

**T. C.**  
**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**  
**Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı**

**ÇOCUKLARDA TÜBERKÜLOZ TANISINDA TÜBERKÜLİN TESTİ,  
İNTERFERON GAMA SALINIM TESTİ SONUÇLARI VE  
TÜBERKÜLOZA T HÜCRE YANITI İLE KORELASYONU**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Özlem AKTAŞ HANIMELİ**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Hasan Yüksel**

**Manisa, 2010**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, meslek hayatım boyunca kendime örnek aldığım, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışmanım Prof. Dr. Hasan Yüksel'e, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime katkıda bulunan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ali Onağ'a, Prof. Dr. Betül Ersoy'a, Prof. Dr. Hasan Erhun Kasırğa'ya, Doç. Dr. Nermin Tansuğ'a, Doç. Dr. Şenol Coşkun'a, Doç. Dr. Pelin Ertan'a, Doç. Dr. İpek Akil'e, Doç. Dr. Hüseyin Gülen'e, Doç. Dr. Muzaffer Polat'a ve Yrd. Doç. Dr. Ali Aykan Özgüven'e, bilgi ve birikimlerinden faydalandığım, her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm, başta tezimin hazırlanmasında gece gündüz demeden her türlü desteğini benden esirgemeyen Uzm. Dr. Özge Yılmaz olmak üzere tüm uzmanlarıma, asistanlık sürecinde zor dönemlerimizde birbirimize destek olduğumuz ve beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım başta devre arkadaşlarım olmak üzere, tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire arkadaşlarıma ve diğer pediatri kliniği çalışanlarına, tezimin QFT çalışılması aşamasında desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu'na, Doç. Dr. Nuri Özkütük'e ve Biyolog Yeşim Hanım'a, hücre kültürü çalışılması aşamasında desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Seda Vatansever'e, ELISA testlerinin çalışılması için laboratuvar desteği sağlayan Doç. Dr. Ece Onur'a ve titiz çalışmaları için Dr. Aysun Hanım'a,

Hayatım boyunca fedakarlıklarıyla, karşılıksız sevgisiyle her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde çok büyük yere sahip anneme, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, sırdaşım, dert ortağım canım kardeşim Murat Aktaş'a, engin zekası ve tecrübeleri ile hayatıma hep önderlik yapmış, uzman hekim olmamı en çok isteyen ve bu konuda hiçbir fedakarlıktan kaçınmamış olan, sevgisini ve koruyucu şemsiyesini sürekli üzerimde hissettiğim ve bu günümü görebildiğine inandığım canım babama,

Tıp fakültesi öğrenciliği ile başlayıp asistanlık dönemi ile devam eden zorlu eğitim dönemim boyunca büyük sabır göstererek her zamanda yanımda olan, zor zamanlarımda sıkıntılarıma hafifleten, bittim artık dediğimde tekrar güçlenmemi sağlayan, varlığı ile hayatımı güzelleştiren, mutluluğumun kaynağı, sevgili eşim Tunay HANIMELİ'ye,

sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
KISALTMALAR .....	V
TABLO, ŞEKİL, RESİM VE GRAFİK DİZİNİ.....	VII
I. GİRİŞ .....	1
II. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Tanım ve Tarihçe .....	3
2.2 Epidemiyoloji .....	3
2.3 Bakteriyoloji .....	4
2.3.1 Mikobakterilerin Sınıflandırılması.....	4
2.3.2 Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve Morfolojisi .....	5
2.3.2 Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapısı .....	5
2.3.3 Mikobakterilerin Antijenik Yapısı .....	7
2.3.4 Bulaşma .....	8
2.4 İmmünopatoloji .....	10
2.4.1 Doğal İmmünite .....	10
2.4.2 Kazanılmış İmmünite .....	13
2.4.2.1 Hümorale İmmünite .....	13
2.4.2.2 Hücreli İmmünite .....	14
2.4.2.3 Geç Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu .....	19
2.4.3 İmmünopatogenezin Klinik Olarak İncelenmesi .....	20
2.5 Çocuklarda Tüberküloz Enfeksiyonu Kliniği .....	21
2.5.1 Primer Pulmoner Tüberküloz .....	22
2.5.1.2 Latent Enfeksiyon .....	23
2.5.1.3 İlerleyici Primer Akciğer Tüberkülozu .....	23
2.5.1.4 Reaktivasyon Tüberkülozu .....	23
2.6 Çocuklarda Tüberkülozda Tanı yöntemleri .....	24
2.6.1 Tüberkülin Deri Testi (TDT).....	24
2.6.2 Görüntüleme Yöntemleri .....	27
2.6.3 Mikrobiyolojik İncelemeler ve Kültür .....	27
2.6.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	28
2.6.5 İmmünolojik Temele Dayalı Yeni Testler .....	28
2.7 Çocuklarda Tüberkülozda Tedavi .....	32
2.8 Çocuklarda Tüberkülozdan Korunma .....	35
2.9.1 Koruyucu İlaç Tedavisi .....	35
2.9.2 Bacille Calmette-Guerin (BCG) Aşılması.....	36

III. MATERYAL VE METOD .....	37
3.1. Hasta Seçimi .....	37
3.2 Çalışma Dizaynı .....	38
3.3 Yapılan Testler .....	38
3.3.1 Tüberkülin Deri Testi (TDT).....	38
3.3.2 Quantiferon TB Gold In Tube (QFT-GIT) Testi.....	39
3.3.3 Sitokinlerin Çalışılması .....	41
3.3.3.1 Mononükleer Hücre Kültürü (PBMC).....	42
3.3.3.2 ELISA Yöntemi İle Sitokinlerin Çalışılması .....	43
3.4 İstatistiksel Analiz .....	44
IV- BULGULAR .....	45
4.1 Çalışma Gruplarının Sosyodemografik Özellikleri.....	45
4.2 Çalışma Gruplarının Hastalık Özellikleri .....	45
4.3 Çalışma Gruplarının Sitokin Düzeyleri.....	47
4.4 Çalışma Gruplarının Mikrobiyolojik Sonuçları.....	51
V- TARTIŞMA .....	52
VI- SONUÇLAR .....	59
VII- ÖZET .....	60
VIII- İNGİLİZCE ÖZET .....	62
IX- KAYNAKLAR .....	64

## KISALTMALAR

- AC** : Akciğer  
**ARB** : Aside dirençli basil  
**BAL** : Bronkoalveolar lavaj  
**BCG** : Bacillus-Calmette-Guerin  
**CDC** : Centers for Disease Control and Prevention (A.B.D. hastalık kontrol merkezi)  
**CFP-10** : Kulture filtrate protein 10-kDa  
**DH** : Dentritik hücre  
**DSÖ** : Dünya Sağlık Örgütü  
**ELISA** : Enzyme linked immunoassay analysis  
**ELISPOT** : Enzime-bağlı immunospot assay  
**ESAT-6** : Early secreted antigenic target 6-kDa  
**EZN** : Erlich-Ziehl-Nielsen  
**FDA** : Amerika gıda ve ilaç yönetimi  
**Foxp3** : Forkhead box protein 3  
**HIV** : Human Immunodeficiency Virus  
**IFN- $\gamma$**  : İnterferon gama  
**IL** : İnterlökin  
**LAM** : Lipoarabinomannan  
**LTBI** : Latent tüberküloz enfeksiyonu  
**LT** : Lökotrien  
**MAS** : Mide açlık sıvısı  
**MHC** : Major histokompatibilite kompleks  
**MTB**: Mycobacterium tuberculosis  
**MTK**: Mycobacterium tuberculosis kompleksi  
**NK** : Natural killer  
**NO**: Nitrik oksid  
**NTM** : Non-tuberculosis mycobacteria  
**PBMC**: Periferik kan mononükleer hücre kültürü

**PCR** : Polimeraz zincir reaksiyonu  
**PG** : Prostaglandin  
**PPD** : Pürifiye protein derivesi  
**RD-1** : Region of difference-1  
**RNI**: Nitrojen ara ürünleri  
**TDT** : Tüberkülin deri testi  
**TH** : T helper  
**THR** : T hücre reseptörü  
**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor-beta  
**TNF- $\alpha$**  : Tümör nekrozis faktör alfa  
**TLR**: Tool Like Reseptör  
**Treg** : Regulator T hücresi  
 **$\mu\text{m}$**  : Mikrometre  
**QFT** : Quantiferon  
**QFT-G** : Quantiferon -TB Gold  
**QFT-GIT**: Quantiferon –TB Gold In Tube

## TABLO, ŞEKİL, RESİM VE GRAFİK DİZİNİ

<b>Tablo-1.</b> Türkiye’de 2005, 2006 ve 2007 yıllarında tüberküloz insidans ve prevelans değerleri .....	4
<b>Tablo-2.</b> Tüberküloz enfeksiyonu için riskler .....	8
<b>Tablo-3.</b> Tüberküloz basilinin bulaşımı etkileyen faktörler .....	9
<b>Tablo 4.</b> Yaşlara göre primer enfeksiyon sonrası hastalığın seyri .....	22
<b>Tablo 5.</b> TDT’nin yorumlanması.....	25
<b>Tablo 6.</b> TDT’nin yanlış negatif olduğu durumlar.....	26
<b>Tablo 7.</b> IFN- $\gamma$ salınım testleri ve özellikleri .....	30
<b>Tablo 8.</b> TDT ve IFN- $\gamma$ salınım testlerinin karşılaştırılması .....	31
<b>Tablo 9.</b> Çocuklarda tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar ve dozları .....	33
<b>Tablo 10 .</b> Tüberkülozda profilaktik tedavi verilmesi gereken durumlar .....	35
<b>Tablo 11 .</b> Hasta grubu ve kontrol grubu için çalışmaya dahil edilme kriterleri .....	37
<b>Tablo 12 .</b> QFT-GIT sonuçlarının yorumu .....	41
<b>Tablo 13 .</b> Olguların gruplara göre yaş ve cinsiyet farklılıkları .....	45
<b>Tablo 14.</b> Gruplara göre temas öyküsü varlığı, başvuru semptomları, akciğer grafisi ve akciğer tomografisi bulgularının dağılımı.....	46
<b>Tablo 15.</b> Gruplara göre sitokin değerleri .....	47
<b>Şekil-1.</b> Mikobakterilerin hücre duvar yapısı .....	6
<b>Şekil 2.</b> MTB’in makrofajlarca alınımı, fagolizozom oluşumu ve T lenfositlere sunulması .....	12
<b>Şekil 3.</b> TH lenfositlerinin farklılaşması .....	14
<b>Şekil 4.</b> CD8 TH lenfositlerin tüberkülozun kontrolündeki mekanizmaları .....	16
<b>Şekil 5.</b> Kit standartlarının dilüsyonu .....	40
<b>Resim 1.</b> Biocoll solüsyonu ileve edilmiş kan örneği.....	42
<b>Resim 2.</b> Santrifüj işleminden sonra altta eritrositlerin olduğu kısım, en üstte plazma ve PBS arada ise hücrelerin olduğu kısım görülmekte.....	42

<b>Grafik 1.</b> Hasta gruplarına göre IL-4 sonuçları .....	48
<b>Grafik 2.</b> Hasta gruplarına göre IL-10 sonuçları .....	48
<b>Grafik 3.</b> Hasta gruplarına göre IL-12 sonuçları .....	49
<b>Grafik 4.</b> Hasta gruplarına göre IL-17 sonuçları .....	49
<b>Grafik 5.</b> Hasta gruplarına göre TGF- $\beta$ sonuçları.....	50
<b>Grafik 6.</b> Hasta gruplarına göre INF- $\gamma$ sonuçları .....	50



## I-GİRİŞ

Tüberküloz, mikobakteriler tarafından oluşturulan, kronik, granülomatöz ve nekrozitan bir enfeksiyondur. Basil, enfekte hastadan sağlam kişilere genellikle inhalasyon yoluyla yayılmakta ve hasta ile yakın ve uzun süreli teması olanlarda daha yüksek oranda bulaşma görülmektedir. Çocuklar tüberküloz basilini, başta yakın çevreleri olmak üzere basil çıkaran erişkinlerden almaktadır. Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde tüberküloz basili ile ilk karşılaşma küçük yaşlarda olmaktadır (1,2,3).

Çocukluk çağı tüberkülozu tanıda zorluklar içeren ancak gelişmekte olan toplumların genel sağlık politikası açısından tedavinin yaşamsal önem taşıdığı bir enfeksiyondur (4). Erişkin çağı tüberkülozunun başlangıç dönemini oluşturan çocukluk dönemi enfeksiyonlarının erken dönemde tedavisi hem bireysel morbiditenin azlatılması hem de toplumsal hastalık yayılımının engellenmesi açısından gereklidir.

Çocukluk çağı tüberkülozu tanısında geleneksel tanı yöntemi olarak tüberkülin deri testi (TDT) kullanılır. Ancak TDT, hem spesifitesinin düşük olması, hem de ülkemiz koşullarında BCG aşısı uygulanması nedeni ile kesin tanı için yetersiz kalmaktadır. Diğer bir yandan TDT pozitifliği tüberküloz basili ile kişinin karşılaşmış olduğunu göstermekte fakat hastalık hakkında net fikir verememektedir (1,5,6,7). Oysa, basil ile enfekte bireylerin bir kısmında klinik hastalık tablosu ortaya çıkmakta, büyük çoğunluğunda ise enfeksiyonun latent kaldığı ve bu bireylerin de yaklaşık olarak onda birinde aktif hastalık gelişebildiği bilinmektedir. 1 yaşından küçük çocukların aktif hastalık geçirme oranı %50'ye yakındır. Beş yaş altındaki çocuklarda ise reaktivasyon riski %25 civarındadır (5,8). Dünya nüfusunun üçte birinin latent olarak infekte olduğu ve bunların büyük çoğunluğunun gelişmekte olan ülkelerde bulunduğu bildirilmiştir (9).

Tüberküloz kontrolünde en büyük güçlük, tanı koymak, prognozu öngörmek ve latent tüberküloz enfeksiyonuna sahip olan kişilere aktif hastalık gelişmeden koruyucu tedavi vermektir.

Hem çocukluk çağı tüberkülozundaki tanı yöntemlerindeki yetersizlik hem de latent tüberküloz vakalarını saptanması amacıyla daha yeni tanı yöntemleri arayışına geçilmiştir. İnterferon gama salınım testleri çocukluk çağı tüberküloz tanısında özellikle de latent tüberküloz tanısında değerli bilgiler sağlayabilmektedir (5,10,11). Quantiferon- TB Gold In Tube testi (QFT-GIT); M. tuberculosis kompleksinde (MTK) bulunan, atipik mikobakterilerde ve Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)'de bulunmayan Region of difference-1 (RD1) bölgesinde kodlanmakta olan, early secretory antigenic target (ESAT-

6), culture filtrate protein (CFP-10) ve TB7.7 antijenleri ile T hepler (TH) lenfositlerin in vitro olarak uyarılması ile interferon gama (IFN- $\gamma$ ) salgılamaları esasına dayanmaktadır. Şimdiye kadar yapılmış çalışmalar duyarlılığının ve spesifitesinin yüksek olduğunu göstermektedir (12,13,14,15). Ayrıca, tüberküloz hastalarıyla temaslı fakat sağlıklı kişilerin tüberküloz hastalığı geliştirmesi açısından izleminde de IFN- $\gamma$  salınım testlerinin değerli bilgiler sunabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (10,11).

Tüberküloz enfeksiyonu yanıtında özellikle TH1 hücrelerin baskın rol oynadığı bilinmektedir. TH1 ve TH2 tipi hücreler arasındaki yanıtın dengenin de tüberküloz enfeksiyonunun klinik belirtileri açısından anlamlı olduğu düşünülmektedir (16,17). Çocukluk çağı tüberküloz tanısına yaklaşım ve ortaya çıkan kliniğin daha ayrıntılı değerlendirilebilmesi açısından immün yanıtta TH1 ve TH2 tipi yanıtların hangi düzeyde ortaya çıktığının belirlenmesi yol gösterici olacaktır.

TH1 tipi yanıtının göstergesi olan sitokinler arasında, IFN- $\gamma$ , interlökin (IL)12 yer alır. TH2 tipi yanıtın göstergesi olan sitokinler ise IL-4, IL-10 ve transforming growth faktör beta (TGF- $\beta$ ) yer alır (16,17). TH17 ise regülatuar T (Treg) hücreler üzerinden gösterdiği etki ile TH1 ve TH2 dengesini etkileyebilmektedir. Bu nedenle bu hücrenin aktivitesinin değerlendirilebilmesi için de IL-17 düzeyleri bakılabilmektedir (18,19,20).

Bu çalışmada amacımız ilk olarak çocukluk çağı tüberkülozu tanısında TDT ve IFN- $\gamma$  salınım testlerinin değerlendirilmesi, ikincil olarak da bu test sonuçlarında ve ortaya çıkan farklı klinik tablolarda TH1 ve TH2 fonksiyonlarının dolaylı olarak sitokin yanıtı ölçülerek belirlenmesidir.

## II- GENEL BİLGİLER

### TÜBERKÜLOZ

#### 2.1 Tanım ve Tarihçe

Tüberküloz, MTK'nin yol açtığı kronik, granümatöz ve nekrotizan bir hastalıktır (1). Çok farklı klinik formları olan hastalıktan sorumlu olan basil sıklıkla Mycobacterium tuberculosis (MTB) tir. Yaklaşık olarak 150 milyon yıl önceden bu yana var olduğu tahmin edilmesine karşın, Robert Koch tarafından 1982 yılında tanımlanmış olan tüberküloz basilinin diğer bir adı Koch basilidir (1,2). Tüberkülozun klinik semptomları ve 'phthisis' olarak ismi ilk olarak milattan önce 460 yılında Hipokrat tarafından tanımlanmış ve zamanın en yaygın ve ölümcül hastalığı olarak nitelendirilmiştir (21,22). Fakat tüberkülozun tam olarak tanımlanması, aşı ve tedavi ile gelişmelerin kaydedilmesi 19. yüzyıldan sonraya kalmıştır (22).

#### 2.2 Epidemiyoloji

1950'li yıllarda etkin tedavinin başlanması ile tüberküloz ciddi anlamda kontrol altına alınmaya başlanmış, ancak 1990'lı yılların başından itibaren vaka sayısında dünya çapında artışlar başlamıştır (22).

Şehir içi kalabalık yaşam koşulları, göçler, fakirlik, yetersiz beslenme, sağlık hizmetlerine erişimdeki aksamalar ve kontrol-koruma programlarındaki yetersizlik epideminin önüne geçemedeki zorluklardır. Human Immunodeficiency Virus (HIV)'ün yaygınlaşması ve çoklu ilaç direncinin de gelişmeye başlamış olması bu duruma katkı sağlamaktadır (1,2).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2007 yılında yeni tüberküloz vaka sayısı 9.27 milyon dur. 9.27 milyon yeni vakanın 1.37 milyonu (%14.8) HIV pozitifdir. Dünya nüfusunun üçte birinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Enfeksiyon oranları Afrika, Asya ve Latin Amerika'da daha yüksektir (9).

Türkiye'de, tüberküloz insidansı, 1965'de yüz binde 172,9, 1980'de 52,2, 1990'da 44,5, 1997'de 32,6, 2000'de 25,6 iken 2005 yılında 18.753 yeni olgu saptanmış ve hastalık insidansı yüz binde 27 olarak bildirilmiştir. Akciğer tüberkülozu oranı %73'tür. Veriler,

ülkemizin tüberküloz açısından orta derecede yaygın olduğu ülkeler grubunda olduğunu göstermektedir (23).

2009 yılı DSÖ verilerine göre, dünya genelinde 2007 yılında olgu bulma oranı (%70) ve tedavi başarı oranı (%85) hedeflerine ulaşabilen 36 ülkeden birisi de Türkiye olmuştur (9).

Ülkemizdeki 2005, 2006 ve 2007 yıllarındaki tüberküloz insidans ve prevelans değerleri DSÖ verilerine göre tablo 1’de gösterilmektedir (24).

**Tablo-1.** Türkiye’de 2005, 2006 ve 2007 yıllarında tüberküloz insidans ve prevelans değerleri

DSÖ Türkiye verileri		2005	2006	2007
İnsidans Tümü	Sayı	21.089	21.752	22.136
	100 binde	29	29	30
İnsidans Yeni	Sayı	9.490	9.788	9.961
	100 binde	13	13	13
Prevelans Tümü	Sayı	32.348	23.875	25.189
	100 binde	44	32	34
Mortalite Tümü	Sayı	3.416	3.448	3.789
	100 binde	5	5	5

Dünya genelinde tüberküloz insidans oranlarının %10-20’sini 15 yaş altı çocuklar oluşturmaktadır. Her yıl yaklaşık 3 milyon erişkin, 450000 çocuk tüberküloz nedeniyle hayatını kaybetmektedir (9).

Çocuklarda tüberküloz tanısını koyabilmek zordur, vakaların yaklaşık yarısı asemptomatiktir, öksürük mekanizmaları zayıftır (1,2,3,25). Akciğer tüberkülozunda basil yükü azdır ve kaviteler nadiren vardır. Latent enfeksiyondan hastalık oluşturma oranı %40’lara ulaşabilmektedir, akciğer dışı tüberküloz oranları da erişkinlerden fazladır (1,2,4,26).

Çoğu pediatrik olgu, kısa inkübasyon süresi ile yeni bir enfeksiyonun hızlı ilerleyişine bağlı ortaya çıktığı için, toplumda yüksek yeni bulaş hızını gösterir. Bu nedenle, toplumdaki enfekte ve hasta çocuklar, Tüberküloz kontrol program aktivitelerinin etkilerini değerlendirmek için yararlı parametrelerdir. Ancak aktif hastalık gelişimi, konağın immünolojik durumuna da bağlıdır (1,2).

## 2.3 Bakteriyoloji

### 2.3.1 Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mikobakteriler, Actinomycetales sınıfından ve yüksek guanin ve sitozin içeren Mycobacteriaceae ailesinin Mycobacterium genusundandır. Mycobacterium genusu da kendi içinde MTK, Mycobacterium leprae, Non tuberculosis mycobacterium (NTM) olarak

üçe ayrılır. MTK, birbirleriyle genetik yakınlık gösteren beş bakteri içermektedir. Bunlar; M.tuberculosis, M.bovis, M.microti, M.africanum, M.canetti'dir. Tüberküloz hastalığından yüksek oranda sorumlu olan, MTB'tir, M.bovis de nadir olarak hastalığa yol açabilmektedir (27,28).

İzole edilmiş olan mikobakteriler, üreme hızları, ışıklı ve ışısız ortamda pigment oluşturabilme özelliklerine göre Runyon sınıflandırması ile dört grupta sınıflandırılmıştır. MTK ve M leprae grup dışında bırakılmıştır (28).

### **2.3.2 Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve Morfolojisi**

Mikobakteriler aerop, sporsuz, hareketsiz, pleomorfik, 0.2-0.6 x 1-10 µm uzunluğunda basillerdir. Hücre duvar yapılarında mikolik asit denilen yağ asitlerinin fazla olması (%25) dolayısıyla aside dirençlidirler. %95 etil alkol ve %3 hidroklorikasit (asit-alkol) mikobakterileri dekolarize edemez, bu sebeple 'aside dirençli basil (ARB)' olarak da adlandırılırlar. Mikobakteriler, pek çok dezenfektana ve laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan boyalara dirençlidirler, gram boyama ile boyanamazlar. Erlich-Ziehl-Nielsen (EZN) boyası ile mavi zemin üzerinde kırmızı renkte, tek tek ya da gruplar halinde çizgiler oluşturmuş olarak izlenirler (27,28,29). Basilin endotoksini ve ekzotoksini yoktur, hücre duvarı ve sitoplazmasında değişik yapıda antijenler içerir. Hücrenin parçalanması ile açığa çıkan komponentler toksiktirler ve konak yanıtını etkilerler (29,30).

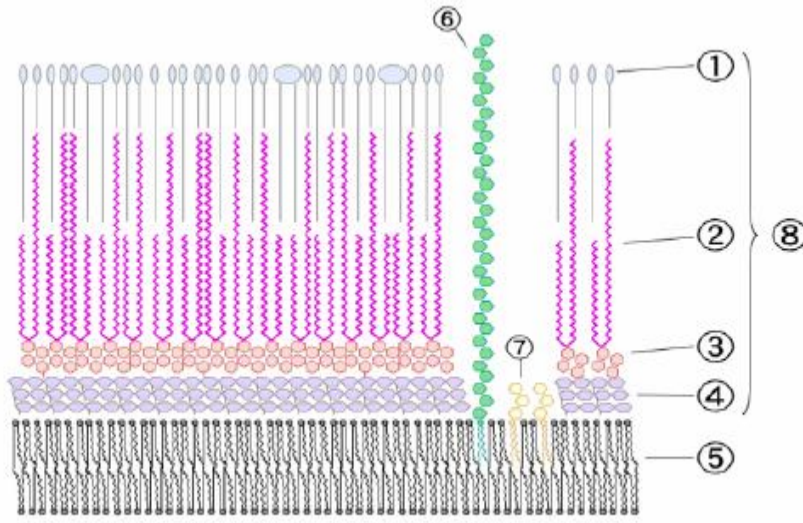
MTB, zorunlu aerobtur, büyüme hızı oksijen varlığına bağlıdır. İnsan vücudunda oksijen parsiyel basıncının yüksek olduğu organ ve dokulara yerleşerek üreyebilir (31).

Replikasyon süreleri 15-20 saattir, uygun kültür ortamında genellikle 4-6 haftadır. Löwenstein –Jensen besiyeri'nde optimal 33–39°C ısıda, pH 6,5-6,8'de, % 5–10 CO<sub>2</sub>' li ortamda çoğalabilirler. Olumsuz koşullara çok dayanıklıdır ve +4°C'de haftalarca, -70°C'de yıllarca canlılığını koruyabilirler (27,29,32). Kültür ortamında 12 yıl kadar enfektivitelerini sürdürebilirler.

### **2.3.2 Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapısı**

Mikobakterilerin hücre duvarında en içte diğer bakterilerle de benzerlik gösteren protein ve fosfolipitlerden oluşan çift katlı plazma membranı vardır. Plazma membranının üzerinde birbirine kovalan bağlarla bağlı peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asitten oluşan üç makromolekül duvarın iskeletini oluşturur. Bu yapılara, açıl trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfotidil inositolun glikosil derivatlarıyla antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapılar da katılmaktadır. Hücre duvarının plazma membranına dayanak noktası ise bir lipopolisakkarid olan lipoarabinomannan (LAM)'dır (29,33,34).

N asetilglukozamin ve Nasetil muramik asit içeren peptidoglikan, bakteriye şeklini veren, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandıran iskeletin en temel elemanıdır (34).



**Şekil-1.** Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapısı.

(1.Dış duvar lipitleri, 2.Mikolik asit, 3.Polisakkaritler (arabinogalactan), 4. Peptidoglikan, 5.Plazma membranı, 6.Lipoarabinomannan (LAM), 7.Fosfotidil inositol mannosid, 8.Hücre duvar iskeleti).

### **Lipidler:**

Mikobakterilerin hücre duvarı ağırlığının %60'ını lipitler oluşturur. Bunların başlıcaları mikolik asit, waxes D (balmumu), 6,6'-dimikolat,  $\alpha$ -D trehaloz (kord faktor), fosfolipidler, glikolipidler, lipoglikan, lipoprotein ve fosfolipitlerdir (27,28).

Mikolik asitler, mikobakterilerde hücre duvarı kuru ağırlığının %50'sini oluştururlar. Basilin aside dirençli boyanmasında, hidrofobik olup hücre zarından sıvı kaybını önlemede ve böylece basilin uzun süre canlı kalmasında etkilidirler. Mikobakterilerde  $\alpha$ -mikolik asit ve meromikolik asitler olmak üzere iki farklı mikolik asit türü vardır. Meromikolik asitlerden ketomikolatlar MTB'in makrofaj içerisinde yaşamasına yardım ederler, yokluklarında fagositik hücrelerde mikobakterilerin ölümü kolaylaşır. Ayrıca mikolik asitler, CD1 antijenler olup TH lenfosit subgrupları tarafından bu reseptörler yardımı ile antijen olarak tanımlanırlar. Yani konağın mikroorganizmaya karşı immun cevabını da etkilerler. Buna karşılık serbest kompleman bağlanmasını engelleyerek fagositozu önlerler (27,29,34).

Waxes D, mikolik asit moleküllerinin ucunda yer alan bir peptidoglikolipid yapısında bir immünoadjuvandır. Antikor ve interferon yapımını indüklediği gösterilmiştir (27,29).

Kord faktör, mikolik asitlerin trehalose gibi şekerlerle bağlanmasıyla oluşur, basilin patojenitesini gösterir. Kord faktörün mitokondri zarını zedeleyici ve oksidatif fosforilasyonu engelleyici özelliği vardır. Fagositlerin göçünü engelleyerek ve bakterilerin paralel zincirler halinde yerleşip üremelerine yol açarak granülom oluşmasına da neden olur (28,29,33).

Sülfatidler (sülfolipidler), basilin virulans faktörlerindedir. Fagozom-lizozom birleşmesini engelleyerek bakterinin intrasellüler yaşamasını sağlarlar. Aynı zamanda adenozintrifosfatın fagolizozom içine girişini ve böylece fagolizozom içindeki pH değerinin düşmesini engelleyerek tüberküloz basilinin fagolizozom içinde canlılığını sürdürmesini sağlar. Kord faktör toksisitesini de artırmaktadır (27).

#### **Proteinler:**

Mikobakterilerin hücre duvar yapısının %15'ini transport proteinler ve porinler oluşturmaktadır. Proteinler, basile antijenik özellik kazandırır, duvar polimerlerinin sentezinde rol alır, porları oluşturarak atık maddelerin dışarı transportunu sağlar. Aynı zamanda hastalarda hücrel immunitiyi uyaran en önemli antijenlerdir (33).

#### **Polisakkaritler:**

En büyük antijenik kısmı oluştururlar. Makrofajlardan tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) salınımını artırır, erken aşırı duyarlılık reaksiyonunu başlatırlar. Nötrofillerin migrasyonunda ve inflamasyonun oluşmasında etkilidirler (27,34).

#### **2.3.3 Mikobakterilerin Antijenik Yapısı**

MTB'in yapısında yer alan protein, lipid ve polisakkaritlerin tümü immünojeniktir. İmmünoşüpresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif kompleman yolu aktivasyonu gibi rolleri vardır (34).

Özellikle de duvar yapısındaki proteinler immünolojik yanıtta ön plandadır. Saflaştırılmış protein derivativesi (Purified Protein Derivative: PPD), old tüberkülinin kollodyen membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiştir. PPD'den daha saf antijenlerin elde edilebilmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucu antijen 5, antijen 6, 38 Kd antijen, Antijen A60, 88kD antijen elde edilmiştir. Saflaştırılmış mikobakteriyel antijenler içinden 65 kD antijeni, ısı şok proteinlerine çok benzemekte ve yüksek oranda immünojen özelliktedir. Konak dokularda otoimmün reaksiyonlara ve kazeifikasyon nekrozuna yol açtığı gösterilmiştir (27,34).

24 kDa ağırlığındaki MPT64 antijeni de MTK'ne özgül antijendir. Yapılan çalışmalarda MPT64 antijeninin orta derecede lenfosit yanıtına yol açtığı gözlenmiştir (35).

Son yıllarda ise daha düşük moleküler ağırlıklı antijenler kültür filtratlarından izole edilmiştir. Bu antijenler, sadece MTK'de bulunan RD1 bölgesinde kodlanan ESAT-6 ve CFP-10'dur (36,37). RD1 yapısal 9 proteini kodlayan genleri içeren bir bölgedir. Bu proteinler Rv3971 ile Rv3979 arasında adlandırılmıştır, immünolojik olan ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerini de kodlamaktadır (37,38).

İn vitro pasajlar sırasında BCG suşunda bazı bölgelerin delesyona uğradığı gösterilmiş ve bu bölgeler RD1, RD2 ve RD3 olarak adlandırılmıştır. ESAT-6, CFP-10 ve MPT64 için genlerin bu delesyona uğrayan bölgelerde olduğu gözlenmiştir (39). Bu nedenle bu gen bölgesinin virulansla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

ESAT-6 ve CFP-10 temel olarak MTK'nin üyelerinde (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) ve *M. leprae*'de bulunan düşük molekül ağırlıklı bir proteindir. ESAT-6'nın tüberküloz hastalarında, periferik kan mononükleer hücre (PBMC)'lerini IFN- $\gamma$  salınımı için tetiklediği belirlenmiştir (6). ESAT-6 ve CFP-10'un makrofajlara etkili bir şekilde bağlandıkları, TNF- $\alpha$  salınımını indükleyebildikleri ve nitrik oksid (NO) sentezini regüle edebildikleri gösterilmiştir (40).

#### **2.3.4 Bulaşma**

Dış ortam koşullarına oldukça dayanıklı olan MTB, esas olarak damlacık enfeksiyonu şeklinde bulaşmaktadır. Nadiren de olsa gastrointestinal yolla, intrauterin bulaş ile, enjeksiyon ve konjonktival yolla da bulaş olabilmektedir (31).

İnhalasyon yoluyla bulaşta, 1-10 basil içeren ve 10  $\mu$ m çapındaki damlacıklar rol oynar. Esas olarak etkin enfektif damlacıklar 5  $\mu$ m ya da altında olanlardır, mukus ve siliyer sistem aktivitesinden korunarak bronşiol ve alveollere yerleşirler. Enfeksiyon oluşması için 5-200 basilin inhale edilmesi gerektiği kabul edilmektedir (41,26). Tüberküloz enfeksiyonu için risk faktörleri Tablo-2'de sunulmaktadır (1,26).

#### **Tablo-2. Tüberküloz Enfeksiyonu için Riskler**

- 1- Yüksek riskli erişkinlere maruz kalan çocuklar (özellikle 1 yaş altı olanlar)
- 2- Tüberküloz prevalansının yüksek olduğu toplumda yaşayanlar.
- 3- Tüberküloz insidansının yüksek olduğu ülkeden göç edenler ve bu kişilerle birlikte yaşayanlar
- 4- Tüberküloza yakalanma riski yüksek olan kişiler ile sık temas edenler (HIV ile enfekte, evsizler, uyuşturucu alışkanlığı olanlar)
- 5- İmmün sistemi baskılanmış kişiler (farmakolojik baskılanma, malnütrisyon, kronik böbrek yetersizliği, lenfoma, malignite)
- 6- Yüksek riskli hastalarla uğraşan sağlık çalışanları



Çevreye bulaştırıcılık, kaynak olgudaki lezyonun yeri, basil yükü, basilin virülansı, kalabalık ortamda yaşam, küçük hacimli ve havalandırmanın iyi yapılmadığı ortamlar gibi enfekte olgu ile uzun süreli ve yakın maruziyetle artmaktadır (1,41,42). Basil ile karşılaşmanın immün sistemi de hastalık oluşmasında önemlidir. Beslenme bozukluğu olan, diyabet, kanser gibi kronik hastalığı olan veya immün sistemi baskılayan HIV benzeri enfeksiyonu olan kişilerde enfeksiyon riski artmaktadır (1,2). Tüberküloz bulaşımını etkileyen faktörler Tablo 3'te gösterilmiştir (26).

**Tablo-3.** Tüberküloz basilinin bulaşımını etkileyen faktörler

#### **Kaynak Hasta**

- \* Lezyonun yeri
- \* Basil yükü, canlılığı ve virülansı
- \* Öksürük, hapşırık gibi manevraların varlığı

#### **Ortam**

- \* Havalandırmanın yetersizliği
- \* Ultraviyole, güneş ışığından yoksunluk
- \* Hasta kişi ile yakın ve uzun süre temas varlığı

#### **Hedef kişi**

- \* Hastalığa/basile dirençlilik (önceki hastalık, koruyucu tedavi, BCG, MTB dışı mikobakteri enfeksiyonları)
- \* Hastalanmayı artıran durumlar (HIV, malnurtisyon, kronik hastalık varlığı)

Çocuklarda, özellikle 1 yaş altında basille karşılaşma sonrası enfeksiyon gelişme oranı daha yüksektir. Çocukluk çağı olgularında, ev içi aile üyeleri ile yineleyen ve süregelen temas çok önemlidir. Böyle durumlarda solunum sisteminde yüksek basil yükü olabilecek erişkin enfekte vaka araştırılmalıdır (31,41). Çocuklarda kavitasyon oluşmaması, etkin öksürme yapamamaları ve sekresyonlarındaki basil oranının az olması nedeniyle bulaştırıcılıkları daha düşüktür (1,2).

Tüberküloz hastalığının etkili tedavisi başladıktan sonra ilk günlerden itibaren basil sayısı ve öksürük sıklığı hızla azalmaktadır. Bulaştırıcılık tedavi başlangıcından 2 hafta sonra bitmekte, ancak bazı vakalarda haftalar boyunca sürebilmektedir. Bu nedenle, tüberkülozlu hastaların hızlı bir şekilde izole edilmesi ve etkili tedaviye başlanması bulaşımı engellemek açısından çok önemlidir (1,43).

## **2.4 İmmünopatoloji**

Pulmoner tüberküloz enfeksiyonu, basillerin inhalasyon yoluyla organizmaya girişi ile başlamaktadır. 5 µm'den büyük partiküller, lizozim, laktoferrin gibi antibakteriyel sekresyon içeren üst solunum yollarının silyalı epitelyumu tarafından tutulurken, küçük partiküller alveollere ulaşmakta ve alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir. Tüberküloz basilinin histolitik enzimleri ve toksinleri yoktur, virulans özellikleri büyük oranda sitoplazmik zarın dışında kalan yapılar ve salgıladığı proteinlerce sağlanmaktadır (41,44).

Tüberküloza karşı konak yanıtında, hem doğal hem de kazanılmış immünite rol oynamaktadır (17).

#### **2.4.1 Doğal İmmünite**

Enfeksiyöz etken, ilk karşılaşmada doğal savunma yollarıyla dışarı atılır veya öldürülür. Doğal savunma, kazanılan immünite gelişinceye kadar enfeksiyonu kontrol altında tutmada önemlidir (17,27). Doğal immünitede makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler ve naturel killer (NK) hücreler görev alsa da esas sorumlu olan makrojaflar ve salgıladıkları IL-12'dir. Makrofajlar, basili tanıyıp fagosite etme, fagozom-lizozom birleşmesi, basilin çoğalmasının inhibisyonu ve/veya öldürülmesi, diğer immün sistem hücrelerinin olay yerine çağırılması, lokal inflamatuvar yanıtın oluşması, kazanılmış immün yanıtın başlaması için öncülük yapan hücrelerdir (17).

Nötrofiller ve NK hücreler basille karşılaşma sonrası olay yerine ilk gelen hücrelerdir. Nötrofiller, bakterilerin fagositozu, oksijene bağımlı öldürme mekanizmaları veya hücre dışı degranülasyon ürünleri ile konak bağışıklık sistemine katkı sağlarlar. NK hücreler ise direk olarak basilleri öldürür veya ilerleyen aşamalarda basille enfekte hücrelerin apoptozunda rol alırlar. IFN-γ salgılayarak makrofajları uyarır ve aktive makrofajların IL-12 salgılamalarını ve doğal immün yanıtın başlamasını sağlarlar (17).

#### **Makrofaj-Basil Bağlanması ve Fagolizozom Oluşumu**

Makrofajların yüzeyinde kopleman reseptörleri (CR1,CR2,CR3,CR4), mannoz reseptörleri (MR) ve IL-10, TNF-α, IFN-γ, CD14, Tool Like Reseptör (TLR1,2,3,4) ler gibi hücre yüzey reseptörleri, makromoleküllerin yakalanmasını sağlayan çöpçü reseptörleri yer almaktadır. Bu reseptörler, MTB'in makrojaflar tarafından tutulması ve fagosite edilmesinde rol oynamaktadır (17).

MTB'in hücre duvar yapısında bulunan LAM, mannoz reseptörlerine bağlanır. Mannoz bağlı LAM virulan mikobakteri türlerinde bulunur, bağlanmanın yanı sıra makrofaj yanıtını inhibe ederek, MTB'in hücre içinde yaşamasını sağlar (45). LAM, infekte makrofajlardan kemoatraktant kemokin (monocyte chemoat tractant protein-1: MCP-1,

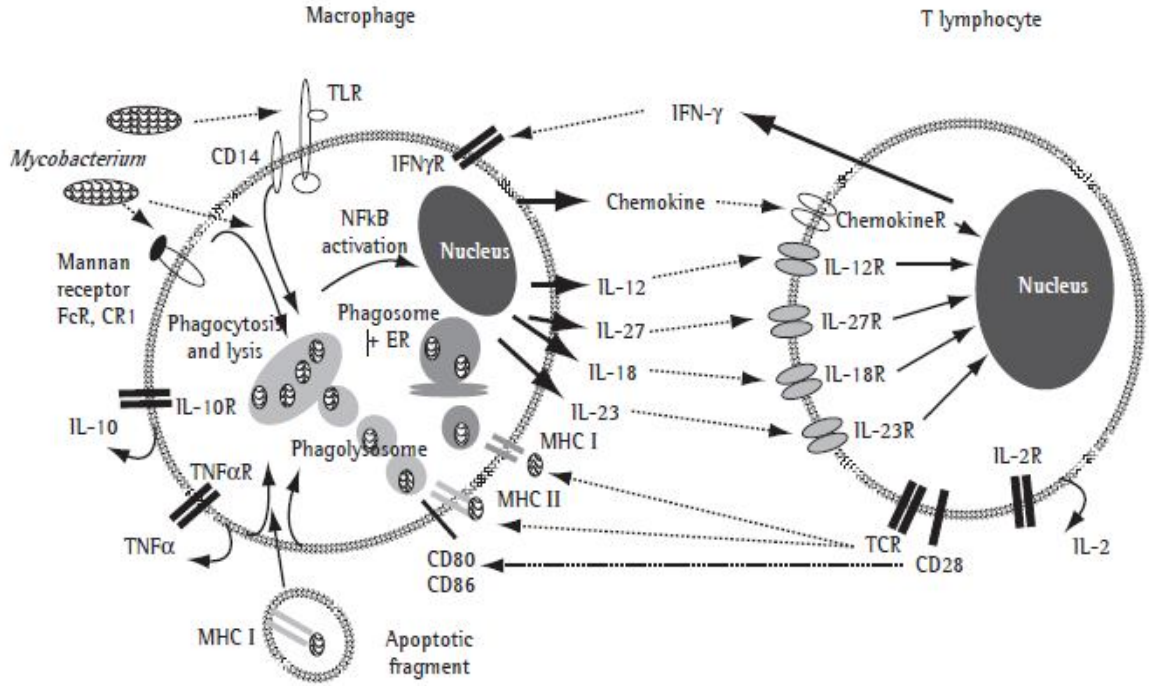
regulated on activation normal T cell expressed and secreted: RANTES) ve IL (özellikle IL-8) yapımını sağlar. Bu kemokinler, enfeksiyon odağına makrofaj, monosit, nötrofil ve T lenfosit kemotaksisine neden olur (17,44).

Basil makrofaj içine alındıktan sonra, fagolizozom füzyonu olur ve intralizozomal asit hidrolazlar bakterinin sindirilmesi için boşaltılır. Böylece ortamın pH'sı düşer, basiller lizozomal proteolitik enzimlerin etkisi, reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve RNI) üretilmesi ile yok edilmeye çalışılır (45). IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'nın fagositleri uyarması ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve RNI'nin sentezi artar. NO sentaz L-arginini substrat olarak kullanarak RNI oluşturur. NO sentaz geninde defekt olan farelerde tüberküloz basilinin daha hızlı replike olduğu gösterilmiştir (46). 1,25 dihidroksi vitamin D<sub>3</sub>'ün de NO sentaz enziminin sentezini arttırdığı ve bu sayede MTB üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (47).

Mikobakteriyel sülfatidler ve kord faktör fagolizozomal füzyonu inhibe etmekte ve basilin makrofaj içinde çoğalarak yaşamına devam etmesini sağlamaktadır (21). 9kDa lipoproteini ise TLR-2 üzerinden makrofajların IL-12 üretimini inhibe etmektedir (48).

Makrofaj içerisinde peptid antijenlerine parçalanmış olan mikobakteri proteinleri major histokompatibilite kompleks (MHC) sınıf II molekülleri yardımıyla, CD4 T-lenfositlere sunulur. Antijenlerin sunumu öncesinde hücre içerisindeki işlenmesi, protein antijenlere karşı spesifik immünitinin temelini oluşturmaktadır. Makrofaj içinde fagozomdan kurtulan antijenler ise MHC sınıf I molekülleri ile CD8 T-lenfositlere sunulmaktadır (16,36). T lenfositlerinin salgıladığı IL-2, hem kendi aktivasyonlarını arttırmakta hem de diğer T lenfositlerinin olay yerine gelmelerini sağlamaktadır. CD8 T lenfositler, perforin, granzim ve granülizini ile de basile ve basille enfekte hücrelere karşı sitolitik aktivite gösterirler (17).

Mikobakteri antijenleri tarafından uyarılmış olan makrofajlar IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  gibi sitokinleri salgılamaktadır. Özellikle de IFN- $\gamma$  ve IL-12 ile uyarılan CD4<sup>+</sup> T hücrelerinden salgılanan IFN- $\gamma$ , makrofajların aktivasyonlarını ve yüzeylerindeki MHC II ekspresyonunu daha da artırır, monositleri ve nötrofilleri ortama çağırır ve granülom oluşumu başlar. Bu şekilde opsonizasyon, kompleman aktivasyonu ve fagositoz kolaylaşmakta, basilin sindirilerek yok edilmesi sağlanmaktadır (45,49). Şekil 2'de MTB'in makrofajlarca alınımı, fagolizozom oluşumu ve T lenfositlere sunulması gösterilmektedir.



**Şekil 2.** MTB'in makrofajlarca alınımı, fagolizozom oluşumu ve T lenfositlere sunulması  
**Apoptozis**

Apoptozis, enfekte alveoler makrofajlar ve diğer fagositik hücrelerde bakteri üremesinin sınırlandırılması ve enfeksiyonun yayılmasının önlenmesinde etkili olan programlı ölüm mekanizmasıdır (44). Aktive makrofajlar ve dentritik hücrelerden salınan TNF- $\alpha$  apoptozda etkili sitokinlerdendir.

Makrofaj apoptozu granülom içinde meydana gelmektedir. Granülomlar, merkezlerinde kazeifikasyon nekrozu, çevresinde de apoptotik makrofajlar ve lenfositlerden oluşur. Granüloma içindeki makrofajlar, pro-apoptotik molekül Bax'ı ekspres ederler. Bcl-2 ise anti-apoptotik moleküldür. Bax, granüloma içinde meydana gelen hücre içi sinyallerle tetiklenen apoptoz yolunu aktive eder (50).

Apoptoz giden makrofajlarda mikobakteriler öldürülürken nekroza giden makrofajlarda ölüm gerçekleşmez. Bu nedenle mikobakteriler, canlı bakteri sayısını azaltan makrofaj apoptozundan korunmak için TNF- $\alpha$  nötralizasyonu gibi farklı yollar geliştirirler (50).

IL-2 ve TNF- $\alpha$ , CD8 T lenfositleri aktive eder ve NK hücre aktivitesini artırır (51). Makrofajlar bakterileri fagosit edip öldürürken, NK hücreler ve CD8 T lenfositler, granül ekzositoz ve fas-fas-L yoluyla direk basilleri veya basiller ile birlikte makrofajları öldürürler (17,44). CD8 T lenfositlerin bir diğer makrofaj öldürme mekanizması perforin aracılığı ile makrofaj membranında delikler oluşturarak granzim A, granzim B (serin proteaz) ve granulozin gibi toksik proteinlerin hücre içine girişinin sağlanmasıdır (52,53).

## **Genetik Faktörler**

Tüberküloz basili ile karşılaşma sonrası, konağın immün yanıtının belirlenmesinde genetik yapı da belirleyici faktörlerdendir (2,44). Genetik olarak dirençli konakta makrofajlar basili yok ederken duyarlı konakta basil makrofajlar içinde hızla çoğalmaktadır.

Tüberküloz genetiğinde, en çok üzerinde durulan genetik faktörler; HLA tipleri, vitamin D reseptörleri, mannoz bağlayan lektin (MBL), TNF- $\alpha$  ve IL-1, natural resistance associated macrophage protein gene 1 (NRAMP 1) geni ve IFN- $\gamma$ 'dır (54,55).

Basilin makrofaj yanıtını bozması; fagolizozomdaki düşük pH'nın nötralizasyonu, hücre duvar yapısındaki lipidler ile makrofajların lizozomal hidrolitik enzimlerine (lizozim, lipaz, fosfotaz) direnç gelişmesi, reaktif oksijen ara ürünlerinin etkisinin inhibisyonu, makrofaj aktive edici moleküllerin sentezinin önlenmesi ile basil fagolizozomun öldürücü etkisinden kurtulabilmektedir (27,29,44).

### **2.4.2 Kazanılmış İmmünite**

Kazanılmış immünite, doğal immünite elemanlarının uyarılmasıyla tetiklenen, T ve B lenfositlerin işlev gördüğü tek bir antijenik yapıya karşı oluşan ve bellek özelliği bulunan immün yanıttır. Hücresel immün yanıt, T hücre aktivasyonu ve bunların efektör işlevleri ile yürütülürken humoral immün yanıt ise B lenfosit olgunlaşması ve antikor sentezi ile sağlanmaktadır (16,17). Her iki tip immün yanıt hücreleri arasında önemli etkileşimler gerçekleşmektedir. TH lenfositler antikor gelişimine, immünglobulin izotip değişimine ve bellek oluşumuna katkı sağlarlarken, B lenfositler de antijen sunan hücreler olarak T lenfositlere destek olmaktadır (17).

Konak, basille ilk karşılaşmadan sonra MTB'in hücre duvarında bulunan lipid tüberküloproteinler tarafından indüklenen özgül hücresel immün yanıt (hücresel immünite ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu) kazanır. Kazanılan immünite, tüberküloz basillerinin enfeksiyon odağında lokalize kalmasını sağlar (44).

#### **2.4.2.1 Hümorale İmmünite**

MTB, hücre içi bakteri olması sebebiyle humoral immün sistem basilin yok edilmesinde tek başına yetersiz kalmaktadır. Ayrıca humoral immün sistemin nasıl ve ne derecede etkili olduğu net olarak anlaşılamamıştır. Basilin hücre duvarında bulunan birçok protein, karbonhidrat ve lipid yapıların antikor üretimini stimüle ettiği bilinmektedir. Tüberkülozda humoral immün sistem, opsonizasyon, kompleman aktivasyonu, antikor bağımlı sitotoksosite ve makrofajların fagositoz fonksiyonlarında etkilidir (16,17).

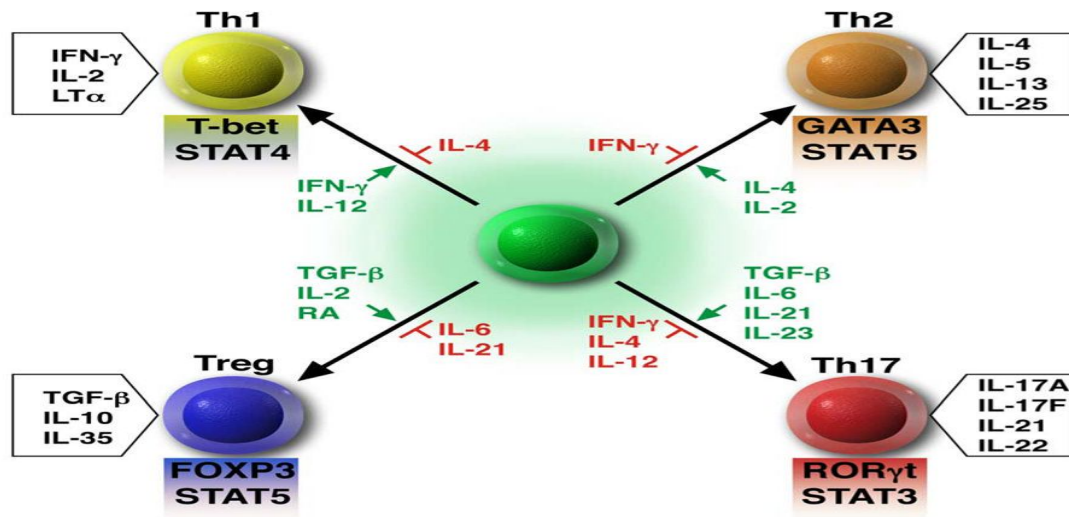
BCG sonrası oluşan LAM spesifik antikorların nötrofil, monosit ve makrofajların mikobakteriler üzerindeki inhibitör aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca hümmoral immün sistemin hüccresel immün sistem yanıtın artmasında, CD4 ve CD8 T lenfositlerin proliferasyonları ve IFN- $\gamma$  sekresyonlarının artışının sağlanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (56).

Mikobakterial antijenlere karşı oluşmuş olan antikorlar, daha çok diyagnostik amaçla kullanılmak üzere saptanmaya çalışılmaktadır. Ancak hangi antikorun konak savunmasında önemli rolü olduğu net olarak bilinmemektedir (16,17).

#### 2.4.2.2 Hüccresel İmmünite

Hüccresel immünitede makrofajlar, dendritik hücreler, sitokinler ve T lenfositler yer alır. (16). MTB'e ait antijenlerin dendritik hücreler ve/veya makrofajlarca MHC I/II molekülleri aracılığıyla CD8/CD4 T lenfositlere sunumuyla başlar (17).

CD4 T lenfositlerin primer koruyucu fonksiyonu, başta IFN- $\gamma$  olmak üzere diğer sitokinleri salgılaması ve makrofajları aktive etmesinden oluşur. Ayrıca CD4 T lenfositler, CD95 Fas ligandı yoluyla enfekte hücrelerin apoptozunu da sağlamaktadırlar (17). Aktive makrofajlardan salınan interlökinler ve IFN- $\gamma$ , CD4 TH lenfositlerin proliferasyonunu ve CD4 TH1 ve CD4 TH2 şeklinde farklılaşmasını sağlar. IL-12 ve IL-27 daha çok TH1 yönünde farklılaşmasını stimüle ederken IL-4 ve IL-10 da TH2 lenfosit farklılaşmasını sağlamaktadır. TH1 lenfositler; IL-2 ve IFN- $\gamma$  yapımını sağlarken TH2 lenfositler ise IL-4, IL-5, IL-9, IL10 ve IL-13 yapımına neden olmaktadır (36). TH lenfositlerin farklılaşması şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. TH lenfositlerinin farklılaşması

Tüberküloza karşı yanıtta TH1 lenfositler daha baskın olmakla birlikte TH1/TH2 dengesi immünitede büyük öneme sahiptir. TH1 yönündeki farklılaşma koruyucu

immünite oluştururken, TH2 yönündeki fazla farklılaşma yetersiz immün cevaba yol açmaktadır (17). CD4 TH lenfosit ve/veya MHC II negatif fareler üzerinde yapılan çalışmalarda tüberküloz basili ile karşılaşma sonrası enfeksiyonun erken evresinde IFN- $\gamma$  seviyelerinin çok düşük olduğu ve makrofajlar tarafından NO sentaz ekspresyonunun çok geciktiği gösterilmiştir (57). Ayrıca CD4 TH lenfosit yetersiz olanlarda enfeksiyon daha hızlı reaktif olmaktadır.

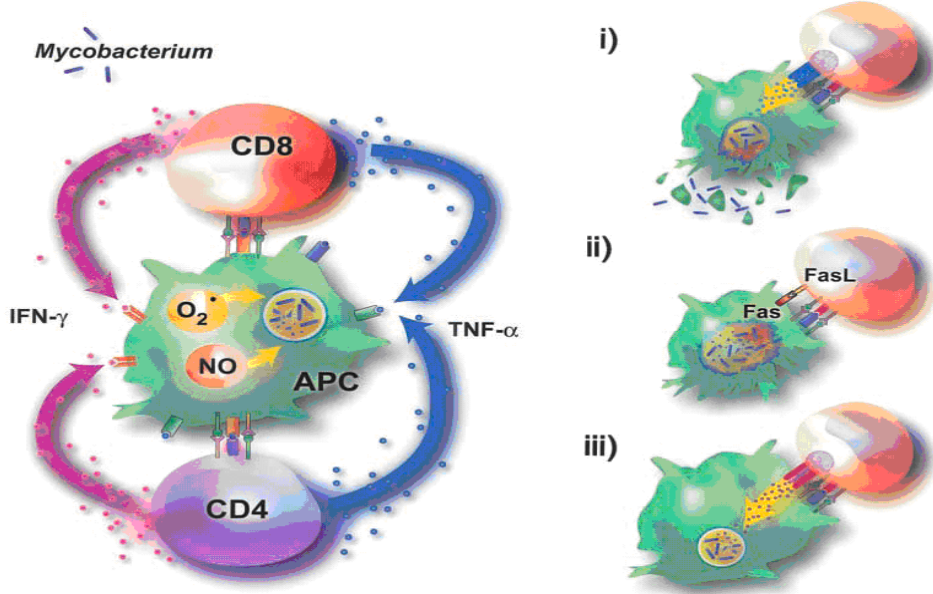
CD4 TH lenfositler içerisinde CD24, CD25 molekülünü yüksek düzeyde sentezleyen ve forkhead box protein 3 (foxp3) gen ekspresyonuna sahip regülatör T (Treg) lenfositler bulunmaktadır. IL-10 ve transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) varlığı ile farklılaşması sağlanan Treg lenfositleri, hem CD4 hem de CD8 TH lenfositleri baskılamakta, IFN- $\gamma$  sentezini ve T hücre proliferasyonunu durdurmaktadır (58,59). İmmün yanıtı bağılı doku hasarını engelleyerek faydalı etkisi olurken enfektif durumlarda immün yanıtı baskılayarak etkenin yaygınlaşmasına ve tekrarlamasına da yol açabilmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada Treg hücreleri deplese edildikten sonra farelere inhalasyon yoluyla MTB verilmiş ve sonrasında akciğer dokusundaki basil miktarına bakılmıştır. Treg'lerin deplese edilmediği farelerde basil sayısı daha az olarak bulunmuştur. Bu nedenle, enfekte dokudaki lokal hasarı azaltmakla birlikte, enfeksiyon kontrolünde negatif yönde etkisi mevcuttur (60).

CD8 TH lenfositleri, fagolizozom dışında makrofaj sitoplazmasındaki tüberküloz basiline ait antijenleri MHC I aracılığı ile sunulmasıyla tanınır. CD4 TH hücrelerine ek olarak CD8 TH hücrelerinin de MTB enfeksiyonunun kontrolünde gerekli olduğu bilinmektedir, MHC I moleküllerinin fonksiyon dışı kaldığı ve CD8 TH hücrelerine antijenin sunulmadığı farelerde; tüberküloz enfeksiyonunun özellikle akciğer tüberkülozunun kontrol edilemediği bildirilmiştir (52).

Tüberküloz enfeksiyonu sırasında gelişen granülomalarda CD8 TH hücre sayısının, CD4 TH hücre sayısına yakın olduğu görülmüştür. CD8-/- farelerde normal granülom oluştuğu, enfeksiyonun kontrol edilebildiği ancak bakteri yükünün daha fazla olduğu gösterilmiştir (61). Granülom oluşumunda erken dönemde CD4 TH hücre sayısı artarken, CD8 TH hücreleri daha geç dönemde artmaktadır.

CD8 TH hücreleri enfeksiyonu, sitokin salınımı, granül bağımlı sitotoksiste, Fas-FasL aracılı sitotoksiste ve direk mikrobisidal aktivite gibi yollarla kontrol altına almada etkilidir. IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin kaynağı olmakla birlikte dokulardaki enfekte makrofajları da öldürerek apoptozisde görev almaktadırlar (17,53).

CD8 TH lenfositleri tüberkülozun kontrolünde; sitokin salgılamak, granül ekzositozu yoluyla toksisite, Fas-Fas-L yoluyla sitotoksisite ve direk mikrobisidal aktivite olmak üzere toplam 4 mekanizma ile rol almaktadır (53).



**Şekil 4.** CD8 T lenfositlerin tüberkülozun kontrolündeki mekanizmaları

### Sitokinler

Tip 2 interferon olarak da bilinen IFN-γ, MTB enfeksiyonunun kontrolünde anahtar sitokin rolünü oynamaktadır. 12. kromozomda lokalize tek genle kodlanır ve immün reaksiyonlar sırasında antijen veya mitojenler tarafından uyarılan T lenfositlerince üretilmektedir. CD4 TH lenfositleri özellikle de TH1 lenfositleri , nadiren de CD8 TH lenfositleri ve NK hücreleri tarafından salgılanan bir sitokindir (17). IFN-γ yapımı, IL-2 aracılığı ile T lenfositlerinin birbirleriyle olan aktivasyonları ve IL-12'nin T lenfositleri ve NK hücrelerini uyarmasıyla düzenlenir (36). IFN-γ yapımından ön planda TH1 lenfositlerinin sorumlu olduğu çalışmalarda da gösterilmiştir (62). Ortamda IL-2 varlığında NK hücreleri de IFN-γ salgılayabilmektedir.

IFN-γ, major makrofaj uyarıcısıdır, makrofajların bakterisidal ve tümorosidal kapasitelerini artırır (45,48,49,63). IFN-γ, makrofaj üzerindeki sınıf II MHC-antijen kompleksinin oluşumunu ve devamlılığını sağlamakta, böylece de antijen, CD4 TH lenfositlere sunulmakta ve T lenfosit fonksiyonları aktive olmaktadır (45). Enfeksiyonun sınırlandırılmasında etkilidir.

IFN-γ, makrofajlardaki 1-alfa hidroksilaz enzimini uyararak aktif D3 vitaminin yapımını arttırmaktadır. D3 vitamini basillerin makrofaj içi çoğalmasını önlemede



yardımcıdır ve bu hücrelerden TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin salınımını artırır (47). Aynı zamanda IFN- $\gamma$ , vasküler endotel hücrelerinin bir aktivatorüdür, TNF- $\alpha$  üretimini ve endotel hücreleri üzerindeki birçok etkisini de güçlendirir. Oksijen radikalleri oluşumunu ve NO sentaz aktivitesini artırarak da nitrojen ara ürünlerinin oluşumunu artırır. IL-1 salınımını artırır. Ayrıca lenfositlerin adhezyonunu ve damar dışına çıkmalarını kolaylaştırır (16).

TNF- $\alpha$ , tüberküloz hastalığında hem immünolojik hem de patolojik süreçte önemli etkilere sahiptir. Basil ile karşılaşma sonrası makrofajlardan, dendritik hücrelerden ve T lenfositlerden salınır. Özellikle de basil duvarında bulunan LAM, TNF- $\alpha$  salınımı için uyarıcıdır. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ile birlikte NO sentazı artırır (17). TNF- $\alpha$  enfekte dokuya adezyon moleküllerinin, kemokinlerin ve reseptörlerinin ekspresyonunu artırarak granülom formasyonunun gelişmesini ve enfeksiyonun sarılarak yayılımının önlenmesinde etkilidir (64,65).

TNF- $\alpha$ , aynı zamanda tüberkülozda görülen ateş, kilo kaybı ve tüberküloza özgü doku nekrozları gibi birçok immünopatolojik olaydan sorumludur.

IL-1, TNF- $\alpha$  ile birlikte ateş kaşeksi gibi akut dönem semptomlarından sorumludur. Makrofajlardan salınır, T lenfositlerini uyararak enfeksiyon bölgesine gelmelerine, IL-2 reseptör ekspresyonlarında ve IL-2 salgılarında artışa yol açar (17).

IL-2, primer olarak CD4 TH lenfositlerden salınmakta, IL-2 aracılığıyla T lenfositleri birbirini uyarılmaktadır. T lenfositlerinin, makrofajların ve NK hücrelerinin IFN- $\gamma$  yapımını ve sitolitik aktivitelerini artırır (66). Tüberküloza karşı immün yanıtta özellikle de IFN- $\gamma$  aracılığıyla stimulan role sahiptir.

IL-4 varlığında TH2 lenfosit yönünde farklılaşma gerçekleşmekte aynı zamanda TH2 lenfositler de IL-4 salınımına yol açmaktadır, otokrin TH2 büyüme faktörüdür. IL-4 makrofajların aktivasyonlarını baskılamakta, IL-2 reseptör down regülasyonu ve T lenfosit proliferasyonunda azalmaya yol açarak hücrel immüniteyi baskılamaktadır. Aynı zamanda B lenfositlerin farklılaşmasını ve IgE dönüşümünü de stimüle etmektedir (66). Tüberküloz lenfadenitli hastalarda oluşmuş granülom yapısı incelenmiş ve bol IFN- $\gamma$  saptanırken, IL-4 seviyesi çok düşük olarak saptanmıştır (67). Bu da tüberküloza karşı immün yanıtta TH2 lenfositlerin primer rolü olmadığını göstermektedir. IL-4'ün tüberküloz immünitesindeki yeri net değildir.

IL-6, hematopoezis, inflamasyon ve T lenfosit differansiasyonu gibi bir çok alanda görevlidir. Doğal immün yanıtta önemlidir. TH17 differansiasyonunda da etkilidir (16,17,44).

IL-10, aktive makrofajlardan ve TH2 lenfositlerden kaynaklanan antiinflamatuvar bir sitokindir. Sitokin sentezini, makrofajların mikrobisidal aktivitesini ve MHC II ekspresyonlarını azaltarak antijen-spesifik T-hücre proliferasyonunu baskılar. Antijen prezente eden hücrelerin IL-12 salınımlarını da azaltarak, IFN- $\gamma$  sekresyonunun azalmasına yol açar (17). IL-10, MTB ile özellikle de hücre duvarındaki LAM ile konağın karşılaşması sonrası salınımlarında artış olur. IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'nın mikrobisidal etkilerini antagonize ederek basilin çoğalmasını kolaylaştırır.

TGF- $\beta$ , NK hücreleri ve makrofajların aktivasyonlarını inhibe ederek IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  yapımlarını ve oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin üretimini azaltarak hücrel immüniteyi baskılar. T lenfositlerinin proliferasyonlarını ve IFN- $\gamma$  üretimlerini de azaltır (68,69). Granülom oluşumu içinde bulunmakta, enfeksiyon sırasında kollajen matriks üretiminde, doku hasarında ve fibrozis oluşumunda da yer almaktadır (70). Tüberküloza karşı immün yanıtta IL-10 ile birlikte sinerji oluşturarak inhibitör etkiyle kontrol edilemeyen inflamatuvar yanıtta aşırı inflamasyon ve doku nekrozunu önleyebilmektedir. Antijenle uyarılmış T lenfositlerden, makrofajlardan ve Treg lenfositlerden salınabilmektedir (17). TGF- $\beta$ 'nın anti TGF- $\beta$  antikoru ile nötralize edilmesiyle monositler içindeki basillerin üreme hızı azalmaktadır (71). TGF- $\beta$ 'nın immün yanıtı baskılayarak basilin öldürülmesini inhibe etmesinin yanında konak savunmasının aşırı yanıtını azaltarak da doku hasarını önlediği bilinmektedir.

IL-12, makrofaj ve dendritik hücreler tarafından üretilir. NK, CD4 TH ve CD8 TH lenfositlerinin sitotoksik aktivitesini ve IFN- $\gamma$  üretimini artırır, TH1 lenfosit proliferasyonunu uyarıcı etkide bulunur. İntrasellüler mikroorganizmalara karşı erken immün yanıtta ana mediatördür. IFN- $\gamma$  ile birlikte MTB ile karşılaşma sonrası ilk savunma yanıtında, granülasyon dokusu oluşturularak basilin sınırlandırılmasında ve basilin yayılımının engellenmesinde büyük role sahiptir (50,66). Bir çalışmada IL-12 salınımlarının sekteye uğratılması sonrası MTB ile enfekte edilen farelerde tüberküloz hastalığı gelişiminin daha hızlı olduğu ve farelerin yaşam süresinin kısaldığı, IL-12 verilme sonrası da direnç kazanarak yaşam sürelerinin iki katına çıktığı gösterilmiştir (72). IFN- $\gamma$  ile birlikte IL-12 salınımlarının bozulması konağın basile immün yanıtının bozulmasına ve tüberküloz hastalığı gelişim riskinin artmasına yol açmaktadır (72-76).

TH17 lenfositlerden salınan IL-17, proinflamatuvar ve hematopoietik sitokinlerin salınımlarını uyarır, akut inflamatuvar süreçle ilişkili kemokinleri, nötrofilleri indükleyerek doğal ve kazanılmış immün yanıtta etki gösterir. Özellikle de nötrofillerin ortamda birikmeleri ve matriks degradasyonunda etkilidirler (19,20). IL-23, TGF- $\beta$ , IL-6 ve IL-1,

TH17 diferansiasyonunu arttırır. IL-23 yokluğunda TH17 diferansiasyonunun olamadığı ve IL-17'nin salgılanamadığı gösterilmiştir (18,20). IL-17 enfeksiyöz ajanlara karşı immün yanıtlarda ve otoimmün reaksiyonlarda rol oynamaktadır (77). TH1 hücreleri, TH2 ve TH17 gelişimini, TH2 hücreleri de TH1 gelişimini inhibe etmektedir. Diferansiasyon yolundaki herhangi bir engel, dengeyi diğer yöne çevirebilmektedir (78). IL-23, TH lenfositlerinin TH17 yönünde farklılaşmasını stimüle ederken IL-4 ve INF- $\gamma$  da TH17'yi baskılamaktadır. INF- $\gamma$  ve IL-4'ün yokluğunda TH17 artmakta ve otoimmün reaksiyonlar ekzajere olmaktadır (79). TH17 hücreleri TH1 ve TH2 gibi stabil hücreler değildir, IL-12 varlığında TH1 gibi de davranabilirler (80).

#### **2.4.2.3 Geç Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu**

Hücrel immünite, basilin vücuda girişinden itibaren makrofajlar tarafından tutulması, öldürülmesi ve veya üremesinin inhibisyonunda etkilidir. Geç tip aşırı duyarlılık (hipersensitivite) reaksiyonu ise tüberküloz basilinin yapısında bulunan 10kDa'luk küçük proteinlerin karışımı olan tüberkülin proteinleri, LAM ve kord faktör gibi antijenlere karşı tip IV immün yanıt olarak adlandırılmaktadır (27,44).

TDT, MTB'ne karşı spesifik immünitinin göstergesi olan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Enfeksiyon başlangıcından yaklaşık 2-6 hafta sonra pozitifleşmektedir. Konakta doku hasarı yapan bir yanıttır, kazeöz nekroz ve kavite oluşumuna yol açmaktadır (82). Hücrel immünite ile birlikte basilin üremesini ve yayılmasını engellemektedir. Basil içeren makrofajları ve çevre dokuları harab ederek basilin üremesi için gereken ortamı bozmakta ve basilin ortadan kaldırılması için hücrel immün sisteme zaman kazandırmaktadır (49). Hücrel immün sistemin yok edemediği basil sayısı ve aktive olamayan makrofaj sayısı arttıkça buna engel olmak için gecikmiş tip hipersensitivite ve oluşturduğu nekrotik doku artacak, beraberinde de hücre harabiyeti genişleyecektir. Basilin yok edilemediği enfeksiyon bölgesinde granümatöz reaksiyon gelişecektir. Granülom epitelioid makrofajlar, onları çevreleyen lenfositler, fibroblastlar ve bağ dokudan oluşmuştur (61,63).

Makrofajların basili CD4 TH lenfositlere sunması ve IL-2 salınımı gecikmiş tip hipersensitivitenin başlamasını sağlamaktadır. Antijene spesifik olarak aktive olan CD4 TH1 lenfositlerinin antijenle tekrar karşılaşmaları sonrası IL-12 ve INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  salınımı ve NK hücrelerinin uyarımı gerçekleşmektedir. INF- $\gamma$ , geç tip hipersensitivitenin en potent mediatörüdür (63,81).

Gecikmiş tip hipersensitivite, enfeksiyonun sınırlandırılmasından sorumlu olmakla birlikte doku nekrozu ve kavitasyon oluşumuna neden olduğu için akciğerlerdeki doku hasarından da sorumludur.

### **2.5.3 İmmünopatogenezin Klinik Olarak İncelenmesi**

Akciğer tüberkülozunda immünopatogenez klinik olarak beş grup altında da incelenebilir (44).

#### **1.Evre: Başlangıç Evresi**

MTB'in alveole alınması ve makrofajların toplanarak basili fagosite etmesiyle başlayan ve yaklaşık 1 hafta süren dönemdir. Fagositoz sonrası basilin virülans özelliklerine ve alveoler makrofajların mikrobisidal gücüne bağlı olarak basiller ya öldürülür ya da yetersiz immün cevap ile makrofaj içinde çoğalarak enfeksiyonu başlatır (17,49).

#### **2. Evre: Çoğalma Evresi**

Makrofajlar tarafından fagosite edilip yok edilemeyen basiller hücre içinde hızla çoğalarak makrofajları parçalar ve hücre dışına çıkarlar. Henüz aktive olmamış yeni makrofajlar tarafından tekrar fagosite edilen basiller çoğalmaya devam ederler ve lenfohematojen yolla yayılabilirler. Makrofajların fagositoz sonrası salgıladıkları kemotaktik faktörler monositleri, dendritik hücreli ortama davet etmekte ve epitelooid makrofajlar, lenfositler, fibroblastlardan oluşan granülom oluşuma yol açmaktadır. Bu dönem enfeksiyon sonrası 2-3. haftalara denk gelmektedir (49,63).

#### **3.Evre : Enfeksiyonun Kontrolü**

Granülom merkezinde kazeöz nekrozun oluşumu ile yumuşak tüberkül oluşur ve primer odak olarak isimlendirilir. Oluşan kazeöz nekroz ortamındaki basiller anoksik koşullar sebebiyle çoğalamazlar, yıllarca sessiz olarak kalabilirler. Primer odaktan bölgesel lenf bezlerine ulaşabilen basiller, lenfadenite neden olarak lenf bezinde granümatöz doku gelişmesine yol açarlar. Primer odak ve bölgesel lenfadenit birlikteliği de “Primer Kompleks” veya “Gohn Kompleksi” olarak tanımlanmaktadır. Üçüncü haftaya denk gelen bu dönemde TDT pozitifleşir (44,49,63).

Bölgesel lenf bezinde çoğalan basiller lenfatik dolaşıma oradan da lenfo-hematojen yolla tüm vücuda dağılabilmektedir. Hücre aracılı immünitinin tam gelişmesi ile enfeksiyon kontrol altına alınır ve böylece gohn kompleksi zamanla fibrozise giderek kalsifiye olur. Diğer organlara bulaşma olsa da hastalık gelişmez (2,63). Nekrozdan sorumlu olan aktive makrofajlar ve sensitize T hücreleri ve salgıladıkları sitokinlerdir. Bu da organizmaya karşı direnç ve immünite kazanıldığını gösterir (48).

#### **4.Evre : Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık ve Kavite Oluşum Evresi**

Granülomlarda kazeöz odaklardan kaçan basilleri yakalayıp fagosite eden yeni makrofajların içindeki basiller yaşamaya ve çoğalmaya devam ettiği sürece gecikmiş tip hipersensitivite devam etmekte ve böylece doku harabiyeti de artmaktadır (41,49). Eğer basiller hücrel immün sistem ile öldürülürse enfeksiyonun ilerlemesi, doku hasarı ve kazeöz nekrozların genişlemesi durdurulabilmektedir.

Vücuda yayılan basillerin oluşturduğu küçük kazeöz odaklar makrofajlar tarafından temizlenmekte, büyük odaklar ise fibröz kapsülle çevrilerek tüberküloz denilen yapı oluşturulmaktadır. (44).

Primer enfeksiyonun yok edilemeyip latent halde kalması ve yıllar içinde endojen reaktivasyon veya eksojen reenfeksiyon ile sekonder tüberküloz oluşabilmektedir. Sekonder tüberkülozda makrofajların salgıladığı hidrolitik enzimler ile granülom ortasındaki protein ve lipidlerin hidrolize olmasıyla nekrotik dokunun erimesi sonucu kavite oluşumu mevcuttur. Hücre içi basil olan MTB, bu likefiye materyal içinde hücre dışı olarak da yaşamını sürdürmekte, çoğalabilmekte ve vücudun diğer bölgelerine taşınabilmektedir (44,61).

### **2.5 Çocuklarda Tüberküloz Enfeksiyonu Kliniği**

Büyük oranda MTB olmak üzere MTK bakterileri ile oluşan tüberküloz hastalığı, her yaş grubu için en sık olarak akciğer (AC) parankimi başta olmak üzere toraks içi (%90) lokalizasyon gösterir. AC dışı tüberküloz vakaları, çocukluk yaş grubunda %25-30 civarında görülürken erişkinlerde bu oran %15 kadardır (1). Kaviteleşen AC tüberkülozu genç erişkinler ve bazen de adölesanlarda görülür.

Tüberküloz enfeksiyonunda çocuklarda belirti ve bulgu gelişmesi seyrek, nadiren yüksek ateş, öksürük, halsizlik, kilo kaybı gibi bulgular gelişir. TDT pozitifleşmeden milier tüberküloz veya tüberküloz menenjit geliştirme riski özellikle 5 yaş altı çocuklarda daha fazladır. Çocuklarda tüberküloz asemptomatik primer enfeksiyondan ilerleyici primer tüberküloza kadar değişik formlarda karşımıza çıkabilir (1,2). Yaşlara göre primer enfeksiyon sonrası hastalığın seyri tablo 4'te gösterilmektedir (44,78)

**Tablo 4.** Yaşlara göre primer enfeksiyon sonrası hastalığın seyri

<b>Primer Enfeksiyon Yaşı</b>	<b>Hastalık Gelişme</b>	<b>Pulmoner Hastalık Gelişme Riski</b>	<b>Dissemine Hastalık Gelişme Riski</b>
< 1 yaş	% 50	% 30-40	% 10-20
1-2 yaş	% 70-80	% 10-20	% 2-5
2-5 yaş	% 95	% 5	% 0.5
5-10 yaş	% 98	% 2	< % 0.5
> 10 yaş	% 80-90	% 10-20	% < 0.5

Tüberküloz basilinin akciğerlere inhalasyonu ile oluşan enfeksiyon dört başlık altında incelenebilir;

1. Primer enfeksiyon
2. Latent tüberküloz enfeksiyonu (LTBI)
3. Hızlı ilerleyici hastalık (Primer progresif tüberküloz)
4. Enfeksiyondan sonraki yıllar içinde aktif hastalık gelişimi (Reaktivasyon hastalığı)

#### **2.5.1 Primer Pulmoner Tüberküloz**

Primer pulmoner kompleks, parankimal odak ve bölgesel lenf bezlerini içerir. AC'deki odakların yaklaşık %70'i subplevral yerleşimlidir, bu sebeple enfeksiyona lokal plörezi de genellikle eşlik eder. Hastaların yaklaşık %25'inde AC'de iki veya daha fazla primer odak vardır. Başlangıç AC odağına göre ona eşlik eden lenfadenit daha büyüktür. Bazı çocuklarda gecikmiş tip aşırı duyarlılık arttıkça hiler lenf bezleri büyümeye devam eder ve bölgesel bronşa bası yaparak önce hiperaerasyon ardından da atelektazilere yol açabilir. Radyolojik olarak görüntü, kollaps-konsolidasyon veya segmental tüberküloz olarak isimlendirilir. Uygun tedaviyle lezyonlar genellikle iyileşir, bazen de iyileşme kalsifikasyonla sonlanır. Primer odak veya nodüller ancak 6-12 ay içinde kalsifiye olurlar (Ghon Kompleksi). Nadiren kazeöz nodüller endobronşial duvara tutunur ve duvarı aşındırarak endobronşial tüberküloz oluşmasına, bronşlarda tam veya kısmi obstrüksiyon gelişmesine yol açabilirler (1,41).

Tüberküloz çocuklarda nadiren adenopati olmaksızın lobar pnömoni olarak seyredebilir. Bu durumda primer enfeksiyon odağında lezyon ilerleyerek kazeifiye olur ve ince duvarlı kavite oluşturur. Parankimal tüberküloz odağından basilin kan veya lenf yoluyla yayılması milier tüberküloza yol açar (1,78).

Çocuklarda primer pulmoner tüberkülozda, bu kadar immünopatolojik olaylar gerçekleşiyor iken belirgin klinik semptom yoktur. Daha çok 5 yaş altı çocuklarda görülen hafif öksürük ve dispne en sık karşılaşılan semptomlardır. Ateş yüksekliği, kilo kaybı ve/veya alamama, gece terlemesi çok nadirdir. Bronşta tıkanıklığa yol açan lezyon varsa hırıltı veya wheezing olabilir (2,41,78).

Primer enfeksiyon döneminde TDT'nin pozitifleşmesi önemlidir, çünkü bu dönemde herhangi bir klinik bulgu olmaksızın sadece TDT pozitifliği mevcuttur (2).

Gelişmekte olan ülkelerde MTB ile karşılaşma küçük yaşlarda olduğundan (2) Türkiye'de de primer tüberküloz daha çok çocukluk çağında izlenmektedir.

#### **2.5.1.2 Latent Enfeksiyon (LTBI)**

Fizik muayene ve radyolojinin normal olduğu MTB ile enfekte olma durumu latent enfeksiyon olarak adlandırılır. TDT'nin pozitifleşmesi 2-3 ay alacağından bu dönemde TDT negatif de olabilir. Bu dönem primer enfeksiyon sonrası hastalık durumu değildir, bulaştırıcılık da yoktur. Basil ile karşılaşma sonrası konağın immün sistemi devreye girmekte fakat bazen cevap kalıcı olamamakta ve enfeksiyon hayatın herhangi bir döneminde hastalığa dönüşebilmektedir (82). Beş yaşından küçük çocuklarda bu oran daha yüksektir. Bu sebeple çocuklarda TDT'nin pozitif saptanması durumunda ve TDT negatif olsa da aktif tüberküloz vakası ile temas sonrası mutlaka profilaktik tedavi başlanmalıdır (1,41).

#### **2.5.1.3 İlerleyici Primer Akciğer Tüberkülozu**

Çocuklarda tüberkülozun nadir görülen fakat ağır bir formudur. Akciğerdeki primer odak büyümeye devam eder ve merkezinde büyük kazeöz nekroz oluşur, içinde çok sayıda tüberküloz basili mevcuttur.

Bu form çok küçük çocuklarda olma eğilimindedir, bulaştırıcılık da mevcuttur (2). Genellikle yüksek ateş, öksürük, geceleri terleme, AC oskültasyonunda krepitan raller, solunum sıkıntısı gibi klasik pnömoni bulguları görülür. Basil primer odaktan diğer AC alanlarına, perikardiuma veya mediastinumaya yayılabilir (1,41).

Primer pulmoner tüberkülozda ilerleyici AC tüberkülozu gelişmesini önlemek için antitüberküloz tedavinin erken başlatılması önerilmektedir (1).

#### **2.5.1.4 Reaktivasyon Tüberkülozu**

Önceden primer enfeksiyon geçirmiş bir kişide sessiz olarak bekleyen tüberküloz basilinin reaktivasyonu ile oluşan klinik tablodur. Reaktivasyon tüberkülozunda bilinen en önemli risk faktörü konak bağışıklık sisteminin baskılanmış olmasıdır. (41).

Reaktivasyon tüberkülozu daha çok erişkinlerde görülen formdur. Endojen veya eksojen reenfeksiyon şeklinde olabilir. Endojen reenfeksiyonda, primer enfeksiyon sırasında lenfohematojen yolla akciğerin apikal-subapikal bölgelerine yerleşmiş (Simon odağı) olan ve yıllarca burada canlılığını sürdüren basillerin hayatın herhangi bir döneminde hücrel immün yanıtta meydana gelen baskılanma nedeniyle aktif hale geçmesidir. Eksojen reenfeksiyonda ise daha önce primer enfeksiyon geçirmiş bir kişinin dışarıdan tekrar tüberküloz basillerini almasıyla oluşur (27,30).

AC'de en sık tutulan bölgeler, marjinal parankimal odak, lenf bezleri veya lenfohematojen yayılım ile akciğerin apikal zonlarıdır. Primer enfeksiyon döneminde gelişmiş olan bağışıklık yanıtı enfeksiyonun yayılmasını engellediğinden bu form genellikle AC'de sınırlı kalır (1,41).

Klinik bulgularda ateş, göğüs ağrısı, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, prodüktif öksürük, hemoptizi ve gece terlemesi mevcuttur. Kaviterin oluştuğu bu formda belirgin balgam ve öksürük varlığı ile bulaştırıcılık da fazladır (1).

## **2.6 Çocuklarda Tüberkülozda Tanı yöntemleri**

Pulmoner tüberküloz tanısında altın standart mikrobiyolojik ve/veya moleküler yöntemlerle basilin gösterilmesi ve kültürde üretilmesidir. Fakat çocuklarda balgam örneği vermede sorunlar, balgamda basil bulunma oranının düşüklüğü gibi sebeplerle basilin gösterilmesi neredeyse imkansızdır. Ayrıca kültür ortamında basilin üremesinin uzun zaman alması ve üretilme ihtimalinin düşük olması başka tanı yöntemlerinin arayışını gündeme getirmiştir (1,31).

Çocuklarda tüberküloz enfeksiyonunun klinik bulgu vermesi de enderdir. Standart tedavi yöntemleri ile düzelmeyen pnömoni, efüzyon, akciğerde kitlesel lezyon varlığında veya nedeni bilinmeyen ateş, büyüme geriliği, süregelen lenfadenopati durumlarında tüberküloza yönelik incelemeler yapılmalıdır. Bu durumlarda klinik ve radyolojik bulguların varlığı ve TDT'nin pozitif olması basil varlığı gösterilemese bile yüksek olasılıkla tüberküloz tanısı koydurmaktadır (2,42,83). Ayrıca tüberkülozlu erişkin ile temas öyküsünün olması çocukluk çağı tüberkülozu tanısı ile yakın ilişkilidir (2,84).

Çocukluk çağı tüberkülozunda tanıda net bir altın standart yoktur.

### **2.6.1 Tüberkülin Deri Testi (TDT)**

TDT, mikobakterilerin antijenik yapılarına karşı konağın vermiş olduğu gecikmiş hipersensitivite yanıtını göstermektedir. Mantoux yöntemi ile ön kolun volar yüzüne intradermal olarak 5 tüberkülin ünite purifiye edilmiş protein derivesi (PPD-S) içeren 0.1ml solüsyonun uygulanmasından 48-72 saat sonra oluşan endurasyon çapı ölçülerek



değerlendirilir. Endurasyon, daha önce basille duyarlanmış olan T lenfositlerinin testin yapıldığı bölgeye toplanması, lenfokinlerin salınımı, vazodilatasyon, ödem, fibrin birikimi ve enflamatuvar hücrelerin ortama gelmesi ile oluşur (1,2,85).

Old tüberkulin ve pürifiye protein derivesi olmak üzere iki tip tüberkulin vardır. DSÖ tarafından internasyonel standart tüberkulin olarak kabul edilen tüberkulin, PPD-S'tir. Tüberkulin solüsyonu büyük miktarda mikobakterilere ait 10.000 Da molekül ağırlığındaki proteinleri, az miktarda da polisakkarit ve lipidleri içermektedir. Bulunduğu kaba yapışmaması için stabilizatör olarak Tween 80 eklenmiştir. Enjektöre çekildiğinde fazla bekletilmeden uygulanmalıdır. Açıldıktan sonra 8 saat içinde kullanılmayan solüsyon atılmalıdır (86,87).

TDT, basil ile karşılaşmış olmayı göstermekte fakat hastalık varlığı hakkında net bilgi vermemektedir. TDT pozitifliği basilin inhalasyonundan ortalama 4-8 hafta sonra gelişmektedir. Çocuklardaki tanı değeri daha yüksektir. BCG aşısının uygulandığı ülkelerde ve özellikle erişkinlerde genellikle pozitif olmakta ve tüberküloz enfeksiyonunu yansıtmamaktadır (86). Ayrıca, HIV pozitifliği gibi immün süpresan durumlarda, malnutrisyonda, milier tüberkülozda ve infantlarda, canlı virüs aşılılarıyla aşılama sonrasında enfeksiyon olsa da TDT negatif olarak saptanabilmektedir (87). 5mm ve üzeri TDT'nin, BCG aşısının yapılmadığı gelişmiş ülkelerde spesifitesi %95'in üzerindedir (85). TDT için pozitif kabul edilme kriterleri bireyin enfeksiyon riski ile ilişkilidir. Çocuklar için en önemli risk faktörü pulmoner tüberkülozu olan veya tüberküloz için yüksek riske sahip erişkinle temas öyküsüdür (1,86). Ayrıca ülkelere göre de değişiklik göstermektedir. Ülkemizde 15mm ve üzeri TDT her yaş için ve her durumda pozitif kabul edilmektedir. 5-15mm arası duruma göre değerlendirilmelidir, 4mm ve altı endurasyonlar ise negatif olarak kabul edilmektedir (87). T.C. Sağlık Bakanlığı'nın TDT sonuçları için yorumu tablo 5'te gösterilmektedir (26).

**Tablo 5.** TDT'nin yorumlanması.

<b>BCG aşısı yapılmış kişilerde</b>	0-5 mm	Negatif
	6-14 mm	BCG aşısına bağlı
	15 mm ve üzeri	Pozitif
<b>BCG aşısı olmayan kişilerde</b>	0-5 mm	Negatif
	6-9 mm	Şüphelidir, test tekrarı yapılır; 6-9 mm; negatif (immün baskılanmada >5mm pozitif) 10 mm ve üzeri pozitif
	10 mm ve üzeri	Pozitif

TDT ile önceden oluşmuş immün yanıt uyarılabilmekte ve ikinci TDT’de daha yüksek yanıt alınabilmektedir. Booster olayı olarak adlandırılan bu durumun yeni enfeksiyonla karışmaması için test tekrarı yapılacaksa birinci testten 1 hafta sonraki en erken dönemde yapılmalıdır (26). İlk testte negatif olup ikinci testte pozitif sonuç elde edilmesi bireyin basille daha önceden teması olduğunu göstermektedir (88). TDT’nin yanlış negatif sonuç verebildiği durumlar tablo 6’da gösterilmektedir (87).

**Tablo 6.** TDT’nin yanlış negatif olduğu durumlar.

<b>Kişiyeye ait Faktörler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- İnfeksiyonlar <ul style="list-style-type: none"> <li>Viral (kızamık, kabakulak, su ciceği, HIV)</li> <li>Bakteriyel (tifo, tifus, brusella, boğmaca, yaygın TB, TB plörezi)</li> <li>Mantarlar (blastomikoz)</li> </ul> </li> <li>- Canlı virus aşılıları (kızamık, kabakulak, polio, su çiçeği)</li> <li>- Metabolik bozukluklar (kronik bobrek yetmezliği)</li> <li>- Beslenme bozuklukları (ağır PEM)</li> <li>- Lenfoid hastalıklar (Hodgkin hastalığı, lenfoma, kronik lösemi, sarkoidoz)</li> <li>- İlaçlar (kortikosteroidler ve diğer immünsüpresifler)</li> <li>- Yaş (6 aydan küçük çocuklar, yaşlı hastalar)</li> <li>-Stres (cerrahi, yanıklar, mental hastalıklar, transplantasyon reaksiyonları)</li> </ul>
<b>Tüberkülin solüsyonuna ait faktörler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uygunsuz depolama (ısı ve ışığa maruziyet)</li> <li>- Uygunsuz sulandırma, kimyasal denaturasyon</li> <li>- Kontaminasyon</li> <li>- Cam veya plastik kaba yapışma (Tween 80 eklemekle engellenir)</li> </ul>
<b>Uygulama tekniğine ait faktörler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Yetersiz antijen enjekte etmek</li> <li>- İntrakutan uygulayamamak (cilt altına kaçırma)</li> <li>- Enjektörde uzun süre bekletmek</li> </ul>
<b>Testin okunmasına ait faktörler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deneyimsiz okuyucu</li> <li>- Kayıt hataları</li> </ul>

Ülkemizde BCG aşısı uygulaması sebebiyle yanlış pozitifliklere sık rastlanabilmektedir. Ancak aşıdan 10 yıl sonra TDT'nin BCG'den etkilenme oranı giderek düşmektedir. Tüberkülin solüsyonu, MTB yanında çok sayıda mikobakterinin antijenini de içerdiğinden NTB enfeksiyonları da yanlış pozitif TDT'den sorumlu tutulmaktadır (86,89).

### **2.6.2 Görüntüleme Yöntemleri**

Tüberküloz düşünülen ve araştırılan çocuklarda mutlaka iki yönlü akciğer grafisi çekilmelidir. AC grafisi, fokal parankimal odak, hiler veya paratrakeal lenfadenopati varlığı açısından değerlendirilmelidir (26,87). Ayrıca bronşial obstrüksiyona ait segmental havalanma artışı ve atelektazi bulgusu, konsolidasyon, plevral efüzyon ve seyrek de olsa kitlesel görünüm de grafide görülebilir. Primer pulmoner tüberkülozda radyolojik olarak bazen sadece tek taraflı plevral efüzyon görülebilmektedir. Kalsifikasyon varlığı geçmiş enfeksiyona, bilateral ince retiküler gölgeler (kar fırtınası görünümü) miliyer tüberküloza işaret etmektedir (1,2,90). Akciğer tomografisi, endobronşiyal tüberkülozun gösterilmesinde, hiler lenfadenopatilerin değerlendirilmesinde, bronşiektazi varlığının gösterilmesinde, atelektazi ve kitlesel görünümün aydınlatılmasında kullanılmaktadır (2,90).

### **2.6.3 Mikrobiyolojik İncelemeler ve Kültür**

Mikrobiyolojik inceleme için ilk yapılması gereken uygun örnek alınmasıdır. Pulmoner tüberküloz için balgam, mide açlık sıvısı (MAS), bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı veya akciğer dokusundan inceleme yapılabilir (2). Küçük çocuklarda (özellikle 5 yaş ve altı) balgam örneği almak çok zordur, bu hastalarda gastrik aspirasyonla gastrik sıvı örneği alınabilmektedir. Çocuklarda en yüksek pozitiflik MAS'dan çalışılan örneklerden elde edilmektedir (2,85,91). Daha büyük çocuklarda hipertonic NaCl solüsyonları kullanılarak balgam çıkarma provoke edilebilmektedir (84,85). Bronkoskopi ile hava yollarının değerlendirilmesi ve endobronşiyal tüberküloz varlığının saptaması yapılabilmekte aynı zamanda BAL örneği alınarak mikrobiyolojik incelemeye de gönderilebilmektedir (42,85).

Mikobakteriler, karbol fuksin yöntemi (Ziehl-Neelsen, Kinyoun) ve florokrom boyama yöntemi (Auromin O, Auromin-Rhodamin) olmak üzere başlıca iki boyama tekniği ile boyanırlar. Işık mikroskobu ile yapılan değerlendirmelerde aside dirençli mikroorganizmalar, mavi zeminde pembe-kırmızı ince çubuklar biçiminde görülür. Florokrom boyama yöntemi kullanıldığında da basiller floresan mikroskobu ile sarımsı-turuncu renkte floresan verirler (27,29,33). Preparattaki tek basil bile tanı için anlamlıdır. Küçük çocuklarda, balgam örneklerinde EZN boyası ile yapılan değerlendirmelerde

tüberkülozun kanıtlanması %20'nin altında iken erişkinde bu oran %75'ler civarındadır (84).

Basilin boyama yöntemleri ile mikroskopta görülebilmesi için, balgamın her mililitresinde 5.000–10.000 basil bulunması gereklidir. Tüberküloz dışı aside dirençli mikroorganizmalar yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedirler (84,92).

Tüberküloz tanısında kültür için sık olarak kullanılan Löwenstein-Jensen besiyeri yanında Petragnani ve Middlebrook besiyerleri de kullanılmaktadır. Tüberküloz basili zorunlu aerobtur ve kültür ortamında üreme süresi yaklaşık olarak 1-21 gündür fakat 4-6 haftaya kadar bekletilmelidir. Uygun üreme ısıları 35-37 derecedir. Kültür yöntemleri geç sonuç veriyor olsa da tür düzeyinin belirlenmesi, ilaç duyarlılık testlerinin yapılabilmesi ve çoğaltılan izolatların daha sonraki araştırmalar için kullanılabilmesi için olanak sağlamaktadır (84,92). Selektif besiyerleri antibiyotik ve antifungal içererek kontaminasyonu süprese ederler. İnkübasyon süresi daha kısa radyometrik bir kültür yöntemi olan BACTEC 460, iki hafta içinde sonuç vermektedir (27,41,84,92).

#### **2.6.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Nükleik asit amplifikasyon yöntemidir (17,41). PCR yöntemi, çok az sayıda mikroorganizma varlığını bile saptayabilecek sensitivite ve oldukça yüksek spesifiteye sahiptir. Ancak yayma negatif hastalarda sensitivitesi düşmektedir, çocukların büyük çoğunluğunun yayma negatif olduğu düşünüldüğünde çocukluk çağı tüberkülozunda kullanımı sınırlıdır. Pulmoner tüberkülozlu yayma pozitif hastalarda sensitivite %95, spesifite %98 civarındadır. Yalancı negatiflik, çapraz reaksiyon ve kontaminasyon durumlarında da yalancı pozitiflik olabilir (2,85). Ayrıca aktif hastalık ile latent enfeksiyonu ayırabilmede yetersizdir (78).

#### **2.6.5 İmmünolojik Temele Dayalı Yeni Testler**

Çocuklarda tüberküloz tanısındaki zorluklar farklı tanı yöntemlerinin arayışını gündeme getirmiştir. En önemli tanı aracı olarak kullanılan TDT, M.bovis, BCG ve NTB'lerle çapraz reaksiyonlara yol açmakta, aynı zamanda da latent enfeksiyonlar hakkında fikir vermemektedir (1,85).

HIV enfekte çocuklarda veya herhangi bir sebeple immün sistemi baskılanmış çocuklarda tüberkülozun klinik semptomları çok daha azdır ve basil ile enfekte hastalarda ancak %50 ve daha altında TDT pozitifliği saptanabilmektedir. Primer enfeksiyon sonrası latent enfeksiyon gelişmesi ve reaktivasyon oranı daha yüksek ve süre daha kısadır. Böyle hastalarda INF- $\gamma$  salınım testlerinin yardımcı olabilme yeteneği daha fazladır (78).

INF- $\gamma$  salınım testlerinin çalışma esası, TSPOT-TB testte enzime-bağlı immunospot assay (ELISPOT) yöntemi ile INF- $\gamma$  salgılayan hücrelerin ölçümüne, diğer testlerde ise enzyme linked immunoassay analysis (ELISA) yöntemi kullanılarak T hücrelerinden salınan INF- $\gamma$ 'nın ölçümüne dayalıdır. Tüberküloz basili ile karşılaşmış ve T hücreleri duyarlanmış olan kişiler, tüberküloz antijenleri ile tekrar karşılaştıklarında T hücreleri uyarılır ve INF- $\gamma$  salgırlar (11). T hücrelerinin uyarılması için tüberkülin solüsyonu veya NTM (M. kansassii, M. szulgai ve M. marinum hariç)'lerde bulunmayan, sadece MTB'de yer alan RD1 gen bölgesinin ürettiği ESAT-6, CFP-10 ve p7.7 gibi proteinler kullanılabilir. INF- $\gamma$  salınımı ile ilgili şimdiye kadar dört test geliştirilmiştir (10,11).

1. QuantiFERON-TB test
2. Quantiferon-TB Gold (Cellestis, Valencia,CA)
3. Quantiferon-TB Gold (In-Tube metod)
4. T SPOT-TB test (Oxford Immunotec, Abingdon, UK)

Dört testte de tüberküloza karşı hücresele immün cevap değerlendirilmektedir fakat çalışma prensipleri arasında farklılıklar vardır. İlk olarak 2001 yılında Amerika gıda ve ilaç yönetimi (FDA) tarafından onaylanan QuantiFERON-TB (QTF) testinde tüberkülin solüsyonu ile uyarım sonucu salınan INF- $\gamma$  düzeyi ELISA yöntemi ile ölçülmektedir. İnkübasyon süresi 24-48 saattir. TDT'ne üstünlüğünün gösterildiği çalışmalar bulunmakla birlikte (93) uyarımda tüberkülin solüsyonu kullanılıyor olması sebebiyle bu testin TDT'ne üstünlüğü net kanıtlanamamıştır (13,94,95). MTB basilinın hücre duvar yapısının moleküler olarak aydınlatılmasıyla daha spesifik testlerin üretilme çalışmalarına başlanmış ve 2005 yılında QuantiFERON-TB Gold (QTF-G) testi FDA onayını almıştır. QTF-G testinde MTB'in hücre duvarında bulunan ESAT-6 ve CFP-10 proteinleri kullanılarak uyarım yapılmakta ve salınan INF- $\gamma$  yine ELISA yöntemi ile ölçülmektedir. ESAT-6 ve CFP-10 NTB duvarında ve BCG aşısının içeriğinde bulunmadığından spesifitesinin QTF'a ve TDT'ne testine göre daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (6,94). Ancak hastalardan kan alındıktan sonra kısa süre içinde taze kan ile çalışılması gerekliliği ve canlı lökositlere ihtiyaç duyulması bu testin kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Bu sebeple QuantiFERON-TB Gold In Tube (QTF-GIT) testi geliştirilmiş ve test 2007 yılında FDA onayı almıştır. Uyarım için ESAT-6, CFP-10 ve TB7.7 kullanılmakta, INF- $\gamma$  ELISA yöntemi ile ölçülmektedir. Son olarak da 2008 yılında FDA onayı alan test T-SPOT-TB testidir. Bu testte uyarım için ESAT-6 ve CFP-10 kullanılmakta, mononükleer hücre kültürü yapılarak INF- $\gamma$  salınımı yapan hücreler ELISPOT yöntemi ile ölçülmektedir. INF- $\gamma$  salınım testleri ve özellikleri tablo 7'de gösterilmektedir (10,13,14,94). T SPOT-TB

yönteminin 4 yaş altı çocuklarda mitojen tüpteki IFN- $\gamma$  salınımının yetersiz olması sebebiyle bu yaş grubunda daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (96,97).

**Tablo 7.** IFN- $\gamma$  salınım testleri ve özellikleri

<b>Kullanılan test</b>	<b>QuantiFERON-TB</b>	<b>QuantiFERON-TB Gold</b>	<b>QuantiFERON-TB Gold (In Tube Metod)</b>	<b>T SPOT-TB</b>
<b>T-Hücre Kaynağı</b>	Tam kan	Tam kan	Tam kan	Periferik kan mononükleer hücreleri
<b>İnkübasyon Periyodu (saat)</b>	24-48	16-24	16-24	16-24
<b>Stimulan Antijenler</b>	PPD	ESAT-6, CFP10	ESAT-6, CFP10, Antigen 7.7	ESAT-6, CFP10
<b>Çalışma Yöntemi</b>	ELISA	ELISA	ELISA	ELISPOT

TDT'nin, sonuç değerlendirilmesinde kişiye bağlı ölçüm farklılıkları, ikinci kez gelme zorunluluğu, BCG aşısı ve NTB enfeksiyonları nedeniyle çapraz reaksiyonlar, latent enfeksiyonunun saptanamaması gibi yetersiz tarafları mevcuttur (85,86). IFN- $\gamma$  salınım testleri, aktif tüberkülozun tanısında, tüberküloz enfeksiyonu ile daha önceden yapılmış olan BCG aşısına bağlı reaksiyonun ayrılabilmesinde, latent enfeksiyona gidişatın ve latent enfeksiyonu olanlarda aktivasyona gidişatın değerlendirilmesi ve de tedaviye yanıtın izlenmesinde kullanılabilir (10). Erişkinlerde sensitivitesi %80-100 arasında değişmektedir (85). TDT ve IFN- $\gamma$  salınım testlerinin karşılaştırmalı olarak özellikleri tablo 8'de gösterilmektedir (14).

**Tablo 8.** TDT ve IFN- $\gamma$  salınım testlerinin karşılaştırılması

<b>Performans ve işlevsel özellikler</b>	<b>TDT</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> araştırmasına dayalı testler</b>
Duyarlılık	%75-90	%80-95
Özgüllük	%70-95	%95-100
BCG ile çapraz reaksiyon	Var	Daha az
NTM'ler ile çapraz reaksiyon	Var	Daha az
Test pozitifliği ile izlem sürecinde aktif tüberküloz gelişim riski ilişkisi	Orta-güçlü	Yetersiz veri
Tüberküloz ile temas ilişkisi	Var	Var
Güvenilirlik	Var	Kanıt yok
Booster etkisi	Var	Yok
Yan etki	Nadir	Nadir
Hasta viziti	İki	Bir
Maliyet	Düşük	Yüksek
Laboratuvar alt yapısı	Gerekmez	Gerekli
Testin sonuçlanma hızı	2-3 gün	1-2 gün
Personel ihtiyacı	Var	Var

LTBI düşünülen her hastaya TDT uygulanabildiği gibi QFT-G testinin de uygulanabileceği ve tanıda yol gösterici olduğu Amerika Hastalık Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control=CDC) tarafından onaylanmıştır (94). Erişkinlerde LTBI tanısında şimdiye kadar yapılmış birçok çalışma, bu testlerin TDT'ne karşı birçok konuda üstünlükleri olduğunu göstermiştir (10,85,94). New York'ta bazı merkezler erişkinler ve çocuklarda sadece pozitif saptanan QFT-G testi sonucuyla da kemoprofilaksiye başlamaktadırlar (98). Çocuklar üzerinde de birçok çalışma yapılmasına rağmen elimizdeki bilgiler henüz yeterli değildir. Oysa LTBI tanısı ve tedavi edilerek aktif hastalık gelişiminin engellenmesi, global bir hastalık olan tüberküloz enfeksiyonunun kontrolünün sağlanmasında çok önemlidir.

Tüberküloz tanısı düşünölen 61 çocukta toraks tomografisi, TDT ve QFT-G testinin performansının karşılaştırıldığı bir çalışmada, MTB'e ait antijenlerle yapılan QFT-G testinin tüberküloz tanısında ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde üstünlüğü gösterilmiştir (7).

Pozitif QFT-GIT testi ile artmış tüberküloz enfeksiyonu gelişme ihtimalinin de korele olduğu gösterilmiştir. IFN- $\gamma$  seviyesi ile yüksek temas ve hastalık risk artışı doğru orantılı bulunmuştur. Tüberküloz gelişiminin belirlenmesinde IFN- $\gamma$ 'nın cut off değerlerinin (0.35 IU/ml olarak kullanılıyor) yaşlara göre düzenlenmesi ile spesifite ve sensitivitenin artırılabilceğı gösterilmiştir (12).

QFT-GIT testi ile TDT'nin BCG'li çocuklarda performansının değerlendirildiğı bir çalışmada yüksek temas ile QFT-GIT testi pozitifliğinin TDT'ne göre daha korele olduğu görölmüştür (15).

Doherty ve arkadaşlarının tüberkülozlu hastalarla temas öyküsü olan 24 HIV negatif olguyu değerlendirdiğı çalışmada aktif tüberküloz gelişimi ile ESAT-6 ile çalışan INF- $\gamma$  salınım testlerinin pozitifliği arasındaki yüksek korelasyon olduğu gösterilmiştir (99).

INF- $\gamma$  salınım testlerinin negatif prediktif değeri yüksektir yani sağlıklı bir kişide testin negatif çıkması tüberküloz enfeksiyonu tanısını dışlamaktadır. Fakat pozitif prediktif değeri toplumdaki topluma değişmektedir. Ayrıca bu testler latent ve aktif tüberkülozu ayıramamaktadır, bu ayırım ancak klinik ile yapılabilmektedir (100).

INF- $\gamma$  salınımına dayalı tüberküloz enfeksiyonu için duyarlı olan bu yeni testlerin, özellikle yanlış negatif TDT'ne yol açabilecek durumlarda (bağışıklığı baskılanmış, malnütrisyonlu hastalar) ve bir kez enfekte olup da aktif tüberküloz gelişme riski olan çocuklarda da tanı aracı olarak kullanılması beklenmektedir (10,94).

## **2.7 Çocuklarda Tüberkülozda Tedavi**

Çocuklarda MTB ile primer enfeksiyonu takiben, basil sayısı az da olsa hızla hastalık gelişebilmektedir. Özellikle 5 yaş altında yaygın tüberküloz enfeksiyonu gelişme riski yüksektir. Bu sebeple çocuklarda tanı alır almaz hemen tedaviye başlanmalıdır (101). Çocuklardaki basil yükünün az olması ve ilaca dirençli tüberküloz enfeksiyonu gelişiminin erişkinlere göre daha az görülmesi ise tedavide avantajdır (1).

Çocuklarda tüberküloz hastalığının tanısını koymak, basili izole edebilmek zordur. Bu nedenle tedavi konusunda da kararsızlıklar yaşanabilir. 5 yaş altında klinik bulgu ve radyolojik bulgu olmasa da TDT pozitifliği durumunda koruyucu olarak tekli antitüberküloz ilaç başlanmalıdır. Tüberküloz hastalığı tanısını almış çocuklarda üçlü antitüberküloz tedavi önerilmektedir (87,102). Akciğerde üst loblarda infiltrasyon, kavite



gelişimi, balgamda mikroskopi pozitifliği gibi erişkin tip tüberküloz kliniği gelişmiş çocuklarda, basil yükünün fazla olduğu düşünülerek dörtlü antitüberküloz tedavi uygulanmalıdır (26,101).

Antitüberküloz tedavi rejimi, hızlı çoğalan basillerin temizlendiği, bakterisidal aktivitenin ön planda olduğu ve genellikle 2 ay süren başlangıç dönemi ve zaman zaman aktivasyon gösteren, aralıklı çoğalan basillerin temizlendiği ve genellikle 4 ay süren idame döneminden oluşur (26).

Pulmoner tüberküloz tanısı almış çocuklarda üçlü antitüberküloz tedavi (İzoniazid=INH, Rifampin=RIF, Pirazinamid=PRZ) başlanır, 2 ay üçlü devam edilerek ikinci ayın sonunda PRZ kesilir ve INH ve RIF ile tedavi 6 aya tamamlanır. Bu tedavi rejimi ile başarı oranı %95'in üzerindedir (87,101). Tüberküloz menenjit ve dissemine tüberküloz enfeksiyonu dışındaki ekstrapulmoner tüberküloz enfeksiyonu durumlarında da tedavi rejimi farklılık göstermez. Ancak menenjit ve dissemine enfeksiyon durumlarında tedavinin süresi 9-12 aya kadar uzatılmalıdır. 2 aydan sonra iki ilaç kesilerek INH ve RIF ile tedavi tamamlanır (101,103).

Antitüberküloz ilaçların primer etki ettikleri bölgeler ve etki şekilleri farklıdır. INH ve RIF güçlü bakterisidal aktiviteye sahiptir, makrofaj içine girerek etkinlik gösterebildikleri gibi kazeöz odaklarda ve kavitelere de etkindirler. Streptomisin ve diğer aminoglikozidler ise bakterisidal etkilidir fakat makrofaj penetrasyonları iyi değildir (1,103). Çocuklarda tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar ve dozları tablo 9'da gösterilmektedir (1,87,101).

**Tablo 9.** Çocuklarda tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar ve dozları

<b>İlaçlar</b>	<b>Günlük Uygulama (mg/kg/gün)</b>	<b>Haftada 2 kez Uygulama (mg/kg/gün)</b>	<b>Maksimum Doz</b>
<b>İzoniazid (PO)</b>	10-15	20-30	300 mg/gün (haftada 2 ise 900mg/g)
<b>Rifampisin (PO)</b>	10-20	10-20	600 mg/gün
<b>Pirazinamid (PO)</b>	20-40	40-60	2 g/gün
<b>Etambutol (PO)</b>	15-25	25-50	2.5 g/gün
<b>Streptomisin (IM)</b>	20-40	20-40	1 g/gün

### **İzoniazid (INH)**

En yaygın olarak kullanılan temel antitüberküloz ilaçtır. Oral veya intramusküler olarak verilebilen INH'in 10mg/kg dozda serum konsantrasyonu MTB için minimum inhibitör konsantrasyonun üzerindedir. Bakterisidal etkilidir, sabah aç tek dozda alınmalıdır (1,103).

Hepatotoksisite nadir görülmekle birlikte major toksik yan etkisidir. Karaciğer fonksiyon testlerinin rutin takibi önerilmemektedir (1,87).

### **Rifampin (RIF)**

Aç olarak alınmalıdır, alındıktan sonra yaklaşık 1-3 saat arası sürede zirve serum konsantrasyonuna ulaşır. Tüm sekresyonları turuncu renge boyamakta, kusma, karın ağrısı gibi gastrointestinal yan etkilere yol açabilmektedir (87,102).

### **Pirazinamid (PRZ)**

Atitüberküloz tedavinin üçüncü ilacıdır ve 2 ay kullanıldıktan sonra kesilir. Makrofaj içindeki basillere karşı bakterisidal etkilidir. Hiperürisemi gelişimine yol açabilmektedir. En sık görülen yan etki hepatotoksisitedir (87,103).

### **Etambutol (EMB)**

Çocuklarda rutin kullanımı yoktur. Bakteriyostatik etkilidir, 25mg/kg/gün dozun üzerinde bakterisidal etkilidir. Direnç gelişiminin önlenmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. INH veya RIF'e direnç gelişmiş hastalarda kullanılabilir. En önemli yan etkisi optik nörittir (101,102).

### **Streptomisin**

Çocuklarda, INH'a dirençli tüberküloz vakalarında veya yaşamı tehdit eden tüberküloz enfeksiyonu varlığında kullanılır. Enflame BOS'a geçişi çok iyidir. 8. kranial sinire toksik etki ile işitme ve denge sorunlarına yol açabilir, nefrotoksisite veya döküntüye yol açabilir (87,101).

### **Kortikosteroidler**

Kortikosteroidler tüberküloz menenjitte konak inflamatuvar yanıtını azaltmak amaçlı kullanılmaktadır. Kafa içi basıncı ve enflamasyonu azaltarak mortaliteyi ve uzun dönem sekelleri azaltmaktadır. Kafa içi basıncının azalması aynı zamanda kullanılan antitüberküloz ilaçların beyne ve menenklere ulaşma oranını da arttırmaktadır. Miliyer tüberkülozda alveolo kapiller bloğu azaltmak, endobronşial tüberküloz, lokalize amfizem, plevral veya perikardial efüzyon varlığında da kortikosteroidler kullanılabilir. En sık kullanılan kortikosteroid prednizondur, genellikle 1-2 mg/kg/gün, iki dozda oral olarak

4-6 hafta kullanılır ve sonra doz azaltılarak kesilir. Birlikte gastroprotektif ajanlar da kullanılmalıdır (1,26,102).

## 2.8 Çocuklarda Tüberkülozdan Korunma

Tüberkülozdan korunma, BCG aşısı, bulaştırıcı hastaların tedavisi, basilin bulaşmasının önlenmesi ve koruyucu ilaç tedavisi ile olmaktadır.

### 2.8.1 Koruyucu İlaç Tedavisi

LTBI'nun tedavisi de denilebilir. Amaç aktif tüberkülozla temaslı kişilerde hastalık gelişimini önlemek, aynı zamanda basilin bulaşını da azaltmaktır. TDT pozitif olup klinik ve radyolojik bulgusu olmayan çocuklarda koruyucu tedavi başlanması ile tüberküloz hastalığının gelişimi engellenebilmektedir. Uzun yıllardır bu amaçla 6-9 ay süre ile INH tedavisi 10mg/kg/gün, max 300mg/gün olarak kullanılmaktadır. HIV enfeksiyonu veya başka bir sebeple bağışıklığı baskılanmış çocuklarda tedavi 12 aya tamamlanmalıdır (1,102,103).

TDT'nin pozitifleşmesi için basil ile karşılaştıktan sonra yaklaşık olarak 3 aylık sürece ihtiyaç vardır. Bu sebeple TDT negatif olsa da aktif tüberkülozlu erişkin ile yakın teması olan çocuklarda da profilaktik tedavi başlanmalıdır. 3 aylık tedavi sonrasında test tekrarlanmalı, hala negatifse ve asemptomatikse tedavi kesilmelidir, aksi halde en az 6 aya tamamlanmalıdır. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda primer enfeksiyondan sonra aktif hastalık gelişmesi ve basilin yayılması ihtimali daha yüksektir (1,78,103). Koruyucu ilaç tedavisinin verilmesi gereken kişiler tablo 10'da gösterilmektedir (26).

**Tablo 10** . Tüberkülozda profilaktik tedavi verilmesi gereken durumlar

<b>Aktif Tüberkülozlu Vaka ile Teması Olmayan Kişilerde</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 15 yaşın altında TDT pozitif çocuklar</li><li>- TDT konversiyonu olması ( BCG aşısı yapılmaksızın son 2 yılda endurasyon çapında en az 6 mm'lik artış)</li><li>- Akciğer filminde tüberküloz sekel lezyonu olan çocuklar</li><li>- Bağışıklığı baskılanmış olan TDT pozitif kişiler (&gt;5mm)</li></ul>
<b>Aktif Tüberkülozlu Vaka ile Teması Olan Kişilerde</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 35 yaş altındaki kişiler (6 yaşından küçüklerde tedavinin sonunda TDT yapılır, negatifse BCG aşısı yapılır)</li><li>- TDT konversiyonu olması ( BCG aşısı yapılmaksızın son 2 yılda endurasyon çapında en az 6 mm'lik artış)</li><li>- Akciğer filminde tüberküloz sekel lezyonu olan çocuklar</li><li>- Tüberküloz riskinin yüksek olduğu bağışıklığı baskılanmış kişiler (KBY, DM, malabsorbsiyon sendromları, maligniteler)</li></ul>

Bir çalışmada, latent tüberkuloz enfeksiyonu tanısı almış 2750 ocuk incelenmiş, INH profilaksisinin tüberkuloz hastalığı gelişimini ilk yılda % 94, izleyen 9 yılda da % 70 azalttığı gösterilmiştir (104).

### **2.8.2 Bacille Calmette-Guerin (BCG) Aşılması**

BCG aşısı zayıflatılmış Mikobakterium bovis suşundan hazırlanan liyofilize bir aşıdır. Kuru şekilde 2-8 derecede 1-2 yıl muhafa edilebilir fakat sulandırılma sonrası 8 saat içinde tüketime elidir, ışığa duyarlıdır. İlk doz 0-3 ayda (genellikle 3.ay), sol omuza, 0.05 ml intradermal olarak, ikinci doz ilkokula başlandığında aynı şekilde 0.1 ml olarak yapılmaktaydı (26,87). şimdiki uygulama 1 yař altında 0.05 ml, 1 yař üstünde 0.1 ml olarak yapılmak üzere tek doz şekindedir (105). Aşı menenģial ve milier tüberkuloz gelişmesinin engellenmesinde etkilidir. Çocuklarda dissemine hastalık gelişme ihtimalinin yüksek olduğu dūřünüldüğünde çocuklarda aşılama tüberkulozun endemik olduğu ülkerlerde önem arz etmektedir. Pulmoner tüberkuloza karşı koruyuculuk %50 iken dissemine hastalık ve menenģitte bu oran %50-80 arasındadır (26,87).

BCG aşısının ciddi komplikasyonları çok nadirdir. Osteomyelit ve dissemine BCG enfeksiyonu gibi ağır tablolara sadece immün yetmezliği olan kişilerde rastlanmıştır (87,105). BCG aşısı canlı aşıların kontrendike olduğu tüm durumlar (immün yetmezlik durumları, steroid kullanımı gibi), yaygın deri enfeksiyonu veya yanığı olan kişilerde yapılmamalıdır (26,105).

Türkiye’de 1981-1982 yıllarında yapılan bir çalışmada, BCG’nin tüm yaş gruplarında koruyuculuğu %72,7, 0-6 yaş grubunda ise %85 olarak bulunmuştur (106).

## III-MATERYAL VE METOD

### 3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmaya, 1-16 yaş arası TDT pozitif saptanan 44 çocuk ve kontrol grubu olarak da tüberküloz ile temas öyküsü olmayan, TDT negatif saptanan 14 sağlıklı çocuk dahil edilmiştir. Hasta grubu, Celal Bayar Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi (CBÜTF) Pediatrik Allerji Bilim Dalı (BD) ve Solunum Birimi polikliniğine kronik öksürük, yineleyen alt solunum yolu enfeksiyonu ya da yineleyen bronşiolit gibi solunum sistemi yakınmaları ile başvuran ve yapılan TDT pozitif saptanan çocuklar ve tüberkülozlu vaka ile temas öyküsü veya temas şüphesi olup da yapılan TDT pozitif saptanan çocuklar ile oluşturulmuştur. TDT pozitifliği değerlendirilmesi için T.C. Sağlık Bakanlığı verileri kullanılmıştır (31). İmmüsupresyona neden olacak hastalıkları olup olmadığı sorgulanmıştır. HIV enfeksiyonu prevalansı Türkiye’de düşük olduğundan hastalara rutin HIV serolojisi bakılmamıştır. Çalışmaya dahil edilme kriterleri tablo 11’de gösterilmiştir.

**Tablo 11** . Hasta grubu ve kontrol grubu için çalışmaya dahil edilme kriterleri

#### **Hasta grubu için**

- 1- 1 yaşından büyük, 16 yaşından küçük olmak
- 2- TDT pozitif saptanmış olmak
- 3- Primer immün yetmezliği olmamak
- 4- Sekonder immün yetmezliğe yol açabilecek tip 1 DM, kronik böbrek yetmezliği gibi kronik hastalığı olmamak

#### **Kontrol grubu için**

- 1- 1 yaşından büyük, 16 yaşından küçük olmak
- 2- TDT negatif saptanmış olmak
- 3- TDT’nin yanlış negatif saptanmasına yol açabilecek immün yetmezlik durumuna veya herhangi bir kronik hastalığa sahip olmamak
- 4- Tüberküloz tanısı almış vaka ile temas öyküsü veya temas şüphesi olmamak
- 5-Tüberküloz hastalığını düşündürecek klinik bulgusu veya yakınması olmamak

### **3.2 Çalışma Dizaynı**

Araştırma protokolü için, CBÜTF Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (proje no: 2009-123). Ayrıca çalışmaya dahil edilmiş tüm hastaların ailelerine bilgilendirilmiş onam formu verilmiş ve onayları alınmıştır.

Tüberküloz grubuna alınan TDT pozitif çocuklardan başvuru anında ayrıntılı öykü alınıp ailede tüberküloz öyküsü sorgulanmış ve cinsiyet, yaş, şikayetleri ve hikayesi, fizik muayene bulguları, BCG skar varlığı ve sayısının kaydedildiği çalışma formları doldurulmuştur. TDT pozitif grubundaki tüm hastalara AC grafisi, AC grafisinde patolojik bulgu saptanan hastalara akciğer tomografisi çekilmiştir. Hasta grubu ve kontrol grubundaki tüm hastalardan QFT-GIT testi için özel 3 tüpe 1'er ml olmak üzere toplam 3 ml kan alınmış ve testler CBÜTF Mikrobiyoloji AD'nda çalışılmıştır. Hasta grupları QFT-GIT sonucuna göre 2 alt grupta toplanmıştır:

1. grup: TDT pozitif, QFT-GIT negatif hastalar
2. grup: TDT pozitif, QFT-GIT pozitif hastalar

QFT-GIT testi negatif olan grup, tam latent hasta grubu olarak, QFT-GIT testi pozitif olan grup ise primer tüberküloz grubu olarak değerlendirilmiştir. Tüberküloz düşünülmeyen, temas öyküsü olmayan ve TDT negatif olan çocuklar ise kontrol grubu olarak alınmıştır (3.grup).

Quantiferon için kan alındığı sırada eş zamanlı tüm hastalardan heparinli enjektöre 4-6 ml kan örneği alınmış ve bu kan örneklerinden CBÜTF Histoloji AD'da periferik kan mononükleer hücre kültürü (PBMC) yapılmıştır. Bu hücreler fitohemaglutinin ile uyarılarak uyarım sonrasında elde edilen süpernatanda IL 4, IL10, IL12, IL17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  düzeyleri ölçülerek immün yanıtlar değerlendirilmiştir.

### **3.3 Yapılan Testler**

#### **3.3.1 TDT (tüberkülin deri testi)**

Çalışmaya alınan tüm çocuklara, tüberkülin solüsyonundan (PPD-S Tween 80) intradermal olarak 0.1 ml (5 tüberkülin ünite) uygulanmış ve 72.saatte oluşan endurasyonun çapı ölçülmüştür. Endurasyonun çapı ölçülürken kalem ucu ile periferden merkeze çizilerek, kalemin takıldığı yerler çapın sınırları olarak kabul edilerek cetvelle milimetre olarak hesaplanmıştır. Pozitif kabul edilmesi için tablo 5'teki kriterler kullanılmıştır.

### 3.3.2 Quantiferon TB Gold In Tube (QFT-GIT) Testi

QFT-GIT testi, MTK'de bulunan, atipik mikobakterilerde ve BCG'de bulunmayan RD1 bölgesinde kodlanmakta olan, ESAT-6, CFP-10 ve TB 7.7 (p4) antijenleri ile TH lenfositlerin in vitro olarak uyarılması ve sonucunda salınan IFN- $\gamma$ 'nın ELISA yöntemi ile ölçümü esasına dayanmaktadır.

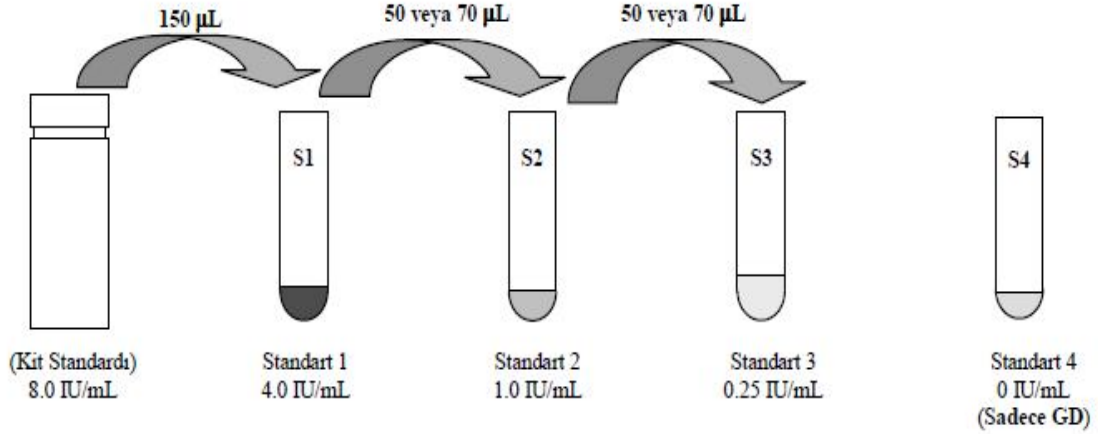
Mitojen tüpü, pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Bu tüpte testin pozitif olması, kişinin bağışıklık durumu ile ilgili şüpheyi ortadan kaldırabilir, ayrıca kan alım ve inkübasyon işlemlerinin doğru yapıp yapılmadığını da kontrol etmiş olur. Mitogene karşı düşük cevap olması ( $<0.5$  IU/mL), şüpheli sonucu gösterir. Bu durum, lenfosit sayısının yetersiz olması, numune alımının uygun olmaması ya da hastanın lenfositlerinin IFN- $\gamma$  salınımının yetersiz olması nedeniyle ortaya çıkabilir.

TB antijen tüpündeki IFN- $\gamma$  miktarı Nil tüpündekinden belirgin şekilde yüksekse, test pozitifdir. Nil numunesi, heterofil antikorların etkilerini veya kan numunesindeki spesifik olmayan IFN- $\gamma$ 'nın testteki düzeltmesini sağlar. Nil tüpünün IFN- $\gamma$  seviyesi TB antijen tüpünün ve Mitojen tüpünün IFN- $\gamma$  seviyesinden çıkartılarak sonuç elde edilir.

Çalışmamızda, tüm çocuklardan test için özel 3 tüpe (Nil kontrol-gri, mitojen-mor ve antijen tüpleri-kırmızı) 1'er ml olmak üzere toplam 3 ml kan alındı. Tüpler, alt-üst edilerek kanın tüm yüzeyle temas etmesi sağlandıktan sonra inkübatörde 37° C'de 16-24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler 2000-3000 RCF'de 15 dakika santrifüj edilerek ayrılan plazma Eppendorf tüplerine alınarak -20 °C'de saklandı. Hastalar tamamlandıktan sonra ELISA (IU/ml) basamağı çalışılmaya başlandı.

#### **Testin uygulanma basamakları:**

1. Konjugat dışında tüm plazma numuneleri ve reaktifler, çalışmaya başlamadan en az 60 dakika önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına (22°C  $\pm$  5°C) gelmeleri beklendi.
2. Dondurularak kurutulmuş Kit Standardı, Standart şişesinin etiketinde belirtilen miktarda distile su ile çözüldü, hafifçe karıştırıldı. Standardın çözülmesi ile 8.0 IU/mL konsantrasyonunda solüsyon elde edilmiş oldu. Sulandırılan standart prospektüste belirtildiği şekilde green diluent ile sulandırılarak 4 farklı IFN- $\gamma$  konsantrasyonu elde edildi. Her ELISA çalışmasında Kit Standardının dilüsyonları taze olarak hazırlandı.



**Şekil 5.** Kit standartlarının dilüsyonu

3. Konjugat, 0.3 ml distile su ile sulandırıldı. Çalışma Konjugatı solüsyonu, çözölen Konjugat 100X Konsantre'nin gereken miktarda Yesil Dilüent ile dilüe edilmesiyle hazırlandı.

4. Teste başlamadan önce, IFN- $\gamma$  tüm numune içinde eşit dağılımını sağlamak için, plazmalar çalkalandı. Taze hazırlanmış olan çalışma konjugat solüsyonundan (Konjugat x 100 Kons + Gren Dil.) tüm ELISA kuyularına 50  $\mu$ l eklendi.

5. Konjugat Çalışma Solüsyonu koyulmuş olan mikropklarda belirlenen pozisyonlara 50ul plazma örnekleri ve 50ul standart solüsyonları eklendi. En son olarak da her standarttan 50 $\mu$ L eklendi.

6. Konjugat çalkalayıcı kullanılarak mikropklaklar kuyular arasında bir kontaminasyon olmayacak şekilde 1 dakika karıştırıldı.

7. Mikropklaklar üzeri kapatılarak gün ışığı görmeyecek şekilde oda sıcaklığında 120 dakika inkübe edildi.

8. Wash Buffer Çalışma solüsyonu, bir birim Wash Buffer 20X Konsantreyi 19 birim distile su ile dilüe edilerek hazırlandı.

9. İnkübasyondan sonra kuyular, 400 $\mu$ L yıkama solüsyonu ile en az 6 kez yıkandı.

10. Yıkama işlemini bittikten sonra plaklar ters çevrilerek, absorban kağıt üzerine vurularak kalan yıkama solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı. Her kuyuya 100 $\mu$ L Enzim Substrat Solüsyonundan eklendi ve iyice karıştırıldı.

11. Her bir plak üzeri kapatılarak gün ışığı görmeyecek şekilde 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

12. 30 dakikalık inkübasyon sonunda her bir kuyuya 50 ul enzim durdurma solüsyonu eklendi.



13. Durdurma solüsyonunun eklenmesinden sonra, bir mikropalak okuyucu kullanarak 450 nm ana dalga boyunda ve 620nm ila 650nm arasında bir referans dalgaboyunu kullanarak mikropalakların Optic Densiteleri (OD) ölçüldü.

14. Okutulan değerlerin analizinde Cellestis tarafından hazırlanan QuantiFERON®-TB Gold IT analiz yazılımı kullanıldı. Yazılım, testin kalite kontrol değerlendirmesini, standart eğrinin çizilmesini ve sonuçların yorumlanması gerçekleştirilmektedir.

QuantiFERON®-TB Gold IT Analiz yazılımı programına göre sonuçların yorumu tablo 12'de gösterilmektedir.

15. QFT-GIT çalışması için tüm laboratuvar aşamaları Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

**Tablo 12 . QFT-GIT sonuçlarının yorumu**

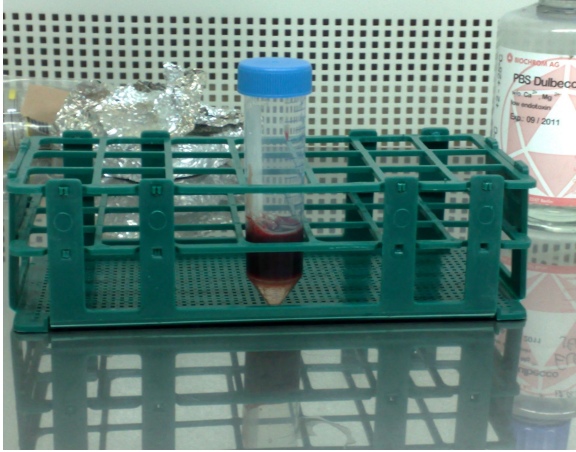
<b>Nil (IU/mL)</b>	<b>TB Antijen – Nil farkı (IU/mL)</b>	<b>Mitogen – Nil farkı (IU/mL)</b>	<b>QuantiFERON®-TB</b>	<b>Rapor/Yorum</b>
<b>≤ 8.0</b>	<0.35	≥ 0.5	Negatif	M. tuberculosis enfeksiyonu olası değil
	≥ 0.35 ve < Nil değerinin %25'i	≥ 0.5		
	≥ 0.35 ve ≥ Nil değerinin %25'i	Her Türlü	Pozitif	M. tuberculosis enfeksiyonu olasılığı yüksek
	<0.35	<0.5	Şüpheli	Sonuçlar TB-Antijen cevabına göre şüpheli
	≥ 0.35 ve < Nil değerinin %25'i	<0.5		
<b>&gt;8.0</b>	Her türlü	Her Türlü		

### 3.3.3 Sitokinlerin Çalışılması

Tüberküloza organizmanın cevabı olarak immün yanıtların değerlendirilmesi, TH1 ve TH2 lenfositlerin immün yanıtındaki rollerinin gösterilmesi amaçlanarak hastalardan IL 4, IL10, IL12, IL17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  düzeylerinin çalışılması planlanmıştır. Tüm hastalardan Qnatiferon için kan alındığı esnada heparinli enjektöre 6-8 ml kan örneği alınmıştır. Bu kan örneklerinden CBÜTF Histoloji AD'da PBMC yapılarak, elde edilen hücreler fitohemaglutinin ile uyarılarak süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatanda IL 4, IL10, IL12, IL17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  düzeyleri CBÜTF Biyokimya AD'da ölçülmüştür.

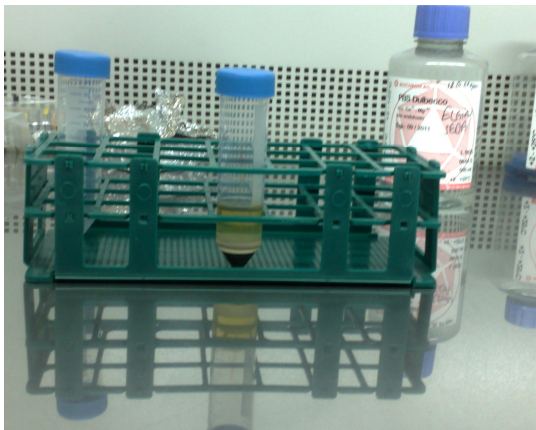
### 3.3.3.1 Periferik Kan Mononükleer Hücre Kültürü (PBMC)

PBMC için alınan kan örnekleri CBÜTF Histoloji ve Embriyoloji AD'na buz üzerinde ulaştırıldı. Örnek 50 ml'lik falkon tüplere boşaltıldı ve üzerine aynı volümde steril 'fosfat tampon solüsyonu (phosphate buffer solution-PBS)' eklendi. PBS ile sulandırılan kan pipetaj yapılarak karışması sağlandı. Üzerine kan ile aynı volümde olmak üzere Biocoll solüsyonu (resim 1) tüpün yan duvarından yavaşça ilave edildi.



**Resim 1:** Biocoll solüsyonu ilave edilmiş kan örneği.

Tüpler 2300 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında en altta eritrositler, eritrositlerin üzerinde yoğunluğu daha yüksek olan biocoll ve en yukarıda ise PBS ve plazma tabakaları gözlemlendi (resim 2) PBS ve biocoll'un birleşim yerinde açık gri-beyaz renkli hücrelerin olduğu kısım 15'lik yeni bir tüpe alındı.



**Resim 2:** Santrifüj işleminden sonra altta eritrositlerin olduğu kısım, en üstte plazma ve PBS arada ise hücrelerin olduğu kısım görülmektedir.

Toplanan hücrelerin üzerine hücre volümü kadar PBS eklendi ve pipetajı yapılarak 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlemde sonra tüpün dip kısmına çöken

hücreler bırakılarak üst kısımdaki supernatant atıldı. Pelet üzerine içinde kalmış olabilecek eritrositleri lizis etmek amacı ile 1cc steril distile su eklendi ve 30 sn pipetaj yapıldıktan sonra 1ml PBS ilave edildi. Pipetaj işleminden sonra 1300 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve pelet üzerindeki supernatant atıldı. Dipte kalan pelet üzerine 4ml içerisinde %1 L-gultamin (cat no), %10 fotal sığır serumu (cat no)ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 (cat no) medium ilavesi yapıldı. Hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlanana kadar pipetaj işlemi yapıldıktan sonra 2'şer ml olarak petri kaplarına dağıtılarak kültüre edildi. Hücre sayımı için örnekten 40 µl alındıktan sonra 40 µl tripan mavisi ile karışımı sağlandıktan sonra thoma lamı üzerinde sayım yapıldı ve her bir örnek için ml'deki hücre sayısı kaydedildi. Kontrol grubu örneklerine herhangi bir işlem uygulanmadı diğer petriye ise 20µl fitohemaglutinin ilave edilerek kontrol ve hasta grupları 2 gün 37°C de inkübasyona bırakıldı. 48 saatin sonunda kültür vasatları toplanarak santrifüj edildi ve pelet üzerindeki sıvı toplanarak -20°C de saklandı.

### **3.3.3.2 ELISA Yöntemi İle Sitokinlerin Çalışılması**

#### **IL-4**

Hücre kültürü örneklerinde IL-4 düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (Gen-Probe Diaclone SAS, France Katalog No: 950020096). Sonuçlar, çift çalışılan tüm örneklerin ölçüm değerlerinin ortalamaları alınarak verildi. IL-4 kitinin analitik sensitivitesi 0.7 pg/ml, kite ait intra-assay varyasyon katsayısı (CV) değerleri 30 pg/ml konsantrasyonda % 3.4 , 11 pg/ml konsantrasyonda %1 idi. Inter-assay CV değerleri, 30 pg/ml konsantrasyonda % 6.2; 21 pg/ml konsantrasyonda %6.6 idi.

#### **IL-10**

Hücre kültürü örneklerinde IL-10 düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (Gen-Probe Diaclone SAS, France Katalog No: 950060096). Sonuçlar, çift çalışılan tüm örneklerin ölçüm değerlerinin ortalamaları alınarak verildi. IL-10 kitinin analitik sensitivitesi 5 pg/ml, kite ait intra-assay varyasyon katsayısı (CV) değerleri 469.3 pg/ml konsantrasyonda % 1.72 , 54.2 pg/ml konsantrasyonda % 5 idi. Inter-assay CV değerleri, 469.3 pg/ml konsantrasyonda %6 ; 62.9 pg/ml konsantrasyonda %8.6 idi.

#### **IL-12p40+p70**

Hücre kültürü örneklerinde IL-12p40+p70 düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (Gen-Probe Diaclone SAS, France Katalog No: 950075096). Sonuçlar, çift çalışılan tüm örneklerin ölçüm değerlerinin ortalamaları alınarak verildi. IL-12p40+p70 kitinin analitik sensitivitesi 20 pg/ml, kite ait intra-assay varyasyon katsayısı (CV) değerleri 2295 pg/ml konsantrasyonda %3.65, 479 pg/ml konsantrasyonda %0.97 idi.

Inter-assay CV değerleri, 2426 pg/ml konsantrasyonda % 7;1493 pg/ml konsantrasyonda %8.3 idi.

#### **IL-17A**

Hücre kültürü örneklerinde IL-17A düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (Bender Med Systems GmbH,Austria Europe Ref No: BMS2017). Sonuçlar, çift çalışılan tüm örneklerin ölçüm değerlerinin ortalamaları alınarak verildi. IL-17A kitinin analitik sensitivitesi 0.5 pg/ml, kite ait intra-assay varyasyon katsayısı (CV) değerleri 59 pg/ml konsantrasyonda %3.9, 16.6 pg/ml konsantrasyonda %4.4 idi. Inter-assay CV değerleri, 59.3 pg/ml konsantrasyonda % 8.9; 15.4 pg/ml konsantrasyonda %8.3 idi.

#### **TGF- $\beta$ 1**

Hücre kültürü örneklerinde TGF- $\beta$ 1 düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (Gen-Probe Diaclone SAS, France Katalog No: 650010096). Sonuçlar, çift çalışılan tüm örneklerin ölçüm değerlerinin ortalamaları alınarak verildi. TGF- $\beta$ 1kitinin analitik sensitivitesi 9 pg/ml, kite ait intra-assay varyasyon katsayısı (CV) değerleri 5673 pg/ml konsantrasyonda %4.0, 10409 pg/ml konsantrasyonda %6.2 idi. Inter-assay CV değerleri, 9120 pg/ml konsantrasyonda %7.7; 23329 pg/ml konsantrasyonda %5.3 idi. Serumlar 30 kez sulandırıldığı için sonuçlar 30 ile çarpılmıştır.

#### **IFN- $\gamma$**

Hücre kültürü örneklerinde IFN- $\gamma$  düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kit kullanılarak tayin edildi (Gen-Probe Diaclone SAS, France Katalog No: 950000096). Sonuçlar, çift çalışılan tüm örneklerin ölçüm değerlerinin ortalamaları alınarak verildi. IFN- $\gamma$  kitinin analitik sensitivitesi 5 pg/ml, kite ait intra-assay varyasyon katsayısı (CV) değerleri 282 pg/ml konsantrasyonda %2.9, 53 pg/ml konsantrasyonda %7.2 idi. Inter-assay CV değerleri, 282 pg/ml konsantrasyonda % 6; 144 pg/ml konsantrasyonda %8 idi.

### **3.4 İstatistiksel Analiz**

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 13.o bilgisayar programı (Chicago, IL) kullanılarak yapıldı. Demografik özelliklerin incelenmesinde tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Cinsiyet, BCG aşılama durumu, TDT sonuçları ve QFT-GIT testi sonuçları frekans olarak rapor edildi. Yaş ve sitokin düzeyleri ise ortalama ve standart deviasyon olarak tanımlandı. Gruplar arasında sitokin düzeylerinin karşılaştırılmasında nonparametrik Mann Whitney U analizi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $p<0.05$  olarak tanımlandı.

## IV-BULGULAR

### 4.1 Çalışma Gruplarının Sosyodemografik Özellikleri

Çalışmaya 1-16 yaş arası toplam 58 çocuk alınmıştır. Yaş ortalaması 103 aydır. Hasta grubunda 44, kontrol grubunda 14 olgu mevcuttur. TDT pozitif olan, hasta grubundaki 44 çocuğun 18'sinde (%40.1 ) QFT-GIT testi pozitif, 26'sında (%59) negatif saptanmıştır. QFT-GIT testi pozitif saptanan 18 hasta 1.grup olarak sınıflandırılırken, QFT-GIT testi negatif gelen 26 hasta da 2.grup olarak sınıflandırılmıştır. Kontrol grubu olarak alınan, TDT negatif, tüberkülozlu olgu ile temas öyküsü ve yakınması olmayan 14 çocuk da 3.grup olarak nitelendirilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların 24'ü kız (%41.3), 34'ü erkek (%58.7)'tir. Yaş ve cinsiyet (sırasıyla p=0.85 ve p=0.12) açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 13).

**Tablo 13 .** Olguların gruplara göre yaş ve cinsiyet farklılıkları

Gruplar		TDT(+)/QTF (-)	TDT(+)/QTF (+)	Kontrol	p
		1. grup (n=26)	2. grup (n=18)	3.grup (n=14)	
Yaş (ay)		103 ± 47	108 ±46	98 ± 53	0.85
Cinsiyet	Kız	8 (%30.8)	7 (%38.9)	9 (%64.3)	0.118
	Erkek	18 (%69.2)	11 (%61.1)	5 (%35.7)	

### 4.2 Çalışma Gruplarının Hastalık Özellikleri

Hastaların polikliniğe başvurma yakınmaları incelendiğinde, 1. gruptaki 26 hastanın 22 (%84.6)'sinde öksürük ve/veya hırıltı şikayeti olduğu, 4 (%15.4)'ünde ise yakınma olmadığı, taramalar esnasında yapılan TDT'nin pozitif saptandığı görüldü. 2. grupta ise öksürük ve/veya hırıltı yakınması olan 16 (%88.9) hasta bulunurken, yakınması olmayan ve tarama esnasında TDT pozitifliği saptanan 2 (%11.1) hasta mevcuttu. Başvuru yakınmaları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p: 0.685).

TDT pozitif olan 44 hastanın 9 (%20.5)'unda tüberkülozlu vaka ile temas öyküsü mevcut iken 35 (%79.5)'inde temas öyküsü yoktu. 1.grupta 5 (%19.2) hastada, 2. grupta 4 (%22.2) hastada tüberküloz tanısı almış olgu ile temas öyküsü vardı. 1. ve 2. grup arasında temas açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p: 0.809).

TDT pozitif saptanan 44 hastaya da akciğer grafisi çekildi. 35 (%79.5) hastanın grafisinde patolojik bulgu yoktu ve normal olarak değerlendirildi. 4 (%9.11) hastada mediastinal genişleme, 5 (%11.4) hastada da infiltrasyon saptandı. Akciğer grafisi bulguları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p: 0.928).

Akciğer grafisinde bulgu saptanan 1.gruptan 5, 2.gruptan 4 olmak üzere toplam 9 hastaya akciğer tomografisi çekildi. 1. gruptan 1 (%2.3) hastada parankimal infiltrasyon, 2. gruptan 1 (%2.3) hastada atalektazi saptandı, 7 (%15.8) hastanın akciğer tomografisi normal olarak değerlendirildi. Akciğer tomografisi çekilme gereksinimi ve bulgular açısından iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.05) (Tablo 14).

**Tablo 14.** Gruplara göre temas öyküsü varlığı, başvuru semptomları, akciğer grafisi ve akciğer tomografisi bulgularının dağılımı

Gruplar		TDT(+)/QTF (-) 1. grup (n=26)	TDT(+)/QTF (+) 2. grup (n=18)	Toplam	P değeri
Temas öyküsü	Var	5 (%19.2)	4 (%22.2)	9 (%20.5)	0.809
	Yok	21 (%80.8)	14 (%77.8)	35 (%79.5)	
Başvuru Yakınması	Yok	4 (%15.4)	2 (%11.1)	6 (%13.6)	0.685
	Öksürük, hırıltı	22 (%84.6)	16 (%88.9)	38 (%86.4)	
Akciğer Grafisi Bulgusu	Yok	21 (%80.5)	14 (%77.8)	35 (%79.5)	0.928
	Mediastinal genişleme	2 (%7.7)	2 (%11.1)	4 (%9.11)	
	İnfiltrasyon	3 (%11.5)	2 (%11.1)	5 (%11.4)	
Akciğer Tomografi bulgusu	Yok	4 (%15.4)	3 (%16.6)	7 (%15.9)	0.493
	İnfiltrasyon	1 (%3.8)	0 (%0)	1 (%2.3)	
	Atalektazi	0 (%0)	1 (%5.6)	1 (%2.3)	
	Çekilmedi	21 (%80.8)	14 (%77.8)	35 (%79.5)	

Kontrol grubunu oluşturan 14 sağlıklı çocuğun tüberkülozlu vaka ile temas öyküsü yoktu, TDT negatif idi, hiçbir hastaya akciğer grafisi ve/veya akciğer tomografisi çekilmedi.

### 4.3 Çalışma Gruplarının Sitokin Düzeyleri

IL-4 düzeyi TDT (+)/QTF-GIT (-) grupta  $9.8 \pm 8.7$ , TDT (+)/QTF-GIT (+) grupta  $9.8 \pm 6.0$ , kontrol grubunda ise  $13.7 \pm 19.7$  bulundu (grafik 1). IL-4 düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0.68$ ).

IL-10 düzeyi TDT (+)/QTF-GIT (-) grupta  $180.1 \pm 216.5$ , TDT (+)/QTF-GIT (+) grupta  $173.1 \pm 263.0$ , kontrol grubunda ise  $154.0 \pm 203.9$  bulundu (grafik 2). IL-10 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=1.0$ ).

IL-12 düzeyi TDT (+)/QTF-GIT (-) grupta  $85.1 \pm 119.0$ , TDT (+)/QTF-GIT (+) grupta  $56.2 \pm 53.2$ , kontrol grubunda ise  $68.1 \pm 90.6$  bulundu (grafik 3). IL-12 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0.885$ ).

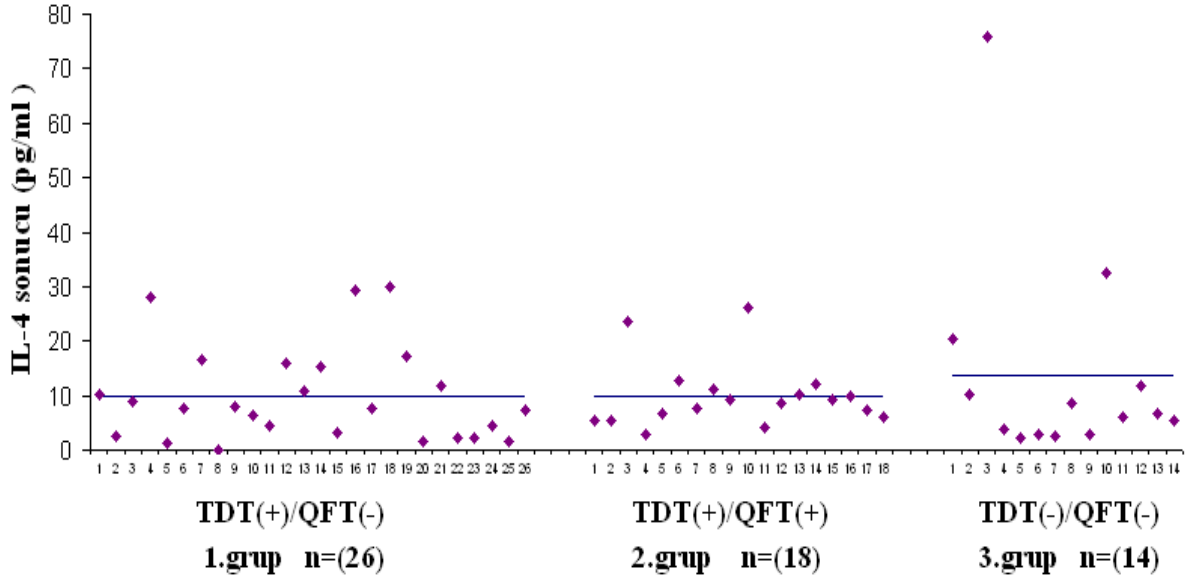
IL-17 düzeyi TDT (+)/QTF-GIT (-) grupta  $18.8 \pm 33.1$ , TDT (+)/QTF-GIT (+) grupta  $40.3 \pm 77.1$ , kontrol grubunda ise  $66.4 \pm 83.3$  bulundu (grafik 4). Gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ( $p=0.030$ ). IL-17 için farklılığın 1.grup ile kontrol grubu arasındaki ( $p: 0.014$ ) farktan kaynaklandığı görüldü (Tablo 15).

TGF- $\beta$  düzeyi TDT (+)/QTF-GIT (-) grupta  $1884.0 \pm 1091.5$ , TDT (+)/QTF-GIT (+) grupta  $1748.7 \pm 759.1$ , kontrol grubunda ise  $1054.0 \pm 734.3$  bulundu (grafik 5). Gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ( $p=0.015$ ). TGF- $\beta$  düzeyleri için saptanan farklılık kontrol grubu ile 1.grup ( $p: 0.014$ ) ve kontrol grubu ile 2.grup ( $p= 0.007$ ) arasında idi (Tablo 15).

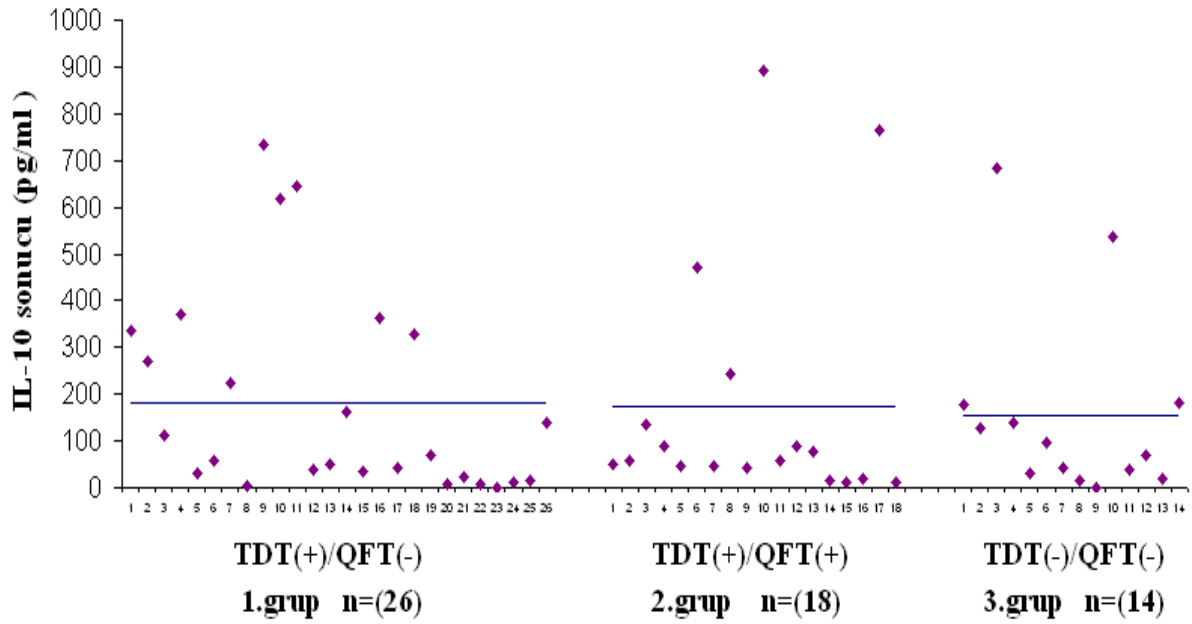
INF- $\gamma$  düzeyi TDT (+)/QTF-GIT (-) grupta  $1056.3 \pm 408.7$ , TDT (+)/QTF-GIT (+) grupta  $1263.7 \pm 266.9$ , kontrol grubunda ise  $1105.0 \pm 444.7$  bulundu (grafik 6). INF- $\gamma$  düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0.114$ ).

**Tablo 15.** Gruplara göre sitokin değerleri

Gruplar	TDT(+)/QTF (-) 1. grup	TDT(+)/QTF (+) 2. grup	Kontrol 3. grup	P değeri
IL-4 (pg/ml)	$9.8 \pm 8.7$	$9.8 \pm 6.0$	$13.7 \pm 19.7$	0.677
IL-10 (pg/ml)	$180.1 \pm 216.5$	$173.1 \pm 263.0$	$154.0 \pm 203.9$	1.0
IL-12 (pg/ml)	$85.1 \pm 119.0$	$56.2 \pm 53.2$	$68.1 \pm 90.6$	0.885
IL-17 (pg/ml)	$18.8 \pm 33.1$	$40.3 \pm 77.1$	$66.4 \pm 83.3$	0.030
TGF- $\beta$ (pg/ml)	$1884.0 \pm 1091.5$	$1748.7 \pm 759.1$	$1054.0 \pm 734.3$	0.015
INF- $\gamma$ (pg/ml)	$1056.3 \pm 408.7$	$1263.7 \pm 266.9$	$1105.0 \pm 444.7$	0.114

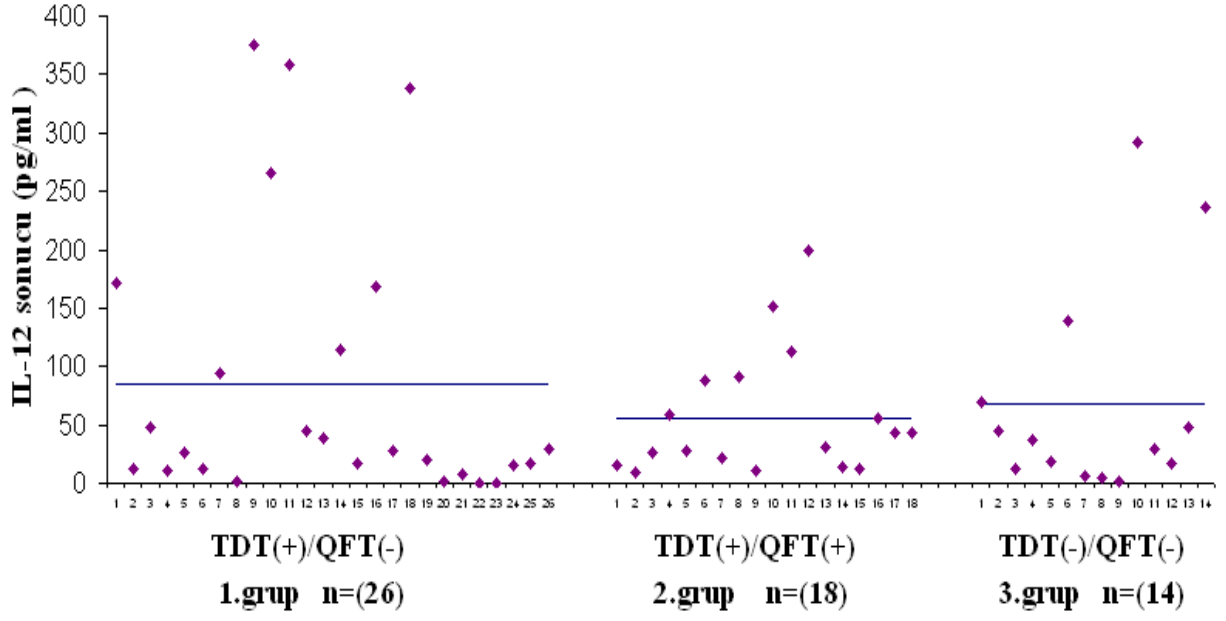


**Grafik 1.** Hasta gruplarına göre IL-4 sonuçları

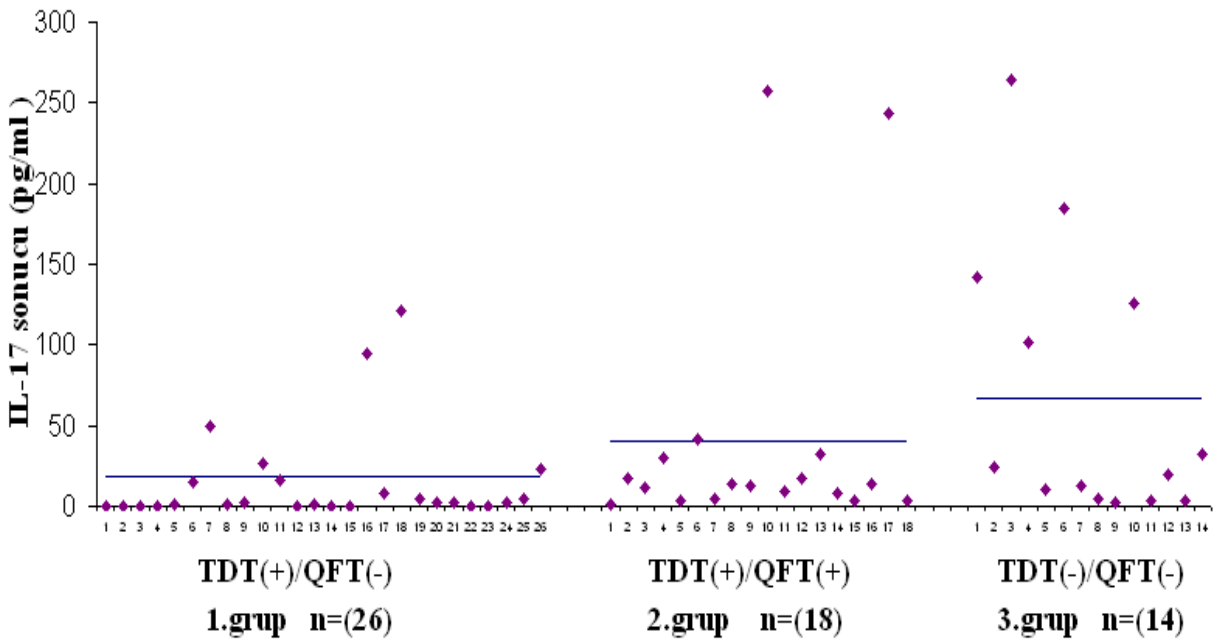


**Grafik 2.** Hasta gruplarına göre IL-10 sonuçları

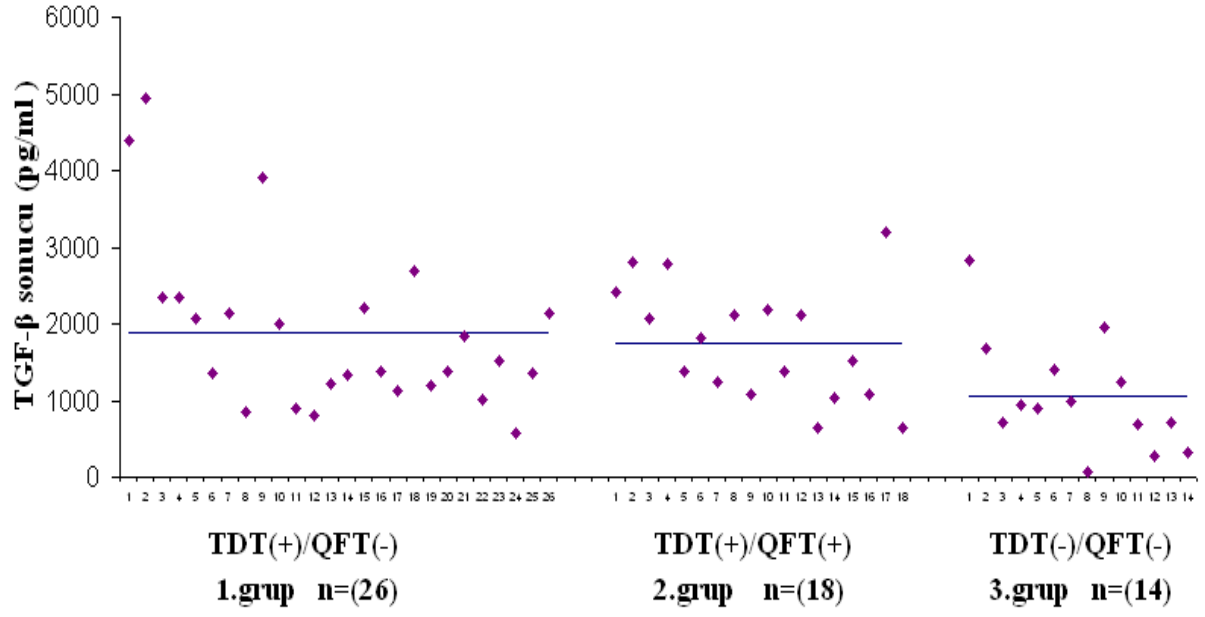




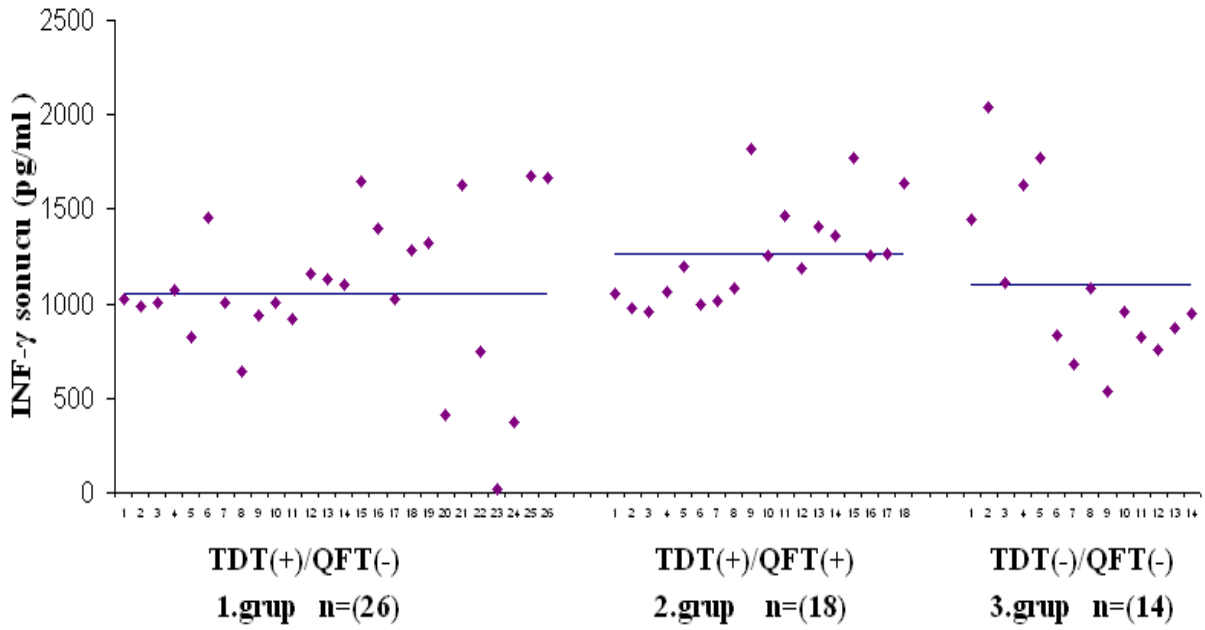
**Grafik 3.** Hasta gruplarına göre IL-12 sonuçları



**Grafik 4.** Hasta gruplarına göre IL-17 sonuçları



**Grafik 5.** Hasta gruplarına göre TGF-β sonuçları



**Grafik 6.** Hasta gruplarına göre INF-γ sonuçları

#### **4.4 Çalışma Gruplarının Mikrobiyolojik Sonuçları**

TDT (+)/QFT-GIT(+) olan 2.gruptan, akciğer tomografisinde atelektazi saptanan ve pnömoni tedavisi ile klinik bulgularında gerileme olmayan 1 hastaya bronkoskopi yapıldı. Bronkoskopide pürülan sekresyon ve dıştan bası bulguları saptandı, bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL) alındı. BAL'da ARB negatif saptandı ve kültürde de MTB üretilmedi. Aynı hastadan bronkoskopiden önce üç gün ard arda MAS alındı. MAS'da ARB saptanmadı, kültürde basil üretilmedi. Klinik bulgular doğrultusunda hastaya akciğer tüberkülozu tanısıyla üçlü antitüberküloz tedavi başlandı, tedavi sonrası klinik bulgularda düzelme saptandı.

TDT(+)/QFT-GIT(-) olan 1.gruptan akciğer tomografisinde infiltrasyon saptanan 1 hastadan üç gün ard arda MAS alındı, MAS'da ARB saptanmadı, kültürde MTB üretilmedi. Pnömoni tedavisi ile klinik bulgularda gerilemesi olan hastaya sadece izoniazid profilaksisi başlandı.

## V-TARTIŞMA

Çocukluk çağı tüberkülozunda kesin tanı, klinik ve mikrobiyolojik özellikleri nedeni ile zordur. Olguların anlamlı bir oranında özgül semptom yoktur (1,2,3). Çocuklarda akciğer tüberkülozunda basil yükünün az olması, kavitelerin yokluğu, erişkinde tüberküloz tanısında altın standart olan mikrobiyolojik yöntemlerin çocuklarda kullanılabilmesini sınırlandırmaktadır. Tanı daha çok klinik ve radyolojik bulgular ve TDT'nin pozitifliği ışığında konulabilmektedir (1,4,26,42).

Çalışmada TDT'nin pozitif saptandığı 44 çocuğun 38 (%86.4)'inde başvuru yakınması olarak öksürük ve hırıltı mevcut olduğu belirlendi. Tüm çocukların 6'sında ise yakınma bulunmamakla birlikte tüberkülozlu vaka ile temas şüphesi olması sebebiyle yapılan TDT pozitif bulunduğu belirlendi. Çalışmamıza alınan olguların Pediatrik Alerji Bilim Dalı ve Solunum Birimi polikliniğinde izlenmekte olması ve çoğu olgunun solunum yakınmaları nedeni ile yapılan incelemeler arasında TDT bulunması, genel literatüre oranla daha sık yakınma saptanmasını açıklayabilir.

Pediatrik olguların varlığı çoğunlukla aktif tüberkülozlu erişkin olgu varlığını yansıtmakta aynı zamanda da toplumdaki yüksek bulaş hızını göstermektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu ve insidans oranlarının %10-20'sini çocukların oluşturduğu bilinmektedir. Dissemine tüberküloz görülme oranı da erişkinlere göre çocuklarda çok daha yüksektir. Mortalite açısından bakıldığında, yaklaşık olarak her yıl 3 milyon erişkin ve 450000 çocuk da tüberküloz nedeniyle hayatını kaybetmektedir (1,9). Bu denli yaygın, bulaş riski yüksek, mortaliteye yol açabilen ve erken tanı ve tedavi ile önüne geçilebilecek toplum sağlığı açısından önemli bir hastalık için çocuklarda kesin tanı yönteminin olmaması sensitivitesi ve spesifitesi yüksek, uygulaması kolay ve pahalı olmayan yeni tanı yöntemlerinin arayışına yol açmıştır. Son yıllarda INF- $\gamma$  ölçümüne dayanan immünolojik temelli testler geliştirilmiş ve bu testlerle yapılan çalışmalarda güvenilir sonuçlar elde edilebilmiştir (94).

QFT-G ve TDT'nin karşılaştırıldığı tüberküloz düşünülen 61 çocukta yapılan bir çalışmada TDT'ne göre QFT-G ile daha spesifik sonuçlar elde edilebildiği gösterilmiştir (7). 137 erişkin olgu üzerinde yapılan bir çalışmada da, TDT, QFT ve QFT-G testi karşılaştırılmıştır. QFT-G testinin, özellikle de BCG aşılı kişilerde TDT ve QFT testine

göre çok daha spesifik olduğu gösterilmiştir (6). İtalya’da 496 çocuk ile ve 393 çocuk ile yapılan iki ayrı çalışmada 5 yaş altındaki çocuklarda mitojen tüpteki IFN- $\gamma$  salınımının yetersiz olması sebebiyle T-SPOT-TB testinin bu yaş grubunda daha duyarlı olduğu ve TDT’ne üstünlüğü olduğu gösterilmiştir (96,97). Ayrıca aktif tüberküloz hastalarıyla yakın temasta bulunan olgularda, T-SPOT-TB testin pozitif olma olasılığı, QFT-G’a göre daha yüksek bulunmuştur (97). Başka bir çalışmada da klinik olarak tüberküloz plörezisi olduğu düşünülen 20 erişkin hasta ve farklı tanısı olan 21 hastada PBMC ve plevral sıvı mononükleer hücreleri kullanılarak T-SPOT-TB testi yapılmıştır. T-SPOT-TB testinin duyarlılığı kan analizleri ile %90, plevral sıvı ile de %95 olarak saptanmıştır (107). QFT-GIT testinin TDT ile kıyaslandığı birkaç çalışmada da QFT-GIT testinin TDT’ne göre LTBI tanısında, aktif tüberküloza ilerlemenin öngörülebilmesinde yol gösterici olduğu ve TDT’ne üstünlüğü gösterilmiştir (12,15).

Türkiye’de sağlık çalışanları üzerinde latent tüberküloz enfeksiyonlarının saptanabilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada da QFT ve TDT karşılaştırılmış ve QFT testinin daha efektif olduğu bulunmuştur (108). Ayrıca, 100 kaviter akciğer tüberkülozu olan olgu ve 47 sağlıklı kişinin dahil edilerek yapmış olduğu bir çalışmada TDT, QFT-G testi ve T-SPOT-TB testi karşılaştırılmıştır. Sensitiviteleri sırasıyla %70, %78, %83.5 olarak, spesifiteleri de sırasıyla %35, %89.4 ve %84.8 olarak bulunmuş ve QFT-G ile T-SPOT-TB testinin TDT’den daha güvenilir yöntem olduğu gösterilmiştir (109).

Tüberküloz hastalığının tanısında IFN- $\gamma$  salınım testlerinin kullanımı ile ilgili yayınlanan 2010 rehberinde, özellikle ESAT-6 ve CFP-10’un kullanıldığı testlerin (QFT-G, QFT-GIT, T-SPOT-TB) erişkinlerde ve çocuklarda tüberküloz tanısında ve aktif tüberküloz vakalarında tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde, TDT’ne üstünlüğü olduğu ve TDT’nin yapıldığı her durumda bu testlerin de kullanılabileceği öne sürülmüştür (10,94,95,99,109-113). Tanı koymada bu testler yardımcı olabilmesine karşın klinik göz önüne alınmalıdır.

LTBI asemptomatiktir ve bu kişilerde hayatlarının herhangi bir döneminde %10 ihtimalle aktif hastalık gelişir. LTBI olan kişileri saptamak ve aktif hastalık gelişmeden önlem almak enfeksiyonun kontrolü açısından çok önemlidir. Fakat dünya çapında LTBI’nun tanısını koyabilmek için tanı yöntemleri yetersizdir (6). TDT hala bu konudaki önemini kaybetmemiş olmakla birlikte BCG aşısından, NTB ile enfeksiyonlardan etkilenmesi nedeniyle güvenilirliği sınırlanmaktadır (10). IFN- $\gamma$  salınım testlerinin LTBI tanısında yeri olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda tüm hastalara QFT-GIT testi uygulandı. TDT pozitif olan 44 çocuğa yapılan QFT-GIT testi, 18 hastada pozitif saptandı, negatif olarak bulunan 26 hasta latent tüberküloz enfeksiyonu grubu olarak

değerlendirildi. Bu ayrımın yapılabilmesi özellikle BCG aşısının rutin uygulandığı ülkemiz gibi ülkelerde önem taşımaktadır. Kontrol grubu olarak alınan 14 sağlıklı ve TDT negatif çocuğun tümünde QFT-GIT negatif saptandı.

MTB ile karşılaşma sonrası gelişen immün yanıt ortaya çıkan klinik bulguları belirleyici rol oynamaktadır. İmmün yanıtın önemi özellikle HIV virüsünün yaygınlaşması sonrası artan tüberküloz olguları ile birlikte vurgulanmış ve dikkat çekmiştir. Primer veya sekonder immün yetmezliği gelişmiş hastalarda basil alınma sonrası aktif hastalığın daha hızlı ve şiddetli görülmesi, latent enfeksiyonun tüberküloz temas sonrasında bazı olgularda gelişmesi, latent enfeksiyondan aktif tüberküloz gelişme sürecinin kişilerde farklılık göstermesi ilgiyi tüberküloz immünopatogenezi üzerinde toplamıştır. Bu sebeple hastalığın immünopatogenezinin iyi bilinmesi, hastalığın tanısı konusunda daha iyi yöntemlerin geliştirilmesini sağlayacak, erken tedavi ile toplum sağlığı açısından büyük adımlar atılabilecektir.

Tüberküloz immünopatogenezinde primer rolü hücrel immün sistem ve elemanları oynamaktadır. CD4 T lenfositler basile karşı konak savunmasında en önemli hücrelerdir. CD4 T lenfositler, IL-12 ve IL-27 varlığında CD4 TH1 yönünde, IL-4 ve IL-10 varlığında da CD4 TH2 yönünde farklılaşırlar (17,36). TH1 lenfositler hücre içi mikroorganizmalara karşı immün yanıtta daha baskın olmakla birlikte TH1/TH2 dengesi immünitede büyük öneme sahiptir. TH1 yönündeki farklılaşma koruyucu immünite oluştururken, TH2 yönündeki fazla farklılaşma yetersiz immün cevaba yol açmaktadır. TH1 tipi yanıtın göstergesi olan sitokinler arasında INF- $\gamma$ , IL-12 yer alır. TH2 tipi yanıtın göstergesi olan sitokinler ise IL-4, IL-10 ve TGF- $\beta$ 'dır (1,17). TH17 ise Treg hücreler üzerinden gösterdiği etki ile TH1 ve TH2 dengesini etkileyebilmektedir. TH17'nin aktivitesinin değerlendirilebilmesi için de IL-17 düzeyleri bakılabilmektedir (77,78).

CD4 T hücreler içerisinde CD24, CD25 molekülünü yüksek düzeyde sentezleyen Treg lenfositler de bulunmaktadır. IL-10 ve TGF- $\beta$  aracılığıyla bu lenfositler, CD4 T ve CD8 T lenfositleri baskılamakta, IFN- $\gamma$  sentezini ve T hücre proliferasyonunu durdurmakta ve periferik toleransı sağlayarak otoimmün reaksiyonları da önlemektedir (58,59). Treg hücreleri lokal doku hasarını engellemekte fakat enflamasyonu da baskıladığı için enfeksiyonun yayılmasına ve/veya tekrarlamasına neden olabilmektedir (60,114,115,1116). Marin ve arkadaşları da aktif pulmoner tüberküloz ve LTBI olan hastalarda Treg hücrelerinin aktivitelerini ve etkilerini araştırmışlardır. Treg lenfositlerin aktif pulmoner tüberkülozlu hastalarda LTBI olan hastalara göre daha yüksek bulmuşlar, Treg hücrelerinin deplese olması durumunda INF- $\gamma$  salınımında artış saptarken IL-17 seviyelerinde

değişiklik saptamamışlardır. Buradan da aktif tüberküloz enfeksiyonunda Treg hücrelerinin artışının TH1 koruyucu immün yanıtını azalttığını fakat IL-17 üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir (117).

TH1 yanıtın göstergesi olan IFN- $\gamma$  ve IL-12 basil ile karşılaşma sonrası ilk immün yanıtta görev alırlar. Özellikle de INF- $\gamma$  makrofaj aktivasyonu ve bakterisidal etkiden sorumludur, IL-12 ile birlikte granülasyon dokusunun oluşmasında görev alarak basilin lokal olarak sınırlandırılmasını sağlar, yayılmasını engellerler (17,36). Bai ve arkadaşlarının pulmoner tüberkülozlu erişkinlerde yapmış olduğu bir çalışmada granülasyon dokusu ve enflame akciğer dokusu alanlarından yaptıkları biyopsi örneklerinde kontrol grubuna göre INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$  ve IL-12'nin arttığını IL-10 ve IL-4'ün ise düşük değerde olduğunu göstermişlerdir (73). Bu da basilin kontrol altına alınmasında, sınırlandırılmasındaki lokal cevapta IL-12 ve INF- $\gamma$ 'nın yer aldığını göstermektedir (72,73). INF- $\gamma$  geni mutasyona uğratılmış ve IL-12 salınımı sekteye uğratılmış farelerde MTB enfeksiyonlarının kontrol altına alınamadığı, dissemine hastalık riskinde artış olduğu ve MTB ile hastalık geliştirmeye meyilli oldukları gösterilmiştir (72,74,75,76). Sonradan bu farelere dışarıdan IL-12 verilmiş ve MTB'ne karşı direnç geliştirdikleri görülmüştür (72). İnsanlarda da defektif INF- $\gamma$  salınımı MTB'ne konak immün cevabında yetersizliğe ve aktif tüberküloz hastalığı gelişmesi için yatkınlığa yol açmaktadır (73,118). Swaminathan ve arkadaşlarının tüberküloz tanısı almış 24, sağlıklı fakat TDT pozitif 22 çocuk ile yapmış oldukları bir çalışmada, orta ve şiddetli pulmoner tüberküloz tanısı olan çocukların INF- $\gamma$  seviyelerini kontrol grubuna göre çok düşük saptamışlardır. IL-4, IL-10, IL-12 sonuçlarında ise kontrol grubu ile hasta grubu arasında farklılık saptamamışlardır. INF- $\gamma$ 'nın MTB ile karşılaşma sonrası ilk immün yanıtta çok önemli rolü olduğunu ve yetersiz cevabın tüberküloz hastalığı gelişimi üzerinde etkili olduğunu yorumlamışlardır (119). INF- $\gamma$ 'nın tekrarlayan tüberküloz enfeksiyonlarına karşı da koruyucu rolü vardır, INF- $\gamma$  reseptör eksikliği olan çocuklarda şiddetli mikobakterial enfeksiyonların geliştiği gösterilmiştir (120,121). INF- $\gamma$  üretimini sağlayan T lenfositlerin TH2 sitokinleri olan IL-4 ve IL-10'un fazla salındığı durumlarda inhibe edilmesinin de aynı tablolara yol açabileceği de unutulmamalıdır. Primer tüberkülozda görülebilen plevral efüzyon TH1 lenfositlerin cevabı ile oluşurken, enfeksiyonun kontrol edilemediği ve milier tüberkülozun oluştuğu tablo ise TH1 yanıtın yetersiz olduğu TH2 yanıtın baskın olduğu durumda oluşmaktadır (122). Çalışmamızda INF- $\gamma$  ve IL-12 düzeylerinde gruplar arasında farklılık saptanmamış olması tüberküloza verilen immün yanıtta INF- $\gamma$  ve IL-12 düzeylerinden bağımsız olarak etki gösteren bir sitokinin varlığını düşündürülebilir. Ancak bununla birlikte her iki sitokinin

de standart deviasyonunun yüksek olması hasta gruplarına alınan hasta sayılarının düşük olması nedeni ile istatistiksel anlamlılık saptanamamış olabileceğinin de göz önüne alınması gerekli kılmaktadır. Grupların sitokin düzeyleri tek tek göz önüne alındığında, istatistiksel farklılık olmasa da IL-12 düzeylerinin TDT(+)/QTF (+) grupta latent enfeksiyonu olan gruba göre düşük düzeylerde olduğunu göstermektedir. Bu durum da tüberküloz enfeksiyonunun latent evreden aktif evreye geçişinde IL-12 nin bilinmekte olan rolünü destekleyici bir veridir. Kontrol grubunda ise latent enfeksiyon grubundan düşük, TDT(+)/QTF(+) grubundan ise yüksek değerler saptanmış olması mononükleer hücrelerin fitohemaglutinin gibi nonspesifik bir uyarana yanıtını yansıtmaktadır. Bu durum hastalığı kontrol edebilmek için latent enfeksiyon grubunda IL-12 nin kontrol grubundan daha yüksek olduğunu; QTF (+) grupta ise MTB ile karşılaşma olmasına karşın IL-12 yanıt kapasitesinin düşük olduğunu düşündürmektedir.

IL-10 ve TGF- $\beta$  seviyeleri daha çok Treg hücrelerinin fonksiyonunu yansıtmakta birlikte TH2 immün yanıtı da yansıtmaktadır. TGF- $\beta$ , makrofaj aktivasyonunu, T lenfositlerinin proliferasyonlarını ve IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  üretimlerini azaltarak hücrel immüniteyi baskılar. Enfeksiyon sırasında kollajen üretimi ve fibroz doku oluşumunun artışında etkilidir, granülom oluşumunda da görevlidir (69,70,73). TGF- $\beta$ 'nın anti TGF- $\beta$  antikoru ile nötralize edilmesiyle monositler içindeki basillerin üreme hızı azalmaktadır. Doğal TGF- $\beta$  inhibitörleri olan decorin ve latency-associated peptide gibi proteinler pulmoner tüberkülozlu hastalarda MTB'nin monositler içinde çoğalmasına engel olmaktadır (71). IL-10 ve TGF- $\beta$  tüberküloza karşı immün yanıtı baskılayarak (70) konağın basili öldürme yeteneği azaltırken aynı zamanda dokunun aşırı enflamatuvar yanıtını azaltıp doku hasarını önlediği bilinmektedir. Balkhi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada MTB sekretuar antijenlerinin konak dendritik hücrelerinden IL-10 ve TGF- $\beta$  salgısını uyararak basile karşı TH1 immün yanıtını baskıladığı gösterilmiştir (123). Bai ve arkadaşları da çalışmalarında aktif tüberkülozlu hastaların akciğer biyopsi örneklerinde TGF- $\beta$ 'yı kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır (73). IL-10'un bazı çalışmalarda da erken yanıtı bozmadığı granülom yapısının sağlam olmaması sebebiyle basilin kaçıışı ve reaktivasyon tüberkülozu riskini arttırdığı gösterilmiştir (124). Bai ve arkadaşları aktif tüberkülozlu hastaların akciğer biyopsilerinde IL-10 seviyesini düşük bulmuşlar ve bunu da IL-4 ve IL-10'un yokluğunda granülasyon formasyonunun daha sağlam olmasına ve biyopsilerin de granüle alanlardan alınmış olmasına bağlamışlardır (73).



Başka bir çalışmada da aktif tüberkülozlu hastalarda serumda IL-10 düzeyleri yüksek saptanmıştır (125). Bizim çalışmamızda IL-10 için gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmazken TGF- $\beta$  sonuçları için gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı farklılık görüldü. TGF- $\beta$  değerleri için farklılığın kontrol grubu ile latent enfeksiyon grubu ve kontrol grubu ile aktif enfeksiyon grubu arasında olduğu görüldü. Kontrol grubunda TGF- $\beta$  değerleri hasta grubuna göre daha düşük saptandı. Bu durum daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermekteydi. LTBI veya aktif tüberkülozlu çocuklarda TGF- $\beta$  düzeylerinin yüksek olması, basile karşı hücrel immüitenin baskılanması ve yetersiz cevap geliştirdiklerini desteklemektedir.

IL-4, TH2 lenfosit sitokinlerindedir. INF- $\gamma$ 'nın hücrel immüitedeki etkilerini inhibe eder, aynı zamanda da makrofaj inhibitörüdür. Tüberküloz enfeksiyonunda faydalı veya zararlı etkileri ile ilgili farklı yaklaşımlar mevcuttur (67,126,127). Tüberküloz lenfadenitli hastalarda biyopsi örneklerinde IL-4 seviyesi düşük saptanırken (67), yüksek basil yüküne sahip kaviter akciğer tüberkülozu olan hastalarda IL-4 değerinin yüksekliği gösterilmiştir (128).

Bizim çalışmamızda da IL-4 seviyelerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

IL-23, TGF- $\beta$ , IL-6 ve IL-1 varlığında TH17 diferansiyasyonu ve IL-17 salınımı meydana gelirken , IL-4 ve INF- $\gamma$  varlığında da TH17'yi baskılanmaktadır (18,20). INF- $\gamma$  ve IL-4'ün yokluğunda IL-17 salınımının ve otoimmün reaksiyonların arttığı gösterilmiştir (79). IL-17, enfeksiyöz ajanlardan ekstrasellüler patojenler ve funguslara karşı immün yanıtta etkilidir. IL-17'nin farklılaşmasında transkripsiyon faktörlerinden olan STAT-3'te mutasyonun olduğu hiperimmünglobülin E sendromunda IL-17'de azalma vardır. Bu hastalarda staphylococcus ve candida enfeksiyonlarına sık rastlanmaktadır (77). IL-6 'da TH17 üzerindeki pozitif etkisi STAT-3 üzerinden olmaktadır (20). Anti-IL-17 tedavisinin sinovyal enflamasyonu ve eklem erozyonunu azaltmakta etkili olduğu gösterilmiştir (129). Cruz ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada farelerde INF- $\gamma$  eksikliği oluşturulmuş ve ardından fareler MTB ile enfekte edilmiştir. IL-17'nin arttığı, immün yanıtın zayıfladığı, ardından dışarıdan INF- $\gamma$  verilme sonrası da IL-17'nin azaldığı gösterilmiştir. Tüberküloz hastalığında basilin kontrol altına alınması ve enfeksiyonun sınırlandırılmasında INF- $\gamma$  ve IL-17 ikilisinin birbirleriyle olan ters ilişkisi büyük rol oynamaktadır (130). IL-17'nin granülom formasyonunda da rolü vardır, IL-17 geni bloke edilmiş farelerde granülom oluşumunun defektif olduğu gösterilmiştir (131). Bu nedenle de enfeksiyon kontrolünü bozabildiği düşünülmektedir. Ancak granülom oluşumunu desteklemesi ise bu durum ile

karşıtlık yaratmaktadır. Çalışmamızda IL-17'nin değerlendirilmek istenmesinin nedenlerinden biri de literatürdeki bu farklı yanıtlardır. Çalışmamızda IL-17 düzeylerinin latent enfeksiyon grubunda en düşük, kontrol grubunda en yüksek düzeylerde olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, IL-17'nin özellikle aktif enfeksiyonun ortaya çıkmasını kolaylaştıracak şekilde immün yanıtta değişiklikler ortaya çıkardığını düşündürmektedir. Ancak IL-17'nin etkileri latent enfeksiyon gibi sınırlandırılmış tüberküloz enfeksiyonu durumunda önemli rol oynamadığı düşünülebilir.

Sonuç olarak, MTB'e karşı immün yanıtın klinik olarak latent ve aktif enfeksiyon ortaya çıkmasını belirlediğini düşünmek gerekmektedir. Çalışmamızın sonuçları, immün yanıtın elemanı olan sitokinlerden özellikle TGF- $\beta$ 'nın immün sistemi baskılayan etkilerinin artmış olmasının latent ve aktif tüberküloz gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, IL-17 gibi enfeksiyon kontrolünü olumsuz etkilediği düşünülen ancak granülom oluşumunda rol oynadığı bilinen bir sitokinin enfeksiyon gelişimini kolaylaştırdığı yönünde bir bulgu saptanmamıştır. Ancak, IL-17 düzeylerinin latent enfeksiyon grubunda tüm gruplara göre anlamlı düşük olması, latent enfeksiyondan aktif enfeksiyona geçişte IL-17'nin önemli rol oynayabileceğini düşündürülebilir. MTB'a karşı bu oldukça karmaşık immün yanıt sürecinde sitokinlerin etkilerinin daha ayrıntılı belirlenebilmesi için daha fazla sayıda hastanın alındığı çalışmalara gereksinim vardır. Ancak sonuçlarımız ileri çalışmaları yönlendirebilecek veriler sunmaktadır.

## VI-SONUÇLAR

- 1- Çocuklarda tüberküloz tanısında kesin bir yöntem olmamakla birlikte TDT, klinik bulgular ve radyolojik bulguların yanında INF- $\gamma$  salınım testleri de çocukluk çağı aktif tüberkülozu ve latent tüberküloz tanısında kullanılabilir.
- 2- Çalışmamızda IFN- $\gamma$  ve IL-12 düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı, bu durumda tüberküloza verilen immün yanıtta IFN- $\gamma$  ve IL-12 düzeylerinden bağımsız olarak etki gösteren başka bir sitokin varlığı düşünülebilir.
- 3- IL-12 sonuçları için gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamış olsa da LTBI grubunda kontrol grubuna göre IL-12 değerleri daha yüksek bulunmuş, hasta grubunda ise (QTF (+) grup) IL-12 yanıt kapasitesi düşük bulunmuştur.
- 4- TGF- $\beta$  değerleri için gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı; hasta grubu ve LTBI grubunda kontrol grubuna kıyasla daha düşük değerler elde edildi. LTBI veya aktif tüberkülozlu çocuklarda saptanan yüksek TGF- $\beta$  düzeylerinin basile karşı hücrel immün yanıt yetersizliğine neden olabileceğini desteklemektedir.
- 5- IL-17 düzeyleri için LTBI grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı; IL-17 düzeylerinin LTBI grubunda tüm gruplara göre anlamlı düşük olması, latent enfeksiyondan aktif enfeksiyona geçişte IL-17'nin önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.
- 6- Çalışmamızda IL-17'nin enfeksiyon gelişimini kolaylaştırdığı yönünde bir bulgu saptanmamıştır.
- 7- Sonuçlar değerlendirilirken hasta gruplarına alınan hasta sayılarının düşük olması nedeni ile istatistiksel anlamlılık saptanamamış olabileceği göz önüne alınmalı, karmaşık tüberküloz immünopatogenezinin aydınlatılması için daha fazla sayıda hastanın alındığı çok sayıda çalışmalara gereksinim vardır.

## ÖZET

### ÇOCUKLARDA TÜBERKÜLOZ TANISINDA TÜBERKÜLİN TESTİ, İNERFERON GAMA SALINIM TESTİ SONUÇLARI VE TÜBERKÜLOZA T HÜCRE YANITI İLE KORELASYONU

Tüberküloz, mikobakteriler tarafından oluşturulan, kronik, granümatöz bir enfeksiyondur. Çocuklar tüberküloz basili, genellikle basil çıkaran erişkinlerden inhalasyon yoluyla almaktadır. Çocukluk çağı tüberkülozunun erken dönemde tanısı ve tedavisi toplumsal hastalık yayılımının engellenmesi açısından önemlidir. Tanıyı doğru koyabilmek, prognozu öngörmek ve latent tüberküloz enfeksiyonlu kişilerin aktif hastalık gelişmeden tedavi edebilmek tüberkülozla savaşta çok önemlidir. Fakat çocuklarda tüberküloz tanısı koymak zordur. Bu konuda geleneksel tanı yöntemlerinin yanında son yıllarda kullanılmaya başlanan INF- $\gamma$  salınım testleri ümit vericidir.

Bizim çalışmamıza 14 kontrol grubu, 44 hasta grubu olmak üzere toplam 58 çocuk alındı. LTBI grubu ve hasta grubu ayrımı için IFN- $\gamma$  salınım testlerinden olan QFT-GIT testi kullanıldı. QFT-GIT (-) olan çocuklar LTBI olarak kabul edildi.

MTB basili ile karşılaşma sonrası gelişebilecek hastalık tablosunda konağın vereceği immün yanıtın belirleyici olduğu bilinmektedir. TH1 lenfositlerin baskın rol oynadığı immün yanıtta TH1 ve TH2 lenfositler arası denge de önemlidir. Bu sebeple basil ile karşılaşma sonrası verilen TH1 ve TH2 tipi yanıtların ve salgılanan sitokinlerin hangi düzeyde olduğunun belirlenmesi de tüberküloz tanısında ve tedavi yaklaşımlarında yol gösterici olacaktır.

Çalışmamızda bu amaçla bakılan sitokinlerden, TGF- $\beta$  düzeyleri hasta grubu ( $p=0.007$ ) ve LTBI grubunda ( $p=0.014$ ) kontrol grubuna kıyasla düşük bulundu. Bu veriler literatür verileri ile uyumlu olarak yüksek TGF- $\beta$  düzeylerinin basile karşı hücrel immün yanıt yetersizliğine neden olabileceğini destekler şekildeydi. IL-17 düzeyleri incelendiğinde LTBI grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşüklük ( $p=0.014$ ) saptandı. Bu durum da LTBI'dan aktif enfeksiyona geçişte IL-17'nin önemli rol oynayabileceğini

düşündürmektedir. Ancak çalışmamızda IL-17'nin enfeksiyon gelişimini kolaylaştırdığı yönünde etkisi saptanmamıştır.

Çocuklarda tüberküloz tanısı ve tedavisinde immünopatogenezin anlaşılması anahtar role sahiptir. Şimdiye kadar yapılmış çalışmalar ve bizim elde ettiğimiz verilerin ışığında daha yüksek sayıda olgunun dahil edildiği fazlaca sayıda çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Çocukluk çağı tüberkülozu, INF- $\gamma$  salınım testleri, immün yanıt, sitokin

## **ABSTRACT**

### **RESULTS OF TUBERCULIN TEST, INTERFERON GAMMA RELEASE TEST IN DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS AND CORRELATION WITH T CELL RESPONSE TO TUBERCULOSIS**

Tuberculosis is a chronic granulomatous infection caused by mycobacteria. Children acquire the tuberculosis bacilli by the inhalation route from adults who expectorate the bacilli. Early diagnosis and treatment of childhood tuberculosis is important for prevention of disease transmission in the population. Correct diagnosis, estimation of the prognosis and treatment of people with latent infection before active disease develops is important in the battle against tuberculosis. However, diagnosis of tuberculosis is difficult in children. INF- $\gamma$  release assays are promising in this aspect besides the traditional diagnostic techniques. It is known that the immune response of the host determines the disease state that develops after contact with MTB bacilli. Balance between TH1 and TH2 lymphocytes are also important for the immune response in which TH1 lymphocytes play a major role. Therefore, determination of the TH1 and TH2 type responses and levels of the cytokines secreted after contact with the bacilli will guide the diagnosis and treatment approaches in tuberculosis.

Total of 58 children were enrolled in our study; 14 in the control group, 44 in the patient group. QFT-GIT which is one of the IFN- $\gamma$  release assays was used to differentiate the LTBI and patient groups. Children who were QFT-GIT negative were regarded as LTBI.

The aim of this study was to evaluate the TST and Quantiferon tests in childhood tuberculosis and to determine the TH1 and TH2 cytokine responses in the different clinical outcomes.

In our study, TGF-  $\beta$  levels were lower in patient and LTBI groups when compared to the control group ( $p=0.007$  and  $p=0.014$  respectively). IL-17 levels were significantly lower in the LTBI group when compared to the control group ( $p=0.014$ ). This might indicate that IL-17 is important in transmission from LTBI to active TB.

Understanding the immunopathogenesis has a key role in diagnosis and treatment of tuberculosis in children. When data from previous studies and from our study are considered, more number of studies in which high number of cases are enrolled are required.

**Key words:** Childhood tuberculosis, INF- $\gamma$  release assays, immune response, cytokines

## IX-KAYNAKLAR

1. Starke JR, Munoz FM. Tuberculosis (Mycobacterium Tuberculosis). In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. 18th edition. Philadelphia, Saunders. 2007: 1240-1254.
2. Morcillo N. Tuberculosis in Children. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. 1th edition. 2007; 525-558.
3. Feja K, Saiman L. Tuberculosis in Children. Clin Chest Med. 2005; 26: 295- 312.
4. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. Lancet Infect Dis 2003; 3: 624-632.
5. Yew WW, Leung CC. Update in Tuberculosis 2008. Am J Respir Crit Care Med. 2009; 179: 337–343.
6. Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG and Litwin CM. Evaluation of an In Vitro Assay for Interferon  $\gamma$  Production in Response to the Mycobacterium tuberculosis Synthesized Peptide Antigens ESAT-6 and CFP-10 and the PPD Skin Test. Am J Clin Pathol. 2006; 125: 467-473.
7. Higuchi R, Mori M, Ozawa R, Miyamae T, Imagawa T, Nishimaki S, Mitsuda T, Aihara Y and Yokota S. Whole blood interferon-  $\gamma$  assay for tuberculosis in children in Japan. Pediatrics International. 2009; 51: 97–102.
8. Janner D. Pediatrik Tüberküloz (Çeviri: Devrim İ.). İç: Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Klinik Rehberi. (Çeviri: Kara A.). Nobel Tıp Kitabevleri. 2008; 123-135.
9. World Health Organization. Epidemiology. Global Tuberculosis Control 2009. Epidemiology, Strategy, Financing. WHO Report 2009. 2009; 6-32.
10. Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: A systematic review. Lancet Infect Dis. 2004; 4: 761-776.
11. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet. 2000; 356: 1099-1104.
12. Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, Peng CH, Pollack H. Latent Tuberculosis Diagnosis in Children by Using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test Pediatrics. 2009; 123: 30-37.



13. Soysal A, Bakır M. Tüberküloz infeksiyonunda yeni tanı yöntemleri. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*. 2007;1: 151-157.
14. Çelik Ü, Kocabaş E. Tüberküloz tanısında yeni bir yöntem: İnterferon-gama araştırmasına dayanan testler. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*. 2007; 55(1): 108-117.
15. Chun JK, Kim CK, Kim HS, Jung GY, Lee TJ, Kim KH, Kim DS. The role of a whole blood interferon-gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in Bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62(4): 389-394.
16. Nicod LP. Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly*. 2007; 137: 357–362.
17. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2004; 213-232.
18. Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008; 41(2): 79-83.
19. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: 247-254.
20. Ochs HD, Oukka M, Torgerson TR. TH17 Cells and Regulatory T cells in Primary Immunodeficiency Diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123(5): 977–985.
21. Daniel TM. *Captain of Death: The Story of Tuberculosis*. Rochester, New York: University of Rochester Pres. 1997.
22. Leao SC, Portaels F. History. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care*. 1th edition. 2007; 25-52.
23. Gümüşlü F, Özkara Ş, Özkan S, Baykal F, Güllü Ü. *Türkiye’de Verem Savaşı, 2007*. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Ankara. 2007.
24. World Health Organization. *Conclusions, Europa. Global Tuberculosis Control 2009. Epidemiology, Strategy, Financing. WHO Report 2009*. 2009; 249-268.
25. Hesseling AC, Schaaf HS, Gie RP, Starke JR, Beyers N. A critical review of diagnostic approaches used in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002; 6(12): 1038–1045.
26. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. *Türkiye’de Tüberküloz İçin Başvuru Kitabı*. T.C Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Ankara. 2003.
27. Kıyan M. Mycobacteriaceae. In: Ustaçelebi S, ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara. Güneş Kitabevi. 1999; 419–437.
28. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. *Mycobacterium Tuberculosis*. In: *Mikrobiyoloji 2000*. İzmir: Asya Tıp Yayıncılık. 2000; 174-183.

29. Saygun N. Mikobakterilerin Yapısal ve Antijenik Özellikleri. In: Kocabaş A, ed. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Adana: Emel Matbaası. 1991; 41-55.
30. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri. 2002; 538-591.
31. Starke JR. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, eds. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone. 2002; 791-810.
32. Brennan PJ, Draper P. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom BR (ed). *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington DC. American Society of Microbiology. 1994: 271-84.
33. Gedikoğlu S. *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre yapısı. *İnfeksiyon Derg*. 1997;11 (4): 13–17.
34. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvar yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyum Kitabı. Samsun. 2003: 34-47.
35. Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F, Andersen P. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol*. 1998; 48(5): 535–543.
36. Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J Bras Pneumol*. 2007; 33(3): 323-334.
37. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*. 1998; 144 (11): 3195-3203.
38. Skjot RL, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S, Andersen P. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT–6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun*. 2000; 68(1): 214–220.
39. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996; 178(5): 1274– 1282.
40. Trajkovic V, Singh G, Singh B, Singh S, Sharma P. Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-specific 10-kilodalton antigen on macrophage release of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Infect Immun*. 2002; 70: 6558-6566.

41. Wilfret C, Hotez P. Tuberculosis In: Gershon AA, Hotez PJ, Katz SL. Krugman's Infectious Disease of Children. (Çeviri:Kanra G.) 11th. edition St. Louis Missouri: Mosby. 2006; 731-762.
42. American Academy of Pediatrics. Tuberculosis In: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA (ed). Red Book: Report of the Committee on Infectious diseases. 27th edition. Elk Grove Village. IL: American Academy of Pediatrics. 2006: 678-698.
43. Loudon RG, Romans WE. Cough frequency and infectivity in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1969; 99: 109-111.
44. Özbal Y. Tüberküloz İmmünolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi.* 2006; 28 (1): 25-34.
45. Ferguson JS, Gaynor CD, Schlesinger LS. Mononuclear phagocytes in tuberculosis pathogenesis. *Cur. Op. Inf. Dis.* 1997; 10: 190-195.
46. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 5243-5248.
47. Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun.* 1998; 66: 5314-5321.
48. Stewart GR, Wilkinson KA, Newton SM et al. Effect of Deletion or Overexpression of the 19-Kilodalton Lipoprotein Rv3763 on the Innate Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 2005; 73: 6831-6837.
49. Dannenberg AM. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp Prac. Hospital Practice.* 1993; 15: 51-58.
50. Fairbairn I.P. Macrophage apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32: 496-498.
51. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol.* 2000; 164: 2016-2020.
52. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(24): 12013-12017.

53. Lazarevic V, Flynn J. CD8<sup>+</sup> T cells in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 1116-1121.
54. Karahan ZC, Akar N. Tüberküloza genetik yatkınlık. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 2002; 55 (2): 151-162.
55. Ryu S, Park YK, Bal GH. 3'UTR polymorphisms in the NRAMP1 gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4(6): 577-580.
56. De Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun.* 2005; 73(10): 6711–6720.
57. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- $\gamma$ , yet succumb to tuberculosis. *J Immunol.* 1999; 162: 5407-5416.
58. Chiacchio T, Casetti R, Butera O, Vanini V, Carrara S, Girardi E, Di Mitri D, Battistini L, Martini F, Borsellino G, Goletti D. Characterization of regulatory T cells identified as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> in patients with active tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology.* 2009; 156: 463–470.
59. Barcelos W, Martins-Filho OA, Guimaraes TM, Oliveira MH, Spindola-de-Miranda S, Carvalho BN, Toledo Vde P. Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. *Microbiol Immunol.* 2006; 50(8): 597-605.
60. Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *JEM.* 2007; 204 (9): 2159-2169.
61. Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol.* 2004; 113: 130-136.
62. Shimokata K, Kishimoto H, Tkagi E, Tsunekawa H. Determination of T-cell subsets producing gamma-interferon in tuberculous pleural effusion. *Microbiol Immunol.* 1986; 30: 353-361.
63. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Akciğerler ve Üst Solunum Yolları (Çev: Tel N.). In: *Temel Patoloji* (Çev Ed:Çevikbaş U.). 6th. İstanbul: Elma Basım. 2000; 420-425.
64. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ and et al. Tumour necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity.* 1995; 2: 561-572.

65. Garcia I, Miyazaki Y, Marchal G, Lesslauer W, Vassalli P. High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in the differentiation of protective granulomas. *Eur J Immunol.* 1997; 27: 3182-3190.
66. Rom WN, Gray SM. *Tuberculosis*. 2th edition. Philadelphia. 2004; 21: 285-299.
67. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun.* 1996; 64: 1351-1356.
68. Ruscelli F, Varesio L, Ochoa A, Ortaldo J. Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system. *Ann NY Acad Sci.* 1993; 685: 488-500.
69. Barnes PF, Wize B. Type 1 cytokines and the pathogenesis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161: 1773–1774.
70. Bonecini-Almeida MG, Ho JL, Boechat N and et all. Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis. *Infect Immun.* 2004; 72: 2628-2634.
71. Hirsch CS, Ellner JJ, Blinkhorn R, Toossi Z. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor b. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 3926–3931.
72. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 1995; 155: 2515–2524.
73. Bai X, Wilson S.E, Chmura K, Feldman N.E, Chan E.D. Morphometric analysis of Th1 and Th2 cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis.* 2004; 84: 375–385.
74. Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol.* 2002; 168: 1322–1327.
75. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon-gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993; 178: 2249–2254.

76. Cooper A, Dalton D, Stewart T, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993; 178: 2243–2247.
77. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O’Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC. Impaired Ochs et al. TH17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature.* 2008; 452(7188): 773–776.
78. Marais BJ, Gie RB, Schaaf HS, Beyers N, Donald PR, and Starke HR. Childhood Pulmonary Tuberculosis. Old Wisdom and New Challenges. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2006; 173: 1078–1090.
79. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD41 effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005; 6:1123-1132.
80. Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, Weaver CT. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity.* 2009; 30(1): 92–107.
81. Barnes PF, Modlin RL, Ellner JJ. T-cell responses and cytokines. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control.* Washington, DC: ASM Pres. 1994; 417-435.
82. Horsburgh CR. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in United States. *N Engl J Med.* 2004; 350(20): 2060-2067.
83. Starke JR. Tuberculosis in children. *Current Opinion in Pediatrics.* 1995; 7: 268-277.
84. Pamukçu AU. Çocukluk çağı tüberkülozunda tanı sorunları. *Güncel Pediatri.* 2008; 6: 26-30.
85. Andresen D. Microbiological diagnostic procedures in respiratory infections: mycobacterial infections. *Paediatric Respiratory Reviews.* 2007; 8: 221–230.
86. Kılınç O. Tüberkülin Deri Testi (TDT), Yorumu ve Son Gelişmeler. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı. Samsun. 2003: 203-207.
87. Salman N, Somer A, Uzel N, Keser M, Hatipoğlu N. Enfeksiyon Hastalıkları, Tüberküloz. In: Neyzi O, Ertuğrul T. eds *Pediatri.* 4th edition. Nobel Tıp Kitabevleri. 2010; 616-625.
88. Soysal A, Bakır M. Tüberkülin deri testi. İç: Tüberküloz enfeksiyonunda tanı. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi.* 2007; 1: 27-32.

89. Yüce A. Non Tüberküloz mikobakteri enfeksiyonlarının klinik önemi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyum Kitabı. Samsun. 2003: 154-155.
90. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3: 624-632.
91. Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swinger G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet.* 2005; 365: 130–134.
92. Köksal İ. Tüberkülozda tanı. *Sürekli Tıp Eğit Derg.* 2000; 5-9.
93. Fietta A, Meloni F, Cascina A, Morosini M, Marena C, Troupioti P, Mangiarotti P, Casali L. Comparison of a whole-blood interferon-gamma assay and tuberculin skin testing in patients with active tuberculosis and individuals at high or low risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Infect Control.* 2003; 31: 347–353.
94. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection. United States. *MMWR.* 2005; 54: 49–55.
95. Mazurek GH, Weis SE, Moonan PK, et al. Prospective comparison of tuberculin skin test and two whole blood interferon-gamma release assays in tuberculosis suspects. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 837–845.
96. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, D'Amico, Meccugni B, Meacci M, De Giovanni D, Rumpianesi F, Fabbri LM, Balli F and Richeldi L. Performance of Commercial Blood Tests for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Children and Adolescents. *Pediatrics.* 2009; 123: 419-424.
97. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, Meccugni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 2006; 367: 1328-1334.
98. Harris TG, Dorsinville M, Munsiff, et al. Piloting of QuantiFERON- TB Gold by the New York City Department of Health and Mental Hygiene. Presented at the First Global Symposium on Interferon- $\gamma$  Releasing Assays. Vancouver, Canada. 2007; 21–22.

99. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Eguale T, Ravn P, Andersen P. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 704–706.
100. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24: 529-536.
101. American Thoracic Society Documents/American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: Treatment of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care medicine.* 2003; 167: 603-662.
102. Özçelik U. Çocuklarda Tüberküloz Tedavisi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı. Samsun 2003: 184-186.
103. Camcıoğlu Y. Çocukluk çağı tüberkülozunda tedavi. *Çocuk Enf Derg.* 2007; Özel sayı 1: 18-22.
104. Pediatric Tuberculosis Collaborative Group. Targeted tuberculin skin testing and treatment of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics.* 2004; 114: 1175-1201.
105. Yalçın S. Tüberküloz aşıları. *Katkı Dergisi.* 2006; 28 (5-6): 554-572.
106. Kocoğlu F. Tüberküloz Sorununun Çözümünde Günümüzde Uygulanan Kontrol Yöntemlerinin Etkinliği. In: Kocabaş A. (Ed). *Tüberküloz, Kliniği ve Kontrolü.* Emel Matbaası. Ankara. 1991: 439-443.
107. Losi M, Bossink A, Codecasa L, et al. Use of a T-cell interferon-  $\gamma$  release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Eur Respir J.* 2007; 30: 1173-1179.
108. Özdemir D, Annakkaya AN, Tarhan G, Şencan İ, Cesur S, Balbay O, Güçlü E. Comparison of the Tuberculin Skin Test and the Quantiferon Test for Latent Mycobacterium tuberculosis Infections in Health Care Workers in Turkey. *Jpn. J. Infect.Dis.* 2007; 60: 102-105.
109. Soysal A, Torun T, Efe S, et al. Evaluation of cut-off values of interferon-gamma-based assays in the diagnosis of M. tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008; 12: 50–66.
110. Tsiouris SJ, Coetzee D, Toro PL, et al. Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2844–2850.



111. Detjen AK, Keil T, Roll S, et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007; 45: 322–328.
112. Dominguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvao M, et al. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15: 168–171.
113. Bartu V, Havelkova M, Kopecka E. QuantiFERON-TB Gold in the diagnosis of active tuberculosis. *J Int Med Res*. 2008; 36: 434–437.
114. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol*. 2002; 2: 845-858.
115. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004; 40(5): 1062-1071.
116. Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe A., Romani L. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J. Immunol* 2002; 169(11): 6298-6308.
117. Nancy D. Marin, Sara C. París, Viviana M. Vélez, Carlos A. Rojas, Mauricio Rojas, Luis F. García. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis. *Tuberculosis*. 2010; 90: 252-261.
118. Fieschi C, Dupuis S, Picard C, Casanova JL. Human interleukin-12-interferon-g axis in protective immunity to mycobacteria. In: Kotb M, Calandra T editors. *Cytokines and chemokines in infectious diseases handbook*. Totowa, New Jersey: Humana Pres. 2003; 151-161.
119. Swaminathan S, Gong J, Zhang M, Samten B, Hana LE, Narayanan PR, Barnes PF. Cytokine Production in Children with Tuberculous Infection and Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 1999; 28: 1290–1293.
120. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al. A mutation in the IFN-g receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*. 1996; 335: 1941–1949.
121. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al. IFN-g-receptor deficiency in infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med*. 1996; 335: 1956–1961.
122. Flynn JL, Bloom BR. Role of T1 and T2 cytokines in the response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann NY Acad Sci*. 1996; 795: 137–146.

123. Balkhi MY, Sinha A, Natarajan K. Dominance of CD86, transforming growth factor- $\beta$ 1, and interleukin-10 in Mycobacterium tuberculosis secretory antigen-activated dendritic cells regulates T helper 1 responses to mycobacterial antigens. *J Infect Dis.* 2004; 189: 1598–1609.
124. Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM, Cooper AM. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2002; 169: 6343–6351.
125. Vankayalapati R, Wizek B, Weis SE, Klucar P, Shams H, Samten B, Barnes PF. Serum cytokine concentrations do not parallel Mycobacterium tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 24–28.
126. Jung Y-J, La Course R, Ryan L, North RJ. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice. *Infect Immun.* 2002; 70: 6436–6443.
127. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Iwakura Y. IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiol Immunol.* 2000; 44: 971–979.
128. Crevel R, Karyadi E, Preyters F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RH, Meer JW. Increased production of interleukin 4 by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis.* 2000; 181: 1194-1197.
129. Bush KA, Farmer KM, Walker JS, et al. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 802-805.
130. Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG. Cutting Edge: IFN- $\gamma$  Regulates the Induction and Expansion of IL-17-Producing CD4 T Cells during Mycobacterial Infection. *The Journal of Immunology.* 2006; 177: 1416–1420.
131. Okamoto YY, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol.* 2010; 184(8): 4414-4422.