

‘Genetics First’: ‘Next-generation sequencing’ voor kosteneffectieve diagnostiek voor patiënten met een primaire immuundeficiëntie

Genetics First: Cost-effective diagnostic evaluation by targeted next-generation sequencing for patients with primary immunodeficiencies

K. Elsink, MSc¹, dr. M.E. van Gijn², dr. R.G.M. Bredius³, prof. dr. P.M. van Hagen⁴, prof. dr. T.W. Kuijpers⁵, dr. G.W.J. Frederix⁶, dr. J.M. van Montfrans⁷, mede namens het Genetics First for Primary Immunodeficiencies (GF-PID)-consortium

SAMENVATTING

Primaire immuundeficiënties (PID's) vormen een heterogene groep afweerstoornissen. De ernstige tot zeer ernstige afweerstoornissen hebben vrijwel altijd een bekende genetische oorzaak. Van meer dan 300 genen is bekend dat ze een PID veroorzaken en dit aantal blijft jaarlijks groeien. De bekende genen maken het mogelijk om PID-paneldiagnostiek uit te voeren. Een panel van PID-gerelateerde genen wordt met behulp van 'next-generation sequencing' uitgelezen. Waar PID-paneldiagnostiek vroeger als laatste optie werd ingezet als diagnostiek bij primaire afweerstoornissen wordt deze nu al vaak bij een eerste indicatie ingezet. Dit wordt de 'Genetics First'-benadering genoemd. Potentiële voordelen van vroege PID-paneldiagnostiek met behulp van 'next-generation sequencing' zijn het sneller vinden van een diag-

SUMMARY

Primary immunodeficiencies (PIDs) are a heterogeneous disorder group. Most severe forms of PIDs are caused by an underlying genetic defect. Currently, over 300 genetic defects are associated with the development of a primary immunodeficiency. This makes evaluation of a gene panel with PID genes by next-generation sequencing (NGS) in the early stages of the diagnostic trajectory a promising development. In Dutch academic hospitals, NGS has already become integrated as an early diagnostic method for evaluation of PIDs. A specific set of genes is analysed in order to identify potential underlying genetic defects. Potential benefits are the shortening of expensive and complex, traditional diagnostic trajectories and opportunities for targeted gene therapy. Because of the promising developments of early NGS

¹onderzoeker in opleiding, afdeling Pediatrie Immunologie en Infectieziekten, UMC Utrecht, ²laboratoriumspecialist Klinische Genetica, afdeling Genetica, UMC Utrecht, ³kinderarts-immunoloog, afdeling Kinderimmunologie en stamceltransplantatie, LUMC, Leiden, ⁴sectorhoofd Klinische Immunologie, afdeling Interne Geneeskunde/Immunologie, Erasmus MC, Rotterdam, ⁵hoofd afdeling Kinderhematologie, Immunologie en Infectieziekten (KHI), Amsterdam UMC, locatie Emma Kinderziekenhuis, Amsterdam, ⁶assistant professor, afdeling Health Technology Assessment, Julius Center for Health Sciences and Primary Care, UMC Utrecht, ⁷kinderarts-immunoloog, afdeling Pediatrie Immunologie en Infectieziekten, UMC Utrecht.

Correspondentie graag richten aan: mw. K. Elsink, onderzoeker in opleiding, Lundlaan 6, 3584 EA Utrecht, e-mailadres: k.elsink@umcutrecht.nl
Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: ZonMw (projectnummer: 846002001).

Trefwoorden: Genetics First for Primary Immunodeficiencies, genetisch defect, kosteneffectiviteitsstudie, PID, PID-panel, primaire immuundeficiënties, targeted next-generation sequencing, vroege diagnose.

Keywords: cost-effectiveness study, early diagnosis, gene panel, genetic defect, Genetics First for Primary Immunodeficiencies, PID, primary immunodeficiencies, targeted next-generation sequencing.

ONTVANGEN 14 MEI 2018, GEACCEPTEERD 21 SEPTEMBER 2018.

nose en het toepassen van gerichtere interventies bij een primaire afweerstoornis. Verwacht wordt dat hierdoor het dure en complexe diagnostische traject verkort kan worden. Vanwege de veelbelovende ontwikkelingen rondom deze vorm van diagnostiek startte in februari 2017 een kosteneffectiviteitsstudie naar de vroege uitvoering van paneldiagnostiek bij immuundeficiënties. Op deze manier wordt inzicht verkregen in onder andere het zorgverbruik van patiënten die een vroege diagnose hebben gekregen. Ook wordt onderzocht welke patiëntengroepen het meest baat hebben bij een genetische diagnose. De eerste resultaten worden verwacht in 2019.

(NED TIJDSCHR ALLERGIE, ASTMA, KLIN IMMUNOL 2019;19:16-21)

in evaluation of PID diagnostics, a Dutch multicentre study exploring the cost-effectiveness of NGS in PIDs has started in February 2017. Economic evaluation will be performed by comparing two PID-patient cohorts: one group evaluated by traditional diagnostic methods and one group by early targeted NGS in PIDs. The aim of the study is to measure cost reduction of early targeted NGS and to identify patient groups for which early diagnosis would reduce costs and provide improved treatment options. The first results are expected in 2019.

INLEIDING

Primaire immuundeficiënties (PID's) vormen een heterogene groep afweerstoornissen. In sommige gevallen zijn essentiële functies van het immuunsysteem geheel afwezig. De stoornissen binnen deze groep kunnen in ernst variëren van mild tot zeer ernstig. In Nederland wordt de prevalentie van ernstige PID's geschat op 4 op 100.000 inwoners; de minder ernstige PID's komen bij 1 op de 1000 voor.¹ Klinische manifestaties verschillen per stoornis, maar bestaan over het algemeen uit recidiverende infecties en 'failure-to-thrive'.² Ook de ernst van klinische manifestaties verschilt per ziektebeeld en kan variëren van mild tot levensbedreigend. Voorbeelden van doorgaans milde afweerstoornissen zijn selectieve antistofdeficiënties waarbij de productie van specifieke antistoffen verstoord is.³ Behandeling is nodig indien symptomen zich manifesteren en bestaat uit periodieke antibiotica-profylaxe of toediening van subcutane of intraveneuze immuunglobulines. Ernstigere afweerstoornissen omvatten onder andere diverse vormen van 'severe combined immunodeficiency' (SCID), gekarakteriseerd door een stoornis in de T-cel-functie en hierdoor ook in de B-cel-functie. SCID-patiënten die geen stamceltransplantatie ondergaan, overlijden meestal in de eerste levensjaren aan ernstige infecties.³ Alhoewel genterapie in ontwikkeling is, wordt voor deze ernstige afweerstoornis op dit moment vooral hematopoëtische stamceltransplantatie als curatieve behandeling toegepast. Onder ernstige vormen van afweerstoornissen valt ook chronisch granulomateuze ziekte (CGD). Deze afweerstoornis kenmerkt zich door het onvermogen van fagocyten om reactieve zuurstofradicalen te produceren, die nodig zijn voor de intracellulaire 'killing'-activiteit

van deze cellen.⁴ Omdat ziekteverwekkers – vaak specifieke schimmels en bacteriën – op deze manier niet adequaat onder controle gehouden kunnen worden, komen onder andere recidiverende longontstekingen veelvuldig voor in deze groep patiënten.⁵ De behandeling van CGD bestaat dan ook uit langdurig antibiotica-profylaxe en gebruik van antischimmelmiddelen. De toepassing van stamceltransplantatie is ook hier de curatieve behandeling. Steeds meer onderzoek toont aan dat deze vorm van behandeling de voorkeur heeft in het geval van ernstige CGD.⁶ Of een patiënt in de praktijk daadwerkelijk in aanmerking komt voor een stamceltransplantatie is afhankelijk van diverse factoren, waaronder de prognose van het ziektebeeld.⁷ De etiologie van afweerstoornissen verschilt per aandoening en kan genetisch of niet-genetisch zijn. Op dit moment zijn defecten in meer dan 300 genen geassocieerd met een primaire afweerstoornis.⁸ Voor secundaire afweerstoornissen geldt dat er geen onderliggende genetische oorzaak is. Zo kan een specifieke of niet-specifieke antistofdeficiëntie veroorzaakt worden door externe factoren, zoals het gebruik van bepaalde medicatie of chemotherapie.⁹

De ernstige tot zeer ernstige afweerstoornissen hebben vrijwel altijd een bekende genetische oorzaak.⁸ Naast de reeds bekende genetische oorzaken in deze groep blijft het aantal nieuwe bekende genmutaties elk jaar groeien. Zo werden tussen de jaren 2013 en 2015 in totaal 34 nieuwe genvarianten geïdentificeerd die bijdragen aan de ontwikkeling van immuundeficiënties.¹⁰ Door dit groeiende aantal bekende gendefecten en het gebruik van nieuwe, beschikbare genetische technieken kunnen ernstige afweerstoornissen, waaronder CGD en SCID, al op jonge leeftijd gediagnosticeerd worden.

De ernst van deze ziekten samen met het groeiend aantal gendefecten maken deze ernstige afweerstoornissen dan ook een geschikte kandidaat voor het vroeg inzetten van genetisch onderzoek binnen de diagnostiek naar primaire immuundeficiënties.

DIAGNOSTIEK NAAR AFWEERSTOORNISSEN

Omdat primaire afweerstoornissen een breed spectrum aan klinische manifestaties kennen en er veel overlap in presenterende symptomen is, duurt het vinden van de juiste diagnose volgens de 'traditionele' diagnostiek vaak lang. Het is afhankelijk van de specifieke stoornis welk soort diagnostiek wordt ingezet, maar over het algemeen bestaat de initiële evaluatie uit de toepassing van kwantitatieve en kwalitatieve beoordeling van het immuunsysteem in het laboratorium. Voor specifieke of niet-specifieke antistofdeficiënties geldt vaak dat de belangrijkste immuunglobulines – IgG, IgA en IgM – gemeten worden.¹¹ Daarnaast kan de patiënt gevaccineerd worden met eiwitvaccins of polysacharide vaccins waarna immuunglobuline-niveaus pre- en post-vaccinatie gemeten worden om de functionele responscapaciteit van de antistofproductie te beoordelen.

Aanvullende diagnostiek bestaat uit de uitvoering van flowcytometrie, waarbij de aan- of afwezigheid van B- en T-cellen wordt gemeten. Alhoewel het snel vinden van een exacte diagnose bij milde afweerstoornissen niet zo essentieel is als bij de ernstige afweerstoornissen zorgt het aantal testen er wel voor dat het een lang traject kan zijn.

Bij verdenking op een fagocytenstoornis als CGD start de diagnostische fase met het bepalen van het aantal leukocyten.¹¹ Bij uitsluiting van neutropenie en morfologische afwijkingen kan de oxidatieve 'burst' van neutrofielen geanalyseerd worden. Dit gebeurt met behulp van nitroblauw-tetrazolium-testen of een flowcytometrische analyse (dihydrorhodamine 123). In het geval van een vermoeden op SCID zijn het aantal T-cellen, het T-celfenotype en functionele testen belangrijk om de cellulaire afweer te beoordelen. Uiteindelijk helpt beoordeling hiervan het meest waarschijnlijke genetische defect gerichter te achterhalen.¹²

Aanvullende informatie over de immuunstatus wordt verkregen door evaluatie van de T-cel-aanmaak, bijvoorbeeld door het meten van de fractie naïeve T-cellen. Een andere methode is 'T-cell receptor excision circles' (TRECs)-screening, waarbij de TRECs gekwantificeerd worden. TRECs zijn een indicator voor de vordering van de aanmaak van naïeve T-cellen.¹³ Recentelijk is in Nederland een pilotstudie gestart naar de toevoeging van deze TREC-screening

aan het Nederlands hielprikprogramma. Zie hiervoor een recent artikel in het Nederlands Tijdschrift voor Allergie & Astma.¹⁴

Als na initiële evaluatie een vermoeden bestaat op een afwijking in een specifiek gen dat de afweerstoornis veroorzaakt, werd traditioneel gezien Sanger-'sequencing' toegepast om het betreffende gendefect te identificeren. Hierbij wordt na een polymerasekettingreactie van DNA-fragmenten de exacte compositie van nucleotiden geïdentificeerd.¹⁵ Aan de hand hiervan kan de sequentie worden bepaald. Dit wordt toegepast voor het identificeren van enkele PID-gerelateerde genen. Daarnaast kon voor nadere analyse gekozen worden voor PID-paneldiagnostiek, waarbij alle bekende PID-gerelateerde genen gesequencet worden. Indien geen diagnose gevonden werd, kon 'whole-exome/-genome sequencing' ingezet worden.

De initiële evaluatie, uitvoering van Sanger-'sequencing' van enkele kandidaatgenen en eventueel aanvullende genetische technieken maken de zoektocht naar een diagnose een complex en langdurig proces. Het vroeg inzetten van PID-paneldiagnostiek kan een uitkomst bieden voor het lange, kostbare en complexe diagnosetraject.¹⁶

'NEXT-GENERATION SEQUENCING'-TECHNIEKEN EN DE GENETICS FIRST-AANPAK: EEN NIEUWE BENADERING BINNEN DE DIAGNOSTIEK

In Nederland wordt op dit moment bij ongeveer 200 tot 300 patiënten per jaar PID-paneldiagnostiek verricht. De overkoepelende techniek die het mogelijk maakt om 360 genen (of meer) in een test te analyseren, is 'next-generation sequencing' (NGS). Binnen deze techniek wordt onderscheid gemaakt tussen 'whole-genome sequencing' (WGS), 'whole-exome sequencing' (WES) en 'targeted next-generation sequencing' (t-NGS).¹³ Voor WGS geldt dat het gehele genoom van een patiënt wordt gesequencet, wat ervoor zorgt dat genvarianten in exons en niet-coderende regio's geïdentificeerd kunnen worden.¹⁷ Bij uitvoering van WES worden alleen de coderende regionen van het genoom gesequencet. Hierin ligt ongeveer 85% van de verantwoordelijke gen-defecten.¹⁸ In het geval van PID-paneldiagnostiek die in de praktijk wordt uitgevoerd, wordt een WGS of WES uitgevoerd. Er wordt echter alleen een specifieke set aan genen geanalyseerd waarvan bekend is dat afwijkingen in deze genen kunnen leiden tot immuundeficiënties.¹⁹ De samenstelling van dit panel van genen is gebaseerd op de genen die in de literatuur beschreven worden als mogelijke oorzaken voor een immuundeficiëntie. Omdat elk jaar weer nieuwe genvarianten worden beschreven, wordt ook het PID-panel binnen de Nederlandse

diagnostiek minimaal 3 keer per jaar herzien door laboratoriumspecialisten en klinisch genetici binnen een landelijk overleg. Het huidige PID-panel voor de diagnostiek in Nederland omvat 360 genen.

De uitvoering van WGS/WES met PID-panel in de diagnostiek naar genetische aandoeningen is een veelbelovende ontwikkeling: immuundeficiëntie-paneldiagnostiek die wordt ingezet in een vroeg stadium levert sneller een diagnose op en vergroot het aantal correcte diagnoses.^{20,21} Uit een studie van Rae *et al.* bleek dat door goede samenwerking met een multidisciplinair team van immunologen, technici, bio-informatici, laboratoriumspecialisten en klinisch genetici een uitslag binnen 4-8 weken gerealiseerd kan worden.²¹ Een directe vergelijking tussen studies is door de constante ontwikkeling van het PID-panel niet eenvoudig. Vanuit de literatuur is bekend dat op dit moment bij 11-16% van de patiënten een genetische diagnose werd gevonden.^{16,19,20,22} Het gaat hierbij om patiënten waarbij nog geen eerdere genetische diagnose werd gesteld. Bij het daadwerkelijk identificeren van bekende gendefecten bij positieve controles – patiënten waarvan bekend is dat zij een causale mutatie hebben – ligt dit percentage logischerwijs hoger. Al-Mousa *et al.* toonden aan dat bij 96% van de patiënten met bekende mutaties de mutaties ook daadwerkelijk als zodanig geïdentificeerd werd.¹⁶

Daarnaast biedt paneldiagnostiek perspectief voor specifieke therapieën voor de individuele patiënt, zoals doelgerichte immuunsuppressie bij auto-immuniteit en gerichte gentherapie met autologe stamcellen.^{23,24} Een vroege diagnose en gerichte interventie zorgen uiteindelijk voor een verlaagde ziektelast door preventie van ernstige complicaties en ineffectieve behandeling.^{25,26} Tot slot leveren de resultaten van een WGS een beter inzicht in de genotype-fenotype-relaties bij afweerstoornissen.

De kosten voor de gezondheidszorg zijn een ander belangrijk aspect van een vroege diagnose. Door de grote diversiteit aan klinische manifestaties is het traditionele diagnose-traject vaak lang en daardoor ook kostbaar.²⁷ Een diagnose werd in sommige historische gevallen pas na meer dan 10 jaar gesteld.¹ Als gevolg duurt het lang voordat de patiënt met de juiste behandeling start. Hierdoor ontstaat het risico op onder- of overbehandeling, met het risico op complicaties, waardoor onnodige kosten worden gemaakt. Een eerdere correcte diagnose kan deze onnodige kosten tegengaan, omdat minder aanvullende tests nodig zijn voor een definitieve diagnose. Daarnaast kan ook sneller gestart worden met een effectieve behandeling, wat de behandelkosten reduceert.²⁸ Daarnaast zorgt een vroege diagnose met behulp van NGS voor een kortere diag-

nostische fase. Hierdoor zijn patiënten en eventueel ouders/verzorgers niet langdurig afwezig van werk of school en wordt productiviteitsverlies verminderd.

De voordelen die NGS kent zorgen ervoor dat ook in de praktijk deze vorm van diagnostiek steeds vaker en vroeger in het diagnosetraject ingezet wordt. Dit wordt de 'Genetics First'-benadering genoemd. Waar PID-paneldiagnostiek als laatste optie werd ingezet als diagnostiek, wordt deze nu al vaak bij een eerste indicatie voor een PID ingezet. Dat wil zeggen dat op basis van klinische afwijkingen en afwijkende laboratoriumresultaten wordt overgegaan op PID-paneldiagnostiek. Bij 'common variable immunodeficiency' (CVID) betekent een eerste indicatie onder andere dat laboratoriumonderzoek aantoont dat Ig-subklassen verlaagd zijn en de vaccinatierespons laag of afwezig is. Ter illustratie wordt in het kader een casus weergegeven van een patiënt met de diagnose CVID en een mutatie in het *PIK3CD*-gen.

Bij een inmiddels 26-jarige jongeman werd gedurende zijn hele jeugd veel en uitvoerig immunologisch en ook genetisch onderzoek verricht vanwege een verdenking op een primaire immuunstoornis. Indertijd had hij last van recidiverende infecties, een chronische epstein-barrvirus-infectie en een persisterende lymfocytopenie (met name CD4- en B-cellen), met hierbij normale immuunglobuline-gehalten maar wel abnormale pneumokokkenvaccinatieresponsen. Uiteindelijk heeft hij de diagnose 'common variable immunodeficiency' (CVID) gekregen.

Recentelijk is er een mutatie gevonden in het *PIK3CD*-gen. Mutaties in dit gen veroorzaken volgens de laatste classificatie van de International Union of Immunological Societies inderdaad een CVID-fenotype.²⁹ Kenmerkende aspecten bij een *PIK3CD*-'gain-of-function'-mutatie zijn onder andere ernstige bacteriële infecties, een verlaagd aantal lymfocyten en reactivaties van het epstein-barrvirus.⁸ Bij een goede samenwerking binnen een multidisciplinair team van onder andere immunologen, technici, bio-informatici en genetici is het in de praktijk mogelijk met behulp van 'next-generation sequencing' (NGS) sneller een diagnose te vinden bij deze patiënt. Bij de eerste afwijkende laboratoriumresultaten zou bij een verdenking op een immuundeficiëntie dan al overgegaan kunnen worden op NGS, waarbij alle primaire immuundeficiëntie-gerelateerde genen in kaart worden gebracht. Binnen de 'Genetics First'-aanpak zou een uitslag dan binnen 4-8 weken gegenereerd kunnen worden, waarna de patiënt tijdig met passende medicatie kan starten.

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** Primaire immunodeficiënties kunnen sneller en vroeger opgespoord worden met inzet van 'next-generation sequencing' (NGS).
- 2** Op dit moment zijn van meer dan 300 genen bekend dat ze een immunodeficiëntie kunnen veroorzaken en de verwachting is dat dit aantal blijft stijgen.
- 3** In de kosteneffectiviteitsstudie naar NGS-technieken bij diagnostiek van primaire immunodeficiëntie wordt in beeld gebracht in hoeverre NGS tijd en kosten bespaart en welke patiëntengroepen het meest baat hebben bij het vroeg inzetten van deze techniek.

WAT LEVERT DE 'GENETICS FIRST'-BENADERING BIJ PRIMAIRE AFWEERSTOORNISSEN OP?

Vanwege de veelbelovende ontwikkelingen rondom t-NGS en de hoge kosten van traditionele PID-diagnostiek is in februari 2017 een kosteneffectiviteitsstudie gestart naar de vroege uitvoering van paneldiagnostiek in de evaluatie van immunodeficiënties. Binnen het project 'Genetics First for Primary Immunodeficiencies' wordt de komende 3 jaar met alle academische centra in Nederland onderzoek gedaan naar wat het vroeg inzetten van PID-paneldiagnostiek in de praktijk oplevert. In het onderzoek zullen 3 uitkomsten gemeten worden: de tijd tot correcte genetische diagnose, het aantal correcte diagnoses en de kosten van behandeling en diagnostiek. De uitkomsten zullen allereerst gemeten worden in een cohort van 150 patiënten dat volgens de traditionele manier is geëvalueerd. Dat wil zeggen dat binnen deze groep eerst een reeks laboratoriumtesten werd uitgevoerd, gevolgd door genetische technieken aan het eind van het diagnose traject: Sanger-'sequencing' en PID-paneldiagnostiek. Daarnaast worden de genoemde uitkomsten gemeten in een cohort van 150 patiënten dat geëvalueerd wordt volgens de 'Genetics First'-benadering. Dat wil zeggen dat deze groep al bij de eerste klinische afwijkingen en afwijkende laboratoriumresultaten worden doorverwezen voor PID-paneldiagnos-

tiel. Niet alleen wordt op deze manier inzicht verkregen in de kosteneffectiviteit van deze benadering, maar ook wordt in beeld gebracht welke patiëntengroep er het meest baat bij heeft en in welke specifieke gevallen deze benadering de zorgkosten kan reduceren. De eerste resultaten worden verwacht in 2019.

CONCLUSIE

Op dit moment is van meer dan 300 genen bekend dat ze primaire immunodeficiënties veroorzaken. Mede hierom wordt in de praktijk bij de diagnostiek van primaire immunodeficiënties steeds vaker gekozen voor het vroeg inzetten van PID-paneldiagnostiek. Het voordeel van PID-paneldiagnostiek is dat een groot aantal kandidaatgenen in 1 keer gesequencet kan worden. Sanger-'sequencing' heeft als beperkende factor dat slechts enkele kandidaatgenen gesequencet kunnen worden. De verwachting is dat het vroeg inzetten van PID-paneldiagnostiek concrete voordelen oplevert voor wat betreft de patiënt, de algemene gezondheidszorg en de zorgkosten. Om te meten in hoeverre deze techniek daadwerkelijk voordelen oplevert, is het van belang een kosteneffectiviteitsstudie uit te voeren waarin data van een historisch en prospectief cohort vergeleken worden op de tijd tot diagnose, het aantal correcte diagnoses en de kosten van behandeling en diagnostiek.

REFERENTIES

1. Jonkman-Berk BM, Van den Berg JM, Ten Berge IJ, et al. Primary immunodeficiencies in the Netherlands: national patient data demonstrate the increased risk of malignancy. *Clin Immunol* 2015;156:154-62.
2. Cooper MA, Pommering TL, Korányi K. Primary Immunodeficiencies. *Am Fam Physician* 2011;68:2001-9.
3. Van Montfrans J, Boelens J. Primaire immunodeficiënties bij kinderen: een update over behandeling en prognose. *Ned Tijdschr Allergie & Astma* 2010;10:23-9.
4. Roos D. Chronic granulomatous disease. *Br Med Bull* 2016;118:53-66.
5. Van den Berg JM, Van Koppen E, Åhlin A, et al. Chronic granulomatous disease: The European experience. *PLoS One* 2009;4:1-10.
6. Åhlin, Anders Fasth A. Chronic granulomatous disease – conventional treatment vs. hematopoietic stem cell transplantation: an update. *Curr Opin Hematol* 2015;22:41-5.
7. Van den Berg JM, Kuijpers TW. Stoorissen van de neutrofiële granulocyten. In: *Werkboek Kinderimmunologie*. Amsterdam: VU University Press;2014:56-60.

8. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 primary immunodeficiency diseases committee report on inborn errors of immunity. *J Clin Immunol* 2018;38:96-128.
9. Onigbanjo MT, Orange JS, Perez EE, et al. Hypogammaglobulinemia in a pediatric tertiary care setting. *Clin Immunol* 2007;125:52-9.
10. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies expert committee for primary immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* 2015;35:696-726.
11. Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S297-305.
12. Fleisher TA, Bosco Oliveira J. Functional and molecular evaluation of lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:227-34.
13. Seleman M, Hoyos-Bachilolu R, Geha RS, et al. Uses of next-generation sequencing technologies for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *Front Immunol* 2017;8:1-8.
14. Blom M, Bredius R, Driessen G, et al. Introduction of severe combined immunodeficiency newborn screening in the Netherlands. *Ned Tijdschr Allerg Astma* 2018;18:23-9.
15. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular anatomic pathology: Principles, techniques, and application to immunohistologic diagnosis. In: *Diagnostic Immunohistochemistry Therapeutic and Genomic Applications*. Philadelphia: Saunders;2011:42-57.
16. Al-Mousa H, Abouelhoda M, Monies DM, et al. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1780-7.
17. Royer-Bertrand B, Rivolta C. Whole genome sequencing as a means to assess pathogenic mutations in medical genetics and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:1463-71.
18. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, et al. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet* 2012;10:621-32.
19. Nijman IJ, Van Montfrans JM, Hoogstraal M, et al. Targeted next-generation sequencing: A novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:529-34.e1.
20. Stoddard JL, Niemela JE, Fleisher TA, et al. Targeted NGS: A cost-effective approach to molecular diagnosis of PIDs. *Front Immunol* 2014;5:1-7.
21. Rae W, Ward D, Mattocks C, et al. Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics. *Clin Genet* 2018;93:647-55.
22. Gallo V, Dotta L, Giardino G, et al. Diagnostics of primary immunodeficiencies through next-generation sequencing. *Front Immunol* 2016;7:1-10.
23. Walter JE, Farmer JR, Foldvari Z, et al. Mechanism-based strategies for the management of autoimmunity and immune dysregulation in primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016;4:1089-1100.
24. Thrasher AJ, Williams DA. Evolving gene therapy in primary immunodeficiency. *Mol Ther* 2017;25:1132-41.
25. Modell V, Quinn J, Ginsberg G, et al. Modeling strategy to identify patients with primary immunodeficiency utilizing risk management and outcome measurement. *Immunol Res* 2017;65:713-20.
26. Seymour B, Miles J, Haeney M. Primary antibody deficiency and diagnostic delay. *J Clin Pathol* 2005;58:546-7.
27. Borte S, Von Döbeln U, Hammarström L. Guidelines for newborn screening of primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Hematol* 2013;20:48-54.
28. Sadeghi B, Abolhassani H, Naseri A, et al. Economic burden of common variable immunodeficiency: Annual cost of disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2015;11:681-8.
29. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, et al. The 2017 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 2018;38:129-43.