



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ÇOCUKLUK ÇAĞI TOPLUM KÖKENLİ PNÖMONİLERİNDE
TOLL-LİKE RESEPTÖR 2 VE TOLL-LİKE RESEPTÖR 4'ÜN
BİR BİYOBELİRTEÇ OLARAK TANIDA VE PROGNOZDAKİ
YERİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Özlem NECİPOĞLU

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2022**



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ÇOCUKLUK ÇAĞI TOPLUM KÖKENLİ PNÖMONİLERİNDE
TOLL-LİKE RESEPTÖR 2 VE TOLL-LİKE RESEPTÖR 4'ÜN
BİR BİYOBELİRTEÇ OLARAK TANIDA VE PROGNOZDAKİ
YERİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Özlem NECİPOĞLU

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yasemin ÖZSÜREKÇİ**

**ANKARA
2022**

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın bütün süreci boyunca deneyimlerini ve bilgisini benimle paylaşan, her zaman desteğini hissettiren ve yol gösteren sevgili hocam Doç. Dr. Yasemin Özsürekci'ye teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışma sürecinde bana yol gösteren Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı Öğretim Üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Ceyhan ve Prof. Dr. Ali Bülent Cengiz'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bilgi ve deneyimlerini paylaşarak çocuk hekimi olma yolunda her zaman en doğru yolu gösteren Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalının tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

COVID-19 pandemisi süresince yapmış olduğum tez çalışmamda bana her zaman destek olan, beraber çalışma fırsatı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve yandal araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda ve destekçim olan sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Araş. Gör. Dr. Özlem NECİPOĞLU
Ankara, 2022

ÖZET

Necipoğlu, Ö. Çocukluk çağı toplum kökenli pnömonilerinde toll-like reseptör 2 ve toll-like reseptör 4'ün bir biyobelirteç olarak tanıda ve prognozdeki yerinin belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022. Pnömoni çocuk ölümlerinin en önemli nedenlerinden biri olup hala tanıda ve ciddiyeti belirlemede kullanılabilecek hızlı ve doğru sonuç verebilecek testlerin yetersizliği pnömoni hastalarının takibindeki en önemli problemlerdendir. Hafif ve ağır pnömoni ayırımında bu zamana kadar serum prokalsitonin ve C-reaktif protein gibi klasik biyobelirteçler sıkça kullanılmış olup değerlendirilen belirteçlerden bir diğeri de *toll-like* reseptörlerdir (TLR). TLR-2 ve TLR-4'ün pnömonideki yerinin araştırılması bu zamana kadar hayvan ve erişkin insan çalışmaları ile sınırlı olup bu çalışmanın amacı toplum kökenli pnömoni (TKP) tanısı alan çocuk hastalarda TLR-2, TLR-4, interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- α ve tümör nekrozis faktör (TNF)- α belirteçlerinin tanıda ve prognozdeki yerini belirlemektir. Bu çalışmada 43'ü yatan hasta ve 24'ü ayaktan hasta olmak üzere 67 toplum kökenli pnömoni tanılı çocuk hasta ve 22 sağlıklı çocuk katılımcının serum ve tükürük örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α seviyeleri değerlendirilmiştir. Toplum kökenli pnömoni tanısıyla izlenen hastaların tanı anında alınan tükürük örneklerinde TLR-2'nin $1.16 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ve TLR-4'ün $1.28 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ eşik değeri ile pnömoni olan ve olmayan hastaları ayırdığı gösterilmiştir. Tükürük TLR-2 ve TLR-4 testlerinin sensitivitesi sırasıyla 0.80 ve 0.86 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Yeni Koronavirüs Hastalığı (COVID-19) pnömonisi olan hastalarda yapılan serum çalışmasında TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α düzeylerinin diğer viral pnömonilere göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (her biri için $p<0,05$). COVID-19 pnömonisi olan hastalardan elde edilen serum örneklerinde kontrol grubuna göre IL-6 ve IFN- α değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşüklük saptanmıştır (her biri için $p<0,05$). Viral pnömonisi olan hastaların tükürük örnekleri ve kontrol grubunun tükürük örnekleri karşılaştırıldığında TLR-2, TLR-4, IL-10, TNF- α sitokinlerinin viral pnömonilerde kontrol grubuna göre ekspresyonlarının anlamlı olarak daha fazla olduğu görülmüştür (her biri için $p<0,05$). Yapılan tükürük analizinde TLR-2 ve TLR-4'ün pnömoni tanısında anlamlı belirteçler olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda çalışmamızda, özellikle çocuk hastalar söz konusu olduğunda, hastaneye yatış gerektiren TKP'si olan çocuk hastalardan serum örneği elde etmenin zorluğu göz önünde bulundurulduğunda tükürük gibi kolay ve acısız temin edilebilecek bir materyalin tanıda, özellikle çocuk hastalar söz konusu olduğunda kullanılmasının önemi ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: sitokin; pediatri; alt solunum yolu enfeksiyonu; SARS-CoV-2; hastalık ciddiyeti

ABSTRACT

Necipoglu, O. The role of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 in childhood community-acquired pneumonia. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Thesis in Pediatrics, Ankara, 2022.

Pneumonia is one of the most important causes of death in children and the inadequacy of tests that can provide rapid and accurate results that can still be used in diagnosis and determination of severity is one of the most important problems in the follow-up of pneumonia patients. Classical biomarkers such as serum procalcitonin and C-reactive protein have been used frequently in the differentiation of mild and severe pneumonia, and another of the evaluated markers is toll-like receptors (TLR). The investigation of the place of TLR-2 and TLR-4 in pneumonia has been limited with animal and adult human studies until now; therefore, the aim of this study is to determine the role of TLR-2, TLR-4, interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- α , and tumor necrosis factor (TNF)- α as biomarkers in the diagnosis as well as prognosis in pediatric patients with community-acquired pneumonia (CAP). In this study, TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α and TNF- α levels were evaluated in serum and saliva samples of 67 pediatric patients with CAP (43 inpatients and 24 outpatients) and 22 healthy pediatric control. In saliva samples taken at the time of diagnosis, threshold level of TLR-2 was $1.16 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ and of TLR-4 was $1.28 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ to differentiate patients with and without pneumonia. The sensitivity of salivary TLR-2 and TLR-4 tests were found to be 0.80 and 0.86, respectively. In serum samples, TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α and TNF- α levels were significantly decreased in patients with Novel Coronavirus Disease (COVID-19) as compared with other viruses ($p < 0.05$ in each). In the serum samples of patients with pneumonia due to COVID-19, IL-6 and IFN- α values were found to be significantly lower than the control group ($p < 0.05$ in each). Salivary analyses of TLR-2 and TLR-4 seem beneficial in the diagnosis of pneumonia, particularly in childhood. Considering the difficulty of obtaining serum samples from pediatric patients requiring hospitalization, the importance of using a material such as saliva that can be recovered easily and painlessly has been once demonstrated in the present study.

Key words: cytokine; pediatrics; lower respiratory tract infection; SARS-CoV-2; disease severity

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Pnömoni ve Toplum Kökenli Pnömoni Tanımı	3
2.2. Pnömoni Epidemiyolojisi	3
2.3. Pnömoni Etiyolojisi	3
2.4. Pnömoni Patogenezi	5
2.5. Pnömoni Kliniğinde Semptomlar ve Fizik Muayene Bulguları	9
2.6. Radyolojik Bulgular ve Tanıda Radyolojinin Yeri.....	11
2.6.1. Göğüs Radyografisi.....	11
2.6.2. Akciğer Ultrasonografisi	12
2.7. Pnömoni Tanısında Karşılaşılan Zorluklar.....	13
2.8. Pnömoni Tanısında Kullanılan Laboratuvar Belirteçleri.....	14
2.9. Pnömoni Etkenini Saptamada Kültür ve Diğer Testlerin Yeri	26
2.10. Pnömoni Tanısında Tükürük Örneğinin Yeri.....	28
2.11. Hastaneye Yatış Kararı.....	29
2.12. Ayaktan Tedavi Alan ve Hastane Yatışı Gerektiren Hastalar Arasında Tanıda Kullanılan Araçlardaki Farklılıklar.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Çalışma Grupları.....	33
3.2. Çalışma Metodu.....	34
3.3. Serum Analizi	35
3.4. Tükürük Analizi.....	41

3.5.	Çalışma Verileri.....	43
3.6.	Radyolojik Değerlendirme	43
3.7.	Laboratuvar Yöntemleri	43
3.8.	Araştırmanın Tipi	44
3.9.	Biyoistatistiksel Yöntemler	44
4.	BULGULAR	45
4.1.	Sosyo-demografik Bulgular ve Klinik Özellikler.....	45
4.1.1.	Katılımcıların Yaşı	45
4.1.2.	Katılımcıların Cinsiyeti.....	45
4.1.3.	Hasta Grubunun Öyküdeki Semptomları	47
4.1.4.	Başvurudan Önce Mevcut Enfeksiyon İçin Antibiyotik Kullanımı.....	48
4.1.5.	Semptom Başlangıcından Başvuruya Kadar Geçen Süre	48
4.1.6.	Kronik Hastalık Varlığı.....	48
4.1.7.	Tekrarlayan Akciğer Enfeksiyonu Öyküsü	49
4.1.8.	Öncesinde COVID-19 Enfeksiyonu Geçirme Öyküsü	49
4.1.9.	Mevcut Enfeksiyon Öncesinde COVID-19 Enfeksiyonu Olan Bireyle Temas Öyküsü	49
4.1.10.	Trakeostomi Varlığı	50
4.1.11.	Gastrostomi Varlığı.....	50
4.1.12.	Yoğun Bakım Ünitesine Kabul	50
4.1.13.	Başvuru Anındaki Fizik Muayene Bulguları	50
4.1.14.	İnotrop Tedavi İhtiyacı.....	51
4.1.15.	Solunum Desteği İhtiyacı.....	51
4.1.16.	Taburculuk	51
4.1.17.	Yeniden Başvuru ve Yeniden Hastaneye Yatış İhtiyacı	52
4.2.	Tanıya Yönelik Yapılan Tetkikler	52
4.2.1.	Solunum Yolu Viral Paneli	52
4.2.2.	Solunum Yolu Bakteri Paneli.....	52
4.2.3.	Kan Aerob Kültürü.....	53
4.2.4.	İdrar Aerob Kültürü.....	53
4.2.5.	Dışkı Aerob Kültürü.....	53

4.2.6. Diğer Vücut Sıvılarından ve Kateterden Elde Edilen Kültürler	53
4.3. Radyolojik Bulgular	54
4.3.1. Akciğer Grafileri	54
4.3.2. Toraks Bilgisayarlı Tomografisi	54
4.3.3. Ekokardiyografi.....	54
4.3.4. Elektrokardiyogram.....	55
4.3.5. Ek Görüntülemeler	55
4.4. Etkene Göre Pnömoni Sınıflaması	55
4.5. Serum ve Tükürük Analizleri	55
4.5.1. Yatan ve Ayaktan Takip Edilen Hasta Gruplarında Tam Kan Sayımı ve Akut Faz Reaktanı Değerlerinin İncelenmesi	56
4.5.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında Serum TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TFN- α Seviyelerinin Analizi	58
4.5.3. Viral Pnömoni Olarak Değerlendirilen Hastalarla Etken Tespit Edilemeyen Diğer Pnömoni Hastalarının Serumlarında Bulunan Sitokin ve Reseptör Seviyelerinin Karşılaştırılması	61
4.5.4. COVID-19 Pnömonisi Tanısı Alan Hastalar ile Diğer Virüslerin Neden Olduğu Pnömoni Tanısı ile İzlenen Hastaların Serum Örneklerinde Bakılan Sitokin ve Reseptör Düzeyi Analizleri	63
4.5.5. COVID-19 Pnömonisi Olan Hastalar ile Kontrol Grubu Katılımcılarının Serum Örneklerinde Bakılan Sitokin ve Reseptör Düzeyi Analizleri	66
4.5.6. Pnömonin Ağırlığına Göre Sınıflanan Hasta Gruplarında İncelenen Tükürük Örneklerinde Sitokin ve Reseptör Ölçümlerinin Karşılaştırılması	69
4.5.7. Viral Pnömoni Hastaları ile Etken Tespit Edilemeyen Diğer Pnömoniler Grubuna Dahil Edilen Hastaların	

Tükürük Örneklerindeki Sitokin ve Reseptör Yanıtlarının İncelenmesi	72
4.5.8. Viral Pnömonisi Olan Hastaların ve Kontrol Grubunun Tükürük Örneklerindeki Sitokin ve Reseptör Yanıtlarının İncelenmesi	74
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇLAR	90
7. KAYNAKLAR.....	92
8. EKLER	111
Ek-1. Veri Toplama Formu	111



SİMGE VE KISALTMALAR

A2M	: Alfa-2 makroglobulin
AAV	: Rekombinant adeno-iliskili virüs
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACE-2	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
AdV	: Adenovirüs
ALI	: Akut akciğer hasarı
ANS	: Absolu nötrofil sayısı
AP-1	: Aktivatör protein-1
ARDS	: Akut solunum sıkıntısı sendromu
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
BTS	: İngiliz Toraks Derneği
COVID-19	: 2019 Koronavirüs hastalığı
<i>C. pneumoniae</i>	: <i>Chlamydia pneumoniae</i>
CRP	: C-reaktif protein
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
HBV	: Hepatit B virüsü
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
<i>H.influenza</i>	: <i>Haemophilus influenza</i>
hMPV	: İnsan metapnömovirüsü
HRV	: İnsan rinovirüsü
IDSA	: Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IP-10	: IFN γ -indükleyici protein-10
IRF	: İnterferon düzenleyici faktör
KOAH	: Kronik obstruktif akciğer hastalığı
<i>K. pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>

LFA	: <i>Lateral flow assay</i>
LPS	: Lipopolisakkarit
LRR	: Lösin bakımından zengin tekrar alanları
MARCO	: Kolajen yapılı makrofaj reseptörü
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
MIP-1β	: Makrofaj inflamatuvar protein-1 β
MIS-C	: COVID-19 ilişkili Multisistem İnflamatuvar Sendrom
<i>M. pneumoniae</i>	: <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MPV	: Ortalama trombosit hacmi
MyD88	: Miyeloid farklılaşması birincil yanıt proteini 88
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NK	: Doğal öldürücü
NLR	: Nötrofil-lenfosit oranı
NOD1	: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 1
OxPL	: Okside fosfolipid
PAAG	: Posteroanterior akciğer grafisi
PAMP	: Patojen ilişkili moleküler patern
PBMC	: Periferik kan mononükleer hücreleri
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PCT	: Prokalsitonin
PIDS	: Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
PRR	: Patern tanıma reseptörü
ROC	: <i>Receiver-operating characteristic</i>
RSV	: Solunum sinsityal virüsü
PUAT	: Pnömonokok idrar antijen testi
SAP	: Serum amiloid protein
SARS-CoV-2	: Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
sNS1	: Çözünür yapısal olmayan protein-1
<i>S. pneumoniae</i>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>

S protein	: <i>Spike</i> protein
<i>S. pyogenes</i>	: <i>Streptococcus pyogenes</i>
SpO2	: Periferik oksijen satürasyonu
TB	: Tüberküloz
TF	: Transkripsiyon faktörü
Th1	: Tip 1 yardımcı T
Th2	: Tip 2 yardımcı T
TIR	: Toll/İnterlökin-1 reseptör direnci
TRAM	: TRIF ilişkili adaptör molekülü
TIRAP	: TIR bölgesi içeren adaptör molekül
TRIF	: TIR alanı içeren adaptör indükleyici interferon- β
TKP	: Toplum kökenli pnömoni
TLR	: <i>Toll-like</i> reseptör
TNF	: Tümör nekrozis faktör
US	: Ultrasonografi
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
WBC	: Beyaz kan hücresi

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 3.1.	Hastalar ve sağlıklı katılımcılardan elde edilen serum ve tükürük örneklerinin çalışmaya dahil edilme süreci ve çalışmaya dahil edilen örnek sayıları	35
Şekil 4.1.	Viral pnömonilerde etken olarak tespit edilen virüslerin dağılımı	61
Şekil 4.2.	COVID-19 pnömonisi olan hastalar ve diğer viral pnömoni hastalarının serum örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.	65
Şekil 4.3.	COVID-19 pnömonisi olan hastalar ile kontrol grubu katılımcılarının serum örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α düzeylerinin analizi.	68
Şekil 4.4.	Hasta ve kontrol gruplarının tükürük analizlerinde bakılan TLR-2 ve TLR-4 ROC analizi.	72
Şekil 4.5.	Viral pnömonisi olan (COVID-19 harici) hastalar ve kontrol grubu arasında tükürük örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.	76

TABLolar

Sayfa No

Tablo 2.1.	Toplum kökenli pnömoni etkenlerinin yaş gruplarına göre dağılımı	5
Tablo 2.2.	Çocuk hastalarda rehberler doğrultusunda belirlenen ağır pnömoni kriterleri.....	30
Tablo 3.1.	IL-1 β için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri	37
Tablo 3.2.	IL-4 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri	37
Tablo 3.3.	IL-6 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri	38
Tablo 3.4.	IL-10 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri	38
Tablo 3.5.	TLR-2 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri	39
Tablo 3.6.	TLR-4 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri	39
Tablo 3.7.	IFN- α için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri	40
Tablo 3.8.	TNF- α için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri	40
Tablo 3.9.	Transkriptaz işlemi için gereken bileşenler ve miktarları	41
Tablo 3.10.	PCR işlemi için soğuk blok üzerinde hazırlanan bileşenler.....	42
Tablo 3.11.	PCR işlemi için <i>thermocycler</i> prosedürü	42
Tablo 3.12.	PCR işlemi için kullanılan primer setleri	42
Tablo 4.1.	Sosyo-demografik bulgular ve klinik özellikler.....	46
Tablo 4.2.	Yatan-ayaktan hasta grubu ve kontrol grubu için değerlendirilen serum parametreleri	60

Tablo 4.3.	Viral pnömoniler ve diğer pnömoniler (etken tespit edilemeyen) için serum TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeyleri.....	63
Tablo 4.4.	Yatan-ayaktan hasta grubu ve kontrol grubunun tükürük örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeyleri.....	71
Tablo 4.5.	Viral pnömoniler (COVID-19 harici) ve diğer pnömoniler (etken tespit edilemeyen) için tükürük örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması	74



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pnömoniler her yıl özellikle beş yaş altı çocuklarda milyonlarca ölüme neden olmaktadır. Pnömoninin çocuk ölümleri arasındaki yeri ve önemi giderek artmaktadır. Pnömoni kliniği hastanın yaşı, eşlik eden hastalıkları ve etkenin cinsi ile ilişkilidir. Pnömoni patogenezinde yer alan inflamatuvar yanıtta rol oynayan bazı etkenler bize hastalığın morbiditesi ve inflamasyonun yoğunluğu hakkında bazı ipuçları vermektedir. Pnömoni nedeniyle tedavi alan çocuklarda inflamasyon süreçleri ile ilişkili olabilecek sitokin gibi birçok biyobelirteç ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Hafif ve ağır pnömoni ayırımında bu zamana kadar serum prokalsitonin (PCT) ve C-reaktif protein (CRP) gibi klasik biyobelirteçler sıkça kullanılmıştır. Ayrıca şimdiye kadar pnömonilerde etken olarak bakteri veya virüs ayırımı yapabilmek için beyaz küre sayısı, nötrofil ve lenfosit sayıları, PCT ve CRP gibi birçok belirteç kullanılmış ancak hiçbirisi bu ayırımıda yol gösterici olmamıştır.

Literatür detaylı olarak gözden geçirildiğinde *toll-like* reseptörlerin (TLR'lerin) literatürde birçok hayvan deneyinde çalışıldığı ancak insan çalışmalarının özellikle de çocuklar üzerinde yapılan çalışmaların çok az olduğu tespit edilmiştir. Çocuklarda toplum kökenli pnömoniler ile ilgili verilerimiz giderek artsa da çocukluk çağında hem tanıda hem tedavide birçok bilgi açığımız mevcuttur. Çocuklarda rol oynayan etkeni belirlemek erişkin hastalara göre daha zordur. Alt solunum yolu sekresyonlarını çocuklarda inceleme ve değerlendirmenin daha zor olması ve invazif tanı yöntemlerinden kaçınılması bu zorluğu açıklayabilmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda TLR'lerin yeri tartışılmaktadır. Literatürdeki çalışmalar ışığında sitokin ve kemokinler ile TLR'lerin pnömoni hastalığının tanısında veya prognozunu öngörmeye kullanılabileceği fikri oluşmuştur. Bu çalışma ile hastalarda çalışmayı planladığımız biyobelirteçlerin ayaktan tedavi alan hastalar ile hastaneye yatış gerektiren hastalar arasında farklı olup olmadığının ve klinik ile ne kadar korele olduğunun gösterilmesi planlanmıştır. Bu doğrultuda pnömoni tanısı alan çocuklarda TLR-2 ve TLR-4 ile interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)-alfa ve tümör nekrozis faktör (TNF)-alfa gibi bazı sitokinlerin tükürük ve serumdaki düzeylerinin ve birbirleri ile ilişkilerinin

belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda ayakta tedavi alan hastalar ile hastaneye yatış gerektiren hastalar arasında TLR-2 ve TLR-4 ile IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α biyobelirteçlerinin farklı olup olmadığının ve klinik ile ne kadar korele olduğunun gösterilmesi planlanmıştır. Etken gösterilebilen hastalarda viral veya bakteriyel pnömoni ayrımı yapıp yapılamayacağı ve düzeyler ile hastalık ciddiyetinin anlaşılıp anlaşılamayacağının da araştırılması hedeflenmiştir.

Özetle bu çalışma ile; toplum kaynaklı pnömonisi olan çocuk hastaların TLR ve sitokin cevaplarıyla hastalık şiddetleri arasındaki ilişkinin anlaşılması, bulgular eşliğinde bazı patogenetik süreçlerin anlaşılabilmesi ve bu yolla olası etkenin bakteri ve virüs olarak ayırımında bazı ipuçları elde edilmesi, veriler eşliğinde izlemde ve tedavide odaklanılacak alanların belirlenerek morbidite ve mortalitenin azaltılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pnömoni ve Toplum Kökenli Pnömoni Tanımı

Pnömoni, bakteriyel ya da viral ajanlar sebebi ile akciğer parankiminde oluşan inflamasyondur (1). Toplum kökenli pnömoni (TKP), özellikle hastane ortamı dışında edinilen pnömoninin klinik belirti ve semptomlarını ifade eder (2).

2.2. Pnömoni Epidemiyolojisi

Pnömoni, dünya çapında çocuklarda en büyük bulaşıcı ölüm nedenidir. 2017 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 5 yaş altı 808.694 çocuk ölümü pnömoni nedeni ile olmuştur ve beş yaşın altındaki tüm ölümlerin %15'ini oluşturmuştur (3). İngiliz Toraks Derneğinin (BTS) 2017 yılı Ulusal Pediatri Toplum Kökenli Pnömoni Denetim Özet Raporu'na göre cinsiyet dağılımı yıllar içinde sabit kalmıştır ve %52'si erkektir. Ortanca yaş 2 yıl ve ortalama 3,6 yıl olarak saptanmıştır. Ek olarak daha genç yaş grubuna doğru bir kayma saptanmış olup hastaların %52'sinin 3 yaşın altında ve %76'sının 5 yaşın altında olduğu görülmüştür (4).

2.3. Pnömoni Etiyolojisi

Streptococcus pneumoniae (*S.pneumoniae*), çocuklarda pnömoninin en yaygın bakteriyel nedenidir ve bunu *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Chlamydia pneumoniae* (*C.pneumoniae*) ve *Mycoplasma pneumoniae* (*M.pneumoniae*) izlemektedir. Yaş olarak değerlendirildiğinde *S.pneumoniae* 3 ila 4 yaş arası çocuklarda en sık görülen bakteriyel patojen iken, *M. pneumoniae* ve *C. pneumoniae* 5 yaş ve üzeri çocuklarda en sık görülen bakteriyel patojenlerdir (5). Pnömonokoklara ek olarak, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) önceden sağlıklı olan çocuklarda pnömoninin diğer bakteriyel nedenleri arasında A grubu streptokok ve *S. aureus* bulunur (5). Ancak aşılamlar bu epidemiyolojiyi değiştirmiş olup *H. influenzae* veya *S.pneumoniae*'nin

neden olduğu pnömoni insidansı, rutin bağışıklamanın uygulandığı alanlarda önemli ölçüde azalmıştır (5).

Viral patojenler, bir aylıktan büyük ancak beş yaşından küçük bebeklerde ve çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonlarının en sık nedenidir. Respiratuar sinsityal virüsü (RSV) ve insan rinovirüsü (HRV), özellikle iki yaşından küçük çocuklarda en sık tanımlanan patojenlerdir (1, 5). Bununla birlikte, rinovirüslerin ciddi alt solunum yolu enfeksiyonundaki rolü, bu virüsler sıklıkla birlikte enfekte olan patojenlerle ve asemptomatik çocuklar arasında tespit edildiğinden belirsizliğini korumaktadır. Pnömoniye neden olan diğer yaygın virüsler arasında influenza virüsleri, insan metapnömovirüsü (hMPV), parainfluenza virüsleri, adenovirüsler (AdV) ve enterovirüsler bulunur. Vakaların %20 kadarında birden fazla solunum yolu virüsü ile enfeksiyon oluşabilmektedir (5).

2019 Koronavirüs hastalığının (COVID-19) nedeni olan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) tüm dünyada milyonlarca kişiyi enfekte eden viral bir hastalığı temsil eder ve uluslararası endişe yaratan büyük bir halk sağlığı acil durumu olarak ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, 11 Mart 2020'de DSÖ, yaygın bulaşıcılık ve yüksek bulaşma oranları nedeniyle COVID-19'u pandemik bir hastalık ilan etmiştir (6). Küresel olarak, 1 Nisan 2022 itibarıyla, DSÖ'ye bildirilen 6.142.735 ölüm dahil 486.761.597 onaylanmış COVID-19 vakası olmuştur (7).

Jain ve ark.'nın yaptığı TKP'ye yönelik bir çalışmada hastaneye yatış yükünün beş yaşından küçük çocuklar arasında en yüksek olduğu gösterilmiştir. Pnömonili çocukların %81'inde bir patojen tespit edilmiş; viral ve bakteriyel patojenler sırasıyla çocukların %73'ünde ve %15'inde bulunmuştur. Patojen birlikte saptanma oranı %26 olarak görülmüştür. Bu çalışma ayrıca viral pnömoninin 2 yaşından küçük çocuklarda büyük çocuklara göre daha yaygın olduğunu, buna karşın mikoplazmanın 5 yaşından büyük çocuklarda (%19) daha küçük çocuklara (%3) göre daha yaygın olduğunu belirtmektedir. En sık saptanan patojenler RSV (%28), HRV (%27), hMPV (%13), AdV (%11), *M. pneumoniae* (%8), PIV (%7), influenza (%7), CoV (%5), *S. pneumoniae* (%4), *S. aureus* (%1) ve *S. pyogenes* (<%1), RSV (%37'ye karşı %8), AdV (%15'e karşı %3) ve hMPV (%15'e karşı %8) daha büyük çocuklara kıyasla 5 yaşından küçük çocuklarda daha sık saptanmıştır. *M. pneumoniae* (%19'a

karşı %3) daha yaygın olarak küçük çocuklara kıyasla beş yaş ve üzeri yaş grubundaki çocuklarda tespit edilmiştir (8).

Tablo 2.1. Toplum kökenli pnömoni etkenlerinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grubu	Sık Etkenler (Sıklığa göre sıralı)
3 haftadan küçük olanlar	B Grubu streptokoklar, <i>Escherichia coli</i> , diğer gram-negatif basiller, <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> (tip b,* tiplendirilemeyen)
3 hafta-3 ay arası	Solunum sinsityal virüsü, diğer solunum virüsleri (rinovirüsler, parainfluenza virüsleri, influenza virüsleri, insan metapnömovirüsü, adenovirüs), <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> (tip b,* tiplendirilemeyen); hasta ateşsizse <i>Chlamydia trachomatis</i>
4 ay-4 yaş arası	Solunum sinsityal virüsü, diğer solunum yolu virüsleri (rinovirüsler, parainfluenza virüsleri, influenza virüsleri, insan metapnömovirüsü, adenovirüs), <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> (tip b,* tiplendirilemez), <i>M. pneumoniae</i> , grup A streptokok
5 yaş ve üzeri	<i>M. pneumoniae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> (tip b,* tiplendirilemeyen), influenza virüsleri, adenovirüs, diğer solunum virüsleri, <i>Legionella pneumophila</i>

*Rutin aşılama programları ile *H. influenzae* tip b artık günümüzde yaygın değildir (5).

2.4. Pnömoni Patogenezi

Alt solunum yolu, mukosilyer klirens, makrofajlar ve sekretuar immünoglobulin A ve solunum yollarının öksürük ile temizlenmesi dahil olmak üzere enfeksiyona karşı bir dizi savunma mekanizmasına sahiptir. Önceleri yapılan kültür temelli çalışmalarla alt solunum yolunun bu mekanizmalar tarafından steril tutulduğuna inanılıyordu. Bununla birlikte, kültürden bağımsız tekniklerin kullanılmasıyla, alt solunum yollarının çeşitli mikrobiyal topluluklar içerdiği gösterilmiştir. Bu veriler, pnömoninin steril alt solunum yolunun tek bir patojen tarafından infestasyonu olduğunu savunan geleneksel pnömoni patogenezi modelini çürütmüştür. Daha yeni kavramsal modeller, pnömoninin potansiyel pnömoni patojenleri, yerleşik mikrobiyal ajanlar ve konak immün savunmaları arasındaki dinamik etkileşimleri barındıran ve bu denli karmaşık olan alt solunum sistemi ekosistemindeki dengenin bozulmasından kaynaklandığını varsaymaktadır (5).

Viral ajanlar alt solunum yoluna girdikten sonra çoğalır ve solunum yolunun alt veya daha uzak kısımlarını içerecek şekilde yayılır. Enfekte epitel siliyer fonksiyonunu kaybeder, yaralanmanın bir sonucu olarak toplanır ve ardından mukus stazı, hücresel ve inflamatuvar yanıtların birikimi ile hava yollarına doğru ilerleme meydana gelir. Enfeksiyon terminal hava yollarına uzandığında, alveolleri döşeyen hücreler yapısal bütünlüğünü ve işlevini kaybeder. Bunun sonucunda sürfaktan üretimi kaybolabilir, hiyalin membranlar oluşabilir ve pulmoner ödem gelişebilir. Mononükleer hücreler submukozal ve interstisyel yapılara sızarak doku ödemine, hava yollarının daralmasına ve alveolar-kılcal gaz alışverişinde olan bloklara katkıda bulunur. Belirli patojenlerle, özellikle RSV ile, biriken hava yolu hasarı bağlamında bronşiyolar spazm, her inspirasyonda küresel valf aracılı hava hapsine yol açarak hiperinflasyona neden olur. Bir hava yolunun tarafından mukus tarafından tamamen tıkanması, distal atelektazi ile sonuçlanabilir. Ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğu, alveolar ödemden kaynaklanan hipoksemiye neden olabilir (1). Küçük bebeklerde hava yollarının küçük çaplı olması, bu hastaları özellikle ciddi enfeksiyona karşı duyarlı hale getirir. Hava yolu obstrüksiyonuna sıklıkla ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğundan kaynaklanan atelektazi, interstisyel ödem ve hipoksemi eşlik eder. Solunum yollarının viral enfeksiyonu, normal konak savunma mekanizmalarını bozarak, sekresyonları değiştirerek ve solunum mikrobiyotasındaki bozulmalar yoluyla ikincil bakteriyel enfeksiyona da zemin hazırlayabilir (5).

Viral pulmoner enfeksiyonlar bronşiolit, interstisyel pnömoni ve parankimal enfeksiyon olmak üzere üç patolojik pattern izler. İlk iki patern genellikle birbiriyle örtüşür. Viral pnömoni, akciğerlerin interstisyum ve parankiminin lenfositik infiltrasyonu ve hava yolu lümeninin nötrofilik infiltrasyonu ile karakterizedir. Küçük hava yolları tıkanıldığında veya oblitere olduğunda ve kalınlaşmış septa oksijen difüzyonunu engellediğinde, ventilasyon-perfüzyon oranında bozukluklarla hava hapsi oluşur. Bronşiyal veya bronşiyol epitelinin nekrozu şiddetli, bazen ölümcül viral enfeksiyonlarda ortaya çıkabilir (9).

Viral patolojinin histopatolojik tanımları arasında akut bronşiolit, nekrotizan bronşiolit, interstisyel pnömoni, alveolar pnömoni ve hemorajik bronkopnömoni yer alabilir. Akut bronşiolit, submukozal dokularda eşlik eden mononükleer infiltrasyon ile birlikte siliyer solunum epitelinin nispeten yüzeysel ve geri dönüşümlü yıkımı ile

karakterizedir. Nekrotizan bronşiolit, solunum yolunu kaplayan daha derin submukozal tabakalara uzanır ve kolayca geri dönüşümlü olmayabilir. Bu yıkıcı patoloji özellikle adenoviral pnömoni ile ilişkilidir (1, 10). Hem viral replikasyon hem de yaşa özgü bağışıklık yanıtları, bebeklerde RSV hastalığının şiddetine katkıda bulunur. Bebeklerde RSV'nin ciddiyetinin, güçlü bir doğal bağışıklık yanıtı ve viral replikasyona karşı yetersiz adaptif bağışıklık yanıtı ve solunum yolu epitelinin hasarı ile ilişkili olduğu görülmektedir. RSV enfeksiyonu, hava yolu epitel hücrelerinin ve fagositik hücrelerin uyarılmasından sonra hem kemokinler hem de sitokinler yoluyla karmaşık bir doğal inflamasyon sürecini başlatır (1, 11, 12).

Çocuklarda bakteriyel olmayan pnömoninin patolojik cevabını etkileyen üç önemli faktör; anatominin farklılığı, kronik akciğer hastalığı varlığı ve bağışıklık yanıtıdır. Küçük bebeklerde, terminal hava yollarının küçük kalibresi ve alveolar boşluklar arasındaki ara bağlantıların (Kohn gözenekleri) olmaması, hırıltı ve lobüler atelektazi gelişimine katkıda bulunur. Önceden var olan akciğer hastalığı (örn. bronkopulmoner displazi) ve enfeksiyon tarafından tetiklenen aşırı salgıların temizlenememesi de bronkospazm, atelektazi ve solunum yetmezliğine yol açabilir (1).

Bakteriyel pnömoninin patogenezindeki en önemli faktörler; patojenin virülansı, spesifik humoral bağışıklığın olmaması ve önceki viral solunum yolu enfeksiyonunun varlığıdır. Çoğu bakteriyel pnömoni, nazofarenks kolonizasyonunun bir sonucudur, bunu bakteriyemi veya organizmaların aspirasyonu izler. Hava yollarında biriken organizmaların siliyer epitel ile mukus tarafından yakalanması ve uzaklaştırılması, bakterilerin alveolar makrofajlar tarafından öldürülmesi, kan dolaşımı yoluyla akciğere erişim sağlayan organizmalar için retiküloendotelial sistemin fonksiyonları, invazyon yapan bakterilerin lokal ve sistemik olarak spesifik olmayan doğal ya da spesifik bağışıklık yanıtları ile nötralize edilmesi, invaze organizmaların lenfatik drenaj ile uzaklaştırılması gibi çeşitli mekanizmalarla akciğerler bakteriyel enfeksiyondan korunur. Pulmoner enfeksiyon, bu mekanizmaların bir veya daha fazlası değiştirildiğinde veya engellendiğinde ortaya çıkabilir (1).

Akciğer parankiminde bakteriyel enfeksiyon oluştuğunda, patolojik süreç istilacı organizmaya göre değişir. *M.pneumoniae* solunum epiteline tutunur, siliyer

hareketi inhibe eder ve submukozada hücresel yıkıma ve inflamatuvar yanıtı yol açar. Enfeksiyon ilerledikçe, dökülen hücresel kalıntılar, inflamatuvar hücreler ve mukus, viral pnömonide görüldüğü gibi enfeksiyonun bronş ağacı boyunca yayılmasıyla solunum yolu obstruksiyonuna neden olur. *S.pneumoniae* organizmaların çoğalmasına ve akciğerin komşu bölümlerine yayılmasına yardımcı olan lokal ödem oluşumuna sebep olur ve sıklıkla karakteristik fokal lobar tutulum ile sonuçlanır. Grup A streptokok alt solunum yolu enfeksiyonu tipik olarak interstisyel pnömoni ve daha yaygın akciğer tutulumu ile sonuçlanır (5).

Bakteriyel pnömoni beş patolojik paterni izleyebilir: Bir lobun veya lobun bir bölümünün parankimal enfeksiyonu, enflamasyonu ve konsolidasyonu (lobar pnömoni, klasik *S.pneumoniae* paterni; hava yollarının ve çevreleyen interstisyumun birincil enfeksiyonu (sıklıkla *S.pyogenes* ve *S. aureus*'a bağlı bronkopnömoni); anaerobların aspirasyonundan sonra veya belirli *S. aureus* veya *S. pneumoniae* ile ortaya çıkan nekrotizan parankimal pnömoni; *M. tuberculosis* ve viral pnömoni bakteriyel enfeksiyonla komplike olduğunda ortaya çıkabilen ikincil parankimal infiltrasyonlu peribronşiyal ve interstisyel hastalık. Bakteriyel pnömonide, hava boşlukları transüdal ve nötrofilik eksüdalarla dolar ve oksijen difüzyonunu bozar. Enfekte alveollerin zengin pulmoner vasküler yatağa yakınlığı bakteriyemi, septisemi veya şok riskini artırır (9).

Hayvan modelleri, akciğerdeki inflamatuvar yanıtların, peptidoglikanlar, gram-pozitif organizmaların lipoteikoik asitleri ve gram-negatif bakterilerin lipopolisakaritleri (endotoksin) dahil olmak üzere çeşitli bakteri hücre duvarı bileşenlerinden kaynaklanabileceğini belgelemektedir. Bakteriyel bileşenler, kısmen model tanıma reseptörlerinin (en belirgin olarak TLR'ler) aktivasyonu ile başlatılan derin bir doğuştan gelen inflamatuvar yanıt, ardından da sitokinler ve kemokinlerin aracılık ettiği yoğun bir inflamatuvar kaskad uyarılmakta ve çoklu hücre içi yollara ek olarak hücre yüzeyi adezyon moleküllerinin regülasyonu ile sonuçlanmaktadır (1, 13, 14).

2.5. Pnömoni Kliniğinde Semptomlar ve Fizik Muayene Bulguları

Pnömonili çocuklar en sık ateş ve takipne ile başvururlar. Pnömoniden genellikle birkaç gün önce üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları, tipik olarak rinit ve öksürük gelir (5, 9). Nadir de olsa ateş ve hızlı nefes alma, bazı çocuklarda öksürüğün başlangıcından önce gelebilir (9). Diğer belirti ve semptomlar arasında dispne, retraksiyonlar, homurdanma, hipoksemi, karın ağrısı, letarji, akciğer alanlarının oskültasyonunda solunum seslerinde azalma veya hırıltı yer alır (15, 16). Pnömokokal pnömonili erişkinlerde tanımlanan semptomlar daha büyük çocuklarda görülebilir ancak klinik paterninin çok daha değişken olduğu bebeklerde ve küçük çocuklarda nadiren gözlenir. Daha büyük çocuklar plöritik göğüs ağrısından veya ense sertliğinden şikâyet edebilir. Birçok çocuk, plöritik ağrıyı en aza indirmek ve ventilasyonu iyileştirmek için etkilenen tarafa doğru dizlerin göğüse doğru çekili olduğu bir pozisyonda yatabilirler (5). Bebekler sadece yetersiz beslenme ve artan huzursuzluk gibi semptomlar gösterebilir. Özetle genel olarak akut başlangıçlı ateş, hızlı nefes alma (takipne) ve öksürük klasiktir (9).

Solunum sıkıntısı belirtileri arasında takipne, taşikardi, hipoksemi (oksijen doygunluğu $<92\%$), apne, solunum işinin artması (subkostal, interkostal veya suprasternal çekilmeler; nazal genişleme veya homurdanma) veya değişmiş zihinsel durum yer alır (16). Gelişmekte olan ülkelerde pnömoninin klinik teşhisi için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından geliştirilen kılavuzlar, takipne ve retraksiyonları alt solunum yolu enfeksiyonlarının en iyi iki göstergesi olarak vurgulamaktadır (17).

Takipnenin pnömoni kliniğinde en tutarlı belirti olduğu kabul edilir (5). Takipne, 2 aylıktan küçük hastalarda >60 solunum/dk, 2-12 aylık bebeklerde >50 solunum/dk, 1-5 yaş arası bebeklerde >40 solunum/dk ve 5 yaşından büyük çocuklarda >20 solunum/dk olarak tanımlanır (1). Takipne, ateş, astım, kalp hastalığı ve metabolik asidoz gibi diğer durumlarla birlikte ortaya çıkabilir. Pnömoni için klinik bulguların öngörücü değerleri defalarca incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada, solunum hızı >50 solunum/dk, oksijen saturasyonu $<96\%$ ve 12 aylıktan küçük çocuklarda burun kanadı solunumu varlığının radyografik olarak doğrulanmış pnömoni ile yüksek oranda ilişkili olduğu görülmüştür (9). Boston'da yapılan bir çalışmada bir pediatrik acil serviste olası pnömoni nedeniyle göğüs radyografisi

uygulanan 5 yaşından küçük çocuklar arasında, akciğer radyografisi ile belgelenmiş pnömonisi olanların solunum hızları, göğüs radyografileri normal olanlardan istatistiksel olarak daha yüksek bulunmamıştır (18). Bununla birlikte, gelişmekte olan ülkelerde, şiddetli pnömonisi olan çocuklarda özellikle antimikrobiyal tedavinin 24. saatinde hala devam eden yüksek solunum hızı klinik tedavi başarısızlığı ile ilişkilendirilmiştir (19).

Pnömoni kliniğinde tanı için duyarlı ve spesifik olmasa da puls oksimetresi, doğrulama amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Hipoksemi, alt solunum yolu enfeksiyonu olan hem yetişkinlerde hem de çocuklarda kötü sonuçlar için bir risk faktörüdür (1). Puls oksimetre klinik değerlendirme ile birlikte kullanılmasına rağmen, periferik oksijen saturasyonu (SpO₂) oda havasında %90'ın altında olan bir çocuğun hastaneye yatırılması için önerilerde bulunulmuştur (16). Orta ile şiddetli pnömonide oksijen saturasyonu sıklıkla azalmakta ve hastaneye yatış için bir gösterge olmaktadır (2, 16). Solunum sıkıntısı olan her çocukta oksijen saturasyonu ve solunum hızı ölçülmelidir. Ancak solunum hızı ya da siyanoz, hipoksinin duyarlı veya spesifik bir göstergesi değildir. Hipoksemi, yardımcı solunum kaslarının kullanımı, kafa sallama, burun kanadı solunumu ve inleme pnömoniyi öngörse de, bunların yokluğu pnömoniyi dışlamaz (9). Spesifik SpO₂ tabanlı önerileri destekleyecek bilimsel verilerin eksikliği göz önüne alındığında, bazı uygulama farklılıklarının mevcut olduğu anlaşılabılır (1).

Fiziksel bulgular pnömoninin evresine bağlıdır. Hastalığın erken döneminde, etkilenen akciğer alanında yaygın olarak azalan nefes sesleri, dağınık raller ve ronküsler duyulur. Dehidrate bir hastada ral olmayabilir (9). Artan konsolidasyon veya plevral efüzyon veya ampiyem gibi pnömoni komplikasyonlarının gelişmesiyle, perküsyonda matite ortaya çıkabilir ve solunum sesleri azalabilir. Azalmış ve bronşiyal solunum sesleri, egofoni, bronkofoni, taktıl fremitus ve perküsyonda matite akciğer konsolidasyonunun spesifik belirtileridir (9). Oskültasyon, özellikle küçük bebeklerde, takipne derecesiyle orantısız yetersiz bulgularla yanıltıcı olabilir (5). Abdominal distansiyon, yutulan hava veya ileustan kaynaklanan gastrik dilatasyon nedeniyle belirgin olabilir. Karın ağrısı, alt lob pnömonisinde yaygındır. Akciğerlerin aşırı ödemli olmasına veya konjestif kalp yetmezliğine

bağlı diyaframın aşağı doğru yer değiştirmesi nedeniyle muayenede karaciğer büyümüş olarak değerlendirilebilir (5).

Viral pnömonide ateş genellikle mevcuttur, ancak ölçülen değerler genellikle bakteriyel pnömoniden daha düşüktür. Takipne, interkostal, subkostal ve suprasternal retraksiyonların eşlik ettiği artan solunum işi, nazal genişleme ve aksesuar kasların kullanımı yaygındır. Şiddetli enfeksiyona özellikle bebeklerde siyanoz ve halsizlik eşlik edebilir. Viral pnömoniye (özellikle adenovirüs) klinik olarak mikoplazma ve diğer bakteriyel patojenlerin neden olduğu hastalıklardan ayırt etmek çoğu zaman mümkün değildir. Bakteriyel pnömoni bazı bebeklerde kusma, anoreksi, diyare ve paralitik ileusa sekonder abdominal distansiyon ile karakterize gastrointestinal rahatsızlıklar olabilir. Semptomların hızlı ilerlemesi, en şiddetli bakteriyel pnömoni vakalarında karakteristiktir (5).

2.6. Radyolojik Bulgular ve Tanıda Radyolojinin Yeri

2.6.1. Göğüs Radyografisi

Solunum semptomları ve bulguları olan bir hastada pnömoni olup olmadığını belirlemek için sıklıkla göğüs radyografisi kullanılmaktadır. Ancak pnömoni açısından bir göğüs radyografisinin doğru yorumlanmasının birçok zorluğu vardır. Bunlardan birkaçı bakteriyel ve bakteriyel olmayan nedeni ayırt etmede duyarsızlık, pnömoni seyrinin erken döneminde muayene edilen çocuklarda veya dehidrate hastalarda yanlış negatif yorumlanması, anormal bulguların radyolojiye yansımalarının gecikmeli olması, hekimler tarafından yapılan değerlendirmelerdeki tutarsızlıklardır (9).

Radyografik olarak doğrulanmış pnömonisi olan çocukların neredeyse dörtte üçü hasta görünümündedir. Bu bulguların çoğu diğer akut alt solunum yolu hastalıklarıyla (örneğin astım ve viral bronşiolit) örtüşür, bu sebeple pnömonili çocukları yalnızca klinik belirti ve semptomlara dayanarak tanımlamak bazen zordur. Sonuç olarak, tanıyı doğrulamak için göğüs radyografileri yaygın olarak kullanılmaktadır. Göğüs radyografisi bir infiltratı ortaya çıkarsa bile, pnömoniye temsil eden konsolidasyon ile astımlı veya bronşiyolitli çocuklarda yaygın olarak

görülen atelektaziyi ayırt etmek bazen zordur (15, 16). Böylece göğüs radyografisinin yorumlanmasında farklılıklar yaygın olarak karşımıza çıkar ve bu durum da antibiyotik kullanımının çok yaygın olmasının sebeplerinden biridir. Bu nedenle Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (PIDS) ve Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) tarafından geliştirilen kılavuz, komplike olmayan pnömoni şüphesi olan çocuklarda ayakta tedavi ortamında göğüs radyografilerinin kullanılmasını önermemektedir (16).

Hipoksemisi olmayan ve ayaktan tedavi alan çocuklarda anamnez ve fizik muayene çoğu zaman pnömoni belirti ve semptomlarını belirlemek için yeterlidir. Bu hastalarda ilk başvuruda göğüs radyografisi ile doğrulama gerekli değildir (1). Bununla birlikte hastane yatışı gereken pnömonili çocuklar için mutlaka infiltrasyon, plevral effüzyon ve diğer olası komplikasyonları değerlendirmek için hastaların yatışında göğüs radyografisi ile değerlendirilmesi önerilir (1, 9). Klinik olarak kötüleşme gösteren hastalarda direkt akciğer grafisi ile değerlendirme nekrotizan pnömoni veya ampiyem varlığını gösterebilir (1).

Dikkatli bir öykü ve fizik muayeneden elde edilen ve pulmoner infiltrat gösteren göğüs radyografileri ile doğrulanan klinik özellikler, pnömoninin varlığını düşündürür. Spesifik nedeni belirlemede mikrobiyolojik testlerin rolü, bakımın tartışmalı bir unsuru olmasına rağmen önemlidir. Etiyoloji nadiren kısa sürede tespit edilir. Bu nedenle, çocuk doktorları bir çocuğun antibiyotiğe ihtiyacı olup olmadığına ampirik olarak karar vermelidir (8, 20).

2.6.2. Akciğer Ultrasonografisi

Bir dizi çalışmada pnömoni tanısı için akciğer ultrasonografisinin (US) tanısal performansı göğüs radyografileri ile kıyaslanmıştır. Pereda ve ark. tarafından yapılan bir meta-analizde akciğer US'si tek başına göğüs radyografisi veya göğüs radyografileri, klinik ve laboratuvar bulgularının bir kombinasyonunun referans standartı ile karşılaştırıldığında %96 duyarlılık ve %93 özgüllük oranları gösterilmiştir (21). Ancak akciğer grafisinin ve akciğer US'nin bazen birbiriyle örtüşmediğini bildiren yayınlar da mevcuttur. Pozitif akciğer US bulgularıyla birlikte akciğer grafisinde bulgu saptanamaması genellikle akciğer US'nin 1 santimetreden

küçük konsolidasyonları saptamadaki üstün duyarlılığı, lateral görüntülerin olmadığı posterior-anterior akciğer grafilerinde görünmeyen retrokardiyak veya subdiyafragmatik konsolidasyonların varlığının saptanması veya karaciğer ya da dalağın alt lob konsolidasyonu olarak yanlış sınıflandırılmasına bağlanmaktadır (22-25). Çoğunlukla perihiler veya parakardiyak bölgelerde bulunan ve plevral yüzeye ulaşmayan konsolidasyonlar ile retroskapular, supraklaviküler veya aksiller bölgeler gibi akciğer US ile ulaşılması zor bölgelerdeki konsolidasyonlar nedeniyle akciğer US’de bulgu saptanamasa da akciğer grafisinde pozitif bulgu saptanması mümkündür (26-28).

2.7. Pnömoni Tanısında Karşılaşılan Zorluklar

Pnömoni çocuk sağlığı, antibiyotik direnci ve doğrudan ve dolaylı sağlık hizmetleri maliyetleri üzerinde muazzam bir etki yaratan oldukça yaygın bir hastalık olmasına rağmen, çözülmemiş bazı tanısallık ve terapötik ikilemler vardır (29). Bebeklerde bronşiolit ile önemli ölçüde örtüşme olmasına rağmen, çoğu vakada pnömoni tanısı klinik özellikler ve göğüs radyografisi bulguları ile konulabilir. Bununla birlikte, doğru ve hızlı etiyolojik tanı, odaklanmış antimikrobiyal tedavi ile daha iyi bakım, daha az gereksiz test ve prosedür ve çocuklarda potansiyel olarak daha kısa hastanede kalış süresi ile sonuçlanmasına rağmen, pnömونيye neden olan spesifik patojeni veya patojenleri tanımlamak için güvenilir testler mevcut değildir (16).

Çocuklarda pnömoninin etiyolojik tanısıyla ilgili bir diğer sorun da patojen tespiti için yeterli örnek almanın zorluğudur. Enfeksiyonun birincil bölgesi akciğer olduğundan, akciğer dokusundan veya alveolar sıvıdan yüksek verimli numunelerin alınması gerekir. Bununla birlikte, bronkoalveolar lavaj gibi prosedürler çok invazivdir ve TKP’li çocuklarda rutin olarak uygulanmaz (5). Küçük çocuklarda bu örneklerin elde edilmesinin zorluğu nedeniyle Gram boyama ve balgam kültürü de nadiren yapılır. Plevral sıvı analizleri, pnömoninin etiyolojik tanısını belirlemeye yardımcı olur, ancak bu hastaların çoğunda aspire edilecek kadar yeterli plevral sıvı örneği elde edilemez. TKP’li çocuklarda piyojenik bakterileri saptamak için duyarlılığı sınırlı olan kan kültürü esasen tek yöntemdir. Ek olarak, solunum yolu viral enfeksiyonları bakteriyel süperenfeksiyonlara yatkınlık yarattığı düşünülür,

TKP'li bir çocukta tanımlanan bir solunum virüsü, mutlaka bakteriyel bir etkeni dışlamaz. Bu durum da genellikle uygunsuz hasta yönetimi ve aşırı antibiyotik kullanımı ile gereksiz hastaneye yatışlarla aşırı tedaviye yol açar (16, 29).

Bakteriyel pnömoninin yüksek morbiditesi nedeniyle, tanı ve tedavi için WHO'nun revize edilmiş sınıflandırması ve tedavi algoritması kullanılmaktadır (17). Bu vaka yönetimi stratejilerinin bakteriyel etiyojiiyi belirlemede yüksek duyarlılığa (%62-94) ancak düşük özgüllüğe (%16-20) sahip olduğu gösterilmiştir (30, 31). Bu algoritmanın pnömoneye bağlı ölümleri %36'ya kadar azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (31). Bakteriyel pnömoninin teşhis edilebileceği özgüllüğü ve duyarlılığı geliştirmek, antibiyotik yönetimini sürdürürken çocukluk çağı pnömoneisi sonuçlarını iyileştirmek için çok önemlidir (32).

2.8. Pnömoni Tanısında Kullanılan Laboratuvar Belirteçleri

Gereksiz testleri, tedavileri ve hastaneye yatışları en aza indirirken kritik tedavileri ciddi sonuçlar açısından en yüksek riske sahip olanlara odaklamak için doğru risk değerlendirmesi gereklidir. Ancak TKP'li çocuklar için çok az objektif prognostik araç mevcuttur. Bu tür araçlar olmadan TKP'li çocuklar için klinik yönetim verimsiz olabilir veya değişkenlik gösterebilir (33).

TKP, alt solunum yollarında, başlangıçta solunum yolundan salınan sitokinler ve kemokinler tarafından düzenlenen, ardından kan dolaşımındaki bağışıklık yanıtının amplifikasyonu ile düzenlenen bir inflamatuvar süreç ile karakterizedir (34). Bakteriler ve virüslerin pnömonide farklı konakçı patojen etkileşimleri uyandırdığı göz önüne alındığında, bu farklı yanıtı yansıtan biyolojik moleküllerin (yani biyobelirteçlerin) ölçülmesi tanısal potansiyel sunar (32). İnflamasyon, endotelial fonksiyon ve akciğere özgü protein ile ilgili belirteçler dahil olmak üzere patojenle ilgili proteinler ve konakçı proteinler dahil olmak üzere bugüne kadar çeşitli biyobelirteçler araştırılmıştır (35). Biyobelirteçler, hastalık şiddetini değerlendirmek için nesnel bir araç sağlayarak hastalık yönetimini etkileyebilir (36). Ayrıca, hastalık şiddetinin değerlendirilmesi ve etiyojinin aydınlatılması konusunda faydalı olup olamayacağıyla ilgili çeşitli araştırmalar da yapılmıştır. Ancak günümüzde bulunan mevcut serum biyobelirteçleri bakteriyel ya da viral gibi

etken ayrımı konusunda yol gösterici değildir (7). Yapılan bir çalışmada acil servise başvuran hastalarda tam kan sayımı, kan kültürü ve akciğer grafisinin en sık istenen testler olduğu görülmüştür. Hem düzeltilmemiş hem de düzeltilmiş analizlerde her bir tanı testi için hastaneler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Hasta özellikleri, tam kan sayımı, kan kültürü ve inflamatuvar belirteçler hastaneler arasında en geniş varyasyon aralığını göstermiştir (33).

Günümüzde kullanılan biyobelirteçlerden biri esas olarak karaciğerde üretilen C-reaktif proteindir (37, 38). Ekstrahepatik bölgeler, makrofajlar, monositler, lenfositler, nöronlar, solunum ve böbrek epitel hücreleri ve düz kas hücreleri dahil olmak üzere doğrudan daha küçük miktarlarda üretilir (37). İlk olarak 1930'da *Streptococcus pneumoniae*'nin C-polisakkaritini çökeltme yeteneği ile pnömoni hastalarından alınan serumlarda tanımlanan CRP, o zamandan beri genel olarak bakteriyel enfeksiyonlarla ve enfeksiyöz olmayan inflamasyon nedenleriyle ilişkilendirilmiştir (39). Bu ilişkiler, bakteriyel ve bakteriyel olmayan pnömoni arasında ayırım yapmak için CRP kullanımına yol açmıştır (40, 41). CRP'nin fonksiyonel özellikleri arasında bakteri ve parazitleri bağlayarak opsonizasyonun stimülasyonu, fagositik hücrelerin klasik yolak modülasyon fonksiyonu yoluyla komplemanın doğrudan aktive edilmesi ve hücre aracılı sitotoksisiteyi artırma sayılabilir. Anemi, polisitemi, protein seviyeleri ve eritrosit şekli gibi eritrosit sedimentasyon hızını (ESR'yi) etkileyen faktörler CRP değerlerini etkilemez. Genel olarak, doku enfeksiyonu olan bakteriyel enfeksiyonlarda CRP seviyeleri önemli ölçüde (15-35 mg/dL) yükselirken çoğu akut viral enfeksiyonda sadece orta düzeyde (2-4 mg/dL) yükselmektedir; >10 mg/dL değerinin bakteriyel enfeksiyonla ilişkili olması daha olasıdır, ancak belirli virüslerin (örn. adenovirüs, sitomegalovirüs, grip, kızamık ve kabakulak) neden olduğu enfeksiyonlarda CRP düzeyleri >10 mg/dL'yi geçebilmektedir (37). 10 mg/L'den düşük normal değerler pnömonili hastalarda olağandışıdır ve tanıyı dışlamak için kullanılabilir. 100 mg/L veya daha yüksek seviyelerin pnömoni varlığını desteklediği düşünülmektedir. Ayrıca 30 günlük mortalitede artış, ventilatör veya vazopresör desteğine daha fazla ihtiyaç duyma olasılığı ile ilişkilendirilmiştir (38). CRP seviyesi, bir doku enfeksiyonu odağı tanımlandığında bakteriyel enfeksiyonu ayırt etmede daha iyi bir tahmin değerine sahiptir (37).

Beyaz kan hücresi sayısı (WBC), CRP ve prokalsitonin (PCT) gibi biyobelirteçler enfeksiyona karşı konak inflamatuvar yanıtını yansıtır. Bakteriyel pnömonili birçok çocukta WBC sayısı yükselir ancak toplum kökenli pnömoni tanısı ve yüksek WBC sayısı olan çocukların çoğunda bakteriyel enfeksiyon yoktur. Ayrıca yükselik derecesi, bakteriyel enfeksiyonu viral enfeksiyondan güvenilir bir şekilde ayırt etmez (1).

Prokalsitonin, enfeksiyon seyri sırasında ortaya çıkan en erken belirteç gibi görünmektedir. Klinik araştırmalar, yüksek PCT düzeyinin ($>0,25-0,5 \mu\text{g/L}$) varlığının pnömoni tedavisi gerektiren hastaları belirlemek için kullanılabileceğini göstermektedir (38, 42). Antibiyotik tedavisinin ne kadar süreyle devam ettirilmesi gerektiğine karar vermek için PCT seviyeleri önemlidir. Yine de bu belirtecin antibiyotik yönetim programlarındaki kullanışlılığı henüz çözülememiştir. Prokalsitonin ayrıca pnömoni ile ilişkili mortalitenin bir göstergesi olarak kullanılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, CRP'nin enfeksiyonun varlığını tanımlamada, PCT'nin ise klinik şiddeti tanımlamada daha iyi bir tahmin edici güce sahip olduğu görülmektedir. Prokalsitonin ile yapılan klinik deneyler antibiyotik maliyetlerinde bir azalmayı öngösterse de, bu biyobelirteçlerin tetkik edilmesi önemli masraflara neden olabilir; bunların maliyet-etkililiklerine ilişkin büyük ölçekli randomize çalışmalar eksiktir. Bu nedenle, pnömonide tanı ve şiddet değerlendirmesindeki rolleri net olarak tanımlanmamıştır (38). Bazı çalışmalar, PCT'nin RSV pnömonisini *S. pneumoniae*'ye bağlı gelişen TKP'den veya viral pnömoniyi bakteriyel TKP'den ayırt etmede iyi bir doğruluğa sahip olduğunu öne sürmüştür (40, 43, 44). Do ve ark.'nın yaptığı çalışmada, tek başına şiddetli RSV pnömonisi ve bakteriyel enfeksiyonlarla birlikte şiddetli RSV pnömonisi olan çocukları tespit etme ve ayırt etmede serum PCT konsantrasyonunun potansiyel rolü araştırılmıştır. PCT için optimal eşik noktası $2,25 \text{ ng/mL}$ olarak belirlenmiştir (45).

Başka bir çalışmada gereksiz antibiyotik kullanımının önüne geçebilmek amacı ile pnömonisi olan 230 çocukta biyobelirteçlerin bakteri-viral ayrımında yol göstericiliği değerlendirilmiştir. Etkeni kesin olarak gösterilmiş bakteriyel pnömoni vakalarında CRP, WBC ve absolu nötrofil sayısı (ANS) daha yüksek bulunmuştur. Kesin bakteriyel pnömoniyi varsayılan viral pnömoniden ayırt etmek için CRP eşiği 72 mg/L olarak belirlenmiştir. CRP'ye eşlik eden ateş varlığı ($\geq 38^\circ\text{C}$) veya rinore

yokluğu bu ayrımı desteklemiştir (43). Flood ve ark.'nın yaptığı 1230 pnömonili çocuğu içeren bir meta-analizde serum CRP değeri, pnömonide bakteriyel ya da bakteriyel olmayan ayrımını yapıp yapamayacağı açısından değerlendirilmiştir (44). Elemraid ve ark.'nın yaptığı diğer bir çalışmada 401 pnömonili çocukta viral enfeksiyonlarla karşılaştırıldığında, bakteriyel enfeksiyonlarda daha yüksek ortalama CRP, WBC ve nötrofil sayısı olduğu görülmüştür. Çok değişkenli analizde, her iki grup arasında sadece yaş ve CRP düzeyi anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Bakteriyel pnömonide CRP'nin viral enfeksiyonlardan daha sık >80 mg/L olduğu ancak <20 mg/L olan CRP seviyelerinin eşlik ettiği pnömoni hastalarında bakteriyel ve viral etkenler açısından anlamlı olmadığı görülmüştür. Nötrofil sayısının $>10 \times 10^9/L$ olması, viral pnömoniden çok bakteriyel pnömoni ile ilişkilendirilirken, beyaz küre sayısının $>15 \times 10^9/L$ olmasının, bakteriyel ve viral pnömoni arasında farklılık göstermediği rapor edilmiştir (46).

Florin ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu şüphesi olan 1142 çocuk değerlendirilmiş; bu prospektif kohortta, biyobelirteçlerden WBC, ANS, CRP ve PCT'nin hastalık şiddeti ile ilişkisi ve tahmin etme yeteneği sorgulanmıştır. Biyobelirteç seviyelerinin genel olarak hastalık şiddetine göre farklılık göstermediği, ancak CRP ve hastalık şiddeti arasında ılımlı bir ilişki gözlemlendiği vurgulanmıştır. Özellikle CRP ve PCT'nin göğüs drenaj prosedürleri gerektiren ampiyem ve vazoaktif infüzyon gerektiren sepsis dahil olmak üzere nadir ancak ciddi sonuçlar geliştiren hastalarda daha yüksek olduğu saptanmıştır (47).

Tagarro ve ark.'nın viral-bakteriyel pnömoni ve atipik-tipik bakteriyel pnömoni ayrımını öngörebilmek için geliştirdikleri skorlama sisteminde hastaların hemoglobin, CRP, yaş, pnömokok aşılama durumu, akciğer grafisinde konsolidasyon varlığı, ateş, lökositoz, nötrofili, lökopeni, solunum yükü ve wheezing varlığı sorgulanmıştır. Bu skorlama sistemine göre 11 puan ve üzeri olan hastalar daha çok bakteriyel pnömoni lehine, 11 puan altı alan hastalar viral pnömoni lehine değerlendirilmiştir. İkinci adımda sadece 11 puan ve üzeri alan hastalarda yaş, öksürük varlığı, wheezing varlığı, solunum yükü, hemoglobin, lökositoz, lökopeni, nötrofili sorgulanmış; skorlamada 11,7 puan ve üzerinde alanlarda tipik bakterilerin, altında puan alanlarda ise atipik bakterilerin etiyolojide ön plana çıktığı öne sürülmüştür (48).

IL-6 ve daha az olarak IL-1 β üretimi CRP için uyarıcıdır (37). Yüksek IL-6, CRP ve D-dimer serum seviyeleri, lenfopeni, nötrofili ve özellikle akciğerde miyeloid yanıtların düzensizliği ile ilişkili diğer komplikasyonlar şiddetli COVID-19'da bildirilmiştir (49-51). Şiddetli vakalarda, sitokin fırtınası, akciğerde ödem ile birlikte akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ile sonuçlanır ve bu durum yaygın olarak başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak kabul edilir (52).

Toll reseptör proteini *Drosophila melanogaster* meyve sineğinde daha öncesinde bir gen olarak tanımlanmışsa da özellikle drosomisin gibi gram-pozitif bakteri ve fungal patojenlere karşı çeşitli konak savunma mekanizmalarının indükleyicisi olan *Toll* sinyal yolağı ilk kez 1996 yılında Hoffmann tarafından bildirilmiştir. *Toll* veya *Toll* tarafından aktive edilen sinyal proteinlerindeki mutasyonların antimikrobiyal peptitlerin üretimini azalttığı ve yetişkin sineklerin mantar enfeksiyonlarına duyarlılığına yol açtığı gösterilmiştir (53, 54). *Toll-like* reseptörler (TLR) olarak adlandırılan *Toll* homologlarının, viral, bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı dirençle ilişkili olduğu memelilerde dahil olmak üzere diğer hayvanlarda da gösterilmiştir (53). İnsanlarda 10 farklı TLR geni bulunmaktadır (41, 53, 54). TLR'ler ekstraselüler alandaki mikrobik ajanlara karşı görev yapan sensörlerdir. Bazıları hücre yüzeyinde bulunurken bazıları hücre içinde endozomların zarında bulunurlar. TLR'ler, lösin bakımından zengin tekrar alanlarının (LRR) 18-25 kopyasından oluşan hücre dışı bir bölgeye sahip tek geçişli transmembran proteinlerdir (53, 54).

Memelilerdeki TLR-1, TLR-2 ve TLR-6, lipoteikoik asit ve gram-negatif bakterilerin diasil ve triaçil lipoproteinleri dahil olmak üzere çeşitli ligandlar tarafından aktive edilen hücre yüzeyi reseptörleridir. Makrofajlarda, dendritik hücrelerde, eozinofillerde, bazofillerde ve mast hücrelerinde bulunurlar. Ligand bağlanması, TLR-2 ve TLR-1'in veya TLR-2 ve TLR-6'nın heterodimerlerinin oluşumunu indükler. TLR-1 ve TLR-2'ye bağlı sentetik bir triasil lipopeptit ligandının X-ışını kristal yapısı, dimerizasyonun nasıl indüklediğinin tam bir göstergesidir. Üç lipid zincirinden ikisi TLR-2'nin konveks yüzeyine bağlanırken, üçüncüsü TLR-1'in konveks yüzeyine bağlanır. Memeli TLR'leri bir ligandın bağlanması ile dimer oluşumu indüklediğinde veya önceden oluşturulmuş bir TLR dimerinde konformasyonel değişiklikler indüklediğinde aktive olur. Tüm memeli

TLR proteinlerinin sitoplazmik kuyruğunda, genellikle diğer sinyal molekülleri ile etkileşime girmelerini sağlayacak TIR (Toll-İnterlökin-1 reseptör direnci) alanları vardır. Dimerizasyon, sinyalleşmeyi başlatmak için TIR alanlarını birbirine yakınlştırır. TLR-2 ve TLR-6'nın dimerizasyonunu indükleyen diasil lipopeptit ligandları ile de benzer etkileşimlerin meydana geldiği varsayılmaktadır (53).

Bir TLR'nin N-terminal lösın açısından zengin tekrar alanı (LRR) ile ligand etkileşimleri, TLR dimerizasyonu ile sonuçlanır ve neticede C-terminal TLR ile TIR alanlarının etkileşimine neden olan konformasyonel değişiklikler olur. TLR-TIR etkileşimleri yoluyla adaptör moleküllerin örneğın, TIR bölgesi içeren adaptör molekül (TIRAP)/Miyeloid farklılaşması birincil yanıt proteini 88 (MyD88) veya TIR alanı içeren adaptör indükleyici interferon- β (TRIF)/TRIF ilişkili adaptör molekülü (TRAM) alımını kolaylaştıran bir moleküler yapı oluşur. Buna karşılık, MyD88 veya TRIF'in TLR-TIR alanına kenetlenmesi, sırasıyla *Myddosome* veya *Triffosome* olarak adlandırılan büyük bir moleküler kompleks oluşturmak için aşağı akış sinyal proteinlerinin daha fazla alınmasına izin verir (55). MyD88'e bağlı yol, endozomal olarak eksprese edilen TLR-3 hariç tüm hücre yüzeyi ve endozomal olarak eksprese edilen TLR'ler tarafından uyarılır. MyD88'in TLR-4 ile uyarılması birincil olarak, çoğu proinflatuvar sitokin ve kemokin genlerinin indüksiyonu için gerekli olan bir transkripsiyon faktörü (TF) olan nükleer faktör kappa B'yi (NF- κ B'yi) aktive eder. Yalnızca endozomal olarak yerleştirilmiş iki TLR'den (yani TLR-3 ve TLR-4) aktive olan TRIF yolu (MyD88'den bağımsız), interferon- β ve diğer TRIF'e bağlı genlerin uyarılması için gerekli bir TF olan interferon düzenleyici faktör (IRF) 3'ü aktive eder. Bununla birlikte, TRIF aracılı yol çatallanır ve ayrıca gecikmiş NF- κ B aktivasyonu ile sonuçlanır. TLR-4, kovalent olmayan ligand bağlanması için bir yardımcı reseptör olarak bilinen MD-2 gerektirmesi bakımından benzersizdir ve hem MyD88 hem de TRIF sinyal yollarını aktive eden tek TLR'dir (56).

TLR-4, dendritik hücreler ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık sistemi hücreleri tarafından eksprese edilir ve çok sayıda bakteriyel enfeksiyonu algılamada ve bunlara yanıt vermede önemlidir. TLR-4, gram-negatif bakterilerin lipopolisakkaritlerini (LPS'lerini) kısmen doğrudan kısmen de dolaylı bir mekanizma ile tanır. LPS'nin sistemik olarak yayılması, şok olarak bilinen bir durum olan dolaşım ve solunum sistemlerinin bozulmasına neden olur. LPS'nin bu dramatik

etkileri, insanlarda kontrolsüz bir sistemik bakteriyel enfeksiyon veya sepsisten kaynaklanan septik şok olarak görülür. Bu durumda, LPS özellikle sistemik vasküler geçirgenliğe neden olan TNF- α gibi sitokinlerin salgılanmasını indükler ve bu durum lokal enfeksiyonların bile istenmeyen bir etkisi olabilir. TLR-4 işlevinden yoksun mutant fareler, LPS'nin neden olduğu septik şoka karşı dirençlidir ancak farelerin doğal bir patojeni olan *Salmonella typhimurium* gibi LPS taşıyan patojenlere karşı oldukça hassastır (53). LPS farklı bakteriler arasında bileşenleri bakımından farklılık gösterir, ancak esas olarak molekül başına değişken sayıda yağ asidi zincirine sahip bir amfipatik lipit olan lipid A'ya bağlı bir polisakkarit çekirdeğinden oluşur. LPS'yi tanımak için TLR-4'ün ektodomaini bir yardımcı protein olan MD-2'yi kullanır. MD-2 başlangıçta hücre içinde TLR-4'e bağlanır ve hem TLR-4'ün hücre yüzeyine doğru bir şekilde taşınması hem de LPS'nin tanınması için gereklidir. MD-2 TLR-4'ün kavisli ektodomainin merkezi bölümü ile ilişkilidir. TLR-4/MD-2 kompleksi LPS ile karşılaştığında, LPS'nin beş lipid zinciri MD-2'nin derin hidrofobik cebine bağlanır, ancak doğrudan TLR-4'e bağlanmaz ve altıncı lipid zinciri MD-2'nin yüzeyinde açıkta kalır. Bu son lipit zinciri ve LPS omurgasının parçaları daha sonra ikinci bir TLR-4 dış bölgesinin dışbükey tarafına bağlanabilir ve hücre içi sinyal yollarını aktive eden TLR-4 dimerizasyonunu indükleyebilir. LPS ile TLR-4 aktivasyonu MD-2'nin yanı sıra iki yardımcı protein daha içerir. LPS normalde gram-negatif bakterilerin dış zarının ayrılmaz bir bileşeni iken enfeksiyonlar sırasında zardan ayrılabilir ve kanda ve dokulardaki hücre dışı sıvıda bulunan konakçı LPS bağlayıcı protein tarafından alınabilir. LPS, LPS bağlayıcı proteinden makrofajların, nötrofillerin ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan ikinci bir protein olan CD14'e aktarılır. CD14 tek başına fagositik bir reseptör görevi görebilir, ancak makrofajlar ve dendritik hücreler üzerinde TLR-4 için yardımcı bir protein olarak da işlev görür. TLR sinyalizasyonu ayrıca TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indükleyen transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'yi aktive edebilir (53, 54). Akciğerde, alveolar ve bronşiyal epitelyal ve vasküler endotelyal hücrelerde TLR-4 ekspresyonu gösterilmiştir (57). Hava yolu epitel hücrelerinin akciğerdeki inflamatuvar yanıtı katkıda bulunduğuna inanılmaktadır (58).

Yapılan bir fare çalışmasında *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonuna karşı doğal konak yanıtını indüklemeye TLR-2 ve TLR-4'ün rollerini belirlemek için

intratrakeal yolla TLR-2 knockout, TLR-4 knockout ve TLR-2/4 double knockout farelerde pnömoni indüklenmiş ve çalışma sonucunda TLR-2 ve TLR-4 eksik farelerde az miktarda bakteri yükü ile birlikte daha ağır pnömoni geliştiği ve sağkalımın azaldığı gösterilmiştir. TLR-2 ve TLR-4 eksikliğinin *K. pneumoniae* enfeksiyonu sırasında sitokinler üzerindeki etkilerini araştırmak için serumlardaki sitokin düzeyleri ve akciğerlerdeki sitokin mRNA düzeyleri ölçülmüş, serumdaki TNF- α seviyelerinin TLR-2/4 double knockout farelerde önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Bu çalışmada, akciğerlerdeki IL-6 mRNA seviyelerinin TLR-2/4 *double knockout* farelerde önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (59).

Fareler ile yapılan başka bir çalışmada akut stafilocok pnömonisinde proinflatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin intrapulmoner üretiminin, nötrofillerin akciğerlere alımının ve alveoler makrofajların bakteriyel tutulumunun TLR-2 knockout farelerde azalmış olduğu gösterilmiştir. TLR-2'nin akciğerlerde *S. aureus*'a karşı doğal bağışıklık tepkilerini tetiklemede rol oynadığı savunulmuştur. Bu çalışmada TLR-2 bulunmayan farelerde stafilocok pnömonisinde sağkalımın bozulmadığı ve TLR-2 yokluğunda sadece hafif enfeksiyondan sonra akciğerlerden bakterinin temizlenmesinin minimal düzeyde bozulduğu rapor edilmiştir. Bakteriyel klerens ve sağkalımın TLR-2'nin bulunmamasından olumsuz etkilenmediği savunulmuştur. Bu bulgular, TLR-2'nin *S. aureus* enfeksiyonuna karşı pulmoner konak savunmasında belirgin fakat zorunlu olmayan bir rolü olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre TNF- α ve IL-1a sitokinlerinin TLR-2 ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (60).

Kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) olanlarda yapılan bir erişkin çalışmasında bronkoskopi ve bronşiyal biyopsi yapılan KOAH hastaları ve kontrol hastaları arasındaki epitel ve *lamina propria* hücrelerinde TLR sayısı karşılaştırılmış ve sigara içip içmediklerine göre de ayırım yapılmıştır. Bakteriyel proteinlerin saptanmasının ciddi KOAH'ta daha fazla gerçekleşeceğini savunarak yaptıkları çalışmada bronşiyal mukozadaki TLR ve *nod-like* reseptör sinyal yollarını incelemişlerdir. Burada ciddi/çok şiddetli KOAH olan hastaların bronş mukozasında TLR-4 ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 1 (NOD1) protein ekspresyonunun kontrol deneklerine kıyasla arttığını ve TLR-4'ün bronşiyal epitel ekspresyonu, bronş mukozasındaki CD4+ ve CD8+ hücrelerinin

sayısı ve hava akımı tıkanıklığı derecesi ile pozitif korelasyonunun olduğunu göstermişlerdir. NOD1 ekspresyonunun ayrıca CD8+ hücre sayıları ile korelasyon gösterdiği savunulmuştur (61).

Yapılan başka bir fare çalışmasında PUL-042 olarak adlandırılan TLR-2/6 ve TLR-9 için sentetik ligandlardan oluşan aerosol ilacının hayvanlara profilaktik olarak verildiğinde, influenzadan kaynaklananlar da dahil olmak üzere bakteriyel, fungal ve viral pnömonilere karşı geniş ölçüde koruma sağladığı savunulmuştur. Bu çalışmada, tek başına veya oseltamivir ile kombinasyon halinde verildiğinde PUL-042'nin influenza A pnömonisine karşı terapötik antiviral etkileride değerlendirmiştir. Ölümcül influenza pnömonisinden sonra tekrarlayan dozlarda bu aerosolize ligandın uygulanmasının sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (62).

Shirey ve ark.'nın yapmış olduğu diğer bir fare çalışmasında TLR-4 bağımlı inflamasyonu uyaran konak kaynaklı akut akciğer hasarının (ALI) oksitlenmiş fosfolipit oluşumuna ikincil olduğundan yola çıkılarak TLR-4 -/- farelerin influenza kaynaklı mortaliteye karşı oldukça dirençli olduklarını ve TLR-4 sinyalizasyonuna karşı terapötik antagonizmanın influenza kaynaklı ALI'ya karşı koruyucu olacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada potent sentetik TLR-4 antagonisti olan 'Eritoran kullanılmış' ve klinik semptomları hafiflettiği, sitokin ve oksidize fosfolipid ekspresyonu ile viral yükü azalttığı savunulmuştur. Eritoran ile tedavi edilen farelerde IL-6 ve IL-10'un akciğer ekspresyonunda azalma görülmüştür (63). H5N1 influenza virusu ile TLR-4 arasındaki ilişkiyi inceleyen başka bir fare çalışmasında TLR-4 sinyalizasyonunun lipopolisakkarit ile stimülasyonunun, MyD88'den bağımsız olarak ve TRIF'e bağlı bir şekilde TLR-3 ekspresyonunun sinerjistik upregülasyonunu indükleyerek patojenik H5N1 suşlarını baskıladığı gösterilmiştir. TLR-4/TRIF'e bağlı sinyalin seçici uyarılması, H5N1 virüslerinin neden olduğu ciddi akciğer hasarını önlemek için antiviral ajanların geliştirilmesinde hedef yolak gibi görünmektedir (64).

Siebert ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada ise 2-5 yaş arasında tekrarlayan alt solunum yolu enfeksiyonu geçiren hastalar değerlendirilmiş, çalışma 45 hasta ve 88 sağlıklı kontrol grubu çocuk üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada hava yollarının anatomik anomalileri, primer siliyer diskinezi, kistik

fibrozis, yabancı cisim aspirasyonu, astım, immun yetmezlik, lenfopeni olan hastalar ve intravenöz immunglobulin tedavisi alan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Üç yaş üstü alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda TLR-2 upregülasyonun özellikle belirgin olmasının yıllar içinde sürekli tekrarlayan pnömokok enfeksiyonu ataklarını yansıtabileceği düşünülmüştür. TLR-4'ün TIRAP homozigot mutant taşıyıcılarında daha az regüle edildiği gözlenmiş, bu düşük TLR-4 ekspresyon seviyesinin, tekrarlayan pnömokok enfeksiyonu olan çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonlarına yatkınlığın altında yatan faktörlerden biri olabileceği savunulmuştur. Tekrarlayan pnömokok pnömonisi olan çocuklarda *S.pneumoniae*, lipopolisakkarid ve TLR-4'e bağımlı IL-6 düzeylerinin sağlıklı çocuklara göre daha yüksek olduğunu gözlemlenmiştir (65). Fan Q. ve ark.'nın 2013-2014 yıllarında yapmış olduğu başka bir çalışmada retrospektif olarak *Mycoplasma pneumoniae* pnömonisi geçiren 84 çocuk değerlendirilmiş ve çocuklarda hışıltı olup olmamasına göre iki gruba ayrılmıştır. Hışıltı olan çocuklarda TLR-2 ve TNF- α düzeyleri hışıltı olmayan çocuklara göre daha yüksek saptanmıştır. Hatta *M. pneumoniae* spesifik antikor titreleri TLR-2 ile korele olarak değerlendirilmiştir (66).

SARS-CoV-2 ve TLR-2 ilişkisini inceleyen bir araştırmada, COVID-19'lu hastalarda sitokin fırtınasının neden olduğu mortalitede proinflamatuvar sitokinlerin üretimi için gerekli reseptörleri belirlemek ve özellikle TNF- α ve IFN- γ 'nın patojenik rolü göz önüne alındığında bu kritik sitokinlerin nasıl üretildiğini anlamak için Myd88'in daha üstünde yer alan doğal sensörler incelenmiştir (67). TLR-2'nin TNF- α ve IFN- γ dahil inflamatuvar sitokinlerin salınımını indüklemek için E proteininin tanınması yoluyla β -koronavirüs enfeksiyonunu algılayabildiği öne sürülmüştür. TLR-2'nin ligand çeşitliliği, TLR-1 veya TLR-6 ile heterodimer oluşturma yeteneği ile açıklanabilir. Ayrıca TLR-10, belirli koşullar altında bazı ligandları algılamak için TLR-2 ile etkileşime girebilir. TLR-2 $-/-$ kemik iliği kökenli makrofajlarda kalıntı NF- κ B ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) sinyal aktivasyonu, E proteini ile uyarılan SARS-CoV-2 proteini, inflamatuvar yanıtı aktive etmek için TLR-1 veya TLR-6 tarafından E proteininin tanınmasından kaynaklanıyor olabilir. Diğer bazı doğuştan gelen sensörlerin E proteinini tanıması da mümkündür (67). Aynı zamanda bu çalışmada TLR-2'nin SARS-CoV-2'nin zarf proteinini algılayabildiği ve β -koronavirüs enfeksiyonu sırasında inflamatuvar sitokin

salınımı için gerekli olduğu gösterilmiştir. TLR-2'nin bloke edilmesinin in vivo olarak SARS-CoV-2 kaynaklı mortaliteye karşı da koruduğu rapor edilmiştir. TLR-2'nin COVID-19'un hastalık gelişiminde önemli bir rolü olduğunu öne sürülmüş ve bu ölümcül pandemik hastalığa karşı terapötik müdahale için potansiyel bir strateji olarak tanımlanmıştır (67).

Şiddetli SARS-CoV-2 enfeksiyonu vakalarında, aşırı düzeyde olan inflamatuvar sitokinlerin yarattığı sitokin fırtınasının kontrolsüz bir inflamatuvar yanıt ve yaygın doku hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (68). Proinflamatuvar sitokinlerin anormal salınımı COVID-19 hastalarında alveolar ve mikrovasküler epitel hücre bariyerine zarar veren pulmoner hücre apoptozisine yol açarak alveolar ödem ve hipoksiye yol açar. COVID-19'lu yetişkin hastalarda yüksek IL-6 serum seviyeleri bildirilmiştir ve semptomların şiddeti ve yaklaşan akut solunum yetmezliği ile yakından ilişkilidir, dolayısıyla bu hastalarda prognostik değere sahip olabilir (69, 70). Ayrıca, SARS-CoV-2 enfeksiyonunda uyarılmış IL-1 β 'nin akciğer ve sistemik inflamasyon, ateş ve fibrozise aracılık ettiği öne sürülmüştür (71). Shafiek ve ark.'nın COVID-19 pnömonisi olan 92 çocuğu değerlendirdikleri çalışmada IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α ve IP-10 seviyeleri değerlendirilmiş ve COVID-19'lu hastaların, kontrol çocuklarına göre önemli ölçüde daha yüksek medyan IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- α ve IFN γ -indükleyici protein-10 (IP-10) seviyelerine sahip olduğu ancak COVID-19 hastaları ve kontrol grubu arasında IL-2, IL-4 ve IFN- γ seviyelerinde anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Şiddetli COVID-19 pnömonisi olan hastalarda orta düzeyde COVID-19 pnömonisi olanlar ve kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında anlamlı derecede daha yüksek medyan IL-1 β , IL-6 ve IP-10 seviyeleri görülmüştür (72). Sun ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada şiddetli COVID-19'lu pediatrik hastalarda IL-6, IL-10 ve IFN- γ ekspresyonunun arttığı ve kan CD16+ ve CD56+ lenfositlerinin azaldığı bildirmiştir (73). Buna karşılık Soraya ve Ulhaq, yedi pediatrik çalışmanın verilerini değerlendirmiş ve pediatrik COVID-19 vakalarının IL-6 seviyelerinin normal aralıkta olma eğiliminde olduğunu göstermiştir. Ancak bu COVID-19 hasta serilerinin nispeten hafif semptomları olduğunu ve hiçbirinin yoğun bakım veya mekanik ventilasyon gerektirmediğini de belirtmişlerdir (74).

Qian ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada TNF- α , IL-2, IL-4 ve IL-6 dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin serum düzeylerinin, COVID-19 pnömonisi olan çocukların orta ve şiddetli alt grupları arasında farklı olmadığını bildirmiştir. Yazarlar, ciddi COVID-19 vakalarında bile CD4+ T hücrelerinin, CD8+ T hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin azalmadığını eklemiştir (75). Pierce ve ark.'nın, COVID-19'lu pediatrik ve erişkin hastalarda klinik sonuç farklılıklarının nedenlerini araştırmış ve daha hafif klinik seyri olan COVID-19'lu pediatrik hastaların, daha ciddi geçiren erişkinlerle karşılaştırıldığında daha düşük IL-6, TNF- α ve IP-10 konsantrasyonlarına sahip olduğunu bildirmiştir (76). Özsürekci ve ark.'nın yaptığı çalışmada COVID-19 enfeksiyonu olan erişkin ve çocuklarda IL-10, IL-6 ve IL-1 α seviyelerinin COVID-19 hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve önemli ölçüde farklılık gösterdiği görülmüştür (77).

IL-6, erişkin ve pediatrik TKP hastalarında pnömoni teşhisi ve bakteriyel enfeksiyon ve sonuç ile ilişkili bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (78). TKP ile hastaneye yatırılan 5 yaş altı çocuklarda IL-6 artışının pnömokok enfeksiyonu ile bağımsız olarak ilişkili olduğu belirlenmiş olup 12,5 pg/mL'nin altındaki IL-6 düzeylerinin bu hastalarda pnömokok enfeksiyonu için yüksek negatif prediktif değere sahip olduğu gösterilmiş ve etiyolojisi saptanamayan olgular pnömokok dışı enfeksiyonlu alt gruba dahil edildiğinde sonuçların aynı olduğu görülmüştür (78). Bir yaşından küçük ağır TKP nedeni ile izlenen 62 çocukta yapılan bir çalışmada hastalığın ağırlığının tahmini için araştırılan potansiyel biyobelirteçler arasında bronkoalveolar lavaj (BAL) IL-1 β , BAL IL-17 ve plazma IL-6'nın en iyi prediktörler olduğu bulunmuştur. Plazmanın elde edilmesi BAL'den daha kolay olduğu için plazma IL-6 seviyesinin üç belirtecin arasında en iyisi olduğu rapor edilmiştir (79). Yapılan hayvan çalışmalarında IL-6'nın, influenza ve *S. pneumonia* ile koenfekte olmuş pnömonisi olan hayvanları koruduğu gösterilmiştir. IL-6'nın koruyucu özelliklerinin akciğerlerde hücre sağ kalımını azaltarak ve makrofaj fagositozunu iyileştirerek gerçekleştiği rapor edilmiştir. IL-6'nın bronkoalveolar lavaj sıvısındaki hücreleri influenza ile tetiklenen apoptozdan koruduğu, patojenlere karşı konak savunmasının ilk hatlarından biri olan homeostazı sağladığı ve ikincil enfeksiyona duyarlılığın azalmasına yol açtığı bildirilmiştir. IL-6, ikincil bakteriyel enfeksiyonlar sırasında fagositoz kapasitelerini artıran makrofajlarda kolajen yapılı makrofaj

reseptörünün (MARCO) yüzey ekspresyonunu arttırmaktadır. Sonuç olarak, IL-6 koenfeksiyon sırasında hücrel koruyucu görevi görmektedir. IL-6 eksikliği olan farelerde rekombinan IL-6 tedavisinin makrofaj yanıtını iyileştirdiği görülmüştür (80). Yapılan bir metaanalizde CRP, WBC, PCT ve ESR dışında kalan 19 biyobelirteçten CRP/ortalama trombosit hacmi (MPV) oranı, nötrofil/lenfosit oranı, IL-6 ve IFN- α 'nın duyarlılıkların %60 ile %85 arasında ve özgüllüklerin %76 ve %83 arasında olduğu ve en yüksek orana sahip biyobelirteçlerin bunlar olduğu gösterilmiştir (32). Nötrofillerin IL-10 üretimine olan katkısı pnömoni nedenleri göz önüne alındığında geniş bir yelpazeye sahiptir (81).

Epidemiyolojinin belirlenmesinde moleküler düzeyde de araştırmalar devam etmektedir. Li ve ark.'nın yaptıkları bir araştırmada alveoler lavaj sıvısında 'Yüksek Verimli Gen Hedefli Amplikon Dizileme Testi' kullanılmış ve tanıda yardımcı diğer testlerle karşılaştırılarak etiyolojide rol oynayan etken ya da etkenleri saptamadaki rolü değerlendirilmiştir (82).

2.9. Pnömoni Etkenini Saptamada Kültür ve Diğer Testlerin Yeri

Viral bir enfeksiyonun kesin tanısı, solunum yolu salgılarında viral genomun veya antijenin saptanmasına dayanır. RSV, parainfluenza, influenza, insan metapnömovirüsü, adenovirüs, enterovirüs ve rinovirüs dahil olmak üzere birçok solunum yolu virüsünün hızlı tespiti için güvenilir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleri yaygın olarak mevcuttur. Serolojik teknikler yakın zamanda meydana gelen bir solunum yolu viral enfeksiyonunu teşhis etmek için kullanılabilir, ancak genellikle spesifik bir virüse karşı antikorlarda bir artış için akut ve nekahat dönemindeki serum numunelerinin test edilmesini gerektirir. Bu tanı tekniği zahmetlidir, yavaştır ve genellikle klinik olarak yararlı değildir, çünkü enfeksiyon genellikle serolojik olarak doğrulandığında düzelme aşamasına gelmektedir. Serolojik testler, çeşitli solunum yolu viral patojenlerinin insidansını ve prevalansını tanımlamak için epidemiyolojik bir araç olarak değerli olabilir (5).

Tipik bir bakteriyel enfeksiyonun kesin teşhisi, bir organizmanın kandan, plevral sıvıdan veya akciğerden izole edilmesini gerektirir. Perkütan akciğer aspirasyonu invazivdir ve rutin olarak uygulanmamaktadır. Kan kültürü pnömokok

pnömonisi olan çocukların sadece %10'unda pozitifdir ve ayakta tedavi gören toksik olmayan çocuklar için önerilmemektedir. İyileşmeyen veya klinik olarak kötüleşen, komplike pnömonisi olan veya hastaneye yatırılması gereken çocuklar için kan kültürleri önerilmektedir (5).

M. pneumoniae'nin neden olduğu akut bir enfeksiyon, solunum örneğinden alınan bir PCR testi veya bir immünoglobulin G testinde serokonversiyon ile tanılabilmektedir. Titreleri >1:64 olan soğuk aglutininler, *M.pneumoniae* enfeksiyonu olan hastaların ortalama yarısının kanında da bulunur; ancak soğuk aglutininler spesifik değildir, çünkü influenza virüsleri gibi diğer patojenlerle gelişen enfeksiyonlarda da artışa neden olabilmektedir. Antistreptolizin O ve anti-DNase B titreleri gibi serolojik kanıtlar da grup A streptokok pnömonisinin tanısında faydalı olabilmektedir (5).

Balgam örneklerinin Gram boyama veya kültür yolu ile çalışılması genellikle yetişkinlerde önerilirken çocuklarda nadiren yapılmaktadır. Şiddetli TKP'si olan daha büyük çocuklar ve ergenler için balgam örneği denenmelidir (1). Balgam kültürü küçük çocuklarda pnömoni tanısında çok az değer taşımaktadır (5). Kültür ayrıca kötü balgam kalitesi, yetersiz hacim, örneklerin gecikmeli işlenmesi ve önceden antibiyotik kullanımı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Aynı zamanda etkenin saptanması nispeten daha yavaş gerçekleşmektedir (83).

Yetişkinlerde tanıda kullanılan diğer testlerden biri de idrarda *S.pneumoniae* antijeninin saptanmasıdır (84). Pnömokok idrar antijen testi (PUAT), pnömokok C-polisakarit proteinine karşı yönlendirilmiş antikorlara sahip *lateral flow assay* (LFA) olarak mevcuttur. Üretici tarafından tanımlanan duyarlılıklar sırasıyla %86 ila %90, özgüllük %71 ila %94 ve pozitif ve negatif tahmin değerleri sırasıyla %31 ila %59 ve %98 arasındadır. En önemli 23 serotipin %100'ünü saptadığı bildirilmektedir (85). Yetişkinlerde yapılan çalışmalar, %50 ila %80 arasında bir duyarlılık ve %90'ı aşan özgüllük göstermiştir (86). Çocuklarda, pnömokok taşıyıcılığı, aşılama ve uzun süreli pnömokok atılımı nedeniyle idrar antijen testinin yorumunun daha zor olduğuna dair veriler mevcuttur (84). Çocuklarda *S.pneumoniae*'nin neden olduğu pnömoniye teşhis etmek için üriner antijen testleri, nazofaringeal taşıyıcılıktan kaynaklanan yüksek oranda yanlış pozitiflik nedeniyle kullanılmamalıdır (5). Yanlış pozitiflik oranını tam

olarak değerlendirmek ve PUAT kullanımına yönelik tavsiyeleri yönlendirmek için farklı coğrafi bölgelerde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (85). Bununla birlikte semptomatik çocuklarda hastalık için daha spesifik olabilir ve son zamanlarda yaşça daha büyük çocuklarda tanıda yararlı bir tanısal tetkik olabileceği öne sürülmektedir (87).

2.10. Pnömoni Tanısında Tükürük Örneğinin Yeri

Tükürük bulaşıcı hastalıkların tanısı için potansiyel teşkil etmektedir (88). Örneğin, kızamık, kabakulak ve kızamıkçık enfeksiyonunu doğrulamak için tükürükte spesifik immunglobulin M'nin tespiti kullanılmıştır (89). Yenidoğanlarda konjenital sitomegalovirüs enfeksiyonu, tükürükte viral DNA'nın saptanması yoluyla teşhis edilebilmektedir (88). Nazofaringeal sürüntüler yerine tükürük kullanılarak çocuklarda SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tanısı hakkında da çalışmalar yapılmıştır (90). Metabolik sendrom, kronik böbrek hastalığı ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklara tanı koymak ve bu hastalıkları izlemek için tükürük biyobelirteçlerinin klinik faydalarını gösteren pediatrik araştırma grupları mevcuttur (91-94). Tükürük örneklerinin tanı açısından faydası erişkin hastalar için artmış olsa da pediatrik yaş grubu için nispeten sınırlı kalmaktadır (88).

Jacobs ve ark.'nın yapmış olduğu araştırmada tüberküloz (TB) hastalığı için yeni belirteçler değerlendirilmiş ve IL-6, IL-8, IP-10, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), alfa-2 makroglobulin (A2M), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), haptoglobin, serum amiloid protein (SAP), fibrinojen ve CRP olmak üzere 10 belirteç incelenmiş ve TB hastalığı olan hastalar ile diğer respiratuar hastalıkları olan hastalar arasında incelenen bu biyobelirteçlerin seviyelerinde önemli farklılıklar saptanmıştır. Bununla birlikte, optimal tanısal biyo-imzanın tükürük CRP, ferritin, SAP, MCP-1, A2M, fibrinojen ve doku plazminojen aktivatörünün yedi belirteçli bir kombinasyonu olduğu gösterilmiştir. Bu biyo-imzanın TB hastalığının tanısında sonra %78,1 duyarlılık %83,3 özgüllüğü olduğu savunulmuştur. Aynı zamanda başlangıç seviyeleri ile karşılaştırıldığında, granzim A, MCP-1, IL-1 β , interlökin-9 (IL-9), IL-10, interlökin-15 (IL-15), makrofaj inflamatuvar protein-1 β (MIP-1 β), ferritin ve serum amiloid A dahil olmak üzere 9 biyobelirtecin konsantrasyonlarının TB tedavisine yanıtın izlenmesinde faydalı olabileceği de gösterilmiştir (95).

Serum CRP düzeyi pnömoni için hassas bir biyobelirteçtir. Pnömonili pediatrik hastalarda tükürük CRP düzeyi ile serum CRP düzeyi arasında yüksek korelasyon olduğu ve pnömonili pediatrik hastalarda sağlıklı çocuklara göre daha yüksek tükürük CRP düzeyi olduğu bildirilmiştir (96). Omran ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *cut-off* değeri 3,8 ng/L olacak şekilde tükürük CRP düzeyindeki artışın yenidoğan pnömonisi tanısına %91,4 duyarlılık ve %80,9 özgüllük ile yardımcı olabileceği bildirilmiştir (97). Yapılan başka bir çalışmada ise pnömonisi olan çocuklarda tükürük akış hızı, pH ve ürik asit konsantrasyonunun daha düşük olduğu; fosfat ve toplam protein seviyelerinin ise pnömonili çocuklarda sağlıklı çocuklara göre daha yüksek olduğu ve bu değişikliklerin anlamlı olduğu gösterilmiştir (98). Son olarak, influenza aşısının etkinliğini değerlendirmek için tükürük sekretuar immunglobulin A düzeyi kullanılmıştır (99).

2.11. Hastaneye Yatış Kararı

Pnömoniye bağlı çocuk ölümlerinin küresel yükü 1980'lerin başında DSÖ sınırlı kaynaklara ve kısıtlı sağlık sistemlerine sahip ülkeler için uygun bir pnömoni kontrol stratejisi geliştirmeye yönlendirmiştir. Tanı teknolojisine erişimin çok az olduğu veya hiç olmadığı ortamlarda değişen şiddetteki pnömoniyi sınıflandırmak için basit işaretler belirlenmiş ve sınıflandırmalar uygun vaka yönetimi eylemlerini gerektirmiştir. Hızlı nefes alan çocuklar “pnömoni” olarak sınıflandırılmış ve beş gün boyunca evde almaları için oral bir antibiyotik (o sırada oral kotrimoksazol) verilmiştir. Hızlı nefes alıp vermeksizin göğüs çekilmesi olan çocuklar “ağır pnömoni” olarak sınıflandırılmış ve enjekte edilebilir penisilin tedavisi için en yakın üst düzey sağlık kuruluşuna sevk edilmiştir. Herhangi bir genel tehlike belirtisi gösteren çocuklar “ağır zatürree veya çok ağır hastalık” olarak değerlendirilmiş ve bu çocuklar ilk doz oral antibiyotik verilmesinin ardından ileri değerlendirme ve parenteral antibiyotiklerle tedavi için acilen daha üst düzey bir sağlık kuruluşuna sevk edilmiştir (17).

Önceki dönemlerde de görüldüğü gibi hafif ile orta şiddette solunum semptomları olan bebekler ve çocuklar hastaneye yatırılmadan güvenle yönetilebilmektedir. TKP yönetiminde en önemli karar, çocuğu hastane dışında tedavi edip etmemek ya da hastaneye sevk ve bakım için kabul etmektir. Bu karar, en

iyi şekilde hastalığın ciddiyetinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi ve olası prognoz değerlendirmesi ile ilişkilidir. Ayrıca bu yönetim genellikle uygun olmayan hastane başvurularını, buna bağlı morbidite ve maliyetleri azaltma potansiyeline sahiptir (2).

Şiddetin değerlendirilmesine ek olarak, bir hastaneye sevk edilip edilmeme kararı, çocuğun sahip olabileceği altta yatan risk faktörleri ile birlikte ebeveynlerin/bakıcıların hastalığı evde yönetme becerisinin de değerlendirilmesini içermektedir. Hastane bakımına ne zaman başvurulacağına dair karara rehberlik edecek tek bir onaylanmış şiddet puanlama sistemi yoktur. Hastaneye yatırılması gerekmesi muhtemel çocuğun belirlenmesinde klinik şiddetin ve risk faktörlerinin küresel bir değerlendirmesi çok önemlidir (2).

Pnömoninin ağırlık derecesine göre sınıflaması BTS 2011, IDSA 2011 ve DSÖ 2014 rehberleri doğrultusunda yapılmıştır (2, 16, 17).

Tablo 2.2. Çocuk hastalarda rehberler doğrultusunda belirlenen ağır pnömoni kriterleri (2, 16, 17)

Bebekler için (Bir yaş altı):	Büyük çocuklar için (Bir yaş üstü):
• Hipoksi varlığı: oksijen saturasyonunun ≤ 92 olması	• Hipoksi varlığı: oksijen saturasyonunun ≤ 92 olması
• Apne ya da inleme	Siyanoz varlığı
• Solunum sayısının 70/dk üstünde olması	• Solunum sayısının 50/dk üstünde olması
• Zayıf beslenme ya da beslenememe	• Oral beslenmeyi tolere edememe
• Ateş yüksekliğinden bağımsız ciddi taşikardi olması	• Ateş yüksekliğinden bağımsız ciddi taşikardi olması
• Kapiller geri dolum zamanının 2 sn ve üzerinde olması	• Kapiller geri dolum zamanının 2 sn ve üzerinde olması
• Solunum güçlüğü olması	• Solunum güçlüğü olması
Tüm yaş grubu çocuklarda:	
♦ Komorbid hastalığı olması (kronik akciğer hastalığı, astım opere edilmemiş ya da tam düzeltme yapılmamış konjenital kalp hastalığı, diyabetes mellitus, nöromusküler hastalıklar, immün yetmezlik, immünsupresyon, orak hücreli anemi)	
♦ Komplike pnömoni gelişmesi (plevral efüzyon ya da ampiyem, pnömotoraks, akut solunum yetmezliği, akciğer apsesi, bronkoplevral fistül, nekrotizan pnömoni, menenjit, merkezi sinir sistemi apseleri, perikardit, endokardit, osteomyelit, septik artritis, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ya da sepsis, hemolitik üremik sendrom)	
♦ Birden çok lob tutulumu olması	
♦ Ayaktan antibiyotik tedavisine yanıt alınamaması	
♦ Ailenin uygun gözlem sağlayamaması	

2.12. Ayaktan Tedavi Alan ve Hastane Yatışı Gerektiren Hastalar Arasında Tanıda Kullanılan Araçlardaki Farklılıklar

Antibiyotik tedavisi alan veya almayan ancak klinik seyri düzelmeyen ya da kötüleşen her çocukta, infiltrasyonun boyutunu, tarzını ve yerini değerlendirmek, ek olarak varsa plevral sıvıyı tespit etmek için mutlaka bir akciğer grafisi çekilmelidir. Benzer şekilde ayaktan tedavi alan çocuklarda kan kültürü ve tam kan sayımı nadiren tedavi seyrini değiştirir. PCR tabanlı tanı tekniklerinin mevcudiyeti ve giderek yaygınlaşmasıyla viral patojenlerin test edilmesi daha fazla mümkündür. Ancak diğer bir ayrım noktası da hızlı antijen bazlı influenza testi negatif çıksa bile, influenza benzeri hastalığı olan ve influenza sirkülasyonu dönemlerinde komplikasyon riski yüksek olan tüm çocuklara influenza için antiviral tedavi uygulanmalıdır, çünkü bu testler yüksek duyarlılıktan yoksundur (1).

Hasta çocuklarda kan kültürlerinin pozitif olma olasılığı daha yüksektir. Yayınlanmış çalışmalarda bakteriyemi oranı %1 ile %11 arasında değişmektedir (100-103). Sistematik bir analizde TKP'li çocuklarda genel bakteriyemi prevalansının ortalama %5,1 olduğunu, ağır olmayan ve ağır olarak gruplandırılan hastalarda sırasıyla %4,1 ve yaklaşık %10 oranlarında olduğu bildirilmiştir (104). Elde edilen pozitif sonuçlar planlanan antibiyotik tedavisi için yol gösterici olmakla birlikte bu kültürler üzerinde gerçekleştirilen hızlı mikrodizi analizlerinin tanıdığı olduğu imkanlarla *S. aureus* diğer gram-pozitif bakterilerden hızlı bir şekilde ayırt edilebilmekte ve böylece organizma tanımlaması beklenirken stabil hastalarda antibiyotik rejiminin aminopenisilinlerden vankomisin veya antistafilokokal penisilinlere gereksiz yere değiştirilmesinin önüne geçilebilmektedir (1, 105). Tam kan sayımı, bakteriyel pnömoninin nadir bir komplikasyonu olan hemolitik üremik sendromla ilişkili anemi ve trombositopeniyi belirlemek için hastanede yatan çocuklarda faydalı olabilir (106).

Literatürdeki çalışmalar ışığında sitokin ve kemokinler ile TLR'lerin pnömoni hastalığının tanısında veya prognozunu öngörmeye kullanılabileceği fikri oluşmuştur. Bu çalışma ile hastalarda çalışmayı planladığımız biyobelirteçlerin ayaktan tedavi alan hastalar ile hastaneye yatış gerektiren hastalar arasında farklı olup olmadığının ve klinik ile ne kadar korele olduğunun gösterilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla bu projede pnömoni tanısı alan çocuklarda TLR-2 ve TLR-4 ile IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α gibi bazı sitokinlerin tükürük ve serumdaki düzeylerinin ve birbirleri ile ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Eğer etken gösterilebilirse viral veya bakteriyel pnömoni ayrımı yapıp yapılamayacağı ve düzeyler ile hastalık ciddiyetinin anlaşılıp anlaşılamayacağının araştırılması planlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları

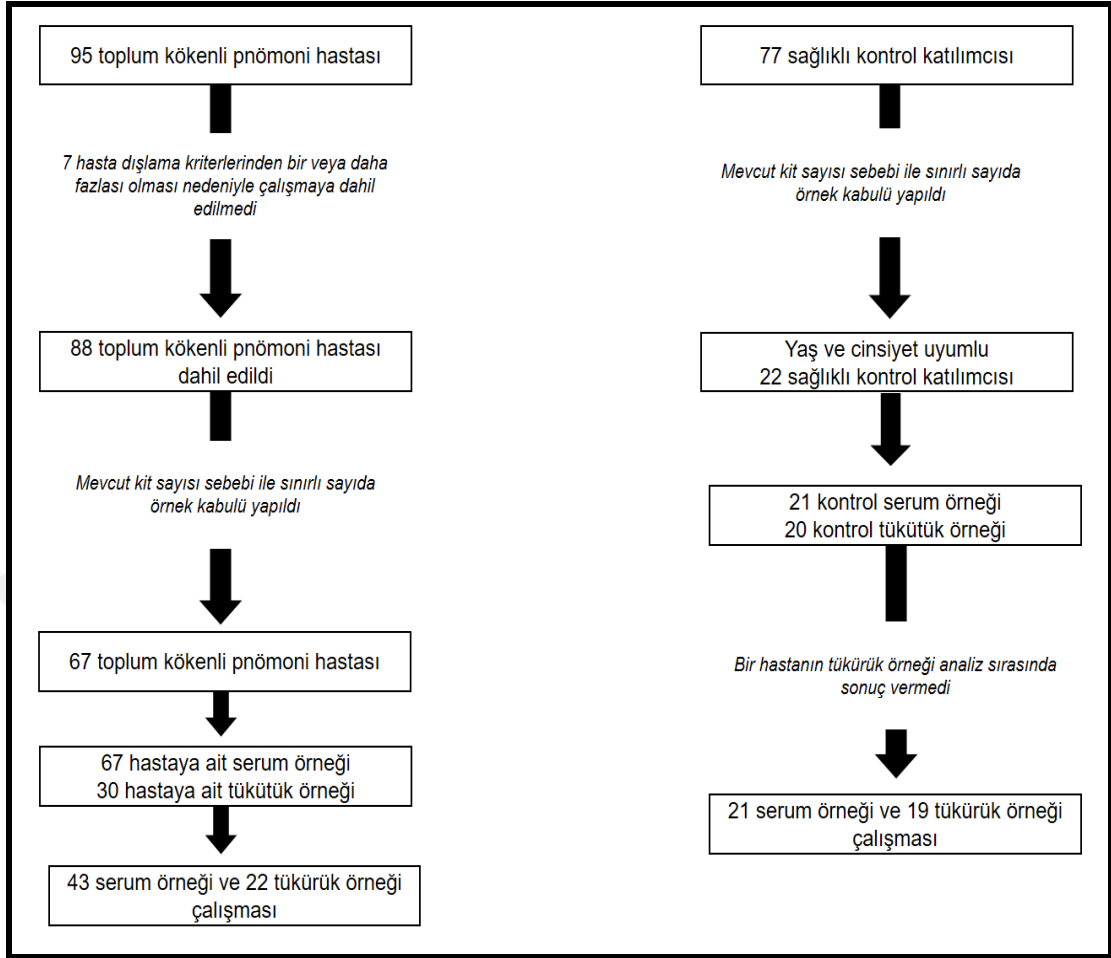
Bu çalışma tek merkezli ve prospektif bir çalışmadır. Araştırma Temmuz 2020-Temmuz 2021 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği ve Çocuk Acil Servisine başvuran klinik ve radyolojik özellikleri ile toplum kökenli pnömoni tanısı alan 1ay-18 yaş arası çocuk hastalar dahil edilmiştir. Yenidoğanlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Olası tanıli hastalar ‘WHO 2014 Revised WHO Classification and Treatment of Childhood Pneumonia at Health Facilities’, ‘British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011’ ve ‘Clinical Practice Guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America’ rehberleri doğrultusunda değerlendirilmiştir (2, 16, 17). Kesin bakteriyel-viral pnömoni ayrımı için solunum yolu viral ve bakteriyel panel PCR testleri, kan kültürü ve örneklenebilirse plevral sıvı kültürleri kullanılmıştır. Küçük bir grup hasta için hastane mevcudiyetinde bu testlerin olmaması sebebi ile viral ya da bakteriyel panel gönderilememiş olmakla birlikte çoğu hasta için bu tetkikler çalışılabilmiştir. Etken gösterilen hastalarda klinik ve radyolojik korelasyon da değerlendirilmiştir. Hasta grubu seçiminde kistik fibrozis, primer siliyer diskinezi, immünyetmezlik, sistemik romatolojik hastalık, lösemi ile takipli hastalar kemoterapi alan hastalar ve immünmodülatör ajan kullanan hastalar kesin olarak dışlanmıştır. Ayrıca aktif COVID-19 enfeksiyonu olan hastalardan sadece pnömoni kliniği olanlar çalışmaya dahil edilmiştir. COVID-19 enfeksiyonun akciğer dışı sistemik tutulumu olan çocuklar çalışmaya alınmamıştır. COVID-19 ilişkili Multisistem İnflamatuvar Sendrom (MIS-C) hastaları henüz aydınlatılamayan inflamatuvar süreçlerin eşlik etmesi nedeni ile bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Bu sebeple dahil edilmesi planlanan 95 hastadan 7 tanesi dışlama kriterleri varlığı sebebi ile çalışmaya dahil edilememiş ve çalışma dışı bırakılmıştır. Çalışma kitinin sınırlılığı sebebi ile mevcut 88 hastanın sadece 67 serum örneği ve 30 tükürük örneği çalışabilmiştir. Tükürük örneği bulunan bu 30 hastanın eş zamanlı alınan serum

örnekleri mevcut 67 örneğe dahildir. Hasta grubundan alınan tüm örnekler tanı anında elde edilmiştir.

Sağlıklı kontrol grubu 1 ay-18 yıl yaş aralığında, aktif enfeksiyon ya da inflamasyonu olmayan, kullandığı ilaç olmayan ve genel kontrol amacı ile Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi polikliniklerine başvuran grup içinden seçilmiştir. Yenidoğan grubundaki sağlıklı katılımcılar çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışmaya toplamda 77 kontrol hastası alınması planlanmıştır ancak mevcut kitlerin sayı sınırlılığı nedeni ile sadece 21 farklı serum örneği ve 20 farklı tükürük örneği çalışılabilmiştir. 19 hastanın eş zamanlı alınan serum ve tükürük örnekleri bu gruba dahildir. Hem hasta grubu hem de kontrol grubu katılımcıları için çalışmaya katılmayı kabul etmeyen ve aydınlatılmış onam formlarını imzalamayan aileler veya hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Onamları hasta ve kontrol grubuna dahil olan tüm katılımcıların ebeveynlerinden ve ek olarak 12 yaş ve üzerindeki okuma-yazma bilen katılımcıların kendilerinden alınmıştır.

3.2. Çalışma Metodu

Bu çalışma için hastalardan ve kontrol grubundan bu zaman dilimlerinde rutinde alınacak olan kan örneklerinin yanı sıra biyokimya tüpüne ekstra 2-3 cc kan örneği ve iki tüp tükürük örneği alındı ve alınan kan örneğinin serumu ayrılarak örnekler -80 °C'de saklandı. Bu serum ve tükürük örneklerinde IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α sitokinleri ile TLR-2 ve TLR-4 çalışıldı.



Şekil 3.1. Hastalar ve sağlıklı katılımcılardan elde edilen serum ve tükürük örneklerinin çalışmaya dahil edilme süreci ve çalışmaya dahil edilen örnek sayıları

3.3. Serum Analizi

Serum örneklerinde IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α sitokinleri ile TLR-2 ve TLR-4 analizi Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA) ile yapılmıştır. Bu yöntemde kit plakası, mevcut antikor ile önceden kaplanmıştır. Her 8 belirteç için bu işlem ayrı ayrı yapılmıştır. Numunede bulunan özgün belirteçler eklenmiş ve kuyucuklarda kaplanmış antikora bağlanmıştır. Daha sonra biyotinlenmiş ilgili belirteçlerin olduğu kuyucuklara insan serumu eklenmiş ve numunedeki biyokimyasal belirteçlere bağlanmıştır. Sonrasında Streptavidin-HRP eklenmiş ve biyotinlenmiş belirteçlerin antikoruna bağlanmıştır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin HRP bir yıkama adımı sırasında yıkılarak uzaklaştırılmıştır. Substrat solüsyonu eklenmiş ve mevcut belirteçlerin miktarıyla

orantılı olarak renk gelişimi gözlenmiştir. Reaksiyon asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve 450 nm'de absorbans ölçülmüştür.

ELISA prosedürüne göre tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler talimatlara göre hazırlanmıştır. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiş ve çalışma oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Test için gereken strip sayısı belirlenmiş ve sonrasında şeritleri kullanmak için çerçevelere yerleştirilmiştir. Kullanılmayan stripler 2-8°C'de muhafaza edilmiştir. Standart kuyuya 50 µl standart eklenmiştir. Standart solüsyon biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya biyotinlenmiş antikor eklenmemiştir. Numune kuyularına 40 µl numune ve sonrasında 10 µl seçilen biyobelirtecine antikoru eklenmiştir. Hemen ardından numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl Streptavidin-HRP eklenmiştir. Bu madde *blank* kuyucuklarına eklenmemiştir. İyice karıştırıldıktan sonra plaka plate bandı ile kapatılmıştır. 37°C'de 60 dakika inkübasyon yapılmıştır. *Plate* 5 kez otomatik yıkama tamponu ile 300 µl olacak şekilde yıkanmıştır. Plaka kâğıt havlu ile iyice kurulanarak yıkama sonrası kalabilecek sıvı kuyulardan boşaltılmıştır. Her bir kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklenmiştir ve ardından her kuyuya 50 µl substrat solüsyonu B eklenmiştir. Yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plaka karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendikten sonra mavi rengin sarı renge dönüşümü gözlemlenmiştir. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroplaka okuyucu kullanılarak her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlenmiştir.

Her bir belirteç için standart solüsyon tabloları aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 3.1. IL-1 β için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri

Solüsyon konsantrasyonları	Standart Numarası	Karışım özelliği
4000 pg/mL	Standart No.5	120 μ l Orijinal Standart + 120 μ l Standart Seyreltici
2000 pg/mL	Standart No.4	120 μ l Standart No.5 + 120 μ l Standart Seyreltici
1000 pg/mL	Standart No.3	120 μ l Standart No.4 + 120 μ l Standart Seyreltici
500 pg/mL	Standart No.2	120 μ l Standart No.3 + 120 μ l Standart Seyreltici
250 pg/mL	Standart No.1	120 μ l Standart No.2 + 120 μ l Standart Seyreltici

Standart Konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
8000 pg/mL	4000 pg/mL	2000 pg/mL	1000 pg/mL	500 pg/mL	250 pg/mL

Tablo 3.2. IL-4 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri

Solüsyon konsantrasyonları	Standart Numarası	Karışım özelliği
640 ng/L	Standart No.5	120 μ l Orijinal Standart + 120 μ l Standart Seyreltici
320 ng/L	Standart No.4	120 μ l Standart No.5 + 120 μ l Standart Seyreltici
160 ng/L	Standart No.3	120 μ l Standart No.4 + 120 μ l Standart Seyreltici
80 ng/L	Standart No.2	120 μ l Standart No.3 + 120 μ l Standart Seyreltici
40 ng/L	Standart No.1	120 μ l Standart No.2 + 120 μ l Standart Seyreltici

Standart Konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
1280 ng/L	640 ng/L	320 ng/L	160 ng/L	80 ng/L	40 ng/L

Tablo 3.3. IL-6 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri

Solüsyon konsantrasyonları	Standart Numarası	Karışım özelliği
320 ng/L	Standart No.5	120 µl Orijinal Standart + 120 µl Standart Seyreltici
160 ng/L	Standart No.4	120 µl Standart No.5 + 120 µl Standart Seyreltici
80 ng/L	Standart No.3	120 µl Standart No.4 + 120 µl Standart Seyreltici
40 ng/L	Standart No.2	120 µl Standart No.3 + 120 µl Standart Seyreltici
20 ng/L	Standart No.1	120 µl Standart No.2 + 120 µl Standart Seyreltici

Standart Konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
640 ng/L	320 ng/L	160 ng/L	800 ng/L	40 ng/L	20 ng/L

Tablo 3.4. IL-10 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri

Solüsyon konsantrasyonları	Standart Numarası	Karışım özelliği
800 pg/mL	Standart No.5	120 µl Orijinal Standart + 120 µl Standart Seyreltici
400 pg/mL	Standart No.4	120 µl Standart No.5 + 120 µl Standart Seyreltici
200 pg/mL	Standart No.3	120 µl Standart No.4 + 120 µl Standart Seyreltici
100 pg/mL	Standart No.2	120 µl Standart No.3 + 120 µl Standart Seyreltici
50 pg/mL	Standart No.1	120 µl Standart No.2 + 120 µl Standart Seyreltici

Standart Konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
1600 pg/mL	800 pg/mL	400 pg/mL	200 pg/mL	100 pg/mL	50 pg/mL

Tablo 3.5. TLR-2 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri

Solüsyon konsantrasyonları	Standart Numarası	Karışım özelliği
24 ng/mL	Standart No.5	120 µl Orijinal Standart + 120 µl Standart Seyreltici
12 ng/mL	Standart No.4	120 µl Standart No.5 + 120 µl Standart Seyreltici
6 ng/mL	Standart No.3	120 µl Standart No.4 + 120 µl Standart Seyreltici
3 ng/mL	Standart No.2	120 µl Standart No.3 + 120 µl Standart Seyreltici
1,5 ng/mL	Standart No.1	120 µl Standart No.2 + 120 µl Standart Seyreltici

Standart Konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
48 ng/mL	24 ng/mL	12 ng/mL	6 ng/mL	3 ng/mL	1,5 ng/mL

Tablo 3.6. TLR-4 için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri

Solüsyon konsantrasyonları	Standart Numarası	Karışım özelliği
8 ng/mL	Standart No.5	120 µl Orijinal Standart + 120 µl Standart Seyreltici
4 ng/mL	Standart No.4	120 µl Standart No.5 + 120 µl Standart Seyreltici
2 ng/mL	Standart No.3	120 µl Standart No.4 + 120 µl Standart Seyreltici
1 ng/mL	Standart No.2	120 µl Standart No.3 + 120 µl Standart Seyreltici
0,5 ng/mL	Standart No.1	120 µl Standart No.2 + 120 µl Standart Seyreltici

Standart Konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
16 ng/mL	8 ng/mL	4 ng/mL	2 ng/mL	1 ng/mL	0,5 ng/mL

Tablo 3.7. IFN- α için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri

Solüsyon konsantrasyonları	Standart Numarası	Karışım özelliği
640 pg/mL	Standart No.5	120 μ l Orijinal Standart + 120 μ l Standart Seyreltici
320 pg/mL	Standart No.4	120 μ l Standart No.5 + 120 μ l Standart Seyreltici
160 pg/mL	Standart No.3	120 μ l Standart No.4 + 120 μ l Standart Seyreltici
80 pg/mL	Standart No.2	120 μ l Standart No.3 + 120 μ l Standart Seyreltici
40 pg/mL	Standart No.1	120 μ l Standart No.2 + 120 μ l Standart Seyreltici

Standart Konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
1280 pg/mL	640 pg/mL	320 pg/mL	160 pg/mL	80 pg/mL	40 pg/mL

Tablo 3.8. TNF- α için standart solüsyon miktarları ve konsantrasyon değerleri

Solüsyon konsantrasyonları	Standart Numarası	Karışım özelliği
480 ng/L	Standart No.5	120 μ l Orijinal Standart + 120 μ l Standart Seyreltici
240 ng/L	Standart No.4	120 μ l Standart No.5 + 120 μ l Standart Seyreltici
120 ng/L	Standart No.3	120 μ l Standart No.4 + 120 μ l Standart Seyreltici
60 ng/L	Standart No.2	120 μ l Standart No.3 + 120 μ l Standart Seyreltici
30 ng/L	Standart No.1	120 μ l Standart No.2 + 120 μ l Standart Seyreltici

Standart Konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
960 ng/L	480 ng/L	240 ng/L	120 ng/L	60 ng/L	30 ng/L

3.4. Tükürük Analizi

150 µl tükürük örneği 2 ml mikrosantrifüj tüpüne alındı. 100 µl pH 7.4 fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi eklenerek son hacim 250 µl olarak ayarlandı. 250 µl Buffer RL eklenerek birkaç saniye vorteks yapıldı ve 250 µl %96-100 etanol eklendi. Yavaşça vorteks yapıldı. Hazırlanan lizattan 600 µl'lik kısmı spin kolona aktarıldı ve 3500 x g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Eğer tüm lizat kolondan geçmediyse 14.000 x g de 1 dakika daha santrifüj edildi. Kolondan geçen süpernatant atıldı ve kolona 400 µl wash solution A eklenerek 14.000 x g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Tüm sıvı kolondan geçmezse santrifüj süresi birkaç dakika uzatıldı. Atık tüp atıldı ve RNA' nın elde edileceği steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü kolona takıldı. 50 µl Elüsyon solüsyonu A kolona eklendi ve 200 x g de 2 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra 14.000 x g de 1 dakika santrifüj edilerek RNA elde edildi. Sensifast (*Bioline*) cDNA Kit Reverse Transkriptaz işlemi için kısa bir vorteks ve spin yapıldı. Revers transkripsiyon işlemi için ABI Veriti 96 cihazı kullanıldı. Cihaz revers transkripsiyon işlemi 25 °C'de 10 dk primer bağlanması, 42 °C'de 15 dk reverse transkripsiyon işlemi ve 85 °C'de 5 dk enzim inaktivasyonu adımlarını içeren bir protokole göre çalışmaktadır. Reaksiyon sonunda enzim 85 °C'de 5 dk 'da inaktive edilerek, cDNA ürünleri -20 °C'de uzun süre muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.9. Transkriptaz işlemi için gereken bileşenler ve miktarları

Komponentler	Miktar
Total RNA	Değişken
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Nükleaz içermeyen H2O	20 µl 'ye tamamlanır

SybrGreen qPCR işlemleri için SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit (*Bioline*) master mix kullanılarak mRNA ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Soğuk blok üzerinde tabloda yer alan bileşenler hazırlanmıştır.

Tablo 3.10. PCR işlemi için soğuk blok üzerinde hazırlanan bileşenler

Komponentler	Derişim	Miktar 1X
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	2x Mastermix (1,5) buffer	10 µl
mRNA MixB (Primer)	F & R (400 nmol)	5 µl
mRNA cDNA	10 ng	5 µl

Tablo 3.11. PCR işlemi için *thermocycler* prosedürü

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95°C / 5 dk	1
PCR Aplikasyon	Denatürasyon	95°C / 5 sn	40
	Bağlanma	60°C / 30 sn (Okuma) *	
Final	Soğutma	40°C 30 sn	1

*Bölgelere göre farklılıklar gösterebilir.

PCR sonuçları incelenerek analizler yapılmıştır. Primer setleri tablodaki gibidir (Tablo 3.12).

Tablo 3.12. PCR işlemi için kullanılan primer setleri

Sırası	Oligo Adı	5- Diziler -3	Optimum Sıcaklık
1	TLR2-hsa-EJ-F	TGGTAGTTGTGGGTTGAA	61°C
2	TLR2-hsa-EJ-R	CTTGGAGAGGCTGATGAT	
3	IL1B-hsa-EJ-F	GGCTTATTACAGTGGCAATG	61°C
4	IL1B-hsa-EJ-R	TAGTGGTGGTCGGAGATT	
5	IL4-hsa-EJ-F	CCTCTGTTCTTCCTGCTA	59°C
6	IL4-hsa-EJ-R	TCTCAGTTGTGTTCTTGGA	
7	IL10-hsa-EJ-F	TCAGCAGAGTGAAGACTT	63°C
8	IL10-hsa-EJ-R	ACCCAGGTAACCCCTTAAAG	
9	TLR4-hsa-EJ-F	TTATCACGGAGGTGGTTC	59°C
10	TLR4-hsa-EJ-R	TGGATTTACACCTGGAT	
11	TNF-hsa-EJ-F	CTTGTTCTCAGCCTCTT	61,5°C
12	TNF-hsa-EJ-R	TCGAGAAGATGATCTGACTG	
13	IL6-hsa-Algn-F	AGCAAAGAGGCACTGGCAGAA	56°C
14	IL6-hsa-Algn-R	CACCAGGCAAGTCTCCTCATTGAA	
15	IFNA1-hsa-Algn-F	AAGGAGGAAGGAATAACA	53°C
16	IFNA1-hsa-Algn-R	TATCAGCATGGTCATAGT	
17	ACTB-hsa-F	TGAAGATCAAGATCATTG	59°C
18	ACTB-hsa-R	TAACGCAACTAAGTCATA	

3.5. Çalışma Verileri

Çalışmadaki hastaların başvuru sırasında detaylı anamnez bilgileri kayıt edilmiştir. Demografik özellikleri (yaş, cinsiyet), semptomları, semptomların başlangıç zamanı, hastaneye başvuru öncesi kullanılan antibiyotik öyküsü, kronik hastalıkları, tekrarlayan akciğer enfeksiyonu öyküsü, öyküde COVID-19 enfeksiyonu geçirme durumu, mevcut enfeksiyon öncesinde COVID-19 enfeksiyonu olan bireyle teması, hastaneye başvurduğundaki fizik muayene bulguları, vital bulguları, laboratuvar sonuçları, radyolojik görüntüleme sonuçları, yoğunbakım servisine yatışlar, mortalite ile taburculuk ve hastaneye yeniden başvuru veya yeniden hastaneye yatış ihtiyacı ile ilgili bilgiler ilgili bilgiler hasta yakını ile birebir iletişim sağlanarak elde edilmiştir. Eksikliği saptanan bilgiler hasta dosyaları ve hastane otomasyon sisteminde yer alan notlar aracılığı ile tamamlanmıştır.

3.6. Radyolojik Değerlendirme

Radyolojik bulguların değerlendirilmesinde Hacettepe Üniversitesi Radyoloji Bölümünün raporları ve dosya notları esas alınmıştır. Hastaların yatışı öncesinde ve izlem sırasında çekilen akciğer grafisi, toraks BT, abdominal US, renal US ve kardiyak manyetik rezonans görüntüleme sonuçları kaydedilmiştir.

3.7. Laboratuvar Yöntemleri

Hastaların hastaneye başvurdıklarında alınan tam kan sayımı örneklerinden hemoglobin düzeyi, lökosit sayısı, lenfosit sayısı, nötrofil sayısı, trombosit sayısı, MPV düzeyi, NLR değeri kaydedilmiştir. Ayrıca akut faz reaktanı olarak da ESR, CRP ve PCT düzeyleri kaydedilmiştir. Mikrobiyolojik incelemeler kapsamında Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışılan '*Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry*' yöntemi ile tanımlanan kan aerob kültürü, plevral sıvı aerob ve mantar kültürleri, bronkoskopi yapılan hastalardan gönderilen bronkoalveolar lavaj sıvısı aerob ve mantar kültürleri, dışkı aerob kültürleri, idrar aerob kültürleri sonuçları kaydedilmiştir. Ayrıca plevral sıvıdan pnömokok DNA'sı tespit edilmesi için enfeksiyon hastalıkları laboratuvarında çalışılan *Real-Time* PCR sonuçları elde edilmiştir. Diğer solunum

yolu viral etkenlerinin değerlendirilmesi amacıyla nazofarengeal sürüntü örneğinden çalışılan nükleik asit izolasyonu sonrasında *Real-Time* PCR analiz sonuçları incelenmiştir. Atipik pnömoni etkenlerinin değerlendirilebilmesi için ise seroloji laboratuvarında ELISA immunoassay yöntemi ile çalışılan *M. pneumoniae* IgM, IgG ve *C. pneumoniae* IgM, IgG sonuçları incelenmiştir.

3.8. Araştırmanın Tipi

Prospektif, vaka kontrol araştırma projesi.

3.9. Biyoistatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analizler, IBM SPSS for Windows Version 23.0 ile gerçekleştirildi. Sayısal değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan [25.-75. persentil] olarak özetlendi. Kategorik değişkenler frekans ve yüzde olarak verildi. Kategorik değişkenler ki-kare testi veya Fisher kesin testi ile karşılaştırıldı. Sürekli değişkenlerin normalliği Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Varyansların homojenliği Levene testi ile test edilmiştir. Sürekli değişkenlere göre gruplar arasındaki farklılıklar Mann Whitney U veya uygunsa Kruskal-Wallis testi ile belirlendi. TLR-2 ve TLR-4'ün tanısal doğruluğunu belirlemek için *Receiver-operating characteristic* (ROC) eğrisi analizi kullanıldı. Bu optimal *cut-off*'larda duyarlılık, özgüllük, negatif ve prediktif değerler, doğruluk değerleri verildi. 0.05'ten küçük bir p değeri anlamlı kabul edildi. Grafik gösterimleri ise Prism 9 (GraphPad Yazılımı) ile yapıldı.

Etik Kurul Onayı: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 23.06.2020 tarihli toplantısında GO 20/613 kayıt numarası ile çalışma için onay verilmiştir (Karar no: 2020/12-11).

Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği: Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından THD-2021-19459 proje kodu ile desteklenmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesinde 1 Temmuz 2020- 31 Temmuz 2021 tarihleri arasında başvuran 24 ayaktan tedavi edilen ve 43 yatırılarak tedavi alan toplum kökenli pnömoni hastaları ile 22 sağlıklı kontrol hastasını içermektedir (Tablo 4.1).

4.1. Sosyo-demografik Bulgular ve Klinik Özellikler

4.1.1. Katılımcıların Yaşı

Yatan hastaların ortalama yaşı ay olarak 28 ay olarak saptandı, en küçük hasta 1 aylık iken en büyük hasta 210 aylıktı. Ayaktan tedavi edilen hastaların ortalama yaşı ise 41,5 ay olarak saptandı, bu hastalardan en küçüğü 6 aylık iken en büyüğü 186 aylıktı. Kontrol grubunda ise ortalama yaş 68 ay olarak saptandı, en küçük sağlıklı kontrol 1 aylık iken en büyük sağlıklı kontrol 200 aylıktı. Bu üç grup arasında yaş ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,069$) (Tablo 4.1).

4.1.2. Katılımcıların Cinsiyeti

Çalışmaya dahil edilen hastalardan yatan hastaların 28'i (%65,1) erkek, 15'i (%34,9) kız cinsiyetteydi. Hastalık yönetimi ayaktan yapılan hastalarda 19 (%79,2) hasta erkek cinsiyete, 5 (%20,8) hasta kız cinsiyete aitti. Kontrol grubunda ise 11 (%50,0) kız hasta ve 11 (%50,0) erkek hasta bulunmaktaydı. Cinsiyet dağılımları açısından bu üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,116$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Sosyo-demografik bulgular ve klinik özellikler

Özellikler	Yatan (n=43)	Ayaktan (n=24)	Kontrol (n=22)	p değeri
Yaş, ay (IQR)	28 (12-89)	41,5 (18,25-87)	68 (52,75-127,5)	0,069
Cinsiyet				0,116
Erkek (n, %)	28 (%65,1)	19 (%79,2)	11 (%50,0)	
Kız (n, %)	15 (%34,9)	5 (%20,8)	11 (%50,0)	
Semptomlar				
Ateş (n, %)	24 (%55,8)	8 (%33,3)	NA	0,131
Boğaz ağrısı (n, %)	4 (%9,3)	4 (%16,7)	NA	0,443
Öksürük (n, %)	27 (%62,8)	20 (%83,3)	NA	0,138
Sekresyon artışı (n, %)	21 (%48,8)	10 (%41,7)	NA	0,757
Burun akıntısı (n, %)	8 (%18,6)	12 (%50,0)	NA	0,016*
Hırıltı (n, %)	18 (%41,9)	9 (%37,5)	NA	0,929
Solunum sıkıntısı (n, %)	28 (%65,1)	7 (%29,2)	NA	0,010*
Hızlı nefes alma (n, %)	23 (%53,5)	6 (%25)	NA	0,046*
Halsizlik (n, %)	10 (%23,3)	2 (%8,3)	NA	0,188
İştahsızlık (n, %)	10 (%23,3)	3 (%12,5)	NA	0,350
Beslenememe (n, %)	11 (%25,6)	3 (%12,5)	NA	0,342
Kusma (n, %)	9 (%20,9)	4 (%16,7)	NA	0,757
Başvurudan önce mevcut enfeksiyon için antibiyotik kullanımı	11 (%25,6)	1 (%4,2)	NA	0,044*
Semptom başlangıcından başvuruya kadar geçen süre, gün (minimum-maksimum)	2 (0-15)	2 (0-15)	NA	0,808
Kronik hastalık				<0,001*
Yok	18 (%41,9)	8 (%33,3)	22 (%100)	NA
Kardiyak hastalık	2 (%4,7)	2 (%8,3)	0	NA
Nörolojik hastalık	15 (%34,9)	5 (%20,8)	0	NA
Pulmoner hastalık	4 (%9,3)	1 (%4,2)	0	NA
Metabolik hastalık	2 (%4,7)	0 (%0,0)	0	NA
İskelet hastalığı	1 (%2,3)	1 (%4,2)	0	NA
Allerjik hastalık	1 (%2,3)	6 (%25)	0	NA
Gastrointestinal hastalık	0 (%0,0)	1 (%4,2)	0	NA
Tekrarlayan akciğer enfeksiyonu öyküsü	18 (%41,9)	12 (%50)	NA	0,699
Trakeostomi varlığı	5 (%11,6)	1 (%4,2)	NA	0,408
Gastrostomi varlığı	3 (%7,0)	1 (%4,2)	NA	1,000
Yoğunbakım servisi yatışı	11 (25,6%)	0 (%0,0)	NA	NA
Viral pnömoni	30 (%69,8)	15 (%62,5)	NA	NA
Bakteriyel pnömoni	3 (%7,0)	0 (%0,0)	NA	NA
Etken tespit edilemeyen pnömoniler	10 (%23,2)	9 (%37,5)	NA	NA
Mortalite	1 (%2,3)	0 (%0,0)	NA	NA
Taburculuk	42 (%97,7)	24 (%100)	NA	NA

*İstatistiksel anlamlı, $p < 0,05$

4.1.3. Hasta Grubunun Öyküdeki Semptomları

Ayaktan ve yatan hasta grubu hastaneye başvuruda mevcut olan semptomlar açısından karşılaştırıldığında ateşin yatan hasta grubunda daha sık olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla %55,8 ve %33,3, p değeri=0,131) (Tablo 4.1). Boğaz ağrısı varlığı açısından bu iki grup karşılaştırıldığında yatan hasta grubu ve ayaktan tedavi alan hasta grubunda sırası ile %9,3 ve %16,7 olarak bulundu, p değeri ise 0,443 olarak saptandı (Tablo 4.1). Diğer bir semptom olarak öksürüğün eşlik edip etmediği incelendiğinde 27 yatan hastada (%62,8) ve 20 ayaktan hastada (%83,3) mevcut olduğu görüldü (p değeri=0,138) (Tablo 4.1). Balgam gibi sekresyonların artışı açısından değerlendirildiğinde yatan hasta grubunda 21 hastada (%48,8) ve ayaktan hasta grubunda 10 hastada (%41,7) mevcut olduğu görüldü (p=0,757) (Tablo 4.1). Burun akıntısının yatan hasta grubuna göre ayaktan tedavi alan grupta daha sık olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu (sırasıyla %18,6 ve %50,0; p=0,016) (Tablo 4.1). Hırıltı yatan ve ayaktan hasta grubunda sırasıyla 18 (%41,9) ve 9 (%37,5) hastada mevcuttu (p=0,929) (Tablo 4.1). Başvuru sırasında solunum eforu ve sıkıntısı olan hastalar yatan hasta grubunda daha sık olarak karşımıza çıktı (sırasıyla %65,1 ve %29,2; p=0,010) (Tablo 4.1). Hızlı nefes alıp verme ya da takipne ise beklendiği gibi daha çok yatan hasta grubuna olup yatan hastaların 23'ünde (%53,5), ayaktan hastaların ise 6'sında (%25) mevcuttu (p=0,046) (Tablo 4.1). Halsizlik ise yatan hastaların 10'unda (%23,3) mevcutken ayaktan hastaların 2'sinde (%8,3) vardı (p=0,188) (Tablo 4.1). Yatan hastalardan 10 hastada (%23,3), ayaktan hastalarda ise 3 hastada (%12,5) başvuru sırasında iştahsızlık olduğu görüldü, ancak iki grup arasında istatistiksel bir fark yoktu (p=0,350) (Tablo 4.1). Ayrıca yatan hastalardan 11 hastada (%25,6), ayaktan hasta grubunda ise 3 (%12,5) hastada hastaların başvuru anında beslenmeyi tolere edemediği görüldü (p=0,342) (Tablo 4.1). Başvuru anındaki semptomlardan bir diğeri olan kusma açısından bakıldığında yatan hastalarda daha sık karşılaşılsa da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı anlaşıldı, yatan hastaların 9'unda (%20,9), ayaktan hastaların ise 4'ünde (%16,7) mevcuttu (p=0,757) (Tablo 4.1). İshal sadece yatan hasta grubuna ait 3 hastada (%7) bulunmaktaydı. Karın ağrısı ise her iki grupta sadece birer hastada mevcuttu (sırasıyla %2,3 ve %4,2; p=1,000). Baş ağrısı ve kas ağrısı sadece yatan hasta grubuna ait birer hastada (her

biri (%2,3) başvuru anında ifade edildi. Göğüs ağrısı yatan hastalardan 3'ünde (%7), ayaktan hastaların ise birinde (%4,2) tespit edildi. Yatan hastalardan 2 hastanın (%4,7) başvuru sebeplerinden biri de febril nöbet geçirmeleriydi.

4.1.4. Başvurudan Önce Mevcut Enfeksiyon İçin Antibiyotik Kullanımı

Başvuru öncesinde antibiyotik kullanımını değerlendirmek için gerekli süre başvurudan önceki bir hafta olarak kabul edildi. Hasta grupları karşılaştırıldığında yatan hasta grubunun mevcut olan enfeksiyon için öncesinde antibiyotik kullanımının daha sık olduğu görüldü ve yatan hasta grubunda 11 hastanın (%25,6), ayaktan tedavi alan grupta ise sadece 1 hastanın (%4,2) antibiyotik kullanımının olduğu saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ortaya çıktı ($p=0,044$) (Tablo 4.1). Başvuru öncesi kullanılan antibiyotiklerin neler olduğu değerlendirildiğinde yatan hasta grubunda amoksisilin-klavulanik asit kullanan hasta sayısının 4 (%9,3), klaritromisin kullanan hasta sayısının 2 (%4,7), azitromisin kullanan hasta sayısının 1 (%2,3), amoksisilin-klavulanik asit ve klaritromisin birlikte kullanan hasta sayısının ise 2 (%4,7) olduğu görüldü (Tablo 4.1). Bu gruba ait hastaların 2'sinde (%4,7) ise ebeveynlerin hastalar için kullandıkları antibiyotiklerin isimlerini bilmedikleri öğrenildi. Ayaktan hasta grubunda ise sadece bir hastanın başvuru öncesinde amoksisilin-klavulanik asit kullanma öyküsü olduğu öğrenildi.

4.1.5. Semptom Başlangıcından Başvuruya Kadar Geçen Süre

Bu değişken incelendiğinde her iki hasta grubunda da ortalama sürenin 2 gün olduğu, bu sürenin en uzun 15 gün olduğu görüldü; istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,808$) (Tablo 4.1).

4.1.6. Kronik Hastalık Varlığı

Yatarak tedavi alan hasta grubu incelendiğinde kardiyak hastalığı olan 2 hasta (%4,7), nörolojik hastalığı olan 15 hasta (%34,9), pulmoner hastalığı olan 4 hasta (%9,3), metabolik hastalığı olan 2 hasta (%4,7), iskelet ve alerjik hastalıkları olan

birer hasta (her biri %2,3) mevcuttu (Tablo 4.1). Kalan 18 hastanın (%41,9) altta yatan hastalığı bulunmamaktaydı (Tablo 4.1).

Ayaktan tedavi alan hasta grubu incelendiğinde ise kardiyak hastalığı olan 2 hasta (%8,3), nörolojik hastalığı olan 5 hasta (%20,8), pulmoner hastalığı olan 1 hasta (%4,2), iskelet sistemi hastalığı olan 1 hasta (%4,2), alerjik hastalığı olan 6 hasta (%25,0) ve gastrointestinal sistem hastalığı olan 1 hasta (%4,2) mevcuttu (Tablo 4.1). Kalan 8 hastanın (%33,3) altta yatan hastalığı bulunmamaktaydı (Tablo 4.1).

Sağlıklı kontrol grubunda kronik hastalığı olan katılımcı bulunmamaktaydı (Tablo 4.1).

4.1.7. Tekrarlayan Akciğer Enfeksiyonu Öyküsü

Hasta grupları incelendiğinde yatan hasta grubunda 18 hastanın (%41,9), ayaktan hasta grubunda ise 12 hastanın (%50) özgeçmiş sorgulamasında tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geçirdikleri öğrenildi. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,699$) (Tablo 4.1).

4.1.8. Öncesinde COVID-19 Enfeksiyonu Geçirme Öyküsü

Yatan hasta grubunda 4 hastanın (%9,3) önceden COVID-19 enfeksiyonu geçirdiği tespit edildi. Bu hastalardan birinin iki kez COVID-19 enfeksiyonu geçirme hikayesi mevcuttu. Ayaktan tedavi alan hasta grubunda ise böyle bir öykü tespit edilmedi.

4.1.9. Mevcut Enfeksiyon Öncesinde COVID-19 Enfeksiyonu Olan Bireyle Temas Öyküsü

Yatan hastaların 7'sinde (%16,3) öyküde COVID-19 enfeksiyonu olan bireyle temas olduğu öğrenildi. Bu hastaların 6'sında COVID-19 pnömonisi mevcuttu. Ayaktan hasta grubunda ise öyküde temas mevcut değildi.

4.1.10. Trakeostomi Varlığı

Yatan hasta grubunda 5 hastada (%11,6) ve ayaktan hasta grubunda ise 1 hastada (%4,2) başvuru sırasında trakeostomi mevcuttu. Bu açıdan iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p=0,408$) (Tablo 4.1).

4.1.11. Gastrostomi Varlığı

Yatan hasta grubunda 3 hastada (%7,0) ve ayaktan hasta grubunda ise 1 hastada (%4,2) başvuru sırasında gastrostomi olduğu görüldü. İki grup değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=1,000$) (Tablo 4.1).

4.1.12. Yoğun Bakım Ünitesine Kabul

Yatan hasta grubundan 11 hasta (%25,6) çocuk acil polikliniği başvurusundan sonra çocuk yoğun bakım ünitesine kabul edildi (Tablo 4.1).

4.1.13. Başvuru Anındaki Fizik Muayene Bulguları

Yatan hastaların 28'inde (%65,1) ve ayaktan takip edilen hastaların ise 10'unda (%41,7) ral mevcuttu ($p=0,110$). Ronküs ise fizik muayenede yatan hastaların 17'sinde (%39,5) ve ayaktan hastaların ise 10'unda (%41,7) tespit edildi ($p=1,000$). Kaba solunum sesleri her iki grupta da mevcuttu, yatan hastaların 22'sinde (%51,2), ayaktan hastaların 16'sında (%66,7) eşlik etmekteydi ($p=0,332$). Ekspiryumda uzama yatan hastaların 20'sinde (%46,5) ve ayaktan hastaların ise 8'inde (%33,3) mevcuttu ($p=0,429$). Dinlemekle solunum seslerinde azalma yatan hastaların 12'sinde (%27,9) ve ayaktan hastaların ise 3'ünde (%12,5) tespit edildi ($p=0,252$). Takipne yatan hastaların 36'sında (%83,7) ve ayaktan hastaların ise 16'sında (%66,7) vardı ($p=0,194$). Satürasyon düşüklüğü yatan hastaların 32'sinde (%77,4) mevcutken ayaktan hastaların 7'sinde (%29,2) mevcuttu ($p=0,001$). Solunum sıkıntısının bir belirtisi olan yardımcı solunum kaslarının kullanımı ise yatan hastaların 25'inde (%58,1), ayaktan hastaların ise 4'ünde (%16,7) fark edildi ($p=0,002$). Başvuru anında yatan hastaların 12'sinde (%27,9) ve ayaktan hastaların

ise 3'ünde (%12,5) ateş tespit edildi ($p=0,252$). Taşikardi ise yatan hastaların 29'unda (%67,4) ve ayakta hastaların ise 8'inde (%33,3) başvuru anında eşlik ediyordu ($p=0,015$). Kan basıncı yüksekliği ise başvuru anında sadece yatan hastaların birinde (%2,3) mevcuttu. Hipotansiyon da başvuru anında sadece yatan hasta grubundaki hastalarda görüldü ve 3 hastada (%7,0) tespit edildi. Hepatomegali sadece 4 hastada (%9,3) fizik muayene bulgusu olarak karşımıza çıktı ve hastaların tamamı yatan hasta grubundaydı. Splenomegaliye hiçbir hastada rastlanmadı. Yatan ve ayakta hasta grubundan birer hastada eşlik eden döküntü mevcuttu (sırasıyla %2,3 ve %4,2). Kardiyak üfürüm ise yatan hastaların 5'inde (%11,6), ayakta hastaların ise 2'sinde (%8,3) tespit edildi.

4.1.14. İnotrop Tedavi İhtiyacı

Yatan hastaların 5'inde (%11,6) dolaşım yetmezliği sebebi ile inotrop tedavi ihtiyacı oldu.

4.1.15. Solunum Desteği İhtiyacı

Yatan hasta grubundan 36 hastanın (%83,7) oksijen veya solunum desteği ihtiyacı oldu. Hastaların 16'sı (%37,2) serbest oksijen desteği gerektirirken 6 hastaya (%14,0) high-flow oksijen desteği sağlandı. Altı hastaya (%14,0) non invaziv mekanik ventilasyon ve 8 hastaya (%18,6) ise invazif mekanik ventilasyon ile solunum desteği sağlandı. Ayaktan hasta grubundan 4 hastanın (%16,7) serbest oksijen desteğine ihtiyacı olurken 1 hastanın (%4,2) ise kullanmakta olduğu '*Bi-level Positive Airway Pressure*' cihaz ayarlarında basınç artışı yapıldı.

4.1.16. Taburculuk

Hastaneye yatışı yapılan 43 hastanın 1'i eksitus oldu; diğer 42 hasta (%97,7) sağlıklı bir şekilde taburcu edildi (Tablo 4.1).

4.1.17. Yeniden Başvuru ve Yeniden Hastaneye Yatış İhtiyacı

Servis yatışından sonra taburcu edilen 42 hasta içinden 8 hastanın (%19,0) yeniden başvuruda bulunduğu ve bu 8 hastadan da 3'ünün (%7,1) tekrar servislere yatırıldığı tespit edildi. Ayaktan takip edilen 24 hastadan ise 2 hastanın (%8,3) yeniden başvuruda bulunduğu ancak takiplerine yine ayaktan devam edildiği görüldü.

4.2. Tanıya Yönelik Yapılan Tetkikler

4.2.1. Solunum Yolu Viral Paneli

Yatan hastaların hepsinde solunum yolu viral paneli değerlendirmesi yapılırken ayaktan hasta grubunda 2 hastada (%8,3) bu tetkik yapılamadı.

Yatan hasta grubunda 14 hastada (%32,6) multipleks PCR negatif sonuçlandı. Etken tespit edilen grupta en sık etken rinovirus olup toplam 17 hastada (%39,5) konfirme edildi. Geriye kalanlardan 10 (%23,3) hastada SARS-CoV-2, 1 (%2,3) hastada RSV B ve 1 (%2,3) hastada RSV A tespit edildi.

Ayaktan hasta grubunda 7 hastada (%29,2) alınan PCR sonucunun negatif olduğu görüldü. Tespit edilen en sık etkenin rinovirüsler olduğu görüldü (n=13, %54,2). Kalan iki hastadan birinde (%4,2) SARS-CoV-2 ve diğerinde ise RSV B pozitifliği saptandı.

4.2.2. Solunum Yolu Bakteri Paneli

Yatan hasta grubunda bir hastada (%2,3) *S. pneumoniae* izole edildi. *H. influenzae* ise etken olarak yatan hasta grubunda 3 hastada (%7), ayaktan hasta grubunda ise 1 hastada (%4,2) tespit edildi. Yatan hasta grubunda 38 hastada (%88,4) bakteri paneli negatif sonuçlandı.

Ayaktan tedavi alan hasta grubunda ise solunum yollarında bakteriyel etken 20 hastada (%83,3) tespit edilemedi. Biri yatan hasta grubundan diğer üçü ise ayaktan hasta grubundan olmak üzere toplamda 4 hastada bu panel çalışılmadı.

4.2.3. Kan Aerob Kültürü

Yatan hastaların 29'unda (%67,4) kan aerob kültür tetkiki mevcuttu. Alınan bu örneklerin sadece birinde üreme oldu ve ajan *Pseudomonas* spp. olarak rapor edildi. Ayaktan takip edilen hastaların da birine ait kan kültürü bulunmaktaydı, bu örnekte üreme olmadı.

4.2.4. İdrar Aerob Kültürü

Yatan hasta grubuna ait 8 hastada (%18,6) idrar kültürü örneği çalışıldı, bunların üç tanesinde üreme saptandı. Saptanan etkenler bir hastada *Escherichia coli*, bir diğer hastada *Enterococcus faecalis* ve diğer bir hastaya ise *Klebsiella* spp.ve *Pseudomonas* spp. olarak rapor edildi. Ayaktan hasta grubunda ise sadece bir hastaya ait idrar kültürü mevcut olup bu örnekten herhangi bir etken izole edilemedi.

4.2.5. Dışkı Aerob Kültürü

Sadece iki hastaya ait dışkı aerob kültürü bulunmaktaydı ve bu iki hasta da yatan hasta grubunda olup örneklerden herhangi bir etken izole edilemedi.

4.2.6. Diğer Vücut Sıvılarından ve Kateterden Elde Edilen Kültürler

Bu örnekler sadece yatan hastalarda çalışıldı. Bir hastada açlık mide suyu örneklerinden bakteri, mantar ya da tüberküloz etkeni üretilmedi. Bir hastanın izleminde kateter aerob kültüründe metisilin dirençli *Staphylococcus hominis* ve *Acinetobacter* spp. üremesi oldu. Başka bir hastanın kateter aerob kültüründe ise metisilin dirençli *Staphylococcus haemolyticus* üremesi oldu. İki hastadan elde edilen plevra sıvısından yollanan aerob, anaerob, mantar ve tüberküloz kültürlerinde üreme olmadığı saptandı. Bir başka hastada ise etken olarak plevra sıvısı aerob kültüründe *S. pyogenes* ve mantar kültüründe *Aspergillus* spp. üretildi; bu hastadan alınan plevra sıvısı anaerob ve tüberküloz kültürlerinde etken gösterilemedi. Bir hastadan elde edilen püü kültürlerinde ise aerob kültürde metisilin duyarlı *S. aureus* üremesi olurken eş zamanlı elde edilen anaerob, mantar ve tüberküloz kültürlerinde üreme olmadı.

4.3. Radyolojik Bulgular

4.3.1. Akciğer Grafileri

Bütün hastaların posteroanterior akciğer grafileri (PAAG) mevcuttu. Yatan hastaların 42'sinde (%97,7) ayakta hastaların ise 23'ünde (%95,8) grafide infiltrasyon görüldü ($p=1,000$). İnfiltrasyon tiplerine daha detaylı bakıldığında yatan hastaların 16'sında retiküler infiltrasyon, 6'sında nodüler infiltrasyon, 20'sinde ise retikülonodüler infiltrasyon saptandı. Atelektazi yatan hastaların 14'ünde (%32,6), ayakta hastaların ise 11'inde (%45,8) mevcuttu ($p=0,304$). Plevral effüzyon ise yatan hastaların 4'ünde (%9,3) saptanırken 1 hastada (%2,3) hem plevral hem de perikardiyal effüzyon olduğu tespit edildi. Pnömotoraks yatan hastaların 2'sinde (%4,7) mevcuttu. Pnömomediastinum ise yatan hastaların 4'ünde (%9,3) tespit edildi.

4.3.2. Toraks Bilgisayarlı Tomografisi

Yatan hastaların 14'ünde (%32,5) toraks bilgisayarlı tomografi (BT) tetkiki gerçekleştirildi. Bu görüntülemelerin 5'inde COVID-19 pnömonisi lehine bulgular olup ikisinde ise bulgulara ampiyem de eşlik ediyordu. Hastaların ikisinde masif olmak üzere toplam 3 hastada plevral effüzyon mevcuttu. Görüntülemelerin 6'sında buzlu cam dansitesinde alanlar mevcuttu. Görüntülemelerin 7'sinde konsolidasyon mevcuttu. Ek olarak üç görüntülemelerde atelektazi ve birinde de küçük hava yolu hastalığı varlığı saptandı.

4.3.3. Ekokardiyografi

Yine yatan hasta grubunda 14 (%32,5) hastaya ekokardiyografi tetkiki yapıldı. Bunların birinde yeni gelişen miyokardit ve bir diğer hastada ise sağ ventrikülde genişleme saptandı; diğer yapılan tetkiklerde ek patolojiye rastlanmadı.

4.3.4. Elektrokardiyogram

Ayaktan hasta grubundan 2 hastanın, yatan hasta grubundan ise 32 (%74,4) hastanın elektrokardiyogram kaydı mevcuttu. Ayaktan tedavi alan hastaların ikisinde sinüs taşikardisi saptandı. Yatan hastaların ise 12'sinde sinüs taşikardisi, 2'sinde T dalgası negatifliği, birinde hem sinüs taşikardisi hem T dalgası negatifliği ve birinde ise T dalgası sivriligi tespit edildi.

4.3.5. Ek Görüntülemeler

Yatan hastaların ikisinde yapılan abdomen US'de hepatomegali saptandı. Bir hastanın abdominal BT'sinde üriner enfeksiyon ve konglomere lenfadenopatiler saptandı. İki hastada yapılan renal US görüntülemesi normal olarak sonuçlandı. Bir hastada yapılan kardiyak manyetik rezonans görüntülemesinde miyokardit saptandı. Bronkoskopi yapılan bir hastada pulmoner hemoraji varlığı tespit edildi. İki hastaya yapılan akciğer US'de ise birinde plevral effüzyon diğerinde de hem plevral effüzyon hem de atelektazi olduğu görüldü.

4.4. Etkene Göre Pnömoni Sınıflaması

Etken tespitinde hastalardan alınan solunum yolu viral paneli, solunum yolu bakteri paneli, kan kültürü, plevral sıvı kültürü sonuçları yol gösterici oldu. Etkenleri belli olan hastalar içinde yatan hastaların 30'u (%69,8); ayaktan hasta grubunun ise 15'i (%62,5) olmak üzere toplamda 45 hasta viral pnömoni olarak değerlendirildi. Üçü de yatan hasta grubuna ait olmak üzere toplamda 3 hasta (%7) bakteriyel pnömoni olarak değerlendirildi. Yatan hasta grubunda 10 hastada (%23,2) ve ayaktan hasta grubunda ise 9 hastada (%37,5) bakteriyel ya da viral etken tespit edilemedi.

4.5. Serum ve Tükürük Analizleri

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan serum ayrıldı. Toplamda 43 yatan grubundan ve 24 ayaktan hasta grubundan olmak üzere 67 hastanın serumu ayrıldı. Kontrol grubundan ise 22 katılımcıdan 21 katılımcının (%95,5) serum örneği ayrıldı.

Tükürük örneklerinin çalışılması yatan hasta grubunda 22 hastada (%51,2) ve ayakta hasta grubunda ise 11 hastada (%45,8) mümkün oldu. Kontrol grubunda ise 22 hastanın 20'sinin tükürük örnekleri toplanabildi. Ayrıca kontrol grubunda alınan bir örnek analiz sırasında sonuç vermemesi nedeni ile dahil edilmedi ve sonuç olarak kontrol grubunda 19 katılımcının (%86,4) tükürük analizi yapılabildi.

4.5.1. Yatan ve Ayaktan Takip Edilen Hasta Gruplarında Tam Kan Sayımı ve Akut Faz Reaktanı Değerlerinin İncelenmesi

Tam kan sayımı ve akut faz reaktanı değerleri Tablo 4.2'de görülmektedir.

Hastaların tam kan sayımı değerleri incelendiğinde yatan hasta grubunun ortalama hemoglobin değeri 12,30 gr/dL (IQR, 11-13,7 gr/dL) ve ayakta hasta grubunda ise ortalama değeri 13,25 gr/dL (IQR, 12,3-13,97 gr/dL) olarak saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p değeri=0,063) (Tablo 4.2).

Yatan hasta grubunda ortalama lökosit değeri 11.000/ μ L (IQR, 6.900-15.100/ μ L) ve ayakta hasta grubunda ise 10.800/ μ L (IQR, 8250-14600/ μ L) olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında lökosit değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,534) (Tablo 4.2).

Hastaların başvuru anındaki tam kan sayımı sonuçları incelendiğinde lenfosit değerleri yatan hasta grubunda 2.680/ μ L (IQR, 1.550-4.180/ μ L) olarak tespit edildi. Ayaktan tedavi alan ve takip edilen hastaların ise ortalama lenfosit değerleri 2.855/ μ L (IQR, 2.280-4.362/ μ L) olarak saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (p=0,327) (Tablo 4.2).

Her iki grubun nötrofil sayıları incelendiğinde yatan hasta grubunun ortalama değerinin 6.290/ μ L (IQR, 4.000-9.070/ μ L) olduğu ve ayakta hastaların ortalama değerinin ise 5.750/ μ L (IQR, 4.327-9.637/ μ L) olduğu görüldü (p=0,676) (Tablo 4.2).

Trombosit değerleri analiz edildiğinde yatan hasta grubunda ortalama değeri 316.000/ μ L (IQR, 211.000-381.000/ μ L) olduğu ve ayakta hasta grubunda ise ortalama değeri 312.500/ μ L (IQR, 223.000-387.500/ μ L) olduğu tespit edildi. Trombosit

değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p değeri=0,906) (Tablo 4.2).

Hastaların başvuru anındaki tam kan sayımı sonuçları incelendiğinde yatan hasta grubunda MPV değerlerinin ortancası 7,8 fL (IQR, 7,2-8,5 fL) olarak tespit edildi. Ayaktan tedavi alan ve takip edilen hastaların ise ortalama MPV değeri 8,1 fL (IQR, 7,6-8,6 fL) olarak saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (p=0,468) (Tablo 4.2).

Nötrofil-lenfosit oranı değerleri analiz edildiğinde yatan hasta grubunda ortalama değerin 2,3090 (IQR, 1,5742-4,5250) olduğu görüldü. Ayaktan hasta grubunda ise ortalama değer 2,4495 (IQR, 1,3990-3,9824) olarak tespit edildi. Bu değerler açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p değeri=0,666) (Tablo 4.2).

Bir akut faz reaktanı olan ESR değerleri her iki hasta grubu için de incelendiğinde yatan hasta grubunda ortalama değerin 13 mm/saat (IQR, 5-27 mm/saat) olduğu görüldü. Ayaktan hasta grubu için de bu parametre analiz edildiğinde ortalama değerin 4,50 mm/saat (IQR, 2-18,50 mm/saat) olduğu görüldü. Bu parametre iki hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,052) (Tablo 4.2).

Diğer bir akut faz reaktanı olan CRP analiz edildiğinde yatan hasta grubu için ortalama değer 2,65 mg/dL (IQR, 0,7-8,3 mg/dL) ve ayaktan hasta grubunda ise ortalama değer 0,71 mg/dL (IQR, 0,51-1,33 mg/dL) olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında CRP değerleri incelendiğinde yatan hasta grubunda belirgin olarak yükseklik olduğu görüldü ve istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulundu (p=0,003) (Tablo 4.2).

Prokalsitoninin başvuru anındaki seviyeleri değerlendirildiğinde yatan hasta grubu için ortalama değer 0,15 ng/mL (IQR, 0,06-0,95 ng/mL) ve ayaktan hasta grubu için ortalama değer 0,07 ng/mL (IQR, 0,04-0,10 ng/mL) olarak tespit edildi. Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (p=0,007) (Tablo 4.2).

Yatan hastaların 36'sında ayaktan hastaların ise 12'sinde kan gazı değerlendirmesi mevcuttu. Laktat değerleri analiz edildiğinde yatan hastalar için ortanca değer 1,40 mmol/L (IQR, 1,02-1,90 mmol/L) iken ayaktan hastalar için ortanca değer 1,35 mmol/L (IQR, 1,22-1,92 mmol/L) olarak bulundu. Laktat değerleri açısından bu iki grup arasında bir fark bulunamadı ($p=0,559$). Ph değerleri açısından bakıldığında ortanca değer yatan hasta grubunda 7,37 mmHg (IQR, 7,33-7,42 mmHg) ve ayaktan hasta grubunda ise 7,42 mmHg (IQR, 7,37-7,45 mmHg) olarak bulundu. ph değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,178$).

4.5.2. Hasta ve Kontrol Gruplarında Serum TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TFN- α Seviyelerinin Analizi

Serum analiz sonuçlarının tamamı Tablo 4.2'de görülmektedir.

Hem hasta gruplarında hem de kontrol grubunda her katılımcının serum örneği için TLR-2 seviyesi ölçümü gerçekleştirildi. Yatan hasta grubu için analiz yapıldığında ortanca değer 4,06 ng/mL (IQR, 2,90-8,53 ng/mL) olduğu ve ayaktan hasta grubuna ait katılımcılar için ortanca değer 4,72 ng/mL (IQR 3,44-6,92 ng/mL) olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise ortanca değer 4,38 ng/mL (IQR, 2,80-6,15 ng/mL) olarak tespit edildi. Bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,832$) (Tablo 4.2).

Yatan ve ayaktan hasta grubu ile sağlıklı katılımcıların serumlarında bulunan TLR-4 ölçümleri yapıldığında ortanca değerler sırası ile 2,13 ng/L (IQR, 1,64-3,65 ng/L), 2,04 ng/L (IQR, 1,65-3,73 ng/L) ve 2,78 ng/L (IQR, 1,83-3,41 ng/L) olarak bulundu. İstatistiksel açıdan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,806$) (Tablo 4.2).

Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcıların serum örneklerinde IL-1 β seviyeleri ölçüldüğünde yatan hasta grubunda ortanca değer 302,73 pg/L (IQR, 200,54-1601,10 pg/L) ve ayaktan hasta grubunda ortanca değer 390,78 pg/L (IQR, 228,14- 980,78 pg/L) olarak saptandı. Kontrol grubunun ortanca değerinin 367,17 pg/L (IQR, 259,15- 777,59 pg/L) olduğu tespit edildi. İstatistiksel açıdan bu gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p= 0,936$) (Tablo 4.2).

Analiz edilen sitokinlerden bir diğeri ise IL-4 idi. Bu sitokinin serum düzeyi tüm katılımcılarda ölçüldü. Yatan hastalarda ortalama değer 118,07 ng/L (IQR, 75,30-322,24 ng/L) ve ayaktan takip edilen hasta grubunda ise ortalama değer 118,57 ng/L (IQR, 69,34-237,01 ng/L) olarak bulundu. Kontrol grubunun ortalama değerinin 111,66 ng/L (IQR, 86,63-161,74 ng/L) olduğu görüldü. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p=0,806$) (Tablo 4.2).

Hem hasta gruplarında hem de kontrol grubunda her katılımcının serum örneklerinde IL-6 için ölçüm gerçekleştirildi. Yatan hasta grubu için analiz yapıldığında IL-6 seviyesi için ortalama değer 43 ng/L (IQR, 22,37-92,07 ng/L) olduğu görüldü. Ayaktan hasta grubuna ait katılımcılar için ortalama değer 47,05 ng/L (IQR, 31,00-78,36 ng/L) olarak tespit edildi. Kontrol grubunda ise ortalama değer 51,41 ng/L (IQR, 38,14-78,19 ng/L) olarak saptandı. Bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,593$) (Tablo 4.2).

Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcıların serum örneklerinde IL-10 seviyeleri ölçüldüğünde yatan hasta grubunda ortalama değer 155,80 pg/mL (IQR, 86,70-333,28 pg/mL) olarak bulundu. Ayaktan hasta grubunda ise ortalama değer 129,71 pg/mL (IQR, 103,65-229,82 pg/mL) olarak saptandı. Kontrol grubunun ortalama değeri 126,90 pg/mL (IQR, 109,65-168,82 pg/mL) olarak tespit edildi. İstatistiksel açıdan bu gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,940$) (Tablo 4.2).

IFN- α tüm katılımcıların serum örneklerinde incelendiğinde yatan hasta grubunda ortalama değer 209,18 pg/mL (IQR, 106,31-575,73 pg/mL) şeklindeydi. Ayaktan tedavi alan hasta grubunda ortalama değer 189,50 pg/mL (IQR, 93,95-456,83 pg/mL) olarak bulundu. Sağlıklı katılımcıların mevcut olduğu grupta ise ortalama değer 163,82 pg/mL (IQR, 140,34-272,94 pg/mL) olduğu görüldü. Bu gruplar arasında IFN- α serum seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,809$) (Tablo 4.2).

Ağır ya da hafif pnömoni geçiren gruplar ve sağlıklı katılımcıların serumlarında bulunan TNF- α ölçümleri yapıldığında ortalama değerler sırası ile 79,07 ng/L (IQR, 52,00-177,75 ng/L), 70,36 ng/L (IQR, 53,76-133,63 ng/L) ve 75,95 ng/L (IQR, 64,16-112,80 ng/L) olarak bulundu. İstatistiksel açıdan gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,686$) (Tablo 4.2).

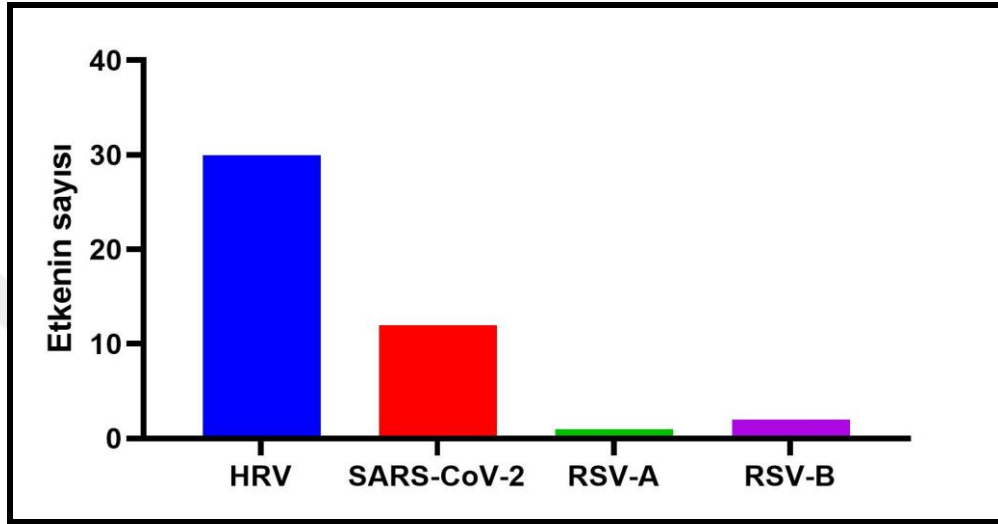
Tablo 4.2. Yatan-ayaktan hasta grubu ve kontrol grubu için değerlendirilen serum parametreleri

Serum parametreleri	Yatan Hasta (n=43)	Ayaktan Hasta (n=24)	Kontrol (n=21)	p değeri
Hemoglobin, gr/dL median (IQR)	12,30 (11,00-13,70)	13,25 (12,30-13,97)	NA	0.063
Lökosit, / μ l median (IQR)	11.000 (6.900-15.100)	10.800 (8.250-14.600)	NA	0.534
Lenfosit, / μ l median (IQR)	2.680 (1.550-4.180)	2.855 (2.280-4.362)	NA	0.327
Nötrofil, / μ l median (IQR)	6.290 (4000-9.070)	5.750 (4.327-9.637)	NA	0.676
Trombosit, / μ l median (IQR)	316.000 (211.000-381.000)	312.500 (223.000-387.500)	NA	0.906
MPV, fL median (IQR)	7,8 (7,2-8,5)	8,1 (7,6-8,6)	NA	0.468
Nötrofil/lenfosit median (IQR)	2,3090 (1,5742-4,5250)	2,4495 (1,3990-3,9824)	NA	0.666
ESR, mm/saat median (IQR)	13 (5-27)	4,50 (2-18,25)	NA	0,052
CRP, mg/dL median (IQR)	2,65 (0,7-8,3)	0,71 (0,51-1,33)	NA	0,003*
Prokalsitonin, ng/mL median (IQR)	0,15 (0,06-0,95)	0,07 (0,04-0,10)	NA	0,007*
TLR-2, ng/mL median (IQR)	4,06 (2,90-8,53)	4,72 (3,44-6,92)	4,38 (2,80-6,15)	0.832
TLR-4, ng/L median (IQR)	2,13 (1,64-3,65)	2,04 (1,65-3,73)	2,78 (1,83-3,41)	0,806
IL-1 β , pg/L median (IQR)	302,73 (200,54-1601,10)	390,78 (228,14-980,78)	367,17 (259,15-777,59)	0,936
IL-4, ng/L median (IQR)	118,07 (75,30-322,24)	118,57 (69,34-237,01)	111,66 (86,63-161,74)	0.696
IL-6, ng/L median (IQR)	43,00 (22,37-92,07)	47,05 (31,00-78,36)	51,41 (38,14-78,19)	0,593
IL-10, pg/mL median (IQR)	155,80 (86,70-333,28)	129,71 (103,65-229,82)	126,90 (109,65-168,82)	0,940
IFN- α , pg/mL median (IQR)	209,18 (106,31-575,73)	189,50 (93,95-456,83)	163,82 (140,34-272,94)	0,809
TNF- α , ng/L median (IQR)	79,07 (52,00-177,75)	70,36 (53,76-133,63)	75,95 (64,16-112,80)	0,686

*İstatistiksel anlamlı, $p < 0,05$

4.5.3. Viral Pnömoni Olarak Değerlendirilen Hastalarla Etken Tespit Edilemeyen Diğer Pnömoni Hastalarının Serumlarında Bulunan Sitokin ve Reseptör Seviyelerinin Karşılaştırılması

Hastalar etkenlerine göre sınıflandırıldı. Toplamda 45 viral pnömoni hastası saptandı. Viral pnömonilerin dağılımı Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1. Viral pnömonilerde etken olarak tespit edilen virüslerin dağılımı

Tanı yöntemleri ile etken tespit edilemeyen 19 pnömoni hastası ile 45 viral pnömoni hastasının serum sitokin ve reseptör seviyeleri ayrıca karşılaştırıldı. Etken olarak bakteri türleri saptanan üç hasta grubun sayıca az olması nedeni ile bu hastaların verileri karşılaştırmaya dahil edilmedi. Dahil edilen 64 hastanın tümünden alınan serum örneklerinde yapılan TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α ölçümleri karşılaştırıldı (Tablo 4.3).

Hastaların serum örneklerinde TLR-2 ekspresyonu incelendiğinde viral pnömonilerde ortalama değer 5,35 ng/mL (IQR, 3,34-8,61 ng/mL) olarak saptandı. Etken saptanamayan hastaların serumlarında ise ortalama değer 4,76 ng/mL (IQR, 2,94-7,77 ng/mL) bulundu ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p=0,343$) (Tablo 4.3).

Viral etken saptanmış hastaların ortalama TLR-4 değerinin 2,56 ng/L (IQR, 1,70-3,89 ng/L) olduğu görüldü. Etken saptanmayan diğer pnömoni grubunda ise ortalama değer 2 ng/L (IQR, 1,37-3,40 ng/L) olarak bulundu. Bu parametre açısından iki grup arasında bir farklılık bulunmadı ($p= 0,270$) (Tablo 4.3).

İnflamasyon yanıtı açısından önemli bir sitokin olan IL-1 β ortanca değeri viral ve diğer pnömoniler için sırasıyla 457,73 pg/L (IQR, 220,84-1427,94 pg/L) ve 246,57 pg/L (IQR, 186,52-322,24 pg/L) olarak ölçüldü. İki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p=0,419) (Tablo 4.3).

Viral pnömoniler için ortanca IL-4 değeri 172,05 ng/L (IQR, 75,50-308,01 ng/L) ve diğer gruptaki pnömoni hastaları için ise bu değer 97,77 ng/L (IQR, 65,80-322,24 ng/L) olarak bulundu. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,572) (Tablo 4.3).

Viral pnömoni hastalarında ortanca IL-6 değeri 58,78 ng/L (IQR, 26,31-91,01 ng/L) ve diğer pnömonilerde ise ortanca değer 43 ng/L (IQR, 22,71-109,13 ng/L) olup gruplar arasında fark olmadığı görüldü (p=0,612) (Tablo 4.3).

IL-10 seviyesi viral pnömonilerde ortanca 155,45 pg/mL (IQR, 99,05-317,64 pg/mL) olup diğer pnömonilerde ortanca 116,75 pg/mL (IQR, 83,23-287,82 pg/mL) olarak tespit edildi. IL-10 seviyeleri açısından her iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0,362) (Tablo 4.3).

IFN- α serum ekspresyon seviyeleri tüm hastalar için ayrı ayrı analiz edildiğinde viral pnömoniler için ortanca 322,77 pg/mL (IQR, 113,28-540,61 pg/mL) ve diğer pnömoniler için ise ortanca 139,40 pg/mL (IQR, 112,60-721,75 pg/mL) olarak bulundu. İstatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı bir fark görülmedi (p= 0,414) (Tablo 4.3).

Viral pnömonisi olan hastaların serum ortanca TNF- α seviyesi 95,88 ng/L (IQR, 56,94-168,04 ng/L) ve diğer pnömoniler için 73,37 ng/L (IQR, 51,78-168,97 ng/L) olarak bulundu. Bu iki grup arasında TNF- α ekspresyonları açısından anlamlı bir fark bulunmadı (p= 0,454) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Viral pnömoniler ve diğer pnömoniler (etken tespit edilemeyen) için serum TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeyleri

Serum parametreleri	Viral Pnömoniler (n=45)	Diğer pnömoniler (n=19)	p değeri
TLR-2, ng/mL median (IQR)	5,35 (3,34-8,61)	4,76 (2,94-7,77)	0,343
TLR-4, ng/L median (IQR)	2,56 (1,70-3,89)	2,00 (1,37-3,40)	0,270
IL-1 β , pg/L median (IQR)	457,73 (220,84-1427,94)	246,57 (186,52-1601,10)	0,419
IL-4, ng/L median (IQR)	172,05 (75,50-308,01)	97,77 (65,80-322,24)	0,572
IL-6, ng/L median (IQR)	58,78 (26,31-91,01)	43,00 (22,71-109,13)	0,612
IL-10, pg/mL median (IQR)	155,45 (99,05-317,64)	116,75 (83,23-287,82)	0,362
IFN- α , pg/mL median (IQR)	322,77 (113,28-540,61)	139,40 (112,60-721,75)	0,419
TNF- α , ng/L median (IQR)	95,88 (56,94-168,04)	73,37 (51,78-168,97)	0,454

4.5.4. COVID-19 Pnömonisi Tanısı Alan Hastalar ile Diğer Virüslerin Neden Olduğu Pnömoni Tanısı ile İzlenen Hastaların Serum Örneklerinde Bakılan Sitokin ve Reseptör Düzeyi Analizleri

Viral pnömoni tanısı alan 45 hasta içinde 12 hasta COVID-19 pnömonisi ve 33 hasta COVID-19 dışı viral pnömoni tanısı aldı ve bu hastaların serum TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeyleri ayrıca değerlendirildi (Şekil 4.2). COVID-19 pnömonisi tanısı alan hastalardan sadece serum örneği çalışıldı. Güvenlik sebebi ile tükürük örnekleri bu hastalardan alınmadı; bu sebeple tükürük örneklerinde sitokin ve reseptör yanıtları değerlendirilemedi.

COVID-19 pnömonisi olan hastaların serum örneklerindeki TLR-2 yanıtları diğer viral pnömoni hastaları ile karşılaştırıldığında bu yanıtın belirgin olarak daha az olduğu görüldü ($p=0,029$) (Şekil 4.2). Ortanca TLR-2 değeri COVID-19 pnömonisi olan hastalar için 3,50 ng/mL (IQR, 2,80-5,56 ng/mL) ve diğer viral pnömoniler için ise 7,02 ng/mL (IQR, 3,58-9,12 ng/mL) olarak saptandı.

TLR-4 yanıtlarına bakıldığında ise etken olarak COVID-19 saptanan pnömoni hastalarında ortalama 1,81 ng/L (IQR, 1,40-2,97 ng/L) ve diğer viral pnömoniler için ortalama 3,13 ng/L (IQR, 1,77-4,12 ng/L) olarak saptandı. Bu reseptör yanıtının COVID-19 hastalarında daha düşük seviyede olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,049$) (Şekil 4.2).

Çalışmada analiz edilen sitokinlerden biri olan IL-1 β 'nin serum düzeyleri de COVID-19 pnömonisi olan hastalarda daha düşük seviyede saptandı ($p=0,022$) (Şekil 4.2). COVID-19 hastalarında ortalama IL-1 β düzeyi 250,73 pg/L (IQR, 195,85-388,84 pg/L) ve diğer viral pnömoni hastalarında 915,88 pg/L (IQR, 249,07-1697,27 pg/L) olarak saptandı.

COVID-19 pnömonisi olan hastaların serumlarında IL-4 seviyeleri diğer viral pnömonilere göre daha düşük olarak bulundu ve bu fark anlamlıydı ($p=0,002$) (Şekil 4.2). Ortalama değer SARS-CoV-2'nin etken olduğu hastalarda 75,50 ng/L (IQR, 62,39-118,45 ng/L) iken, diğer virüslerin etken olarak saptandığı hastalarda ise 236,47 ng/L (IQR, 88,68-329,53 ng/L) şeklindeydi.

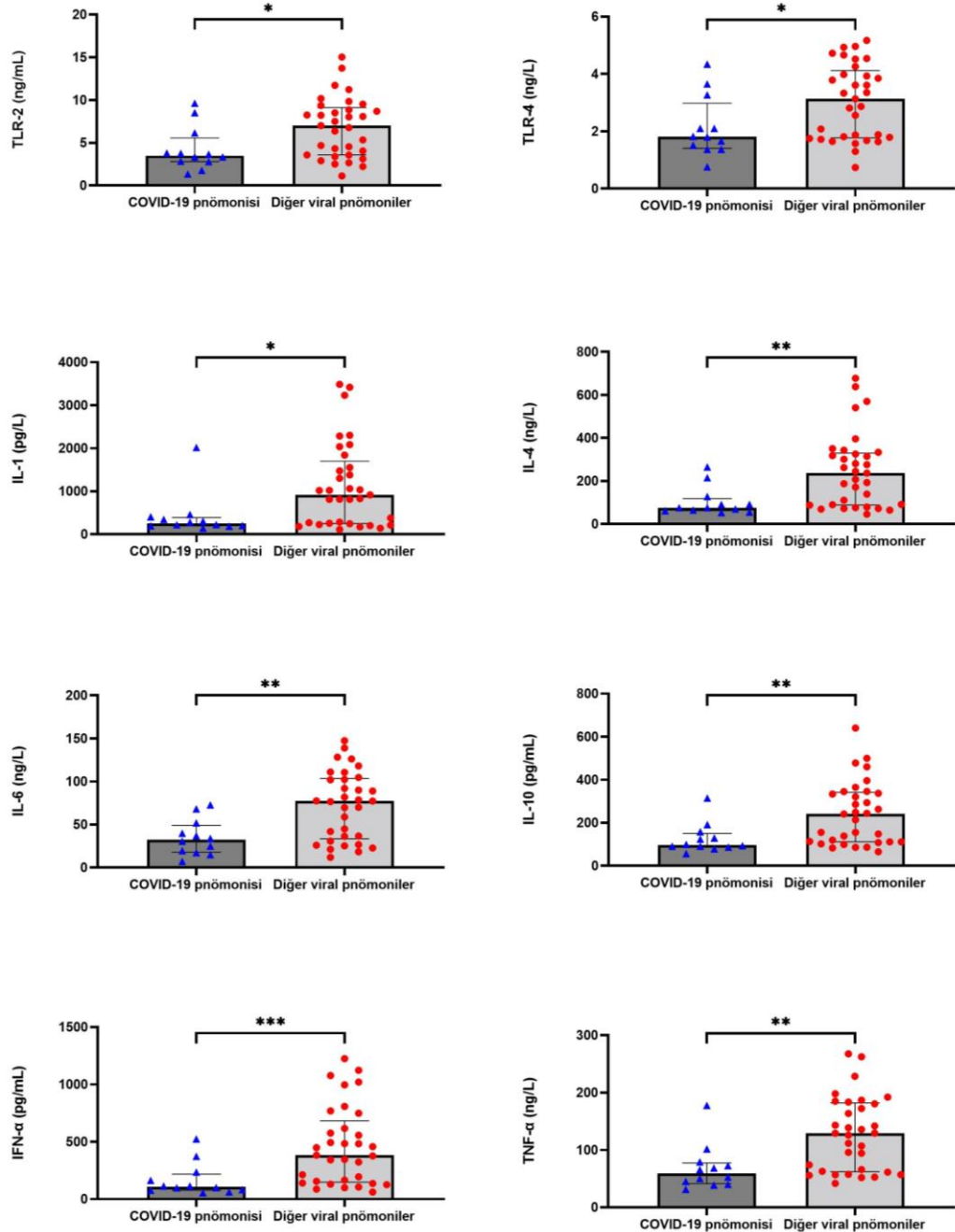
COVID-19 pnömoni tanısı alan hastalar için ortalama IL-6 değeri 32,18 ng/L (IQR, 17,90-48,97 ng/L) ve diğer viral etkenlerin saptandığı hastalarda ise ortalama 77,23 ng/L (IQR, 33,48-135,53 ng/L) olarak bulundu. IL-6 yanıtı diğer viral pnömonilerde daha yüksek olup aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,002$) (Şekil 4.2).

Hastaların serum örneklerinde çalışan sitokinlerden biri IL-10 idi. COVID-19 pnömoni hastalarında ortalama IL-10 değeri 96,24 pg/mL (IQR, 87,34-150,72 pg/mL) olarak saptanırken, diğer viral pnömonilerde ortalama değerin 241,03 pg/mL (IQR, 111,36-340,96 pg/mL) olduğu görüldü. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,007$) (Şekil 4.2).

IFN- α seviyeleri değerlendirildiğinde ise yine COVID-19 pnömonisi olan hastalarda diğer viral pnömonisi olan hastalara oranla belirgin olarak düşük olduğu bulundu ($p=0,001$) (Şekil 4.2). COVID-19 pnömonisi olan hastalarda ortalama değer 106,57 pg/mL (IQR, 77,64-217,84 pg/mL) iken diğer hastalarda 382,58 pg/mL (IQR, 148,21-683,03 pg/mL) olarak saptandı.

Son olarak TNF- α düzeyleri tüm viral pnömonisi olan hastalarda incelendi. COVID-19 pnömonisi olan hastalarda ortalama değer 59,16 ng/L (IQR, 41,32- 77,43

ng/L) olarak bulundu. Diğer viral pnömoni hastalarında ise ortanca değerin 129,06 ng/L (IQR, 62,16-182,02 ng/L) olduğu tespit edildi. İstatistiksel olarak aradaki bu fark anlamlı olarak bulundu ($p=0,002$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. COVID-19 pnömonisi olan hastalar ve diğer viral pnömoni hastalarının serum örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.

TLR-2 için $p=0,029$; TLR-4 için $p=0,049$; IL-1 β için $p=0,022$; IL-4 için $p=0,002$; IL-6 için $p=0,002$; IL-10 için $p=0,007$; IFN- α için $p=0,001$; TNF- α için $p=0,002$ (*: $0,01 < p \leq 0,05$, **: $0,001 < p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

4.5.5. COVID-19 Pnömonisi Olan Hastalar ile Kontrol Grubu Katılımcılarının Serum Örneklerinde Bakılan Sitokin ve Reseptör Düzeyi Analizleri

COVID-19 pnömonisi olan 12 hastaya ait serum örnekleri ve 21 kontrol katılımcıya ait serum örnekleri TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Analizler değerlendirildiğinde sadece IL-6 ve IFN- α açısından istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar olduğu görüldü (Şekil 4.3).

TLR-2 için değerlendirildiğinde, COVID-19 pnömonisi olan hastalarda ortalama değer 3,59 ng/mL (IQR, 2,80-5,56 ng/mL) olarak bulundu. Kontrol grubunda ise ortalama değer 4,38 ng/mL (IQR, 2,80-6,15 ng/mL) olduğu görüldü. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,291$) (Şekil 4.3).

Her iki grupta TLR-4 seviyeleri analiz edildiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,104$) (Şekil 4.3). COVID-19 pnömonisi olan hastalar için ortalama değer 1,81 ng/L (IQR, 1,40-2,97 ng/L) olarak saptanırken kontrol grubu için bu değer 2,78 ng/L (IQR, 1,83-3,41 ng/L) olarak bulundu.

IL-1 β için yapılan analizde de iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,163$) (Şekil 4.3). COVID-19 pnömonisi olan hastalar için ortalama değer 250,73 pg/L (IQR, 195,85-388,84 pg/L) olarak; kontrol grubu için ortalama değer ise 367,17 pg/L (IQR, 259,15-777,59 pg/L) olarak saptandı.

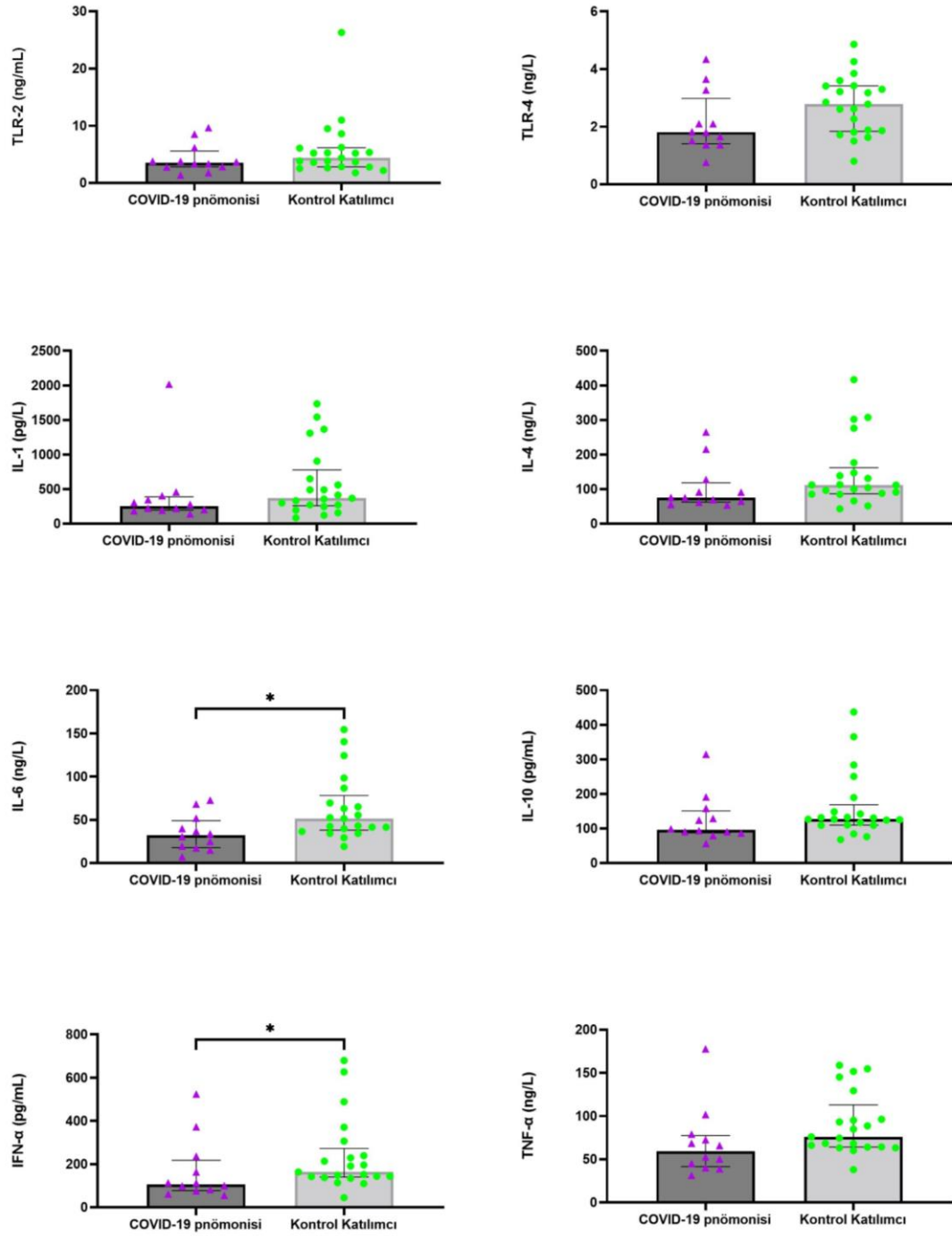
Gruplar arasında serum IL-4 düzeyleri karşılaştırıldığında, COVID-19 pnömonisi olan hastalar için ortalama değer 75,50 ng/L (IQR, 62,39-118,45 ng/L) olarak saptandı. Kontrol grubu için ise ortalama değer 111,66 ng/L (IQR, 86,63-161,74 ng/L) olduğu görüldü. Gruplar arasında anlamlı istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,063$) (Şekil 4.3).

Değerlendirilen bir diğer sitokin IL-6 idi. Bu sitokinin seviyeleri COVID-19 pnömonisi olan hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0,011$) (Şekil 4.3). COVID-19 pnömonisi için ortalama değer 32,18 ng/L (IQR, 17,90-48,97 ng/L) iken kontrol grubu için bu değer 51,41 ng/L (IQR, 38,14-78,19 ng/L) olarak bulundu.

IL-10 açısından her iki grup karşılaştırıldığında COVID-19 pnömonisi olan hastalar ve kontrol grubu katılımcıları için ortanca değerler sırası ile 96,24 pg/mL (IQR, 87,34-150,72 pg/mL) ve 126,90 pg/mL (IQR, 109,65-168,82 pg/mL) olarak bulundu. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,152$) (Şekil 4.3).

Gruplar arasında değerlendirilen serum biyobelirteçlerinden biri de IFN- α idi. COVID-19 pnömonisi olan hastalar ile kontrol katılımcılar arasında bu belirteç açısından yapılan değerlendirmede aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,044$) (Şekil 4.3). COVID-19 pnömonisi olan hastalarda bu sitokinin seviyeleri kontrol grubuna göre düşük olarak saptandı. Sırası ile ortanca değerlerin 106,57 pg/mL (IQR, 77,64-217,84 pg/mL) ve 163,82 pg/mL (IQR, 140,34-272,94 pg/mL) olduğu görüldü.

Son olarak TNF- α değerlendirildi. COVID-19 pnömonisi olan hastalarda ortanca değer 59,16 ng/L (IQR, 41,32-77,43 ng/L) olduğu, kontrol grubunda ise bu değer 75,95 ng/L (IQR, 64,16-112,80 ng/L) olduğu görüldü. İki grup arasındaki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,069$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. COVID-19 pnömonisi olan hastalar ile kontrol grubu katılımcılarının serum örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α düzeylerinin analizi.

p değerleri sırasıyla TLR-2 için 0,291; TLR-4 için 0,104; IL-1 β için 0,163; IL-4 için 0,063; IL-6 için 0,011; IL-10 için 0,152; IFN- α için 0,044; TNF- α için 0,069 olarak bulunmuştur (*: $0.01 < p \leq 0.05$, **: $0.001 < p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

4.5.6. Pnömonin Ağırlığına Göre Sınıflanan Hasta Gruplarında İncelenen Tükürük Örneklerinde Sitokin ve Reseptör Ölçümlerinin Karşılaştırılması

Toplamda 40 hasta ve 20 sağlıklı katılımcının tükürük örneğinde analizler yapıldı, ancak sonrasında kontrol grubundan elde edilen bir örneğin analiz sırasında herhangi bir sonuç vermediği görüldü ve bu örnek dışlandı. Sonuç olarak 19 yatan hastanın, 11 ayaktan hastanın ve 19 sağlıklı katılımcının tükürük örnekleri incelendi. Bu tükürük örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α çalışıldı. Aslında analiz edilmesi planlanan bir diğer sitokin olan IL-4 düzeyinin tükürük örneklerinde ölçümü yapılamadı (Tablo 4.4).

Grupların TLR-2 yanıtları incelendiğinde yatan hasta grubu için $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerlerinin ortancası 3,81 (IQR, 2,09-5,45) ve ayaktan hasta grubu için ortanca değer 2,16 (IQR, 0,78-7,87) olarak tespit edildi. Kontrol katılımcılar için ise ortanca değer 0,98 (IQR, 0,54-1,86) olarak bulundu. Yapılan analizlerde p değeri 0,003 olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığını detaylandırmak adına gruplar arasında ikili karşılaştırmalar yapıldı. Bu farkın kontrol ve yatan hasta grubuna dahil olan hastalardan kaynaklandığı tespit edildi ($p=0,002$) (Tablo 4.4).

Elde edilen tükürük örneklerinin TLR-4 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ düzeyleri değerlendirildi. Ortanca değer yatan hasta grubuna dahil olan katılımcılar için 4,26 (IQR, 2,52-6,51); ayaktan takip edilen hasta grubu için 2,18 (IQR, 0,63-6,59); sağlıklı kontroller için ise 0,97 (IQR, 0,57-1,81) olarak tespit edildi. Bu fark istatistiksel anlamlıydı ($p=0,002$). Yapılan ikili karşılaştırmalarda bu farkın yine kontrol katılımcılar ile yatan hasta grubundan kaynaklandığı gösterildi ($p=0,001$) (Tablo 4.4).

Serum örneklerinde olduğu gibi tükürük örneklerinde de değerlendirilen diğer bir önemli sitokin IL-1 β idi. Yapılan çalışmanın sonucunda yatan hastaların ortanca IL-1 β $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ katsayıları 1,01 (IQR, 0,66-1,42) olarak saptandı. Ayaktan hasta grubu için ortanca değer 1,20 (IQR, 0,59-1,55) şeklinde bulundu. Sağlıklı katılımcılar için ise ortanca değer 1,05 (IQR, 0,83-1,49) şeklinde tespit edildi. IL-1 β açısından bu üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterilemedi ($p=0,721$) (Tablo 4.4).

Yapılan analizlerde IL-6'nın tükürük seviyeleri açısından da gruplar arasında farklılıklar tespit edildi ($p=0,012$). Yatan hastalarda ortalanca IL-6 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ katsayısı 3,04 (IQR, 1,70-3,68) olarak saptandı. Ayaktan tedavi alan hastaların oluşturduğu grupta ise ortalanca değerin 1,90 (IQR, 0,62-2,60) olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise ortalanca değerin 0,79 (IQR, 0,64-2,11) olduğu saptandı. Bu fark ikili gruplar arasında değerlendirildiğinde kontrol grubu ile yatan hasta grubundan kaynaklandığı tespit edildi ($p=0,009$) (Tablo 4.4).

Tükürük örneklerinde IL-10 sitokininin $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ katsayıları değerlendirildiğinde yine yatan hasta grubunda ortalanca değerin ayaktan hasta ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü (sırasıyla 3,92 [IQR, 2,90-6,00]; 2,04 [IQR, 0,89-5,88]; 0,92 [IQR, 0,50-1,64]). Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,002$). Yapılan iki karşılaştırmalarda ise bu farkın yine kontrol ve yatan hasta grubu arasındaki farktan kaynaklandığı anlaşıldı ($p=0,001$) (Tablo 4.4).

IFN- α 'nın ortalanca $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ katsayısı yatan hasta grubunda 2,79 (IQR, 1,67-4,51) saptandı. Ayaktan takip edilen hastalar için ise ortalanca değerin 2,36 (IQR, 0,50-4,19) şeklinde olduğu tespit edildi. Kontrol grubu için ortalanca değer 0,90 (IQR, 0,64-1,64) olarak bulundu. Gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,018$). İleri değerlendirmede yine bu anlamlı farklılığın kontrol grubu ile yatan hasta grubu arasındaki farktan kaynaklandığı anlaşıldı ($p=0,014$) (Tablo 4.4).

Son olarak hasta ve kontrol gruplarındaki katılımcılardan elde edilen tükürük örneklerinde TNF- α sitokininin $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ katsayıları analiz edildi. Yatan hasta grubunda ortalanca değer 10,34 (IQR, 4,94-20,13) olarak tespit edildi. Ayaktan tedavi alan hasta grubunda ise ortalanca değerin 3,59 (IQR, 1,81-6,29) olduğu görüldü. Kontrol grubuna dahil olan katılımcıların örneklerinde ise ortalanca değer 0,96 (IQR, 0,28-3,22) olarak saptandı. Bu üç grup arasında istatistiksel olarak da anlamlı bir fark olduğu anlaşıldı ($p<0,001$). İleri inceleme için ikili alt grup analizlerine gidildi. Anlamlı bir farkın olduğu diğer sitokin analizlerinde olduğu gibi TNF- α 'nın analizinde de farkın yatan hasta ve kontrol grubu ilişkisinden kaynaklandığı görüldü ($p<0,001$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Yatan-ayaktan hasta grubu ve kontrol grubunun tükürük örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeyleri

Tükürük parametreleri	Yatan Hasta (n=19)	Ayaktan Hasta (n=11)	Kontrol (n=19)	p değeri
TLR-2, 2 ⁻ ($\Delta\Delta$ Ct) median (IQR)	3,81 (2,09-5,45)	2,16 (0,78-7,87)	0,98 (0,54-1,86)	0,368 ^a 0,002^{b*} 0,532 ^c
TLR-4, 2 ⁻ ($\Delta\Delta$ Ct) median (IQR)	4,26 (2,52-6,51)	2,18 (0,63-6,59)	0,97 (0,57-1,81)	0,278 ^a 0,001^{b*} 0,525 ^c
IL-1 β , 2 ⁻ ($\Delta\Delta$ Ct) median (IQR)	1,01 (0,66-1,42)	1,20 (0,59-1,55)	1,05 (0,83-1,49)	NA NA NA
IL-6, 2 ⁻ ($\Delta\Delta$ Ct) median (IQR)	3,04 (1,70-3,68)	1,90 (0,62-2,60)	0,79 (0,64-2,11)	1,000 ^a 0,009^{b*} 0,327 ^c
IL-10, 2 ⁻ ($\Delta\Delta$ Ct) median (IQR)	3,92 (2,90-6,00)	2,04 (0,89-5,88)	0,92 (0,50-1,64)	0,395 ^a 0,001^{b*} 0,395 ^c
IFN- α , 2 ⁻ ($\Delta\Delta$ Ct) median (IQR)	2,79 (1,67-4,51)	2,36 (0,50-4,19)	0,90 (0,64-1,64)	0,703 ^a 0,014^{b*} 0,654 ^c
TNF- α , 2 ⁻ ($\Delta\Delta$ Ct) median (IQR)	10,34 (4,94-20,13)	3,59 (1,81-6,29)	0,96 (0,28-3,22)	0,143 ^a <0,001^{b*} 0,234 ^c

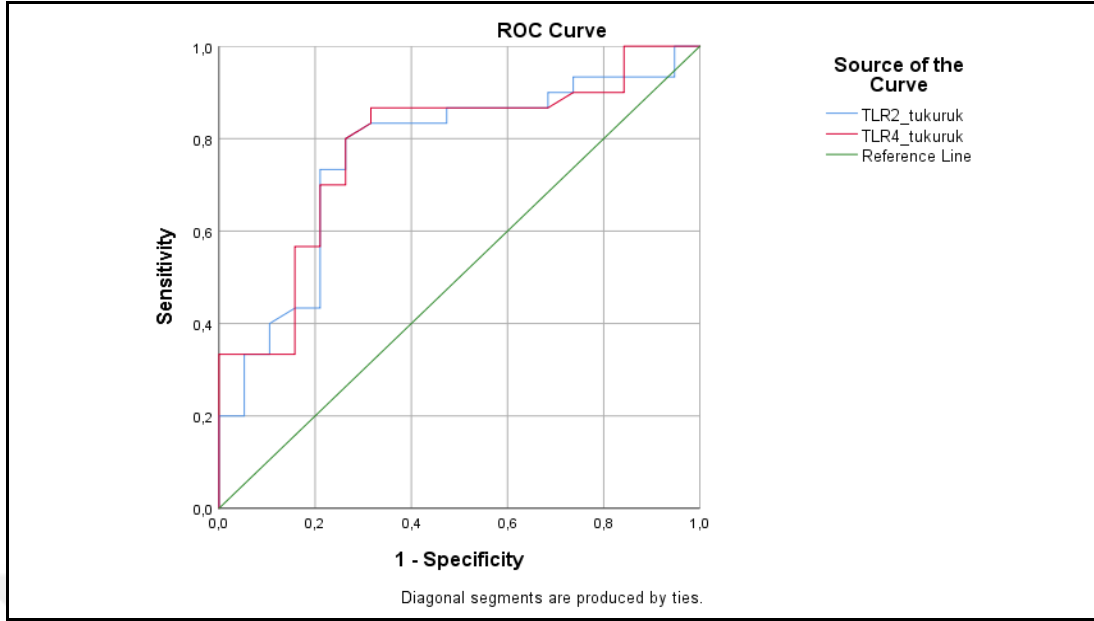
*İstatistiksel anlamlı, $p < 0,05$

a: Kontrol-ayaktan hasta grubu karşılaştırması için p değeri

b: Kontrol-yatan hasta grubu karşılaştırması için p değeri

c: Ayaktan-yatan hasta grubu karşılaştırması için p değeri

Toplum kökenli pnömoni tanısında hasta ve kontrol grubu tükürük analizi karşılaştırması yapıldığında, ROC eğrilerinin altında kalan alanlar TLR-2 için 0.765 (%95 CI, 0.625-0.905; $p = 0.002$) (en iyi eşik, 1.160 2⁻($\Delta\Delta$ Ct); Şekil 4.3) ve TLR-4 için 0.781 (%95 CI, 0.646-0.915; $p = 0.001$) (en iyi eşik, 1.280 2⁻($\Delta\Delta$ Ct); Şekil 4.3). TLR-2'nin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri sırasıyla 0.800, 0.737, 0.828 ve 0.700 idi. TLR-4'ün duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri sırasıyla 0.867, 0.684, 0.812 ve 0.765 idi.



Şekil 4.4. Hasta ve kontrol gruplarının tükürük analizlerinde bakılan TLR-2 ve TLR-4 ROC analizi.

TLR-2 ve TLR-4 için eşik değerler sırasıyla $1.16 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ve $1.28 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ olarak bulunmuştur. Tükürük TLR-2 ve TLR-4 testlerinin sensitivitesi sırasıyla 0.80 ve 0.86 olarak tespit edilmiştir.

4.5.7. Viral Pnömoni Hastaları ile Etken Tespit Edilemeyen Diğer Pnömoniler Grubuna Dahil Edilen Hastaların Tükürük Örneklerindeki Sitokin ve Reseptör Yanıtlarının İncelenmesi

Bu grupta toplamda 30 hastanın tükürük örneklerinde sitokin ve reseptör yanıtları değerlendirilmiştir. Tükürük örnekleri COVID-19 enfeksiyonu saptanan hastalardan alınmadı. COVID-19 pnömonisi haricinde kalan hastalardan elde edilen tükürük örnekleri analiz edildi. Bu hastalar etkenlerine göre sınıflandırıldığında 17 hastada viral etken gösterildi, 12 hastada ise herhangi bir etken gösterilemedi. Kalan bir hastada ise etken olarak bakteri (*S. pyogenes*) gösterildiği için bu hastadan elde edilen tükürük örneği analize dahil edilmedi (Tablo 4.5).

Bu gruplarda TLR-2 yanıtları değerlendirildiğinde viral pnömonilerde ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri 2,40 (IQR, 1,08-6,54) ve tükürük örneği olan ancak pnömoni etkeni tespit edilemeyen hastaların örneklerinde ise ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerinin 3,44 (IQR, 1,69-4,98) şeklinde olduğu görüldü. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,499$) (Tablo 4.5).

Tükürük örneklerinde TLR-4 reseptör yanıtları değerlendirildiğinde viral pnömoni ve etken tespit edilemeyen pnömoniler için ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri sırasıyla 3,05 (IQR, 1,41-7,29) ve 3,64 (2,07-5,58) olarak bulundu. Bu reseptör yanıtlarının farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,711$) (Tablo 4.5).

Toplanan tükürük örneklerinde IL-1 β yanıtına bakıldığında viral pnömonisi olan hastalarda ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerinin 0,99 (IQR, 0,65-1,49) olduğu görüldü. Etken bulunamayan hastaların ise ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri 1,13 (IQR, 0,63-1,51) olarak bulundu. IL-1 β yanıtlarına bakıldığında yine iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,586$) (Tablo 4.5).

IL-6'nın $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ortancası viral pnömonisi olan hastalardan elde edilen tükürük örneklerinde 1,93 (IQR, 0,76-3,36) ve etken bulunamayan pnömonisi olan hastaların tükürük örneklerinde ise 2,78 (IQR, 1,36-3,53) olarak saptandı. İstatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p=0,347$) (Tablo 4.5).

IL-10'un tükürük örneklerindeki seviyeleri değerlendirildiğinde neden olarak virüslerin gösterilebildiği pnömonilerde ve etken saptanamayan pnömonilerde ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri her iki grupta da 3,52 (IQR, sırasıyla, 1,13-6,03 ve 2,08-5,37) olarak karşımıza çıktı. Bu sitokinin tükürük örneklerinde seviye farklılıkları bu iki grup için anlamlı bulunmadı ($p=0,744$) (Tablo 4.5).

IFN- α viral pnömonilerde $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ortalama değeri 2,65 (IQR, 0,76-4,13) olarak görülürken etken saptanamayan pnömonilerin tükürük örneklerinde ise bu değer 2,74 (IQR, 1,09-4,14) olarak bulundu. İstatistiksel olarak bakıldığında bu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,679$) (Tablo 4.5).

Son olarak toplanan bu tükürük örneklerinde TNF- α yanıtları incelendi. Viral pnömonilerde ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerinin 7,91 (IQR, 1,99-18,32) olduğu görüldü. Etken saptanamayan pnömonilerde ise ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri 5,87 (IQR, 4,04-17,63) olarak bulundu. Bu iki grup arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,913$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Viral pnömoniler (COVID-19 harici) ve diğer pnömoniler (etken tespit edilemeyen) için tükürük örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α , TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması

Tükürük parametreleri	Viral Pnömoniler (n=17)	Diğer pnömoniler (n=12)	p değeri
TLR-2, 2 ^Δ -(ΔΔCt) median (IQR)	2,40 (1,08-6,54)	3,44 (1,69-4,98)	0,499
TLR-4, 2 ^Δ -(ΔΔCt) median (IQR)	3,05 (1,41-7,29)	3,64 (2,07-5,58)	0,711
IL-1 β , 2 ^Δ -(ΔΔCt) median (IQR)	0,99 (0,65-1,49)	1,13 (0,63-1,51)	0,586
IL-6, 2 ^Δ -(ΔΔCt) median (IQR)	1,93 (0,76-3,36)	2,78 (1,36-3,53)	0,347
IL-10, 2 ^Δ -(ΔΔCt) median (IQR)	3,52 (1,13-6,03)	3,52 (2,08-5,37)	0,744
IFN- α , 2 ^Δ -(ΔΔCt) median (IQR)	2,65 (0,76-4,13)	2,74 (1,09-4,14)	0,679
TNF- α , 2 ^Δ -(ΔΔCt) median (IQR)	7,91 (1,99-18,32)	5,87 (4,04-17,63)	0,913

4.5.8. Viral Pnömonisi Olan Hastaların ve Kontrol Grubunun Tükürük Örneklerindeki Sitokin ve Reseptör Yanıtlarının İncelenmesi

Bu grupta toplamda 36 hastanın tükürük örneklerinde sitokin ve reseptör yanıtları değerlendirilmişti. Tükürük örnekleri COVID-19 enfeksiyonu saptanan hastalardan alınmadı. COVID-19 pnömonisi haricinde viral pnömonisi olan hastalardan elde edilen tükürük örnekleri analiz edildi. 17 örnek hasta grubuna, 19 örnek ise kontrol grubuna aitti.

Bu gruplarda TLR-2 yanıtları değerlendirildiğinde viral pnömonilerde ortalanca 2^Δ-(ΔΔCt) değeri 2,40 (IQR, 1,08-6,54) ve kontrol grubu örneklerinde ise ortalanca 2^Δ-(ΔΔCt) değerinin 0,98 (IQR, 0,54-1,86) şeklinde olduğu görüldü. İstatistiksel olarak bu farkın anlamlı olduğu görüldü (p=0,016) (Şekil 4.5).

Tükürük örneklerinde TLR-4 reseptör yanıtları değerlendirildiğinde viral pnömoni ve kontrol grubu için ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri sırasıyla 3,05 (IQR, 1,41-7,29) ve 0,97 (IQR, 0,57-1,81) olarak bulundu. Bu reseptör yanıtlarının farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,008$) (Şekil 4.5).

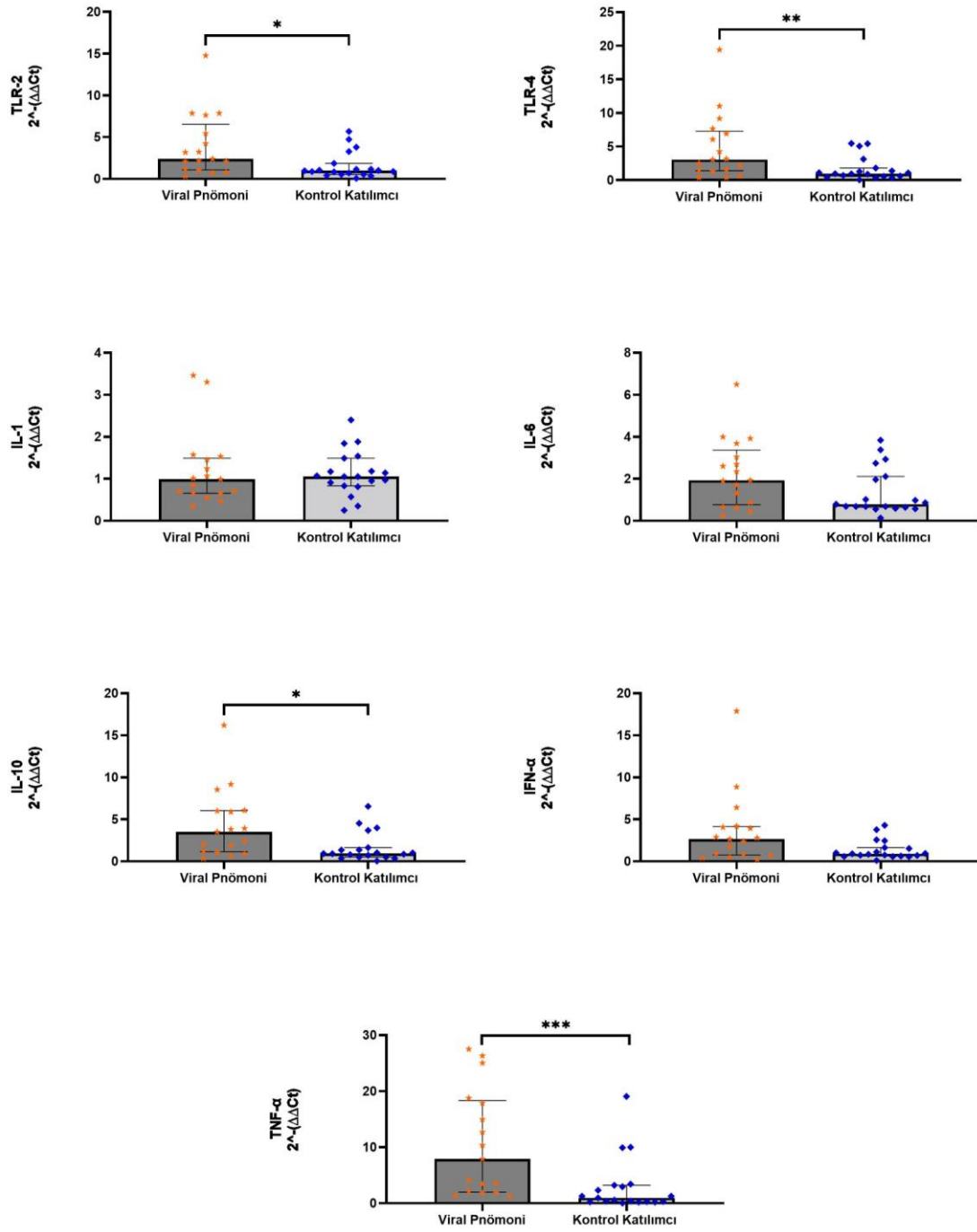
Toplanan tükürük örneklerinde IL-1 β yanıtına bakıldığında viral pnömonisi olan hastalarda ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerinin 0,99 (IQR, 0,65-1,49) olduğu görüldü. Kontrol grubunun ise ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri 1,05 (IQR, 0,83-1,49) olarak bulundu. IL-1 β yanıtlarına bakıldığında ise yine iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,616$) (Şekil 4.5).

IL-6'nın $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ortancası viral pnömonisi olan hastalardan elde edilen tükürük örneklerinde 1,93 (IQR, 0,76-3,36) ve kontrol grubu katılımcılarının tükürük örneklerinde ise 0,79 (IQR, 0,64-2,11) olarak saptandı. İstatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p=0,121$) (Şekil 4.5).

IL-10'un tükürük örneklerindeki seviyeleri değerlendirildiğinde neden olarak virüslerin gösterilebildiği pnömonilerde ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri 3,52 (IQR, 1,13-6,03) ve kontrol grubunda ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri 0,95 (IQR, 0,50-1,64) olarak karşımıza çıktı. Bu sitokinin tükürük örneklerinde seviye farklılıkları bu iki grup için anlamlı olarak bulundu ($p=0,011$) (Şekil 4.5).

IFN- α viral pnömonilerde $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ortalama değeri 2,65 (IQR, 0,76-4,13) olarak görülürken kontrol grubunun tükürük örneklerinde ise bu değer 0,90 (IQR, 0,64-1,64) olarak bulundu. İstatistiksel olarak bakıldığında bu iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p=0,071$) (Şekil 4.5).

Son olarak toplanan bu tükürük örneklerinde TNF- α yanıtları incelendi. Viral pnömonilerde ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerinin 7,91 (IQR, 1,99-18,32) olduğu görüldü. Kontrol katılımcıların örneklerinde ise ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değeri 0,96 (IQR, 0,28-3,22) olarak bulundu. Bu iki grup arasında yapılan karşılaştırmada aradaki fark anlamlı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Viral pnömonisi olan (COVID-19 harici) hastalar ve kontrol grubu arasında tükürük örneklerinde TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.

p değerleri sırasıyla TLR-2 için 0,016; TLR-4 için 0,008; IL-1 β için 0,616; IL-6 için 0,121; IL-10 için 0,011; IFN- α için 0,071; TNF- α için <0,001 olarak bulunmuştur (*: $0.01 < p \leq 0.05$, **: $0.001 < p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın verileri ışığında alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında TLR-2 ve TLR-4 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı ve hatta ciddi pnömonisi olan hastalarda bu seviyelerin hafif pnömonisi olanlarla kıyaslandığında daha da yüksek olduğu tespit edildi. Dünyada hala çocukluk çağı ölümlerinin en sık nedenlerinden biri olan pnömonileri erken tanımak oldukça önemlidir. Bu çalışma ile pnömoni şüphesinin oluştuğu tanı anında TLR-2'nin $1.16 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ve TLR-4'ün $1.28 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ eşik değeri ile pnömoni olan ve olmayan hastaları ayırdığı gösterilmiştir. Tükürük TLR-2 ve TLR-4 testlerinin sensitivitesi sırasıyla 0.80 ve 0.86 olup herhangi bir hastadaki pozitif test pnömoni tanısı için erken bir uyarıcı olabilir. Bu sonuçlar TLR-2 ve TLR-4'ün hem pnömoni tanısında hem de hastalık ciddiyetinde kullanışlı olabilecek önemli biyobelirteçler olduğunu göstermiştir. Ayrıca çok basit ve kolayca alınabilecek tükürük örneklerinin özellikle çocuk hastalardaki damar yolu sorunları da düşünüldüğünde tanısal değerinin önemi ortaya konmuştur. Tükürük örnekleri aynı zamanda ulaşılabilirliğinin daha kolay olması, daha az yardımcı malzeme gerektirmesi ve alınma tekniğinin ağrı ya da acı yaratmaması nedeni ile günümüze kadar birçok hastalığın tanısında yeri olup olamayacağı konusunda araştırılmıştır. Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde yeterli altyapının olmaması nedeni ile çoğu zaman çocuklarda pnömoni tanısında da aksamalar ya da gecikmeler yaşanmaktadır. Çalışmamız verileri ışığında, tükürük belirteçleri sayesinde daha kolay ve invaziv olmayan bir yöntem ile pnömoninin ağırlık derecesi hakkında öngörüle bulunulabileceği anlaşılmıştır.

Şimdiye kadar toplum kökenli pnömoni ve tükürük TLR ekspresyonunu inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. TLR'lerin akciğer hasarı ve pnömonideki ilişkisi şimdiye kadar birçok araştırmacı tarafından aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda serum ve BAL örneklerinde TLR değerlendirmesi yapılmıştır. Aynı zamanda bu reseptörlerin birçok bakteri ve virüsle olan etkileşimi de incelenmiştir. Literatürde şimdiye kadar TLR-2 ve *S.pneumoniae* ilişkisini inceleyen birçok çalışma mevcuttur. Yapılan bir fare çalışmasında yüzey lipoproteini eksik Δlgt pnömokok mutant suşu kullanılmış ve TLR-2 sinyalleşmesinin pnömokok

lipoproteinlerine bağı olduğu ve makrofaj NF- κ B aktivasyonunun ve TNF- α salımının Δ lgt zincirine yanıt olarak azaldığı gösterilmiştir (107). TLR sinyal yolu proteinlerinin genetik eksikliği, invaziv *S. pneumoniae* enfeksiyonu riskini önemli ölçüde arttırmaktadır (108). Bizim çalışmamızda da viral pnömoniler ve diğer pnömoniler arasında TLR-2 yanıtında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Ancak viral pnömonilerde sağlıklı kontrollere göre tükürük TLR-2 seviyelerinde anlamlı bir yükseklik olduğu görülmüştür. Virüslerin de TLR-2 aracılığı ile immün sistem yanıtında yer aldığını savunan birçok yayın mevcuttur. TLR-2'nin viral tanıma ve immün yanıtların modülasyonunda oynadığı kilit roller nedeniyle, TLR-2 yolundaki değiştirilmiş sinyalleşme veya ekspresyonun, uzun süreli hepatit B virüsü (HBV) ile enfekte hastalarda kalıcı HBV enfeksiyonu ile sonuçlanabileceği öngörülmektedir (109). Mastalerz-Migaz ve ark. influenza virüs aşılması ve oluşan immün yanıtta TLR'lerin rolünü araştırmayı amaçlamışlar ve 55 kronik hemodiyaliz hastası ve 55 sağlıklı erişkin hastayı değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak aşılamanın çözünürlük TLR-2, TLR-4 ve TLR-7 düzeylerini hemodiyaliz hastalarında veya sağlıklı gönüllülerde araştırılan sitokinleri önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür (110). Bununla birlikte rekombinan virüslerin tedavideki yerlerinin TLR ilişkili olabileceğini gösteren yayınlar da mevcuttur. Rekombinant adeno-ilişkili virüs (AAV), retinadaki gen tedavisi için önde gelen vektördür. AAV'nin TLR-2 ve TLR-9 reseptörlerini aktive ettiği ve bunun sonucunda inflamatuvar sitokinlerin ve tip I interferonların salınmasına neden olduğu gösterilmiştir (111).

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) de, özellikle TLR-2 olmak üzere, TLR'leri aktive ederek ek hasar yapabilir ve viral girişten bağımsız olarak proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına yol açabilir (112). SARS-CoV-2 Spike (S) proteini tarafından bağlanan TLR-1/2 heterodimerleri, COVID-19'da görülen hiperinflamatuvar duruma ve akciğer hasarına katkıda bulunabilir. TLR-2, fonksiyonel hücre yüzeyi reseptörleri oluşturmak için sırasıyla TLR-1 ve TLR-6 ile heterodimerler oluşturur. In vitro ve in vivo çalışmalar, TLR-2'nin SARS-CoV-2 zarf proteinini tanıdığını ve MyD88'e bağı inflamasyona neden olduğunu göstermektedir (67). Özellikle, S proteini içinde TLR-2 agonistleri olarak spesifik peptitler tanımlanmıştır. Bu heterodimerlerin S proteinine bağlanmasının COVID-19'daki bağışıklık tepkisini ne ölçüde etkilediği açık değildir (113). Bu

proteinler tipik olarak MyD88 yolları aracılığıyla sinyal yolağının başlamasına sebep olurken, bazı bağışıklık hücrelerinde ise TLR-2'nin hücre içine ve endozomlara alınarak sonrasında tip I/III IFN yanıtının indüklenmesine neden olur (114). S proteini içindeki bu spesifik peptitler ve TLR ligandları, aşı geliştirmede kullanılabilecek SARS-CoV-2'ye özgü ve antijenik moleküller olarak ayrıca araştırılmaktadır (113). TLR-1, yalnızca TLR-2 ile bir heterodimer olarak hareket eder. Sepsiste TLR-1 polimorfizmlerinde özellikle TLR1-7202G, sepsiste ve travma sonrasında NF- κ B aktivitesi ve sitokin üretimi ile ilişkili olarak ARDS gelişimine yatkınlığa katkıda bulunur (115). Ayrıca T düzenleyici hücreler aracılığı ile de proinflamatuvar yolların düzenlenmesinde rolü vardır (116). SARS-CoV-2'ye ait S proteininin TLR-1/2'yi bağladığı tahmin edilmektedir; TLR-1/2 agonizmi sitokin fırtınasının patofizyolojisine katkıda bulunabilir ve şiddetli COVID-19 hastalarında buna ikincil akciğer hasarı görülür (113). Çalışmamızda COVID-19 pnömonisi olan çocuk hastalarda TLR-2'nin serum seviyelerinde kontrol grubundaki hastalara göre anlamlı bir farklılık görülmemekle birlikte bu konuda çocuk COVID-19 hastalarında daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Belki uygun biyo-güvenlik düzeyindeki laboratuvarlarda tükürük örneklerini çalışabilmek bu hasta grubunda daha anlamlı olabilir.

Akciğerde, alveolar ve bronşiyal epitelyal ve vasküler endotelyal hücrelerde TLR-4 ekspresyonu gösterilmiştir. Siebert ve ark.'nın yaptığı çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda TLR-2 upregülasyonunun özellikle belirgin olmasının yıllar içinde sürekli tekrarlayan pnömokok enfeksiyonu ataklarını yansıtabileceği düşünülmüştür. Tekrarlayan pnömokok pnömonisi olan çocuklarda, lipopolisakkarid ve TLR-4'e bağımlı IL-6 düzeylerinin sağlıklı çocuklara göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (65). Bizim sonuçlarımızda da benzer olarak alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuk olgulardan elde edilen tükürük örneklerinde hem TLR-4 hem de IL-6 upregülasyonu gözler önüne serilmiştir. Ancak farklı olarak yüksek pnömokok kolonizasyonu gösterilememiştir. Yine benzer şekilde, Shinya ve ark. yaptıkları fare çalışmasında, TLR-4 yolunun LPS ile önceden uyarılmasının fareleri H5N1 influenza virüsü ile ölümcül enfeksiyondan koruduğunu göstererek viral hastalıklar ile TLR-4 ilişkisini ortaya koymuştur. TLR-4 ile ilgili molekülleri *knockout* edilmiş fareleri kullanarak bu koruyucu etki için TLR-4/TRIF yolunun

gerekli olduğunu savunmuşlardır. Bu çalışmada TLR-4/TRIF ekseninin, H5N1 influenza A virüs enfeksiyonuna karşı koruyucu doğuştan gelen bağışıklığı uyarmada önemli bir rolü olduğu gösterilmektedir (64). Bir başka çalışmada da TLR-4 sinyalinin, akut akciğer hasarında çoklu viral ve bakteriyel patojenler tarafından uyarılma için önemli olduğu savunulmuştur (117). İnfluenza virüsü TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-10 dahil olmak üzere birden fazla patern tanıma reseptörü (PRR) tarafından tanınırken, esas olarak TLR-4 merkezli çoklu bir inflamasyon yolağının bu hasarda rol aldığı düşünülmektedir (117). Bu çalışmalardan farklı olarak çalışmamızın yapıldığı dönemde etken olarak influenza virüsü saptanmamıştır. Tükürük örnekleri çalışılan ve viral pnömoni tespit edilen hastalarda rol alan etkenlerin çoğunlukla HRV, RSV A ve RSV B olduğu görülmüştür. Akciğerde hasara yol açan virüslere verilebilecek örneklerden bir diğeri de Deng virüsüdür. Bu virüse ait çözünür yapısal olmayan protein-1'in (sNS1), hem insan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) hem de fare kemik iliği kaynaklı makrofajlarda TLR-4'ü bir patojen ilişkili moleküler patern (PAMP) olarak doğrudan aktive ettiği gösterilmiştir (118). Younan ve ark. ise Ebola virüsü ile enfekte olmuş farelerin Eritoran ile tedavi edildiklerinde belirli sitokinlerin ve kemokinlerin seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (119). İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) Tat proteininin N-terminal dizisinin TLR-4 ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (120).

Prototipik TLR-4 ligandı LPS olmakla birlikte glikolipidler, viral yapısal proteinler ve *High mobility group box protein 1* gibi Hasar-ilişkili moleküler paternler dahil diğer ligandlar da tanımlanmıştır (121, 122). COVID-19'da viral yapısal proteinlerin ve glikolipidlerin, doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi başlatan ve TLR-4'ü bağlayan PAMP'lar olduğu öne sürülmektedir. Zhao ve ark.'na göre saflaştırılmış SARS-CoV-2 S proteinini in vitro ortamda güçlü bir afinite ile TLR-4'ü bağlamakta ve LPS ile gözlenen yanıtı benzer şekilde TLR-4'e bağlı IL-1 β yanıtını indüklemektedir (121). S protein ile TLR-4'ün etkinleştirilmesinin, anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE-2)'nin ekspresyonunu arttırdığı ve bir otokrin döngüye yol açarak viral enfektiviteyi daha da arttırdığı düşünülmektedir (123). Ayrıca, SARS-CoV-2, TLR-4 ile bağlanınca aktivatör protein-1 (AP-1), NF- κ B ve IRF gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder (124). TLR-4'ün ayrıca IL-6'yı NF- κ B aracılığıyla düzenlediği tespit edilmiştir (125). Bazı araştırmacılar, sitokin üretimi ve

akciğer hasarı ile sonuçlanan SARS-CoV-1 enfeksiyonunda okside fosfolipid (OxPL) aracılı TLR-4 yanıtı bulmuşlardır (125). Diğer birkaç araştırma çalışması, S protein ve hücre yüzeyi TLR'leri arasındaki etkileşimi ortaya koyan moleküler yerleştirme çalışması yoluyla TLR-4'ün SARS-CoV-2'ye dahil olduğunu bulmuştur. S protein ve TLR-1, TLR-4 ve TLR-6'nın bağlanma etkileşimi sırasıyla -57.3, -120.3 ve -68.4 bağlanma enerjisiyle anlamlı bulunmuştur (126, 127). SARS-CoV-2'nin S proteininin TLR-4 ile etkileşiminin diğer TLR'lerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak, ssRNA'ya sahip SARS-COV-2 tarafından TLR-4'ün bu kadar güçlü tanınmasının arkasındaki neden hala bulunamamıştır (124). Koreli 48 hasta üzerinde yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, NF- κ B sinyal yolunun TLR-4 aracılı aktivasyonunun COVID-19 hastalarındaki hiperinflamatuvar yanıtlarda rol oynadığı gösterilmiş ve bu da TLR-4 sinyalinin hastalık patogenezinde önemli ölçüde yeri olduğunu düşündürmüştür. IL-1 β ve tüm aşağı akış sinyal moleküllerinin artışı da kontrolsüz patolojik inflamasyonla sonuçlanmıştır (128). Moleküler yerleştirme çalışmaları ayrıca SARS-CoV-2 S proteininin TLR-1, TLR-4 ve TLR-6'ya önemli ölçüde bağlandığını öne sürmüştür; bunlardan TLR-4 ile S protein arasındaki bağlanmanın en güçlü olduğu bulunmuştur. Bağlanmanın esas olarak hidrofobik etkileşimlerden veya hidrojen bağlarından kaynaklandığı savunulmuştur (129). Çalışmamızda COVID-19 pnömonisi olan çocuklarda TLR-4 ekspresyonunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak HRV veya RSV gibi diğer virüslerin etken olduğu pnömoni hastalarında hem TLR-4 hem de TLR-2 düzeyleri COVID-19 pnömonisi olan hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuç bize birçok viral etkenin benzer patogenetik mekanizmaları kullandığını ancak COVID-19 hastalarında patolojik süreçlere katkıda bulunan esas faktörün daha önceki çalışmalarımızda da gösterdiğimiz gibi kemokin gibi başka biyobelirteçler olabileceğini düşündürmüştür (77).

TNF- α , lipopolisakkaritler, virüsler veya gram-pozitif veya gram-negatif bakteriler dahil olmak üzere birçok uyarana yanıt olarak aktive edilmiş monositler/makrofajlar tarafından salgılanır. Ayrıca aktif B veya T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından da salgılanabilir. Blanchard ve ark. yaptıkları yayında anti-TNF- α tedavisi alan hastaların alt solunum yolu enfeksiyonları açısından riskli olduğunu savunmuşlardır (130). Pulmoner homeostazda TNF- α 'nın

önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda yatırılarak izlenen, ciddi pnömonisi olan hastalardan elde edilen tükürük örneklerinde TNF- α 'nın kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yine çalışmamızda IL-6 ve IL-10 düzeylerinde de ciddi pnömoni hastalarında belirgin artış tespit edilirken aynı artış IL-1 β düzeylerinde görülmemiştir. Benzer şekilde Haugen ve ark. yapmış olduğu çalışmada TKP tanısı alan çocuk hastalarda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri yüksek saptanmış ancak IL-10 seviyelerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (131). Önceki raporlarda, TKP tanısı olan hastalarda özellikle proinflamatuvar sitokin IL-6 ve antiinflamatuvar sitokin IL-10, mental konfüzyon, hipotansiyon, plevral efüzyon ve bakteriyemi gibi farklı ciddiyet kriterleri ile anlamlı olarak ilişkilendirilmiştir (34, 132). Menéndez ve ark. tarafından yetişkinlerde yapılan bir çalışmada, influenza virüsünün neden olduğu pnömonide bakteriyel nedenlere kıyasla IL-10 seviyesinin daha yüksek ve TNF- α seviyesinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (133). Çalışmamızda da COVID-19 haricinde viral pnömonisi olan çocuk hastaların tükürük örneklerinde IL-10 ve TNF- α sitokin düzeylerinin kontrol grubu hastalara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Pnömoninin ağırlığını değerlendirmede şimdiye kadar kullanılan biyobelirteçlerden biri de proinflamatuvar süreçte önemli bir role sahip olan IL-6'dır. TKP'li çocuklarda yapılan bir çalışmada IL-6 artışının akciğer radyografilerinde kesin konsolidasyon ile anlamlı ilişkisi olduğunu ortaya çıkarılmıştır (134). Spesifik etiyolojik ajanlara odaklanan iki sitokin çalışması, *Mycoplasma pneumoniae* ve influenza H1N1 pnömonilerinde, şiddetli semptomları olan çocuklardan alınan kan örneklerinde IL-6 konsantrasyonlarının önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir (131, 135). Çocuklarda IL-6 veya IL-8 ve bunun TKP şiddeti ile ilişkisini bildiren yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu tür biyobelirteçlerin hastalık şiddetini tahmin etmedeki rolünü belirlemek için ek çalışmalara hala ihtiyaç olduğu çok açıktır. Remmelts ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, antibiyotik tedavisine ek deksametazon tedavisinin TKP'li hastalarda IL-6, IL-10 ve TNF- α konsantrasyonlarını azalttığı gösterilmiştir. Ek olarak, TKP'nin farklı mikrobiyal etiyolojilerine göre deksametazonun etkinliğinde farklılıklar olabileceği savunulmuştur. Deksametazon, pnömokok pnömonisi olan hastalarda sitokin konsantrasyonları üzerinde çok az ek etkiye sahip gibi görünürken, atipik bir

patojenin neden olduğu TKP'li hastalarda deksametazonun sitokin konsantrasyonlarında plaseboya göre önemli ölçüde daha hızlı bir düşüş sağladığı gösterilmiştir (136). Genel olarak yetişkin pnömoni hastalarında serum ve bronkoalveolar lavaj sıvısında yüksek IL-6 konsantrasyonları bildirilmiştir. Ek olarak, yüksek serum IL-6 seviyelerinin pnömoni varlığının, hastalık şiddeti ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (137, 138). Kim ve ark. tarafından pediyatrik hastalarda yapılan başka bir çalışmada, influenza A/H1N1 ve pnömonisi olan hastalarda IL-6 ve IP-10 konsantrasyonlarının H1N1 enfeksiyonu olmayanlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (139). IL-6 ve TNF- α birlikte, akut faz proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek pnömonide genel bir inflamasyon belirteci olarak hareket etmektedirler (34). Bu çalışma ile benzer şekilde kendi çalışmamızda tükürük analizlerinde ortaya çıkan bulgular doğrultusunda bu sitokinlerin ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre TKP hastalarında daha fazla olduğunu tespit ettik. Pnömonin ağırlığını belirlemede IL-6, IL-10 ve TNF- α 'nın kolay, basit ve ulaşılabilir bir yöntem olarak tükürük örneklerindeki ekspresyonunu değerlendirmenin önemli bir yeri olabileceğini düşünüyoruz.

COVID-19'daki en önemli sitokinlerden biri, serum seviyesinin hastalığın ciddiyeti ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu savunulan IL-6'dır (140). İnfluenza, kuduz, HBV, hepatit C virüsü ve HIV dahil olmak üzere birçok viral enfeksiyona karşı bağışıklık sistemi yanıtında yer aldığı bilinmektedir (141). IL-6'nın bir proinflamatuvar sitokin olarak COVID-19'lu hastalarda meydana gelen sitokin fırtınasındaki yeri şimdiye kadar birçok araştırmada aydınlatılmaya çalışılmıştır (124). Yapılan bir meta-analizde, şiddetli COVID-19 olan hastalarda IL-6 seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir (124, 125). Bazı klinik raporlar, kritik durumdaki SARS-CoV-2 hastalarının muhtemelen IL-6 kaynaklı immün disregülasyon veya makrofaj aktivasyon sendromu nedeniyle proinflamatuvar sitokin seviyelerinde anormal bir artışa sahip olduğunu ileri sürmektedir (125). Bununla birlikte, SARS-CoV-2 enfeksiyonu bir anti-IL-6 monoklonal antikoru olan tocilizumab ile tedavi edilen ilk enfeksiyondur (142). Ancak çocuklarda COVID-19 enfeksiyonu çok farklı kliniklerde karşımıza çıkmaktadır. Çocuklarda SARS-CoV-2'nin beş klinik paterni tanımlanabilir: yarısından fazlası asemptomatik veya ılımlı semptomlara sahiptir (ateş, asteni, miyalji ve öksürük); yaklaşık üçte biri orta

derecede semptomlara sahiptir (hafif solunum sıkıntısı); %5'i daha şiddetli solunum semptomları (dispne, hipoksi) geliştirir ve <%4'ü akut solunum yetmezliği nedeniyle veya bazen çocuklarda MIS-C ile ilişkili olarak yoğun bakım gerektirir (143). Çocuk hastalar açısından değerlendirildiğinde MIS-C hastalarında IL-1 β yolunun aktivasyonu ve IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerinde yükselme ile meydana gelen "sitokin fırtınası" önemli bir rol oynar. Bu durum, MIS-C hastalarında görülen çoklu organ tutulumuna yol açar (144). Benzer şekilde, Carter ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada MIS-C hastalarının akut fazında yüksek IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 ve IFN- γ seviyeleri ve düşük T ve B hücre alt grupları bulunmuştur (145). Başka bir çalışmada ise IL-6 seviyelerinin MIS-C'de değişken olduğu ve bazı hastalarda seviyelerin normal olduğu gösterilmiştir (146). Bu veriler ışığında, çalışmamızda pnömonik infiltrasyonu olan MIS-C hastaları komplike sitokin fırtınası göz önüne alınarak çalışma dışı bırakılmıştır.

Son çalışmalar, düzensiz bir tip I IFN yanıtı ile COVID-19 arasında bir ilişki belirlemiştir. Tip I IFN yanıtındaki farklı derecelerdeki düzensizlik COVID-19 hastalarında gözlenen hastalığın çok çeşitli klinik prezentasyonlarını ve prognozunu açıklayabilir. Enfeksiyonun ilk aşamasında normal veya normale yakın bir tip I IFN yanıtına sahip olmak prognoz daha iyi olacağını gösterir. Bu nedenle anormal tip I IFN yanıtları kötüleşen prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu aynı zamanda genç bireylerin neden COVID-19'dan daha az etkilendiğini de açıklayabilir (147). Contoli ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada COVID-19 hastalarında kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha düşük kan IFN- α seviyeleri olduğu saptanmıştır. Ayrıca COVID-19 hastalarında kan IFN- α seviyelerindeki artışın, hastalık şiddetindeki azalma ve daha fazla sağkalım ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle, klinik olarak iyileşen ve çalışma sırasında hayatta kalan hastalarda IL-10 ve IFN- α seviyeleri arasında ters bir ilişki bulunmuştur (148). Bizim çalışmamızda COVID-19 pnömonisi olan çocuk hastalarda kontrol katılımcılara göre daha düşük serum IFN- α seviyeleri tespit edilmiştir. Bu durum diğer çalışmalarda olduğu gibi IFN- α 'nın patofizyolojideki yerini ortaya koymaktadır.

IL-4, esas olarak aktive edilmiş tip 2 yardımcı T (Th2) hücreleri tarafından üretilir ve hücre apoptozu ve proliferasyonunu, Th1 yanıtlarını, Th2 farklılaşmasını, immünoglobulin E'ye izotip geçişini ve makrofajların tip 2 makrofajlara doğru

evrilmesini düzenler. Solunum yolu enfeksiyonlarının, bir anti-inflamatuvar sitokin olarak IL-4'ün serum seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir. IL-4'ün genellikle immünoglobulin aracılı alerjik/inflamatuvar yol ile ilgili olarak düşünülmesine rağmen, bakteriyel enfeksiyon sırasında hüморal yanıtı etkilediği ve bakteriyel toksinlerin neden olduğu proinflamatuvar sitokinlerin sentezini baskıladığı da bilinmektedir. Aynı zamanda IL-4 pulmoner sürfaktan homeostazını etkileyerek bakteri ve virüslerin pulmoner temizlenmesinde rol almaktadır (149). Viral immün yanıt CD8+ lenfosit yanıtı (Th1 yanıtı) ve artan IL-4 ve interlökin-13 (IL-13) (Th2 yanıtı) düzeyleriyle doğrudan bağlantılıdır; çünkü her iki sitokin de bu süreçte CD8+ hücrelerini destekler. Akut faz yanıtı sırasında viral enfeksiyonun esas olarak bir Th2 yanıtı ortaya çıkardığı görülmektedir. Bununla birlikte, kronik fazda ise şiddetli akut inflamatuvar süreçler ve akciğer fibrozisi ortaya çıkmaktadır. Yapılan bir erişkin çalışmasında IL-4'ün serum düzeylerinin, sağlıklı kontrollere kıyasla COVID-19 hastalarında çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle daha şiddetli solunum semptomları olan COVID-19 hastalarında daha yüksek IL-4 seviyeleri bildirilmiştir (50, 150). Hastalığın başlangıcından sonraki ilk hafta serum IL-4 seviyelerinde bir düşüş ve ikinci hafta boyunca hafif bir artış, iyi bir COVID-19 prognozu ile ilişkilidir (151). Diao ve ark.'nın 522 COVID-19'lu çocuk ve erişkin hastada yaptıkları çalışmada TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-10 serum sitokin konsantrasyonlarını incelenmiştir. Yalnızca TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeylerinin enfekte hastalarda önemli ölçüde arttığı ve yoğun bakım ünitesine yatan hastalardaki düzeylerinin diğer hastalardan önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (152). Bir metaanalizde ise IL-4 rs2243250-T alelinin nozokomiyal pnömonideki rolü değerlendirilmiştir. Bu metanalizde bahsedilen rs2243250-T alelinin, çeşitli solunum yolu enfeksiyonlarında bir genetik belirteç veya bir duyarlılık aleli olabileceği savunulmuştur (149). Viral pnömoni ve akciğer hasarı üzerine odaklanan bir çalışmada, pandemik olmayan virüsler kaynaklı pnömoni sebebi ile ölüm gerçekleşen hastaların akciğer doku biyopsileri incelenmiştir. Bu hastalarda IL-4 ve IL-13'ün daha fazla doku immüno-ekspresyonu gösterdiği görülmüştür (153). Bizim çalışmamızda ise COVID-19 hastalarında ya da viral pnömonisi olan tüm hastalarda kontrol gruba göre IL-4 seviyelerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Tükürük örneklerinin hastalıkların tanısındaki rolü SARS-CoV-2 pandemisinde de yerini tartışmalı olarak korumaktadır. ACE-2, SARS-CoV-2'nin ana hücre reseptörü olarak tanımlanmıştır ve virüsün hücreye girişinde ve ardından enfeksiyon gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. ACE-2 reseptörü tükürük bezinde ve ağız mukozasında yüksek oranda eksprese edilir ve tükürük bezlerindeki ACE-2 pozitif hücrelerin SARS-CoV-2 hedef hücreleri olması muhtemeldir (154, 155). Ayrıca tükürükte SARS-CoV-2'nin varlığı virüsü tükürüğe taşıyan üst ve alt solunum yolu sıvısının karışmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu bulgular, tükürük bezi ve oral mukozanın SARS-CoV-2 enfeksiyonu için yüksek riskli bir kaynak bölge olabileceğini düşündürmektedir (155). Tüm bu mekanizmaların birlikteliği tükürüğü SARS-CoV-2 enfeksiyonunu test etmek için uygun bir örnek haline getirmektedir (156). Tükürük, SARS-CoV-2'yi tespit etmek ve viral yükü izlemek için tanısal bir örnek olarak kullanılabilir (157). Hastaların kendi örneklerini almasının ihtiyaç duyulan sağlık personeli sayısının azalması ve numune toplamak için gereken kişisel koruyucu ekipmanlara ihtiyacın azalması gibi çeşitli faydaları mevcuttur. Böylece numune toplamayla ilişkili viral bulaşmanın azaltılmasına ve maliyet ve riskin azaltılarak SARS-CoV-2 kitle testlerinin arttırılmasına olanak sağlanmış olur (157, 158). Yapılan başka bir metaanalizde ise COVID-19'u saptamak için hastaların bireysel olarak topladığı tükürüğün orta düzeyde duyarlılığı ve pozitif öngörü değeri olduğu, aynı zamanda yüksek özgüllüğü ve negatif öngörü değeri olduğu saptanmıştır. Ayrıca, kişisel koruyucu ekipman gerekmediğinden üniversiteler gibi büyük kuruluşlarda tükürük verimli bir şekilde kullanılabilir ve bu viral bulaşma tehlikesini azaltmaya yardımcı olabilir. Sonuç olarak, tükürük testi olduğu yenilikçi bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle salya akıtma veya öksürmeden tükürme gibi basit toplama yöntemleri semptomatik hastaların değerlendirilmesinde etkili olacaktır (159). Ancak örneklerin saklanması ve çalışılması konusunda solunum yoluna ait partiküllerin tükürük aracılığı ile bulaşma riskinin fazla olması ve laboratuvarımızın biyo-güvenlik düzeyinin yukarıda bahsedilen çalışmaları yapmaya uygun olmaması nedeniyle çalışmamızda COVID-19 pnömonisi olan hastaların tükürük örnekleri toplanmamıştır.

Geçmişte ve günümüzde serum örneklerinde de olsa CRP ve PCT bilinen eski ve klasik biyobelirteçler olarak önemlerini korumaya devam etmektedir. Ancak bu belirteçler etiyolojik nedenle ilgili bir bilgi sağlamamaktadır. Pediatrik TKP'de birçok çalışma, yüksek CRP düzeylerinin lobar konsolidasyon, ateş, hastanede uzun süre kalış süresi, plevral efüzyon ve hatta ölüm gibi olumsuz sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (160). Bizim verilerimizde benzer olarak düşük CRP düzeyleri olan çocukların ciddi pnömoni riskinin düşük olduğunu gösterdi ve bu belirteci acil servise başvuru sırasında ciddiyeti tahmin etmek için kullanma olasılığını güçlendirdi. Ayrıca bu biyobelirteçlerin uygun maliyetli olması erişimi kolaylaştırmaktadır (161). CRP'nin Lee'nin çalışmalarında doğrulandığı gibi, ikincil sonuçları (yoğun bakım ünitesine kabul, vazopresör kullanımı veya mekanik ventilasyon ihtiyacı) tahmin etmedeki rolü anlamlı olmamakla birlikte hastaneye yatışta hastalık şiddetinin değerlendirilmesi için kullanımı da kısıtlıdır (162). TKP'li çocuklarda etiyolojik tanı için kullanılan bazı biyobelirteçler, aynı popülasyonda hastalık şiddetini değerlendirmek için de test edilmiştir. PCT en sık çalışılan belirteç olup verilerin çoğu, daha önce yetişkin hastalarda bildirildiği gibi PCT konsantrasyonu ne kadar yüksekse, TKP'nin hastaneye yatış gerektirebileceği riskinin de o kadar yüksek olduğunu göstermektedir (163, 164). Ayrıca, şiddet değerlendirmesinde PCT'nin CRP'den üstün olduğu bulunmuştur. Bir yayında, bronkopnömoniye göre lobar TKP'de hem PCT hem de CRP değerlerinde artış bildirilmiş ancak PCT'nin radyolojik bulgularla korele olarak TKP'yi saptamada daha iyi duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olduğu bulunmuştur (165). Ancak bunun temersinin iddia edildiği ve PCT'nin CRP'ye üstünlüğünün belirgin olmadığını savunan yayınlar da mevcuttur (166). Sonuçlarımıza göre, pek çok yayınla benzer şekilde CRP ve PCT gibi klasik belirteçler pnömoninin ağırlığını belirlemede günümüzde halen bize yol gösterici olmaktadır.

TLR-2 ve TLR-4 agonistlerinin gelecekteki yeri insanlık için büyük umut vaat etmektedir. Aşılar da kullanımı için yapılan çalışmalar günümüzde birçok bilim insanı tarafından yürütülmektedir. TLR-2 agonisti bazlı aşılar günümüze kadar HIV, borrelia ve HBV gibi enfeksiyonlarda denenmiştir (167). XS15, suda çözünür sentetik bir TLR1/2 aktivatörüdür. Başlangıçta kanser aşılarında adjuvan olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır (168). İnsanlarda yapılan bir çalışmada XS15

enjeksiyonunun gönüllü katılımcılarda Th1 CD4 ve CD8 T hücrelerinin güçlü tepkilerini indüklediği gösterilmiştir. CoVac-1, COVID-19 ile verilen mücadelede T hücre bağışıklığını indüklemek için çeşitli viral proteinlerden türetilen SARS-CoV-2 T hücresi epitoplarından oluşan XS15 ile adjuvanlanmış bir peptit aşısıdır. Faz 1 çalışmasında CoVac-1 kabul edilebilir bir güvenlik profili göstermiş ve antikor üretim eksiklikleri olan hastalarda kullanıldığında ise (faz 2 çalışmasında) güçlü T-hücre aracılı yanıtları indüklediği tespit edilmiştir (169-171).

Esposito ve ark.'nın yaptıkları bir araştırma sonucunda 'pidotimod' isimli sentetik immunsitumulan madde toplum kökenli pnömonisi olup hastanede yatarak tedavi alması gereken 20 kişiden oluşan bir grupta kullanılmış ve immun sistemdeki yeri ve katkısı alınan kan örnekleri aracılığı ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma TKP'li çocuklarda standart antibiyotik tedavisine ek olarak pidotimod uygulamasının, dendritik hücre olgunlaşması ve işlevi, monositlerde TLR-2 ekspresyonu, antimikrobiyal peptit salgılanması ve genlerin upregülasyonu üzerinde doğrudan etki yoluyla inflamatuvar yanıtta yer aldığını ve doğal bağışıklık sistemi yanıtını önemli ölçüde artırabileceğini göstermektedir (172). Trabattone ve ark.'nın yaptığı 16 TKP tanımlı erişkinden oluşan çalışmada ise pidotimod desteği alanlarda bu maddenin TLR-2 ve TLR-4 eksprese eden CD14+ hücrelerinin yüzdesini ve kemokinlerin üretimini, CD80 ve CD86 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve antibakteriyel özelliklere sahip bir dizi proteinin transkripsiyonunu upregüle ettiği savunulmuştur (173). Bizim çalışmamızda TLR-2 ekspresyonunda serum örneklerinde bir farklılık saptanmamıştır. Ancak tükürük örneklerinde TLR-2 ekspresyonundaki anlamlı farklılık değerlendirildiğinde TKP hastalarında özellikle yatan hasta grubunda tükürük gen ekspresyonu analizinde daha fazla TLR-2 ekspresyonu olduğu görülmüştür. Bu durum TKP oluşumu süresince bağışıklık yanıtında TLR-2'nin anti-inflamatuvar yanıtta ziyade pro-inflamatuvar yanıtta katkı sağladığını düşündürmektedir.

TLR immünomodülatörü PUL-042, COVID-19'da araştırılmaktadır. PUL-042, TLR-2/6 ligandı Pam2CSK4 ve TLR-9 ligandı ODN M362'den oluşan bir kombinasyon ilacıdır. Solunum yolu enfeksiyonlarına karşı konak yanıtını arttırmak için geliştirilmiştir. Hayvan modellerinde, ölümcül hastalığa sebep olan SARS-CoV ve MERS-CoV enfeksiyonlarında sağ kalımı etkili bir şekilde iyileştirdiği ve patojen yükünü azalttığı gösterilmiştir (174). Onofrio ve ark. TLR-4 antagonistlerinin ve

anti-IL-6 ajanlarının kombinasyonunun ARDS nedeniyle solunum desteği alan hastalarda yararlı olabileceğini savunmuştur (112). Eritoran, mortalitede hiçbir iyileşme sağlamasa da mükemmel bir güvenlik profili sergilemesi nedeniyle sepsisli hastalarda yapılan büyük bir randomize kontrollü klinik çalışmada test edilmiş ve iyi tolere edilebilen bir TLR-4 antagonistidir (175). Bir influenza fare modelinde ise Eritoran'ın, klinik semptomları ve patolojik akciğer hasarını iyileştirirken okside fosfolipid ve sitokin düzeylerini ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (63). Ayrıca, yapılan bir meta-analiz TLR-4 A299G gen polimorfizminin pnömoniye duyarlılıkla önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir (176). Bu analiz de TLR-4'ün pnömonide yer alan inflamatuvar yanıtındaki rolünü desteklemektedir.

Bu çalışmada pek çok kısıtlayıcı etken bulunmaktadır. Bunların ilki çalışma döneminde COVID-19 pandemisinin beraberinde getirdiği izolasyon süreci ile birlikte çocuklarda üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının daha az bulaş olması nedeni ile sayıca azalmasıdır. Bu süreçte hastaneye başvurular azalmış ve bazı ailelerin hasta çocuklarına ampirik antibiyotik tedavisine evde kendilerinin başladığı ve yanıt alamadıkları durumda hastaneye başvuru yaptıkları bu süreçte öğrenilmiştir. İkinci olarak, çocuk hastalarda MIS-C vakalarının insidansındaki dramatik artışla birlikte ağır COVID-19 enfeksiyonu seyrinde de multiorgan yetmezliği gelişen hastaların varlığı izole COVID-19 pnömonisi olan hastaları ayırma konusunda güçlüklerle neden olmuştur. Üçüncüsü, ailelerin yeni bir pandemi ile karşı karşıya kaldıkları bu süreçte çalışmaya katılma konusundaki kararsızlıkları da çalışmayı olumsuz etkilemiş ve karar değiştiren ailelerin ve çocukların örnekleri etik kurallar çerçevesinde çalışılmamıştır. Tüm bu nedenlerle mevcut hasta sayısının az olması en önemli kısıtlayıcı etkindir. Sonuncu olarak da pandemi koşulları sebebi ile çalışma kitlerinin çok geç temin edilebilmesi çalışmanın sonuçlandırılma sürecini uzatmıştır.

Çocuk hastalarda TKP tanısında en doğru ve en hızlı sonucu veren biyobelirteçlerin tespit edilmesi önemlidir. Bu çalışma ile hastalardan serum örneği elde etmenin zorluğu göz önünde bulundurulduğunda tükürük gibi kolay ve acısız temin edilebilecek bir materyalin, özellikle çocuk hastalar söz konusu olduğunda TKP tanısında kullanılmasının önemi ortaya konmuştur. Ayrıca çalışmamız daha önce erişkin hasta çalışmaları ve fare deneyleri ile sınırlı kalan yeni agonist ve antagonist ilaçların çocuk hastalar üzerinde etkilerini değerlendirebilme potansiyeli taşıyan gelecek çalışmalara ışık tutmaktadır.

6. SONUÇLAR

1. Yatarak tedavi alan ve ayaktan takip edilen hastaların serum parametreleri değerlendirildiğinde hemoglobin değerleri, lökosit, lenfosit, nötrofil, trombosit sayıları, ortalama trombosit hacmi, nötrofil/lenfosit oranı, ESR değerleri, TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α açısından farklılık saptanmadı. Ancak özellikle TLR'lerin serumdaki düzeylerini değerlendirmek ve karşılaştırmak, bu reseptörlerin serum düzeylerinin çocuk TKP hastalarında tanıda ve prognozdeki yerini anlamak için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

2. Serum CRP ve PCT seviyeleri yatan hasta grubunda ayaktan hasta grubuna göre daha yüksek olarak bulundu. Literatür ile benzer olarak bu iki parametrenin çocuk TKP hastalarında hastalığın ciddiyetinin belirlenmesindeki rolünün günümüzde de hala geçerliliğini koruduğu görüldü.

3. Viral pnömonisi olan hastalar ile etken tespit edilemeyen diğer pnömoni hastaları karşılaştırıldığında serum TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α düzeyleri açısından iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı.

4. Etken olarak virüslerin tespit edildiği pnömoni hastalarında alt grup analizine bakıldığında COVID-19 pnömonisi olan hastalarda serum TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α düzeyleri diğer viral pnömoni hastalarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. SARS-CoV-2 ve diğer virüslerin özellikle çocuk hastalarda tetikledikleri inflamatuvar yolların farklılıklarını araştırmak için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

5. Serum TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-4, IL-10 ve TNF- α düzeyleri açısından COVID-19 pnömonisi olan hastalar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. Ancak COVID-19 hastalarında IL-6 seviyesinin daha düşük olduğu görüldü. Bu bulgunun COVID-19 pnömonisi ile izlenen çocuk hastaların inflamatuvar süreçlerinin farklılığından kaynaklanabileceği düşünüldü. Ayrıca IFN- α düzeylerinin de düşük olması COVID-19'a bağlı inflamasyonda bu sitokinin önemli bir yeri olabileceğini düşündürdü.

6. Yatan-ayaktan hasta grubu ve kontrol grubunun tükürük örnekleri analiz edildiğinde tükürük TLR-2, TLR-4, IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α seviyelerinin pnömoni hastalarını kontrol grubundan ayırt edebildiği görüldü. Özellikle enfeksiyon süreçlerinde önemini korumaya devam eden TLR-2 ve TLR-4'ün hasta ve kontrol grubu tükürük örneklerinde ROC analizi yapıldığında, ROC eğrilerinin altında kalan alanlar TLR-2 için eşik değer $1.16 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ve TLR-4 için eşik değer $1.28 \cdot 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ olarak bulundu. Tükürük TLR-2 ve TLR-4 testlerinin sensitivitesi sırasıyla 0.80 ve 0.86 olarak tespit edildi.

7. Viral pnömoniler (COVID-19 pnömonisi hariç) ve etken saptanamayan diğer pnömoniler karşılaştırıldığında tükürük TLR-2, TLR-4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α ve TNF- α seviyelerinde iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı.

8. Viral pnömoni hastaları (COVID-19 pnömonisi hariç) ve kontrol grubu katılımcılarının tükürük örnekleri analiz edildiğinde IL-1 β , IL-6 ve IFN- α seviyelerinde her iki grup arasında farklılık saptanmadı. Ancak tükürük TLR-2, TLR-4, IL-10 ve TNF- α ekspresyonları viral pnömonilerde (COVID-19 pnömonisi hariç) kontrol grubuna göre daha yüksek olarak saptandı. Virüslerin başlattığı inflamatuvar süreçte literatüre benzer olarak bu biyobelirteçlerin önemli bir rol oynadığı görüldü. SARS-CoV-2'nin etken olduğu TKP hastalarında biyogüvenlik açısından sorunlara yol açabileceği gerekçesi ile tükürük örnekleri elde edilmediği için bu hastalar değerlendirmeye alınamadı.

7. KAYNAKLAR

1. Shah SS, Bradley JS. Pediatric Community-Acquired Pneumonia. In: Cherry JD, Harrison GJ, Kaplan SL, Steinbach WJ, Hotez PJ, editors. Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 1. 8th ed2019. p. 208-19.
2. Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, McKean M, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax*. 2011;66 Suppl 2:ii1-23.
3. WHO. Pneumonia WHO2019 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>].
4. Legg J, Rampton C. British Thoracic Society paediatric pneumonia audit. National audit period: 1 November 2016–31 January 2017.
5. Kelly MS, Sandora TJ. Community-Acquired Pneumonia. In: Kliegman RM, Iii JWSG, Blum NJ, Shah SS, Tasker RC, Wilson KM, et al., editors. Nelson Textbook of Pediatrics. 2. 21 ed2019. p. 3246-57.
6. Turrini M, Gardellini A, Beretta L, Buzzi L, Ferrario S, Vasile S, et al. Clinical course and risk factors for in-hospital mortality of 205 patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Como, Lombardy Region, Italy. *Vaccines*. 2021;9(6):640.
7. Organization WH. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard April 1, 2022 [Available from: <https://covid19.who.int/>].
8. Jain S, Williams DJ, Arnold SR, Ampofo K, Bramley AM, Reed C, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among US children. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(9):835-45.
9. Mani CS. Acute Pneumonia and Its Complications. In: Long SS, Prober CG, Fischer M, editors. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 1. 5th ed: Elseiver; 2018. p. 238-49.
10. Ou Z-Y, Zeng Q-Y, Wang F-H, Xia H-M, Lu J-P, Xia J-Q, et al. Retrospective study of adenovirus in autopsied pulmonary tissue of pediatric fatal pneumonia in South China. *BMC infectious diseases*. 2008;8(1):1-6.
11. Welliver RC. The immune response to respiratory syncytial virus infection: friend or foe? *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2008;34(2):163-73.

12. Welliver TP, Garofalo RP, Hosakote Y, Hintz KH, Avendano L, Sanchez K, et al. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(8):1126-36.
13. Calbo E, Garau J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(2):107-13.
14. Gill S, Wight TN, Frevert CW. Proteoglycans: key regulators of pulmonary inflammation and the innate immune response to lung infection. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2010;293(6):968-81.
15. Katz SE, Williams DJ. Pediatric Community-Acquired Pneumonia in the United States: Changing Epidemiology, Diagnostic and Therapeutic Challenges, and Areas for Future Research. *Infect Dis Clin North Am*. 2018;32(1):47-63.
16. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2011;53(7):e25-e76.
17. WHO. Revised WHO Classification and Treatment of Pneumonia in Children at Health Facilities: Evidence Summaries. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2014:1-34.
18. Shah S, Bachur R, Kim D, Neuman MI. Lack of predictive value of tachypnea in the diagnosis of pneumonia in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010;29(5):406-9.
19. Mamtani M, Patel A, Hibberd PL, Tuan TA, Jeena P, Chisaka N, et al. A clinical tool to predict failed response to therapy in children with severe pneumonia. *Pediatric pulmonology*. 2009;44(4):379-86.
20. Williams DJ, Edwards KM, Self WH, Zhu Y, Arnold SR, McCullers JA, et al. Effectiveness of β -lactam monotherapy vs macrolide combination therapy for

- children hospitalized with pneumonia. *JAMA pediatrics*. 2017;171(12):1184-91.
21. Pereda MA, Chavez MA, Hooper-Miele CC, Gilman RH, Steinhoff MC, Ellington LE, et al. Lung ultrasound for the diagnosis of pneumonia in children: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2015;135(4):714-22.
 22. Shah VP, Tunik MG, Tsung JW. Prospective evaluation of point-of-care ultrasonography for the diagnosis of pneumonia in children and young adults. *JAMA pediatrics*. 2013;167(2):119-25.
 23. Claes A-S, Clapuyt P, Menten R, Michoux N, Dumitriu D. Performance of chest ultrasound in pediatric pneumonia. *European journal of radiology*. 2017;88:82-7.
 24. Reali F, Papa GFS, Carlucci P, Fracasso P, Di Marco F, Mandelli M, et al. Can lung ultrasound replace chest radiography for the diagnosis of pneumonia in hospitalized children? *Respiration*. 2014;88(2):112-5.
 25. Guerra M, Crichiutti G, Pecile P, Romanello C, Busolini E, Valent F, et al. Ultrasound detection of pneumonia in febrile children with respiratory distress: a prospective study. *European journal of pediatrics*. 2016;175(2):163-70.
 26. Urbankowska E, Krenke K, Drobczyński Ł, Korczyński P, Urbankowski T, Krawiec M, et al. Lung ultrasound in the diagnosis and monitoring of community acquired pneumonia in children. *Respiratory medicine*. 2015;109(9):1207-12.
 27. Ho M-C, Ker C-R, Hsu J-H, Wu J-R, Dai Z-K, Chen I-C. Usefulness of lung ultrasound in the diagnosis of community-acquired pneumonia in children. *Pediatrics & Neonatology*. 2015;56(1):40-5.
 28. Ianniello S, Piccolo CL, Buquicchio GL, Trinci M, Miele V. First-line diagnosis of paediatric pneumonia in emergency: lung ultrasound (LUS) in addition to chest-X-ray (CXR) and its role in follow-up. *The British journal of radiology*. 2016;89(1061):20150998.
 29. Yun KW, Wallihan R, Juergensen A, Mejias A, Ramilo O. Community-Acquired Pneumonia in Children: Myths and Facts. *Am J Perinatol*. 2019;36(S 02):S54-s7.

30. Cardoso MR, Nascimento-Carvalho CM, Ferrero F, Alves FM, Cousens SN. Adding fever to WHO criteria for diagnosing pneumonia enhances the ability to identify pneumonia cases among wheezing children. *Arch Dis Child*. 2011;96(1):58-61.
31. Sazawal S, Black RE, Group PCMT. Effect of pneumonia case management on mortality in neonates, infants, and preschool children: a meta-analysis of community-based trials. *The Lancet infectious diseases*. 2003;3(9):547-56.
32. Gunaratnam LC, Robinson JL, Hawkes MT. Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Biomarkers for Pediatric Pneumonia. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2021.
33. Florin TA, French B, Zorc JJ, Alpern ER, Shah SS. Variation in emergency department diagnostic testing and disposition outcomes in pneumonia. *Pediatrics*. 2013;132(2):237-44.
34. Bordon J, Aliberti S, Fernandez-Botran R, Uriarte SM, Rane MJ, Duvvuri P, et al. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(2):e76-e83.
35. Florin TA, Ambroggio L. Biomarkers for community-acquired pneumonia in the emergency department. *Curr Infect Dis Rep*. 2014;16(12):451.
36. Florin TA, Ambroggio L, Shah SS, Ruddy RM, Nylén ES, Balmert L. Urinary Proadrenomedullin and Disease Severity in Children with Suspected Community-Acquired Pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2021.
37. Long SS, Vozzak J. Laboratory Manifestations of Infectious Diseases. In: Long SS, Prober CG, Fischer M, editors. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 1. 5th ed 2018. p. 1449-50.
38. Daly JS, III RTE. Acute Pneumonia. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 1. 9th ed 2020. p. 888-913.
39. Tillett WS, Francis Jr T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of experimental medicine*. 1930;52(4):561.

40. Higdon MM, Le T, O'Brien KL, Murdoch DR, Prosperi C, Baggett HC, et al. Association of C-Reactive Protein With Bacterial and Respiratory Syncytial Virus-Associated Pneumonia Among Children Aged <5 Years in the PERCH Study. *Clin Infect Dis*. 2017;64(suppl_3):S378-s86.
41. Iwasaki A. A virological view of innate immune recognition. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66:177-96.
42. Schuetz P, Muller B, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, Bouadma L, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal*. 2013;8(4):1297-371.
43. Bhuiyan MU, Blyth CC, West R, Lang J, Rahman T, Granland C, et al. Combination of clinical symptoms and blood biomarkers can improve discrimination between bacterial or viral community-acquired pneumonia in children. *BMC pulmonary medicine*. 2019;19(1):1-9.
44. Flood RG, Badik J, Aronoff SC. The utility of serum C-reactive protein in differentiating bacterial from nonbacterial pneumonia in children: a meta-analysis of 1230 children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008;27(2):95-9.
45. Do Q, Dao TM, Nguyen TNT, Tran QA, Nguyen HT, Ngo TT. Procalcitonin Identifies Bacterial Coinfections in Vietnamese Children with Severe Respiratory Syncytial Virus Pneumonia. *Biomed Res Int*. 2020;2020:7915158.
46. Elemraid MA, Rushton SP, Thomas MF, Spencer DA, Gennery AR, Clark JE. Utility of inflammatory markers in predicting the aetiology of pneumonia in children. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;79(4):458-62.
47. Florin TA, Ambroggio L, Brokamp C, Zhang Y, Rattan M, Crotty E, et al. Biomarkers and disease severity in children with community-acquired pneumonia. *Pediatrics*. 2020;145(6).
48. Tagarro A, Moraledas C, Domínguez-Rodríguez S, Rodríguez M, Martín MD, Luisa Herreros M, et al. A Tool to Distinguish Viral From Bacterial Pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2021.

49. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive care medicine*. 2020;46(5):846-8.
50. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*. 2020;395(10223):497-506.
51. Ren X, Wen W, Fan X, Hou W, Su B, Cai P, et al. COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas. *Cell*. 2021;184(7):1895-913. e19.
52. Bonam SR, Kotla NG, Bohara RA, Rochev Y, Webster TJ, Bayry J. Potential immuno-nanomedicine strategies to fight COVID-19 like pulmonary infections. *Nano Today*. 2020:101051.
53. Murphy K, Weaver C. The Induced Responses of Innate Immunity In: Murphy K, Weaver C, editors. *Janeway's Immunobiology*. 1. 9th ed2017. p. 87-96.
54. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Innate Immunity. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Basic Immunology Functions And Disorders of The Immune System*. 1. 6th ed2020. p. 26-7.
55. Bryant CE, Gay NJ, Heymans S, Sacre S, Schaefer L, Midwood KS. Advances in Toll-like receptor biology: Modes of activation by diverse stimuli. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2015;50(5):359-79.
56. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*. 2020;180(6):1044-66.
57. Perros F, Lambrecht BN, Hammad H. TLR4 signalling in pulmonary stromal cells is critical for inflammation and immunity in the airways. *Respiratory research*. 2011;12(1):1-8.
58. Schoeniger A, Fuhrmann H, Schumann J. LPS-or *Pseudomonas aeruginosa*-mediated activation of the macrophage TLR4 signaling cascade depends on membrane lipid composition. *PeerJ*. 2016;4:e1663.
59. Jeon HY, Park JH, Park JI, Kim JY, Seo SM, Ham SH, et al. Cooperative Interactions between Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4 in Murine *Klebsiella pneumoniae* Infections. *J Microbiol Biotechnol*. 2017;27(8):1529-38.

60. Skerrett SJ, Braff MH, Liggitt HD, Rubens CE. Toll-like receptor 2 has a prominent but nonessential role in innate immunity to *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Physiological reports*. 2017;5(21):e13491.
61. Di Stefano A, Ricciardolo FL, Caramori G, Adcock IM, Chung KF, Barnes PJ, et al. Bronchial inflammation and bacterial load in stable COPD is associated with TLR4 overexpression. *European Respiratory Journal*. 2017;49(5).
62. Leiva-Juarez MM, Kirkpatrick CT, Gilbert BE, Scott B, Tuvim MJ, Dickey BF, et al. Combined aerosolized Toll-like receptor ligands are an effective therapeutic agent against influenza pneumonia when co-administered with oseltamivir. *European journal of pharmacology*. 2018;818:191-7.
63. Shirey KA, Lai W, Scott AJ, Lipsky M, Mistry P, Pletneva LM, et al. The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature*. 2013;497(7450):498-502.
64. Shinya K, Ito M, Makino A, Tanaka M, Miyake K, Eisfeld AJ, et al. The TLR4-TRIF pathway protects against H5N1 influenza virus infection. *Journal of virology*. 2012;86(1):19-24.
65. Siebert JN, Hamann L, Veroleet CM, Gameiro C, Grillet S, Siegrist C-A, et al. Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein 180L single-nucleotide polymorphism is associated with susceptibility to recurrent pneumococcal lower respiratory tract infections in children. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1780.
66. Fan Q, Gu T, Li P, Yan P, Chen D, Han B. Roles of T-cell immunoglobulin and mucin domain genes and toll-like receptors in wheezy children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Heart, Lung and Circulation*. 2016;25(12):1226-31.
67. Zheng M, Karki R, Williams EP, Yang D, Fitzpatrick E, Vogel P, et al. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol*. 2021;22(7):829-38.
68. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2020;10(2):102-8.
69. Ulhaq ZS, Soraya GV. Interleukin-6 as a potential biomarker of COVID-19 progression. *Medecine et maladies infectieuses*. 2020;50(4):382.

70. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable serum severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 level in critically ill patients with coronavirus disease 2019. *Clinical infectious diseases*. 2020;71(8):1937-42.
71. Kritas S, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga C, Ross R, Conti P. Mast cells contribute to coronavirus-induced inflammation: new anti-inflammatory strategy. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2020;34(1):9-14.
72. Shafiek HK, El Lateef HMA, Boraey NF, Nashat M, Abd-Elrehim GAB, Abouzeid H, et al. Cytokine profile in Egyptian children and adolescents with COVID-19 pneumonia: A multicenter study. *Pediatr Pulmonol*. 2021.
73. Sun D, Li H, Lu X-X, Xiao H, Ren J, Zhang F-R, et al. Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: a single center's observational study. *World Journal of Pediatrics*. 2020:1.
74. Soraya GV, Ulhaq ZS. Interleukin-6 levels in children developing SARS-CoV-2 infection. *Pediatrics and neonatology*. 2020;61(3):253.
75. Qian G, Zhang Y, Xu Y, Hu W, Hall IP, Yue J, et al. Reduced inflammatory responses to SARS-CoV-2 infection in children presenting to hospital with COVID-19 in China. *EClinicalMedicine*. 2021;34:100831.
76. Pierce CA, Preston-Hurlburt P, Dai Y, Aschner CB, Cheshenko N, Galen B, et al. Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. *Science translational medicine*. 2020;12(564).
77. Ozsurekci Y, Aykac K, Er AG, Halacli B, Arasli M, Oygur PD, et al. Predictive value of cytokine/chemokine responses for the disease severity and management in children and adult cases with COVID-19. *J Med Virol*. 2021;93(5):2828-37.
78. Vasconcellos ÂG, Clarêncio J, Andrade D, Cardoso M-RA, Barral A, Nascimento-Carvalho CM. Systemic cytokines and chemokines on admission of children hospitalized with community-acquired pneumonia. *Cytokine*. 2018;107:1-8.

79. Liu M, Lu B, Fan H, Guo X, Du S, Yang D, et al. Heightened Local T(h)17 Cell Inflammation Is Associated with Severe Community-Acquired Pneumonia in Children under the Age of 1 Year. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:9955168.
80. Gou X, Yuan J, Wang H, Wang X, Xiao J, Chen J, et al. IL-6 During Influenza-Streptococcus pneumoniae Co-Infected Pneumonia-A Protector. *Front Immunol.* 2019;10:3102.
81. González LA, Melo-González F, Sebastián VP, Vallejos OP, Noguera LP, Suazo ID, et al. Characterization of the Anti-Inflammatory Capacity of IL-10-Producing Neutrophils in Response to Streptococcus pneumoniae Infection. *Front Immunol.* 2021;12:638917.
82. Li F, Wang Y, Zhang Y, Shi P, Cao L, Su L, et al. Etiology of Severe Pneumonia in Children in Alveolar Lavage Fluid Using a High-Throughput Gene Targeted Amplicon Sequencing Assay. *Front Pediatr.* 2021;9:659164.
83. Clark JE. Determining the microbiological cause of a chest infection. *Arch Dis Child.* 2015;100(2):193-7.
84. Song JY, Eun BW, Nahm MH. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: current pitfalls and the way forward. *Infection & chemotherapy.* 2013;45(4):351-66.
85. Couturier MR, Graf EH, Griffin AT. Urine antigen tests for the diagnosis of respiratory infections: legionellosis, histoplasmosis, pneumococcal pneumonia. *Clin Lab Med.* 2014;34(2):219-36.
86. Selickman J, Paxos M, File Jr TM, Seltzer R, Bonilla H. Performance measure of urinary antigen in patients with Streptococcus pneumoniae bacteremia. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2010;67(2):129-33.
87. Elemraid MA, Rushton SP, Clark JE, Perry JD, Thomas MF, Sails AD, et al. A Case-Control Study to Assess the Urinary Pneumococcal Antigen Test in Childhood Pneumonia. *Clinical pediatrics.* 2014;53(3):286-8.
88. Hassaneen M, Maron JL. Salivary diagnostics in pediatrics: applicability, translatability, and limitations. *Frontiers in public health.* 2017;5:83.
89. Measles. In: Salisbury D, Ramsay M, Noakes K, editors. *The Green Book, Immunisation against infectious disease.* 12019. p. 1-23.

90. Al Suwaidi H, Senok A, Varghese R, Deesi Z, Khansaheb H, Pokasirakath S, et al. Saliva for molecular detection of SARS-CoV-2 in school-age children. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(9):1330-5.
91. Maciejczyk M, Szulimowska J, Skutnik A, Taranta-Janusz K, Wasilewska A, Wiśniewska N, et al. Salivary biomarkers of oxidative stress in children with chronic kidney disease. *Journal of Clinical Medicine.* 2018;7(8):209.
92. Goodson JM, Kantarci A, Hartman M-L, Denis GV, Stephens D, Hasturk H, et al. Metabolic disease risk in children by salivary biomarker analysis. *PloS one.* 2014;9(6):e98799.
93. Kovalčíková AG, Pavlov K, Lipták R, Hladová M, Renczés E, Boor P, et al. Dynamics of salivary markers of kidney functions in acute and chronic kidney diseases. *Scientific reports.* 2020;10(1):1-12.
94. Maciejczyk M, Taranta-Janusz K, Wasilewska A, Kossakowska A, Zalewska A. A case-control study of salivary redox homeostasis in hypertensive children. Can salivary uric acid be a marker of hypertension? *Journal of clinical medicine.* 2020;9(3):837.
95. Jacobs R, Tshehla E, Malherbe S, Kriel M, Loxton AG, Stanley K, et al. Host biomarkers detected in saliva show promise as markers for the diagnosis of pulmonary tuberculosis disease and monitoring of the response to tuberculosis treatment. *Cytokine.* 2016;81:50-6.
96. Tsai CM, Tang KS, Cheng MC, Liu TY, Huang YH, Chen CC, et al. Use of saliva sample to detect C-reactive protein in children with pneumonia. *Pediatric Pulmonology.* 2020;55(9):2457-62.
97. Omran A, Ali M, Mohammad MH, Zekry O. Salivary C-reactive protein and mean platelet volume in diagnosis of late-onset neonatal pneumonia. *The clinical respiratory journal.* 2018;12(4):1644-50.
98. Klein Kremer A, Kuzminsky E, Bentur L, Nagler RM. Salivary and serum analysis in children diagnosed with pneumonia. *Pediatric pulmonology.* 2014;49(6):569-73.
99. Giancchetti E, Manenti A, Kistner O, Trombetta C, Manini I, Montomoli E. How to assess the effectiveness of nasal influenza vaccines? Role and

- measurement of sIgA in mucosal secretions. *Influenza and other respiratory viruses*. 2019;13(5):429-37.
100. Shah SS, Dugan MH, Bell LM, Grundmeier RW, Florin TA, Hines EM, et al. Blood cultures in the emergency department evaluation of childhood pneumonia. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(6):475.
 101. Kurowski EM, Shah SS, Thomson J, Statile A, Sheehan B, Iyer S, et al. Improvement methodology increases guideline recommended blood cultures in children with pneumonia. *Pediatrics*. 2015;135(4):e1052-e9.
 102. McCulloh RJ, Koster MP, Yin DE, Milner TL, Ralston SL, Hill VL, et al. Evaluating the use of blood cultures in the management of children hospitalized for community-acquired pneumonia. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117462.
 103. Myers AL, Hall M, Williams DJ, Auger K, Tieder JS, Statile A, et al. Prevalence of bacteremia in hospitalized pediatric patients with community-acquired pneumonia. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(7):736.
 104. Iroh Tam P-Y, Bernstein E, Ma X, Ferrieri P. Blood culture in evaluation of pediatric community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Hospital pediatrics*. 2015;5(6):324-36.
 105. Sullivan K, Turner N, Roundtree S, Young S, Brock-Haag C, Lacey D, et al. Rapid detection of Gram-positive organisms by use of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test and the BacT/Alert Pediatric FAN system in a multicenter pediatric evaluation. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(11):3579-84.
 106. Banerjee R, Hersh AL, Newland J, Beekmann SE, Polgreen PM, Bender J, et al. *Streptococcus pneumoniae*-associated hemolytic uremic syndrome among children in North America. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(9):736-9.
 107. Tomlinson G, Chimalapati S, Pollard T, Lapp T, Cohen J, Camberlein E, et al. TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. *The Journal of Immunology*. 2014;193(7):3736-45.

108. Picard C, Casanova J-L, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(3):490-7.
109. Bagheri V, Askari A, Arababadi MK, Kennedy D. Can Toll-Like Receptor (TLR) 2 be considered as a new target for immunotherapy against hepatitis B infection? *Hum Immunol*. 2014;75(6):549-54.
110. Mastalerz-Migas A, Pokorski M, Kiliś-Pstrusińska K, Doskocz K, Sapilak BJ, Brydak LB. Cytokines and toll-like receptors in the immune response to influenza vaccination. *Adv Exp Med Biol*. 2015;836:35-40.
111. Bucher K, Rodríguez-Bocanegra E, Dauletbekov D, Fischer MD. Immune responses to retinal gene therapy using adeno-associated viral vectors - Implications for treatment success and safety. *Prog Retin Eye Res*. 2021;83:100915.
112. Onofrio L, Caraglia M, Facchini G, Margherita V, Placido SD, Buonerba C. Toll-like receptors and COVID-19: a two-faced story with an exciting ending. *Future Science*; 2020. p. FSO605.
113. Mabrey FL, Morrell ED, Wurfel MM. TLRs in COVID-19: How they drive immunopathology and the rationale for modulation. *Innate Immunity*. 2021;27(7-8):503-13.
114. Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature immunology*. 2009;10(11):1200-7.
115. Thompson CM, Holden TD, Gail RR, Laxmanan B, Black RA, O'Keefe GE, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms and associated outcomes in sepsis following traumatic injury, a candidate gene association study. *Annals of surgery*. 2014;259(1).
116. Mikacenic C, Schneider A, Radella F, Buckner JH, Wurfel MM. Cutting edge: Genetic variation in TLR1 is associated with Pam3CSK4-induced effector T cell resistance to regulatory T cell suppression. *The Journal of Immunology*. 2014;193(12):5786-90.

117. Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 2008;133(2):235-49.
118. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science translational medicine*. 2015;7(304):304ra142-304ra142.
119. Younan P, Ramanathan P, Graber J, Gusovsky F, Bukreyev A. The toll-like receptor 4 antagonist eritoran protects mice from lethal filovirus challenge. *MBio*. 2017;8(2):e00226-17.
120. Haij NB, Leghmari K, Planès R, Thieblemont N, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF- α and IL-10. *Retrovirology*. 2013;10(1):1-12.
121. Zhao Y, Kuang M, Li J, Zhu L, Jia Z, Guo X, et al. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR4. *Cell Res*. 2021;31(7):818-20.
122. Lee KM, Seong SY. Partial role of TLR4 as a receptor responding to damage-associated molecular pattern. *Immunol Lett*. 2009;125(1):31-9.
123. Aboudounya MM, Heads RJ. COVID-19 and toll-like receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 may bind and activate TLR4 to increase ACE2 expression, facilitating entry and causing hyperinflammation. *Mediators of inflammation*. 2021;2021.
124. Manik M, Singh RK. Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19. *J Med Virol*. 2021.
125. Magro G. SARS-CoV-2 and COVID-19: Is interleukin-6 (IL-6) the ‘culprit lesion’ of ARDS onset? What is there besides Tocilizumab? *SGP130Fc. Cytokine: X*. 2020;2(2):100029.
126. Moreno-Eutimio MA, Lopez-Macias C, Pastelin-Palacios R. Bioinformatic analysis and identification of single-stranded RNA sequences recognized by TLR7/8 in the SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genomes. *Microbes and infection*. 2020;22(4-5):226-9.
127. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(4):293-307.

128. Sohn KM, Lee S-G, Kim HJ, Cheon S, Jeong H, Lee J, et al. COVID-19 patients upregulate toll-like receptor 4-mediated inflammatory signaling that mimics bacterial sepsis. *Journal of Korean medical science*. 2020;35(38).
129. Choudhury A, Mukherjee S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *Journal of medical virology*. 2020;92(10):2105-13.
130. Blanchard E, Truchetet ME, Machelart I, Séneschal J, Raherison-Semjen C. Respiratory infections associated with anti-TNF α agents. *Med Mal Infect*. 2017;47(6):375-81.
131. Haugen J, Chandyo RK, Brokstad KA, Mathisen M, Ulak M, Basnet S, et al. Cytokine concentrations in plasma from children with severe and non-severe community acquired pneumonia. *PloS one*. 2015;10(9):e0138978.
132. Martinez R, Menendez R, Reyes S, Polverino E, Cilloniz C, Martinez A, et al. Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. *European Respiratory Journal*. 2011;37(2):393-9.
133. Menéndez R, Sahuquillo-Arce JM, Reyes S, Martínez R, Polverino E, Cillóniz C, et al. Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia. *Chest*. 2012;141(6):1537-45.
134. Ning J, Shao X, Ma Y, Lv D. Valuable hematological indicators for the diagnosis and severity assessment of Chinese children with community-acquired pneumonia: prealbumin. *Medicine*. 2016;95(47).
135. Saghafian-Hedengren S, Mathew JL, Hagel E, Singhi S, Ray P, Ygberg S, et al. Assessment of cytokine and chemokine signatures as potential biomarkers of childhood community-acquired pneumonia Severity. *The Pediatric infectious disease journal*. 2017;36(1):102-8.
136. Remmelts HH, Meijvis SC, Biesma DH, van Velzen-Blad H, Voorn GP, Grutters JC, et al. Dexamethasone downregulates the systemic cytokine response in patients with community-acquired pneumonia. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012;19(9):1532-8.

137. Bacci M, Leme R, Zing N, Murad N, Adami F, Hinnig P, et al. IL-6 and TNF- α serum levels are associated with early death in community-acquired pneumonia patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2015;48:427-32.
138. Paats MS, Bergen IM, Hanselaar WE, van Zoelen ECG, Hoogsteden HC, Hendriks RW, et al. Local and systemic cytokine profiles in nonsevere and severe community-acquired pneumonia. *European respiratory journal*. 2013;41(6):1378-85.
139. Kim YH, Kim JE, Hyun MC. Cytokine response in pediatric patients with pandemic influenza H1N1 2009 virus infection and pneumonia: comparison with pediatric pneumonia without H1N1 2009 infection. *Pediatric pulmonology*. 2011;46(12):1233-9.
140. Gubernatorova E, Gorshkova E, Polinova A, Drutskaya M. IL-6: relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine & growth factor reviews*. 2020;53:13-24.
141. Velazquez-Salinas L, Verdugo-Rodriguez A, Rodriguez LL, Borca MV. The role of interleukin 6 during viral infections. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:1057.
142. Toniati P, Piva S, Cattalini M, Garrafa E, Regola F, Castelli F, et al. Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure: a single center study of 100 patients in Brescia, Italy. *Autoimmunity reviews*. 2020;19(7):102568.
143. Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, Jiang Z, et al. Epidemiological characteristics of 2143 pediatric patients with 2019 coronavirus disease in China. *Pediatrics*. 2020;145(6):e20200702.
144. McMurray JC, May JW, Cunningham MW, Jones OY. Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C), a post-viral myocarditis and systemic vasculitis—a critical review of its pathogenesis and treatment. *Frontiers in Pediatrics*. 2020;8:871.
145. Carter MJ, Fish M, Jennings A, Doores KJ, Wellman P, Seow J, et al. Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory

- syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. *Nature medicine*. 2020;26(11):1701-7.
146. Consiglio CR, Cotugno N, Sardh F, Pou C, Amodio D, Rodriguez L, et al. The immunology of multisystem inflammatory syndrome in children with COVID-19. *Cell*. 2020;183(4):968-81. e7.
 147. Lu LY, Feng PH, Yu MS, Chen MC, Lin AJ, Chen JL, et al. Current utilization of interferon alpha for the treatment of coronavirus disease 2019: A comprehensive review. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2022;63:34-43.
 148. Contoli M, Papi A, Tomassetti L, Rizzo P, Vieceli Dalla Sega F, Fortini F, et al. Blood interferon- α levels and severity, outcomes, and inflammatory profiles in hospitalized COVID-19 patients. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:536.
 149. Smelaya TV, Belopolskaya OB, Smirnova SV, Kuzovlev AN, Moroz VV, Golubev AM, et al. Genetic dissection of host immune response in pneumonia development and progression. *Sci Rep*. 2016;6:35021.
 150. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507-13.
 151. Xu Z-S, Shu T, Kang L, Wu D, Zhou X, Liao B-W, et al. Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. *Signal transduction and targeted therapy*. 2020;5(1):1-3.
 152. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11:827.
 153. Baurakiades E, Costa Jr VH, Raboni SM, de Almeida VRT, Larsen KSK, Kohler JN, et al. The roles of ADAM33, ADAM28, IL-13 and IL-4 in the development of lung injuries in children with lethal non-pandemic acute infectious pneumonia. *Journal of Clinical Virology*. 2014;61(4):585-9.
 154. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International journal of oral science*. 2020;12(1):1-5.
 155. Liu L, Wei Q, Alvarez X, Wang H, Du Y, Zhu H, et al. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome

- coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *Journal of virology*. 2011;85(8):4025-30.
156. Duma Z, Chuturgoon AA, Ramsuran V, Edward V, Naidoo P, Mpaka-Mbatha MN, et al. The challenges of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) testing in low-middle income countries and possible cost-effective measures in resource-limited settings. *Global Health*. 2022;18(1):5.
 157. Ceron JJ, Lamy E, Martinez-Subiela S, Lopez-Jornet P, Capela-Silva F, Eckersall PD, et al. Use of saliva for diagnosis and monitoring the SARS-CoV-2: a general perspective. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(5):1491.
 158. Meng L, Hua F, Bian Z. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): emerging and future challenges for dental and oral medicine. *Journal of dental research*. 2020;99(5):481-7.
 159. Kim DH, Basurrah MA, Han JH, Kim SW, Hwang SH. The diagnostic accuracy of RT-PCR from self-collected saliva versus nasopharyngeal sampling: A systematic review and meta-analysis. *Saudi Med J*. 2022;43(1):9-30.
 160. Wu J, Jin Y, Li H, Xie Z, Li J, Ao Y, et al. Evaluation and significance of C-reactive protein in the clinical diagnosis of severe pneumonia. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;10(1):175-80.
 161. de Brito RdCCM, Lucena-Silva N, Torres LC, Luna CF, Correia JdB, da Silva GAP. The balance between the serum levels of IL-6 and IL-10 cytokines discriminates mild and severe acute pneumonia. *BMC pulmonary medicine*. 2016;16(1):1-10.
 162. Lee JH, Kim J, Kim K, Jo YH, Rhee J, Kim TY, et al. Albumin and C-reactive protein have prognostic significance in patients with community-acquired pneumonia. *Journal of critical care*. 2011;26(3):287-94.
 163. Torres A, Ramirez P, Montull B, Menéndez R, editors. *Biomarkers and community-acquired pneumonia: tailoring management with biological data*. *Seminars in respiratory and critical care medicine*; 2012: Thieme Medical Publishers.

164. Zhu F, Jiang Z, Li W, Wei H, Su G. Clinical significance of serum procalcitonin level monitoring on early diagnosis of severe pneumonia on children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(22):4300-3.
165. Lee JY, Hwang SJ, Shim JW, Jung HL, Park MS, Woo HY, et al. Clinical significance of serum procalcitonin in patients with community-acquired lobar pneumonia. *The Korean journal of laboratory medicine*. 2010;30(4):406-13.
166. Agnello L, Bellia C, Di Gangi M, Sasso BL, Calvaruso L, Bivona G, et al. Utility of serum procalcitonin and C-reactive protein in severity assessment of community-acquired pneumonia in children. *Clinical biochemistry*. 2016;49(1-2):47-50.
167. Yang J-X, Tseng J-C, Yu G-Y, Luo Y, Huang C-YF, Hong Y-R, et al. Recent Advances in the Development of Toll-like Receptor Agonist-Based Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):423.
168. Rammensee H-G, Wiesmüller K-H, Chandran PA, Zelba H, Rusch E, Gouttefangeas C, et al. A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7(1):1-18.
169. Rammensee H-G, Gouttefangeas C, Heidt S, Klein R, Preuß B, Walz JS, et al. Designing a sars-cov-2 t-cell-inducing vaccine for high-risk patient groups. *Vaccines*. 2021;9(5):428.
170. Heitmann JS, Bilich T, Tandler C, Nelde A, Maringer Y, Marconato M, et al. A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity. *Nature*. 2022;601(7894):617-22.
171. Tuebingen: CoVac-1 [Available from: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/41/>].
172. Esposito S, Garziano M, Rainone V, Trabattoni D, Biasin M, Senatore L, et al. Immunomodulatory activity of pidotimod administered with standard antibiotic therapy in children hospitalized for community-acquired pneumonia. *J Transl Med*. 2015;13:288.
173. Trabattoni D, Clerici M, Centanni S, Mantero M, Garziano M, Blasi F. Immunomodulatory effects of pidotimod in adults with community-acquired

- pneumonia undergoing standard antibiotic therapy. *Pulm Pharmacol Ther.* 2017;44:24-9.
174. Evans SE, Tseng C-TK, Scott BL, Höök AM, Dickey BF. Inducible epithelial resistance against coronavirus pneumonia in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2020;63(4):540-1.
175. Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *Jama.* 2013;309(11):1154-62.
176. Cai X, Fu Y, Chen Q. Association between TLR4 A299G polymorphism and pneumonia risk: a meta-analysis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* 2015;21:625.

8. EKLER

Ek-1. Veri Toplama Formu

ÇALIŞMA FORMU

Katılımcının;

Numarası:

İlk başvuru tarihi:

Klinik: (Sağlıklı kontrol, hafif ya da ağır pnömoni geçiren hasta)

Saptanan etken ve izole edilen yer:

Radyolojik görüntüleme:

Beyaz küre sayısı:

Lenfosit sayısı:

Trombosit sayısı:

MPV:

NLR:

ESR:

CRP:

Prokalsitonin:

Serum TLR-2 düzeyi:

Serum TLR-4 düzeyi:

Serum IL-1 düzeyi:

Serum IL-4 düzeyi:

Serum IL-6 düzeyi:

Serum IL-10 düzeyi:

Serum IFN- α düzeyi:

Serum TNF- α düzeyi:

Tükürük TLR-2 düzeyi:

Tükürük TLR-4 düzeyi:

Tükürük IL-1 düzeyi:

Tükürük IL-6 düzeyi:

Tükürük IL-10 düzeyi:

Tükürük IFN- α düzeyi:

Tükürük TNF- α düzeyi: