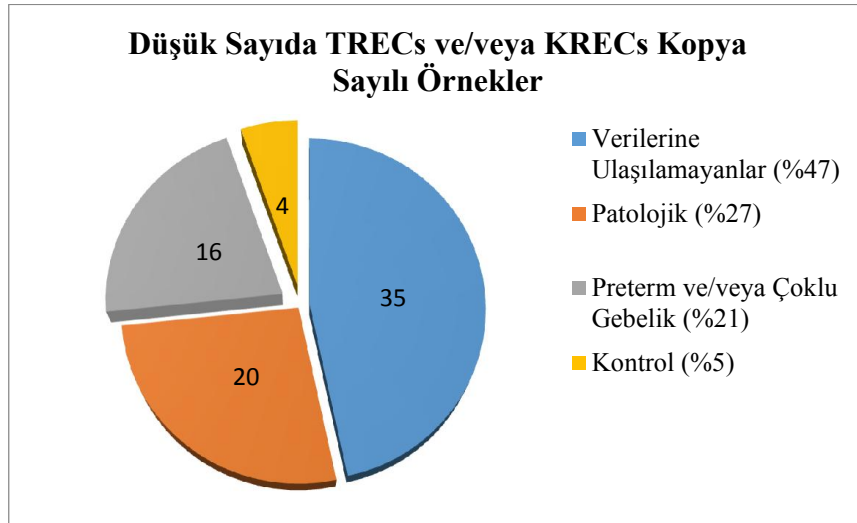
4.2. Veriler

Test edilen 1960 örnekten 96 tanesinin (%5) 2 defa çalışılmasına rağmen sonuç elde edilemedi. Başarısız sonuçların yorumlanmasında Tablo 3 esas alındı. Sonuç alınan 1864 örneğin ise 1789 tanesi (%91) normal iken 75 tanesi (%4) patolojik sonuç verdi (Şekil 13).



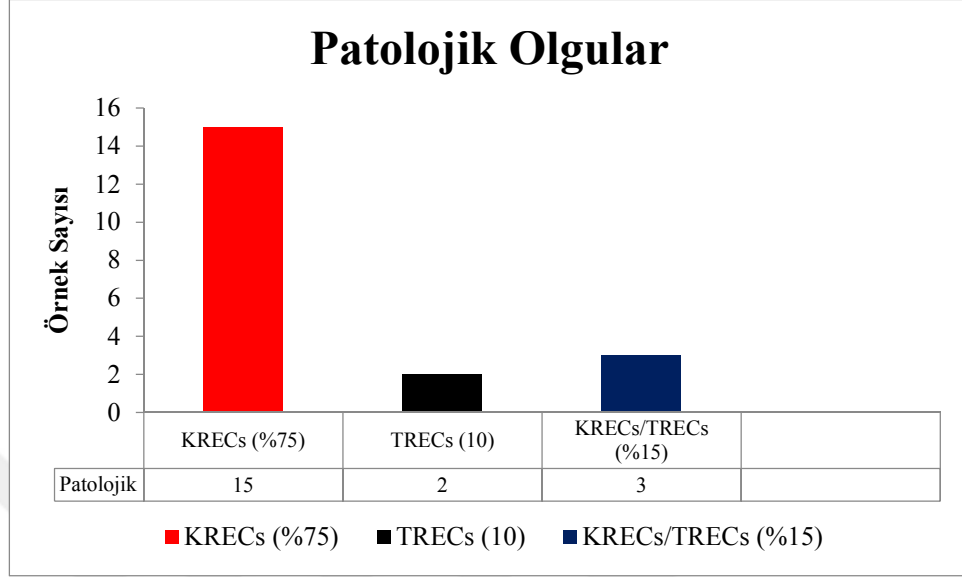
Şekil 13. Örneklerin genel değerlendirilmesi

75 şüpheli patolojik örneğin (Şekil 14) dört tanesi (%5) tanısını daha önceden bilinen dış kontrol vakaları (Tablo 5), 16 tanesi (%21) ise preterm ve/veya çoklu gebelik örnekleri idi. Geriye kalan 55 örneğin 35 tanesinin (%47) verilerine hiçbir şekilde ulaşılamazken, ulaşılabilen 20 örneğin (%27) yapılan retrospektif çalışmaları ve dosya taramaları sonucu klinikle anlamlı olabilecek patolojilerinin olduğu düşünüldü. Patolojik olgulardaki kopya sayısı düşüklüklerinin dağılımı Şekil 15’de gösterildi. Buna göre 20 olgunun 15 tanesinde (%75) KRECs kopya sayısı düşük bulunurken, 2 tanesinde (%10) TRECs ve 3 tanesinde (%15) ise KRECs-TRECs kopya sayılarının ikisi de düşük bulunmuştur.



Şekil 14. Düşük TRECs ve/veya KRECs kopya sayısındaki örneklerin dağılımı

Tablo 5’de gösterilen kontrol vakalarından biri 3 aylıkken ölen RAG1 gen ilişkili defekti olan SCID hastasıydı. 2 tanesi 1 yaşından önce tanı alıp takipde olan Agamaglobulinemi vakasıydı. Diğer kontrol vakası ise XLA tanılı bir hastaydı.



Şekil 15. Patolojik olgulardaki kopya sayısı düşüklükleri

Tablo 5. Kontrol Vakaları, Değerleri ve Bulguları

Sıra No	Olgu No	Bulgusu	Tipi	ACTB Kopya Sayısı	KRECs Kopya Sayısı	TRECs Kopya Sayısı	Cinsiyet
1	41	Agamaglobulinemi	KRECs-TRECs	3.772	5	6	E
2	602	Agamaglobulinemi	KRECs	2.480	4	27	E
3	631	XLA	KRECs	6.201	1	21	E
4	730	SCID, ex	TRECS	4.470	248	1	E

Term ve preterm patolojik olguların bulguları Tablo 6 ve 7 de gösterildi. Term patolojik olguların 6 tanesi (%30) kız, 14 tanesi (%70) erkek idi. 20 olgunun ulaşılan 6 (%30) hastasına Ig bakılmış olup, Ig sonuçları 4 hastada düşük bulunurken 2 hastada normal bulunmuştur. Olgulardan TRECs-KRECs kopya sayısı düşük bulunan 1 vakanın akraba evliliğinden doğduğu öğrenilmiş ancak sonrasında bu hastaya ulaşılamamıştır. TRECs ve KRECs kopya sayısı düşük bulunan diğer bir vaka ise SCID tanısı ile takip edilip İntravenöz İmmüoglobulin (IVIg) tedavisi almıştır. Yine diğer bir KRECs-TRECs düşüklüğü olan vakanın retrospektif bulgusunda işitme azlığı görülmüş ancak

hastaya daha sonra ulařılamamıřtır. TRECs dūřüklüğü olan olgulardan birine 10 aylıkken Ig bakılmıř ve dūřük bulunmuřtur. Diđer TRECs dūřüklüğü olan vakanın retrospektif bulgusunda lenfopenisi olduđu görülmüř ancak daha sonra hastaya ulařılamamıřtır.

Preterm vakalardaki patolojik olguların retrospektif bulgularına bakıldığında 2 vakanın erken dönemde öldüğü tespit edildi. TREC ve/veya KREC kopya sayısı dūřük olan pretermilerin dokuz (%56) tanesinin çoklu gebelik sonucu dünyaya geldiği öğrenildi. Bu olguların dört tanesinde ise lenfopeni ve/veya nütropenisi olduğu görüldü (Tablo 7).



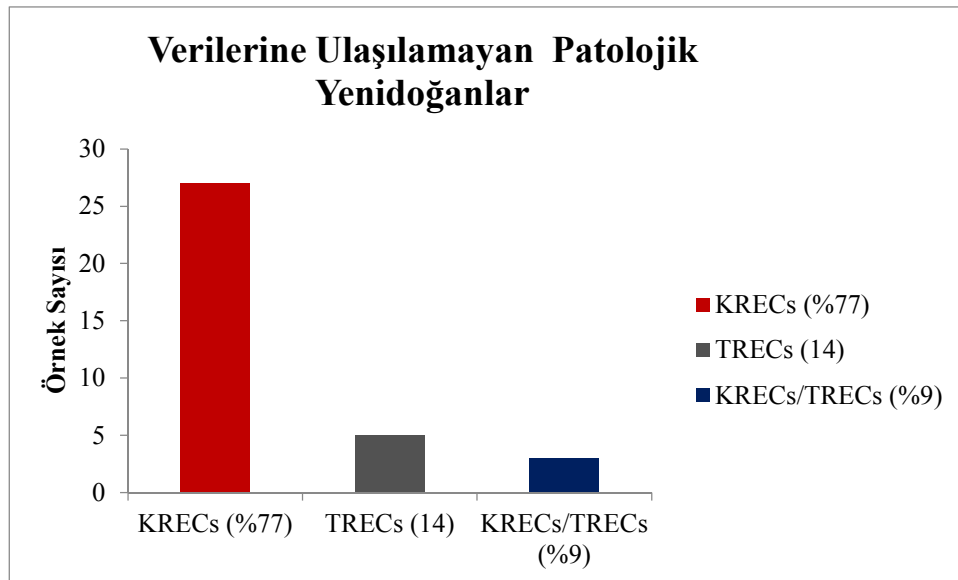
Tablo 6. TREC's/KREC's değerleri d'ş'k patolojik olgular, kopya sayıları ve retrospektif bulguları

Sıra No	Olgu No	Retrospektif Bulgular	ACTB Kopya Sayısı/µl	KREC's Kopya Sayısı/µl	TREC's Kopya Sayısı/µl	Ek Bulgular	Cinsiyet
1	116	Hipogamaglobulinemi	2.360	2	9	1 yaşımda Ig bakılmış d'ş'k çıkmış	K
2	219	Hipogamaglobulinemi ve nefrolityaz	3.224	6	17	Ig'ler normal çıkmış	K
3	246	Hipogamaglob'linemi	1.747	6	13	Yenidoğan menenjit geğirmış, Ig'ler bir yaşımda iken d'ş'k	E
4	248	Sepsis, Hipogamaglobulinemi, West sendromu?	3.167	24	6	10 aylıkken Ig'ler hafif d'ş'k çıkmış	K
5	480	3 aylıkken SCID?	1.435	4	5	Opere midgut volvulus, IVIG kullanmış	E
6	590	Lenfopeni, diabetik anne	2.678	6	48		E
7	686	Hipogamaglobulinemi, omfalit	1.901	4	58	6 aylıkken tanı konmuş, Ig'ler d'ş'k çıkmış	E
8	719	Lenfopeni	1.895	16	3		E
9	749	Anemi takipli	3932	4	28		E
10	874	Anne baba teyze çocukları	1.236	3	1		E
11	1181	Gelişme geriliği	3.475	5	19	Boyunda lenfoadenopati	E
12	1184	Gelişimsel kalça çıkıklığı ortopedi takipli	2.124	4	15		E
13	1202	Dismorfizm	3.055	3	8	Trigonosefali	K
14	1208	Nefrolityaz, Pelviktezi	1.637	3	25		K
15	1228	Hipogamaglobulinemi, midgut	1.502	5	20		E
16	1230	Mikrosefali, atopik dermatit	2.467	4	24	Ig'ler normal çıkmış	E
17	1234	D'zelmiş n'otropeni	2.261	3	17		E
18	1269	İşitme azlığı	3.064	5	5		K
19	1299	N'otropeni	1.075	3	33	Egzama	E
20	1313	Lenfopeni	1.664	6	22	Opere anal atrezi	E

Tablo 7. Preterm Vakalardaki TREC/KREC Düşük Kopya Sayılı Olguların Değerleri ve Bulguları

Sıra	Olgu	Retrospektif Bulgular	ACTB	KRECs	TRECs	
1	78	-----	1.024	5	33	Erkek
2	329	Üçüz, lenfopeni, eozinofili	1.963	6	5	Kız
3	343	600g, ex	1.338	4	54	Kız
4	480	Sepsis, Hipogamaglobülinemi, westsendromu	1.338	5	15	Erkek
5	599	Lenfopeni, sepsis	2.187	8	6	Erkek
6	718	Nötropeni	1.232	56	4	Kız
7	745	İkiz, Hipogamaglobülinemi, nötropeni	1.483	2	11	Kız
8	830	Hipogamaglobülinemi, midgut	1.224	3,	1	Erkek
9	970	İlk gün ex	1.006	3	11	Kız
10	1097	İkiz	1.324	8	5	Erkek
11	1109	İkiz	1.548	15	6	Erkek
12	1122	İkiz	1.516	3	46	Erkek
13	1215	Sindaktili, İkiz, 2300g, Hellp sendromu	1.060	1	6	Erkek
14	1223	İkiz	1.477	1	9	Erkek
15	1331	Herni ve İkiz	1.502	9	3	Erkek
16	1581	İkiz	1.372	1	4	Erkek

Kendilerine ve verilerine ulaşamayan şüpheli patolojik 35 olgunun kopya sayısı dağılımlarında ise %77'sinde (27 vaka) KRECs düşüklüğü, %14'ünde (5 vaka) TRECs ve %9'unda (3 vaka) TRECs/KRECs kopya sayısı düşüklüğü saptandı (Şekil 16).



Şekil 16. Ulaşamayan patolojik olguların sınıflandırılması

Çalışılan 1960 örneğin ACTB, KRECs ve TRECs kopya sayısı dağılımları, ortalama ve ortanca değerleri analiz edildi. Buna göre ACTB ortalama ve ortanca değeri sırasıyla 3720 ve 2914 kopya/μl'dir. Minimum ve maksimum ACTB kopya değerleri ise sırasıyla 112 ve 29178 kopya/μl'dir (Tablo 8).

Tüm olguların KRECs ve TRECs ortalama değerleri sırasıyla 36 ve 56 kopya/μl iken ortanca değerleri 25 ve 37 kopya/μl'dir. Tüm olguların minimum KRECs ve TRECs değerleri sırasıyla 0,2 ve 0,00 kopya/μl iken maksimum değerleri 522 ve 956 kopya/μl şeklindedir (Tablo 8).

Tablo 8. Tüm olguların ACTB-KRECs-TRECs kopya sayıları ortalama ve ortanca değerleri

	ACTB Kopya sayısı/μl	KRECs Kopya sayısı/μl	TRECs Kopya sayısı/μl
Ortalama	3720	36	56
Ortanca	2914	25	37
Standart Sapma	2816	34	62
Minimum	112	0,2	0,0
Maksimum	29178	522	956

Çalışmanın sağlıklı yürütülmesi için olgu numarasına göre ilk 571 örnek duplike olarak çalışıldı. Duplike çalışan örneklerin %58'i erkek, % 42'si kızdı. Yine bu olguların %46'sı Medikalpark hastanesinde doğmuşken, %54'ü OMÜ Tıp Fakültesinde dünyaya gelmiştir. Duplike çalışılan örneklerin %20'si preterm bebekler iken %80'i term bebeklerdi.

Örneklerin duplike çalışılması sonucunda 1. ve 2. çalışma şeklide analizleri ayrıca yapılmış olup kopya sayıları açısından kıyaslandıklarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Duplike çalışılan 571 örnekleğin birinci ve ikinci çalışma sonrası ACTB, KRECs ve TRECs kopya sayılarının karşılaştırılması

	1. Çalışma			2. Çalışma		
	ACTB Kopya sayısı/ μ L	KRECs Kopya sayısı/ μ L	TRECs Kopya sayısı/ μ L	ACTB Kopya sayısı/ μ L	KRECs Kopya sayısı/ μ L	TRECs Kopya sayısı/ μ L
Ortalama	3442	39	61	3612	35	61
Ortanca	2820	29	46	2928	25	44
Standart Sapma	2472	34	68	2821	32	53

4.3. Verilerin İstatiksel Testlerle Değerlendirilmesi

4.3.1. Term ve Preterm Yenidoğanların Karşılaştırılması

Yapılan Mann Whitney U testinde prematüre yenidoğanlar ile term yenidoğanlar ACTB, TRECs ve KRECs kopya sayıları açısından karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 12’de gösterildi. İstatistiksel analiz sonucunda prematüre ve term doğan çocuklar arasında %95 güven aralığı (CI) ile ACTB kopya sayıları (p değeri $<0,05$), %99,9 CI ile KRECs ve TRECs değerleri (p değeri $<0,01$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu. Preterm örneklerde ACTB Kopya sayısı ortalama 3489 kopya/ μ L iken ortanca değeri 2690 kopya/ μ L şeklinde bulunmuştur. Preterm örneklerin KRECs ve TRECS ortalama değerleri sırasıyla 29 ve 43 kopya/ μ L iken ortanca değerleri sırasıyla 20 ve 24 kopya/ μ L olarak hesaplanmıştır (Tablo 10). Bu durum pretermelerde kopya sayısı düşüklüğünü göstermektedir.

Tablo 10. Yenidoğanların doğum yaşına göre ACTB, KRECs ve TRECs değerlerinin karşılaştırılması

Parametre	Doğum Yaşı		P değeri	Yöntem
	Prematüre	Term		
ACTB	3489 \pm 3211	3751 \pm 2759	0,019 $<$ 0,05	Mann Whitney U
KRECs	29 \pm 25	37 \pm 35	0,000 $<$ 0,001	Mann Whitney U
TRECs	43 \pm 48	58 \pm 63	0,000 $<$ 0,001	Mann Whitney U

4. TARTIŞMA

1950'li yılların başında agammaglobulineminin keşfi ile yenidoğan primer immün yetmezlik hastalıkların alanı, yeni genetik mutasyonların keşfi, yeni moleküler ve genetik prensiplerin tanımlanmasıyla birlikte bir üst seviyeye ilerleyip devrim geçirmiştir (Ochs ve ark., 2014). Bu hızlı büyüme, yeni nesil dizileme (NGS) için yeni teknolojilerin geliştirilmesi ve membran, sitoplazmik veya nükleer proteinlerin tanımlanmasına ve sinyal yollarının işlevsel olarak değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Belki daha da önemlisi, PİY terimlerinin artık, enfeksiyonlara genel yatkınlık gösteren, otoimmüniteye, immün düzensizliğe, alerjik hastalıklara, otoinflamatuvar bozukluklara ve duyarlılığa, malign tümörlere dayandırılan ağır ve sıklıkla ölümcül olan genetik hastalıkları tanımlamak için kullanılmasıdır (Casanova ve Abel, 2007). PİY alanındaki bu gelişmeler tanı ve tedavide doğrudan hastalara fayda sağlasa da immün sisteminin nasıl çalıştığıyla ilgili yeni bilgilerin gelmesi, atipik klinik fenotipler, yeni sinyal yollarıyla ve karmaşık genetik mekanizmalarla karşılaştıklarında klinisyenler için yeni zorluklar da ortaya çıkmaktadır. Tanı ise tüm hastalıklarda olduğu gibi PİY için de en önemli kriterdir. PİY hastaları erken tanıdan faydalanarak hastalığın prognozu açısından önleyici, destekleyici terapötiklerden faydalanırlar. Tanı geciktiğinde, önemli sayıda çocuk hematopoietik kök hücre transplantasyonu veya gen tedavisi (şu anda Adenozin Deaminaz(ADA)-SCID ve X-SCID için mevcut) gibi kesin bir tedavi edici yöntemden faydalanmadan önce ölmektedir. Erken tanı, profilaktik antibiyotikler, antifungal veya antiviral tedavi ve immünoglobulin replasman tedavisi ile canlı aşıların önlenmesi gibi önleyici tedbirlerin zamanında başlatılmasını sağlar. Ek olarak, İnsan lökosit antijeni (HLA) uyumlu hematopoietik kök hücre vericileri için erken araştırmalar etkinleştirilmiş olur. Bu durum, donör tipi veya SCID tipine bakılmaksızın yaşamın ilk 3,5 ayında verilen HSCT ile % 95'e kadar hayatta kalma şansı varken (Gennery ve ark. 2010) daha sonraki dönemlerde verilen HSCT için % 76 sağkalım ile karşılaştırıldığında gerçekten çok önemlidir (Buckley ve ark., 1999).

Kısacası, tarama testi pozitif çıkan bebeklerin erken tanı almaları hem bebekler hem aileleri için çok faydalıdır. Erken tanı alan bebekler canlı aşılarından korunabilir, hastalığın kesin tedavisinden faydalanma şansı olur ve hayatta kalma oranları artar. Erken tanı ise en ucuz ve en hızlı yenidoğan tarama metodolojileri ile gerçekleştirilebilir. Son 13 yılda geliştirilen ve hızla tüm dünyada pilot çalışmaları yapıp hatta bazı bölgelerde rutin

tarama programına dâhil edilen TREC ve KREC yenidoğan immün yetmezlik tarama testi ilk defa bu çalışma ile Türkiye’de bir pilot bölgede de uygulanmıştır.

Bu çalışmada Samsun ilinde doğan kontrol örnekleri ile birlikte 1960 adet yenidoğan topuk kanı örneği çalışılmıştır. Çalışmamızda 1960 örneğin 20’sinde (%1) patolojik bulgular elde edildi. Sıklığın bu kadar fazla olmasının nedeni ise Türkiye’de akraba evliliğinin, diğer ülkelere nazaran daha fazla olmasıdır ki; Türkiye’de akraba evliliği görülme sıklığı %23,2’dir. Yani yapılan her 4 evlilikten yaklaşık olarak biri akraba evliliğidir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2016). Akraba evlilikleri ise otozomal resesif hastalıklar için ciddi bir risk faktörü olduğundan, bu çalışmada bulduğumuz yüksek insidans değeri de anlamlı olmaktadır. Bu sonuç da yenidoğanlarda primer immün yetmezlik taramasının gerekliliğini açıkça vurgulamaktadır.

Şüpheli PİY tanılı 20 örneğin üç tanesinde TRECs ve KRECs değerleri düşük bulundu. Bu vakaların birinde işitme azlığı, birinde lenfopeni ve diğerinde ise anne-babanın teyze çocukları olduğu tespit edildi. İki örnekte ise sadece TRECs değerleri düşük bulunup bu vakaların birinde sepsis ve hipogamaglobulinemi; diğerinde ise lenfopeni görüldü. Kalan 16 pozitif örnekte KRECs kopya sayısının 7 kopya/μl’nin altında olduğu görüldü. Bu vakaların klinik tablosuna bakıldığında hipogammaglobülinemiden gelişimsel kalça çıkıklığına kadar farklı yelpazede klinik belirtiler görüldü. Kontrol vakaların üç tanesinin önceden agammaglobülinemi tanısı vardı. Dördüncü kontrol vakası sonradan ex olan bir SCID hastasıydı.

Bu çalışmada testin güvenilirliğini test etmek için ilk 571 örnek aynı real-time cihazı ile iki defa çalışıldı. Yapılan duplike çalışmalar ve analizleri sonucunda testler arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Bu durum bize testin kendi içinde güvenilir olduğunu kanıtladı.

Primer immün yetmezlik hastalıklarının cinsiyet dağılımı ile ilgili literatürde bazı çalışmalar yapılmıştır. Rhim ve ark., 2012’de Kore’de yaptığı bir çalışmada da erkeklerde PİY görülme sıklığı kızlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Amerika’da 2014 yılında Kobrynski ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PİY hastalıklarının erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında da elde edilen sonuçlara göre patolojik olguların %70’inin erkek hastalar olduğu saptanmış olup literatürde yapılan cinsiyet ve PİY ilişkili çalışmalar ile uyumludur.

Uyguladığımız bu tarama testinde dikkat edilmesi gereken bazı parametreler vardı. Bunlardan bir tanesi yenidoğan immün yetmezlik taramasında hangi referans değerlerinin normal olarak değerlendirileceği konusunda görüş birliğinin olmamasıydı. Örneğin, Olbrich ve arkadaşlarının (2014) İspanya’da bizim çalışmamıza benzer bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada 1088 örnek ve 9 kontrol örneği çalışılmış, bunlardan 20 örnek (%1.87) için başarısız sonuç alınmıştır. Bizim çalışmamızda 1960 örnekten 96 tanesi (%4,9) başarısız sonuç vermiştir. Bu oranın bizde daha yüksek olmasının nedenleri örneklerin alınmasında ya da işlenmesinden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı çalışmadaki (Olbrich ve ark., 2014) örneklerin %48’i erkek, %52’si kız; term bebeklerin yüzdesi ise %67,5 olarak bildirilmiştir. Bu grup TRECs, KRECs ve ACTB kopya sayılarını gruplara (doğum yaşı, doğum kilosuna) bölerek analiz etmiştir. TRECs için ortalama değerleri 129-150 kopya/μl medyan değerleri 123-140 kopya/μl olarak bulmuşlardır. KRECs kopya sayıları ise ortalama 71-84 kopya/μl iken ortanca değeri 61-71 kopya/μl olarak ifade edilmiştir. ACTB değerleri ortalama 2017-2920 kopya/μl arasında iken, ortanca değerleri 2016-2911 değerleri arasında bulunmuştur. En yüksek TRECs, KRECs ve ACTB kopya sayıları sırasıyla 503,381, 7710 kopya/μl şeklinde bulmuşlardır. Çalışmamızda ise KRECs, TRECs ve ACTB için ortalama değerleri sırasıyla 36,55 ve 4.295 kopya/μl olarak hesaplandı. Burada ilginç olarak ACTB ortalama değerimiz Olbrich ve grubundan yüksek çıkmışken KRECs-TRECs ortalama ve ortanca değerlerimiz düşük çıkmıştır. Ayrıca bu grup sonuçları yorumlarken referans aralıklarını ACTB değeri 1000 kopya/μl üzerinde tutup KRECs için 10 kopya/μl altını TRECs için 15 kopya/μl değerlerini patolojik olarak değerlendirmişlerdir. Bu değerlendirmeler eşliğinde %0,75 patolojik bulmuşlar. İkinci defa bu örnekleri çalıştıklarında normal sonuçlar elde etmişler. Daha sonra KRECs için 4 kopya/μl ve TRECs için 8 kopya/μl altındaki değerleri patolojik olarak belirlediklerinde tüm örnekler normal aralıkta sonuçlar verirken kontrol örnekleri yine patolojik sonuç vermiştir. Bizim çalışmamızda ise TRECs ve KRECs 7 kopya/μl altı patolojik olarak değerlendirildi. Bu değer bizim kendi oluşturduğumuz referans değeri olup, optimize edilmesi gerekebilir. Literatürde bu konuda görüş birliği olmadığından bu tarz çalışmaların artmasıyla sağlam bir referans değeri bulunabilir. Olbrich ve arkadaşları preterm ya da doğum ağırlığı düşük olan yenidoğanlar için önemli bir değişiklik bulmamışlardır. Biz ise yenidoğanların %6,5’inde

düşük TRECs ve/veya KRECs kopya sayısı olan örnekler bulduk ve bunun anlamlı olabileceğini düşündük.

İspanya, Sevil’de Felipe ve arkadaşlarının (2016) 3 hastanede prospektif olarak yaptığı bir çalışmada referans aralıklarını ACTB değeri 700 kopya/μl üzerinde tutup KRECs için 4 kopya/μl altını TRECs için 6 kopya/μl altını patolojik olarak değerlendirmişlerdir. 18 iç 20 dış kontrol kullanılmışlardır. Çalışmada 5160 yenidoğan taramış olup örneklerin %51,2 erkek ve %74,6’sı term olarak bildirilmiştir. 109 örnek düşük ACTB kopya sayısına sahip bulunmuş ve bunlardan 32 tanesinde örnek miktarı yetersiz olduğundan tekrar çalışılmamış. Kalan 77 örnek tekrar çalışılmış ve 10 tanesinden yeni kan istemiş. Bu 10 örneğin 5 tanesi normal 5 tanesi pozitif sonuç vermiş. 5 pozitif örneğin 2 tanesinin çok erken doğum, iki tanesinin de annesinin immünoşüpresan kullandığı, 1 tanesinde de kromozomal anomali mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma ile preterm ve doğum ağırlığı düşük olan yenidoğanlarda TRECs ve KRECs değerlerini anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. %1,5 örneği tekrar çalışılmışlar, %0,19 vakadan ise tekrar örnek istemişlerdir.

Borte ve arkadaşlarının (2012) yaptığı bir çalışmada 2560 örnek çalışılmış; referans aralıklarını ACTB değeri 1000 kopya/μl üzerinde tutup KRECs için 10 kopya/μl altını TRECs için 15 kopya/μl altını patolojik olarak değerlendirmişlerdir. 160 örneği farklı real-time cihazlarında duplike olarak çalışmışlar ve sonuçları tutarlı bulmuşlardır. Bu çalışmada 6 örnek patolojik bulunmuş ve 1 örnekten sonuç alamamışlardır. Biz ise 571 örneği aynı şartlarda duplike çalıştık ve sonuçları tutarlı bulduk.

Somech ve arkadaşlarının (2013) İsrail’de yaptığı bir çalışmada 2010-2011 yıllarında doğan ve sonrasında SCID tanısı alan 7 hastanın tanı almadan önceki Guthrie kâğıtlarından ve sağlıklı kontrollerden TRECs ve KRECs seviyesine bakılmıştır. Burada referans aralıklarını KRECs için 8 kopya/μl ve TRECs için 30 kopya/μl’den az olanları patolojik olarak belirlemişlerdir ve bu şekilde tüm hastaları sağlıklı kontrollerden ayırmışlardır.

Adams ve arkadaşlarının (2014) İngiltere’de yaptığı çalışmada 5081 yenidoğan tarama kartı ve 18 tane SCID olduğu bilinen örnek çalışılmıştır. İlk başta TRECs için 40 kopya/μl altını patolojik değerlendirmişler. Sonrasında 20 kopya/μl’ye kadar düşmüşlerdir. SCID’li vakada en çok 15 kopya/μl TRECs belirtmişlerdir. Bu çalışmada prematüre ya da doğum ağırlığı arasında belirgin bir ilişki bulunamamıştır.

Audrain ve arkadaşlarının (2014) Fransa’da tek merkezde yaptığı çalışmada 5028 yenidoğan tarama kartı ve 8 pozitifliği bilinen örnekte TRECs kopya sayısına bakılmış ve 100 kopya/ μ l’yi sınır olarak belirlemişlerdir.

Thompson ve arkadaşlarının 2010 yılında Amerika’da yaptığı çalışmada 25.609 yenidoğan ve 9 tane SCID vakası çalışılmıştır. Taramaya alınan yenidoğanlarda immün yetmezlik saptanmamıştır. Bu çalışmada kullanılan yöntemin özelliği elde edilen DNA ile farklı parametrelere de bakılabilmek imkânı sağlanmıştır ve sadece TRECs taranmıştır. Bizim kullandığımız metot ise sadece tek bir reaksiyonluk çalışma için optimize edilmiş olup hem TRECs hem KRECs kuantifikasyonuna bakılmıştır.

Real-Time multipleks PCR Yöntemiyle PİY taramasında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri de bağışıklık sistemi gelişimini henüz tamamlamamış olan prematüre bebeklerden elde edilen sonuçların nasıl yorumlanacağıdır. Literatürde de bu konuda fikir birliği yoktur. Çalışmamızdaki olguların %13’ü prematüre olup ve bu oran çalışma süresince Samsun ilindeki prematüre doğum oranını bire-bir yansıtmaktadır. Preterm olguların %6,5’inden patolojik sonuç alınırken %11,7’sinden iki defa çalışılmasına karşın sonuç alınamamıştır. Bu nedenlerden dolayı preterm örnekler çalışılırken farklı bir algoritma kullanılması faydalı olabilir.

Yenidoğan taramalarında karşılaşılan ve bizimde karşılaştığımız bir diğer sorun ise ailelerin verdiği bilgilerin güvenilir olmasıdır. Çünkü pozitif bulduğumuz bir örneğe en hızlı şekilde telefon yoluyla ulaşmaktayız, yanlış ya da eksik verilen bazen yanlış kaydedilen telefon numaraları ailelere ulaşmamızı engellemiştir. Bizim çalışmamızda pozitif bulduğumuz 35 yenidoğanın detaylı bilgilerine yanlış veya eksik sunulan veriler nedeniyle ulaşamamıştır. Bu 35 olgunun 27 (%77) tanesinde KRECs, 5 (%14) tanesinde TRECs ve 3 (%9) tanesinde TRECs/KRECs kopya sayıları düşük bulunmuştur. Diğer bir durum ise ailelerin sağlık çalışanları ile işbirliği içinde olmayıp kliniğe çağırılmasına rağmen gelmemeleri durumudur. Belki de tüm bu problematik durumların nedeni ailelerin ve sağlık çalışanının yenidoğan taramalarının ciddiyetini bilmemelerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle ilk önce sağlık çalışanı bu konular hakkında yeterli bilgi ve deneyime sahip değil ise eğitime alınmalı ardından dönem dönem teste ya da denetlemeye tabi tutulmalıdır. İşin ciddiyetinin farkında olan bir sağlık çalışanı aileleri de bu ciddiyetle bilgilendirip gerektiği zamanlarda eğitebilmelidir.

Burada üzerinde durulması gereken diğerk bir durum ise immün yetmezlik tarama testi algoritmasıdır. ABD'de TREC ile yapılan ağır T-hücre lenfopeni taraması standartlaştırılmamıştır ve devam eden tarama programlarında yeni oluşan T-hücre sayısı için eşik değeriinde belirgin farklılıklara yol açan farklı yöntemler kullanmaktadır. Bu durum sonuç olarak, hasta geri çağırma sayısı ve tanı prosedürleri (floresan aktive edilmiş hücre sıralama, (FACS)) gibi durumlar açısından neredeyse on kat bir fark ortaya çıkarmıştır (Kwan ve ark., 2014) TREC taraması ile tanımlanan olası SCID'li bebeklerin yeterli takibini sağlamak ve yanlış pozitif sonuçların sayısını aynı anda sınırlamak için, tarama merkezleri klinik immünologlarla birlikte algoritmalar tasarlanmıştır. Çoğu durumda bu algoritma aşağıdakileri içerir:

Bütün bebekler TREC testi ile taranır. Sonuç normal ise, başka müdahale olmaması tavsiye edilir. TREC seviyeleri eşik değeriin altında olan bebeklerde, ilk tarama kartı qRT-PCR ile TREC ve β -aktin için yeniden test edilir. Eğer β -aktin seviyesi normale ve TREC'ler hala eşik değeriin altındaysa, birinci basamak sağlık hizmeti sağlayıcısı iki senaryo geliştirir: bunlardan birinci senaryo acil olanıdır ki eğer TREC's saptanamazsa, bebeğinin akım sitometrisi ile acil doğrulayıcı testlere ve bir klinik immünolog tarafından tedaviye ihtiyacı vardır. İkinci senaryo ise eğer TREC'ler saptanabilirse, yine de lokal referans değeriinin altındaysa, ikinci bir tarama kartın tekrar test edilir ve yenidoğanın takibi, TREC's ve / veya KREC's kopya sayıları için verilen ilk kuru kan örneğinden en az üç defa bağımsız test yapıldıktan sonra tekrarlayan patolojik test sonuçları olması durumunda başlatılır (Borte ve Reichenbach, 2015).

Takip prosedüründe ilk eylem olarak, doktor ve yenidoğanın ebeveynleri çocuğinin durumu hakkında ek bilgi elde etmek için temasa geçmelidir. (1. aşama). Tekrarlayan düşük TREC ve / veya KREC test sonuçları özellikle erken doğmuş bebeklerde (gebeliğinin 32. haftası), sendromlu hastalıklarda(örn., Trizomi 21 veya 22q11 mikrolelesyon), metabolik hastalıklarda (propionil-CoA karboksilaz eksikliği veya metilmalonik asidüri gibi) olabileceği için ciddi bir konjenital immün yetmezlik şüphesi varlığının değerlendirilmesinde ek inceleme bulgularının toplanması ve derlenmesi önemlidir (Borte ve Reichenbach, 2015).

Yenidoğanın ebeveynleri, ikinci ayrı kuru kan kartının incelenmesinden sonra bulgular normal olsa bile gecikmeden bilgilendirilmeli, sonuçlar tekrar düşük ise özel bir immün yetmezlik merkezinde test sonuçlarının öneminin ayrıntılı bir açıklaması

sağlanmalıdır. Ebeveynler bölgede bu durumlarla ilgilenen bir merkeze (2. aşama) yönlendirilmeli ve bu merkez de gelen hasta hakkında önceden bilgilendirilmelidir (Borte ve Reichenbach, 2015).

Daha sonra, eve yakın bir özel tedavi merkezi seçilmelidir. Ağır T- ve / veya B-lenfopeni şüphesi varsa, yoğun hijyen önlemleri alınmalı ve fırsatçı enfeksiyonları önlemek için muhtemelen erken, sıkı izolasyon yapılması gereken adımlardır. Bazen kemik iliği nakli veya gen terapisini gerçekleştirmek için, uzman bir nakil merkezine transfer gerekli olabilir. Primer immün yetmezlikli hastaların tedavisinde bu alanda sadece deneyim kazanmış olan merkezler seçilmelidir (Borte ve Reichenbach, 2015).

Tarama testlerinin karşılaştığı en büyük bariyer ise maliyet ve yarar oranlarının dengesiz olması, kısacası testin pahalı olmasıdır. Ancak yapılan maliyet-etkililik analizi SCID'in tarama yöntemi ile saptanmasının tıbbi sağlık harcamaları açısından ekonomik olduğu göstermiştir. Doğumda SCID'in saptanması sağlık bakım maliyetlerini önemli ölçüde artıran ve uzun süreli, pahalı yoğun bakım yönetimine ihtiyaç duyan komplikasyonların ortaya çıkmasından önce iyileştirici tedaviye olanak tanınmasından dolayı en önemli belirleyici faktördür. Tedaviye hızlı erişim; yaşam kalitesinde meydana gelen bozulmayı, sosyal yükü ve tanınmayan bir SCID ile ilişkilendirilemeyen sosyal maliyetleri de azaltır. Şimdiye kadar, ABD'den (McGhee ve ark., 2005) ve Birleşik Krallık'tan (Chan ve ark., 2011) elde edilen verilere dayanılarak SCID yenidoğan tarama programları hakkında beş maliyet analizi yapıp yayınlanmıştır. Bu yayınların hepsi SCID'in tarama programları ile erken tanısının hem hayat kurtaracağına hem de genel sağlık bakım maliyetlerinde azalma sağlayacağı sonucuna varmışlardır (Borte ve Reichenbach, 2015).

Ülkemizde yapılan diğer yenidoğan tarama testleri maliyeti üç liranın altındadır. Bu durum PİY taramalarının yenidoğan tarama programına dahil edilmeme nedenlerinden biridir. Ancak, İngiltere'de bir sağlık ekonomisti olan Dr. Chan yenidoğanlarda yaptığı SCID taramasının maliyet analizini bu durumu tersine çevirmektedir. Yapılan analize göre İngiltere'de SCID için erken tanı alan bir infantın tedavi maliyeti geç tanı alan bir infanta göre 10 kat daha azdır. (78.540 Sterline karşılık 744.200 Sterlin) İngiltere'deki yıllık doğum hızı 813.000 olarak alındığında SCID taraması yapılmadan SCID hastasının tedavi masrafları 9,17 milyon sterlin iken tarama yapıldığında tedavi maliyetleri 970.000 sterlin olarak belirlenmiştir.

Fransa’da yapılan bir maliyet etkinlik analizinde (Clement ve ark.,2015) SCID'in erken tanısı, kişi başına tedavi maliyetini 50.000-100.000 Euro kadar azalttığı gösterilmiştir. Yine Buckley’in (2012) Amerika’da yaptığı bir araştırmada erken tanı alıp tedavi gören bir SCID hastasının maliyeti, geç tanı alıp tedavi görmesindeki maliyetinden çok daha düşüktür. Yakın zamanda Washington’da yapılan başka bir maliyet analizinde de SCID’in taranarak erken tanı almasının faydalı olacağı yönündedir (Ding ve ark.,2016).

Tüm bu maliyet analizleri incelendiğinde yenidoğanlarda PİY taraması uygulaması hastaların yaşamlarını kurtarmasındaki büyük öneminin yanı sıra tedavi maliyetlerini kayda değer bir biçimde azalttığı ortaya çıkmaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada kullandığımız kitin maliyeti 2.65 Euro idi. Bu fiyat ülkemizde yapılan tarama testlerinin ücretinden 3-4 kat daha yüksektir. Ancak insan genom dizilenmesi de ilk yapılmaya başlandığında milyon dolarlara mal olurken; şuan bin dolarlarla bu işlem yapılabilmektedir. Bu örnek teknolojilerin ilerlemesi ile immün yetmezlik tarama panellerinin de gelişip ucuzlayacağını habercisi olabilir.

Yenidoğan taramaları sonucunda farklı yeni bilgiler de elde edilmektedir. Örneğin bir çalışmada da RAG gen kusurlarının bulunmasında TREC ve KREC biyo belirteçlerinin faydalı olabileceği gösterilmektedir (Kato ve ark., 2015). Ayrı bir çalışmada ise KREC seviyesinin immün trombositopenik purpura (ITP) hastalarında kontrollere nazaran daha fazla olduğu gösterilmiştir (Levy-Mendelovich ve ark., 2017)

Son olarak, TRECs ve KRECs taramaları tüm SCID hastalarını belirlemede bazı noktalarda yetersizdir. Bununla ilgili olarak Kwan ve arkadaşlarının 2014 yılında yayımladıkları makalelerinde Amerika’nın Kaliforniya eyaletinde 2 yılda 993.724 yenidoğan SCID açısından TRECs kuantifikasyonu ile taranmıştır. Bu çalışmada TRECs ile tüm SCID türlerini saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Bunun nedeni ise T hücre lenfopenisinin ileriki yaşlardaki sorunlar, Major Doku Uygunluk Kompleksi (MHC) II eksikliği, geç başlangıçlı ADA gibi formların olabileceğini belirtmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hızla büyüyen yeni immün yetmezlik hastalıkları listesi ve tedavi yöntemleri, klinisyenlerin en yeni ve en iyi yönetim stratejilerini takip etmesini zorunlu kılmaktadır. Birçok ülkede immün yetmezlik hastalıklarının yenidoğan tarama programlarına katılması ve yeni nesil dizileme gibi yöntemlerle yeni gen ve mutasyonların öğrenilmesi PİY hastalıkları için bilinmeyenlerin ortaya çıkmasına büyük ölçüde katkı sağlamaktadır. Türkiye’de henüz uygulanmakta olmayan bu yenidoğan tarama metodolojisi ilk defa bu çalışma ile test edilmiştir. Kısacası bu çalışma Türkiye’de yenidoğan taramalarında T ve B hücre lenfopenisine bakan ve TRECs/KRECs ve ACTB mütipleks PCR testini kullanan ilk restrospektif çalışmadır. Daha önce böyle bir çalışma Amerika, İspanya, İsveç, İngiltere, Fransa, Brezilya ve İsrail gibi birçok ülkede yapılmıştır (Rechavi ve ark., 2017; Kanegae ve ark., 2017; Morinishi ve ark., 2009). T ve B lenfopenisi ile karakterize ağır immün yetmezlik hastalığı olan yenidoğanlarda RT-qPCR ile TRECs ve KRECs sayılarını bilmek uygun bir tarama yöntemidir.

Yapılan bu çalışmada en önemli nokta başlangıç noktası olan örnek toplama ve kayıtlama kısmı olduğundan ileride bu ve buna benzer çalışma yapmayı planlayan kişi, grup veya organizasyonların bu taban kısmında ki probleme odaklanıp çözmesi önerilmektedir.

Diğer önemli bir nokta ise referans aralıklarının nasıl belirleneceğidir. Bu konuda literatürde bir fikir birliği olmadığından bu çalışmayı yapacak grupların bu noktada güncel verileri göz önünde bulundurması önerilir.

Tarama metodolojileri açısından en iyi metodun hangisi olduğuna dair bir ortak bir düşünce yoktur. Sonuçların yorumlanması, klinik takip açısından karar verilmesi gibi konularda da bir fikir birliği yoktur.

TREC konsantrasyonunun ölçülmesi, timik aktiviteyi araştırmak için en iyi non-invaziv klinik ve araştırma aracı olmuştur. Timustan periferik kana geçen T hücrelerinin tanımlanmasını ve timus tarafından T hücre üretiminin tespit edilmesini sağlar. Yenidoğan immün yetmezlik taraması böylesine yıkıcı bir hastalıkta en hassas ve spesifik analiz olarak hizmet vermektedir. SCID birçok ülkede erken tanı almak için yenidoğan tarama programının hastalıklarından biri olarak kullanılmaktadır. Bu şekilde hastaların hayatları kurtarılabilir ve hastalığı iyileştirebilecek tedavi edici müdahale mümkün kılınabilir. TREC ölçümü ile T hücre immün fonksiyon bozukluğu hakkında ihtiyaç

duyulan klinik ve araştırma bilgisini sağlanması beklenmektedir. Ayrıca T hücresi immün yetmezliğinin rol oynadığı HIV enfeksiyonu, yaşlanma süreci, otoimmün hastalıklar ve immün sistem yeniden yapılandırılması dâhil tüm hastalıklarda kemik iliği naklinden sonra kullanılabilir.

En önemlisi bu çalışmada primer immün yetmezlikle ilişkili olabilecek vaka sayısı %1 olup bu yüzde çok yüksektir. Her ne kadar çalışmada bazı zorluklar ile karşılaşılsa da TRECs ve KRECs tarama testi diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de rutin tarama protokolleri içine alınmalıdır. Ayrıca bu testler sadece tarama amaçlı değil hastalıkların genetik temelini bulmada da faydalı olmaktadır.

Son olarak diğer tarama testlerine kıyasla ilk maliyeti yüksek olan PİY hastalıklarının taranması, uzun vadedeki tedavi maliyetlerini önemli ölçüde azaltacağı için; bu tarama metodolojisinin yenidoğanlarda uygulanması ülkelerin ekonomileri açısından önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmanın sonucunda, Türkiye gibi akraba evliliklerinin sık olduğu ülkelerde yenidoğan taramalarına bu testlerin dâhil edilmesi oldukça önemli olup en kısa zamanda hayata geçirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas AK and Lichtman AH. Lymphocyte Maturation and Expression of Antigen Receptor Genes. Cellular and Molecular Immunology. Fifth edition, Philadelphia Saunders. 2003; 129-162.
- Adams SP, Rashid S, Premachandra T, Harvey K, Ifederu A, Wilson MC, Gaspar, HB. Screening of Neonatal UK Dried Blood Spots using a Duplex TREC Screening Assay. J Clin Immunol 2014; 34:323-330.
- Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Gaspar HB, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck JM, Sullivan K, Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. Frontiers in immunology 2014; 5:1-33.
- Al-Mousa H, Al-Saud B. Primary Immunodeficiency Diseases in Highly Consanguineous Populations from Middle East and North Africa. Epidemiology, Diagnosis, and Care Front Immunol 2017; 8:678-685.
- Amariglio N, Klein A, Dagan L, Lev A, Padeh S, Rechavi G, Berkun Y, Somech R. T-cell compartment in synovial fluid of pediatric patients with JIA correlates with disease phenotype. J Clin Immunol 2011; 31:1021-1028.
- Amariglio N, Lev A, Simon AJ, Rosenthal E, Spirer Z, Efrati O, Broides A, Rechavi G, Somech R. Molecular assessment of thymus capabilities in the evaluation of T-cell immunodeficiency. Pediatr Res 2010; 67:211-216.
- Audrain M, Thomas C, Mirallie S, Bourgeois N, Sebille V, Rabetrano H, Durand-Zaleski I, Boisson R, Persyn M, Pierres C, Mahlaoui N, Fischer A. Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French single centre study. Clin Immunol 2014; 150:137-139.
- Bayer DK, Martinez CA, Sorte HS, Forbes LR, Demmler-Harrison GJ, Hanson IC, Pearson NM, Noroski LM, Zaki SR, Bellini WJ, Leduc MS, Yang Y, Eng CM, Patel A, Rodningen OK, Muzny DM, Gibbs RA, Campbell IM, Shaw CA, Baker MW, Zhang V, Lupski JR, Orange JS, Seeborg FO, Stray-Pedersen A. Vaccine-associated varicella and rubella infections in severe combined immunodeficiency with isolated CD4 lymphocytopenia and mutations in IL7R detected by tandem whole exome sequencing and chromosomal microarray. Clin Exp Immunol 2014; 178:459-469.
- Baykal T, Huner G, Sarbat G, Demirkol M. Incidence of biotinidase deficiency in Turkish newborns. Acta Paediatr 1998; 87(10):1102-1103.

- Borte S, Reichenbach J. Newborn Screening for Primary Immunodeficiencies: Focus on Severe Combined Immunodeficiency (SCID) and Other Severe T-Cell Lymphopenias. *Int J Neonatal Screen* 2015; 1(3):89-100.
- Borte S, Von Döbeln U, Fasth A, Wang N, Janzi M, Winiarski J, Sack U, Pan-Hammarstrom Q, Borte M, Hammarstrom L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood* 2012; 119:2552–2555.
- Borte S, VonDöbeln U, Hammarström L. Guidelines for newborn screening of primary Immuno deficiency diseases. *Curr Opin Hematol* 2013; 20(1):48-54.
- Borte S, Wang N, Oskarsdottir S, Von Döbeln U, Hammarstrom L. Newborn screening for primary immunodeficiencies: Beyond SCID and XLA. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1246:118-130.
- Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Ailal F, Gaspar HB, Al-Herz W, Chatila T, Crow YJ, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck J, Tang MLK, Tangye SG, Torgerson TR, Casanova JL, Sullivan KE. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol.* 2018; 38(1): 129-143.
- Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9:722-728.
- Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, Markert L, Williams LW, Roberts JL, Myers LA, Ward FE. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1999; 340:508-516.
- Buckley RH. The Long Quest for Neonatal Screening for SCID. *Allergy Clin Immunol* 2012; 129(3): 597-604.
- Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science* 2007; 317: 617-619.
- Chan A, Scalchunes C, Boyle M, Puck JM. Early vs. delayed diagnosis of severe combined immunodeficiency: A family perspective survey. *Clin. Immunol* 2011; 138:3-8.
- Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immuno deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(2):391-398.
- Chan K. 2015. Cost-effectiveness analysis of newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID). <http://www.folhamarela.com.br/PDF/scid.pdf>. Erişim Tarihi: 12.04.2018.
- Chiarini M, Zanotti C, Serana F, Sottini A, Bertoli D, Caimi L, Imberti L. T-cell Receptor and K-deleting Recombination Excision Circles in Newborn Screening of T- and B-cell Defects. *J Public Health Res* 2013; 2(1):9-16.

- Clement MC, Mahlaoui N, Mignot C, Bihan CL, Rabetrano H, Hoang L, Neven B, Moshous D, Cavazzana M, Blanche S, Fischer A, Audrain M, Zaleski ID. Systematic neonatal screening for severe combined immunodeficiency and severe T-cell lymphopenia: Analysis of cost-effectiveness based on French real field data. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135:1589-1593.
- Ding Y, Thompson JD, Kobrynski L, Ojodu J, Zarbalian G, Grosse SD. Cost-Effectiveness/Cost-Benefit Analysis of Newborn Screening for Severe Combined Immune Deficiency in Washington State. *J Pediatr* 2016; 172: 127-135
- Felipe B, Olbrich P, Lucenas JM, Delgado-Pecellin C, Pavon-Delgado A, Marquez J, Salamanca C, Soler-Palacin P, Gonzalez-Granado LI, Antolin LF, Borte S, Neth O. Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. *Pediatr Allergy Immunol* 2016; 27: 70-77.
- Gennery AR, Slatter MA, Grandin L, Taupin P, Cant AJ, Veys P, Amrolia PJ, Gaspar HB, Davies EG, Friedrich W, Hoenig M, Notarangelo LD, Mazzolari E, Porta F, Bredius RG, Lankester AC, Wulffraat NM, Seger R, Güngör T, Fasth A, Sedlacek P, Neven B, Blanche S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Landais P. Transplantation of hematopoietic stem cells and long-term survival for primary immunodeficiencies in europe: Entering a new century, do we do better? *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:602-610.
- Hammarström L. Primary immuno deficiencies screening: neonatal screening for T/B Cell disorders – a triplex PCR method for quantitation of TRECs and KRECs in newborns. *Clin Exp Immunol* 2014; 178:14-15.
- Hansen BR, Kolte L, Haugaard SB, Dirksen C, Jensen FK, Ryder LP, Sorensen AL, Flyvbjerg A, Nielsen SD, Andersen O. Improved thymic index, density and output in HIV-infected patients following low-dose growth hormone therapy: a placebo controlled study. *AIDS* 2009; 23(16):2123-2131.
- Hawkins SF, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. In: *Multiplex Biomarker Techniques*. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 125-133.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Generation of lymphocytes in bone marrow and thymus. e-book: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition, New York, Garland Science. 2001.
- Janik DK, Lindau-Shepard B, Comeau AM, Pass KA. A multiplex immunoassay using the Guthrie specimen to detect T-cell deficiencies including severe combined immunodeficiency disease. *Clin Chem* 2010; 56:1460-1465.
- Kanegae MPP, Barreiros LA, Sousa JL, Brito MAS, Oliveira EB Junior, Soares LP, Mazzucchelli JTL, Fernandes DQ, Hadachi SM, Holanda SM, Guimaraes FATM, Boacnin MAPVV, Pereira MAL, Bueno JMC, Grumach AS, Gesu RSWD, Santos AMND, Bellesi N, Costa-Carvalho BT, Condino-Neto A. Newborn

- Screening for severe Combined Immunodeficiencies Using TRECs and KRECs: Second Pilot Study in Brazil. *Rev Paul Pediatr* 2017; 35(1):25-32.
- Kato T, Crestani E, Kamae C, Honma K, Yokosuka T, Ikegawa T, Nishida N, Kanegane H, Wada T, Yachie A, Ohara O, Morio T, Notarangelo LD, Imai K, Nonoyama S. RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2015; 35(3):280-288.
- Kılıç SS, Özel M, Hafizoğlu D, Karaca NE, Aksu G, Kütükçüler N. The Prevalences and Patient Characteristics of Primary Immunodeficiency Diseases in Turkey-Two Centers Study. *J Clin Immunol* 2013; 33:74-83.
- King JR, Hammarström L. Newborn Screening for Primary Immunodeficiency Diseases: History, Current and Future Practice. *J Clin Immunol* 2018; 38:56-66.
- Kobrynski L, Powell RW, Bowen S. Prevalence and Morbidity of Primary Immunodeficiency Diseases, United States 2001–2007. *J Clin Immunol* 2014; 34(8):954-961.
- Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, Andruszewski K, Abbott JK, Baker M, Ballow M, Bartoszesky LE, Bonilla FA, Brokopp C, Brooks E, Caggana M, Celestin J, Church JA, Comeau AM, Connelly JA, Cowan MJ, Cunningham-Rundles C, Dasu T, Dave N, De La Morena MT, Duffner U, Fong CT, Forbes L, Freedenberg D, Gelfand EW, Hale JE, Hanson IC, Hay BN, Hu D, Infante A, Johnson D, Kapoor N, Kay DM, Kohn DB, Lee R, Lehman H, Lin Z, Lorey F, Abdel-Mageed A, Manning A, McGhee S, Moore TB, Naides SJ, Notarangelo LD, Orange JS, Pai SY, Porteus M, Rodriguez R, Romberg N, Routes J, Ruelle M, Rubenstein A, Saavedra-Matiz CA, Scott G, Scott PM, Secord E, Seroogy C, Shearer WT, Siegel S, Silvers SK, Stiehm ER, Sugerman RW, Sullivan JL, Tanksley S, Tierce ML 4th, Verbsky J, Vogel B, Walker R, Walkovich K, Walter JE, Wasserman RL, Watson MS, Weinberg GA, Weiner LB, Wood H, Yates AB, Puck JM, Bonagura VR. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA* 2014; 312:729-738.
- Lee WI, Huang JL, Lin SJ, Yeh KW, Chen LC, Ou LS, Yao TC, Jaing TH, Shih YF, Tseng TY, Lin YL. Applying T-cell receptor excision circles and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles to patients with primary immunodeficiency diseases. *Ann Med* 2014; 46(7):555-565.
- Lev A, Simon AJ, Bareket M, Bielora B, Hutt D, Amariglio N, Rechavi G, Somech R. The kinetics of early T and B cell immune recovery after bone marrow transplantation in RAG-2-deficient SCID patients. *PLoS One* 2012; 7(1):1-12.
- Levy-Mendelovich S, Lev A, Aviner S, Rosenberg N, Kaplinsky C, Sharon N, Miskin H, Dvir A, Kenet G, Schushan IE, Somech R. Quantification of specific T and B cells immunological markers in children with chronic and transient ITP. *Pediatr Blood Cancer* 2017; 64(12):1-6.

- Lima K, Abrahamsen TG, Foelling I, Natvig S, Ryder LP, Olausson RW. Low thymic output in the 22q11.2 deletion syndrome measured by CCR9+CD45RA+ T cell counts and T cell receptor rearrangement excision circles. *Clin Exp Immunol* 2010; 161:98-107.
- Locke BA, Dasu T, Verbsky JW. Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2014; 46(2):154-168.
- Marciano RE, Huang C, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinciogullari A, Reda SM, Gennery A, Thon V, Espinosa-Rosales F, Al-Herz W, Porras O, Shcherbina A, Szaflarska A, Kiliç Ş, Franco JL, Gómez Raccio AC, Roxo-Jr P, Esteves I, Galal N, Grumach AS, Al-Tamemi S, Yildiran A, Orellana JC, Yamada M, Morio T, Liberatore D, Ohtsuka Y, Lau YL, Nishikomori R, Torres-Lozano C, Mazzucchelli JTL, Vilela MMS, Tavares FS, Cunha L, Pinto JA, Espinosa-Padilla SA, Hernandez-Nieto L, Elfeky RA, Ariga T, Toshio H, Dogu F, Cipe F, Formankova R, Nuñez-Nuñez ME, Bezrodnik L, Marques JG, Pereira MI, Listello V, Slatter MA, Nademi Z, Kowalczyk D, Fleisher DA, Davies G, Neven B, Rosenzweig SD. BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: Complications, risks, and vaccination policies. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:1134-1141.
- McGhee SA, Stiehm ER, Cowan M, Krogstad P, McCabe ER. Two-tiered universal newborn screening strategy for severe combined immunodeficiency. *Mol Genet Metab* 2005; 86:427-430.
- McGhee SA, Stiehm ER, McCabe ER. Potential costs and benefits of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Pediatr* 2005; 147:603-608.
- Mitchell WA, Lang PO, Aspinall R. Tracing thymic output in older individuals. *Clin Exp Immunol* 2010; 161:497-503.
- Modell V, Knaus M, Modell F. An analysis and decision tool to measure cost benefit of newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID) and related T-cell lymphopenia. *Immunol Res* 2014; 60(1):145-152.
- Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, Morio T, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards. *J Pediatr* 2009; 155:829-833.
- Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of kappa-deleting

- recombination excision circles in guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:223-225.
- National Cancer Institute 2009. Hematopoietic and Lymphoid Neoplasm Project. https://seer.cancer.gov/tools/heme/webinars/03_lineages1.pdf. Erişim Tarihi: 21.05.2018.
- Nourizadeh M, Borte S, Fazlollahi MR, Hammarström L, Pourpak Z. A New IL-2RG Gene Mutation in an X-linked SCID Identified through TREC/KREC Screening: a Case Report. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2015; 14(4):457-461.
- Ochs HD, Edvard Smith CI, Puck JM. Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach.3. Baskı, New York, Oxford University Press, 2014.
- Ochs HD, Hitzig WH. History of primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12(6):577-587.
- Olbrich P, de Felipe B, Delgado-Pecellin C, Rodero R, Rojas P, Aguayo J, Marquez J, Casanovas J, Sánchez B, Lucena JM, Ybot-Gonzalez P, Borte S, Neth O. A first pilot study on the neonatal screening of primary immuno deficiencies in Spain: TRECS and KRECS identify severe T- and B-cell lymphopenia. *An Pediatr (Barc)* 2014; 81(5):310-317.
- Özaltun ŞC, Güler S, Şengelen M. Sağlık Taramaları. HUTF Halk Sağlığı AD Toplum Eğitim Sunumları. http://www.halksagligi.hacettepe.edu.tr/diger/topluma_yonelik.php. Erişim Tarihi: 10.03.2018.
- Patel JP, Puck JM, Srinivasan R, Brown C, Sunderam U, Kundu K, Brenner SE, Gatti RA, Church JA, Nijmegen breakage syndrome detected by newborn screening for T cell receptor excision circles (TRECs). *J Clin Immunol* 2015; 35:227-233.
- Public Health England. Guidelines for Newborn Blood Spot Sampling, 2016. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/511688/Guidelines_for_Newborn_Blood_Spot_Sampling_January_2016.pdf. Erişim Tarihi: 26.07.2018.
- Puck JM. Laboratory technology for population-based screening for severe combined immunodeficiency in neonates: The winner is T-cell receptor excision circles. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:607-616.
- Raje N, Dinakar C. Overview of Immuno deficiency Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am* 2015; 35(4):599-623.
- Rechavi E, Lev A, Simon AJ, Stauber T, Daas S, Levy TS, Broides A, Nahum A, Marcus N, Hanna S, Stepensky P, Toker O, Dalal I, Etzioni A, Almashanu S, Somech R. First Year of Israeli Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency Clinical Achievements and Insights. *Frontiers in Immunology* 2017; 8:1448-1458.

- Rhim JW, Kim KH, Kim DH, Kim BS, Kim JS, Kim CH, Ki HM, Park HJ, Pai KS, Son BK, Shin KS, Oh MY, Woo YJ, Yoo Y, Lee KS, Lee KY, Lee CG, Lee JS, Chung EH, Choi EH, Hahn YH, Park HY, Kim JG. Prevalence of Primary Immunodeficiency in Korea. *J Korean Med Sci* 2012; 27:788-793.
- Rivers L, Gaspar HB. Severe combined immunodeficiency: Recent developments and guidance on clinical management. *Arch Dis Child* 2015; 100(7):667-672.
- Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, Caimi L, Imberti L. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immuno deficiencies. *J Transl Med* 2013; 11:119-130.
- Somech R, Lev A, Simon AJ, Korn D, Garty BZ, Amariglio N, Rechavi G, Almashanu S, Zlotogora J, Etzioni A. Newborn Screening for Severe T and B cell Immunodeficiency in Israel: A Pilot Study, *Israel Medical Association Journal (IMAJ)* 2013; 15:472-477.
- Sottini A, Serana F, Bertoli D, Chiarini M, Valotti M, Tessitore MV, Imberti L. Simultaneous Quantification of T-Cell Receptor Excision Circles (TRECs) and K-Deleting Recombination Excision Circles (KRECs) by Real-time PCR. *J Vis Exp* 2014; 94:1-10.
- Tessitore MV, Sottini A, Roccaro AM, Ghidini C, Bernardi S, Martellosio G, Serana F, Imberti L. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocked swabs. *J Transl Med* 2017; 15:70-80.
- Thompson JLG, Wilkey JF, Baptiste JC, Navas JS, Pai SY, Pass KA, Eaton RB, Comeau AM. High-Throughput Multiplexed T-Cell–Receptor Excision Circle Quantitative PCR Assay with Internal Controls for Detection of Severe Combined Immunodeficiency in Population-Based Newborn Screening. *General Clinical Chemistry* 2010; 56:1466-1474.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Yenidoğan Tarama Programı. <https://dosyaism.saglik.gov.tr/Eklenti/11173,259822214447pdf.pdf?0>. Erişim Tarihi: 20.03.2018.
- Türkiye İstatistik Kurumu, İstatistiklerle Aile, 2016. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24646> Erişim Tarihi: 08.07.2018.
- Usha PD ve Ranjan DB. Newborn Screening – From ‘Guthrie age to Genomic age’. *J Obstet Gynecol India* 2010; 60:210-220.
- Van Zelm MC, Van Der Burg M, Langerak AW, Van Dongen JJ. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Front Immunol* 2011; 2:1-9.

Verbsky J, Routes J. Screening for and treatments of congenital immunodeficiency diseases. *Clin Perinatol* 2014; 41:1001-1015.

Wilson JMG, Jungner G. Principles and Practice of Screening for Disease. No 34, Geneva, Public Health Papers. 1968; 26-27.

Yel L. Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2010; 30(1):10-16.

Yorulmaz A, Artaç H, Kara R, Keleş S, Reisli İ. Primer İmmün Yetmezlikli 1054 Olgunun Retrospektif Değerlendirilmesi. *Astım Allerji İmmünoloji* 2008; 6(3):127-134

Zhang S, Bhandoola A. Losing TREC with age. *Immunity* 2012; 36(2):163–165.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Kabul Yazısı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU


Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/368

09.06.2016

Sayın : Prof. Dr. Alişan YILDIRAN

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Primer immün yetmezlik hastalarının PCR ile yenidoğanlarda tarama ile erken teşhisi** başlıklı ÖMÜ KA EK 2014/678 Karar nolu İmmünoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına; çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 24.07.2014 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof. Dr. Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başkanı

Ek 2: Araştırma İzin Yazısı



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu
Samsun İli Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği

SAMSUN İLİ KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ GENEL
SEKRETERLİĞİ - SAMSUN KHBGS İDARI HİZMETLER
BAŞKANLIĞI
30/06/2016 10:53 - 54103609 - 404.02 - E.13352
00026307634

Sayı : 54103609/604.02
Konu : Araştırma İzin Talebi (Prof. Dr. Alişan
YILDIRAN)

DAĞITIM YERLERİNE

İlgi : 15/06/2016 tarihli ve 3492 sayılı dilekçe.

İlgi tarih ve sayılı dilekçeye istinaden; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bölümü Arş. Gör. Mediniye KARADAĞ ALPASLAN ve Öğr. Üyesi Prof.Dr.M.Gönül OĞUR, Prof.Dr. Alişan YILDIRAN'ın "Primer İmmün Yetmezlik Hastalıklarının Multipleks PCR Yöntemiyle Yenidoğanlarda Taranmasıyla Erken Teşhisi" konulu anket çalışmalarını, Genel Sekreterliğimize bağlı tüm Sağlık Tesislerinde, yenidoğan çocuklarda tarama testi için topuk kanı örneği alınması uygun görülmüş olup anket çalışmasının yapılabilmesi için Genel Sekreterliğimiz ile ilgili kişi arasında "Araştırma İzinleri İşbirliği Protokolü" imzalanarak Ek'te sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Dr. Yılmaz DÜNDAR
Genel Sekreter a.
İdari Hizmetler Başkanı

EKLER:

- 1-Dilekçe
- 2-Başvuru Formu
- 3-Araştırma İzinleri İşbirliği Protokolü

Bilgi:

Prof.Dr. Alişan YILDIRAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk İmmünoloji - Alerji BD, Kurupelit Yerleşkesi
Atakum/SAMSUN

Dağıtım:

Samsun Alaçam Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Birimi
Samsun Asarcık İlçe Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Ve Özlük Birimi

Samsun Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği/
Araştırma ve Geliştirme (Ar-Ge) Merkezi
Adalet Mahallesi 100.Yıl Bulvarı No:232 İlkadım/SAMSUN
(0362) 311 2500 (1428)
Faks No:0(362) 311 25 28
e-Posta:kursat.yurdakos@saglik.gov.tr İnt.Adresi: -

Bilgi için:KÜRSAT YURDAKOS

Unvan:UZMAN

Telefon No:0362 311 25 00/1428

Evrakın elektronik imzalı suretine <http://e-belge.saglik.gov.tr> adresinden f99d273b-08cf-418d-8745-af7a84f5ffa3 kodu ile erişebilirsiniz.
Bu belge 5070 sayılı elektronik imza kanuna göre güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Samsun Ayvacık Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Yazı İşleri Birimi
Samsun Bafra Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Yazı İşleri Birimi
Samsun Çarşamba Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Yazı İşleri Birimi
Samsun Khb Sbü Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Evrak Kayıt Birimi
Samsun Fiziksel Tıp Rehabilitasyon Hastalıkları Hastanesi Evrak Kayıt Birimi
Samsun Gazi Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Servisi Birimi
Samsun Dr. Kamil Furtun Göğüs Hastalıkları Ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi Evrak Kayıt Birimi
Samsun Havza Devlet Hastanesi Evrak Yönetimi Birimi
Samsun Kadın Doğum Ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi Evrak Kayıt Yazı İşleri Birimi
Samsun Kavak Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Yazı İşleri Birimi
Samsun Ladik Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Yazı İşleri Birimi
Samsun Salıpazarı Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Yazı İşleri Birimi
Samsun Terme Devlet Hastanesi Evrak Kayıt İşleri Birimi
Samsun Vezirköprü Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Yazı İşleri Birimi
Samsun 19 Mayıs İlçe Devlet Hastanesi Evrak Kayıt Birimi
Samsun Ruh Sağlığı Ve Hastalıkları Hastanesi Evrak Kayıt Birimi
SAMSUN

Samsun Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği/
Araştırma ve Geliştirme (Ar-Ge) Merkezi
Adalet Mahallesi 100.Yıl Bulvarı No:232 İlkadım/SAMSUN
(0362) 311 2500 (1428)
Faks No:0(362) 311 25 28
e-Posta:kursat.yurdakos@saglik.gov.tr İnt.Adresi: -

Bilgi için:KÜRŞAT YURDAKOŞ

Unvan:UZMAN

Telefon No:0362 311 25 00/1428

Evrakın elektronik imzalı suretine <http://e-belge.saglik.gov.tr> adresinden f99d273b-08cf-418d-8745-af7a84f5ffa3 kodu ile erişebilirsiniz.
Bu belge 5070 sayılı elektronik imza kanuna göre güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ek 3: Hibe Yazısı



SAĞLIK ÜRÜNLERİ VE LABORATUVAR
HİZMETLERİ SANAYİ VE TİCARET LTD. ŞTİ.

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
SAMSUN

05/05/2016

Aşağıda yer alan malzemeler "Primer immün yetmezlik hastalıklarının PCR ile yenidoğanlarda tarama ile erken teşhisi" adlı projede kullanılmak üzere, firmamız tarafından Çocuk İmmünoloji-Allerji BD ve Çocuk Genetik BD'na hibe edilmiştir.

Malzemenin Adı	Miktarı	K.D.V Dahil Fiyatı
Yenidoğan immün yetmezlik tarama kiti (TREC/KREC)	4000 adet	10.400 Euro

MZM
SAĞLIK ÜRÜNLERİ VE LABORATUVAR
HİZMETLERİ SANAYİ VE TİCARET LTD. ŞTİ.
Hilal Mah.686 Sok.No:6/3 Yıldız Çankaya/ANKARA
Tel:0312 440 45 10 - Fax:0312 440 45 24
Şişme No: D. 527 034 8152

Hilal Mah. 686. Sokak No: 6/3 Yıldız - Çankaya / ANKARA • Tel: +90 312 440 45 10 • Fax: +90 312 440 45 24

Ek 4: Muvafakat Formu

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ARASTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

“ Primer Immün Yetmezlik Hastalıklarının PCR ile Yenidoğanlarda Tarama ile Erken Teşhisi”

Gönüllünün Baş Harfleri <>>

Bir araştırma çalışmasına katılmamız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğimize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamamız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığımız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılmamızla ilgili olarak hekiminiz bilgilendirilecektir.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

Yenidoğan döneminde primer immün yetmezlik hastalıklarının topuk kanı ile erken teşhisi yoluyla komplikasyonların önlenmesi ve gerekirse hastaların etkin tedaviye yönlendirilmesi.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ: Yenidoğan tarama testleri için topuk kanı örneği alınırken ayrı bir gutrie kağıdına birkaç damla kan örneği alınacak. Alınan örnekler oda sıcaklığında direkt ışık görmeyen 4-5 saat kurutulduktan sonra +4°C’de iki hafta muhafaza edilebilir. Örnekler OMÜ Tıbbi Genetik Moleküler Laboratuvar’ında Arş. Görv. Mediyeni Karadağ Alpaslan’a ulaştıktan sonra burada gerekli kayıtlama işlemi yapıp, DNA izolasyonu ve multipleks PCR yöntemi ile primer immün yetmezlik biyobelirtici olarak düşünülen TRECs ve KRECs adı verilen DNA halkalarının sayılarına bakılarak yorum yapılacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Onay vermeniz ve çocuğunuzdan örnek için kan vermesini onaylamanız yeterlidir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Yapılacak olan çalışmanın size ve sağlığınıza herhangi bir zararı bulunmamaktadır.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Primer immün yetmezliklerin erken tanınmasında katkı sağlamış olacaksınız.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabileceğim bilincindeyim.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışmaya katılmamızın herhangi bir maliyeti yoktur.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz,

etik kökeniniz ayrıca çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Doktorunuzdan toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahipsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsiniz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Ad, soyad ve telefon numaraları

Mediniye Karadağ Alpaslan / 0 362 3121919-4119

CALISMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:

Çalışmaya devam etmek istememeniz durumu dışında çalışmadan ayrılmanızı gerektirecek başka bir durum bulunmamaktadır.

YENİ BİLGİLER CALISMADAKI ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.


Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Ek 5: Çalışmada Kullanılan Gutrie Kâğıdı Örneği

**T. C. SAĞLIK BAKANLIĞI**
ULUSAL YENİDOĞAN TARAMA PROGRAMI

KANI GÖNDEREN HALK SAĞLIĞI MÜDÜRLÜĞÜ

HALK SAĞLIĞI MÜDÜRLÜĞÜ TELEFON NUMARASI

NUMUNENİN ALINDIĞI YER Hastane Aile Hekimliği

BEBEĞİN DOĞUM YERİ KODU

EVLİLİK İÇİ EVLİLİK DIŞI

ANNE UYRUGU BABA UYRUGU

T.C. DİĞER T.C. DİĞER

ANNE T.C. KİMLİK NUMARASI BEBEĞİN CİNSİYETİ

K E

BABA T.C. KİMLİK NUMARASI BEBEĞİN DİNİ

ANNE ADI SOYADI

BABA ADI SOYADI

BEBEĞİN ADI

BEBEĞİN T.C. KİMLİK NUMARASI DOĞUMUN GERÇEKLEŞME ŞEKLİ

SEZARYEN NORMAL

BEBEĞİN DOĞUM TARİHİ VE SAATI

BEBEĞİN DOĞUM AĞIRLIĞI (gram) GEBELİK HAFTASI

BEBEĞİN DOĞUM SİRASINI ANNENİN CANLI DOĞUM SİRASINI

Barkod

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Medine Karadağ Alpaslan

Doğum Yeri: Zonguldak

Doğum Tarihi: 03.03.1983

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2001-2005

Yüksek Lisans: Drexel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler
Moleküler, Hücre Biyolojisi ve Genetik, 2008-2011

Doktora: Ondokuzmayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp
ABD, 2014-devam ediyor

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD 2011- devam ediyor

E-posta: mediniye.alpaslan@omu.edu.tr