



**T.C  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Sağlıklı Bireylerde *Pneumocystis jirovecii*  
Kolonizasyonunun Araştırılması**

**Doktora Tezi**

**Iman Qoraan**

**Danışman**

**Doç. Dr. Yasemin Öz**

**2015**





**T.C**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Sağlıklı Bireylerde *Pneumocystis jirovecii***  
**Kolonizasyonunun Araştırılması**

**Doktora Tezi**

**Iman Qoraan**

**Danışman**






**Doç. Dr. Yasemin Öz**

**Proje no: 2014-496**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

İnan Polatın 'in Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak hazırladığı  
"Sağlıklı bireylerle... Paten... yüksekli... kalani... araştırılması"  
başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim  
ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek  
"KABUL" edilmiştir.

Tarih  
22/12/2015

Üye: Prof. Dr. Yurdanur Alişan   
Üye: Prof. Dr. Gül Dürner   
Üye: Prof. Dr. A. Meltem May   
Üye: Prof. Dr. Kymet Coşkun   
Üye: Doç. Dr. Yasecan ÖZ 

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu'nun 24/12/2015 tarih ve 1070/5025 sayılı kararı ile  
onaylanmıştır.

(Ünvan ve İsim)  
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ  
Enstitü Müdürü

## Teşekkür

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora yapmamı sağlayan; tez çalışmalarımı yönlendiren; her konuda desteğini gördüğüm, büyük anlayış ve yardımlarını esirgmeden katkıları ile yetişmemde vesile olan, tez çalışmalarına önemli katkıları ile yardımcı olan ve bilgilerinden faydalandığım Sayın Hocam Doç. Dr. Yasemin Öz'e içten şükran duygularımı sunarım.

Tezimin ilk aşamasında, örnek toplama sırasında yardım gösteren ve ilgilerinden dolayı Prof. Dr. O.Meltem Akay ve Sayın Dahiliye uzmanı Dr. Ali Öz'e,

Çalışmamın istatistik analizini destekleyen ve bilgilerinden faydalandığım değerli Hocam Sayın Prof. Dr.Selma Metintaş'a,

Daima anlayışlı ve yardımcı yaklaşımları ile güç veren, uzun bir dönemden bu yana birlikte çalıştığımız Araş. Gör. Dr. Egemen Gökbolat, Araş. Gör. Dr. Suat Yıldız, Araş. Gör. Dr. Ali Durmaz ve Mikrobiyoloji de çalışan teknisyen arkadaşım Esra Bilir'e, ayrıca tüm Hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yaşantım boyunca beni destekleyen daima yanımda olan, her zaman güç aldığım AİLEM'e teşekkür ederim.

*İnan Çeraan*

## Özet

*Pneumocystis jirovecii* immüdüşkün hastalarda interstisyel pneumoni (PCP) etkeni olan atipik bir mantardır. Bununla birlikte, hastalarda ve sağlıklı bireylerde asemptomatik alt solunum yolu kolonizasyonu da yapabilmektedir. Kolonize bireyler *P.jirovecii* için hem rezervuar hem de duyarlı hastalara bulaşta enfeksiyon kaynağı rolü oynayabilmektedir. *Pneumocystis* enfeksiyonlarının tanısında altın standart yöntem, geleneksel boyalarla veya işaretli özgül antikorların yer aldığı direkt floresan antikor (DFA) testleri ile *Pneumocystis* kist ve/veya trofozoitlerinin hasta örneklerinde gösterilmesidir. Ancak, özellikle düşük parazit yükünün söz konusu olduğu kolonize bireylerde moleküler yöntemlerin daha uygun olduğu bildirilmektedir.

Çalışmamızda, PCP açısından sağlık çalışan ve sağlık çalışan olmayan bireylerde *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, Sağlık çalışanları, sağlık çalışan olmayan gönüller ve immüdüşkün gönüllülerden oluşan 250 gönüllüden ağız çalkantı suyu ve nazal sürüntü örnekleri toplanmış ve real-time PCR yöntemi ile *P.jirovecii* MSG geni araştırılmıştır. Ayrıca, PCR ile *P.jirovecii* pozitif saptanan örnekler DFA testi ile değerlendirilmiştir.

*P.jirovecii* kolonizasyon oranı tüm çalışma grubunda %22.8 bulunmuş olup, sağlık çalışanları, sağlık çalışan olmayan erişkinleri ve immüdüşkün hastalarda ayrı olarak değerlendirildiğinde sırasıyla %22, %21 ve %28 oranları elde edilmiştir. *P. jirovecii* kolonizasyonu üzerine etkili olabilecek faktörlerin analizinde; cinsiyet, geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu, kronik hastalık varlığı, sigara ve alkol kullanımı, antibiyotik ve kemoterapi ilac kullanımı, sağlık çalışanın çalışma süresi ile *P. jirovecii* kolonizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Hematoloji hastalarında hastalık süresi ile kolonizasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Öte yandan, *P.jirovecii* kolonizasyonu

pozitif örneklerin DFA testi ile de değerlendirilmesi sonucunda, *P.jirovecii* kolonizasyonunun saptanmasında real-time PCR testinin daha duyarlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu alışma, sınırlı bir bölgeyi kapsamakla birlikte, ülkemizde *P. jirovecii* kolonizasyonunun varlığını ve yaygınlığını ortaya çıkarmıştır. Bilgilerimize göre çalışmamız, *Pneumocystis jirovecii* enfeksiyonu olmayan bireylerde kolonizasyon prevalansını belirlemeye yönelik ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Ancak, ülkemizdeki genel durumun yansıtılabilmesi için, farklı bölgelerden, daha fazla sayıda katılımcının dahil edileceği, kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: *P.jirovecii*, kolonizasyon, sağlık çalışan, sağlık çalışan olmayan, immüdüşkün gönüllüleri,real time-PCR

## Summary

*Pneumocystis jirovecii*, is an atypical fungus that can cause interstitial pneumonia in most immunosuppressed patients. However, it could colonize the lower respiratory system of patients as well as healthy population. *P.jirovecii* colonized individuals could act as a major reservoir and would serve as a source of infection for susceptible subjects.

The gold standard method for detection of *P.jirovecii* is staining trophozoites and cysts by conventional and immunofluorescence stains, though it can be diagnosed by different PCR methods. In colonized subjects, the load of organisms is usually low making it may be more appropriate for detection of *Pneumocystis* colonization using PCR methods.

The object of our study is to determine the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in three different *Pneumocystis jirovecii* not infected population groups: Health care workers, general population and immunosuppressed volunteers using oropharyngeal and nasal swabs. All specimens were analysed by real time-PCR targeting *P.jirovecii* MSG gen. Positive samples were re-assessed using direct immunofluorescence method as the standard diagnostic method of *P.jirovecii*.

Our results showed that a total of % 22 of the hospital workers, % 21 of general population and %28 of immunosuppressed volunteers are colonized with *P.jirovecii*. Analysis of colonization risk factors; gender, upper respiratory infection, chronic lung infection, smoking, alcohol, working duration in hospital, using antibiotics or chemotherapeutic drugs revealed that there is no statistical difference between these factors and *P.jirovecii* colonization; however, there is statistical difference between colonized and non colonized groups in terms of disease duration ( $p < 0.05$ ). Moreover, comparing positive results given by real time-PCR with direct



immunofluorescence test we found that real time-PCR method is more sensitive in detecting *P.jirovecii* low levels present in colonized patients.

In conclusion; our results of *P.jirovecii* colonization among health workers and general population in our country are comparable to other published data in other populations. This is also the first time to assess *P.jirovecii* colonization prevalence among PCP not infected immunosuppressed volunteers, health care workers and general population; however, there is a need to study broader groups in Turkey in order to generalize these results.

Key words: *P.jirovecii*, colonization, health workers, general population, immunosuppressed volunteers, real time-PCR.

## İçindekiler

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay Sayfası	ii
Teşekkür	iii
Özet	iv-v
Summary	Vi-vii
Tablo Dizini	ix-xi
Şekil Dizini	xii
Simge ve Kısaltmalar Dizini	xiii-xiv
Giriş ve Amaç	1
Genel Belgiler	2
Gereç ve Yöntemler	23
Bulgular	30
Tartışma	49
Sonuç	59
Kaynaklar	61
Özgeçmiş	82

## Tablo Dizini

### Tablo

3.1 MSG gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan primer ve probe dizileri	26
3.2 Real time -PCR Reaksiyon karışımı	27
4.1 Çalışma gruplarının yaş dağılımları	30
4.2 Çalışma gruplarının cinsiyet dağılımları ve kolonizasyon oranları	31
4.3 Yaşlara göre real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılması	32
4.4 Bireylere ait çeşitli özellikler ve <i>P. jirovecii</i> kolonizasyon sıklığı	33
4.5 Sağlık çalışanlarının mesleklere göre dağılımları	34
4.6 Sağlık çalışanlarının çalışma bölümlerine dağılımları	34
4.7 Sağlık çalışanın çalışma süresi dağılımları	35
4.8 Sağlık çalışanın da geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu (son 3 ay) ve <i>P. jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	35
4.9 Sağlık çalışanın da kronik akciğer hastalık varlığında <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	36
4.10 Sağlık çalışanın da immünsüpresif ilaç kullanımı ile <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	36
4.11 Sağlık çalışanlarında antibiyotik kullanımı ile <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	37

Devam Ediyor

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 Sağlık çalışanlarında sigara kullanımı ve <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu	37
4.13 Sağlık çalışanlarında alkol kullanımı ve <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu	38
4.14 Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde geçirilmiş solunum yolu enfeksiy (son 3 ay) ve <i>P. jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	38
4.15 Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde kronik akciğer hastalık varlığı ile <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu ilişkisi	39
4.16 Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde immunsüpresif ilaç kullanımı ve <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	40
4.17 Son üç ay Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde antibiyotik kullanımı ve <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	40
4.18 Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde sigara kullanımı ve <i>P.jirovecii</i> Kolonizasyonu	41
4.19 Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde alkol kullanımı ve <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu	41
4.20 Hematolojik hastalıklar ve <i>P. jirovecii</i> kolonizasyon sıklığı	42
4.21 Hastanede yatış süresi ile <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu	42
4.22 Hastalık süresi ile <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	42
4.23 İmmüdüškün hastalarda geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu (son 3 ay) ve <i>P. jirovecii</i> kolonizasyonu sıklığı	43

Devam Ediyor

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.24a İmmüdüşkün hastalarda kemoterapi ilaç kullanımı ile <i>P. jirovecii</i> kolonizasyonu	44
4.24b İmmüdüşkün hasta grubu kemoterapi tedavi şekli ile <i>P. jirovecii</i> kolonizasyonu	44
4.25 Son üç ay immüdüşkün hastalarında antibiyoti kullanımı ile <i>P. jirovecii</i> kolonizasyonu	45
4.26 İmmüdüşkün hastalarında sigara kullanımı ile <i>P. jirovecii</i> kolonizasyonu	45
4.27 İmmüdüşkün hastalarda alkol kullanımı ve <i>P.jirovecii</i> kolonizasyonu	46

## Şekil Dizini

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> hayat döngüsü	5
Şekil 2.2 <i>P. P. jirovecii</i> tanısında kullanılan boyama Yöntemleri	17
Şekil 3.1 Real-time PCR Amplifikasyon eğrileri	27
Şekil 4.1 Çalışma gruplarında yaşa göre kolonizasyon oranları	31
Şekil 4.2 <i>P.jirovecii</i> İFA görüntüleri	47
Şekil 4.3 Real-time PCR ve direkt immunfloresan test sonuçları	48

## Simge ve Kısaltmalar Dizini

- AIDS:** Acquired Immune Deficiency Syndrome  
**BAL:** Bronkoalveolar lavaj  
**BDG:** (1-3)  $\beta$ -D-Glukan  
**CT:** Cycle threshold  
**CD4:** Cluster of differentiation 4  
**CD8:** Cluster of differentiation 8  
**DHFR:** Dihidrofolat redüktaz  
**DNA:** Deoksiribonükleik asit  
**GMS:** Gomori-Grocott methenamine silver  
**gp A:** Glikoprotein A  
**HAART:** Highly Active Anti-Retroviral Therapy  
**HEL:** İnsan akciğer fibroblast  
**HIV:** Human immunodeficiency virus  
**HRCT:** Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi  
**IFA:** Immunofloresan antikor  
**Ig:** Immunoglobulin  
**IL:** Interlökin  
**IS:** İndüklenmiş balgam  
**ITS:** Internal transcribed spacer  
**KL-6:** Musin benzeri yüksek molekül ağırlıklı glikoprotein  
**KOAH:** Kronik obstrüktif akciğer hastalığı  
**KDa:** Kilo dalton  
**LDH:** Laktat dehidrojenaz  
**MIP:** Makrofaj iltihap proteini  
**MSG:** Major yüzey glikoprotein

Devam Ediyor

**MSR:** Tip II major yüzey glikoprotein

**mtLSU:** Mitokondriyal geniş alt ünite

**NK:**Doğal öldürücü hücreler

**nm:** Nano metre

**PcADAM:** *Pneumocystis carinii* disintegrin and metalloproteas

**PCP:** *Pneumocystis carinii* pnömoni

**PRT:** Proteaz

**rRNA:** Ribosomal ribonükleik asit

**REAL TIME-PCR:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

**SAM:** S-adenosylmethionine

**SIDS:** Bebek ölüm sendromu

**spp:** Türler

**TMP/SMX:** Trimetoprim/sulfametoksazol

**TS:** Timidilat sentaz

**TNF:** Tümör nekrozu faktörü



## 1- GİRİŞ VE AMAÇ

*Pneumocystis jirovecii* kültürde üretilmeyen, kaynağı ve bulaş yolu kesin olarak kanıtlanamamış bir fırsatçı fungal patojen olup, pnömosistis pnömonisinin (PCP) etkenidir. Bununla birlikte muhtemel kaynağın enfekte hastalar ve kolonize sağlıklı bireyler olduğu ve bulaşın da solunum yoluyla gerçekleştiğine dair bulgular mevcuttur (Wazir vd., 2004; Medrano vd., 2005). *P. jirovecii* bakteriyel veya viral pnömonisi olup hastanede yatan hastalarda kolonize olabilmektedir. Hastalar, pnömoninin yaygınlaşması, enfeksiyonun bulaşı, tedavinin güçleşmesi, inflamasyon ve bölgesel alveolar hasarın gelişip kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) oluşması gibi risklerle karşı karşıya gelebilmektedir. Hastane ve kliniklerde PCP salgınlarının olması, PCP'li bir hastadan, PCP açısından riskli bir immün düşkün hastaya *P. jirovecii*'nin aktarıldığı yönündeki teoriyi desteklemektedir (Moris vd., 2008). *P. jirovecii* pnömonisinin yayılımında kolonize olmuş kişilerin rolü kesinleşmiştir ve çalışmalar, PCP'li hastalarla ilgilenen immün yeterli hastane çalışanları ve PCP'li hastanın ailesindeki diğer bireylerin de *P. jirovecii* ile kolonize olabildiğini göstermiştir. İnsanların *P. jirovecii* ile karşılaşmalarının genellikle çocukluk döneminde gerçekleştiği ve sağlıklı bireylerde kolonizasyon oranının yüksek olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Vargas vd., 2001). Ancak, ülkemizdeki *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığına dair herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Bu çalışmada, herhangi bir solunum sistemi enfeksiyonu bulgusu olmayan gönüllülerden invaziv olmayan yöntemlerle elde edilen klinik örneklerde *P.jirovecii* DNA'sının moleküler testlerle araştırılması ve böylece ülkemiz için, en azından yakın çevremizi içeren, bir veri elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 2- GENEL BİLGİLER

### 2.1- Tarihçe

*Pneumocystis* türleri dünyada yaygın olarak saptanan ve konak çeşitliliği geniş olan ökaryotlardır. Bazı özellikleriyle protozoon, bazı özellikleriyle mantarlara benzeyen bir mikroorganizmadır. İlk olarak 1909 yılında Carlos Chagas tarafından fark edilmiş ve *Trypanosoma cruzi* ile enfekte edilmiş kobayların akciğerlerinde gösterilmiş ve yanlışlıkla *Trypanosoma*'ların şizogonal evresi olarak tanımlanmıştır (Delanoe P vd., 1912). Doktor Antonio Carini, 1910 yılında, *Trypanosoma lewisi* ile enfekte sıçanların akciğerinde benzer kistler saptadığını bildirmiştir (Delanoe P vd., 1912). Üç yıl sonra Pierre ve Delanoe *Trypanosoma* ile enfekte olmayan hayvanların akciğerlerinde de aynı kistleri saptamışlar ve ayrı bir tür ve cins olarak tanımlamış ve daha önce sıçanlar üzerinde etkeni saptamış olan Carini'nin anısına *P. carinii* olarak adlandırmışlardır (Walzer vd., 2005; Moris ve Noris, 2012; Aliouat-Denis ve ark, 2009; Stringer, 1996; Stringer vd., 2002; Magali vd., 2010).

İnsanda *Pneumocystis carinii*'ye bağlı ilk enfeksiyon, 1942'de Hollanda'da 3 olgu şeklinde rapor edilmiştir (Van der vd., 1942). İkinci Dünya Savaşı sonunda Avrupa'da bir öksüzler yurdunda yetersiz beslenen çocuklar arasında görülen plazma hücreli pnömoni epidemisi ile Vanek ve Jirovec tarafından tanımlandı (Jirovec 1952; Gajdusek, 1957). Daha sonra 1960'lı yıllarda konjenital immun yetmezlikli çocuklar ve malignite tedavisi gören yetişkinlerde nadir sporadik vakalar olarak bildirilmiştir. 1980'li yıllarda AIDS hastalığının ortaya çıkmasıyla PCP vaka sayısında artış gözlenmiştir. İmmunitesi baskılanmamış bireylerde etkenin hastalık oluşturmadığı bildirilmektedir. Mikroorganizmayı 1951 yılında yeni doğanlarda interstisyel plazma hücreli pnömoni etkeni olarak ilk kez tanımlayan Çek parazitolog Otto Jirovec'in onuruna, Frenkel tarafından 1999 yılında *P. jirovecii* ismi kullanılmıştır. Böylece *Pneumocystis carinii* ismi sadece sıçanlarda enfeksiyon etkeni olan türün adı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Walzer vd., 2005; Wazir vd., 2004; Stringer vd., 1996; Stringer vd., 2002; Magali vd., 2010).

### 2.2- Sınıflandırma

*Pneumocystis jirovecii* (*P. carinii* f. sp. *hominis*) tek hücreli, ökaryotik bir mikroorganizma olup, önceleri protozoon olarak kabul edilmesine rağmen 1980'lerin sonuna doğru kromozomal karyotiplendirme, nükleotid sekans analizi, multilokus enzim elektroforezi, antijenik özellik ve enfeksiyonun deneysel olarak geçişini araştıran ultrastrüktürel çalışmalar sonucu protozoonlardan çok atipik filamentöz olmayan mantarlara benzerlik

gösterdiği saptanmıştır (Wazir vd., 2004; Aliouat-Denis vd., 2009; Stringer vd., 1996; Cushion vd., 2007).

Morfolojik yapısı, protozoa ve bakterilerde bulunan yüzey antijenik varyasyonu, antiprotozoal ilaçlara karşı olan duyarlılığı, mantar besiyerinde üreyememesi özellikleri protozoonlarla benzerlik gösterir. Ancak organel sisteminin iyi gelişmiş olması, mantar boyaları ile boyanabilmesi, kist duvarının ultrastrüktürel yapısı, kristalize lameller yapıdaki mitokondriler, intrakistik yapıları içeren kist formları, protein sentez elongasyon faktör 3, timidilat sentaz, dihidrofolat redüktaz genleri ve 18S rRNA geni nükleotid dizi analizleri ile mantarlara daha yakın olduğu gösterilmiştir. Filogenetik olarak *P. jiroveci*'nin, fungi aleminde, Dikarya alt aleminde, Ascomycota bölümünde, Taphrinomycotina alt bölümünde, Archiascomycetes sınıfında, Pneumocystidales takımında ve Pneumocystiaceae ailesinde sınıflandırılması önerilmektedir (Wazir vd., 2004; Stringer, 1996; Cushion, 2004; Beck vd., 2009; Mehlhorn, 2008; Cushion vd., 2007).

## **2.3- Morfoloji**

*Pneumocystis'in* uzun süreli, devamlı ve güvenilir bir kültür sistemiyle halen üretilmemiş olması nedeniyle mantarın yaşam siklusu, morfolojisi ve enfeksiyona hangi formunun neden olduğu tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir (Walzer vd., 2004; Calderon vd., 2011). Mikroorganizmanın bilenen tüm yaşam döngüsü aşamaları memelilerin akciğer alveollerinde hücre dışında nadiren de ekstrapulmoner organlarda belirlenmiştir. Işık ve elektron mikroskopisi ile incelendiğinde *P. jiroveci*'nin yaşam döngüsünde farklı formların bulunabildiği saptanmıştır (Walzer vd.,2005; Wazir vd., 2004; Calderon vd., 2011; Magali vd., 2010):

- 1.Trofozoit
- 2.Prekist (erken, ara, geç prekist evreleri)
- 3.Kist (asci)

### **2.3.1 -Trofozoitler;**

Trofozoit formu, *Pneumocystis* yaşam siklusunun vejetatif aşaması ve akciğerde en sık (% 90-95 oranında) görülen formudur (Aliouat-Denis vd., 2009). Boyutları 1.2-5 µm çapında olup pleomorfik yapıdadır. Çoğunlukla kümeler halinde amoeboid şekilde bulunurlar. İnce çift duvarla çevrilidir. Hücre duvarı yaklaşık 20-25 µm kalınlığındadır ve iç kısımda daha ince plazma membranı bulunur. Trofozoit yüzeyinde bulunan tübüler çıkıntılar (veya filopodya), alveolar keselerde tip 1 epitelyal hücrelere tutunmaya yardımcı olmakta ve besin alımını arttırmaktadır.

Trofozoit içinde çok sayıda porları bulunan tipik nükleer zarf ile çevrelenmiş ve genelde dağınık kromatin içeren tek çekirdek bulunur. Çekirdek çift çeperlidir. Sitoplazmada veziküllü golgi, düzensiz yerleşimli mitokondri, vakuoler boşluklar, ribozomlar, glikojen benzeri parçacıklar, mikrotübül ve muhtemel lipit kökenli serbest osmofilik granüller bulunur. Plasma zarı düzgündür ve pas mantarları (rust fungi) gibi plazma membranında sterol değil, yağ asidi veya 3-beta hydroxysterol içerir (Walzer vd., 2005; Vavra vd., 1970; Magali vd., 2010; Chinnappan vd., 2011; Mehlhorn, 2008).

### **2.3.2- Prekistler (erken, ara, geç prekist evreleri);**

Prekist formu trofozoit ve kist arasındaki ara şekiller olarak tanımlanmaktadır. Erken dönemde dış zar tek ve kesintili, elektron yoğun katmanlıdır. Tek çekirdeklidir. Ribozom, glikojen ve mitokondri sayısı fazladır. Sinaptonemal kompleksler görülür, bu kompleksler mayoz bölünmenin olduğunun göstergesidir. Ara dönemde, yapısı yuvarlaktır, 2-4 adet çekirdeği vardır ve hücre duvarı üç katmanlı olup daha kalındır. Geç dönemde ise hücre duvarı daha da kalınlaşır, 40-100 nm boyutlarına ulaşır ve  $\beta$ -1,3 glukan açısından zengindir. Çekirdek sayısı dörtten fazla ve çift zarlı görüntüsü tipiktir (Walzer vd., 2005; Magali vd., 2010).

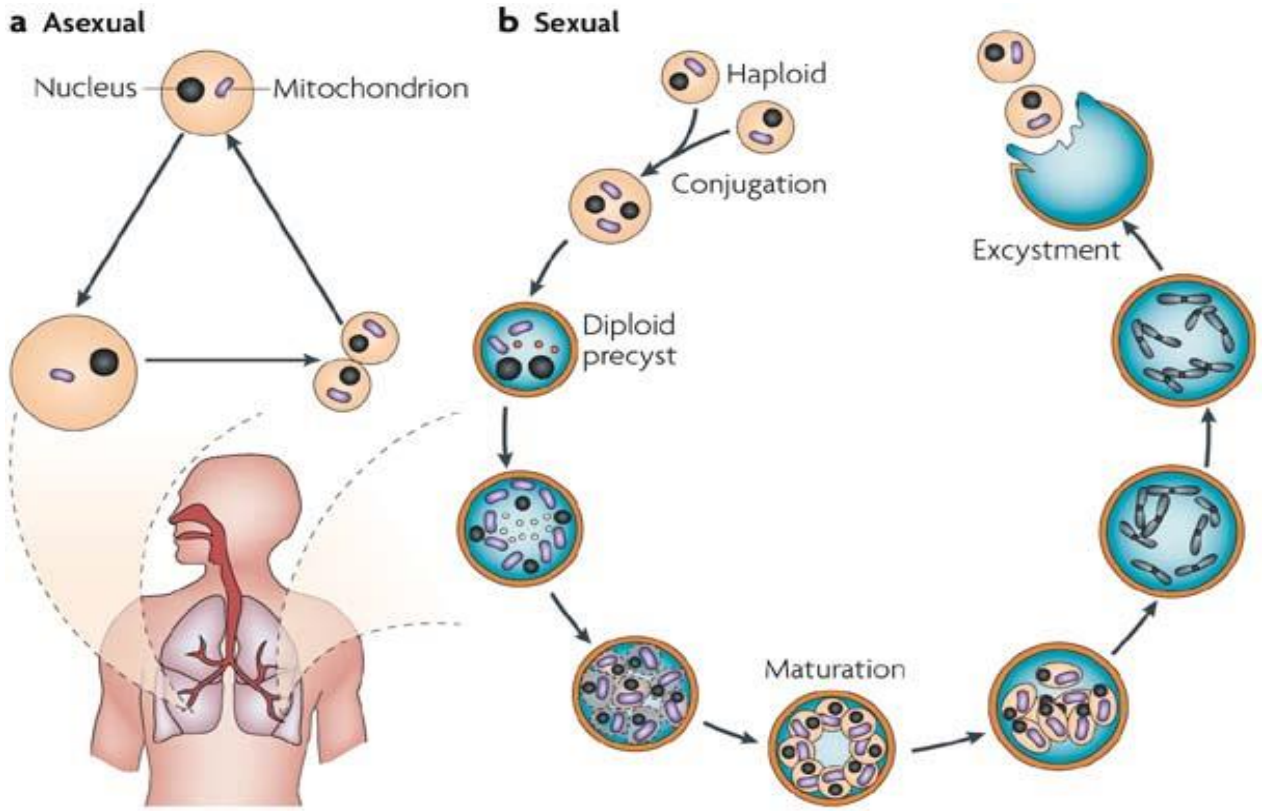
### **2.3.3- Kist formu**

Kist formu diğer şekillere göre daha büyük olup 4-8  $\mu$ m boyutlarında ve yuvarlak veya hilal şekillidir. Düzgün ve kalın bir duvara sahiptir. Duvar çeriye çıkıntılar yaparak parantez benzeri şekiller oluşturur, Gomori'nin gümüşleme boyası ile boyandığında görünen bu çıkıntılar kistler için tipik bir özelliktir. Filopodya nadiren bulunur. Her kist en fazla sekiz intrakistik cisim içermektedir (Walzer vd., 2005; Wazir vd., 2004). İtrakistik cisimcikler 1-2  $\mu$ m büyüklüğünde olup çift katlı zara sahiptir. Cisimciklerin içinde nükleus, mitokondri, endoplazmik retikulum ve birçok serbest ribozom bulunmaktadır. Kistin parçalanması ile açığa çıkan intrakistik cisimcikler gelişerek trofozoitlere dönüşmektedir. Kist duvarı 50-160 nm kalınlığında olup dış, orta ve en içte plazmalemma olmak üzere 3 katmandan oluşmaktadır. En iç tabaka trofozoitlerin plazma membranına benzer, orta tabaka en elektron geçirgen tabakadır, beta-1,3 glukan, kitin ve melanin gibi karmaşık polimerler içermektedir (Walzer vd., 2005; Magali vd., 2010; Chinnappan vd., 2011; Thomas vd., 2004).

## **2.4- Üreme**

Elektron mikroskopik çalışmalarla göre, *Pneumocystis*'in üreme şekilleri belirlenmiştir. *Pneumocystis* eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki farklı şekilde

üreme gösterir; trofozoitler yaşam siklusunun aseksüel fazında ikiye bölünerek çoğalırlar. Trofozoitlerde saptanan feromon sinyalizasyonu ve sinaptonemal komplekslerin varlığı mayoz bölünmeyi destekler ve *Pneumocystis*'in eşeyli üremesini sağlar. Nadir oluşan seksüel döngüde haploid yapıdaki trofozoitlerin konjugasyonu ile sporozoitler oluşur. Sporozoitler mayoz ve sonrasında mitoz ile bölünerek 8 adet haploid yapıda intrakistik cisimciği oluştururlar. Daha sonrasında trofozoitler kist duvarında oluşan yarıktan dışarı serbestlenirler. Bunun sonucunda kist duvarında çökme meydana gelmekte ve kist içerisinde bir miktar sitoplazma kalmaktadır (Şekil 2.1) (Walzer vd., 2005; Aliouat-Denis vd., 2009; Mehlhorn, 2008; Almeida vd., 2015; Cushion vd., 2007).



**Şekil 2.1** *Pneumocystis jirovecii* hayat döngüsü (Nature Reviews Microbiology, 2007)

## 2.5- Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri

*Pneumocystis jirovecii* yüzeyinde glukoz/mannoz, N-asetil glukozamin ve galaktoz/n-asetil galaktozamin bulunmaktadır. Hücre duvarının esas yapısını kitin ve  $\beta$ - 1,3 glukoz oluştururken sterol olarak %75 oranında kolesterol bulunmaktadır. Diğer mantarlardan farklı olarak hücre duvarında ergosterol bulunmaz (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008). En önemli *Pneumocystis* antijeni majör yüzey glikoproteinidir (MSG ya da gp A). İnsanlardan izole edilen *Pneumocystis* MSG'si 95 kDa iken hayvanlardan izole edenlerde 140 kDa'a kadar ulaşmaktadır. Trofozoitlerdeki MSG miktarı kistlerde bulunandan daha azdır (Walzer vd., 2005; Stefano vd., 1998).

MSG türe özgü ve ortak epitoplara içerir, humoral ve hücreyel bağışık yanıtların oluşmasına neden olur ve mantarın konak ile etkileşiminde merkezi rol oynar. Bu glikoprotein *Pneumocystis*'in konak hücre yüzeyinde bulunan matriks proteinleri, fibronektin, yüzey proteinleri A, D ve mannoz gibi reseptörlere yapışmasını kolaylaştırır (Walzer vd., 1999). *Pneumocystis*'in memeli konakta bağışıklık yetmezliğinin olmadığı koşullarda kendisini antijenik varyasyonlarla gizlediği düşünülmektedir. Antijenik varyasyonlardan sorumlu tutulan gen MSG antijenlerini kodlayan MSG gen ailesidir. Diğer antijenik yapıları ise 35-45 kDa, 45-55 kDa glikoprotein, MSR (Tip II MSG), kistlerde bulunan disintegrin ve metalloproteaz PcADAM, subtilisin benzeri bir serin proteaz PRT 1 (Kex 1)'dan oluşmaktadır. *Pneumocystis jirovecii*'de bulunan tek gen kopyası olan Kex 1 serin endoproteazın tam anlamıyla görevi bilinmemekle birlikte, MSG proteolitik aktivite ile organizmanın patojenitesini artırabilmektedir (Walzer vd., 2005; Morris vd., 2012; Lugli vd., 1999; Keely vd., 2005; Kutty vd., 2003; Kennedy vd., 2009).

## 2.6- Patogenez

*Pneumocystis* spp. insan ve çeşitli hayvanların alveollerinde bulunur. İnhalasyon edildikten sonra üst solunum yolundaki savunma mekanizmalarından kaçarak tüm döngüsünü alveoler boşluklarda tamamlamaktadır. Yüzeyinde pek çok fibronektin bulunan tip I alveolar hücrelere *Pneumocystis* trofozoitinin tutunması ile enfeksiyonun başladığı düşünülmektedir. Konak hücre yüzeyindeki mannoz bağlayan reseptörler, laminin ve vitronektinin *Pneumocystis*'in epitelyal katmanlara tutunmasında önemli rol oynadıkları bildirilmektedir. *Pneumocystis*'in tip I alveolar hücrelere tutunmasını takiben, hücre yüzey glikokaliksinde azalma, alveolar kapiller damarların permeabilitesinde artma olduğu elektron mikroskopisi ile gösterilmiş, tip I alveolar hücrelerdeki bu değişimin subepitelyal kabarcık oluşumu, temel membran erezyonu ve dejeneratif değişimin ortaya çıkması ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Bu değişikliklerin sonucu olarak tip II epitelyal hücrelerde de hipertrofi ve hiperplazi oluşur. Işık mikroskopunda *Pneumocystis*

pnömonisinin tipik köpüksü eozinofilik eksüdası ve bal peteği görünümü gözlenebilir. PCP'nin şiddeti arttıkça interstisyel fibrozisin yanı sıra, hiyalin zar oluşumu da izlenmektedir. Bazı hastalarda atipik olarak alveolar eksüda görülmemekte, bazen de kaviter lezyonlar, granülomlar veya mikrokalsifikasyonlar oluşabilmektedir (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008; Thomas vd., 2004). Nadir görülen granülomatöz PCP genelde HIV enfekte hastalar ile hematolojik hastalarda ve %3-5 oranında bildirilmektedir (Bondoc vd., 2002; Sabur vd., 2011) .

## **2.7- İmmun Yanıt**

*Pneumocystis* türlerine karşı korunmada hem doğal hem de adaptif immün yanıt etkilidir. Doğal immün yanıtta alveolar makrofajlar, adaptif immün yanıtta ise özellikle hücresel immün yanıt önemli olmakla birlikte humoral immün yanıtın da rolü olduğu belirtilmiştir (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008; Walzer vd., 1999).

### **2.7.1- Doğal immün yanıt**

*Pneumocystis*'e karşı savunmada ilk basamak alveolar makrofajlardır ve mantarın akciğerden temizlenmesinde esas rolü oynarlar (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008). Alveolar makrofajların yüzeyinde bulunan mannoz reseptörleri *Pneumocystis*'in hücre yüzeyindeki MSG ve  $\beta$  glukana bağlanarak fagositoz yanıtını başlatır (Limper vd., 1997; Steele vd., 2003). Dektin 1 ve FC reseptörleri makrofajlar için gereklidir. *Pneumocystis*'in makrofaj hücrelerine alınabilmesi ancak kompleman, opsonizasyon ve spesifik antikörlerin yardımıyla tamamlanabilir. *Pneumocystis* hücre duvarı esas bileşeni olan  $\beta$  glukana, kritik proinflamatuvar sitokinlerin (IL1, TNF- $\alpha$ , eikozanoidler, reaktif oksidanlar) ve makrofaj iltihap proteini (MIP)-2 gibi kemokinlerin alveolar makrofajlardan salınımını başlatır. Vitronektin ve fibronektin glikoproteinler, *Pneumocystis*  $\beta$  glukana ile bağlanarak alveolar makrofajlardan IL-6 üretimini sağlar (Walzer vd., 2005; Steele vd., 2003; Fidel vd., 2005). Bunun yanında, insan alveolar makrofaj yüzeyindeki mannoz reseptörlerine *Pneumocystis* türlerinin bağlanması ile nükleer faktör kapp B (NF-kB)'nin nükleusa geçişini uyardığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2004).

Alveolar makrofajların *Pneumocystis* türlerine karşı savunmadaki diğer bir rolü de surfaktant protein (SP) üretimidir ve enfeksiyon sırasında surfaktan proteinlerinden A ve D artışı olur. Bununla birlikte SP-A ve SP-D'nin alveolar makrofajların *Pneumocystis* türlerine bağlanmasını uyardığı ancak fagositozu uyarmadığı bildirilmiştir (Fidel vd., 2005; Koziel vd., 1998). SP-D'nin ise büyük agregasyonlar oluşturarak alveolar makrofajların

*Pneumocystis* türlerinin fagositozunu engellediği düşünülmüştür (Yong vd., 2003; Steele vd., 2005).

*Pneumocystis* enfeksiyonunda nötrofilin rolü tam olarak anlaşılmamıştır. İmmün düşkün hastalarda *Pneumocystis* pnömonisi ile nötrofopeni arasında ilişki bulunamamıştır. AIDS ve immün sistemi baskılanmış PCP hastalarında IL8 ve nötrofil seviyesi takip edildiğinde, bu moleküllerin seviyesinin hastalığın şiddeti hakkında bilgi verdiği ve konsantrasyonlarının arttıkça şiddetin de arttığı belirtilmiştir (Fidel vd., 2005). PCP olan fareler ile yapılan bir çalışmada ise yine akciğer hastalığı ile nötrofil seviyesi arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, CD4+ T lenfosit yokluğunda *Pneumocystis* eliminasyonunda nötrofil'in önemli rolü olmadığı bulunmuştur (Swain vd., 2004).

HIV enfekte ve immün yetmezliğin bulunduğu diğer hastalarda, bozulmuş veya azalmış doğal öldürücü (NK) hücre sayıları, bu hücrelerin *Pneumocystis* türlerine karşı konak doğal immün yanıtında rol oynadığını düşündürmüştür (Walzer vd., 1999; Steele vd., 2005). Ayrıca *Pneumocystis* pnömonili hastalarda hipogammaglobulinemi ve NK hücrelerin eksikliği bildirilmiştir (Steele vd., 2005). *Pneumocystis* pnömonili hastalardan alınan BAL örneklerinde CD57+ NK hücreleri belirgin olarak yüksek bulunduğunda bağışık yanıtın etkili olduğu düşünülürken (Mantovani de Castro vd., 2006), başka çalışmalarda doğal öldürücü hücrelerin *Pneumocystis* türlerine karşı konak savunmasında rollerinin minimal olduğu belirtilmektedir (Steele vd., 2005).

### **2.7.2- Kazanılmış immün yanıt**

Hücreyel immün yanıt yanında B hücreleri aracılığıyla oluşturulan salgısal (humoral) immün yanıtında *Pneumocystis* türlerinin akciğerlerden temizlenmesinde önemli rol aldığı belirtilmiştir (Steele vd., 2005; Kling vd., 2010).

#### **2.7.2.1- Hücreyel immün yanıt**

*Pneumocystis* pnömonisine karşı adaptif bağışıklıkta en önemli rolü CD4+ T hücreleri oynamaktadır (Blanco vd., 2008). *Pneumocystis* pnömoni riski, CD4+ T hücre sayısı 200 hücre/mm<sup>3</sup> altında bulunan kişilerde (HIV enfekte hastalar gibi) artmaktadır (Mehlhorn, 2008; Walzer vd., 1999; Steele vd., 2005; Rapaka vd., 2010). *Pneumocystis* enfeksiyonu sırasında akciğerlerde meydana gelen CD4+ T hücre infiltrasyonu, bu hücrelerin enflamatuvar sürecin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir (Steele vd., 2003). *Pneumocystis* MSG ve 55-kDa'lık antijenlerine karşı CD4+ T hücrelerinin yanıtı, sayılarının ve proinflamatuvar cevabın (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  ve IL-



1 gibi sitokinlerin salgılanması) artışı olarak ortaya çıkar (Steele vd., 2003). CD4+ T hücrelerinin B lenfositler ve diğer hücrelerle CD40-CD40L yolu ile etkileşimi, antikor sentezi ve *P. jirovecii*'nin akciğerlerden uzaklaştırılması için gereklidir (Walzer vd., 2005; Walzer vd., 1999; Steele vd., 2003). Kanda ve/veya akciğerlerde azalmış CD4+ hücre sayıları PCP şiddetini ve tedavide kullanılan ilaca (trimetoprim) direnç gelişme riskini artırmaktadır (Walzer vd., 1999).

*Pneumocystis*'e karşı savunmada CD8+ T hücrelerinin rolü net değildir. Hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda, *Pneumocystis*'e karşı savunmada CD4+ T hücreleri bulunmadığında CD8+ T hücrelerinin kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir (Walzer vd., 2005; Fidel vd., 2005; Blanco vd., 2008). Bazı çalışmalarda da, akciğerlerde tek başına CD8+ T hücreleri varlığında *Pneumocystis*'in temizlenemediği belirtilmektedir. CD8+ T hücrelerinin akciğerlerde oksijenasyonun azalması ve akciğer hasarı gibi komplikasyonlardan sorumlu olduğu gösterilmektedir. Gamma delta T ( $\gamma\delta$ -T) hücrelerinin *Pneumocystis* enfeksiyonundaki rolü tam anlaşılammıştır, ancak AIDS ve PCP'li hastalarda kan ve bronkoalveolar lavaj sıvısında düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir (Steele vd., 2005).

### **2.7.2.2- Humoral immün yanıt**

*Pneumocystis* türlerinin akciğerlerden temizlenmesinde B hücrelerinin ve spesifik antikorlarının önemli rol aldığı belirtilmiştir (Walzer vd., 2005). B hücrelerinin en önemli rolü immün yanıt sırasında CD4+ T hücrelerinin aktivasyonunu desteklemektir (Steele vd., 2003). Yaşamın erken yıllarında *Pneumocystis* türlerine karşı antikorlar oluşmaya başlar (Walzer vd., 2005). Sağlıklı çocuklar *Pneumocystis* türlerine erken dönemde maruz kalır ve yapılan çalışmalara göre 4 yaş altındaki çocukların çoğunda anti-*Pneumocystis* antikorların saptandığı bildirilmiştir (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008; Djawe vd., 2013; Daly vd., 2002; Helweg-Larsen, 2004; Wakefield vd., 2002). Sağlıklı erişkinlerde *Pneumocystis* antijenlerine karşı serokonversiyon oranının %70'in üzerinde olduğu ve altıncı aydan itibaren antijenlere maruz kalındığı gösterilmiştir (Walzer vd., 2005; Daly vd., 2002). Bu nedenle anti-*Pneumocystis* antikor varlığı aktif enfeksiyonu göstermez. PCP'li hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj örneklerinde spesifik IgM, IgG ve IgA saptanmıştır, ancak *Pneumocystis* enfeksiyonunda antikor izotiplerinin rolü tam olarak bilinmemektedir. Spesifik insan IgG/IgA ve kompleman ile *Pneumocystis* kistlerinin opsonizasyonu hem nötrofil hem de monositlerde oksidatif patlamayı uyardığı halde, *Pneumocystis* ile IgM ve kompleman sadece nötrofillerde tetikleme göstermektedir (Fidel vd., 2005). *Pneumocystis* pnömonili CD40L mutasyonu nedeniyle oluşan X-bağımlı hiper-IgM sendromlu hastalarda, IgM antikorunun tek başına enfeksiyona karşı dirençte yeterli olmadığı gösterilmiştir (Rapaka vd., 2010). *Pneumocystis*

MSG'lerinin üç fragmanına (A, B ve C) karşı oluşan immun yanıt karşılaştırıldığında, MSG-C antikor seviyelerinin *Pneumocystis* pneumoni enfeksiyonunun iyileşmesinden 3-4 hafta sonra en yüksek düzeye ulaştığı gösterilmiştir. Bu yüzden sağlıklı bireylerde MSG-C antikor düzeyleri immun yanıtın takibinde umut verici görülmüştür (Huang vd., 2006; Daly vd., 2006). PCP'li hastalar iyileştikten sonra, enfeksiyona tekrarlayan maruziyetlerinde daha iyi immun yanıt oluşturdukları gösterilmiştir (Daly vd., 2006).

## 2.8- Epidemiyoloji

Dünyanın her yerinde rastlanabilen *Pneumocystis* türleri hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyona neden olabilmektedir. *P. jirovecii*, tüm dünyada yaygın olarak bulunan ve insanlarda görülen *Pneumocystis* pnömonisinin etkeni olup, başta AIDS (Acquired Immun Deficiency Syndrome) olmak üzere primer immun yetmezlik sendromu, solid organ veya hematolojik malignitesi olan, organ transplantasyonu yapılan, steroid tedavisi veya kronik immünsüpresif tedavi alan, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, kötü beslenen çocuklarda ve prematüre bebeklerde enfeksiyona yol açabilen fırsatçı bir patojendir (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008).

*Pneumocystis* türlerinde konak, türe özgün olup, farklı konaklardan izole edilen *Pneumocystis* türlerinin antijenik ve fenotipik olarak farklı olduğu gösterilmiştir (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008; Wakefield vd., 2002). DNA gen dizisi analizlerine göre beş tür tanımlanmıştır; *P. carini* ve *P. wakefieldiae* sıçanları, *P. oryctolagi* tavşanları, *P. murina* fareleri ve *P. jirovecii* insanları enfekte eden türlerdir (Walzer vd., 2005; Morris vd., 2008; Medrano vd., 2005).

*P. jirovecii*'nin bulaşma yolu tam olarak anlaşılamadığı gibi çevresel kaynağı da bilinmemektedir (Wazir vd., 2004; Chumpitazi vd., 2011; Gupta vd., 2008; Cushion, 2004). Enfeksiyonun daha çok hava yolu ile bulaştığı düşünülmekle birlikte fetus enfekte olabilir ve doğum sırasında plasenta ile de geçiş olabilmektedir (Montes-Cano vd., 2009; Calderón, 2009). Perinatal dönemde HIV enfeksiyonu bulaşan 3564 çocuğun yaklaşık %20'sinde üç veya altı aylıkken PCP geliştiği bildirilmiştir (Vargas vd., 2001). İmmun düşkün hastalar arasında oluşan PCP'nin, hastalarla sağlık çalışanları arasında ve annelerden duyarlı çocuklara hava yoluyla bulaştığı moleküler çalışmalarla desteklenmiştir (Medrano vd., 2005; Höcker vd., 2005; Rabodonirina vd., 2004; Vargas vd., 2000; Miller vd., 2002). Etkenin ya da genetik materyalinin havada bulunması çevresel bir maruziyetin olabilmesini mümkün kılmaktadır (Stringer vd., 2002; Thomas vd., 2004).

Enfeksiyonun ardından uzun süre sessiz kaldığı, konağın bağışıklığı baskılandığında latent enfeksiyonun reaktif olduğu ve pnömoni tablosuna yol açtığı düşünülmektedir. Aynı zamanda enfeksiyonun geçici olduğu ancak mikroorganizma ile sık sık karşılaştıkları için enfeksiyonun tekrarladığı da düşünülmektedir. Bu durumda aktif pnömosistozlu hastaların risk oluşturduğu öne sürülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre de latent enfeksiyonun aktive olması değil, etkenin yeniden alınmasıyla enfeksiyon oluştuğu gösterilmiştir (Medrano vd., 2005; Thomas vd., 2004; Wakefield, 2002; Moris vd., 2002). Eğer insanda yaşam boyu *P.jirovecii*'nin latent kalması mümkün olsaydı, doğdukları yerde yaşamayan erişkinlerin doğdukları yerdeki suşla enfekte olmaları gerekirdi. Bu durumun böyle olmadığı erişkinlerin doğdukları yerdeki suşla değil, yaşadıkları yerdeki suşla enfekte olduğu gösterilerek kanıtlanmıştır (Stringer vd., 2002; Wakefield, 2002). Ayrıca, PCP'li hastaların BAL örnekleriyle yapılan bir moleküler tiplendirme çalışmasında, 6 aydan daha uzun aralıklarla görülen PCP episodlarında farklı dizi tipleri elde edilmiş ve bunların farklı *Pneumocystis* kökenleri ile yeni enfeksiyonlar olduğu bildirilmiştir (Wakefield, 2002).

HIV ile enfekte hastalarda PCP en önemli fırsatçı enfeksiyonlardan biridir (Cushion vd., 2007). Sağlıklı homoseksüel erkeklerde PCP'nin oluşması, AIDS epidemisinin tanınmasında ilk faktörlerden biri olmuştur (CDC MMWR, 1996). Erişkinde PCP gelişimi için en önemli risk faktörü CD4 T lenfosit sayısının 200 hücre/ $\mu$ L'nin altına düşmesidir. HIV negatif hastalarda PCP gelişimi için en önemli risk faktörleri ise hücresel bağışıklıkla ilgili bozukluklar ve kortikosteroid kullanımınıdır (Morris vd., 2004). *Pneumocystis* seroprevalansı yaş ile değişiklik göstermektedir;  $\leq 6$  yaş çocuklarda prevalans %52 iken,  $\leq 10$  yaş çocuklarda %66 ve  $\leq 13$  yaş çocuklarda %80'e kadar yüksek bulunmuştur (Morris vd., 2008). İnsan ve hayvan çalışmaları da, immüdüşkün olmayan bireylerin akciğerlerinde *P. jirovecii*'nin bulunabileceğini ve hatta düşük düzeylerde replike olabileceğini desteklemiştir (Walzer vd., 2005).

Klinik olarak semptom vermeyen kişilerde organizmanın veya DNA'sının tespit edilmesi "kolonizasyon" olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı kişilerin üst solunum yolundan, PCP'li hasta odalarından alınan hava örneklerinden ve PCP enfeksiyonu olmayan bağışıklık baskılanmış hastalarından tespit edilen *P.jirovecii*, mikroorganizmanın kolonizer olarak bulunabildiğini göstermiştir (Medrano vd., 2005; Vargas vd., 2002; Durand-Joly vd., 2003). Kolonizasyon riskinin sağlıklı çocuklarda yetişkinlerden daha yüksek oranlarda olabileceği bildirilmektedir (Morris vd., 2004; Vargas vd., 2002). *Pneumocystis* kolonizasyonu olan yetişkin ve çocukların bu enfeksiyon için rezervuar olduğu (Medrano vd., 2005; Stringer vd., 2002; Wakefield, 2002; Durand-Joly vd., 2003) ve bunların mikroorganizmanın insan ekosisteminde devamlılığını sağladığı düşünülmektedir (Medrano vd., 2005). *Pneumocystis*

kolonizasyonunun bebek ve çocuklarda bronşit ve ani bebek ölüm sendromu (SIDS)'na neden olabildiği bildirilmiştir (Morris vd., 2004; Morris vd., 2008). Ani bebek ölüm sendromu ve diğer nedenlerle ölen bebekler arasında PCP kolonizasyon prevalansı %9.4-100 arasında rapor edilmektedir (Monroy-Vaca vd., 2014). Altta yatan akciğer hastalığı olan bağışıklık sistemi sağlam konaklarda, *P. jirovecii*'nin asemptomatik akciğer kolonizasyonu yapabileceği de gösterilmiştir (Walzer vd., 2005; Medrano vd., 2005). HIV enfekte hastalar gibi, ileri yaşlarda azalan hücresel immun yanıt (immunosenescence) da kolonizasyon lehine sonuçlanabilmektedir (Vargas vd., 2010). Güncel çalışmalar, immunkompetan bireylerde ya da aktif enfeksiyon veya klinik hastalık bulgusu olmayan HIV (+) hastalarda *Pneumocystis*'in düşük miktarda bulunması ve tekrarlayan incelemelerde mikroorganizmanın saptanamaması, geçici asemptomatik *P. jirovecii* taşıyıcılığı olabileceğini düşündürmektedir.

Buna ek olarak, *Pneumocystis* kolonizasyonu olan hastalara profilaktik ilaç uygulanması, seçici mutasyona neden olarak ilaç direncine yol açabilmektedir (Morris vd., 2008; Morris vd., 2012). *Pneumocystis* kolonizasyonu ile cinsiyet arasında herhangi bir ilişki bulunmamakta (Beck vd., 2009) ve PCP enfeksiyon riski erkekler ve kadınlar arasında eşit görülmektedir (Morris vd., 2004). Sigara içimi ile *Pneumocystis* kolonizasyonu arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmaların sonuçları farklılık göstermektedir (Morris vd., 2012; Beck vd., 2009; Monroy-Vaca vd., 2014).

Sağlıklı erişkinlerde BAL, indüklenmiş balgam, burun sürüntüsü ve ağız çalkantı suyu ile akciğer otopsi örneklerinde *Pneumocystis jirovecii* moleküler yöntemlerle araştırılmış ve *Pneumocystis* kolonizasyon prevalansının %0-20 arasında değiştiği bildirilmiştir (Medrano vd., 2005; Nevez vd., 2006). HIV ile enfekte olmuş erişkin hastaların BAL örneklerinde ise *Pneumocystis* kolonizasyon prevalansı moleküler yöntemlerle %20-43 arasında bulunmuştur. Kronik akciğer hastalığı bulunan imünokompetan hastalardan alınan çeşitli invaziv olmayan örneklerde *Pneumocystis* prevalansı %10-40 (Sing vd., 2001), başka bir çalışmada ise yaşlı hastalardan alınan nazal sürüntü ve ağız çalkantı suyu örneklerinde %21.5 olarak rapor edilmiştir (Vargas vd., 2010). PCP'li hastalara maruz kalan sağlık personellerinde de *Pneumocystis* kolonizasyonu olabileceği gösterilmiştir; PCP enfeksiyonlu HIV (+) hastalarla teması olan imünokompetan sağlık personellerinde *Pneumocystis* kolonizasyon oranı %24 iken, bu hastalarla teması olmayan sağlık personellerinde oran %11 bulunmuştur (Morris vd., 2008).

Hamilelik de asemptomatik taşıyıcılık için risk oluşturabilir; üçüncü trimesterdeki hamile kadınlardan alınan 33 derin burun sürüntüsü örneğinin 5'inde *P.jirovecii* DNA'sı saptanırken, hamile olmayan 28 kadından alınan örneklerde gösterilememiştir (Morris vd., 2012).

## 2.9- Klinik ve Radyolojik Bulgular

*Pneumocystis* türlerinin oluşturduğu PCP'de fizik muayene ve klinik bulgular hastalığa özgün olmadığı için tanı aşamasında sorunlar yaşanmaktadır. Primer enfeksiyonu çocukluk çağında gelişir ve genellikle asemptomatik seyretmektedir (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008; Thomas vd., 2004). PCP'nin kuluçka döneminin yaklaşık 3-13 hafta olduğu tahmin edilmektedir (Manoloff vd., 2003).

Klinik olarak hastada en sık görülen bulgular takipne ve taşikardidir, nonprodüktif öksürük, ateş ve dispne de görülebilir. Nadiren balgam, hemoptizi ve göğüs ağrısı da eşlik edebilmektedir. Çocuklardaki şiddetli enfeksiyonlarda siyanoz, burun kanatlarının solunuma katılması ve interkostal çekilmeler izlenebilmektedir. Etken, immünesi baskılanan kişilerde hastalık oluşturduğu için altta yatan hastalık, enfeksiyonun klinik gidişini etkiler ve tedavi edilmezse tablo ölümlü sonuçlanabilir. Erişkin hastaların yaklaşık dörtte birinde raller duyulabilmesine rağmen, akciğer oskültasyonu genelde tanıya yardımcı olamamaktadır (Walzer vd., 2005; Wazir vd., 2004; Chinnappan vd., 2011; Thomas vd., 2004; Kanne vd., 2012) .

AIDS hastalarında PCP semptomları haftalarca, nadir olarak aylarca sürebilir ve genellikle sinsi bir seyir gösterir (Walzer vd., 2005). Semptomlar HIV negatif ve pozitif hastalarda farklılık göstermektedir. PCP, HIV pozitif hastalarda subakut başlayıp, ilerleyen solunum sıkıntısı, kuru veya şeffaf balgamlı öksürük, halsizlik ve hafif ateş bulguları vermektedir. HIV pozitif PCP'li hastalarda HIV negatif PCP'li hastalara göre arteriyel oksijen basıncının genellikle daha yüksek ve alveolar-arteriyel oksijen farkının daha düşük olduğu, BAL örneklerinde daha çok sayıda *Pneumocystis* ve daha az sayıda nötrofil bulunduğu gösterilmiştir (Calderon vd., 2011; Gill vd., 1991; DeLorenzo vd., 1987; Krajicek vd., 2008; McKinnell vd., 2012). AIDS olmayan hastalarda daha akut ve semptomlar kısa süreli geçirilmektedir. Tipik olarak ansızın bir solunum yetmezliği ortaya çıkmaktadır (Wazir vd., 2004; Hardak vd., 2012; Monnet vd., 2008; Dahlin vd., 2014; Krajicek vd., 2008; McKinnell vd., 2012).

**Akciğer dışı pnömosistoz:** AIDS öncesi dönemde akciğer dışı pnömosistoz çok nadir bildirilirken, bu tablonun AIDS hastalarının %1-3'ünde geliştiği tahmin edilmektedir. Profilaksi uygulanmayan veya yalnızca aerosol pentamidin kullanan son evre AIDS hastalarında sıklık daha yüksektir. AIDS'li hastalarda *P. jirovecii*'nin akciğer dışında en sık yerleştiği organlar; göz, kaslar, kulak, lenf düğümleri, kemik iliği, karaciğer ve dalaktır (Walzer vd., 2005; Bartlett vd., 1997; Valerie vd., 1997).

PCP'de gözlenen tipik radyolojik bulgular, hastalık ilerledikçe homojenliği artan ve diffüz hale gelen hilus çevresindeki iki taraflı interstisiyel infiltratlardır. Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografide (HRCT) buzlu cam görünümü veya kistik lezyonlar gözlenebilir. Teknesyum-99 ile işaretli *Pneumocystis* MSG'sine karşı oluşturulmuş monoklonal antikor, galyum-67 sitrat ve indiyum-111'in kullanıldığı nükleer tıp yöntemlerinde akciğerde yüksek tutulum izlenmektedir (Walzer vd., 2005; Thomas vd., 2004; DeLorenzo vd., 1987; Macfarlane vd., 1985).

Tüm bunlara rağmen hastalığın semptom ve bulgularıyla, göğüs radyolojisi bulgularının hiçbir kombinasyonu PCP için tanı koydurucu değildir. *Pneumocystis* pnömonisi olan AIDS hastalarının %10-20'sinde normal göğüs radyolojisi bildirilmiştir. Ayrıca *Pneumocystis* enfeksiyonu olmayan AIDS hastalarının % 47'sinde yaygın akut akciğer gölgelenmesi ile pozitif galyum taraması da rapor edilmiştir. PCP'ye diğer mikroorganizmaların neden olduğu pulmoner enfeksiyonların eşlik etmesi durumunda hastalığın kliniği daha karmaşık bir hale gelmektedir (Macfarlane vd., 1985).

## **2.10- Tanı**

*Pneumocystis* pnömonisinin klinik bulgularının özgün olmaması, profilaktik ilaçlar kullanılması ve immüdüşkün hastalarda birden fazla organizmayla enfeksiyon gelişebilmesi nedeniyle kesin tanı için laboratuvar testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Thomas vd., 2004; Krajicek vd., 2008).

### **2.10.1- Tanıda kullanılan örnekler**

*P. jirovecii* enfeksiyonu tanısında altın standart, klinik örnekte kist ve/veya trofozoitlerinin mikroskopik olarak gösterilmesidir. En değerli klinik örnekler ise BAL, trakeal aspirat ve akciğer biyopsisi gibi invaziv yöntemlerle elde edilen örneklerin yanında daha kolay elde edilebilen indüklenmiş balgam (IS), nazofarengial sürüntü ve ağız çalkantı suyu gibi invaziv olmayan örnekler de kullanılmaktadır (Fischer vd., 2001; Mehlhorn, 2008; Chill vd., 1991). AIDS hastalarında *P. jirovecii* yükü fazla olduğundan genellikle indüklenmiş balgam örneğinin incelenmesi ile tanı konulabilir ve bronkoskopi gibi invaziv girişimlere ihtiyaç duyulmayabilir. Ancak bağışıklığı baskılanmış diğer hasta gruplarında indüklenmiş balgam örneği ile nadiren tanı konulabildiğinden BAL, bronşiyal yıkama sıvısı veya doku örneklerinin kullanılması gerekebilmektedir (Cruciani vd., 2002).

Örneklerin alınış yöntemi tanı için kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğünü direkt olarak etkilemektedir. %3'lük sodyum klorür ile uyarılarak

elde edilen balgam örneğinde *P. jirovecii* saptama oranının %50-90 arasında değiştiği bildirilmiştir (Walzer vd., 2005; Turner vd., 2003). İki segmentten ve fazla miktarda alınan BAL örnekleri ile *P. jirovecii* saptama oranının %90-99'a yükseldiği ve diğer örnek alma tekniklerine göre daha üstün bir yöntem olduğu belirtilmektedir (Walzer vd., 2005; Singhal vd., 2005). Aynı hastadan hem BAL hem de balgam örneğinin alındığı bir çalışmada, BAL örneklerinin % 7.5'inde *P. jirovecii* pozitif bulunurken, uyarılmış balgam örneklerinde *P. jirovecii* saptanamamıştır (Singhal vd., 2005). Açık akciğer biyopsisi, örnekleme yöntemleri içinde en invaziv olanıdır ve rutin olarak uygulanmaz. Bu teknikte duyarlılık da düşüktür. Fiberoptik bronkoskopi ile elde edilen transbronşiyal biyopsi, doku örneği alınmasında sık kullanılan bir invaziv tekniktir. HIV (+) hastalarda *P. jirovecii* için tanı duyarlılığı yüksek (% 95-100) olmakla birlikte pnömotoraks riski taşır ve günümüzde bu amaçla nadiren uygulanmaktadır, HIV (-) hastalarda duyarlılığı düşüktür (Singhal vd., 2005; Young vd., 1986). İnsanlarla yapılan son çalışmalarda, *P. jirovecii*'nin özgül primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu ile nazofaringeal aspirat ve orofaringeal yıkantı suyundan saptanabildiği bildirilmektedir. Daha invaziv örnekleme tekniklerinin problem oluşturduğu veya tanı şansının düşük olduğu çocuk hastalarda bu yöntem oldukça yararlıdır (Fischer vd., 2001; Kelvin vd., 2013; Samuel vd., 2011).

### **2.10.2- Direkt tanı**

*P. jirovecii*, akciğer epitel hücrelerini içeren doku kültürlerinde düşük sayılarda çoğalabilmektedir (Krajicek vd., 2008; Schildgen vd., 2014). *Pneumocystis* üretilmesinde insan akciğer karsinoma A549 hücreleri, insan akciğer fibroblast HEL ve mink akciğer hücre Mv1Lu gibi tek tabaka kültür sistemleri kullanılmaktadır. Ancak bu sistemler devamlı *Pneumocystis* kültürü sağlamamaktadır (Singhal vd., 2005). Son yıllarda kullanılan Epi Airway ve CuFi-8 doku kültür sistemleri *Pneumocystis jirovecii*'nin üretilmesinde umut verici bulunmakla birlikte, bu sistemlerin pahalı ve heterojen kaynaklı olmaları rutin kullanımlarını kısıtlamaktadır (Schildgen vd., 2014).

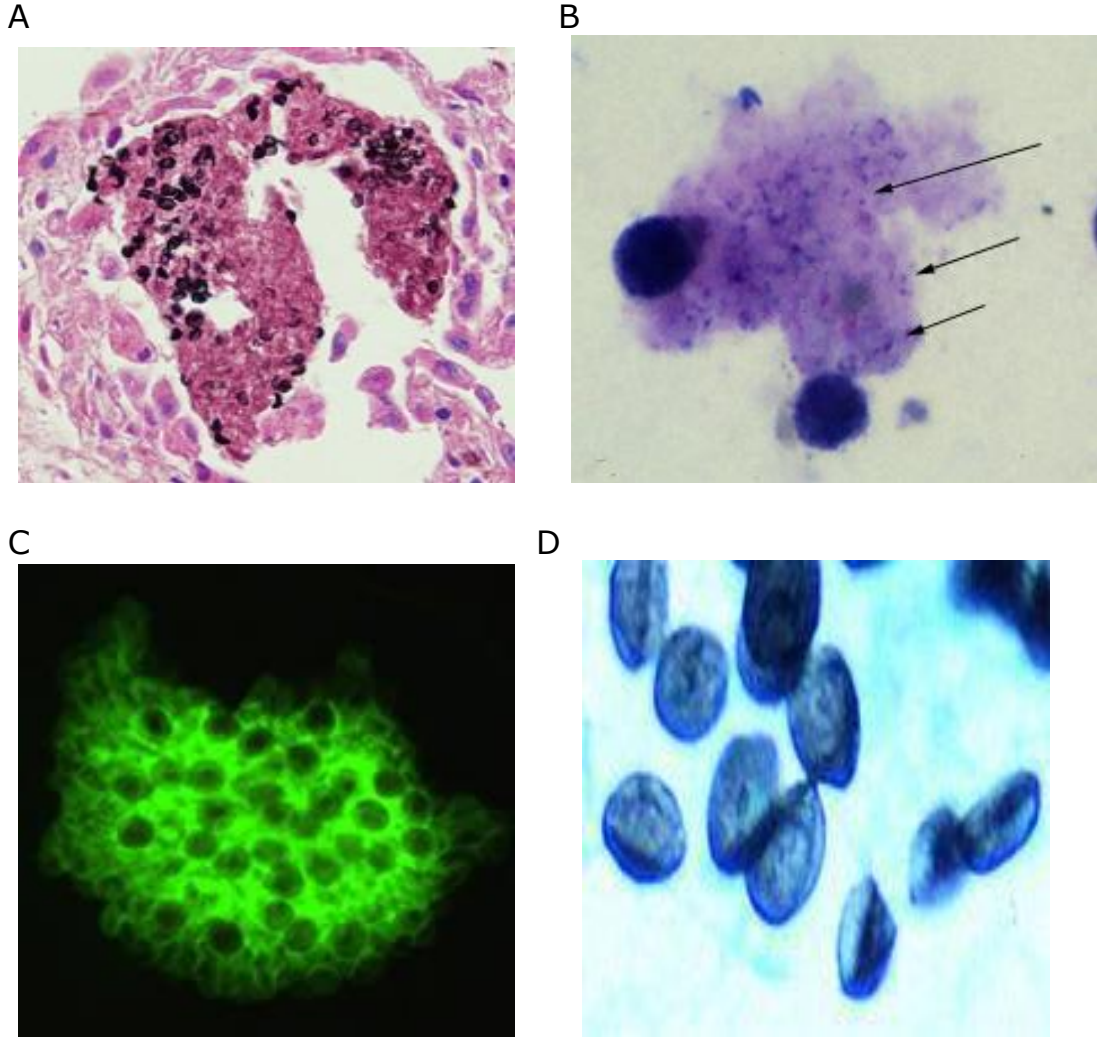
Direkt tanıda, mikroskopik yöntemlerle etkeni morfolojik olarak saptamaya yönelik çok sayıda boya kullanılmaktadır. Immunofloresan yöntemlerle BAL sıvısının incelenmesi PCP tanısında altın standart yöntemdir. Trofozoit ve sporozoit formları boyayan Giemsa, Gram Weigert ve Papanicolaou; seçici olarak kist duvarını boyayan Gomori-Grocott metamin gümüşleme (GMS), cresyl echt violet, toluidin blue O, calcofluor White; hem trofozoit hem de intrakistik cisimcikleri boyayan Quik-Diff (modifiye Wright-Giemsa) mikroskopik tanıda kullanılan boyalar/boyama yöntemleridir. May-Grünwald Giemsa boyamanın hızlı bir modifikasyonu (RAL 555) ise tüm *Pneumocystis* evlerini boyar (Walzer vd., 2005; Procop vd., 2004; Calderon vd., 2011; Thomas vd., 2004; Krajicek vd., 2008; Cregan vd., 1990;

Rajagopalan-Levasseur vd., 1998; Helweg-Larsen vd., 1998; Balows vd., 1988; Aviles vd., 2000).

GMS ve bundan daha hızlı ticari gümüşleme boyaları *Pneumocystis* kistlerinin tanısında altın standart yöntemdir (Cregan vd., 1990). Kist duvarının glukan zengin orta tabakası gümüşleme boyaları ile koyu kahverengi boyanır ve kistler kâse şeklinde görünür. BAL, indüklenmiş balgam ve doku kesitlerine uygulanabilir. Ancak, diğer mantarların da boyanması, işlemin uzun sürmesi ve metal doyurma işleminin değişken olması, solüsyonların dayanıksız olması GMS boyama yönteminin dezavantajlarıdır. Giemsa boyası ile trofozoitler ve intrakistik cisimler koyu mor, kist sitoplazması eflatunsu pembe boyanır. Ancak kist çeperi boyanamadığı için periferik halo şeklinde görülebilmektedir. Bu boyalar da BAL, indüklenmiş balgam ve dokuların boyanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük maliyeti ve hızlı olması nedeniyle PCP tanısında önerilmekte ancak, konağa ait hücreleri boyaması nedeniyle değerlendirmede deneyim gerektirmektedir (Walzer vd., 2005). Wright ile trofozoit sitoplazması mavi, nükleusu kırmızı boyanmaktadır (Bottone vd., 2006). Diff-Quick ile trofozoitlerin nükleusları koyu mavi, sitoplazması mor görülür. Sporozoitlerin nükleusları ise kırmızı, sitoplazması mavi boyanır. Kistler negatif boyanır. Toluidin blue O ile kist çeperi boyanır ancak kist içindeki yapıları boyanmaz. Gram Weigert boyası ile *P. jirovecii* kistlerinin çeperi koyu kırmızı-bordo renge boyanır (Rubin vd., 1987). Kalkoflor beyazı *Pneumocystis* kist duvarındaki kitine bağlanarak mavi-beyaz floresan vermektedir (Walzer vd., 2005). Sitopatologlar tarafından kullanılan Papanicolaou boyasının *Pneumocystis* türlerini boyamamasına karşın çevresindeki köpüksü eozinofilik materyali saptamada çok duyarlı olduğu belirtilmiştir (Young vd., 1986). Hematoksilen-eozin, mikroorganizmayı değil, görünüm olarak "bal peteği"ni andıran köpüksü eksudayı boyar (Walzer vd., 2005).

Yapılan bir çalışmada *Pneumocystis* tanısında kullanılan indüklenmiş balgam ve BAL örnekleri için Diff-Quik boyama yönteminin duyarlılığı sırasıyla %92 ve %81 bulunmuştur. Aynı çalışmada kullanılan gümüşleme boyası ile indüklenmiş balgam ve BAL örneklerinde *Pneumocystis* saptama oranı %92 ve 86 bulunmuştur (Cregan vd., 1990). Başka bir çalışmada da solunum yolu örneklerinin kalkoflor beyazı boyamasının duyarlılığı ve özgüllüğü %74 ve %100, Diff-Quik boyamasının duyarlılığı ve özgüllüğü %48 ve %100, GMS boyamasının duyarlılığı ve özgüllüğü ise %77 ve %99 olarak rapor edilmiştir (Procop vd., 2004). GMS ve Giemsa ile balgam örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise duyarlılığın sırasıyla %56 ve %55 olduğu, dithiothreitol ile homojenizasyon ve konsantrasyon sonrasında duyarlılık ve özgüllükte artış olduğu bildirilmiştir (Walzer vd., 2005).





**Şekil 2.2** *P. jirovecii* tanısında kullanılan boyama yöntemleri

**A:** Hematoksilen-eozin (H&E) ile boyanan *P. jirovecii* kistleri, **B:** Giemsa ile boyanan *P. jirovecii* trofozoitleri, **C:** Direkt IFA (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Pneumocystis.htm>, 2013) **D:** Toluidin Mavis (www.pathguy.com).

İmmüno Floresan antikor (IFA) testlerinde, fluorescein veya peroksidaz ile işaretli *Pneumocystis*-spesifik monoklonal antikorlar *Pneumocystis* türlerinde bulunan yüzey glikoprotein ailesini hedefleyerek boyar. Floresan mikroskopu ile boyalı örnekler incelendiğinde mikroorganizmalar tek tek veya kümeler oluşturmuş parlak elma yeşili cisimcikler olarak görülür (Walzer vd., 2005). Floresan işaretli monoklonal antikorlar ile boyanan indüklenmiş balgam örneklerinde geleneksel boyalardan daha yüksek duyarlılık sonuçları elde edilmiştir. GMS boyama yöntemi ile IFA tekniğinin karşılaştırıldığı bir

çalışmada 553 BAL örneği incelenmiş, GMS boyasının duyarlılığı %81 iken IFA tekniğinin duyarlılığı %86 olarak bulunmuştur (Lautenschlager vd., 1996) Diff-Quik, GMS, direkt ve indirekt IFA tekniğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada 21 BAL ve 37 indüklenmiş balgam örneği incelenmiş, BAL'da duyarlılıklar sırasıyla %81, %86, %90 ve %86 balgam'da ise %92, %92 , %97 ve %97 bulunmuştur (Cregan vd., 1990).

*P. jirovecii* tanısında moleküler tanı yöntemleri mikroskopik tanı yöntemlerinden daha yüksek oranda duyarlılığa sahiptir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA amplifikasyonunun kullanılması ile duyarlılık oranları arttırılmıştır. Geleneksel boyalarla boyanan indüklenmiş balgam örneklerinde duyarlılığın BAL örneklerinden çok daha düşük ve bazı çalışmalarda bu oranın % 48-78 olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte PCR kullanıldığında indüklenmiş balgam örneklerinde duyarlılık oranları artmıştır (Helweg-Larsen vd., 1998). PCR'ın BAL örneklerinde duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %98, indüklenmiş balgam örneklerinde ise duyarlılığı %94 ve özgüllüğü %90 rapor edilmektedir (Turner vd., 2003). PCR tanı metodu daha çok alt solunum yolu örneklerinde uygulanmaktaysa da son yıllarda ağız yıkama örnekleri, burun sürüntü örnekleri gibi invaziv olmayan yöntemlerle alınan örneklerde de kullanılmıştır (Huang vd., 2006; Samuel vd., 2011). Ancak PCP tedavisi PCR'ın duyarlılığını azaltabileceğinden, ağız çalkalama suyu gibi invaziv olmayan örnekler ile çalışıldığında test sonuçlarının duyarlılığını arttırmak için örneklerin tedavi öncesi toplanması tercih edilmelidir (Huang vd., 2006). Kan ve serum örneklerinde *Pneumocystis* saptama oranı %0-100 arasında değişken bulunmuş (Helweg-Larsen vd., 1998) ve PCP tanısında PCR için serum örneklerinin yararlı olmadığı düşünülmüştür (Thomas vd., 2004).

*Pneumocystis* enfeksiyonlarının moleküler tanısında geleneksel PCR, touchdown, nested, heminested, revers transkriptaz ve real-time PCR gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla *Pneumocystis jirovecii*'nin MSG, mitokondriyal geniş alt ünite (mtLSU) rRNA, 5S rRNA, timidilat sentaz (TS), dihidrofolat redüktaz (DHFR), ITS1, ITS2 gen bölgelerini hedefleyen primerler kullanılabilir (Huang vd., 2006; Lu vd., 1995). Bu yöntemlerden herhangi birisi ile DNA'nın saptanması mikroorganizmanın canlılığı veya enfektivitesi hakkında bilgi vermez. Ancak RNA, özellikle mRNA, hücre ölümünden sonra endojen RNAazlar ile hızla bozulduğundan daha az stabildir; bu yüzden *P. jirovecii* mRNA'sının ya da Phsb1 transkriptinin saptanması mikroorganizmanın canlılığının gösterilmesinde yararlı olabilmektedir (Huang vd., 2006).

*P. jirovecii* DNA'sı, PCP gelişmeyen hastaların solunum yolu örneklerinde de saptanabilmektedir; klinik örneklerde *P. jirovecii* DNA'sının saptanması mutlaka enfeksiyon anlamına gelmemektedir. Bu durum, kolonizasyonu ya da subklinik enfeksiyonu göstermekte olup epidemiyolojik açıdan önemlidir.

Bu gibi klinik olarak yanlış pozitif ancak biyolojik olarak gerçek pozitif sonuçlar kalitatif testlerin özgüllüğünü ve pozitif prediktif değerini düşürmektedir. Bu nedenle, PCR testi için örneklerin kuvvetli PCP şüphesi bulunan hastalardan alınması biyolojik pozitifliğin kolonizasyon ve subklinik enfeksiyondan ayırt edilmesinde önemlidir (Miller vd., 2006; Wang vd., 2007; Alanio vd., 2011). Yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip gerçek zamanlı PCR ile organizmanın kantitasyonu enfeksiyon yükünün ve cut-off değerinin belirlenmesi (Samuel vd., 2001; Maillat vd., 2013), dizi analizine dayalı testler ile suşlar arasındaki farklılıkların, ilaç direncinin ve virulansın saptanması epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır (Calderon vd., 2011; Valerio vd., 2007; Ripamonti vd., 2009; Rabodonirina vd., 2013).

### **2.10.3- İmmünolojik testler**

(1,3)- $\beta$ -D-glukan (BDG), bu antijenik yapı maya ve küf mantarlarının hücre duvarında bulunan bir moleküldür. Hem BAL'da hem de kanda tespit edilebilmektedir (Morris vd., 2011). Serumdaki BDG seviyesi birçok fungal enfeksiyonun erken evrelerinde yükselir ve invaziv fungal enfeksiyon taramasında yüksek duyarlılığa sahip invaziv olmayan bir testtir. Bununla birlikte intravenöz amoksisilin klavulanik asit kullanımı, albümin ve globülin içeren tedaviler, selüloz membran filtrelerin kullanıldığı hemodiyaliz, ameliyat sırasında pamuk/gazlı bez kullanımı, gram negatif endotoksemi, böbrek yetmezliği gibi durumlarda testin yalancı pozitiflikle sonuçlanması önemli bir dezavantajdır (Calderon vd., 2011; Onishi vd., 2012; Desmet vd., 2009; Karageorgopoulos vd., 2013). PCP tanısında BDG testinin duyarlılığı %90-100, özgüllüğü %88-96 olarak bildirilmiştir (Sax vd., 2011; Morris vd., 2011) ve BDG pozitifliği ile PCP arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır (Sax vd., 2011). HIV pozitif veya hematolojik maligniteli immüdüşkün hastalardaki PCP enfeksiyonlarında BDG düzeyi çok yüksek, HIV negatif PCP enfeksiyonlu hastalarda ise mikroorganizmanın düşük yükü nedeniyle BDG düzeyleri daha düşük bulunmuştur (Calderon vd., 2011; Morris vd., 2011). *Pneumocystis* tedavi, hastalığın şiddeti ve kortikosteroid kullanımı BDG seviyelerini etkilemez (Morris vd., 2011). Serum BDG testinin *P. jirovecii* kolonizasyonunu ve enfeksiyondan ayırt edilebileceği düşünülmektedir (Karageorgopoulos vd., 2013; Morris vd., 2011).

MSG antijeninin rekombinant olarak üretilmiş msgC parçasının serolojik testlerde kullanılarak PCP tanısında, seroepidemiyolojik çalışmalarda, PCP'de *P. jirovecii*'nin rolünün araştırılmasında faydalı olabileceği belirtilmiştir (Daly vd., 2009; Daly vd., 2006). Anti-*P. jirovecii* antikörlerini saptamaya yönelik serolojik testler epidemiyolojik çalışmalar için yararlıdır. Fakat sağlıklı bireylerde de anti-*P.jirovecii* antikörleri pozitif bulunabildiğinden PCP tanısında nadiren kullanılır (Calderon vd., 2011; Fong vd., 2013; Djawe vd., 2010). Serum antikör düzeylerinin belirlenmesi, immünyetmezlikli hastalarda

başarısızdır, antikor düzeyi saptanabilse bile, aktif hastalıkla önceden geçirilmiş hastalık ayırt edilemez. Kullanılan diğer serolojik testler de nonspesifiktir. Western blot ve ELISA analizleriyle BAL ve serumda etkene karşı antikor yanıtları aranabilir. *P. jirovecii*'ye karşı IgA ve IgG yanıtının HIV'li hastalarda arttığı bildirilmektedir (Walzer vd., 2005; Bishop vd., 2003).

PCP hastalarındaki yükselmiş serum LDH enzim düzeyleri özgül bir belirteç olmaktan çok altta yatan akciğer inflamasyonunun ve hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle PCP hastalarındaki LDH seviyeleri genellikle tedaviye yanıtın değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Walzer vd., 2005; Tasaka vd., 2007). *Pneumocystis* pnömonisinde yüksek serum LDH seviyelerinin duyarlılığı %82-83 arasında bildirilmektedir. LDH seviyeleri, hasta grubundan, enfeksiyonun şiddetinden ve *Pneumocystis*'e karşı profilaksi kullanımından etkilenebilmektedir. Bu konu ile ilgili çalışmalarda, PCP tedavisi alan hastalardaki yüksek LDH seviyelerinin kötü prognoz, tedavi başarısızlığı ve yüksek mortalite ile uyumlu olduğu bulunmuştur (Walzer vd., 2005; Mehlhorn, 2008). LDH düzeylerinin oksijenasyon bozukluğu ile uyumlu olduğu da saptanmıştır (Tasaka vd., 2007).

Son zamanlarda plazma S-adenosylmethionine (SAM), PCP tanısı için duyarlı bir test olarak bildirilmektedir. SAM sentetaz tarafından metionin ve ATP'den sentezlenen ve *Pneumocystis* üremesini uyarabilen genel metil donörüdür. Hem PCP'li ratların plazmasında hem de kültür ortamında SAM miktarının azaldığı gösterilmiştir. Bununla uyumlu olarak, PCP'li hastaların plazma SAM düzeyleri de düşük bulunmuş ve tedavi ile yavaş yavaş yükseldiği gösterilmiştir (Calderon vd., 2011). PCP'li hastalarda diğer pnömoni etkenleriyle enfekte olan hastalara göre daha düşük plazma S-adenozilmetiyonin düzeyleri saptanmakla birlikte bunun doğrulanması için daha fazla çalışma yapılması gerektiğinden de bahsedilmektedir (Walzer vd., 2005; Calderon vd., 2011; Thomas vd., 2004).

KL-6, PCP tanısında başka bir belirteç olarak düşünülmektedir. Tip II pnömositler ve bronşiyal epitel hücrelerince salgılanan müsin benzeri bir glikoproteindir. PCP'li hastalarda düzeyi yüksek bulunmuş olmakla birlikte, KL-6 alveolar epitel hasarını gösteren daha genel bir belirteçtir; *Legionella*, şiddetli tüberküloz ve RSV bronşioliti gibi mantar dışı enfeksiyonlarda, hatta enfeksiyon dışı nedenlerle oluşan interstisyel akciğer hastalıklarında da yüksek bulunmuştur (Calderon vd., 2011). Bu nedenle PCP'de görülen KL-6 yüksekliğini *Pneumocystis*'e özgül olmadığı, akciğerlerdeki harabiyet ve rejenerasyona bağlı olarak yükseldiği düşünülmüştür. PCP tanısında BDG testinin, LDH ve KL-6'dan daha anlamlı olduğu bulunmuştur (Calderon vd., 2011; Tasaka vd., 2007; Nakamura vd., 2009).

## 2.11- Prognoz ve Tedavi

*Pneumocystis* enfeksiyonunda hastanın kliniği hızla bozulabilmektedir. Tedavi başarısı tedaviye başlandığı sırada hastanın klinik durumu ile ilişkilidir. Son 30 yılda tanı olanaklarının gelişmesi hastaların solunum fonksiyonlarında belirgin bir bozulma ortaya çıkmadan önce tedaviye başlanmasına olanak sağlamaktadır (Walzer vd., 2005; Wazir vd., 2004; Mehlhorn, 2008). Hafif bulguları olan hastalar oral ilaçlar ve yakın bir takip ile ayaktan tedavi edilebilir. PCP'de tedavi süresi AIDS hastaları için üç hafta iken diğer hastalarda iki haftadır. İlk seçilecek antimikrobiyal trimetoprim-sulfametoksazol (TMP/SMX)'dür. Oral tedavide biyoyararlanımı iyi, doku penetrasyonu mükemmel ve en hızlı yanıt alınan ajandır. Yüksek etkili antiretroviral tedavi (HAART) AIDS klinik bulguları ortaya çıkmadan önce, 3 ya da 4 antiretroviral ilacın birlikte verilmesiyle yapılmakta ve hastalık belirtilerinin mümkün olduğunca geciktirilmesini ve immün sistemin korunmasını hedeflemektedir. PCP enfeksiyonlu HIV pozitif hastalarda tedavi rejimlerine kortikosteroidlerin ilavesi ile solunum yetmezliği gelişmesinin ve mekanik ventilatör ihtiyacının azalmasının sağlandığı gösterilmiştir (Walzer vd., 2005; Wazir vd., 2004; DEI-CAS vd., 2000). Böbrek ve karaciğer nakli olan kişilerde ko-trimoksazol kullanımı nefrotoksisiteye neden olabilmektedir. Bu durumda, trimetoprim-dapson, atovakuon, klindamisin-primakin, primakuin-pentamidin gibi ikincil tedavilerin kullanılması tavsiye edilmektedir (Wazir vd., 2004; Gill vd., 1991).

*P. jirovecii*'de sulfametoksazol veya dapsona karşı direnç gelişebilir. Direnç gelişmesiyle ilişkili dihidropteroat sentetaz (DHPS) gen mutasyonları saptanmıştır (Beck vd., 2009; Iliades vd., 2005). *P.jirovecii* sık kullanılan antifungal ve antiprotozoal ilaçlara direnç gösterebilir. Ekinokandinler (kaspofungin gibi) tedavide başarılı bir seçenek olarak bildirilmektedir. Bu ilacın düşük dozlarda ko-trimoksazol ile birlikte kullanımının PCP enfeksiyonu tedavisinde daha başarılı olduğu düşünülmüştür (Lobo vd., 2013).

## 2.12- Korunma

Proflaksi, PCP atağı hiç geçirmemiş kişilerde ilk atağı önlemeye yönelik veya daha önce atak geçirenlerde yeni atakları önlemeye yönelik olarak uygulanabilmektedir. Kemoproflaksi uygulanıp uygulanmaması konusunda karar verilirken, hedef hasta grubundaki *Pneumocystis* insidansının yanı sıra, ilaç etkinliği, güvenilirliği, kullanım kolaylığı, maliyeti ve zaman gibi faktörler de önem taşımaktadır. *P. jirovecii*'ye karşı kullanılan ilaçların hiçbirinin bu organizmaya karşı öldürücü olmaması nedeni ile hastanın bağışıklığı

baskılandığı sürece profilaksiye devam edilmesi önerilmektedir (Walzer vd., 2005; Calderon vd., 2011). HIV ile enfekte hastaların PCP'ye karşı birincil profilaksi alması gerekmektedir. CD4+ T hücre sayısı 200/mm<sup>3</sup>'ten az olan erişkinlerin, CD4+ T hücre sayısına bakılmaksızın iki haftadan uzun süren ateşi olan hastaların, orofaringeal *Candida* enfeksiyonu olan hastaların ve daha önceden PCP atağı geçirenlerin profilaksi alması gerekmektedir. Primer profilaksi, şiddetli seyreden primer immünyetmezlikli hastalar, lenforetiküler maligniteler, organ nakli ameliyatları ve beyin tümörü gibi solid tümör hastalarında önem taşımaktadır (Walzer vd., 2005; Calderon vd., 2011; Thomas vd., 2004). Dapson PCP profilaksisinde, erişkinlerde günlük veya haftalık 50-100 mg dozunda tek başına veya bir dihidrofolat redüktaz inhibitörü ile birlikte kullanılabilir (Walzer vd., 2005). AIDS hastalarında anti-*Pneumocystis* tedavi uygulandıktan sonra ilk 72 saat içinde kortikosteroid verilmesi solunum yetmezliği ve ölümü önlemektedir (Walzer vd., 2005; Wilkin vd., 1999). HIV ile enfekte olmayan ancak bağışıklık sistemi baskılayan ilaç kullanan veya önceden edinilen bağışıklık yetmezliği bulunan hastalara PCP'ye karşı profilaksi uygulanması önerilmektedir. Yapılan araştırmalarda, 8 hafta süreyle 16 mg prednizona eşdeğer veya daha yüksek dozda kortikosteroid kullanan HIV negatif hastaların da PCP yönünden risk altında olduğu saptanmıştır (Walzer vd., 2005; Thomas vd., 2004). Hastada PCP geliştiğinde profilaksinin sonlandırılması ve tam doz TMP/SMX, parenteral pentamidin veya diğer etkili tedavilerden birinin uygulanması önerilmektedir. Tedavi tamamlandıktan sonra tekrar profilaksiye devam edilmelidir (Walzer vd., 2005; Calderon vd., 2011).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Bu çalışma, Üsküdar Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **04.02.2015** tarih ve **2015/002** sayılı onayı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülmüştür.

#### **3.1- Hastalar ve Örnekler**

##### **3.1.1- Çalışma grubu**

Bu çalışmada 3 farklı katılımcı grubu oluşturuldu; 100 sağlık çalışanı, hasta ve hastane ile herhangi bir bağlantısı olmayan 100 erişkin gönüllü ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servisinde takip edilmekte olan, *P. jirovecii* enfeksiyonunu düşündürecek herhangi bir klinik ve/veya laboratuvar bulgusu olmayan 50 immüdüşkün birey. Onsekiz yaşından küçük bireyler ve herhangi bir solunum sistemi enfeksiyonu kliniği veya bulgusu olan bireyler çalışmaya alınmamıştır.

##### **3.1.2- Bireylere ait bilgiler**

Örnek alınmadan önce bireyler çalışma hakkında bilgilendirildi. Çalışmaya katılmayı kabul eden her bireyden "gönüllü onam formu" alındıktan sonra, gönüllülere ait yaş, cinsiyet, demografik özellikler, geçirilmiş hastalıklar gibi bilgilerin yer aldığı kısa bir form dolduruldu.

##### **3.1.3- Örnekler**

Örneklerin toplanması işlemi Mart 2015 ile Mayıs 2015 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Tüm katılımcılardan steril SF kullanılarak ağız-boğaz çalkantı suyu ve pamuk uçlu eküvyonlar ile derin nazal sürüntü örnekleri toplandı.

**Ağız çalkantı suyu örnekleri;** Gönüllülere 30-50 ml steril serum fizyolojik verilerek yaklaşık 10-30 saniye boyunca gargara yapmaları beklendi. Ağız çalkantı suyu örnekleri steril 50 ml kapaklı kaplara alınarak, buz aküleri ile sağlanan soğuk ortamda laboratuvara ulaştırıldı.

**Derin nazal sürüntü örnekleri;** Steril SF ile ıslatılmış pamuk uçlu eküvyonlar kullanılarak damağa paralel şekilde burun deliklerinden girildi. Sekresyonların yeterince emilmesi için birkaç saniye bekletildikten sonra döndürülerek çıkarıldı. Eküvyonların sap kısımları kırılarak pamuk uçlar 1.5

ml steril SF içeren eppendorf tüplere alındı ve buz aküleri ile sağlanan soğuk ortamda laboratuvara ulaştırıldı.

## **3.2- Kullanılan Araç ve Gereçler**

### **3.2.1- Kullanılan Cihazlar**

- Sınıf II biyogüvenlik kabini
- Vortex
- Isı bloğu
- -70°C'lik derin dondurucu
- -20°C'lik derin dondurucu
- Real-time PCR cihazı (Bioneer, ExiCycler™ 96, Republic of Korea)
- Santrifüj
- Spin Santrifüj (Exispin, Bioneer, Republic of Korea)
- 37°C±1 İnkübatör
- Floresan mikroskop

### **3.2.2- Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri**

- Steril serum fizyolojik (SF)
- Deiyonize su
- Steril pamuk uçlu eküvyon
- Steril 50 ml vida kapaklı falkon tüpler
- Steril DNA-RNA içermeyen 1.5 ml eppendorf tüpler
- Buzlu lam
- Mikropipet seti ve pipet uçları
- Aseton
- Alüminyum folyo
- Kurutma kağıdı
- Real-time PCR kit (Bioneer, Green star, Republic of Korea, qPCR premix)
- Monofluo *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit (Bio-RAD, cat no.32515)
- *Pneumocystis jirovecii* pozitif kontrol kit (Bio-RAD, cat no.p72734)

## **3.3- Örneklerin Hazırlanması**

1. Tüp içinde bulunan eküvyon uçlar çıkarılmadan önce 5 dakika vortekslendi.

2. Eküvyonlar atıldıktan sonra nazal sürüntü örnekleri ağız çalkantı suyu örnekleri ile birleştirildi.

3. Örnekler 2800xg'de, 10 dakika santrifüj edildi.

4. Üstteki süpernatant kısmı atılarak, dipte yaklaşık 1 ml örnek bırakıldı.

5. Direkt floresan antikör testi için, bu çökeltiden 100 µl örnek alınarak önceden %96 alkolle temizlenen lamın ortasına bırakıldı. Havada kurutulan



preparatlar 10 dakika aseton ile tespit edildi ve test edilene kadar -70 °C'de saklandı.

6. Real-time PCR testi için tüplerde kalan yaklaşık 900 µl örnek 1.5 ml eppendorf tüplerine alınarak çalışma zamanına kadar -70 °C'de saklandı.

### **3.4- DNA İzolasyonu**

*P. jirovecii* fungal DNA izolasyonu için Qiamp DNA Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) kullanıldı. Çalışmalar üretici tarafından önerildiği şekilde uygulandı.

#### **3.4.1- Ön hazırlıklar**

- 1-Isı bloğu 56 °C'ye ayarlandı.
- 2-Örnek sayısı kadar eppendorf tüpü, gruplar halinde numaralandırıldı.
- 3-Çalışma adedi kadar spin kolon çıkarıldı.
- 4-Yıkama solüsyonu1 (AW-1)'e 160 ml etanol, yıkama solüsyonu 2 (AW-2)'ye 125 ml etanol eklenerek kullanıma hazır hale getirdi.

#### **3.4.2- Çalışma**

1. Örnekler -70 °C'den çıkarıldı ve oda ısısına ulaştıktan sonra santrifüj edildi.
2. Çökeltiden 200 µl örnek ilk eppendorf tüplerine alındı.
3. Üzerlerine 200'er µl buffer AL (Lysis Buffer) ve 20'şer µl proteinaz eklendi.
4. Tüplerin kapakları kapatılıp 3-5 sn vorteksledikten sonra spin santrifüj uygulandı.
5. Santrifüjlenen örnekler, ısı bloğunda (56°C) 15 dk inaktivasyona bırakıldı.
6. Isı bloğundan alınan örneklerin üzerlerine 200 µl etanol ilave edildi.
7. Vorteks ve spin santrifüj tekrarlanarak karışımların tamamı spin kolonlara aktarıldı.
8. Tüm spin kolonlar, 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.
9. Bu sırada boş toplama tüpleri dizilerek spin kolonların alt kısımları atılıp, üstteki filtreler bu boş spin kolonlara alındı.
10. Filtre kısımlarına 500 µl AW-1 solüsyonu eklenip, 8000 rpm'de 1dk santrifüjlendi.
11. Santrifüjden çıkan tüplerin alt kısımları atılıp, üstteki filtreler yeni boş spin kolonlara alındı.
12. Filtre kısımlarının üzerlerine 500'er µl AW-2 eklendi ve 14.000 rpm'de 3dk santrifüj edildi.
13. Spin kolonların alt kısımları atılıp, üstteki filtreler yeni boş toplama tüplerine alındı.

14.Tüm spin kolonlar, 14.000 rpm'de 1 dk boş olarak tekrar santrifüj edildi.

15.Santrifüjden çıkarılan tüplerin alt kısımları atılıp, filtre kısımları yeni toplama tüplerine yerleştirildi.

16.Tüplerin filtre kısımlarına 50 µl elüsyon buffer (Buffer AE) ilave edildi.

17.Tüm tüpler 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.

18.Santrifüjden sonra bu kez üst (filtre) kısımları atılıp, alttaki sıvı (DNA) içeren ependorfların kapakları kapatılarak PCR testine alındı.

### **3.5- *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR**

#### **3.5.1- Malzemeler**

1- MSG gen bölgesini hedefleyen primer ve probe setleri (BIONEER, Republic of Korea) (Tablo3.1)

**Tablo 3.1 MSG gen bölgesini hedefleyen primer ve problar**

<b>Primer ve Probe setleri</b>	<b>Sekanslar</b>
<b>MSG Primerler</b>	F: GAA TGC AAA TCC TTA CAG ACA ACA G R: AAA TCA TGA ACG AAA TAA CCA TTG C
<b>MSG-Probe</b>	AGA CAT CGA CAC ACA CAA GCA CGT CT

2- PCR Master Mix (GreenStar, Republic of Korea, Kat No: K-6101)

3- PCR grade distile su

4- PCR eppendorf tüpü

5- Vortex

6- Şeffaf bant

7- Exi cyclers TM-96 Real time Kantitatif Termal Blok

8- Pozitif kontroller (Real time PCR ile pozitif saptanmış, yüksek, orta ve düşük CT değerlerine sahip BAL örnekleri).

#### **3.5.2- Real time PCR yöntemin prensibi**

SYBR Green kullanarak PCR sırasında *Pneumocystis jirovecii* MSG gen bölgesinin saptanması, logaritmik siklus döneminde MSG'nın miktarının analizine olanak sağlar. Çalışmada pozitif ve negatif kontrol örnekleri yanı sıra amplifikasyon kontrolü için internal kontrol de yer aldı.

### 3.5.3- Uygulama basamakları

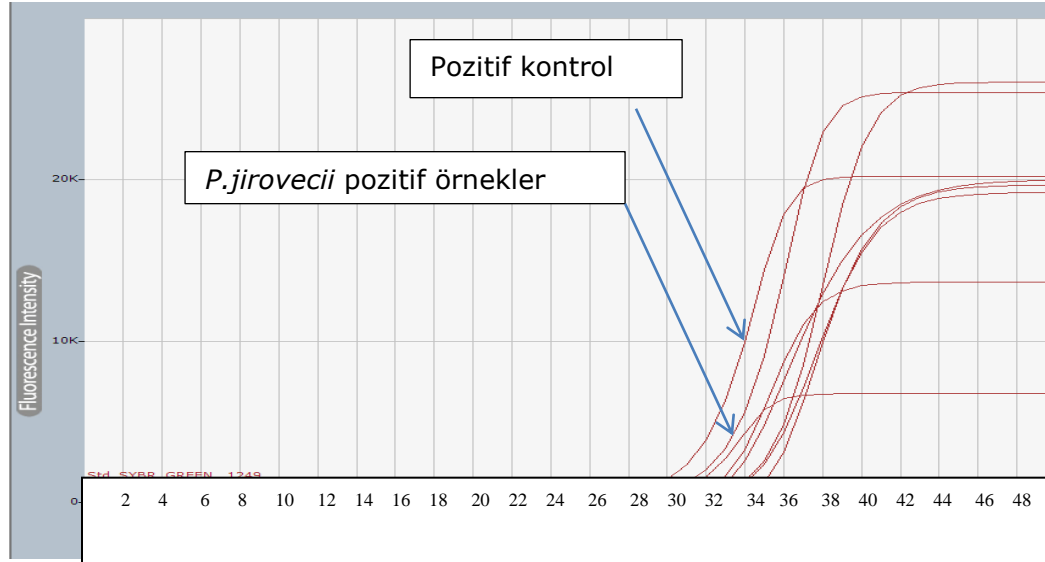
1- Her bir PCR tüpünde aşağıdaki şekilde oluşturulan 25 µL karışım yer aldı.

**Tablo 3.2 Real time-PCR Reaksiyon karışımı**

Real time – PCR Reaksiyon karışımı	Reaksiyon hacmi /1x
Distile su	6µl
Green star Master mix	12
Forward primer (10 pmol)	1µl
Reverse primer (10 pmol)	1µl
Örnek DNA'sı	5µl
<b>Toplam</b>	<b>25 µl</b>

2- Bütün tüpler şeffaf bantla kapatılıp spin vortekslendi ve real time PCR cihazına (Exicycler TM-96 Real time Kantitatif Termal Blok) yüklendi.

3- PCR protokolünde, 95°C'de 10 dakikalık pre-denatürasyon aşamasından sonra 95°C'de 5 sn denatürasyon ve 55°C'de 30 sn annealing-extension aşamalarını içeren 45 siklus uygulandı.



**Şekil 3.1** Real-time PCR amplifikasyon eğrileri

### **3.6- *P.jirovecii* Direkt Floresan Antikor (DFA) Testi**

Bu amaçla ticari bir DFA testi (MONOFLUO *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit, BIO-RAD, USA) kullanıldı ve test tamamen üretici önerileri doğrultusunda uygulandı.

#### **3.6.1- Kit içeriği**

- *Pneumocystis jirovecii* boya (Fluorescein isothiocyanate işaretli özgül monoklonal antikor) (R1)
- Mounting medium (R2)
- Buzlu mikroskop lamları

#### **3.6.2- DFA yöntem prensibi**

Fluorescein isothiocyanate (FITC) işaretli özgül monoklonal antikor (R1) örnekteki *Pneumocystis jirovecii* trofozoitleri, kistleri ve hücre dışı matriks materyali ile bağlanarak kırmızı-siyah zeminde elma yeşili renkte görünürler.

#### **3.6.3- DFA uygulama basamakları**

1. Daha önceden hazırlanmış ve fikse edilmiş lamlar  $-70^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak oda sıcaklığına ulaşana kadar bekletildi.
2. Her bir örnek ve pozitif kontrol lamı için ayrı bir nemli plak hazırlanarak lamlar bu plaklara yerleştirilerdi ve üzerlerine bir damla *P. jirovecii* boya eklendi.
3. Işıktan korumak amacıyla plaklar alüminyum folyo ile kapatılıp  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası boyanın fazlası kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı.
5. Lamlar hafif çalkalama uygulanarak deiyonize su ile 1dk yıkandı ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de kurumaya bırakıldı.
6. Lamların üzerine birer damla mounting medium damlatılarak floresan mikroskopta 515 nm dalga boyunda önce X400 büyütmede tarandı, pozitif saptanan preparatlar X1000 büyütmede incelendi.

### **3.4- Genotiplendirme**

Real-time PCR testi ile pozitif bulunan örnekler mitokondriyal large subunit (mLSU) ve ITS-1 ve ITS-2 bölgelerini içeren DNA dizi analizi ile genotiplendirmeye alındı. Bu amaçla ticari bir firmadan hizmet alımı yapıldı. Ancak, floradan zengin steril olmayan klinik örneklerin kullanımından kaynaklanan fazla sayıdaki non-spesifik bantlar nedeniyle *P. jirovecii* DNA'sı

saflaştırılmadı. Bu nedenle genotiplendirme çalışmasından sonuç elde edilemedi.

### **3.5- İstatistiksel Analiz**

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS v.15.0 programı ile yapıldı. *P.jirovecii* DNA'sı pozitif saptanan ve saptanmayan grupları karşılaştırmak için ve her iki grup arasındaki demografik ve klinik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Çalışma grupları arasındaki yaş farklılıkları Kruskal-Wallis analizi ile değerlendirildi. Sağlık çalışanlarında çalışma süresi ile *P.jirovecii* kolonizasyonu ilişkisinin değerlendirilmesinde Mann whitney U testi kullanıldı. İmmünsüpresif ilaç ve alkol kullanımı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu ilişkisini değerlendirmek için Fisher's Exact ki-kare testi kullanıldı. İmmüdüškün grupta hastalık süresi ile kolonizasyon ilişkisinin değerlendirilmesinde Mann whitney U testi kullanıldı.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4- BULGULAR

Mart - Mayıs 2015 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servisi'nde takip edilen ve PCP düşündürecek herhangi bir akciğer enfeksiyonu olmayan 50 immüdüşkün bireyden, hastanemiz servislerinde görevli 100 sağlık çalışanından ve hasta ve hastane ile bağlantısı olmayan 100 erişkin gönüllüden toplanan ağız çalkantı suyu ve nazal sürüntü örnekleri Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Laboratuvarında çalışmaya alındı.

### 4.1- Çalışma Grubunun Genel Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmaya katılan sağlık çalışanları grubu 21 erkek ve 79 kadından oluştu, yaş ortancası 31'di. Sağlık çalışan olmayan gönüllü grubu 44 erkek ve 56 kadından oluştu ve yaş ortancası 40'dı. İmmüdüşkün gönüllü grubu ise 27 erkek ve 23 kadından oluştu ve yaş ortancası 54 bulundu(Tablo 4.1).

**Tablo 4.1** Çalışma gruplarının yaş dağılımları

<b>Çalışma grubu</b>	<b>Yaş aralığı</b>	<b>Ortalama±SD</b>	<b>Ortanca</b>
<b>Sağlık çalışanı</b>	21-60	32.6±8.42	31
<b>Sağlık çalışan olmayan gönüllüler</b>	18-75	42.0±12.5	40
<b>İmmüdüşkün gönüllüler</b>	19-83	58.1±16.0	54
<b>Toplam</b>	18-83	41.5±15.1	38

Sağlık çalışanlarından toplanan 100 örnekten 22'si (%22), Sağlık çalışan olmayan gruptan alınan 100 örnekten 21'i (%21) ve immüdüşkün gruptan toplanan 50 örnekten 14'ü (%28) *P.jirovecii* kolonizasyonu açısından real-time PCR yöntemiyle pozitif saptandı (Tablo 4.2). Kolonizasyon sıklığı immüdüşkün bireylerde daha fazla görülmekle birlikte, gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P=0.610). Tüm gruplar, katılımcıların cinsiyetine göre de değerlendirilmiştir. Sağlık çalışanı ve sağlık çalışanı olmayan gruplarında kolonizasyon sıklığı erkeklerde daha fazla görüldüğü halde, immüdüşkün bireyler arasında kadınlardaki sıklık daha yüksekti (Tablo 4.2). Ancak her bir grubun kendi içinde ve çalışma grubunun

genelinde (n=250) değerlendirildiğinde kolonizasyonla cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $P>0.05$ ) (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2** Çalışma gruplarının cinsiyet dağılımları ve kolonizasyon oranları

Çalışma grubu	Real-time PCR		Toplam	<sup>a</sup> <i>P-değeri</i>
	Pozitif (%)	Negatif (%)		
<b>Sağlık çalışanı</b>				
Erkek	6 (28.6)	15 (71.4)	21	<i>P=0.413</i>
Kadın	16 (20.3)	63 (79.7)	79	
Toplam	22 (22)	78 (78)	100	
<b>Sağlık çalışan olmayan gönüllüler</b>				
Erkek	10 (22.7)	34 (77.3)	44	<i>P=0.707</i>
Kadın	11 (19.6)	45 (80.4)	56	
Toplam	21 (21)	79 (79)	100	
<b>İmmüdüškün gönüllüler</b>				
Erkek	7 (25.9)	20 (74.1)	27	<i>P=0.723</i>
Kadın	7 (30.4)	16 (69.6)	23	
Toplam	14 (28)	36 (72)	50	
<b>Genel</b>				
Erkek	23 (25)	69 (75)	92	<i>P=0.527</i>
Kadın	34 (21.5)	124 (78.5)	158	
Toplam	57 (22.8)	193 (77.2)	250	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

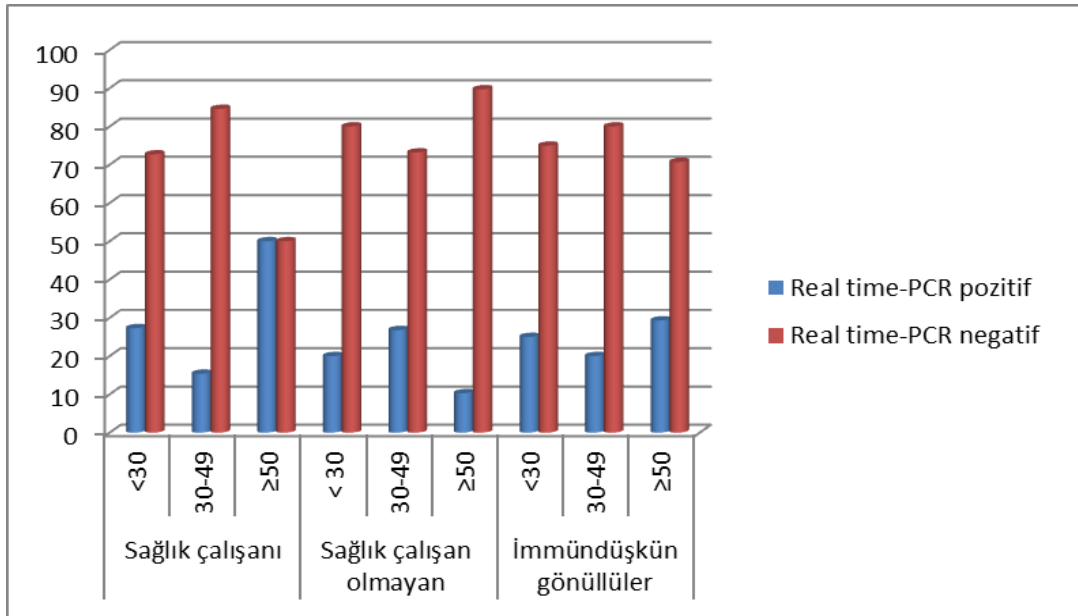
Real-time PCR test sonuçları yaş gruplarına göre değerlendirildi. Genel olarak değerlendirildiğinde, kolonizasyon saptanan katılımcıların çoğunluğu (%42.1) 30-49 yaş aralığında yer almaktaydı. Ancak istatistiksel olarak kolonizasyon sıklığı ile yaş grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı;  $P=0.819$  (Tablo 4.3). Ayrıca her bir grup içinde kolonizasyon sıklıkları yaşlara göre değerlendirildiğinde, immüdüškün bireylerde kolonizasyonun en fazla 50 yaş üzerindeki bireylerde gözlenmesine rağmen, sağlık çalışanları ve sağlık çalışan olmayan erişkin gruplarında kolonizasyon daha genç yaşlarda gözlemlendi (Şekil 4.1).

**Tablo 4.3** Yaşlara göre real-time PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Yaş grupları	Real-time PCR sonuçları (%)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
<30 yaş	16 (28.1)	47 (24.4)	63 (25.2)
30-49 yaş	24 (42.1)	89 (46.1)	113 (45.2)
50≤	17 (29.8)	57 (29.5)	74 (29.6)
<b>Toplam (%)</b>	57 (100)	193 (100)	250

<sup>a</sup> *P-değeri*  $P=0.819$

<sup>a</sup>Pearson ki-kare testi ile analiz edildi



**Şekil 4.1** Çalışma gruplarında yaşa göre kolonizasyon oranları



**Tablo 4.4** Katılımcılara ait çeşitli özellikler ve *P. jirovecii* kolonizasyon sıklığı

Katılımcı özellikleri (n=200)	Real-time PCR (%)		Toplam (%)	<sup>a</sup> P-değeri	
	Pozitif	Negatif			
<b>Geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu</b>	Evet	25 (59.1)	95 (60.5)	120 (60)	0.779
	Hayır	18 (41.9)	62 (39.5)		
<b>Kronik akciğer hastalığı varlığı</b>	Evet	5 (11.6)	25 (15.9)	30 (15)	0.485
	Hayır	38 (88.4)	132 (84.1)		
<b>Sigara kullanımı</b>	Evet	12 (27.9)	51 (32.5)	63 (31.5)	0.567
	Hayır	31 (72.1)	106 (67.5)		
<b>Alkol kullanımı</b>	Evet	4 (9.3)	14 (8.9)	18 (9)	0.937
	Hayır	39 (90.7)	143 (91.1)		

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

İmmüdüşkün bireylerin yer aldığı grupta kolonizasyon sıklığı daha fazla görüldüğünden ve altta yatan kronik hastalıkları nedeniyle immüdüşkün olmayan toplumu yansıtmayacakları düşünüldü. Bu nedenle, geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu ve kronik akciğer hastalığı varlığı, sigara ve alkol tüketimi özellikleri ile kolonizasyon sıklığı arasındaki ilişki sağlık çalışanları ve sağlık çalışanı olmayan erişkin grupları dahil edilerek değerlendirildi (Tablo 4.4) Ancak oransal olarak dikkati çeken bir farklılık gözlenmedi ve istatistiksel olarak da *P. jirovecii* kolonizasyonu ile geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu, kronik akciğer hastalığı ya da sigara ve/veya alkol kullanımı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

## 4.2- Sağlık çalışanlarının demografik özellikleri

Çalışmaya katılan 100 sağlık çalışanının mesleklerine göre dağılımları; 31'i (%31) doktor, 56'sı (%56) hemşire, 9'u (%9) hizmetli, 4'ü (%4) sekreterdi. *P.jirovecii* kolonizasyon oranı doktorlarda %29, hemşirelerde %16.1, hizmetlilerde %33.3 ve sekreterlerde %25 bulundu. Buna göre

*P.jirovecii* kolonizasyonu ile sağlık çalışanlarının meslekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır;  $P > 0.05$  (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5** Sağlık çalışanlarının mesleklere göre dağılımları

Meslek	Real-time PCR (%)		Toplam (%)
	Pozitif	Negatif	
<b>Doktor</b>	9 (29)	22 (71)	31 (100)
<b>Hemşire</b>	9 (16.1)	47(83.9)	56 (100)
<b>Hizmetli</b>	3 (33.3)	6 (66.7)	9 (100)
<b>Sekreter</b>	1 (25)	3 (75)	4 (100)
<b>Toplam</b>	22 (22)	78 (78)	100 (100)
<b><sup>a</sup>P-değeri</b>		$P= 0.434$	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Tüm örneklerin 5'i cerrahi, 40'ı dahiliye, 24'ü hematoloji-onkoloji, 15'i pediatri, 16'sı ise yoğun bakımda görevli sağlık çalışanlarına aitti. *P.jirovecii* kolonizasyonu cerrahi bölüm çalışanlarında %40, dahiliyede %25, hematoloji-onkolojide %20.8, pediatriye %7 ve yoğun bakım çalışanlarında %25 oranında saptanmıştır. İstatistiksel olarak *P.jirovecii* kolonizasyonu açısından meslekler arasında farklılık bulunmamıştır;  $P > 0.05$  (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6** Sağlık çalışanlarının görevli oldukları birimlere dağılımları

Bölüm	RT-PCR(%)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
<b>Cerrahi</b>	2 (40)	3 (60)	5 (100)
<b>Dahiliye</b>	10 (25)	30 (75)	40 (100)
<b>Hematoloji-onkoloji</b>	5 (20.8)	19 (79.2)	24 (100)
<b>Pediatri</b>	1 (7)	14 (93)	15 (100)
<b>Yoğun bakım</b>	4 (25)	12 (75)	16 (100)
<b>Toplam</b>	22 (22)	78 (78)	100 (100)
<b><sup>a</sup>P-değeri</b>		$P= 0.643$	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Sağlık çalışanlarının çalışma süreleri ile kolonizasyon sıklığı karşılaştırılmış, kolonizasyon pozitif saptanan gönüllülerin hastanede çalışma süreleri (ortalama 101.25 ay), negatif saptanan gönüllülerin çalışma sürelerine göre (ortalama 66.26 ay) belirgin olarak daha uzun bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı bir farklılık gösterilememiştir;  $P>0.05$  (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7** Sağlık çalışanlarının çalışma süreleri

Bölümde çalışma süresi	Ortalama (std.hata)	Ortanca %25-%75
	min-max	
<b>Pozitif</b>	101.25 (26.32) 0.25-396	45 (5.75-171)
<b>Negatif</b>	66.25 (9.69) 0.1-360	36 (5.5-120)
<b><sup>c</sup>P-değeri</b>	$P=0.327$	

<sup>c</sup>Mann Whitney test ile analiz edildi

Altmış yedi sağlık çalışanı, örneklerin toplanmasından önceki üç ay içinde geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu hikayesi bildirdi. *P.jirovecii* kolonizasyonu bu grupta %20.9 iken, solunum yolu enfeksiyonu hikayesi bulunmayan 33 sağlık çalışanında kolonizasyon oranı %24.2 bulunmuştur. Geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu ile *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı açısından bu iki grup arasında anlamlı istatistiksel bir ilişki bulunmamıştır;  $P>0.05$  (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8** Sağlık çalışanlarında geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu (son 3 ay) ve *P. jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

Solunum yolu enfeksiyon durumu	RT-PCR (%)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
<b>Hayır</b>	8 (24.2)	25 (75.8)	33 (100)	
<b>Evet</b>	14 (20.9)	53 (79.1)	67 (100)	$P= 0.704$
<b>Toplam</b>	22 (22)	78 (78)	100 (100)	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Sağlık çalışanlarının 94'ü herhangi bir kronik akciğer hastalığı bildirmedi. Kronik akciğer hastalığı bildirmeyen gönüllülerin 21'inde, kronik akciğer hastalığı bulunduğunu bildiren 6 katılımcının ise sadece birinde *P.jirovecii* kolonizasyonu saptandı. Kronik akciğer hastalığı varlığı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır;  $P>0.05$  (Tablo 4.9)

**Tablo 4.9** Sağlık çalışanlarında kronik akciğer hastalığı ve *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

Kronik akciğer hastalık varlığı	Real-time PCR (N)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
<b>Hayır</b>	21	73	94	
<b>Evet</b>	1	5	6	$P=0.745$
<b>Toplam</b>	22	78	100	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Son bir yıl içinde immünsüpresif ilaç kullanımı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığının karşılaştırması Tablo 4.10'da sunulmuştur. İmmünsüpresif ilaç kullanmayan sağlık çalışanlarının 19'unda kolonizasyon saptanırken immünsüpresif ilaç kullanımı sadece 7 personelde sözkonusuydu. *P.jirovecii* kolonizasyonu ile immünsüpresif ilaç kullanımı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı;  $P>0.05$ .

**Tablo 4.10** Sağlık çalışanlarında immünsüpresif ilaç kullanımı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

İmmünsüpresif ilaç kullanımı	RT-PCR (N)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	19	74	93	
Evet	3	4	7	P=0.167
<b>Toplam</b>	22	78	100	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Sağlık çalışanı grubunda, *P.jirovecii* kolonizasyonu son üç ay içinde antibiyotik kullanımına göre de değerlendirildi (Tablo 4.11). Buna göre yakın zamanda antibiyotik kullanan grupta kolonizasyon sıklığı %26.1 ve antibiyotik kullanımı öyküsü olmayanlarda %20.8 bulundu ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi; P>0.05.

**Tablo 4.11** Sağlık çalışanlarında antibiyotik kullanımı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

Antibiyotik kullanım durumu	Real-time PCR (%)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	16 (20.8)	61 (79.2)	77 (100)	
Evet	6 (26.1)	17 (73.9)	23 (100)	P=0.590
<b>Toplam</b>	22 (22)	78 (78)	100 (100)	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Sağlık çalışanları arasında sigara kullanımı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu ilişkisi Tablo 4.12'de özetlenmiştir. Buna göre sigara kullanımı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır; P>0.05.

**Tablo 4.12** Sağlık çalışanlarında sigara kullanımı ve *P.jirovecii* kolonizasyonu

Sigara kullanımı	RT-PCR (%)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	16 (23.9)	51 (76.1)	67 (100)	
Evet	6 (18.2)	27 (81.8)	33 (100)	P=0.518
<b>Toplam</b>	22 (22)	78 (78)	100 (100)	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Sağlık çalışanlarının 14'ünde alkol kullanımı söz konusu iken, 86'sı alkol tüketmediğini bildirdi. Bu bireylerdeki *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı Tablo 4.13'de verilmiştir. Sağlık çalışanlarında alkol kullanımının *P.jirovecii* kolonizasyonu üzerine istatistiksel olarak etkisi olmadığı gözlenmiştir; P>0.05.

**Tablo 4.13** Sağlık çalışanlarında alkol kullanımı ve *P.jirovecii* kolonizasyonu

Alkol kullanımı	RT-PCR (N)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	18	68	86	
Evet	4	10	14	P=0.522
<b>Toplam</b>	22	78	100	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

### 4.3- Sağlık Çalışanı Olmayan Erişkin Gönüllülerin Demografik Özellikleri

Sağlık çalışan olmayan 100 erişkin gönüllünün 53'ü örnek alınmadan önceki üç ay içinde solunum yolu enfeksiyonu geçirdiğini bildirmiştir. Bunların %20.8'sinde *P.jirovecii* kolonizasyonu saptanmış, enfeksiyon hikayesi bulunmayanlarda ise %21.3 oranında kolonizasyon gösterilmiştir. Bu iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır; P>0.05 (Tablo 4.14).

**Tablo 4.14** Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu (son 3 ay) ve *P. jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

Solunum yolu enfeksiyonu varlığı	Real-time PCR (%)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	10 (21.3)	37 (78.7)	47 (100)	
Evet	11 (20.8)	42 (79.2)	53 (100)	P= 0.949
<b>Toplam</b>	21 (21)	79 (79)	100 (100)	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Sağlık çalışanı olmayan erişkin katılımcıların 11'i en az bir kronik hastalık bildirmiş ve bunların ikisinde *P.jirovecii* kolonizasyonu bulunmuştur (Tablo 4.15). Herhangi bir kronik hastalık bildirmeyen gruptaki katılımcıların ise 19'unda *P.jirovecii* kolonizasyonu bulunmuş ve kronik hastalık açısından iki grup arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir; P>0.05.

**Tablo 4.15** Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde kronik akciğer hastalık varlığı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu ilişkisi

Kronik akciğer hastalık varlığı	Real-time PCR (N)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	19	70	89	
Evet	2	9	11	P=0.808
<b>Toplam</b>	21	79	100	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Sağlık çalışan olmayan erişkin gönüllüler arasında son bir yıl içinde immünsüpresif ilaç kullanım oranları ve immünsüpresif ilaç kullanımı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu ilişkisi Tablo 4.16'da özetlenmiştir. İmmünsüpresif ilaç kullandığını bildiren grupta kolonizasyon sıklığı belirgin olarak yüksek görünse de, bu gruptaki gönüllü sayısı oldukça az (n=5) olduğundan gerçek oranı yansıtmadığı düşünülmektedir. Sağlık çalışan olmayan erişkin gönüllülerde *P.jirovecii* kolonizasyonu ile immünssüpresif ilaç kullanımı

arasında anlamlı bir ilişki bulunamamış olmakla birlikte ( $P>0.05$ ), bunun değerlendirilebilmesi için immünsüpresif ilaç kullanımı bildiren gönüllü sayısının yetersiz olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır.

**Tablo 4.16** Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde immünsüpresif ilaç kullanımı ve *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

İmmünsüpresif ilaç kullanımı	Real-time PCR (N)		Toplam	<sup>d</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
<b>Hayır</b>	19	76	95	
<b>Evet</b>	2	3	5	$P=0.282$
<b>Toplam</b>	21	79	100	

<sup>d</sup> Fisher's Exact ki-kare testi ile analiz edildi

*P.jirovecii* kolonizasyonu ile antibiyotik kullanımı arasında sağlık çalışanı olmayan erişkin gönüllü grubunda da anlamlı bir ilişki saptanmamıştır;  $P>0.05$  (Tablo 4.17).

**Tablo 4.17** Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde son üç ay içinde antibiyotik kullanımı ve *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

Antibiyotik kullanımı	Real-time PCR (%)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
<b>Hayır</b>	17 (81)	69 (87.3)	86 (100)	
<b>Evet</b>	4 (19)	10 (12.7)	14 (100)	$P=0.453$
<b>Toplam</b>	21 (100)	79 (100)	100 (100)	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Sağlık çalışan olmayan erişkin gönüllülerin sigara ve alkol kullanımları ile *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı da değerlendirilmiş olup, Tablo 4.18 ve Tablo 4.19'da sonuçlar özetlenmiştir. Sigara ya da alkol kullanımının kolonizasyon üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı gözlenmiştir;  $P>0.05$ .



**Tablo 4.18** Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde sigara kullanımı ve *P.jirovecii* kolonizasyonu

Sigara kullanımı	RT-PCR (%)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	15 (21.4)	55 (78.6)	70 (100)	
Evet	6 (20)	24 (80)	30 (100)	P=0.872
<b>Toplam</b>	21 (21)	79 (79)	100 (100)	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

**Tablo 4.19** Sağlık çalışan olmayan erişkinlerde alkol kullanımı ve *P.jirovecii* kolonizasyonu

Alkol kullanımı	RT-PCR (N)		Toplam	<sup>d</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	21	75	96	
Evet	0	4	4	P=0.576
<b>Toplam</b>	21	79	100	

<sup>d</sup> Fisher's Exact ki-kare testi ile analiz edildi

#### 4.4- İmmüdüşkün Gönüllü Grubunun Demografik Özellikleri

Hematoloji servisinde takip edilmekte olan 50 hastanın 15'i lösemi (ALL/AML), 20'si lenfoma, 7'si multiple myelom ve 8'i diğer hematolojik hastalıklara sahipti. Real-time PCR yöntemiyle *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı altta yatan hematolojik hastalığa göre belirgin farklılıklar sergilemiştir; lösemi hastalarında %26.7, lenfoma hastalarında %40, multiple myeloma hastalarında %14.3 ve diğer hastalık grubunda %12.5 oranında saptanmıştır (Tablo 4.20). Bununla birlikte, *P.jirovecii* kolonizasyonu açısından hematolojik hastalıklar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır; P>0.05.

**Tablo 4.20** Hematolojik hastalıklar ve *P. jirovecii* kolonizasyon sıklığı

Hematolojik <sup>a</sup> Hastalık	Real-time PCR sonucu (%)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Hematolojik malignite	12 (34.3)	23 (65.7)	35 (100)
Diğer	2 (13.3)	13 (86.7)	15 (100)
<sup>b</sup> <i>P</i> -değeri		<i>P</i> =0.131	

<sup>a</sup>Hematolojik malignite, lösemi ve lenfomalar; Diğer, anemiler, polisitemia, vb.

<sup>b</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Hastanede yatış süresi ile *P.jirovecii* kolonizasyonu değerlendirildi; *P. jirovecii* kolonizasyonu saptanan hastaların hastanede yatış süreleri 1-20 gündü. Kolonize olmayan hastaların yatış süreleri ise 1-120 gün raporlandı (Tablo 4.21).

**Tablo 4.21** Hastanede yatış süresi ile *P.jirovecii* kolonizasyonu

Hastanede yatış süresi (Gün) Ortanca (min-max)	Real time-PCR (%)
4 (1-20)	Pozitif (28)
5 (1-120)	Negatif (72)

*P.jirovecii* kolonizasyonunun hastalık süreleri ile ilişkileri de değerlendirildi. Kolonizasyon pozitif hastaların hastalık süreleri 2-240 ay hesaplanırken, kolonizasyon olmayan hastalarda hastalık süreleri 0.07-60 ay bulunmuştur. Buna göre hastalık süresi ile kolonizasyon sıklığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmış ve hastalık süresinin uzaması ile kolonizasyon sıklığının arttığı gösterilmiştir;  $P < 0.05$  (Tablo 4.22).

**Tablo 4.22** Hastalık süresi ile *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

Real-time PCR (n)	Hastalık süresi aralığı (ay)	Ortanca	<sup>c</sup> P-değeri
<b>Pozitif (14)</b>	2-240	16	<i>P=0.001</i>
<b>Negatif (36)</b>	0.07-60	3	

<sup>c</sup>Mann Whitney testi ile analiz edildi

İmmüdüşkün katılımcılardan sadece 8'i son üç ayda geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu bildirmiştir. Bu bireylerin 3'ünde, solunum yolu enfeksiyonu bildirmeyenlerin ise 11'inde *P. jirovecii* kolonizasyonu saptanmış olup, bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır;  $P>0.05$  (Tablo 4.23)

**Tablo 4.23** İmmüdüşkün katılımcılarda geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu (son 3 ay) ve *P. jirovecii* kolonizasyonu sıklığı

Geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu	Real-time PCR (N)		Toplam	<sup>a</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
<b>Hayır</b>	11	31	42	<i>P=0.514</i>
<b>Evet</b>	3	5	8	
<b>Toplam</b>	14	36	50	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

Elli hematoloji hastasının 45'inde kemoterapi uygulaması söz konusu iken, 5 hastaya örneklerin toplanması sırasında kemoterapi başlanmamıştı. Kemoterapi uygulanan hastalarda *P.jirovecii* kolonizasyon oranı (%28.9), kemoterapi uygulanmayan hastalara göre (%20) daha yüksek bulunmuş olmakla birlikte, kemoterapi uygulanmayan hasta grubundaki katılımcı sayısının düşük olması göz önünde bulundurulmalıdır (Tablo 4.24a). Ancak. Kemoterapi uygulanmakta olan hastaların 40'ında tedavi şekli belirlendi; 21'ine monoterapi, 19'una ise iki veya daha fazla ilaç kombinasyonu uygulanmaktaydı. Kemoterapinin monoterapi şeklinde uygulandığı grupta kolonizasyon oranı %22.5, kombine olarak uygulanan grupta ise %5

bulunmuş olup, *P. jirovecii* kolonizasyonu ile immünsüpresif tedavi şekli arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı gözlenmiştir;  $P>0.05$  (Tablo 4.24b).

**Tablo 4.24a** İmmüdüškün katılımcılara kemoterapi uygulanması ve *P. jirovecii* kolonizasyonu

Kemoterapi uygulanması	Real-time PCR(%)		Toplam	<sup>d</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
<b>Hayır</b>	1 (20)	4(80)	5 (100)	
<b>Evet</b>	13 (28.9)	32 (71.1)	45 (100)	$P=0.675$
<b>Toplam</b>	14 (28)	36 (72)	50 (100)	

<sup>d</sup>Fisher's Exact ki- kare testi ile analiz edildi

**Tablo 4.24b** İmmüdüškün katılımcılarda kemoterapi şekli ile *P. jirovecii* kolonizasyonu

Kemoterapi şekli (n)	Real-time PCR(%)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
<b>Monoterapi (21)</b>	9 (22.5)	12(30)	21 (100)
<b>Kombinasyon (19)</b>	3 (7.5)	16 (40)	19 (100)
<b>Toplam (40)</b>	12(30)	27 (67.5)	40 (100)

Hematoloji hastalarının 17'si profilaktik olarak antibiyotik ilaç kullanmaktaydı. Antibiyotik kullanan hastaların %41.2'sinde *P.jirovecii* kolonizasyonu saptanırken, antibiyotik kullanmayan hastalarda bu oran %21.2 bulundu. Antibiyotik kullanan hastalarda kolonizasyon oranı belirgin şekilde daha yüksek saptanmış olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı;  $P>0.05$  (Tablo 4.25).

**Tablo 4.25** İmmüdüškün katılımcılarda son üç ay içinde antibiyotik kullanımı ile *P. jirovecii* kolonizasyonu

Antibiyotik kullanımı	Real-time PCR (%)		Toplam	<sup>a</sup> <i>P</i> -değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	7 (21.2)	26 (78.8)	33 (100)	
Evet	7 (41.2)	10 (58.8)	17 (100)	<i>P</i> =0.136
<b>Toplam</b>	14 (28)	36 (72)	50 (100)	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare analize ile test edildi

Hematoloji hastaları arasında sigara ve alkol tüketimi ile *P. jirovecii* kolonizasyonunun ilişkisi değerlendirildi. Ancak sigara ve/veya alkol kullanımı bildiren hasta sayısı oldukça düşük olduğundan sonuçlar yeterince güvenilir bulunmadı. İstatistiksel olarak da sigara ve/veya alkol kullanımı ile *P. jirovecii* kolonizasyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı;  $P > 0.05$  (Tablo 4.26; Tablo 4.27).

**Tablo 4.26** İmmüdüškün bireylerde sigara kullanımı ile *P. jirovecii* kolonizasyonu

Sigara kullanım durumu	Real-time PCR (N)		Toplam	<sup>a</sup> <i>P</i> -değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	11	33	44	
Evet	3	3	6	<i>P</i> =0.201
<b>Toplam</b>	14	36	50	

<sup>a</sup> Pearson ki-kare testi ile analiz edildi

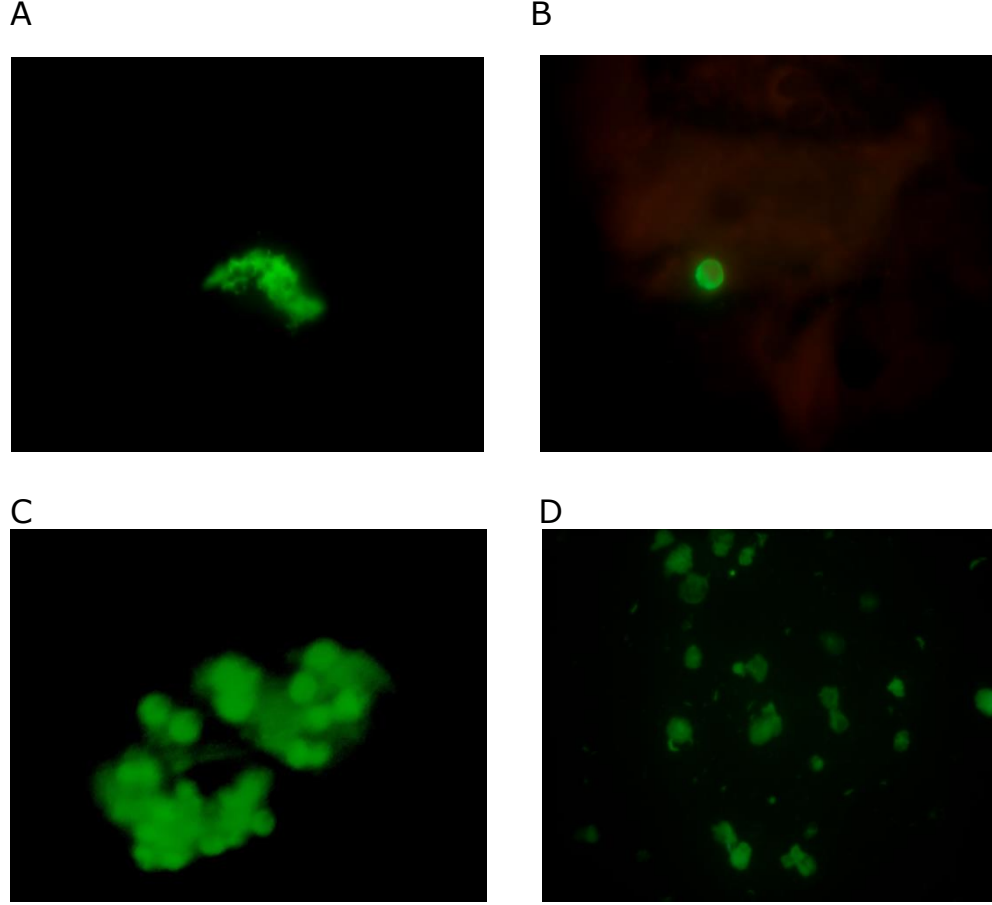
**Tablo 4.27** İmmüdüškün bireylerde alkol kullanımı ve *P.jirovecii* kolonizasyonu

Alkol kullanım durumu	RT-PCR(N)		Toplam	<sup>d</sup> P-değeri
	Pozitif	Negatif		
Hayır	13	35	48	
Evet	1	1	2	<i>P=0.479</i>
<b>Toplam</b>	14	36	50	

<sup>d</sup>Fisher's Exact ki-kare testi ile analiz test edildi

#### 4.5- Direkt İmmunfloresan Testi Sonuçları

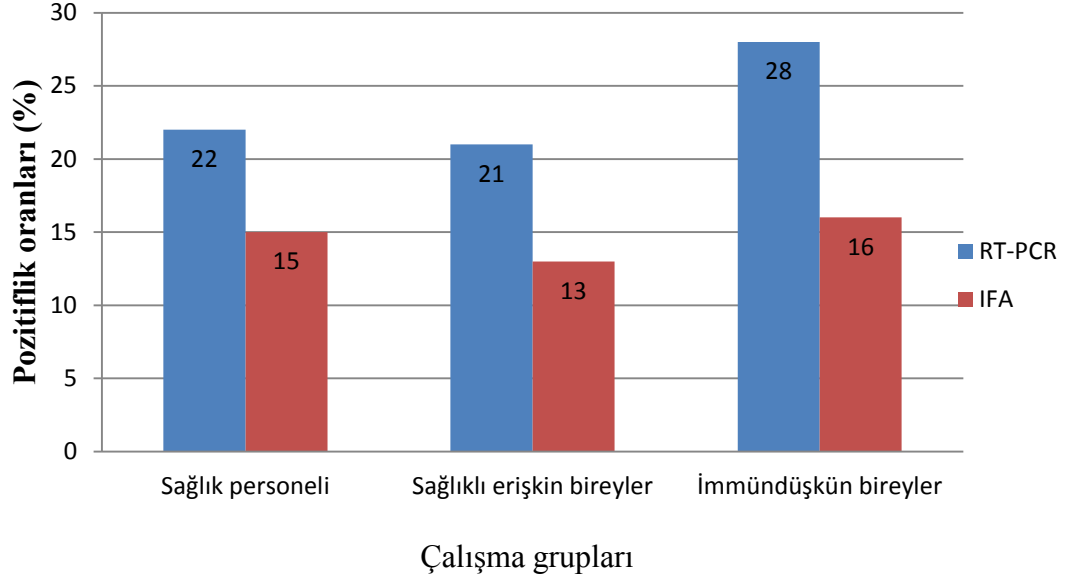
Çalışmamızda real-time PCR yöntemi ile *P.jirovecii* geni saptanan toplam 57 örnek (22 sağlık personeli, 21 sağlıklı erişkin, 14 immüdüškün erişkin) direkt immunfloresan testi (DFA)'ne alındı. Bu amaçla kullanılan ticari test *P.jirovecii*'nin hem kisti hem de trofozoit formlarını saptayabilme özelliğindeydi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2** *P.jirovecii* İFA görüntüleri

A, İFA ile *P.jirovecii* trofozoit pozitif sağlık personel; B, İFA ile *P.jirovecii* kist pozitif gönüllü erişkin; C, İFA ile *P.jirovecii* trofozoit pozitif hematoloji hastası; D, Pozitif Kontrol İFA görülmekte.

Real-time PCR ve DFA testi sonuçları Şekil 4.3’de karşılaştırılmıştır. Real-time PCR yöntemi ile kolonizasyon saptanan 22 sağlık çalışanının 15’i, 21 sağlık çalışanı olmayan erişkin bireyin 13’ü ve 14 immün düşük bireyin 8’i DFA yöntemi ile pozitif bulundu.



**Şekil 4.3** Real-time PCR ve direkt immunfloresan test sonuçları

Buna göre PCR testi kolonizasyonu saptamada DFA testine göre anlamlı oranda üstün bulunmuştur;  $P < 0.0002$ .



## 5. TARTIŞMA

*P. jirovecii* HIV pozitif bireylerde, konnektif doku hastalığı ya da hematolojik malignitesi olanlarda ve organ transplantasyonu yapılan hastalarda hayatı tehdit eden infeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir (Durand vd., 2003). Özellikle HIV pozitif hastalarda anti retroviral tedavinin kullanıma girmesiyle PCP insidansı belirgin olarak azalmıştır (Bartlett vd., 1997). Bununla birlikte, son yıllarda hematolojik ve solid organ tümörleri, organ transplantasyonları ve otoimmün hastalıklarda etkili immünoşüpresif tedavilerin kullanıma girmesiyle, HIV negatif immünoşüpresif hastalardaki PCP enfeksiyonlarında artış gözlenmektedir (Tasaka vd., 2012).

Klinik olarak semptom vermeyen bireylerde organizmanın veya DNA'sının tespit edilmesi "kolonizasyon" olarak tanımlanmıştır. Kolonizasyon saptanan kişilerin, etkenin topluma yayılmasında rezervuar rolü oynadığı, ayrıca bu kişilerin duyarlı hale gelmeleri durumunda mevcut kolonizasyondan *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi (PCP) gelişim riski taşıdıkları belirtilmektedir (Morris vd., 2008).

*P.jirovecii* kültürde üretilmediği için PCP tanısı indüklenmiş balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL), trakeal aspirasyon veya bronşiyal fırçalama, akciğer biyopsisi ve plevral sıvı örneklerinde mantarın morfolojik olarak gösterilmesiyle yapılabilmektedir. Bu örneklerde *Pneumocystis*'in tanımlanması, çeşitli boyalar (Giemsa, toluidin mavisi vb.) ve immünofloresan boyama yöntemleri ile hazırlanmış preparatlarda *P.jirovecii* kist ve/veya trofozoitlerinin mikroskopik olarak gösterilmesi ile mümkün olmaktadır. Son yıllarda ise moleküler yöntemlerle klinik örneklerdeki mikroorganizmanın daha duyarlı olarak saptanabildiği gösterilmiştir (Krajicek vd., 2008; Thomas vd., 2004).

İmmünofloresan boyalarla işaretli özgül antikorların kullanıldığı yöntemlerde, floresan mikroskopu ile mikroorganizmalar tek tek veya kümeler oluşturmuş parlak elma yeşili renkli cisimcikler olarak görülmektedirler. Floresan boyalarla hem trofozoidler hem de kistler ve kistlerin ekstrasellüler matriksi boyanır. PCP tanısında, floresans antikor yönteminin kolay uygulanabilmesi, kısa sürede sonuç alınabilmesi, diğer boyama yöntemlerinden daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğünün bulunması gibi olumlu özelliklerine rağmen, AIDS dışı immünoşüpresif hastalarda ve kolonizasyonu pozitif bireylerde çoğu zaman mantar yükünün düşük olması, bu yöntemin duyarlılığını azaltmaktadır. Bununla uyumlu olarak, immün sağlıklı bireylerdeki otopsi çalışmalarında mikroskopik ya da immünofloresan yöntemlerle *P. jirovecii* saptanma oranının son derece düşük (<%1) olduğu gözlenmiştir (Takahashi vd., 2002).

Oysa PCR, direkt mikroskopik inceleme ya da direkt floresan antikor testlerine göre son derece duyarlı bir yöntemdir ve *P. jirovecii* yükü çok düşük düzeyde olsa bile PCR ile saptanabilmektedir (Leigh vd., 1993; Lu vd., 1997). Kolonize hastalardaki mantar yükü çoğu zaman düşük seviyede kalmakta ve bu kişilerin saptanmasında geleneksel boyama yöntemleri yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle kolonizasyon sıklığını araştıran çalışmalarda PCR'a dayalı moleküler yöntemlerin tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Arcenas vd., 2006; Huggett vd., 2008; McTaggart vd., 2012; Medrano vd., 2005; Tasaka vd., 2012). Son yıllarda, "real-time polimerase chain reaction (PCR)" yöntemi, daha az özgül olan önceki yöntemlerin (klasik PCR, nested PCR gibi) yerini büyük oranda almıştır (Carmona vd., 2011). Özellikle kolonizasyonu saptamaya yönelik çalışmalarda invaziv işlem gerektirmeyen ağız yıkama sıvısı, nazofaringeal aspirat veya indüklenmiş balgam örnekleri sıkça kullanılmakta, ancak BAL sıvısı ve akciğer doku örnekleri en değerli klinik örnekler olarak değerlendirilmektedir (Morris vd., 2008).

*P. jirovecii* saptamaya yönelik moleküler çalışmalarda, diğer mantarlarda olduğu gibi, çok kopyalı ribozomal ya da mitokondriyal gen bölgeleri ile MSG geni kullanılmaktadır. Huang vd. (1999), *P. jirovecii* saptamak amacıyla indüklenmiş balgam, BAL ve ağız çalkantı suyu örneklerinde yüksek spesifik MSG genini PCR ve agaroz jel elektroforezi takiben southern hibridizasyon yöntemiyle araştırmışlar ve *P.jirovecii* saptamada MSG geninin mitokondriyal ribozomal RNA (mrRNA)'ya göre daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Gupta vd. (2008) ise, *P.jirovecii* çok kopyalı MSG geni duyarlılığının mitokondriyal geniş alt ünite (mtLSU)'e benzer olduğunu göstermişlerdir.

*P.jirovecii*'nin saptanabilirliği hem örnek tipinden hem de örnek miktarından etkilenebilmektedir. Ponce vd. (2010), immünkompetan 77 olgunun postmortem akciğer dokusunda PCR yöntemi ile *P. jirovecii* varlığını araştırmışlar ve olguların %64.9'unda saptamışlardır. Spencer vd. (2008), HIV pozitif hastaların ailelerindeki *P.jirovecii* kolonizasyonunun araştırılmasında erişkin bireyler için ağız çalkantı suyu örneklerini kullanmışlardır. Medrano vd. (2005), akciğer enfeksiyonu olmayan immun sağlıklı bireyden aldıkları ağız çalkantı suyu örneklerinin %20'sinde nested PCR ile *P.jirovecii* mtLSU-rRNA pozitifliği tespit etmişlerdir. Vargas vd. (2010), yetişkinlerde *P. jirovecii* kolonizasyonunun saptanmasında ağız çalkantı suyu kullandıklarında %12.8 oranını buldukları halde, ağız çalkantı suyu ile birlikte nazal sürüntü örneklerini de kullandıklarında bu oranın %21.5'a yükseldiğini bildirmekteyler. Çalışmamızda PCP açısından sağlıklı bireylerdeki *P. jirovecii* kolonizasyonunun araştırılması hedeflendiğinden, invaziv işlem gerektirmeksizin kolayca elde edilebilmesi nedeniyle ağız çalkantı suyu örnekleri tercih edildi. Ancak, bu örnekte mantar yükünün alt solunum yolu örneklerine göre daha düşük olacağı düşünüldüğünden

duyarlılığın arttırılması amacıyla nazal sürüntü örnekleri de eklendi. Hedef olarak çok kopyalı MSG geni ve yöntem olarak da real-time PCR kullanıldı.

Çalışmamızda PCP'ni düşündürecek herhangi bir akciğer enfeksiyonu bulgusu olmayan 250 katılımcı arasında real-time PCR yöntemi ile *P. jirovecii* pozitiflik oranı %22.8 bulundu. Bununla birlikte, immün sistemi baskılanmış hastalarda gözlenen *P.jirovecii* varlığının, immün sistemi sağlam kişilere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir (Krajicek vd., 2008; Lu J vd., 2008; Fan L vd., 2013). Çalışmamızda yer alan üç farklı katılımcı grubuna göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde bu oran sağlık çalışanı olmayan erişkin grubunda %21, sağlık çalışanı grubunda %22 ve immün düşkün erişkin grubunda %28 bulunmuştur. *P.jirovecii* kolonizasyonu açısından bu üç grup karşılaştırıldığında anlamlı istatistik farklılık saptanmamıştır (P= 0.61).

Ponce vd. (2010), hastalık ve hastalık dışı nedenlerle ölen immünsağlıklı bireylerin otopsileri sırasında alınan akciğer örneklerinde *P.jirovecii* genini araştırmışlar, nested PCR ve immunfloresan testlerle akciğerde *P.jirovecii* kolonizasyonunu %64.9 oranında saptamışlardır. Aynı çalışmada immüdüşkün olmayan ve hastalık nedeni ile ölenlerde kolonizasyon oranı (%78.9), hastalık dışı nedenlerle ölenlere göre (%61.8) anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Kan vericilerinden toplanan serum örneklerinin *P.jirovecii* kolonizasyonu açısından araştırıldığı bir çalışmada ise %8.8 oranında pozitiflik saptanmıştır (Chatterton vd., 1989). İspanya'da sağlıklı bireylerden alınan ağız çalkantı suyu örneklerinde nested PCR ile *P.jirovecii* kolonizasyonu %20 oranında bulunmuştur (Medrano vd., 2005). Fransa'da ise CD4+ T lenfosit düzeyleri ve akciğerleri normal bireylerden toplanan balgam örnekleri PCR ile çalışılmış ve *P. jirovecii* kolonizasyonu saptanmamıştır (Nevez vd., 2006). Bu çalışmalarda, kullanılan örnekler, araştırma yöntemleri ve coğrafi farklılıklar nedeni ile *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığı sağlıklı bireylerde farklılık göstermiştir. Çalışmamızda yüksek duyarlı ve özgül real-time PCR yöntemi kullanılarak, sağlıklı bireylerden alınan non invaziv örnekler ile diğer çalışmalara benzer *P.jirovecii* kolonizasyonu oranları elde ettik.

HIV pozitif 27 hasta ve kontrol grup olarak HIV negatif sağlıklı 27 personelden kan ve ağız çalkantı suyu örnekleri toplanmış, hedef olarak ITS gen bölgesi seçilmiş ve nested-PCR ile *P.jirovecii* HIV pozitif hastaların tamamında (%100) saptanırken, negatif kontrol grubunda *P.jirovecii* saptanmamıştır (Atzori vd., 1998). Tipirneni vd. (2009), hastane personeli arasında yapılan bir çalışmada, göğüs hastalıkları, yoğun bakım, HIV/AIDS hastalarının bakımının yapıldığı bölümlerde çalışan, HIV ile enfekte veya PCP'li hastalara klinik ve laboratuvar bakımı vermekte olan 126 personeli incelemişlerdir. Çalışanlar klinik grubu ve klinik dışı grubu olarak ayrılmıştır. Katılan personelde *P. jirovecii* major yüzey glikoprotein (MsgA, MsgB, MsgC1)

düzeyleri ELİSA yöntemi ile değerlendirilmiştir (MsgC, HIV enfekte hastalar arasında PCP olan ve olmayanları ayırt etmek için kullanılan temel antijenik belirteçtir). MsgA ya da MsgB düzeylerinde klinik ve klinik dışı grup arasında PCP'li hasta ile temas durumu olsun olmasın önemli farklılık saptanmamış ancak klinik çalışanlarında MsgC1 antikor düzeyleri klinik dışı çalışma grubuna göre önemli derecede yüksek saptanmıştır (Tipirneni vd., 2009). HIV/AIDS hastalarının bulunduğu kliniklerdeki sağlık çalışanlarının balgam veya nazal yıkama örneklerinde nested PCR ile *P. jirovecii* mt LSU rRNA geninin araştırıldığı başka bir çalışmada, kontrol olarak PCP hastalara maruz kalmayan, genel solunum polikliniğindeki sağlık çalışanları yer almıştır (Miller vd., 2001). PCP'li hastalara maruz kalan 10 sağlık personeli ve 1 poliklinik personelinde *P.jirovecii'nin* geni saptanmıştır. Aynı çalışmada genotiplendirme de yapılmış ve hastalarda bulunmayan bazı genotiplerin sağlık çalışanlarında bulunduğu gözlenmiş ve kolonizasyon üzerine maruziyet yanında başka faktörlerin de etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Miller vd., 2001). Sağlık personellerinin çalıştıkları bölümlere göre kolonizasyon sıklığının değerlendirildiği bir çalışmada; farklı bölümlerde çalışan 164 sağlık personelinden (hematoloji bölümü 90, pediatri yoğun bakım 39, göğüs hastalıkları 35) alınan ağız çalkantı suyu örnekleri nested-PCR ile değerlendirilmiş, hematoloji bölümünde %8, pediatri yoğun bakım ünitesinde %8 ve göğüs hastalıkları bölümünde %0 oranında *P.jirovecii* kolonizasyonu bulunmuştur (Durand vd. ,2003).

Öte yandan, *P.jirovecii'nin* PCP hasta odaları dışındaki alanlarda hastane havasında varlığını kanıtlayan bazı çalışmalar bulunmaktadır (Olsson vd.,1998). Bartlett vd. (1997), Indiana Üniversitesi (IU) ve Birmingham Alabama Üniversitesi (UAB)'den çeşitli alanlardan (PCP'li hasta odaları ve evlerinden, PCP hastası bulunmayan odalardan, HIV pozitif hasta bakımı odalarından ve hastane boş odalarından) hava örnekleri toplamışlar ve bu örneklerde *P.jirovecii* ITS genini PCR ile araştırmışlardır. PCP'li hasta odalarından toplanan 29 örneğin 16'sında *P.jirovecii* ITS geni saptanmıştır. PCP'li hastaların evlerinden toplanan 9 örneğin 2'sinde, PCP hastası bulunmayan odalardan toplanan 7 örneğin 2'sinde ve boş odalardan alınan 14 örneğin 4'ünde *P.jirovecii* ITS geni pozitif bulunmuştur. PCP'li hastaya direkt olarak maruz kalmayan veya kısa süreli maruz kalan immünsağlıklı hastane personelinin de *P.jirovecii* kolonizasyonu açısından risk altında olduğu bildirilmiştir (Olsson vd., 1998; Choukri vd., 2010). Çalışmamızda, sağlık çalışanlarından alınan ağız çalkantı suyu ve nazal sürüntü örneklerinde *P.jirovecii* kolonizasyonu %22 bulunmuştur. Pozitif saptanan 3 hemşire ve 2 doktor, örneklerin toplanmasından en az bir hafta önce PCP'li hastaya maruz kalmışlardır. Bu bulguları, sağlık personellerinin *P.jirovecii'nin* bulaşında ara konak rolü oynayabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, hastalarla hiç teması bulunmayan sekreterlerde de *P.jirovecii* kolonizasyonunun bulunması, *P.jirovecii'nin* hasta odaları dışına hava yolu yayılabileceğini ve kolonize

bireylerin duyarlı kişilere *P.jirovecii*'nin aktarılmasında rol oynayabileceğini gösterebilir.

İmmüdüşkün hastalarda *P.jirovecii* kolonizasyon sıklığı çalışma grubu, kullanılan yöntem ve örnek türüne göre farklı oranlarda saptanmıştır. Bu çalışmalar genellikle HIV pozitif hastalara odaklıdır. Ann vd. (2003), 16 HIV pozitif hastadan alınan 47 örnekte nested PCR yöntemi ile *P.jirovecii* DNA'sını %74 oranında saptamışlar ve PCP hastası olmayan ve daha sonra hastalık oluşmayan HIV pozitif hastalarda kolonizasyon süresini 0.5-16.5 ay arasında bulmuşlardır. PCP hastası olmayan ancak pnömoni nedeniyle hastanede yatmakta olan HIV pozitif hastalardan alınan indüklenmiş balgam veya BAL örneklerinde PCR yöntemi ile *P.jirovecii* kolonizasyon sıklığı %69 bulunmuştur (Huang vd., 2003). HIV enfekte hastaların PCP nedeni ile olmayan ölümlerinden sonra yapılan otopsilerde *P.jirovecii* kolonizasyonu %46 oranında bulunmuştur (Morris vd., 2004). Solunum yolu enfeksiyonu olan HIV pozitif 20 gencin ağız çalkantı suyu örneklerinde PCR yöntemi ile %20 oranında *P.jirovecii* saptanmıştır (Gutierrez vd., 2011). Bununla birlikte, tek başına HIV pozitifliğinin değil, CD4+ T hücre düzeylerinin de kolonizasyonla ilişkili olabileceği düşünülmüştür; Leigh vd. (1993), CD4+T hücre düzeyleri 400/ $\mu$ l'den fazla olan HIV hastalarında *P.jirovecii* kolonizasyon sıklığını %10 bulmuşken, CD4+ T hücre düzeyleri 60/ $\mu$ l ve altına düştüğünde kolonizasyon oranının %40'a kadar yükseldiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda HIV pozitif katılımcı bulunmamakla birlikte, altta yatan diğer hastalıkların da *P.jirovecii* kolonizasyonunu etkileyebileceğini düşündük. HIV negatif 82 immüdüşkün hastadan alınan BAL örnekleri *P.jirovecii* varlığı yönünden PCR, Giemsa ve immunofloresan boyama yöntemleriyle araştırılmıştır (Nevez vd., 1999a). Multiple myelom, sarkoidoz, kronik lenfoid lösemi ve diyabet hastalarından örnekler alınmış, toplam 69 hasta hem PCR hem de kullanılan boya ile negatif bulunmuştur. *P.jirovecii* kolonizasyonu PCR ile örneklerin %16'sında saptanmıştır. Çalışmada CD4+ T hücre düzeyi düşük HIV negatif immüdüşkün hastalar ile *P.jirovecii* kolonizasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Nevez vd. (1999b) HIV pozitif ve HIV negatif immün düşkün hastalardaki *P.jirovecii* kolonizasyon prevalansını sırasıyla %11.4 ve %15.9 bulmuş ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptamamışlardır ( $P=0.59$ ). Benzer başka bir çalışmada da Takahashi vd. (2002) HIV pozitif ve HIV negatif immüdüşkün hastalardan alınan BAL örneklerinde *P.jirovecii* 5S rDNA genini araştırmışlardır. Bu çalışmada ise *P.jirovecii* kolonizasyonu HIV pozitif hastalarda %26.9, HIV negatif immüdüşkün hastalarda %8.9 oranında saptanmıştır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P=0.048$ ). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada da akciğer kanseri bulunan 47 hastadan alınan ağız çalkantı suyu örneklerinde *P.jirovecii* kolonizasyonu

saptanmamıştır (Togashi vd., 2013). Primer solunum bozuklukları nedeniyle bronkoskopi yapılan toplam 93 HIV negatif hastanın BAL örneklerinin %18'inde PCR ile *P.jirovecii* DNA'sı saptandığı bildirilmektedir (Maskell vd., 2003). İnterstisyel akciğer hastalığı bulunan üç farklı grup hastadan alınan toplam 90 BAL örneğinde *P.jirovecii* kolonizasyon prevalansı nested PCR yöntemi ile %33.8 oranında tespit edilmiştir. Aynı çalışmada geleneksel mikroskopik ve immunofloresan yöntemlere *P.jirovecii* kolonizasyonu %8.8 bulunmuştur (Vidal vd., 2006). Böbrek nakli olan 70 hastadan alınan indüklenmiş balgam örneklerinde *P.jirovecii* kolonizasyonu %18.6 oranında saptanmıştır (Fritzche vd., 2013). Bu çalışmalardan anlaşıldığı üzere, *P. jirovecii* kolonizasyonu için en önemli predispozan durum HIV pozitifliği olmakla birlikte, immün sistemin baskılandığı diğer hastalık/durumlarda da kolonizasyonun daha sıklıkla gözleendiği ortaya konmuştur. Çalışmamızda invaziv olmayan örneklerde, hematoloji hastalarından oluşan immün sistemi baskılanmış 50 olgunun ağız çalkantı suyu ve nazal sürüntü örneklerinde *P.jirovecii* pozitifliği %28 oranında saptanmıştır. Kolonizasyonun en fazla gözleendiği hastalık grubunu ise lenfoma ve lösemi oluşturmaktaydı. Hematoloji hastalarından herhangi bir akciğer enfeksiyonu belirti/bulgusu olanlardan örnek alınmamıştır. Antibiyotik kullanımı olan hastalarda verilen tedavi non-spesifik olup PCP ile ilişkili değildi. Bu nedenle saptanan pozitiflikler kolonizasyon lehine yorumlanmıştır. Çalışmamızda Nevez vd. (1999) çalışmasına göre *P.jirovecii* kolonizasyon sıklığı daha yüksek bulunmuş olmakla birlikte, bizim çalışmamızdaki immüdüskün grubu sadece hematoloji hastaları oluşturmakta iken, bahsedilen çalışmada hematoloji dışındaki kronik hastalık grupları da yer almaktaydı. Ayrıca coğrafik özellikler ve çalışmada kullanılan yöntemler gibi başka faktörler de kolonizasyon oranlarındaki farklılıkların nedeni olabilir.

Literatürde *P.jirovecii* kolonizasyonu artan yaş ile ilişkilendirilmiş olup; yaşlılardaki kolonizasyonun azalmış T hücre immün yanıtına bağlı gelişen immünsüpresyondan kaynaklandığı bildirilmiştir (Helweg-larsen vd., 2002; Effros vd., 2008). Vargas vd. (2001), ciddi solunum yolu enfeksiyonu olmayan, 1 ay - 2 yaş arasındaki 107 sağlıklı bebekten alınan nazofarenks aspiratlarının %32'sinde *P.jirovecii* DNA'sının varlığını PCR yöntemi ile göstermişlerdir. İspanya'da 6, 10 ve 13 yaş grubundaki toplam 233 sağlıklı çocukta *P.jirovecii* seroprevalansı immunoblot yöntemiyle araştırılmış ve %73 oranında pozitiflik saptanmıştır (Respaldiza vd., 2004). Ayrıca, *P.jirovecii* seroprevalansının artan yaşla birlikte yükseldiği, 6 yaş grubu çocuklarda %52, 10 yaş grubu çocuklarda %66 ve 13 yaş grubu çocuklarda %80 saptandığı bildirilmiştir. Ponce vd. (2010), hastalık ve hastalık dışı nedenlerle ölenlerin otopsilerinde, en yüksek *P.jirovecii* kolonizasyon oranlarını <20 ve >60 yaş gruplarında saptamışlardır. Vargaz vd. (2010), 69-95 yaş arasındaki 110 immün sağlıklı erişkinden alınan ağız çalkantı suyu ve nazal sürüntü örneklerinden *P.jirovecii* kolonizasyonunu araştırmışlar; <80

yaş bireylerde *P.jirovecii* kolonizasyon prevalansını ağız çalkantı suyu örneklerinde %13.8, nazal sürüntü örneklerinde ise %14.6; ≥80 yaş bireylerde *P.jirovecii* kolonizasyon oranını ağız çalkantı suyunda %10.8, nazal sürüntü örneklerinde ise %4 bulmuşlardır. Fritzsche vd. (2013) 24-76 yaş arasındaki böbrek nakli hastalardan alınan indüklenmiş balgam örneklerinde *P.jirovecii* kolonizasyonunu %18.6 oranında; Özkoç vd. (2014) 41-70 yaş arasındaki akciğer hastalığı olan kişilerden alınan BAL örneklerinde *P.jirovecii* kolonizasyonunu %70 oranında; Fritzsche vd. (2012) otoimmün enflamatuvar hastalığı olan 19-85 yaş grubunda *P.jirovecii* kolonizasyonunu %41.5 oranında bildirmişlerdir. Çalışmamızda, 30-49 yaş arasındaki sağlık çalışanları, sağlık çalışanı olmayan gönüllü erişkinler ve hematoloji hastalarının *P.jirovecii* kolonizasyon oranları sırasıyla %15.4, %26.3 ve %20 bulundu. Çalışmamızda bu yaş grubu için elde ettiğimiz sonuçlar, özellikle immün sağlıklı bireylerde, literatürdeki çalışmalara benzerdi. Ancak 30-49 yaş arasındaki immüdüşkün hasta grubunda *P.jirovecii* kolonizasyonu, immüdüşkün hastaların yer aldığı diğer çalışmalara göre uyumlu saptanmıştır. Sonuç olarak, kolonizasyon ile yaş arasındaki ilişki tam olarak kanıtlanamamış ve çalışmamızda da, *P. jirovecii* kolonizasyonu ile katılımcıların yaşları arasında herhangi bir anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Cinsiyet ile *P. jirovecii* kolonizasyonu arasında belirgin bir ilişki gösterilememiştir. Respaliza vd. (2004) erkek ve kız çocuklarda *P.jirovecii* seroprevalansını sırasıyla %70.4 ve %75 bildirmektedirler ( $P=0.47$ ). Hasta bakımı yapan ve yapmayan sağlık personellerinde *P.jirovecii* kolonizasyon oranı erkeklerde %42.9, kadınlarda %57.1 ve hasta bakımı yapmayanlarda erkeklerde %44.7, kadınlarda %55.7 bulunmuştur ( $P=0.39$ ) (Tipirneni vd., 2009). Mekinian vd. (2011) sistemik otoimmün hastalığı bulunan erkeklerde *P.jirovecii* kolonizasyonunu %33.3, kadınlarda ise %8.7 bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olmakla birlikte, farkın erkeklerde kadınlara göre lenfosit düzeylerinin daha düşük ve kortikosteroid tedavi dozunun daha yüksek olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu açıdan çalışmamızın sonuçları literatürle uyumludur ve *P.jirovecii* kolonizasyonu açısından cinsiyetin önemli bir risk faktörü olmadığı düşünülmüştür.

Kortikosteroid kullanımı en önemli risk faktörleri arasında gösterilmekle birlikte, yeni nesil immünomodülatör ilaçların kullanıma girmesiyle, özellikle hematolojik malignitelere, organ nakli alıcılarında, inflamatuvar bağ dokusu hastalıklarında yüksek *P. jirovecii* pozitiflikleri bildirilmiştir (Maskell vd., 2003; Tasaka vd., 2012; Obeid vd., 2012; Helweg-Larsen vd., 2002). Primer solunum bozukluğu nedeniyle bronkoskopi yapılan hastalardan alınan BAL örneklerinde *P. jirovecii* kolonizasyon oranı %18 iken, prednizolon kullananlarda bu oran %47 bildirilmiştir (Maskell vd., 2003). İmmunosüpresif tedavi uygulanmakta olan otoimmün enflamatuvar hastalıklı 18 yaş ve üstü

102 hastadan toplanan indüklenmiş balgam örneklerinde *P.jirovecii* kolonizasyon oranı %28.5 bulunmuş, ayrıca kolonizasyonu pozitif immünsüpresif ilaç kullanan ve kullanmayan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Fritzsche vd., 2012). Akciğer kanseri bulunan ve 7'si immünsüpresif ilaç kullanmakta olan 47 hastada *P.jirovecii* kolonizasyonu saptanmamıştır (Togashi vd., 2012). Böbrek transplant alıcısı 70 hasta arasında immünsüpresif ilaç kullanımı olan 13 hastada kolonizasyon pozitifliği saptanmıştır (Fritzsche vd., 2013). Bu hastalardan 9'u ikili, ve 4'ü immünsüpresif ilaç kullanmaktaydı ve tek ilaç kullanılan hastalarda *P.jirovecii* kolonizasyonu saptanmamıştır. Ancak, kolonizasyon açısından bu fark anlamlı bulunmamıştır. Bizim çalışma gruplarımızda HIV pozitif katılımcı bulunmamaktaydı. Ancak steroid ve kemoterapotik kullanımı nedeniyle immüdüşkün hematoloji hastaları mevcuttu. İmmünsüpresif ilaç kullanan 7 sağlık çalışanından 3'ünde kolonizasyon saptanırken, immünsüpresif ilaç kullanan 5 sağlık çalışanı olmayan erişkinden sadece birinde kolonizasyon gözlemlendi. İmmüdüşkün grupta ise kemoterapi uygulanan hematoloji hastalarında *P.jirovecii* kolonizasyonu %28.9 oranında saptandı. Çalışmamızda, tek veya kombine immünsüpresif ilaç kullanımı ile *P.jirovecii* pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ayrıca, Fritzsche vd. (2013)'nin sonuçlarının aksine, çalışmamızda tek ilaçla kemoterapi uygulanan immüdüşkün hastalarda *P.jirovecii* kolonizasyonu %22.5 oranında saptanmış ve kombine kemoterapi uygulanan grupta *P.jirovecii* kolonizasyonu daha düşük oranda bulunmuştur.

Primer pulmoner hastalığı olan immünsağlıklı bireylerin *P.jirovecii* açısından asemptomatik taşıyıcı olduğu fark edildiğinde, bunun sebebi olarak akciğerde var olan doku hasarı düşünülmüştür. Solunum bozukluğu ve kronik hastalığı olan immünsağlıklı bireylerde *P. jirovecii* kolonizasyon oranı %7-19 bildirilmektedir (Sing vd., 1999; Nevez vd., 1999; Sing vd., 2001). Çalışmamızda kronik akciğer hastalığı olan 6 sağlık personelinden 1'inde, 11 sağlıklı erişkinin 2'sinde kolonizasyon olduğu bulunmuştur. Öte yandan, son üç ayda geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu hikayesi bulunan 67 sağlık çalışanı ve 53 sağlık çalışan olmayan erişkin bireyin sırasıyla %20.9'u ve %20.8'i *P.jirovecii* kolonizasyonu açısından pozitif saptandı. Literatürde, immün sağlıklı bireylerde yakın zamanda geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu ile *P.jirovecii* kolonizasyonunu değerlendiren az sayıda çalışmaya rastlanmıştır ve bu çalışmalar bebeklik yaş grubunu kapsamaktadır. Geçirilmiş üst solunum enfeksiyonunun bebeklerde *P.jirovecii* kolonizasyonu için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Morris vd., 2012). *P.jirovecii* kolonizasyonu sıklığının üst solunum yolu enfeksiyonu olan bebeklerde, alt solunum yolu enfeksiyonu olan bebeklere göre iki kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Larsen vd., 2007). Bilgilerimize göre, erişkinlerdeki üst solunum yolu enfeksiyonu ile *P.jirovecii* kolonizasyon sıklığını karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda son üç ay içinde geçirilmiş solunum



yolu enfeksiyonu hikayesi bulunan sağlık alışanlarında ve sağlık çalışanı olmayan erişkin bireylerde *P.jirovecii* kolonizasyon oranı %21 saptanmıştır. Kolonizasyon pozitif saptanan 6 sağlık personelinde (3 doktor, 2 hemşire, 1 memur) hastanede çalışmalarının dışında etkili olabilecek herhangi bir faktör saptanamadı. *P.jirovecii* kolonizasyonu pozitif saptanan 4 sağlıklı erişkinde de üst solunum yolu enfeksiyonu dışında başka bir risk faktörü bulunamadı. Muhtemelen, üst solunum yolu enfeksiyonunun çocuklarda olduğu gibi erişkinlerde de kolonizasyon için bir risk faktörü olabileceği sonucuna varıldı.

Sigara kullanımı akciğer ortamını değiştirerek ve mukosiliyer aktiviteyi bozarak siliyer klirensi azaltabilir ve bu durum bireyleri *Pneumocystis* kolonizasyonuna daha duyarlı hale getirebilir. Beck vd. (2009), çok değişkenli bir analizde sigara kullanımının *P.jirovecii* kolonizasyonu için bağımsız bir risk faktörü olduğunu bildirmektedirler. Sigara kullanan kişilerin *P.jirovecii* kolonizasyonu %19 iken, sigara kullanmayan kişilerde %5 oranında saptanmıştır (Beck vd., 2009). *P.jirovecii* kolonizasyonu %20 oranında bildirilen sağlık personeli grubunda, kolonize hastaların %70'inde sigara kullanımı öyküsü bildirilmektedir (Medrano vd., 2005). HIV pozitif hastalar arasında da sigara içen grupta kolonizasyon sıklığı içmeyenlere oranla daha yüksek bulunmuştur; sırasıyla %37.8 ve %17.5 (Morris vd., 2004). Çalışmamızda sigara kullanan sağlık personeli ve sağlıklı erişkin bireylerde sigara kullanmayanlara göre *P.jirovecii* kolonizasyonu daha düşük bulmuş ve önceki çalışmaların aksine, sigara ile *P. jirovecii* kolonizasyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. İmmüdüşkün bireylerin yer aldığı grupta sigara kullanımı ile kolonizasyon arasında anlamlı bir ilişki varlığı görünmekle birlikte, bu grupta sigara kullanım oranı son derece düşüktü. Sigara kullanımının kolonizasyon üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi için, kullanım süresi, miktarı gibi bilgilerin de yer aldığı daha kapsamlı çalışmaların gerektiğini düşünmekteyiz.

Alkol, bağışıklık sistemini baskılayan bir faktördür. Aşırı alkol tüketimi, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin akciğerlerde toplanmasını engelleyerek *P. jirovecii* enfeksiyonuna zemin hazırlar (Shellito, 1998). Çalışmamızda, alkol tüketimi olan sağlık çalışanlarının 4'ünde *P.jirovecii* kolonizasyonu saptadık. Bununla birlikte *P.jirovecii* kolonizasyonu ile alkol kullanımı arasında anlamlı istatistiksel ilişki bulamadık. Alkolün diğer immünsüpresif ilaçlar gibi kolonizasyon sıklığını arttıracadığı kanısındayız, ancak çalışma gruplarımızın tümünde alkol tüketimi bildiren birey sayısı oldukça azdı. Bu nedenle alkol kullanımı ile *P.jirovecii* kolonizasyonu arasındaki ilişki değerlendirilemedi. Ayrıca literatürde de, *P.jirovecii* kolonizasyonu için alkolün bir risk faktörü olup olmadığına dair herhangi bir çalışmaya rastlanmadı.

Antibakteriyel profilaksi immüdüşkün hastalarda yaygın olarak uygulanmaktadır. İmmünsüpresif ilaç tedavisi sırasında enfeksiyon riskine

maruz kalan hematolojik hastalar için antibiyotik kullanılması önerilmektedir (Neumann vd., 2013). Ancak, yaygın antibiyotik kullanımı durumunda dirençli mikroorganizmalara bağlı enfeksiyon sıklığında artış bildirilmiştir (Respaldiza vd., 2005). Gafter vd. (2005) immünsüpresif ilaç tedavisine başlamadan önce anti-*Pneumocystis* profilaksi uygulanmasını tavsiye etmiştir. Klinik olarak *P. jirovecii* pnömonisi olmayan ve antibiyotik kullanmakta olan hematolojik maligniteli çocukların %19'unun *P.jirovecii* ile kolonize olduğu bulunmuştur (Wissmann vd., 2008). Azitromisin tedavisi almakta olan 24 kistik fibrozlu hastada %20.8 oranında *P.jirovecii* saptanmıştır (Respaldiza vd., 2005). Çalışmamızda antibiyotik kullanmakta olan sağlık çalışanlarının %26'sı, sağlık çalışanı olmayan erişkinlerin %19'u, immüdüskün bireylerin %41'i *P.jirovecii* ile kolonize bulundu. Antibiyotik kullanmakta olan hastane personeli ve sağlıklı erişkinlerde *P.jirovecii* kolonizasyonu saptanması, hem hastane hem de toplumda ilaca dirençli *P.jirovecii* kökenlerinin ortaya çıkma riskini gündeme getirebilir. PCP-AIDS hastalarında *P. jirovecii*'nin kotrimoksazol direnci %33 oranında saptanmıştır (Calderon vd., 2004).

Çalışmamızda *P. jirovecii* kolonizasyonu ile hastanede kalma süresi arasında ilişki saptanmadı. Literatürde direkt olarak hastanede yatış süresi veya hastalık süresi ile *P.jirovecii* kolonizasyonunu değerlendiren bir çalışmaya rastlamadık. Ancak çalışmamızda hastalık süresi ile *P.jirovecii* kolonizasyonu istatistiksel olarak ilişkili bulundu. Bu ilişki, hematolojik hastalıklar nedeni ile immüdüskün olan hastalarda, hastalık süresi uzadıkça daha fazla hastanede yatış, PCP'li hastalarla daha sık temas, tekrarlayan immünsüpresif tedavi rejimleri ve profilaktik antibiyotik kullanımları, uzun ve tekrarlayan immüdüskünlük periyotları gibi kolonizasyon riskini artırabileceği düşünülen olaylarla açıklanabilir. Bu nedenle hematoloji hastalarında hastalık süresi uzadıkça PCP enfeksiyonu riskinin de artabileceği, yeni tanı alan hastalara göre, hematolojik hastalık hikayesi eski olanlarda PCP enfeksiyonlarının daha sık ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

Önceki çalışmalarda, kolonizasyonun saptanmasında DFA testi duyarlılığının düşük olduğu bildirildiğinden, çalışmamızda DFA testi sadece real-time PCR pozitif saptanan örneklerle uygulanarak bu testin kolonizasyonu saptamadaki duyarlılığı değerlendirildi. Buna göre, DFA testi *P. jirovecii* kolonizasyon oranı sağlık personellerinde %15, sağlıklı erişkinlerde %13 ve immüdüskün bireylerde %16 bulunmuştur. Bu nedenle *P. jirovecii* kolonizasyonunun araştırılmasında DFA yönteminin, özellikle mikroorganizma yükünün düşük olduğu non invaziv örneklerin incelenmesinde, uygun olmadığını düşünmekteyiz. Ayrıca real-time PCR objektif bir testtir, örnekte aranan hedef bölge varlığında pozitif sonuç elde edilmektedir. Oysa DFA testi nispeten subjektiftir ve testin doğruluğu değerlendiricinin bilgi, deneyim ve tecrübesi ile direkt ilişkilidir.

## 6. SONUÇ

*P. jirovecii*, başta HIV pozitif hastalar olmak üzere, immüdüskün hastalarda interstisiyel pnömoniye neden olan bir mantardır. Kesin olmamakla birlikte, kaynağın enfekte hastalar ya da kolonize bireyler olduğu ve bulaşın da bu kişilerden solunum yoluyla gerçekleştiğine dair veriler bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerde kolonizasyonun erken yaşlarda gerçekleştiği ve kolonize bireylerin duyarlı konaklar için kaynak rolü oynadıkları düşünülmektedir. Bu çalışmada, toplumumuzdaki *P. jirovecii* kolonizasyonu sıklığının değerlendirilmesi ve kolonizasyon üzerine etkili olabilecek faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

1-Çalışmamızda toplam 250 gönüllü katılımcı yer almış ve real-time PCR yöntemi ile *P. jirovecii* kolonizasyon oranı %22.8 bulunmuştur (sağlık çalışanlarında %22, sağlık çalışanı olmayan erişkinlerde %21 ve immüdüskün bireylerde %28). Kolonizasyon oranı immüdüskün bireylerde daha yüksek saptanmış olmakla birlikte, istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

2- *P. jirovecii* kolonizasyonu ile yaş, cinsiyet, kronik hastalık varlığı, geçirilmiş solunum yolu enfeksiyonu, immünsüpresif ya da antibiyotik ilaç kullanımı, sağlık çalışanlarının mesleği, çalışma süresi ve çalıştıkları bölüm arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

3- Sigara ve/veya alkol tüketimi ile *P. jirovecii* kolonizasyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ancak çalışma gruplarımızda sigara ve özellikle alkol tüketimi bildiren katılımcı sayısı, sonuçların genellenebilmesi için yeterli değildi.

4-İmmüdüskün bireylerin yer aldığı grupta, lenfoma ve lösemili hastalarda kolonizasyon sıklığı diğer hastalık gruplarına göre daha yüksekti. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

5-İmmüdüskün bireylerin yer aldığı grupta hastalık süresi ile *P. jirovecii* kolonizasyonu arasında anlamlı bir ilişki saptandı. Bu nedenle hematoloji hastalarında hastalık süresi uzadıkça PCP enfeksiyonu riskinin de artabileceği, yeni tanı alan hastalara göre, hematolojik hastalık hikayesi eski olanlarda PCP enfeksiyonlarının daha sık ortaya çıkabileceği düşünüldü.

6- Kolonizasyonun saptanmasında real-time PCR testi direkt immunofloresan antikor testine göre daha başarılı bulundu. *P. jirovecii* kolonizasyonunun araştırılmasında DFA yönteminin, özellikle mikroorganizma

yükünün düşük olduğu non invaziv örneklerin incelenmesinde, uygun olmadığı düşünöldü.

7-Çalışmamızda, başta immüdüşkün bireyler olmak üzere, belirgin oranda *P. jirovecii* kolonizasyonu saptanmıştır. *P. jirovecii* özellikle immüdüşkün bireylerde ciddi akciğer enfeksiyonlarına neden olabildiğinden, immüdüşkün bireylere trimetoprim-sülfametoksazol profilaksisi uygulanmasının ve bulaşın/yayılimın engellenebilmesi için hastane enfeksiyonu kontrol kurallarına titizlikle uyulmasının önemi üzerinde durulmalıdır.

8-Bu çalışma, sınırlı bir bölgeyi kapsamakla birlikte, ölkemizde *P. jirovecii* kolonizasyonunun varlığını ve yaygınlığını ortaya çıkarmıştır. Bilgilerimize göre çalışmamız, *Pneumocystis jirovecii* enfeksiyonu olmayan bireylerde kolonizasyon prevalansını belirlemeye yönelik ölkemizde yapılan ilk çalışmadır. Ancak, ölkemizdeki genel durumun yansıtılabilmesi için, farklı bölgelerden, daha fazla sayıda katılımcının dahil edileceğı, kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## Kaynaklar

- 1- Alanio, A., Desoubeaux, G., Sarfati, C., Hamane, S., Bergeron, A., Azoulay, E., Molina, J., Derouin, F. & Menotti J. (2011). Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect Dis. 17(10):1531-37. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03400.x.
- 2- Aliouat-Denis, C., Martinez, A., Aliouat, M., Pottier, M., Gantois, N. & Dei-Cas, E. (2009). The *Pneumocystis* life cycle. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104(3):419-26.
- 3- Almeida, J., Cissé, O., Fonseca, A., Pagni, M. & Hauser, P. (2015). Comparative Genomics Suggests Primary Homothallism of *Pneumocystis* Species. mbio. asm. org. 6 (1) e02250-14. Doi:10.1128/mBio. 02250-14
- 4- Arcenas, R., Uhl, J., Buckwalter, S., Limper, A., Crino, D., Robert, G. & Wengenack, N. (2006). A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. Diagn Microbiol Infect Dis. 54(3):169-75.
- 5- Atzori, C., Agostoni, F., Angeli, E., Mainini, A., Orlando, G. & Cargnel, A. (1998). Combined use of blood and oropharyngeal samples for noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia using polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 17(4):241-6.
- 6- Aviles, P., Aliouat, E., Martinez, A., Dei-Cas, E., Herreros, E., Dujardin, L. & Gargallo-Viola, D. (2000). In Vitro Pharmacodynamic Parameters of Sordarin Derivatives in Comparison with Those of Marketed Compounds against *Pneumocystis carinii* Isolated from Rats. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44(5):1284-90.
- 7- Balows, A., Huasler, W., Ohashi, J. (1988). *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice* (vol. 1, p.965). Springer-Verlag New York Inc., USA.

Devam Ediyor

- 8- Bartlett, J.& Hulette, C. (1997). Central Nervous System Pneumocystosis in a Patient with AIDS. *CID*. 25 (1): 82-4.
- 9- Bartlett, M., Vermund, S., Jacobs, R., Durant, P., Shaw, M., Smith, J., Tang, X. , Lu, J., Li, B., Jin, S., , & Lee, C. (1997). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *J Clin Microbiol*. 35 (10): 2511-3.
- 10- Beck, J.& Cushion, M. (2009).*Pneumocystis* Workshop:10th Anniversary Summary. American Society for Microbiology. 8 (4):446–60.
- 11- Bishop, L.,& Kovacs, J. (2003). Quantitation of Anti-*Pneumocystis jirovecii* Antibodies in Healthy Persons and Immunocompromised Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 187:1844–8.
- 12- Blanco, J.& Garcia, M. (2008). Immune response to fungal infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 125 (1-2):47–70.  
doi: 10.1016/j.vetimm.2008.04.020.
- 13- Bondoc, A. & White, D. (2002).Granulomatous *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with malignancy. *Thorax*, 57, 435–37.  
doi:10.1136/thorax.57.5.435.
- 14- Bottone, E. (2006). *Atlas of the Clinical Microbiology of Infectious Diseases: Viral, Fungal and Parasitic Agents* (vol.2. Chapter 8). New York, NY : Parthenon Pub. Group.
- 15- Calderón, E. (2009). Epidemiology of *Pneumocystis* infection in Human. *Journal of medical mycology*, 19, 270–75.  
doi:10.1016/j.mycmed.2009.08.001.
- 16- Calderón, E., Horra, C., Medrano, F., López-Suárez, A., Montes-Cano, M., Respaldiza, N., Elvira-González, J., Martín-Juan, J., Bascuñana, A. & Varela, J. (2004). *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 23(7):545–49.

Devam Ediyor

- 17- Calderon, E., Varela, J. Durand, I. & Eduardo, D. (2011). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Nova science publishers (Chapter 1), 1-36.
- 18- Carmona, E. & Limper, A. (2011). Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *The Adv Respir Dis*, 5, 41-59
- 19- CDC. (1996). *Pneumocystis* Pneumonia—Los Angeles. *MMWR*, 45, 730-56.
- 20- Chatterton, J., Joss, A., Williams, H. & Ho-Yen, D. (1989). *Pneumocystis carinii* antibody testing. *J Clin Pathol*. 42(8): 865-68.
- 21- Chinnappan, J., Lakshmi, P. & Veeran, M. (2011). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Asian J. Exp. Biol. SCI*. 2 (2): 171-76.
- 22- Choukri, F., Menotti, J., Sarfati, C., Lucet, J., Nevez, G., Garin, Y., Derouin, F. & Totet, A. (2010). Quantification and Spread of *Pneumocystis jirovecii* in the Surrounding Air of Patients with Pneumocystis Pneumonia. *CID*. 51 (3): 259-65.
- 23- Chumpitazi, B., Flori, P., Kern, J., Brenier-Pinchart, M., Hincky-Vitrat, V., Brion, J., Thiebaut-Bertrand, A., Minet, C., Maubon, D., Pelloux, H. (2011). Characteristics and Clinical Relevance of the Quantitative Touch-down Major Surface Glycoprotein Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Pneumocystis pneumonia. *Med. Mycol*. 49 (7): 704-13. Doi: 10.3109/13693786.2011.566894
- 24- Cregan, P., Yamamoto, A., Lum, A., VanDerHeide, T., MacDonald, M. & Pulliam, L. (1990). Comparison of Four Methods for Rapid Detection of *Pneumocystis carinii* in Respiratory Specimens. *Journal OF Clinical Microbiology*. 28(11): 2432-36.
- 25- Cruciani, M., Marcati, P., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, G. & Mengoli, C. (2002). Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. *Eur Respir J*. 20(4): 982-89.

Devam Ediyor

- 26- Cushion, M. (2004). Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov. a new species in rats. *Mycologia*, 96 (3), 42.
- 27- Cushion M., Smulian A., Slaven, B., Sesterhenn, T., Arnold, J., Staben, C., Porollo, A., Adamczak, R. & Meller, J. (2007). Transcriptome of *Pneumocystis carinii* during Fulminate Infection: Carbohydrate Metabolism and the Concept of a Compatible Parasite. *PLoS ONE*. 2(5):e423.
- 28- Dahlin, J., Kottom, T., Han, J., Zhou, H., Walters, M., Zhang, Z. & Limper, A. (2014). *Pneumocystis jirovecii* Rtt109, a Novel Drug Target for *Pneumocystis* Pneumonia in Immunosuppressed Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58 (7):3650-59. Doi: 10.1128/AAC.02637-14
- 29- Daly, K., Fichtenbaum, C., Tanaka, R., Linke, M., Bert, R., Thullen T., Hui, M., Smulian, A. & Walzer, P. (2002). Serologic Responses to Epitopes of the Major Surface Glycoprotein of *Pneumocystis jirovecii* Differ in Human Immunodeficiency Virus-Infected and Uninfected Persons. *JID*. 186 (5):644-51.
- 30- Daly, K., Huang, L., Morris, A., Koch, J., Crothers, K., Levin, L., Eiser, S., Satwah, S., Zucchi, P. & Walzer, P. (2006). Antibody Response to *Pneumocystis jirovecii* Major Surface Glycoprotein. *Emerging Infectious Diseases*. 12 (8):1231-37.
- 31- Daly K, Koch J., Respaldiza, N., Horra, C., Montes-Cano, M., Medrano, F., Varela, J., Calderon, E. & Walzer, P. (2009). Geographical variation in serological responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein antigens. *Clin Microbiol Infect*. 15 (10):937-42.
- 32- DEI-CAS, E. (2000). *Pneumocystis* infections: the iceberg?. *Journal of Medical Mycology*. 38 (1):23-32.
- 33- Delanoe, P., Delanoe, M. (1912). Sur les rapports des kystes de Carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisii* presenter par M. Laveran. Note de Delanoe and Delanoe CR Acad SG (Paris), 155, 658-60.

Devam Ediyor



- 34- DeLorenzo, L., Huang, C., Maguire, G. & Stone, D. (1987). Roentgenographic patterns of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 104 patients with AIDS. CHEST. 91(3):323-27.
- 35- Desmet, S., Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbeken, E., Munter, P., Meersseman, W., Meensel, B., Eldere, J., & Lagrou, K. (2009). Serum (1-3)- $\beta$ -D-Glucan as a Tool for Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection or Hematological Malignancy. Journal of Clinical Microbiology. 47(12):3871-74.
- 36- Djawe, K., Daly, K., Levin, L., Zar, H. & Walzer, P. (2013). Humoral Immune Responses to *Pneumocystis jirovecii* Antigens in HIV-Infected and Uninfected Young Children with *Pneumocystis* Pneumonia. PLOS ONE. 8 (12):1-7.
- 37- Djawe, K., Huang, L., Daly, K., Levin, L., Koch, J., Schwartzman, A., Fong, S., Roth, B., Subramanian, A., Grieco, K., Jarlsberg, L. & Walzer, P. (2010). Serum Antibody Levels to the *Pneumocystis jirovecii* Major Surface Glycoprotein in the Diagnosis of *P.jirovecii* Pneumonia in HIV+ Patients. PLOS ONE. 5 (12):e14259.
- 38- Durand, J., Soula, F., Chabé, M., Dalle, J., Lafitte, J., Senechal, M., Pinon, A., Camus, D. & Dei-Cas E. (2003). Long-Term Colonization with *Pneumocystis jirovecii* in Hospital Staffs: A Challenge to Prevent Nosocomial Pneumocystosis. J. Eukaryot. Microbiol, 50 ,614-15.
- 39- Effros, R., Fletcher, C., Gebo, K., Halter, J., Hazzard, W., Horne, F., Huebner, R., Janoff, E., Justice, A., Kuritzkes, D., Nayfield, S., Plaeger S., Schmader, K., Ashworth, J., Campanelli, C., Clayton, C., Rada, B., Woolard N. & High K. (2008). Workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. Clin Infect Dis. 47 (4):542-53.
- 40- Enomoto, T., Azuma, A., Kohno, A., Kaneko, K., Saito, H., Kametaka, M., Usuki, J., Gemma, A., Kudoh, S. & Nakamura, S. (2010). Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromized patients with and without HIV infection. Respirology. 15 (1):126-31.

Devam Ediyor

- 41- Fan, L., Lu, H., Cheng, K., Li, H.& Xu, J. ( 2013). Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. *PLoS One*. 8(9):73099.
- 42- Fidel, P. & Huffnagle, G. (2005). *Fungal Immunology: From an Organ Perspective*. (Eds). (Chapt.13, 267-281). Springer,USA .
- 43- Fischer, S., Gill, V., Kovacs, J., Miele, P., Keary, J., Silcott, V., Huang, S., Borio, L., Stock, F., Fahle, G., Brown, D., Hahn, B., Townley, E., Lucey ,D.& Masur H. (2001). The Use of Oral Washes to Diagnose *Pneumocystis carinii* Pneumonia: A Blinded Prospective Study Using a Polymerase Chain Reaction–Based Detection System. *The Journal of Infectious Diseases*. 184 (11):1485–8.
- 44- Fong, S., Daly, K., Tipirneni, R., Jarlsberg, L., Djawe, K., Koch, J ., Swartzman, Al., Roth, B., Walzer, P.& Laurence, H. (2013). Antibody Responses against *Pneumocystis jirovecii* in Health Care Workers Over Time. *Emerging Infectious Diseases*. 19(10):1612-19.
- 45- Fritzsche, C., Riebold, D., Fuehrer, A., Mitzner, A., Klammt, S., Mueller-Hilke, B.& Reisinger, E. (2013). *Pneumocystis jirovecii* colonization among renal transplant recipients. *Nephrology*.18 (5):382–87.
- 46- Fritzsche, C., Riebold, D., Munk-Hartig, A., Klammt, S., Neeck ,G.& Reisinger, E. (2012). High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among patients with autoimmune inflammatory diseases and corticosteroid therapy. *Scand. J. Rheumatol*. 4 (3):208–13.Doi: 10.3109/03009742.2011.630328.
- 47- Gafter-Gvili, A., Fraser, A., Paul, M.& Leibovici, L . (2005). Meta-analysis: antibiotic prophylaxis reduces mortality in neutropenic patients. *Ann Intern Med*. 142 (12 Pt1):979–95.
- 48- Gajdusek, D. (1957). *Pneumocystis carinii*—etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Pediatrics*,19,543–65.

Devam Ediyor

- 49- Kutty, G. & Kovacs, J. (2003). A Single-Copy Gene Encodes Kex1, a Serine Endoprotease of *Pneumocystis jirovecii*. *Infection and Immunity*. 71(1):571-74.
- 50- Gill, M. & Read, R. (1991). *Pneumocystis carinii*: A review of an important opportunistic pathogen in AIDS. *Can J Infect Dis*. 2 (1):12-18.
- 51- Gupta, R. , Mirdha, B. , Guleria, R., Mohan, A., Kumar, S., Kumar ,L., Agarwa, S. & Luthra, K. (2008). Use of Different Primer Directed Sequence Amplification by Polymerase Chain Reaction for Identification of *Pneumocystis jirovecii* in Clinical Samples. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 50, 321-27.
- 52- Gutierrez, S., Morilla, R., León, J., Martín-Garrido, I., Rivero, L., Friaiza, V., Respaldiza, N., Montes-Cano, M., Terán, R.& de la Horra, C. (2011). High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among young HIV-infected patients. *J. Adolesc. Health*. 48 (1):103-5. Doi: 10.1016/j.jadohealth.2010.05.013.
- 53- Hardak, E., Neunerger, A., Yigla, M., Berger, G., Finkelstein, R., Sprecher, H. & Oren, I. (2012). Outcome of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia diagnosed by polymerase chain reaction in patients without human immunodeficiency virus infection. *Respirology*. 17 (4):681-86. Doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02158.x.
- 54- Helweg-Larsen, J. (2004). *Pneumocystis jirovecii* applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Dan Med Bull*, 51:251-73.
- 55- Helweg-Larsen, J., Jensen, S., Benfield, T., Svendsen, U., Lundgren, J.& Lundgren, B. (1998). Diagnostic Use of PCR for Detection of *Pneumocystis carinii* in Oral Wash Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (7):2068-72.
- 56- Helweg-Larsen, J., Jensen, J., Dohn, B., Benfield, T. & Lundgren, B. (2002). Detection of *Pneumocystis* DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia-a case control study. *BMC Infect Dis*, 2:28. Doi:10.1186/1471-2334-2-28.

Devam Ediyor

- 57- Höcker, B., Wendt, C., Nahimana, A. Tönshoff, B. & Hauser, P. (2005). Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. *Emerg Infect Dis.* 11(2):330–2.
- 58- Huang, L., Crothers, K., Morris, A., Groner, G., Fox, M., Turner, J., Merrifield, C., Eiser, S., Zucchi, P. & Beard C. (2003). *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. *J Eukaryot Microbiol*, 50, 616–7.
- 59- Huang, L., Morris, A., Limper, A., Beck, J. & ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. (2006). An Official ATS Workshop Summary: Recent Advances and Future Directions in *Pneumocystis* Pneumonia (PCP). *Proceedings of the American Thoracic Society.* 3(8): 655–64.
- 60- Huang, N., Fischer, S. Shaughnessy, E., Gill, V., Masur, H. & Kovacs J. (1999). Development of a PCR Assay for Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia Based on Amplification of the Multicopy Major Surface Glycoprotein Gene Family. *Diagn. Microbiol Infect Dis.* 35(1):27–32.
- 61- Huggett, J., Taylor, M., Kocjan, G., Evans, H., Morris-Jones, S., Gant, V., Novak, T., Costello, A., Zumla, A. & Miller RF. (2008). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV infected patients. *Thorax.* 63(2):154–59.
- 62- Iliades, P., Meshnick, S. & Macreadie I G. (2005). Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS Gene Confer Cross-Resistance to Sulfa Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 49 (2):741–48.
- 63- DeStefano, J., Myers, J., Du Pont, D., Foy, J., Theus, S. & Walzer P. (1998). Cell Wall Antigens of *Pneumocystis carinii* Trophozoites and Cysts: Purification and Carbohydrate Analysis of these Glycoproteins. *J. Euk. Microbiology.* 45 (3):334-43.
- 64- Jirovec, O. (1952). *Pneumocystis carinii* puvodce t. zv interstitialnich plasmocelularnich pneumonii kojencw Csl. *Hyg. Epidemiol Mikrobiol*,1,141.
- 65- Kanne, J., Yandow, D. & Mayyer C. (2012). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: High-Resolution CT Findings in Patients With and Without HIV Infection. *AJR.* 198(6):W555-61. Doi: 10.2214/AJR.11.7329.

Devam Ediyor

- 66- Karageorgopoulos, D., Qu, J., Korbila, I., Zhu, Y., Vasileiou, V. & Falagas, M. (2013). Accuracy of  $\beta$ -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 19(1):39-49. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03760.x.
- 67- Keely, S., Renauld, H., Wakefield, A., Cushion, T., Smulian, A., Fosker, N., Fraser, A., Harris, D., Murphy, L., Price, C., Quail, M., Seeger, K., Sharp, S., Tindal, C., Warren, T., Zuiderwijk, E., Barrell B., Stringer, J. & Hall, N. (2005). Gene Arrays at *Pneumocystis carinii* Telomeres. The Institute of Genomics Research. 170:1589-600.
- 68- Kelvin, K., Wong, S., Xu, T., Poon, R., Mok, K., Chan, J., Cheng, V., Chan, K., Hung I. & Yuen, K. (2013). Use of Nasopharyngeal Aspirate for Diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia. Journal of Clinical Microbiology. 51(5):1570-74.
- 69- Kennedy, C., Kottom, T. & Limper, A. (2009). Characterization of a Novel ADAM Protease Expressed by *Pneumocystis carinii*. Infection and Immunity. 77(8):3328-36.
- 70- Kling, H., Shipley T., Patil, S., Kristoff, J., Bryan, M., Montelaro, R., Morris, A. & Norris K. (2010). Relationship of *Pneumocystis jirovecii* Humoral Immunity to Prevention of Colonization and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a Primate Model of HIV Infection. Infection and Immunity. 78(10):4320-30.
- 71- Koziel, H., Phelps, D., Fishman, J., Armstrong, M., Richards, F. & Rose, R. (1998). Surfactant Protein-A Reduces Binding and Phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by Human Alveolar Macrophages in Vitro. American Journal of Respiratory and Molecular Biology. 18,835-843.
- 72- Krajcicek, B., Limper, A. & Thomas, C. (2008). Advances in the biology, pathogenesis and identification of *Pneumocystis* pneumonia. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 14 (3): 228-234.
- 73- Larsen, H., Linstow, M., Lundgren, B., Birthe, H., Henrik W. & Jens, D. (2007). Primary pneumocystis infection in infants hospitalized with acute respiratory infection. Emerging Infectious Diseases. 13 (1):66-72.

Devam Ediyor

- 74- Lautenschlager, I., Lyytikainen, O., Jokipii, L., Jokipii, A., Maiche, A., Ruutu, T., Tukiainen, P. & Ruutu, P. (1996). Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in Bronchoalveolar Lavage Specimens Compared with Methenamine Silver Stain. *Journal of Clinical Microbiology*. 34 (3):728–730.
- 75- Leigh, T., Kangro, H., Gazzard, B., Jefferies, D., & Collins, J. (1993). DNA amplification by polymerase chain reaction to detect subclinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative homosexuals with and without respiratory symptoms. *Respir. Med*, 87,525–529.
- 76- Limper, A., Hoyte, J.& Standing, J. (1997). The Role of Alveolar Macrophages in *Pneumocystis carinii* Degradation and Clearance from the Lung. *J. Clin. Invest.* 99 (9): 2110–17.
- 77- Lobo, M., Esteves, F., deSousa, B., Cardoso, F., Cushion, T., Antunes, F.& Matos, O. (2013). Therapeutic Potential of Caspofungin Combined with Trimethoprim-Sulfamethoxazole for *Pneumocystis* Pneumonia: A Pilot Study in Mice. *PLoS One*. 8 (8):e70619.
- 78- Lu, J., Chen, C., Bartlett, M., Smith, J.& Lee, C. (1995). Comparison of Six Different PCR Methods for Detection of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 33 (10): 2785–88.
- 79- Lugli, E., Bampton, E., Ferguson, D., Wakefield, A. (1999). Cell surface protease PRT1 identified in the fungal pathogen *Pneumocystis carinii*. *Molecular Microbiology*. 31(6): 1723–33.
- 80- Macfarlane, J. (1985). *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Thorax*. 40:561-570. <http://thorax.bmj.com>.
- 81- McTaggart, L., Wengenack, N.& Richardson, S. (2012). Validation of the MycAssay *Pneumocystis* kit for detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage specimens by comparison to a laboratory standard of direct immunofluorescence microscopy, Real-Time PCR, or conventional PCR. *J Clin Microbiol*,50:1856-9.
- 82- Magali, C., Aliouat-Denis, C., Delhaes, L., Aliouat, M., Viscogliosi, E. & Dei-Cas, E. (2011). *Pneumocystis*: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS Yeast Res*. 11 (1):2-17. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00698.x.

Devam Ediyor

- 83- Maillet, M., Maubon, D., Brion, J., François, P., Molina, L., Stahl, J., Epaulard, O., Bosseray, A. & Pavese, P. (2013). *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33 (3):331-6. Doi: 10.1007/s10096.
- 84- Manoloff, E., Francioli, P., Taffé, P., Van, G., Bille, J. & Hauser P. (2003). Risk for *Pneumocystis carinii* Transmission among Patients with Pneumonia: a Molecular Epidemiology Study. *Emerging Infectious Diseases.* 9 (1):132-4.
- 85- Mantovani, L., Pagliari, C., Fernandes, E., Brasil, R., Duarte, M. (2006). Immunohistochemical study of the cellular immune response in human *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Bras Patol Med Lab.* 42 (1):1-4.
- 86- Martin-Garrido, I., Horra, C., Respaldiza, N., Gutiérrez, S. (2008). Cigarette smoking is a major risk factor for *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic obstructive pulmonary disease, abstr. PO40. 10th Int. Workshops Opportunistic Protists.
- 87- Maskell, N., Waine, D., Lindley, A., Pepperell, J., Wakefield, A., Miller, R. & Davies, R. (2003). Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax.* 58 (7):594-7.
- 88- Matos, O., Costa, M., Lundgren, B., Caldeira, L., Aguiar, P. & Antunes, F. (2001). Effect of Oral Washes on the Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia with a Low Parasite Burden and on Detection of Organisms in Subclinical Infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 20 (8):573-5.
- 89- McKinnell, J., Cannella, A., Kunz, D., Hook, E., Moser, S., Miller, L., Baddley, J. & Pappas, G. (2012). *Pneumocystis* pneumonia in hospitalized patients: a detailed examination of symptoms, management, and outcomes in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and HIV-uninfected persons. *Transplant Infectious Disease.* 14 (5):510-18. doi: 10.1111/j.1399-3062.2012.00739.x.

Devam Ediyor

- 90- Medrano, F., Montes-Cano, M., Manuel, C., Horra, C., Respaldiza, N., Gasch, A., Perez-Lozano, M., Varela, J. & Calderon, E. (2005). *Pneumocystis jirovecii* in General Population. *Emerging Infectious Diseases* . 11(2 ):245-50. Doi: 10.3201/eid1102.040487.
- 91- Mehlhorn Heinz. (2008) (Ed.), *Encyclopedia of Parasitology* ( 3<sup>rd</sup>ed.) [<http://link.springer.com/referencework/10.1007%2F978-3-54048996-2>], 1170-74.
- Mekinian, A., Durand-Joly, I., Hatron, P. , Moranne, O., Denis, G., Dei-Cas, E., Morell-Dubois, S., Lambert, M., Launay, D., Delhaes, L., Hachulla, E. & Queyrel, V. (2011). *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology*. 50 (3): 569–77. Doi: 10.1093/rheumatology/keq31.
- 92- Miller, R., Ambrose, H., Novelli, V. & Wakefield, A. (2002). Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis infection. *J Clin Microbiol*. 40 (4):1555–7. Doi: 10.1128/JCM.40.4.1555–1557.2002
- 93- Miller, R., Ambrose, H. & Wakefield A. (2001). *Pneumocystis carinii* f.sp. hominis DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol*. 39 (11):3877–82.
- 94- Miller, R. & Huang, L. (2006). A Need for Standardized Definitions for Clinical Studies of *Pneumocystis*. *J. Eukaryot. Microbiol*. 53 (S1):87–88.
- 95- Monnet, X., Vidal-Petiot, E., Osman, D., Hamzaoui, O., Durrbach, A., Goujard, C., Miceli, C., Bourée, P. & Richard, C. (2008). Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis* pneumonia in patients with and without HIV infection. *Critical Care*. 12 (1): 1-9.
- 96- Monroy-Vaca, E., de Armas, Y., Illnait-Zaragozí, M., Toraño, G., Diaz, R., Vega, D., Alvarez-Lam, I., Calderón, E. & Stensvold, C. (2014). Prevalence and Genotype Distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban Infants and Toddlers with Whooping Cough. *Journal of Clinical Microbiology*. 52 (1):45–51.

Devam Ediyor



- 97- Montes, M., Chabe, M., Fontillon, M., Horra, C., Respaldiza, N., Medrano, F., Varela, J., Dei-Cas, E. & Calderon, E. (2009). Vertical Transmission of *Pneumocystis jirovecii* in Humans. *Emerging Infectious Diseases*. 15 (1):125-27.
- 98- Morris, A., Beard, C. & Huang, L. (2002). Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes and Infection*. 4 (1): 95-103.
- 99- Morris, A., Kingsley, L., Groner, G., Lebedeva, I., Beard, C. & Norris K. (2004). Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. *AIDS*; 18:793- 8.
- 100- Morris, A., Lundgren, J., Masur, H., Walzer, P., Hanson, D., Frederick, T., Huang, L., Beard, C. & Kaplan, J. (2004). Current Epidemiology of *Pneumocystis* Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (10):1713-20.
- 101- Morris, A. & Norris, K. (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and Its Role in Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 25 (2):297-317. doi: 10.1128/CMR.00013-12.
- 102- Morris, A. & Masur, H. (2011). A Serologic Test to Diagnose *Pneumocystis* Pneumonia: Are We There Yet? . *Clinical Infectious Diseases*. 53(2):203-204.
- 103- Morris, A., Wei, K., Afshar, K. & Huang, L. (2008). Epidemiology and clinical significance of pneumocystis colonization. *J Infect Dis*. 197 (1):10-7. Doi: 10.1086/523814.
- 104- Nakamura, H., Tateyama M. Tasato, D., Haranaga, S., Yara, S., Higa, F., Ohtsuki, Y. & Fujita, J. (2009). Clinical Utility of Serum  $\beta$ -D-Glucan and KL-6 Levels in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Inter Med*. 48(4): 195-202.
- 105- Sabur, N., Kelly, M., Gill, M., Ainslie, M. & Pendharkar, S. (2011). Granulomatous *Pneumocystis jirovecii* pneumonia associated with immune reconstituted HIV. *Can Respir J*. 18 (6):e86-88.

Devam Ediyor

- 106- Neumann S, Krause S, Maschmeyer G., Schiel, X., Von Lilienfeld-Toal, M. (2013). Primary prophylaxis of bacterial infections and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with hematological malignancies and solid tumors. *Ann Hematol*; 92 (4):433-42. Doi: 10.1007/s00277
- 107- Nevez, G., Magois, E., Duwat, H., Gouilleux, V., Jounieaux, V., & Tote, A. (2006). Apparent Absence of *Pneumocystis jirovecii* in Healthy Subjects. *Clinical Infectious Diseases*. 42: e 99–101.
- 108- Nevez, G., Raccurt, C., Jounieaux, V., Dei-Cas, E., Mazars, E. (1999). Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS*.13 (4): 535–6.
- 109- Nevez, G., Raccurt, C., Vincent, P., Jounieaux, V. & Dei-Cas, E. (1999). Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus-negative patients: assessing risk with blood CD4 T cell counts. *Clin Infect Dis.*, 29:1331–2.
- 110- Obeid, K., Aguilar, J., Szpunar, S., Sharma, M., del Busto, R., Al-Katib, A. & Johnson, L. (2012). Risk Factors for *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients with Lymphoproliferative Disorders. *J Infect Chemother*. 12(1):66-9. Doi: 10.1016/j.clml.2011.07.006
- 111- Olsson, M., Lidman, C., Latouche, S., Björkman, A., Roux, P., Linder, E., Wahlgren, M. (1998). Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis gene sequences in filtered air in hospital environments. *J Clin Microbiol*. 36(6):1737-40.
- 112- Onishi, A., Sugiyama, D., Kogata, Y., Saegusa, J., Sugimoto, T., Kawano, S., Morinobu, A., Nishimura, K. & Kumagaia, S. (2012). Diagnostic Accuracy of Serum 1,3-β-D- Glucan for *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia, Invasive Candidiasis, and Invasive Aspergillosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(1):7-15.
- 113-Özkoç, S., Delibaş, S., Erbaycu, A., Ergüden, C. & Akısü, Ç. (2014). Investigation of *Pneumocystis jirovecii* Colonization in Patients with Pulmonary Diseases. *Turkiye Parazitoloj Derg*. 38 (4):214-9. Doi: 10.5152/tpd.2014.3611.

Devam Ediyor

- 114- Pereira, R., Müller, A., Zimmerman, R., Antunes, D., Zinn, V., Friaza, V., dela Horra, C. Calderón, E. & Wissmann G. (2014). High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among HIV-positive patients in southern Brazil. *Medical Mycology*.52(8):804-9.  
doi: 10.1093/mmy/myu059.
- 115- Ponce, C., Gallo, M., Bustamante, R. & Vragas, S. (2010). *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clinical Infectious Diseases*, 50,347–53.
- 116- Ponton, J. Utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora. (2009). *Rev Iberoam Micol*,26,8-14.
- 117- Procop, G., Haddad, S., Quinn, J., Wilson, M., Henshaw, N., Reller L., Artymyshyn, R., Katanik M. & Weinstein, M. (2004). Detection of *Pneumocystis jirovecii* in Respiratory Specimens by Four Staining Methods. *Journal of Clinical Microbiology*.42(7):3333–35.
- 118- Rabodonirina, M., Vaillant, L., Taffé, P., Nahimana, A. , Gillibert, R., Vanhems, P. & Hause, P. (2013). *Pneumocystis jirovecii* Genotype Associated with Increased Death Rate of HIV-infected Patients with Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*. 19(1):21-28.
- 119- Rabodonirina, M., Vanhems, P., Couray-Targe, S., Gillibert R., Ganne, C., Nizard, N., Colin, C., Fabry, J., Touraine, J., vanMelle, G., Nahimana, A., Francioli, P. & Hauser, P. (2004). Molecular evidence of inter human transmission of *Pneumocystis pneumonia* among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis*. 10(10):1766–73.
- 120- Rajagopalan–Levasseur, P., Allaert, A., Dridba, M., Ödberg-Ferragut, C., Jouault, T., Creusy, C., Camus, D. & Dei-Cas, E. (1998). Response to *Pneumocystis* infection in an immunocompetent host. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, (22), 107-121.
- 121- Rapaka, R., Ricks, D., Alcorn, J., Chen, K., Khader, S., Zheng, M., Plevy, S., Bengtén. E.& Kolls, J.(2010). Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*. *J. Exp. Med*. 207 (13):2907-19.

Devam Ediyor

- 122- Rashmi, G., Bijay, R., Randeep, G., Anant, M., Sushil, K., Lalit, K., Sanjay, K. & Kalpana L. (2008). Use of Different Primer Directed Sequence Amplification by Polymerase Chain Reaction for Identification of *Pneumocystis jirovecii* in Clinical Samples. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 50,321-23.
- 123- Respaldiza, N., Medrano, F., Medrano, A., Varela, J., de la Horra, C., Montes-Cano, M., Ferrer, S., Wichmann, I., Gargallo-Viola, D. & Calderon, E. (2004). High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clinical Microbiology and Infection*. 10(11):1029-31 .
- 124- Respaldiza, N., Montes-Cano, M., Dapena, F. de la Horra, C., Mateos, I., Medrano, F., Calderon, E.& Varela, J. (2005). Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 11(12):1012–15.
- 125- Riebold, D., Hennig, A., Loebermann, M.,Schareck, W.,Reisinger, E. (2005). *Pneumocystis* pneumonia in an alcoholic patient with prolonged mechanical ventilation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* , 24, 294–296. Doi: 10.1007/s10096-005-1318-6.
- 126- Ripamonti, C., Orenstein, A., Kutty, G., Huang, L., Schuegger, R., Sing, A., Fantoni, G., Atzori, C., Vinton, C., Huber, C., Conville, P.& Kovacs, J. (2009). RFLP Typing Demonstrates Substantial Diversity among *Pneumocystis jirovecii* Isolates. *J Infect Dis*. 200 (10):1616–22.
- 127- Rubin, R. & Young L. (1987). *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host*. (2<sup>nd</sup>ed.Chap.10:255) New York: Kluwer Academic/Plenum.
- 128- Samuel, C., Whitelaw, A., Corcoran, C., Morrow, B., Hsiao, N., Zampoli, M & Zar, H. (2011). Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected pneumocystis pneumonia using real-time PCR: a prospective study. *BMC Infectious Diseases*, 11,329.
- 129- Sax, P., Komarow, L., Finkelman, M., Grant, P., Andersen, J., Scully, E., Powderly. W.& Zolopa, A. (2011). Blood (1/3)-β-D-Glucan as a Diagnostic Test for HIV-Related *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *CID*. 53 (2):197-202.

Devam Ediyor

- 130- Schildgen, V., Mai, S., Khalfaoui, S., Lüsbrink, J., Pieper M., Tillmann, R. & Brockmann, M. (2014). *Pneumocystis jirovecii* Can Be Productively Cultured in Differentiated CuFi-8 Airway Cells. *Mbio.asm.org*.5 (3 ):e 01186-14
- 131- Shellito J. (1998). Alcohol and host defense against pulmonary infection with *Pneumocystis carinii*. *Alcohol Clin Exp Res* 22 (Suppl 5):208–211.
- 132- Sing, A., Geiger A., Hogardt, M.& Heesemann, J. (2001). *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *J Clin Microbiol*. 39 (7):2717–18.
- 133- Sing, A., Roggenkamp, A., Autenrieth, I.& Heesemann, J. (1999). *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J Clin Microbiol*. 37(10):3409–10.
- 134- Singhal, R., Mirdha, B. & Guleria, R. (2005). Human Pneumocystosis. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 47,273-83.
- 135- Spencer, L., Ukwu, M., Alexander, T., Valadez, K., Liu, L., Frederick, T., Kovacs, A.& Morris A. (2008). Epidemiology of *Pneumocystis* Colonization in Families. *Clin Infect Dis*. 46(8): 1237–40.
- 136- Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A., Zheng, M., Brown G., Gordon, S., Shellito, J. & Kolls, J. (2003). Alveolar Macrophage-mediated Killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. Muri Involves Molecular Recognition by the Dectin-1Glucan Receptor. *J. Exp. Med*.198 (11):1677–88.
- 137- Steele, C., Shellito J. & Kolls J. (2005). Immunity against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis*. *ISHAM*, 43, 1- 19.
- 138- Stringer, J., Beard, C., Miller, R. & Wakefield, A. (2002). A New Name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from Humans. *Emerging Infectious Diseases* September. 8 (9):891-6.

- 139- Stringer, J. (1996). *Pneumocystis carinii*: What Is It, Exactly?. *Clinical Microbiology Reviews*. 9 (4):489-98.
- 140- Stringer, J& Walzer, P. ( 1996). Molecular biology and epidemiology of *Pneumocystis carinii* infection in AIDS. *AIDS*.10: 561-571.
- 141- Suk-Joong, Y. & Zvezdana, V.( 2003). Surfactant Protein D-Mediated Aggregation of *Pneumocystis carinii* Impairs Phagocytosis by Alveolar Macrophages; 71, 1662-1671.
- 142- Swain, S., Wright, T., W. (2004). Neither Neutrophils nor Reactive Oxygen Species Contribute to Tissue Damage during *Pneumocystis* Pneumonia in Mice. *Infection and Immunity*. 72 (10):5722-32.
- 143- Takahashi, T.& Goto, M.( 2002). *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Med. Microbiol*, 51:611-14.
- 144- Tasaka, S. & Hasegawa, N. (2007). Serum Indicators for the Diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia. *CHEST*. 131 (4):1173-80.
- 145- Tasaka, S. & Tokuda, H. (2012). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother*. 18 (6): 793-806.
- 146- Tekinşen, F. & Koç, A. (2013). Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens by different methods. *Mikrobiyol Bul*. 47 (4):658-67.
- 147- Togashi, Y., Masago, K., Ito, Y. (2013). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in patients with advanced lung cancer. *Oncology Letters*, 5,601-604,.
- 148- Thomas, C., Jr, M.& Limper ,A. (2004). *Pneumocystis* pneumonia. *N Engl J Med*, 350,2487-98.
- 149- Tipirneni, R., Daly, K., Jarlsberg, L., Koch, J., Swartzman, A., Roth, B., Walzer. D. & Huang L. (2009). Healthcare Worker Occupation and Immune Response to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging Infectious Diseases* .15(10):1590-97. Doi: 10.3201/eid1510.090207.

Devam Ediyor

- 150- Tosun, I., Buruk, K., Dede, R. & Kaklikaya, N. (2013). Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples of immunocompromised patients with PCR, IFA and Giemsa staining methods. *Mikrobiyol Bul.* 47 (1):195-7.
- 151- Turner, D., Schwarz, Y. & Yust, I. (2003). Induced sputum for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV patients: new data, new issues. *Eur Respir J*, 21:204–8.
- 152- Valerie, L., Yajko, D. & Hadley W. (1997). Extrapulmonary Pneumocystosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 10 (3): 401–18.
- 153- Valerio, A., Tronconi, E., Fantoni, G., Atzori, C., Tartarone, F., Duca, P. & Cargnel A. (2007). Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Italian AIDS Patients Clinical Outcome Is Influenced by Dihydropteroate Synthase and Not by Internal Transcribed Spacer Genotype. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 45 (5):521–28.
- 154- Van der Meer, M., Brug, S. (1942). Infection à *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Ann Soc Belge Med Trop*, 22, 301.
- 155- Vargas, S., Hughes, W., Santolaya, M., Ulloa, A., Ponce, C., Cabrera, C., Cumsille, F. & Gigliotti, F. (2001). Search for Primary Infection by *Pneumocystis carinii* in a Cohort of Normal, Healthy Infants. *CID*, 32, 855-61.
- 156- Vargas, S., Ponce, C., Gigliotti, F., Ulloa, A., Prieto, S. & Muñoz, M. (2000). Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol.*, 38, 1536–8.
- 157- Vargas, S., Pizarro, P., López-Vieyra, M., Neira-Avilés, P., Bustamante, R. & Ponce C. (2010). *Pneumocystis* Colonization in Older Adults and Diagnostic Yield of Single versus Paired Noninvasive Respiratory Sampling. *Clinical Infectious Diseases.* 50 (3):e19–21.
- 158- Vavra, J. & Kucera, K. (1970). *Pneumocystis carinii* Delanoë, its Ultrastructure and Ultrastructural Affinities. *J. Protozool.* 17 (3), 463-483.

- 159- Vidal, S., Horra, C. & Martí'n, J. (2006). *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. Clin Microbiol Infect. 12 (3): 231–235. Doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01337.x.
- 160- Wakefield, A. (2002). *Pneumocystis carinii*. British Medical Bulletin, 61,175–188.
- 161- Wakefield, A., Lindley, A., Ambrose, H., Denis, C.& Miller, R. (2003). Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. J. Infect. Dis. 187(6):901–8. Doi: 10.1086/368165
- 162- Walzer, P. & Cushion, T. (2005). *Lung Biology in Health and Disease Book* (3<sup>rd</sup> ed; Vol. 194). New York: Marcel Dekker Inc.
- 163- Walzer, P. (1999). Immunological Features of *Pneumocystis carinii* Infection in Humans. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 6(2):149–55.
- 164- Wang, Y., Doucette, S., Qian, Q. & Kirby, J. (2007). Yield of Primary and Repeat Induced Sputum Testing for *Pneumocystis jirovecii* in Human Immunodeficiency Virus–Positive and Negative Patients. Arch Pathol Lab Med. 131(10): 1582–84.
- 165- Wazir, J. & Ansari, N. (2004). *Pneumocystis carinii* Infection, Update and Review. Arch Pathol Lab Med.128(9):1023-7.
- 166- Wilkin, A.& Feinberg, J. (1999). *Pneumocystis carinii* Pneumonia: A Clinical Review. 60 (6):1699-1708.
- 167- Wissmann, G., Prolla, J., Goldani, L., Martin-Garrido, I., Morilla V., De La Horra, C., Montes-Cano, M., Respaldiza, N., Medrano, F., Varela, J. & Calderón E. (2008). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* in Brazilian children patients with hematologic malignancies, abstr. PO42.10<sup>th</sup> Int. Workshops Opportunistic Protists, Boston, MA, 28 to 31 May.
- 168- Young, J., Stone, J. Mcgonigle, R., Adu, D. & Michael, J. (1986). Diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia by cytological examination of bronchoalveolar lavage fluid: report of 15 cases. J Clin Pathol, 39, 945-49.



- 169- Zhang, J., Zhu, J., Imrich ,A., Cushion, M., Kinane, T.& Koziel, H. (2004). *Pneumocystis* Activates Human Alveola Macrophage NF- $\kappa$ B Signaling through Mannose Receptors. *Infection and Immunity*. 72 (6):3147-60.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı soyadı:**Iman Qoraan

**Doğum tarihi ve yeri:**26 Augustus 1971/Al-Bireh Filistin

**Uyruğu:**Filistin

**Medeni durumu:**Bekar

**Unvanı:** Doktora öğrencisiyim

**Ana dili:** Arapça

**Yabancı dili:** İngilizce ve Türkçe

### İletişim adresleri:

1-Eskişehir, Odunbazarı, Büyükdere, Uğurbey sok.Koç apart No.29.

2-Batı Şeria, Ramallah-Al-bireh, Saloon Al-şaab,Nidal sok.

**Email:**imanafaneh@yahoo.com

**Tel:**[05076546247,00972-2406303](tel:05076546247,00972-2406303)

### Öğrenim durumu

Dereci	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Tıbbi laboratuvar	Kudüs Üniversitesi/Filistin	1994
Yüksek Lisans	Tıbbi laboratuvar	Birzeit Üniversitesi/Filistin	2006

### Mesleki Deneyim

Çalışma yeri	Ünvanı	Yıl
Red crescent Hastanesi/Filistin	laboratuvar teknisyeni	1994-1997
Medicare-Medipal	laboratuvar sorumlusu	1997-2006
Medicare-Medipal	Gelişme müdürü	2006-2008

Devam Ediyor

## Pratik eğitimi

Eğitim	Yer	Yıl
HLA tiplenirme	Ürdün	2004
Axsym kullanma ve sorun çözme teknikleri	Mısır	2005

## Yaptığım çalışmalar:

- 1- In vitro antifungal susceptibility of tinea pedis agents and toenail onychomycosis in type 2 diabetic patients.
- 2- Vancomycin and Teicoplanin Susceptibility Trends Analysis to *Staphylococcus* species in a University Hospital During a Four Year Period.
- 3- Tinea corporis'in bir etkeni olarak *Microsporum ferrugineum*'un identifikasyonu.
- 4- Cilt Rejenere Edici Doğal ve Sentetik Hammaddelerin Klasik ve Multipl Emülsiyon Sistemleri Halinde Formülasyonu Karakterizasyonu: Stabilitesi ve Cilt Üzerinde Değerlendirilmesi.
- 5- In vitro activity of different 5-nitroimidazole derivatives and natural oils against *Trichomonas vaginalis*.

## Yayınlar:

- 1-Tinea corporis'in nadir bir etkeni olarak *Microsporum ferrugineum*'un identifikasyonu. 3.ulusal klinik mikrobiyoloji kongresi.2015.Antalya.
- 2-Staphylococcus türlerinde vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerinin dört yıllık analizi.XXXVI Türk mikrobiyoloji kongresi.2014.Antalya.
- 3-Prevalence of *Blastocystis* spp. among patients referred to Eskişehir Osmangazi University hospital during the 2010-2014 years.ICOPA XIII international congress of parasitology2014.Mexico.

**Burslar:** Türk Devlet ve Akraba Toplulukları Bursu.

**Ödüller:** 2014 yılında Türkiye'deki en başarılı Filistinli doktora öğrencisi ACUF ödülü.