

Doç. Dr. Mutlu Yüksek  
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD  
Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları BD

## PRİMER İMMÜN YETMEZLİKTE TANISAL SÜREÇLER

### Fonksiyonel incelemeler

İmmün hücrelerin sayılarının belirlenmesi bu hücrelerin fonksiyonlarının değerlendirmesi açısından yardımcı olabilir ancak bu hücreler nonfonksiyonel olabilirler. İmmün sistem fonksiyonlarını tam doğru olarak gösteren tek bir laboratuvar testi yoktur. Var olan testler hücre serilerinin yaşamakta ve birbirleriyle iletişim halinde olduğunu ölçmeye yarar.

#### 1- T hücre fonksiyonlarının değerlendirilmesi

Bu anlamda, tarihsel olarak en önemli test “gecikmiş tip hipersensitivite” reaksiyonudur ve bellek T hücrelerinin var ve fonksiyonu olduğunun iyi bir göstergesidir. Bu test günümüzde de hücre immün sistemin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Test için sıklıkla kullanılan antijenler kandida, PPD, kabakulak antijenidir. Antijen uygulandıktan 24-72 saat sonraki endürasyon çapı 2 mm’den fazla ise (PPD için 5 mm) T hücreleri fonksiyon görüyor anlamı taşır. Ancak daha önceden antijen ile karşılaşma olasılığı düşük olduğu için test 1 yaş altında anlamlı olmayabilir. Testin negatifliğinin değerlendirilmesi çok dikkatli yapılmalıdır. Çünkü geçirilmekte olan viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, kullanılan antiinflamatuvar ilaçlar T hücrelerinin fonksiyonlarını baskılayabilir.

#### T hücre proliferasyon incelemeleri

T hücre fonksiyonlarının in vitro ölçümü, periferik kanda, çeşitli uyaranlarla bu hücrelerin proliferasyonunun saptanması ilkesine dayanır. Bu uyaranlar:

- Mitojenler (fitohemagglütinin, konkovalin A, pokeweed mitojen veya anti CD3).
- Spesifik antijenler ( tetanos ve difteri toksoitleri, Kandida albicans antijenleri)
- Allojenik lenfositler (karışık lenfosit kültürü)

T hücre uyarımı için pek çok mitojen sağlıklı antijen sunan hücreye(monosit, B hücre) gereksinim duyar. Mitojenler T hücrelerinin çok güçlü uyaranlarıdır ve test her yaşta değerlendirilebilir ve aşılardan etkilenmez.

Bu çalışmalarda hastadan izole edilen mononükleer periferik kan hücreleri mikropsuz ortamda test materyalleri ile 3-6 gün süreyle inkübe edilir. Eş zamanlı bir kontrol tüpü de inkübasyona bırakılır. Sürenin son günü ortama timidin eklenir. Bölünen lenfositler DNA’ ları içine timidini alırlar ve proliferasyon gücü hücreler tarafından alınan radyoaktivitenin ölçülmesiyle belirlenir ve sonuçlar dakikadaki sayı (CPM – counts per minute) olarak ifade edilir.

Ancak pek çok laboratuvar sonuçları stimölasyon indeksi (SI) olarak rapor eder. Stimölasyon indeksi stimölle dakikalık sayının unstimölle dakikalık sayıya bölünmesiyle elde edilir.

Testin normal değeri erişkinlerin hücreleriyle yapılmış testlerden elde edilmiştir. Yenidoğanların mitojen yanıtı genellikle erişkinlerden daha yüksektir. Timidin ile yapılan testlerin normal değeri, laboratuvardan laboratuvara değışmekle birlikte, dakikadaki sayı (CPM) için normal aralık 50,000 ile 300,000 arasında, SI için 10-200 arasında değışmektedir. Mitojenler arasında en sık kullanılanlardan birisi fitohemagglütinin (PHA) 'dir. Bu mitojen için SI > kontrolün %50'si ise normal kabul edilirken <10 yanıt yok olarak değeriendirilir.

T hücre proliferasyonun ölçmenin bir diğer yolu da akış hücre ölçer yöntemleridir. Bu yöntemde floresan izli boyalar (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester [CFSE], 5-ethynyl-2'-deoxyuridine) kullanılır. CFSE ortama konduğunda hücre içine girer ve aktivasyon sonrası her bölünme siklusunda floresan yoğunluğu %50 azalmasına veya floresan nukleozid analogları (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) bölünmekte olan hücrelerin DNA'larına girerek floresan sinyalin artmasına neden olur.

Mitojenlere T-hücre yanıtını değeriendirmenin ek yolları, stimölasyondan sonra belirli zamanlarda belirli hücrelerde ifade edilen aktivasyon belirteçlerinin ( CD69, HLA-DR ve CD25 vb.) akış hücre ölçerle değeriendirmesini ve hücre süpernatantında salgılanan sitokinlerin ölçülmesini içerir.

Ağır T hücre immün yetmezliğinin olduğu durumlarda (Ağır kombine immün yetmezlik AKİY) poliklonal uyarılara T hücre yanıtı çoğunlukla referans alt değeriinin %10'undan azdır. Bazı ağır olmayan AKİY ve diğer T hücre yetersizliklerinde hücre fonksiyonları kısmen korunur. Bu durumda da test sonuçları normal olarak saptanmaz ( genellikle referans al limitinin %30'undan düşük).

## 2- Antikor fonksiyonlarının değeriendirilmesi

Antikorların fonksiyonları, aşılama veya doğal enfeksiyonlara yanıt olarak gelişen antikorların titrelerinin ölçülmesiyle değeriendirilir. Aşı yanıtını değeriendirmenin iki önemli amacı vardır: birincisi naive B hücrelerin yeni antijene yanıtını; ikincisi de bellek B hücrelerinin geçmişte alınan antijene reaksiyonunu değeriendirmek. Burada en önemli etmen uygun aşının seçilmesidir.

Antikor yanıtının değeriendirilmesi iki tür aşıyla yapılır: protein ve polisakkarit. Rutin aşılama şeması her ikisini de kapsar.

Tetanos, difteri, H. influenza B, konjuge pnömokok antikor titreleri protein antijenlere karşı oluşan antikor yanıtını değeriendirmek için kullanılır. Aynı amaçla hepatit A, hepatit B ve kızamık aşıları da kullanılabilir.

Polisakkaritlere karşı antikor yanıtının değeriendirilmesi amacıyla polisakkarit pnömokok ve Salmonella typhi M aşısı kullanılabilir. Bu değeriendirme 2 yaş üstü hastalarda kullanılmalıdır. Bu test özellikle spesifik antikor yanıtı tanısı için önemlidir.

Aşıya karşı antikor yanıtı aşı öncesi ve aşıdan 4-8 hafta sonra titre bakılmasıyla değerlendirilir. Sürenin 8 haftayı geçmemesi ve 4 haftadan kısa olmaması gerekir.

Pnömonokok aşısıyla yapılan testlerde 23 valanlı aşı kullanıldıysa aşı sonrası değerlendirme için en az 14 aşı içeriğinde bulunan süşun antikor titresi değerlendirilmelidir. Serotipe özgü IgG antikor konsantrasyonu >1,3 mcg/ml saptanırsa normal kabul edilir.

2-5 yaş arasındaki çocuklarda, yapılan aşıdaki serotiplerin %50'sinden fazlasında yeterli konsantrasyon sağlandıysa, aşı yanıtı normal kabul edilir. Bu oran 6 yaşından büyük ve daha önce aşılanmamış bireylerde oran %70'e çıkmaktadır.

Tetanos için koruyucu düzey > 0,1 enternasyonal ünite/ml, difteri için 0,01-0,1 enternasyonal ünite/ml'dir. Aşı sonrası bu konsantrasyonlara ulaşılrısa aşı yanıtı sağlanmış olur.

Humoral yanıtları değerlendirmede kullanılan diğler bir molekül olan izohemaglütininler barsak florasındaki polisakkaritlere karşı gelişen ve A ve B grubu eritrosit antijenlerine çapraz reaksiyon veren IgM sınıfı antikorlardır.

Genellikle AB dışı kan grubu olan çocuklarda 6. aydan sonra kanda görölmeye başlar. 1 yaşından büyük çocuklarda çok düşük titreler (< 1/8) zayıf antikor yanıtının göstergesi olabilir.

### 3- Fagosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi

Fagositlerin fonksiyon görebilmeleri için yeterli sayıda olmaları gerekir. Bu nedenle fonksiyon değerlendirilmesine mutlak sayının (MNS-mutlak nötrofil sayısı) saptanmasıyla başlanır. Milimetreküpte 1500'ün altındaki sayılar nötropeni olarak kabul edilir. Ancak lökosit adezyon defektleri (LAD) gibi durumlarda MNS sürekli yüksek olmasına karşın nötrofillerin adhezyon fonksiyonlarının bozuk olduğunun unutulmaması gerekir. LAD tanısı akış hücre ölçerde nötrofillerin üzerindeki adezyon moleküllerinin (CD18, CD11, CD15) ifade düzeyinin ölçülmesiyle konur.

Superoksit, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi reaktif oksijen radikalleri (ROR) nötrofillerin bakteri öldürme sistemlerinin önemli komponentleridir. Kronik granulomatöz hastalıklı (KGH) çocuklardan izole edilen nötrofillerde NADPH oksidaz defekti vardır ve ROR üretemezler bu da bakterisidal defekte neden olur.

Nitroblue tetrazolium (NBT) testi ROR üretiminin niteleyici incelenmesi için kullanılır. Hastanın nötrofilleri bir odacığa konur ve 37 derecede PMA ile 15-30 dakika inkübe edilir ve havada kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra %0,1 safranin ile boyanır ve mikroskop altında incelenir. Test NBT boyasının erimez mavi-siyah formazan'a indirgenmesi esasına dayanır. Normal nötrofiller ( hasta olanlar değil) sarı boyayı hücre içi siyah- mavi-kahverengi agregatlar haline indirger. X 'e bağı KGH taşıyıcılarında NBT<sup>+</sup> ve NBT<sup>-</sup> nötrofiller bir aradadır. Bu kişilerde NBT<sup>-</sup> nötrofil oranı %5-95 arasında değişir. Uyarılmış hücrelerde NBT pozitifliği %70'in altında saptanırsa taşıyıcılık ve ya hastalık düşünölmelidir.

NBT'ye alternatif akış hücre ölçerde kullanılan dihidrorodamin -123 (DHR-123) boyasıdır. Nötrofiller floresan olmayan boya ve PMA ile uyarılarak inkübe edilir. Oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> boyayı

okside eder ve floresan yoğunluğunda artışa neden olur. Hasta nötrofillerde floresan artışı olmaz ve bu durum akış hücre ölçer ile saptanır.

#### 4- Kompleman sisteminin fonksiyonlarının değerlendirilmesi

Kompleman defektleri için başlangıç tarama testi total hemolitik kompleman aktivitesi (CH50) testidir ve klasik kompleman yolunun değerlendirilmesi için kullanılır. Eğer çok düşük (<%50) veya sıfır saptanırsa ilgili kompleman komponentlerinin serum düzeyinin ölçülmesi gerekir. CH50 normal ve hala kompleman eksikliğinden kuşulanılıyorsa alternatif yolun tarama testi olan AH50 çalışılmalıdır.

#### Kaynakça

- 1- Chapel HM, Misbah S, B.Webster AD. Primary immunodeficiency diseases. Oxford Press,2007:611-32
- 2- Feldveg AM. Assessing antibody function as part of an immunologic evaluation. UptoDate
- 3- Oliviera JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. J Allergy Clin Immunol;2010: s297 -s305
- 4- Rosenzweig SD, Fleisher TA. Laboratory evaluation for T-cell dysfunction. J Allergy Clin Immunol. 2013; 131: 622–3.
- 5- Orange JS, Ballow M, Stiehm R et al. Use and interpretation of diagnostic vaccination in primary immunodeficiency: A working group report of the Basic and Clinical Immunology Interest Section of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. Allergy Clin Immunol 2012;130:S1-24