

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDE *Pneumocystis jirovecii* VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. RUŞEN DEDE

TRABZON-2012

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDE *Pneumocystis jirovecii* VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Ruşen DEDE

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İlknur TOSUN

TRABZON-2012

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iii
TABLolar ve ŞEKİLLER	iv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Taksonomi	3
2.2. <i>Pneumocystis</i> Genel Özellikleri	5
2.2.1. Epidemiyoloji	6
2.2.2. Bulaşma	7
2.2.3. Kolonizasyon	8
2.2.4. Patoloji	9
2.2.5. Doğal İmmun Yanıt	10
2.2.6. Klinik	11
2.2.7 Tanı	14
2.2.8 Tedavi	16
3. MATERYAL ve METOD	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Klinik İzolatlar	20
3.1.2. Araç ve Gereçler	20
3.1.3. Kimyasallar	20
3.1.4. Solüsyonlar	21
3.1.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar	21
3.1.4.1.1. Tris HCL	21
3.1.4.1.2. EDTA	21
3.1.4.1.3. TE Tamponu	21
3.1.4.1.4. Fosfat Tuzlu Su Tamponu	21
3.1.4.1.5. DTT Hazırlanması	21
3.1.4.2. Master Mix İçin Kullanılan Solüsyonlar	21

3.1.4.2.1. dNTP Mix	21
3.1.4.2.2. Primer Mix	21
3.1.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar	22
3.1.4.3.1. 0.5X TBE Buffer Hazırlama Protokolü	22
3.1.4.3.2. Etidyum Bromür Solüsyonu	22
3.1.4.4. Giemsa Boyasının Hazırlanması	22
3.2. Metod	22
3.2.1. Hasta Örneklerinin Hazırlanması	22
3.2.2. İndirect IF Test	22
3.2.2.1. Lamların Hazırlanması	23
3.2.2.2. İFA Boyama Talimatı	23
3.2.3. <i>Pneumocystis jirovecii</i> DNA izolasyonu	23
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	24
3.2.5. Master Mix Hazırlanması	24
3.2.6. PZR Ürünlerinin Gösterilmesi	25
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi	26
3.2.8. PCR Ürünlerinin UV Transilluminatör'de Görüntülenmesi	26
3.2.9. Örneklerin Giemsa Boyasıyla Boyanması	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	37
7. ÖZET	38
8. SUMMARY	39
9. KAYNAKLAR	40

KISALTMALAR

AIDS :	Kazanılmış immun yetmezlik sendromu
BAL :	Bronkoalveolar lavaj
DNA :	Deoksiribonükleik asit
dNTP :	Deoksiribonükleozid trifosfat
HIV :	Human Immunodeficiency Virus
ITS :	Internal Transcribed Spacer
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
İFA :	İndirekt Floresan Antikor testi
FITC:	Floresan izotiyosiyanat
PBS:	Phosphate Buffered Saline
bp :	Baz çifti
Rpm :	Dakikadaki Devir Sayısı
EDTA :	Etilendiamintetra-asetik asit
SF:	Serum fizyolojik
DTT:	dithiothreitol
TBE:	Tris- Borik asit-EDTA
EtBr:	Etidyum bromür
P.carinii:	Pneumocystis carini
PCP:	Pneumocystis pnömonisi
TNF-α:	Tümör Nekrosis Faktör-alfa
TMP-SMX:	Trimetoprim-sülfametoksazol
Tr.asp :	Trakeal aspirat
PFGE :	Pulsed-Field Gel Elektroforez
IS :	İndüklenmiş balgam
HAART :	Highly active antiretroviral terapi
PZP :	Piperasilin -tazobaktam

TABLÖLAR ve ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 1:	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Araştırılmasında Kullanılan Primerler	24
Tablo 2:	Nested PZR İçin Master mix1 ve Master mix2 Bileşenleri ve Miktarları	25
Tablo 3:	Hasta ÖrneKlerinin Kliniklere Göre Dağılımı	27
Tablo 4:	ÖrneKlerin Klinik Materyallere Göre Dağılımı	28
Tablo 5:	Hastaların Klinik Bulguları	29
Tablo 6:	Hastaların Sonuçları	31
Şekil 1:	<i>Pneumocystis carinii</i> hayat döngüsü (CDC, 2010)	7
Resim 1:	<i>P.jirovecii</i> kistlerinin İFA yöntemiyle görüntüsü	31
Resim 2:	<i>P.jirovecii</i> 'ye ait DNA ürünlerinin jeldeki görüntüsü	32

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) dünyada yaygın bulunan ökaryotik bir mikroorganizmadır. İnsanlarda ve tavşan, köpek, domuz, kedi, keçi, maymun, şempanze gibi birçok memeli hayvanda bulunmaktadır. *P. jirovecii*'nin morfolojik özellikleri tüm memeli türlerinde aynıdır. Türün trofozoit, kist, prekist ve sporozoit olmak üzere dört morfolojik formu tanımlanmıştır. Bazen iki veya daha fazla nükleus bulunduran, ince duvar yada zarla kaplı tek hücreli yapılar şeklindedir (1).

Oportunistik bir maya olan *P. jirovecii* kazanılmış immun yetmezlik sendromu (AIDS) hastalarında ve diğer immun yetmezlikli kişilerde önemli morbidite ve mortalite nedenidir (2). Önceleri bir protozoon olduğu düşünülmekteyken, 1988 yılında yapılan DNA analiz çalışmasına göre etkenin bir maya türü olduğu belirlendi. İnsanlarda tanımlanan bu mikroorganizma 1999 yılında parazitolog olan Otto Jirovec'in onuruna *Pneumocystis jirovecii* olarak adlandırılmıştır (3). Toplumda bulunan normal kişilerin *Pneumocystis* ile geçici olarak kolonize olabileceği ve bu kişiler sayesinde organizmanın, insan ekosisteminde yer almasında rolü olabileceği düşünülmektedir. *Pneumocystis* kolonizasyonunun klinik bulguları henüz yeterince anlaşılammıştır. Kolonizasyon durumunda diğer kişilere bulaşabilir yada risk altındaki kişilerde Pnömosistis pnomoni (PCP) gelişebilir. Ayrıca akciğerde az miktarda bulunduğu bile konağın inflamatuvar yanıtını stimule ederek kronik obstruktif akciğer hastalığına yol açabilir. Yaşamın ilk yıllarında çocuklarda anti-*Pneumocystis* antikor titrelerinde artış gösterilmiştir. Bu durum bronşiolit, ani bebek ölüm sendromu gibi durumlara neden olabilir (4). Çocukluk çağında latent enfeksiyonun reaktivasyonu sonucunda hastalık görülebileceği ya da yeni bir enfeksiyon olabileceği düşünülmektedir. İnsanlar ve hayvanlar arasında hava yoluyla geçiş yapabilmesi bu görüşü desteklemektedir (1). Bağışıklık sistemi baskılananlarda insandan insana bulaş görülebilmektedir.

P. jirovecii temel olarak immun yetmezlikli kişilerde önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Son yıllarda immun sağlıklı bireylerde de artan sıklıkta enfeksiyona neden olduğu rapor edilmektedir. Bu etkenin, kişiler arasında bulaşıcılığının önlenmesi ve erken tedavisinin sağlanması için uygun ve hızlı yöntemlerle tanımlanması gereklidir.

Bu çalışmada hastanemize başvuran immun yetmezlikli/sağlam hastaların solunum örneklerinde, *P. jirovecii* oranını belirlemek ve rutinde kullanılan tanı yöntemlerinin (mikroskopi, PZR) karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taksonomi

Pneumocystis organizmalarının 1914 yılında, tamamen kendilerine ait bir kimliklerinin olduğu kanıtlanmış ve iki terimden oluşan bir cins ismi verilmiştir. Öncelikle akciğeri tutmasından dolayı 'pneumo', karakteristik morfolojik özelliğinden dolayı da 'cystis' terimi uygun görülmüş ve bu çalışmada preparatları sağlayan İtalyan araştırmacı Antonio Carini'ye ithafen de tür ismi olarak *carinii* terimi verilmiştir (5). İlk tanımlandığında bir protozoon parazit olduğu düşünülmüş, 1950'lerde *P.carinii*'nin fungal yapıda olma potansiyeli sorgulanmıştır (6,7). Bu organizmaların protozoa veya mantar yapısında olmalarına dair tartışmalar 20.yüzyıl sonlarına kadar sürmüştür (8).

1980'lerin sonlarına doğru, çekirdeğe ait küçük rRNA altbirim dizilerinin karşılaştırılmasına dayalı filogenetik analizler, *P. carinii*'nin fungal alemin bir üyesi olduğunu göstermiştir (9,10,11). Buna ek olarak yapılan gen dizisi karşılaştırmalarında, cDNA ve genomik dizi verileri, *P. carinii*'ye en yakın akrabalığın, bir maya olan *Schizosaccharomyces pombe* tarafından gösterildiğini ortaya koymuştur (12,13). *P. carinii*; genetik ve morfolojik kriterlere göre, *S.pombe* ile birlikte Ascomycota şubesinde yeni tanımlanan Archiascomycetes sınıfı içerisine ayrıca bir takım ayrımı yapılmadan yerleştirilmiştir (14). Eriksson (15) yalnızca gen dizi karşılaştırmalarına dayanarak Pneumocystidacea ailesi ve Pneumocystidales takımının oluşturulmasını önermiştir. *P.jirovecii*'nin taksonomide Pneumocystidales (Ascomycota) takımında, Pneumocytidaseae ailesinde sınıflandırılması önerilmektedir.

Morfolojik yapısı, mantar besiyerinde üreyememesi, antiprotozoal ilaçlara duyarlılığı ile protozoonlarla, organel sisteminin iyi gelişmiş olması ve mantar boyaları ile boyanması ile de mantarlara benzerlik göstermektedir (16). Mantarlara benzeyen diğer özellikleri; kist duvarının ultrastrüktürel yapısı, lameller kristal mitokondriler, intrakistik yapıları içeren kist formları, protein sentez elongasyon faktör 3, timidilat sentaz, dihidrofolat redüktaz genleri ve 18S rRNA geni nukleotid sekansıdır (17).

Moleküler çalışmalar sonucunda sıçanlarda görülen *P. carinii* ile insanlarda görülen *P. jirovecii*'nin farklı suşlar olduğu anlaşılmıştır. Sıçanlardaki *P. carinii* suşlarının nükleer rRNA genleri klonlanmış, sekans analizleri yapılmış, transkripleri karakterize edilmiştir (17,18-19). Diğer organizmalar gibi *P. carinii* üç nükleer rRNA transkript türüne sahiptir: 18S, 5.8S ve 26S insanlardaki ve sıçanlardaki suşların 18S, 5.8S ve 26S rRNA gen sekansları %90 oranında benzerlik gösterirken (16,20), diğer konakçılardaki *Pneumocystis* türleri ile %60

oranında benzerlik saptanmıştır (20). 18S ile 5.8S ve 5.8S ile 26S gen sekansları arasındaki bölgeler “*internal transcribed spacer*” (ITS) bölgeleri olarak tanımlanmıştır. 18S ile 5.8S arasındaki bölge ITS1, 5.8S ile 26S arasındaki bölge ITS2 olarak tanımlanmaktadır. Farklı izolatlarda *P. jirovecii* ITS sekansları çeşitlilik gösterir. Bu nükleotid sekans varyasyonu tiplendirmede kullanılmaktadır. Yaklaşık 60 farklı ITS sekansı bulunmuştur (21). ITS bölgelerindeki farklılıklara göre, insanları infekte eden *Pneumocystis* türleri tiplendirilmektedir (21-22).

Hastalığın insandaki en sık formu olan *Pneumocystis pnömonisi* (PCP) ilk defa 2. Dünya Savaşı sonrası bakımevlerinde kalan infantlarda interstisyel plazma hücreli pnömoni biçiminde gözlenmiş olup, daha sonra 1960’lı yıllarda konjenital immün yetmezlikli çocuklar ve malignite tedavisi gören yetişkinlerde sporadik vakalar olarak bildirilmiştir (23). 1980’li yıllarda AIDS hastalığının ortaya çıkmasıyla PCP vaka sayısında artış gözlenmiştir (24,25). İmmünitesi baskılanmamış bireylerde etkenin hastalık oluşturmadığı bildirilmektedir (26).

Pneumocystis genomu bir ya da birkaç türü kapsamaktadır. İnsan, fare ve başka hayvan kaynaklı türler birbirinden tam olarak ayırt edilemediğinden çoğu raporlarda tüm *Pneumocystis* organizmaları için *P. carinii* ismi kullanılmıştır. 1976 yılında, Frenkel insan kaynaklı *Pneumocystis* organizmasını *P. jirovecii* olarak adlandırılmasını önermiştir, bununla birlikte bu adlandırma yaygınca kullanılmamıştır. Son yıllarda Hunges ve Gigliotti *P. carinii* isminin aynen kalmasını önermiştir. Bunu takiben Latin tasarımına göre türlerin konakları baz alınarak insan kaynaklı türlerin *P. carinii humanus*, fare kaynaklı türlerin *P. carinii rattus* olarak adlandırılmasını önermiştir. Aynı konak türünden kaynaklanan *Pneumocystis* organizmaları arasında suş farklılıkları olup olmadığı da net değildir. PFGE insan ve farelerden elde edilen *Pneumocystis spp.* ile yapılan çalışmalarda kullanılmıştır. İki gruptan araştırmacılar aynı konak türünden izole edilen organizmaların farklı olduğunu göstermiştir. Hong ve ark.’nın (27) verileri bir farenin iki *Pneumocystis* türü ile eş zamanlı enfekte olduğunu göstermiştir.

2.2. *Pneumocystis*’in Genel Özellikleri

Genel olarak üç gelişim evresi bilinmektedir: trofozoit (trofik evre) 1-5 mikrometre, prekist (sporosit) 5-8 mikrometre ve kist (spor hali) yaklaşık 8 mikrometre çapındadır. Eksantrik bir nükleusu, mitokondrisi, retiküler sitoplazması ve az gelişmiş 20-40 nm kalınlığındaki bir hücre duvarı bulunmaktadır. Hücre duvarı dış katman ve plazmalemma olmak üzere iki tabakadan oluşur. Trofozoitin hücre duvarında, diğer evrelerde bulunabilen,

orta tabaka bulunmaz. Prekist formu trofozoit ve kist arasındaki ara şekiller olarak tanımlanmaktadır. Prekistler, trofozoite göre daha az morfolojik özellikler taşımaktadır (28). Prekist evresi erken, ara ve geç prekist olmak üzere üç evrede incelenmektedir. Erken prekist oval şekilli olup dış yüzeyi trofozoit kadar düzensiz değildir. Pelikül, tıpkı trofozoitte olduğu gibi, iki katmandan oluştuğu belirtilmiştir. Prekist nukleusunda mayoz bölünme göstergesi olan sinaptonemal kompleksler gösterilmiştir. Ara prekist genellikle daha yuvarlağımsı olup pelikül daha da kalındır ve hücre duvarı üç katmandan oluşmaktadır. Bu evrede 2 veya 4 nukleus gözlenebilmektedir. Geç prekist evresinde daha da yuvarlaklaşan prekist, üç katmanlı kalın bir peliküle sahiptir. Genellikle birbirine yakın, 0,5-1,0 µm çapında, dörtten fazla nukleus gözlenir (Şekil 1).

Kist formu diğer şekillere göre daha büyük olup 5-8 µm boyutlarında ve yuvarlak şekillidir. Kalın bir kist duvarı bulunur ve birbirinden bağımsız en fazla sekiz intrakistik cisim içermektedir. İntrakistik cisimciklerde nukleus, mitokondri, endoplazmik retikulum ve serbest ribozom bulunmaktadır. Kistin parçalanması ile açığa çıkan bu yapılar gelişerek trofozoitlere dönüşmektedir. Kist duvarı 50-160 nm kalınlığında olup dış, orta ve en içte plazmalemma olmak üzere 3 katmandan oluşmaktadır. Orta katman kist duvarını oluşturan temel bileşen olup, yapısı temel olarak β-1,3-glukan'dan oluşmaktadır (29). Bu nedenle *P. carinii* kist duvarı polisakaridlerini boyayan Gomori methenamine gümüş (GMS) ve Anilin mavisi ile iyi boyanmaktadır. Buna karşılık trofozoitin hücre duvarında orta katmanda β-1,3-glukan bulunmadığından, trofozoitin hücre duvarı bu boyalarla boyanmamaktadır. Kist yüzeyinde, trofozoitlerdeki kadar olmasa da, tubüler çıkıntılar bulunmaktadır (30).

P. carinii'nin eşeyli (seksüel) ve eşeysiz (aseksüel) olmak üzere iki farklı şekilde üreme gösterdiği belirtilmiştir. Aseksüel döngüde trofozoitler mitoz ile çoğalmaktadır. Seksüel döngüde haploid yapıdaki trofozoitler konjugasyon ile sporozoit oluştururlar (erken kist). Sporozoit mayoz ve sonrasında mitoz ile bölünerek 8 adet haploid yapıda intrakistik cisimciği oluştururlar. Daha sonrasında trofozoitler kist duvarında oluşan yarıktan dışarı serbestlenirler (31).

Pneumocystis organizmaları memeli akciğer alveolleri içerisinde ekstraselüler olarak çoğalır. Elektron mikroskopik fotoğraflarda, trofik formlar yapısal olarak ameboid şekilde görülürken, taze hazırlanmış preparatlarda elipsoid şekildedir ve sıklıkla da diğer trofik formlarla ve gelişim basamaklarına ait diğer formlarla kümeler oluşturmuş şekilde görülürler. Hızlı olarak Wright-Giemsa ile boyanmış örneklerde, çekirdeği ve sıklıkla da mitokondrisi ışık mikroskobu ile görülebilmektedir. Metenamin gümüş gibi hücre duvarı ile kompleks

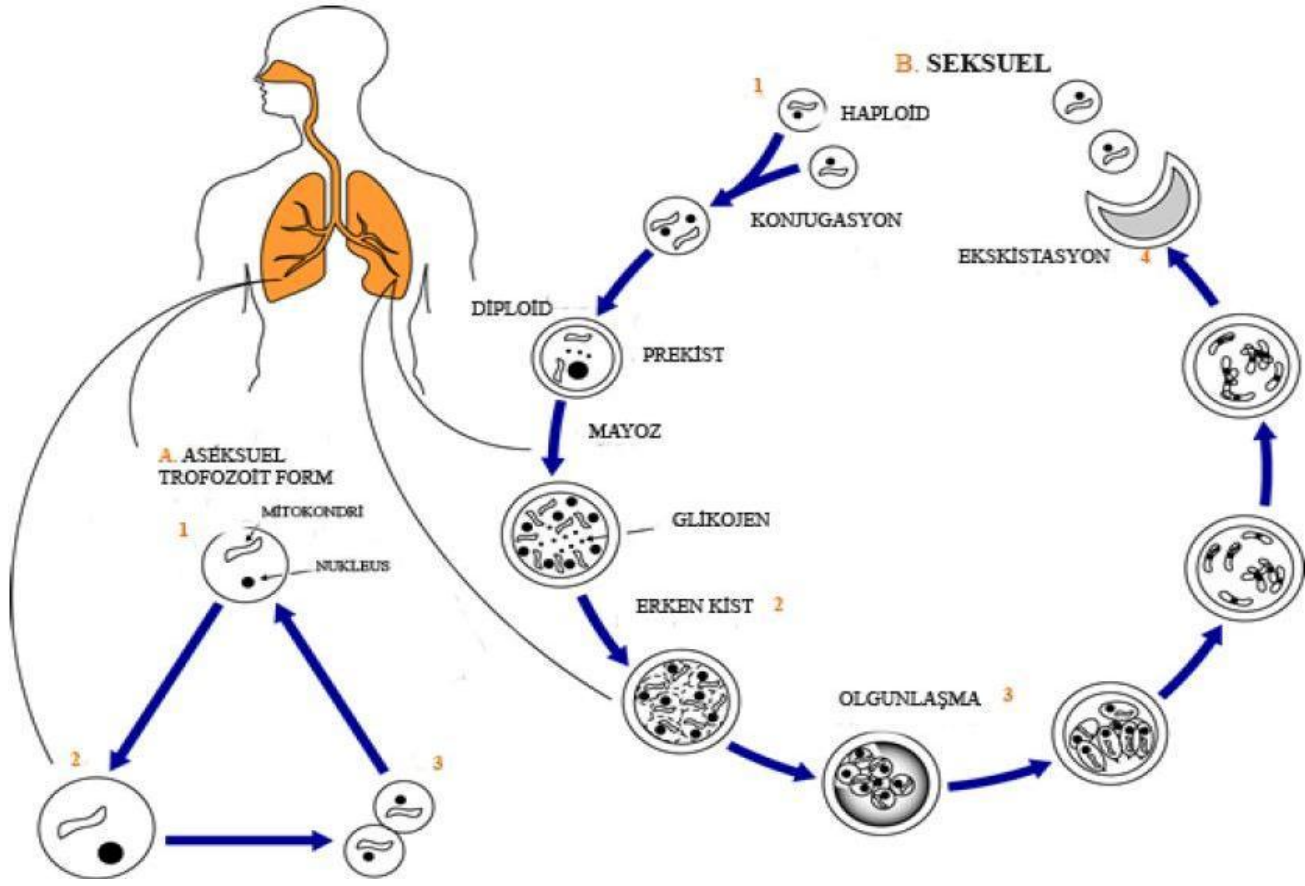
oluşturmak üzere tasarlanmış mantar boyalarıyla trofik formlar boyanmazlar. Sporosit olgun kistten daha küçüktür ve sıklıkla da oval yapıdadır. Bu evre, trofik formlarda olmayan sert bir hücre duvarı yapısına sahiptir ve mantar hücre duvarı boyaları ile görülebilir. Sporosit evresinde çekirdekler, çekirdek bölünmesinin (2-8 çekirdek) farklı aşamalarında olmakla birlikte henüz ayrı spor yapılarına dönüşüm gerçekleşmemiş durumdadır. Bu evrede mitokondri birikimleri de görülebilir. Olgun kist sferik yapıdadır ve hepsi birden görülemese de sekiz spor içerir. Hızlı Wright-Giemsa boyası gibi boyaları kabul etmeyen kalın bir hücre duvarı vardır ve Metenamin gümüş gibi hücre duvarı ile kompleks oluşturan boylarla boyanır. Tanıda rol oynayan formun olgun kist olduğu düşünülmektedir. Tüm gelişim aşamaları ve henüz tam olarak tanımlanmayan çeşitli diğer ara evreleri, klinik örneklerde sıklıkla birbirine sıkıca tutunmuş birikintiler yada kümeler şeklinde bulunurlar. Bu durum da, her bir evrenin tanımlanmasını güçleştirir.

2.2.1. Epidemiyoloji

PCP gelişimi açısından risk altında olan bireyler arasında hematolojik veya solid malignitesi olan hastalar, immünespresif tedavi alan bireyler, transplant alıcıları ve bağışıklık sistemi yetersiz olan kişiler sayılabilir (32,33). Malignitelerin bağışıklık sistemini baskılaması nedeniyle, kanser hastalarında kemoterapi almadan önce de PCP görülebilir (34).

Kortikosteroidler, *Pneumocystis* infeksiyonu ile ilişkili en yaygın immünespresan ilaç grubu olmasına karşın, nonsteroid immün modülatör ilaçların birçoğuyla da PCP geliştiği bildirilmiştir. Birkaç güncel yayında adalimumab, infliksimab, etanersept veya rituksimab gibi monoklonal antikorlar ile tedavi edilen otoimmün hastalığı veya malignitesi olan hastalarda da PCP geliştiği bildirilmiştir (35-40).

Şekil 1. *Pneumocystis carinii* hayat döngüsü (CDC, 2010)



2.2.2. Bulaşma

Dünya genelinde insandan başka çok sayıda memeli hayvanda *Pneumocystis* türlerinin enfeksiyona sebep olduğu bildirilmiştir (41). *Pneumocystis* türlerinin DNA'sı hava örneklerinde, asemptomatik hayvanlarda, normal sağlıklı kişilerde, immunsupresif tedavi alan hastalarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile saptanmıştır (41,42). Günümüzde yapılan moleküler çalışmalar ile farklı konaklardan elde edilen *Pneumocystis* türlerinin genomları arasında belirgin farklar olduğu saptanmıştır (41). Farklı konaklardan izole edilen *Pneumocystis* türlerinin antijenik ve fenotipik olarak farklı olduğu gösterilmiştir (43).

P. jirovecii, başlıca hava yolu ile bulaşır (44-45,46). Bağışıklık sistemi baskılananlarda insandan insana bulaş görülebilmektedir (47-48,49). En sık akciğer tutulumu olmakla birlikte kemik iliği, lenf bezleri, karaciğer, kalp, dalak, göz, kulak, mastoid, tiroid bezi ve genitoüriner organlarda da *P. jirovecii* enfeksiyonu saptanabilmektedir (50). *P. jirovecii*'nin en sık PCP'ye yol açtığı bilindiğinden özellikle akciğer tutulumuna yer verilecektir. Eskiden PCP'nin, önceden geçirilen latent bir enfeksiyonun reaktivasyonu ile ortaya çıktığı düşünülmekteyken,

hastalardan alınan örneklerin incelenmesiyle PCP'nin yeni kazanılan suşlarla da ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (51). Günümüzde *Pneumocystis* enfeksiyonu en çok AIDS hastalarında, kanser kemoterapisi alan hastalarda, immun baskılayıcı tedavi gören transplantasyon alıcılarında saptanmaktadır. Sağlıklı erişkin kişilerde BAL, uyarılmış balgam, burun sürüntü ve ağız çalkantı suyu ile akciğer otopsi örneklerinde *Pneumocystis* türleri PZR kullanılarak araştırılmış ve *Pneumocystis* kolonizasyon prevalansının %0-20 arasında değiştiği bildirilmiştir (52-56). HIV ile enfekte olmuş erişkin hastaların BAL örneklerinde *Pneumocystis* kolonizasyon prevalansı PZR ile % 20-43 arasında bulunmuştur (57).

Pneumocystis kolonizasyonu immun sistemi baskılanmış kemik iliği kanseri, sarkoidoz, diyabet, kronik lenfoid lösemi hastalarında araştırılmış ve kolonizasyon prevalansının %16 olduğu bildirilmiştir (58). Kortikosteroid ile iyatrojenik olarak oluşturulmuş immun sistem baskılanmasının *Pneumocystis* kolonizasyonu için uygun ortam hazırladığı gösterilmiştir (57). Kortikosteroid olan prednizon ile tedavi edilmiş bir grup hastada kolonizasyonun %44 olduğu ve bir başka kortikosteroid olan glukokortikoid ile tedavi edilmiş hasta grubunda ise kolonizasyonun %12 olduğu belirtilmiştir (59).

2.2.3. Kolonizasyon

Serolojik testler çoğu kişinin dört yaşından önce *P. jirovecii* ile karşılaştığını göstermektedir. Latent *P. jirovecii* sağlıklı erişkinlerde saptanmamakla birlikte, hiç bulunmadığını kanıtlamak pratikte olanaksızdır. Vücudun herhangi bir yerindeki tek bir mikroorganizma latent bir enfeksiyonu sürdürmek için yeterli olabilir. Latent enfeksiyonlar geçici olabilir ve enfeksiyonu yenmiş olan hastalar yeniden enfekte olabilirler (60,61). Ömür boyu süren bir latent enfeksiyondan çok, geçici bir kolonizasyon daha olası görünmektedir (61).

Güncel çalışmalar, *Pneumocystis* organizmalarının bağışıklık sistemi normal olan bireylerde veya aktif enfeksiyon veya klinik bulgusu olmayan HIV pozitif hastalarda da düşük miktarda bulunabildiğini ortaya koymuştur (62,63). Tekrar inceleme ile organizmaların saptanamaması, geçici asemptomatik *P. jirovecii* taşıyıcılığı olabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, sayısı gün geçtikçe artan yayınlarda, altta yatan hastalığı olan bağışıklık sistemi sağlam konaklarda, asemptomatik *P. jirovecii*'nin akciğer kolonizasyonu yapabileceği tanımlanmaktadır (64-65,66). İlginç olarak, hem bağışıklık sistemi sağlam kişilerde, hem kistik fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, hem de interstisyel akciğer hastalığı olan olgularda asemptomatik *Pneumocystis* taşıyıcılığı gösterilmiştir (62,65). Kolonizasyon yada asemptomatik enfeksiyonda PCP görülmemektedir. Fakat *Pneumocystis* organizmalarının ya

da DNA'sının varlığını tanımlamak için kullanılmaktadır. Konakta az sayıdaki *P. jirovecii* bulunmasının klinik etkileri henüz saptanmamıştır. Taşıyıcılığın orta derecede solunum yolu enfeksiyonu, kronik akciğer hastalığı ve PCP gelişimindeki rolü günümüzde yoğun olarak araştırılmaktadır. HIV negatif kişilerde *P. jirovecii* varlığıyla ilişkili olarak en sık karşılaşılan klinik durumlar, astım, kronik akciğer hastalıkları, kronik obstruktif akciğer hastalığı, kistik fibrozis, Epstein-Barr virüs enfeksiyonu, lupus eritematozis, romatoid artrit, tiroidit, ülseratif kolittir. Yüksek doz kortikosteroid alan hastalarda da *P. jirovecii* bulunması dikkat çekmektedir (67).

2.2.4. Patoloji

Günümüze ait kanıtlar, bu organizmaların bağışıklık sistemleri sağlam olan memeli konaklarında herhangi bir etki oluşturmaksızın bulunabileceğini göstermektedir (67,68). Ancak bağışıklık sistemi bozulmaya başlarsa, organizmalar akciğer alveolleri içerisinde çoğalmaya başlarlar ve tedavi edilmediği takdirde ölümcül bir pnomoniye neden olurlar. *Pneumocystis* türleri inhalasyon yolu ile alındığında üst solunum yolundaki savunma mekanizmalarından kaçarak, alveoller içinde biriktiği gösterilmiştir (28). *Pneumocystis* türlerinin tip I alveoler hücreler üzerinde bol miktarda bulunan fibronektine tutunması ile başladığı bildirilmiştir (69,70). *Pneumocystis* türlerinin akciğerlerde çoğalması sonucu alveollerde histolojik olarak köpüksü eozinofilik alveolar eksuda olduğu bildirilmiştir. *Pneumocystis* türlerinin sayısı arttıkça intersitisyel fibrozisin yanında hyalin membran oluşumu gözlenmektedir. Bazı atipik hastalarda alveolar eksuda görülmediği, bazen de kaviter lezyonlar, granülomlar veya mikrokalsifikasyonlar oluşabildiği bildirilmiştir (71).

2.2.5. Doğal İmmun Yanıt

Akciğerlerden *Pneumocystis* türlerinin oluşturduğu enfeksiyona karşı immün yanıtın başlıca alveolar makrofajların sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Kortikosteroid uygulanan sıçanlardan elde edilen *Pneumocystis* organizmalarının kist formlarının yanında trofozoit formlarının %99'nun alveolar makrofajlarla ilişkisi olduğu bildirilmiştir (71). HIV ile enfekte kişilerde alveolar makrofajların *Pneumocystis* fagositozunda, sağlıklı kişilere göre sayısal düşüş olduğu ve bunun da mannoz reseptör ekspresyonunun düzenlenmesinin düşüşü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. HIV ile enfekte bireylerde makrofajlarda mannoz reseptörlerinin miktarının düzenlenmesindeki düşüş PCP insidansının artmasından kısmen sorumlu olduğu gösterilmiştir (72). İnsan alveolar makrofaj yüzeyindeki mannoz reseptörlerine *Pneumocystis* türlerinin bağlanması ile nükleer faktör kappanın β , nükleusa geçip IL-8 üretimini uyardığı gösterilmiştir (73).

Pneumocystis hücre duvarında β -glukan miktarının immun yanıtta önemli olduğu bilinmektedir (74). Glikoproteinlerden vitronektin ve fibronektinin *Pneumocystis* β -glukanlarına bağlanması alveolar makrofajlardan IL-6 üretilmesini uyarır. Alveolar makrofajlardan proinflamatör mediatörler, makrofaj inflamator protein-2 ve Tümör Nekrosis Faktör-alfa (TNF- α) salınımının olduğu bildirilmiştir (75). İmmun sistemi baskılanmış hastalarda *Pneumocystis* türleri fagosite edilmezken nötrofillerin bu konuda bir rolü olduğu belirtilmektedir. Nötrofillerin immun sistemi baskılanmış PCP hastalarının BAL sıvılarında bol miktarda bulunduğu gösterilmiştir (76). HIV ile enfekte kişilerin akciğerlerinde *Pneumocystis* enfeksiyonu enflamasyona sebep olarak var olan nötrofil sayısını arttırmaktadır. Çok sayıda klinik çalışmadan çıkan sonuçlarda *Pneumocystis* pnömonisinin şiddeti ile nötrofil sayısının doğru orantılı arttığı belirtilmektedir (71).

PCP'de CD4+ T helper hücre sayısının mm^3 'de 200 hücreden aşağıya düştüğü gözlemlenmiştir (77). CD4+ T hücreleri Pneumosisozis kliniğinin iyileşmesinde ve *Pneumocystis* türlerine karşı efektör hücre aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.

Pneumocystis türlerinin geliştirilebilmesi için uygun in vitro kültür ortamı tarif edilmediği için oluşan immun yanıtın araştırılması için hayvan modelleri kullanılmaktadır. PCP'de T hücrelerinin önemini belirlemek için immun sistemi baskılanmış kişilere benzer hayvan modelleri oluşturulmuştur. Kortikosteroid verilerek PCP oluşturulan sıçanlarda T helper hücrelerin azaldığı ve T supresor hücrelerin arttığı, farelerde ise CD4+ T hücrelerini seçici olarak azaldığı belirlenmiştir (78). Sonuç olarak bu çalışmalar CD4+ T hücrelerinin PCP'den korunmadaki rolünü ortaya koymaktadır. *Pneumocystis*'e karşı immunitede CD8+ T hücrelerinin önemli bir role sahip olduğu belirtilmektedir. CD4+ ve CD8+ T hücreleri eksiltelen farelerde yalnız CD4+ eksikliği olan farelere göre daha şiddetli PCP gözlenmesi, *Pneumocystis* türlerine karşı immun yanıtın oluşturulmasında CD8+ T hücrelerinin önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (79). Hücrel immun yanıt yanında B hücreleri aracılığıyla oluşturulan humoral immun yanıtında *Pneumocystis* türlerinin akciğerlerden temizlenmesinde önemli rol aldığı belirtilmiştir (71).

2.2.6. Klinik

Klinik olarak hastalarda en sık dispne, takipne, öksürük, ateş ve siyanoz görülür. Öksürük nonproduktiftir. Nadiren balgam, hemoptizi ve göğüs ağrısı da olabilir. Etken immünitesi baskılanan kişilerde hastalık oluşturduğu için altta yatan hastalık, enfeksiyonun klinik gidişini etkiler. Tedavi edilmediği takdirde tablo ölümle sonuçlanabilir. Hastanın fizik

muayenesinde akciğerlerde raller duyulabilmekle birlikte akciğer sesleri tamamen normal de olabilmektedir (80,81).

PCP'nin belirti ve bulgularının özgün olmaması ve *Pneumocystis*'in kültürlerde üretilmeyen bir organizma olması nedeniyle PCP'nin klinik tanısı oldukça karmaşıktır. Dolayısıyla, bu fungal patojenin rutin tanısı, organizmanın mikroskopik olarak gösterilmesi esasına dayanmaktadır. Altın standart yıllardır, bronkoalveolar lavajın (BAL) veya indüklenmiş balgamın (IB) Giemsa veya direkt immunfloresans boya ile mikroskopik olarak incelenmesi olmuştur (82,83). Bununla beraber, bu yöntemlerin başarısı örneğin kalitesine, organizma yüküne ve laboratuvar ekibinin deneyimine dayanmaktadır. PCP'nin klinik tanısına yardımcı olmak için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler teknikler de yakın zamanda kullanılmaya başlanmıştır. *Pneumocystis* türlerinin oluşturduğu PCP fizik muayene ve klinik bulguları hastalığa özgün olmadığı için tanı konulmasında sorunlar yaşanmaktadır. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda pnömoni kliniği bulunması durumunda *Pneumocystis jirovecii* ayırıcı tanıda düşünülmelidir. PCP semptomları HIV negatif ve pozitif hastalarda farklılık göstermektedir. PCP, HIV pozitif hastalarda subakut klinik tablo ile başlayıp ilerleyen solunum zorluğu, kuru veya şeffaf balgamlı öksürük, halsizlik ve hafif ateş bulguları vermektedir. HIV pozitif hastalarda negatif hastalara göre arteriyel oksijen basıncının genellikle daha yüksek ve alveolar arteriyel oksijen farkının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Hiçbir semptom, bulgu, kan biyokimyası veya radyolojik bulgu kombinasyonu, PCP için tanı koydurucu değildir. Bu nedenle tanı koymak için, klinik olarak uyumlu bir örnekte *Pneumocystis*'in gösterilmesi gerekmektedir. BAL sıvısı alınan bronkoskopi tercih edilen tanısal işlemdir ve duyarlılığı %89 ile %98'in üstü arasında değişmektedir (82). Bazı merkezlerde ilk tanısal işlem olarak, IB veya orofaringeal yıkantı örnekleri kullanılmaktadır. Daha az invaziv bir yaklaşım olmasına karşın, mevcut mikroskopik ve moleküler tekniklerle analiz edildiğinde, bu örneklerin duyarlılık ve özgüllüklerinin genel olarak kabul edilemez düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Yakın tarihli bir çalışma IB'nın tanısal değerinin düşük olduğunu doğrulamakta ve özellikle HIV-negatif hastalarda ilk tanı testi olarak BAL sıvı örnekleme yapılmasını önermektedir (83).

PCP gelişen erişkinlerde sıklıkla nefes darlığı, balgamsız öksürük, derin nefes alamama, göğüs sıkıntısı ve gece terlemeleri vardır (39). Düşük seviyeli bir ateş (örn.38.5°C) ve takipne sıklıkla bulunurken, hemoptizi ve balgam nadirdir. Fizik muayene sonrasında bazı anormallikler de saptanır. Çeşitli derecede solunum sıkıntısı, küçük solunum hacimleri ve ince bazal raller gözlelenebilir. AIDS'li hastalarda klinik hastalığın gelişimi, HIV ile enfekte

olmayan fakat bağıışıklığı baskılanmış hastalara kıyasla genelde daha sinsi bir seyir gösterir. Göğüs grafileri normal olabildiği gibi bir hastalık durumunu da yansıtabilir.

Radyolojik olarak interstisyel pnömoni görünümü mevcuttur. Posterio-anterior akciğer grafisinde %90 kadar olguda perihiler bölgeden başlayan bilateral diffüz infiltratif görünüm gözlenir. Bunun dışında nodüller, kavitasyon, mikrokalsifikasyon, konsolidasyon, pnömosel, pnömotoraks gibi atipik radyolojik görünümde de saptanabilmektedir. Yoğun, simetrik ve doku arası yerleşimli infiltratlar sıkça gözlenirken, fokal infiltratlar, lobar konsolidasyonlar, kaviteler ve nodüller daha az sıklıktadır. Enfeksiyonun erken evresinde infiltratlar geniş bir yayılım gösterebilir. Fakat konsolidasyon hastalık ilerledikçe artar. Proflaktik bir önlem olarak aerosol şeklinde pentamidin uygulanması yüksek oranda apikal infiltrat ve pnömotoraks gelişimiyle ilişkili bulunmuştur (84). Posterio anterior akciğer grafisi bulguları normal iken daha duyarlı bir yöntem olan yüksek resolüsyonlu bilgisayarlı tomografi ile buzlu cam görünümü ve kistik lezyonlar görülebilmektedir (85).

Göğüs grafilerindeki anormalliklerin ölçüsü prognostik yönden değer taşır ve yüksek bir mortaliteyle birliktelik gösterebilir. Akciğer dışı bölgelerde *Pneumocystis* organizmalarının insidansı, pulmoner *P. jirovecii* enfeksiyonlu hastaların postmortem incelemelerinde %1-3 oranında bulunmuştur (73,86). Sınırlı sayıda otopsi uygulanması ve akciğer dışı pnömosistoz şüphesinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı, bu oran büyük olasılıkla tahminlerin altındadır. Metenamin gümüş boyama veya immunfloresan kitler, antemortem olguların doku örneklerinde ve ince iğne aspiratlarında *Pneumocystis*'in kist evresinin tanımlanmasına katkıda bulunurlar. Lenf nodülleri, 52 hastanın incelendiği bir seride, akciğer dışı tutulumun en sıklıkla (%44) gözlendiği alan olurken, bunu dalak, kemik iliği ve karaciğer (%33) izlemiştir. *P. jirovecii*, adrenal bezler, gastrointestinal kanal, genitoüriner kanal, tiroid, kulak, pankreas, göz, deri ve diğer vücut kısımlarından da saptanmıştır. Akciğer dışı bölgede çoklu alan tutulumu ile seyreden bir enfeksiyon, hızlı bir şekilde ölüme sonuçlanmaktadır. Patolojik bulgular enfeksiyonun gözlendiği organla uyum göstermektedir. Örneğin, göz enfeksiyonu olanlarda retinada pamuk yünü benekleri gözlenirken, kemik iliği lezyonları olan hastalarda pansitopeni görülmektedir. Çocuklarda PCP'ye siyanoz, burun kanat solunumu, ateşin bulunmadığı orta derecede bir öksürük ve ciddi bir enfeksiyonda da interkostal çekilmeler eşlik edebilir (61). CD4+ hücre sayıları mikrolitrede 200'ün altında olan erişkinler PCP gelişimi yönünden yüksek bir risk altındayken, pnömoni gelişen bir yaşın altındaki çocuklarda CD4+ sayılarının mikrolitrede 1000'den fazla olduğuna dikkat çekilmektedir (87). PCP ilk olarak çocuklarda ortaya çıkan bir enfeksiyon olarak tanımlanmış ve tarihi gelişim içerisinde

hastalığın ilk önceleri pediyatrik bir enfeksiyon olduğu düşünülmüştür (33). İkinci Dünya Savaşından sonra kötü koşullarda barınan ve beslenme yetersizliği bulunan çocuklarda "*interstisyel plasma cell pneumonia*" olarak ünlenen epidemiler, aslında, daha sonradan *P. jirovecii* pnomonisi olarak tanımlanacak hastalığın klinik belirtileriydi. Bu çocuklardaki enfeksiyon, pnömonili erişkin hastalarda tanımlanan tip 2 hücre hipertrofisine ve sınırlı sayıda mononükleer hücre infiltrasyonuna karşın, bir plazma hücre infiltratı ile karakterizeydi (61).

2.2.7. Tanı

P. carinii pnömonisinin (PCP) tanısı solunum yolu örneklerinde, boyama metodları veya immünofloresan yöntemleri kullanılarak organizmanın mikroskopik gösterilmesine dayanır. Son zamanlarda, PCP için spesifik tanı metodu olduğu rapor edilmektedir. Çeşitli çalışmaların sonuçları göre insan örneklerinde *P. carinii* tespitinde PZR'ın geleneksel yöntemlere kıyasla çok daha sensitif olduğu gösterilmiştir (88).

P. jirovecii kültürü yapılamadığı için, PCP'nin laboratuvar tanısı geleneksel sitokimyasal boyalar ya da immünofloresan boyama yönteminde organizmanın mikroskopik olarak görülmesine dayanır. Çünkü solunum yolu örneklerinde organizma yükü nispeten yüksek olduğunda bu yöntemler yararlıdır. Ancak organizma yükü az olduğunda güvenilir değildir. Bazı araştırmacılar geleneksel boyama yöntemleri *Pneumocystis* taşıyıcılığını tespit etmede yetersiz olmasından dolayı *Pneumocystis* kolonizasyon tespiti için daha hassas olan moleküler yöntemlere döndüler. PZR yöntemleri mikroskopik inceleme ile organizmaların gösterilmesine gerek kalmadan tespit etmektedir. Bu patojenin saptanmasında altın standart olan PZR sitolojik boyalara göre anlamlı derecede duyarlıdır. Nested PZR protokolleri standart singlecycle amplifikasyona göre artan duyarlılığı nedeniyle daha fazla avantajlıdır (46,89).

AIDS ve PCP olan hastaların akciğerlerinde AIDS olmayan hastalara göre daha fazla *Pneumocystis* organizmaları, daha az sayıda nötrofiller bulunur. Solunum sekresyonlarındaki çok sayıdaki mikroorganizmanın varlığı, bağışıklık yetmezliğinin ortaya çıktığı diğer durumlara göre AIDS olgularında balgam ve bronkoalveolar lavaj sıvısı örnekleri ile daha yüksek oranda PCP tanısı konmasını sağlar. Hipertonik tuzlu su ile balgam indüksiyonu tanı olasılığını artırır, özellikle AIDS hastalarında başlangıç prosedürü olmalıdır. Eğer indüklenmiş balgam örneği ile tanı konulamazsa bronkoskopi ve bronkoalveolar lavaj uygulanmalıdır. Bronkoskopi ile veya cerrahi olarak biyopsi alınmasına nadiren gerek duyulur (33).

IB, BAL sıvısı veya akciğer dokusundan elde edilen *Pneumocystis* trofozoitleri (trofik formları) veya kistleri, histokimyasal boyalarla gösterilebilir. Trofik formları Papanicolaou, Gram-Weigert veya modifiye Wright Giemsa (Diff-Quik) boylarıyla incelenebilir. Kistler ise Grocott-Gomori methenamin gümüş (GMS), krezil saf viyole, toluidin mavi O boyası veya kalkofluor beyazı (CW) mantar boyasıyla boyanabilir. CW hızlıdır, kullanımı kolaydır ve örnek içerisindeki diğer mantarları da saptayabilme avantajına sahiptir. Birkaç çalışma, *Pneumocystis*'in rutin laboratuvar incelemesinde CW boyasının kullanılmasını desteklemektedir (90). Florokrom işaretli monoklonal antikor en duyarlı boyama yöntemidir (33,61), hem kistler hem de pnömoni sırasında solunum sekresyonlarında çok daha fazla sayıda bulunan trofozoitler boyanabilir. Bu yöntem indüklenmiş balgam örneklerinde diğer boyama yöntemlerine göre daha duyarlı ve spesifiktir. Fakat, bronkoalveolar lavaj örneklerinde bu fark azalır (33). Gomori metenamin gümüş ve Giemsa boyama yöntemleri de kullanılabilir (61). Trofik formlar modifiye Papanicolaou, Wright-Giemsa boyamaları ile saptanabilir (33). Bronkoalveolar lavajla alınmayan balgam örneklerinin mikroskopik incelemesinin negatif bulunması her zaman PCP tanısını dışlamaz (61). Polimeraz zincir reaksiyonu ile hem *Pneumocystis* enfeksiyonu tanısı konmakta hem de sulfonamid direnci saptanabilmektedir. İndüklenmiş balgam ve bronkoalveolar lavaj sıvılarında *Pneumocystis* mitokondrial büyük-altünite ribozomal RNA primerleri kullanıldığında PZR konvansiyonel boyama yöntemlerine göre çok daha duyarlı ve spesifiktir (33). Ayrıca, PZR diğer yöntemlere göre daha erken tanı konmasını sağlayabilmektedir (61).

PCR sensivitesi yüksek olduğundan PCP olmayan kolonize kişilerden alınan solunum yolu örneklerinde düşük sayıda organizma yükünü tesbit edebilir. Çalışmalar İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu veya diğer immünsüpresyonun türleri ile bağışıklık sistemi baskılanmış ancak kronik bir akciğer hastalığı olmayanlar bireylerde genellikle *P. jirovecii* tarafından kolonize olduğunu göstermiştir (46).

Bununla beraber, CW ve diğer boyalar kullanıldığında, *Pneumocystis*'in artefaktan ve diğer nonspesifik boyanmalardan ayırt edilebilmesi için deneyim gerekmektedir. Dört boyama yöntemini karşılaştıran güncel bir araştırma, CW ve GMS boylarının, klinik laboratuvarında rutin kullanım için en iyi parametreler olduğunu ortaya koymuştur (90). İnsan *Pneumocystis*'lerine karşı yönlendirilmiş monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan immunfloresan antikor (IFA) boyları, organizmanın klinik örneklerde doğrudan saptanması için de kullanılabilir. IFA boylarının avantajı, organizmanın hem trofik hem de kist formlarını saptayabilmesidir. Bununla beraber IFA boyları, konvansiyonel boylardan çok

daha pahalıdır ve daha fazla zaman alır. CW, GMS veya Diff-Quik gibi histokimyasal boyaları, Meriflour kullanılarak yapılan IFA ile karşılaştıran güncel bir çalışma, IFA boyalarının, duyarlılığı en yüksek, ancak özgüllüğü en düşük boyama yöntemi olduğu sonucuna varmıştır. Bu sonuçların ışığında yazarlar, bir klinik mikrobiyoloji laboratuvarında primer boyama yönteminin IFA olması durumunda, son test sonucunun özgüllüğünün ve pozitif prediktif değerinin yüksek olması için, ikinci bir yöntemle doğrulama yapılmasını önermektedirler. AIDS hastası olmadan PCP gelişen hastalarda, PCP atağı sırasında alınan BAL sıvısında nötrofil sayısı çok yüksek, organizma sayısı ise belirgin derecede düşük olarak saptanmaktadır (90). Dolayısıyla, AIDS olmayan hastalardan IB veya BAL sıvı ile organizma elde etmek daha zor olabilir. İmmunfloresan veya konvansiyonel boyalarla *Pneumocystis*'in canlı formlarının görülmesi, PCP için tanı koydurucu olmakla beraber, AIDS olmayan hastalarda organizma yükünün az olması nedeniyle tanıda karşılaşılan zorluklar, daha hassas diagnostik teknolojilerin geliştirilmesine yol açmıştır. *P. jirovecii*'i tanımlamaya yönelik moleküler yöntemler, mikroskopiyile karşılaştırıldığında daha yüksek duyarlılık ve özgüllük potansiyellerinin yanı sıra, daha objektif bir inceleme olanağı da sunmaktadır (91).

2.2.8. Tedavi

PCP'nin tedavisinde Trimetoprim-sülfametaksazol (TMP-SMX) birinci seçenek ilaçtır. Doku penetrasyonu mükemmeldir, en hızlı yanıt alınan ajandır, oral tedavide biyoyararlanımı iyidir. Hafif bulguları olan hastalar yakın takip ile ayaktan oral tedavi kullanılabilir (74). TMP üzerinden 15-20 mg/kg/gün veya SMX üzerinden 75-100 mg/kg/gün olarak bölünmüş dozlarda kullanılmaktadır. HIV pozitif hastalarda 21 gün ve HIV negatif hastalarda 14-17 günlük tedavi önerilmektedir.

TMP-SMX tedavisinin i.v. başlanması ve takiben oral tedaviye geçilmesi tavsiye edilmektedir. Oral tedavi verilecek ise ilk doz toplam günlük dozun yarısı kadar olmalıdır. Oral veya parenteral kullanımda toplam doz 640 mg trimetoprim ve 320 mg sülfametaksazolü geçmemelidir. TMP-SMX'un olası yan etkileri döküntü, ateş, lökopeni, anemi, trombositopeni, transaminaz artışı, gastrointestinal yakınmalar ve azotemidir. Pentamidin sulfonamid alerjisi olan hastalar için ilk sıradaki alternatiftir. İkinci basamakta kullanılan ilaçlar pentamidin, dapson+trimetoprim kombinasyonu ve atovaquone'dur. Pentamidin intravenöz olarak 4 mg/kg/gün dozunda, aerosol olarak ise 600 mg/gün dozda kullanılmaktadır. Pentamidin tedavisinin yan etkileri; renal fonksiyonlarda bozulma, pankreatit, hipoglisemi, diyabet, pansitopeni, hipotansiyon veya hipertansiyon gelişimidir.

Ayrıca kardiyak toksisite ve bunun sonucunda bradikardi, elektrokardiyogramda QT aralığında uzama ve ölümlerle sonuçlanabilecek ventriküler aritmiler (torsades de pointes) görülebilir. Dapson-trimetoprim kombinasyonu sulfametoksazolü tolere edemeyen HIV pozitif hastalarda uygun bir alternatif olabilir. Uzun yarı ömrü ve istenmeyen etki profili nedeniyle, özellikle kök hücre ve organ transplantasyonu alıcılarında tercih edilmez. Dapson 100 mg/gün, trimetoprim 15-20 mg/kg/gün dozunda 3 eşit dozda kullanılmaktadır. Glukoz-6 fosfat dehidrogenaz eksikliği olanlarda hemoliz, anemi, methemoglobinemi, ateş, raş, hepatit gibi yan etkiler görülebilir (92).

Atovoquone günde 3 kez 750 mg dozunda oral olarak kullanılabilir. Nadir görülmekle birlikte döküntü, diyare, bulantı, kusma, ateş, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma gibi yan etkileri vardır. Üçüncü basamakta tercih edilebilecek ilaçlar ise i.v. trimetrexate ve folinik asit kombinasyonu veya klindamisin i.v. ve oral formu ile birlikte primakin kombinasyonudur. Günlük 15-30 mg oral primakin ve 6 saatte bir 450-600 mg/gün dozunda oral klindamisin kombinasyonu da kullanılmaktadır. Klindamisin primakin kombinasyonu 1989'dan beri başarıyla kullanılmaktadır. Klindamisin ve primakin kombinasyonunda sıklıkla saptanan yan etkiler; döküntü, methemoglobinemi, diyare, anemi, nötropeni ve kusmadır. Trimetrexate 30-45 mg/m²/gün, folinik asit ise 80-100 mg/m²/gün dozunda verilmektedir. Bu tedavi ile gözlenebilecek yan etkiler ateş, döküntü, lökopeni ve transaminaz düzeylerinde artmadır. Diğer tercih edilebilecek tedavi seçenekleri ise oral primetamin, oral sulfadiazin ve folinik asit kombinasyonudur. Primetamin ilk iki gün, günde 2 doz 50 mg, sonrasında günde 4 doz 25-50 mg dozunda, sulfadiazin 75 mg/kg/gün sonrasında 100 mg/kg/gün dozunda önerilmektedir. Sulfa içeriği olan TMP-SMX, dapson gibi antiprotozoal özelliği olan ilaçlar, *P. jirovecii*'nin dihidrofolat redüktaz (DHFR) genine etki etmektedir. Son yıllarda TMP-SMX, dapson gibi ilaçlarla profilaksi verilen hastalarda DHFR gen mutasyonu sonucu sulfa direnci gözleendiği bildirilmektedir. Şiddetli pnömosistozlu olgularda kortikosteroid kullanılması gerekebilir. Kortikosteroidlerin uygun antimikrobiyal tedavi ile birlikte kullanıldıklarında klinik sonuca olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Steroid arteryel oksijen basıncı < 70 mm Hg veya alveoler-arteryel oksijen gradiyenti > 35 mmHg'nın üzerinde olan olgularda 1-5 gün arası günde iki kez 40 mg oral prednizolon, 6-10. günler arasında günde bir kez 40 mg oral prednizolon, 11-20. günler arasında günde 20 mg oral prednizolon şeklinde kullanılabilir. HIV enfeksiyonu bulunmayan olgularda prednizolonun 60 mg/gün ve üzerindeki dozlarında, düşük dozlara göre daha iyi sonuçlar bildirilmiştir. Mantar protein sentezinin inhibisyonu yoluyla etki gösteren sordarinler ve beta-

glukan sentezini inhibe ederek etki gösteren pnömokandinler ve ekinokandinler yeni geliştirilmekte olan ilaçlardır.

Primer profilaksi, HIV ile infekte olan kişilerde, gebelerde, AIDS tedavisi için etkinliği yüksek antiretroviral tedavi verilen hastalarda, CD4+ sayısı 200/mm³'ün altında olduğunda veya orofaringeal kandidiyazis öyküsü olan hastalara önerilmektedir. Retrospektif çalışmalarda HIV ile infekte olmayan hastalarda günlük 16 mg veya daha fazla dozda, yaklaşık 8 haftalık bir süre steroid kullanımının PCP İçin risk oluşturabildiği gösterilmiştir (92). Benzer şekilde bağ dokusu hastalıkları veya kanser tedavisi esnasında steroid alan hastalarda da PCP enfeksiyonuna yatkınlık saptanabilmektedir (61,92). İlk tercih trimetoprim-sulfametaksazol (TMP-SMX) olup, günlük bir tablet (160 mg TMP+ 800 mg SMX) veya alternatif bir seçenek olarak haftada 3 kez bir tablet (160 mg TMP+ 800 mg SMX) kullanımı önerilmektedir. Ayrıca dapson oral yolla 50 mg günde 2 kez veya 100 mg günde tek doz olarak verilebilmektedir. Hastada glukoz-6 fosfat dehidrogenaz eksikliği varsa hemolize sebep olabileceği için dikkatli olunmalıdır. Dapson 50 mg/gün + primetamin 50 mg/hafta + lökovorin 25 mg/haftalık oral kombinasyon da verilebilmektedir. Ayrıca haftalık 200 mg dapson + haftalık 75 mg primetamin + haftalık 25 mg'lık kalsiyum folinat kombinasyonu da bir başka profilaksi alternatifidir. Aerosol olarak pentamidin aylık 300 mg önerilebilmektedir. Atovaquone günlük 1500 mg dozunda verilebilen bir başka alternatif ilaçtır. Atovaquone'ın daha iyi emilebilebilmesi için yağ içeriği fazla olan gıdalarla alınması önerilmektedir (92). Ayrıca primetamin + sülfadoksin kombinasyonu da kullanılabilir başka bir seçenektir, ancak doz standardize edilmemiştir (60). "Etkinliği yüksek antiretroviral tedavi" Highly active antiretroviral therapy(HAART) AIDS klinik bulguları ortaya çıkmadan önce 3 veya 4 antiretroviral ilacın birlikte verilmesiyle yapılmakta olup, hastalık belirtilerinin mümkün olduğunca geciktirilmesini ve immün sistemin korunmasını hedeflemektedir.

PCP'den korunma amacıyla PCP enfeksiyonu riski bulunan HIV enfeksiyonu olan hastaların PCP olan hastalarla aynı odayı paylaşmamasını öneren yazarlar vardır (60). Fakat bu konuda veriler yeterli değildir (61). *P. jirovecii* için rutin profilaksi uygulanması persistan bağışıklık yetmezliği olan hastalarda sağ kalımı artırmış, mikobakteri, mantar ve viruslar da içeren diğer enfeksiyonların oranında göreceli bir artışa neden olmuştur (60). Allojeneik veya otolog hemopoetik kök hücre transplantasyonunda postengraftman döneminde (30-100. günler) hücresel bağışıklık yetmezliği vardır. *P. jirovecii* özellikle bu dönemde önde gelen patojenler arasındadır (61). Allojenik transplant alıcılarında ilk 6 ay trimetoprim sulfametoksazol ile profilaksi yapılmalıdır. Bu amaçla, haftada üç kez 320/1600 mg tablet

kullanılabilir (28). Solid organ transplant alıcılarında PCP riski transplantasyon sonrası ilk yılda sonraki yıllara göre sekiz kat fazladır (29). Profilaksi almayan hastaların %10-20'sinde PCP gelişebilir. Ek risk faktörleri yoksa, günde bir trimetoprim-sulfametoksazol 80/400 mg tablet ile 6 ay profilaksi uygulanmalıdır (30). En riskli grup olan ve birinci yıldan sonra da riskin devam ettiği akciğer transplantasyonu hastalarında profilaksinin bir yıldan uzun sürdürülmesi gerekli olabilir (29). AIDS olguları için önemli bir risk faktörü olan *P. carinii* enfeksiyonu, ilk HIV/AIDS olgularının, dolayısıyla HIV enfeksiyonunun tanımlanmasında önemli bir rol oynamıştır (31). CD4+ T lenfosit sayısı 200/mm³'ün altında olan HIV ile infekte erişkin ve adolesanlar kemoprofilaksi almalıdır. Eğer üç ayda bir CD4 sayımı yapılamıyorsa CD4 sayısı >200 ve <250/mm³ olan hastalara da kemoprofilaksi verilmesi düşünülmelidir (61).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Klinik örnekler

Bu çalışmaya Mayıs 2011- Ocak 2012 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi (K.T.Ü) Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Hasta Hizmetleri Laboratuvarına değişik servis ve polikliniklerden gönderilen 35 hastanın solunum yolu örnekleri dahil edildi. Çalışmaya alınan toplam 35 örnekten 34 tanesi (% 97.2) servis hastalarından ve 1 tanesi (% 2.8) ise poliklinik hastasından alındı. Hasta dosyalarından her bir örneğe ait demografik ve klinik özellikler taranarak kaydedildi.

3.1.2. Araç ve Gereçler:

Otomatik pipetler (Lab-mate), pipet ucu, vorteks (Heidolph, Almanya), santrifüj (Sigma), elektroforez tankı (Owl), dijital güç kaynağı (EC-105), jel dökme tepsisi ve tarak, 250 ml erlenmayer, 50 ml mezür, buz makinesi (Scotsman), thermal cycler (ABI 9700, Applied biosystems), hassas terazi (Sartorius Laboratory), mikrodalga fırını (Beko), jel dökümantasyon sistemi (Bio-rad), UV ilüminatör (Vilber lourmat), -20°C derin dondurucu (Uğur), -80°C derin dondurucu (Thermo), 36±1°C inkübatör (dedeoğlu), deiyonize su cihazı (Barnstead) ve distile su cihazı (GFL), floresans mikroskobu (EUROStar-fluorescence microscope Euroimmun Almanya), VersaDoc (Bio-rad ABD).

3.1.3. Kimyasallar:

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler değişik firmalardan sağlandı. Giemsa boya (Merck 1.09204) Agaroz (Biochemical, Vivantis Molecular Biology Grade), etidyum bromür (Sigma), Tris HCl, EDTA, Glycerol, Amplifikasyon seti; dNTP seti (Roche, Almanya, Fermentas, ABD), Primerler (IDT, ABD, biomers, Almanya), 1 kb DNA marker (Fermentas), 550 bp DNA marker (Biolabs, New England), DL-Dithiothreitol (Sigma), Taq buffer DNA polimeraz with KCL (Fermentas), MgCL₂ (Fermentas)

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.1.1. Tris HCl (1 M)

80 ml deiyonize su üzerine 15.7 gr Tris HCl eklendi ve çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121° C'de 1 atm'de 15 dakikada steril edildi.

3.1.4.1.2. Etilendiamintetra-asetik asit disodyum tuzu (EDTA) (0.5 M)

80 ml deiyonize su üzerine 29.2 gr EDTA eklendi ve çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121° C'de 1 atm'de 15 dakikada steril edildi.

3.1.4.1.3. TE Tamponu

Son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1ml, EDTA (0.5 M) stok solüsyonundan 200 µl alınarak 98.8 ml distile suya eklendi.

3.1.4.1.4. Fosfat Tuzlu Su Tamponu (Phosphate Buffered Saline – PBS) :

Standart formüle göre (Dulbecco's PBS) 100 mililitre deiyonize suda, 1 tablet PBS çözüldü. Otoklavda steril ettikten sonra, pH'sı 7.2'ye ayarlandı ve oda ısısında saklandı. PBS, artık maddelerden temizlenmesi ve yıkanmasında, aynı zamanda İFA testinde preparatların yıkanmasında kullanıldı.

3.1.4.1.5. DTT hazırlanması (Dithiothreitol)

DTT % 0.3'lük hazırlandı. Distile suda çözüldü. 500 µl hacimde bölünerek -20'de saklandı

3.1.4.2. Master Mix İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.2.1. dNTP Mix:

1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 100 mM'lık dTTP, dATP, dGTP, dCTP'den 20'şer µl koyuldu ve üzerine 720 µl steril distile su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım kısa bir süre vortekslendi. Böylece 2.5 mM konsantrasyonunda dNTP karışımı elde edildi. Hazırlanan karışım 200'er µl olarak yeni, steril, DNase-free santrifüj tüplerine bölünerek kullanıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.1.4.2.2. Primer Mix:

Liyofilize haldeki primerler 100 pmol/µl olacak şekilde steril distile suyla sulandırılarak stok çözeltiler elde edildi. Her bir primer çifti için (10µl reverse primer ile 10µl forward primer), 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine stok çözeltilerden 20'şer µl koyuldu ve üzerine 180 µl

steril distile su eklenerek son konsantrasyonu 5 pmol/ μ l olan (her biri) primer mix hazırlandı. 10 saniye vortekslendi. Kullanılmıncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

3.1.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar:

3.1.4.3.1. 0.5X TBE buffer hazırlama protokolü

Tartılacak kabı hassas teraziye yerleştirip, darasını alındı. Tris base 27 gram ve Borik asit 13.5 gram tartıldı. Dengeli silindirin içine aktarıldı. Üzerine 5 ml EDTA (0.5 molar, pH 8.0) eklendi. 300-400 ml deiyonize su eklendi. Barı mezürun içine atıp karıştırarak kimyasalların su içinde çözünmesi sağlandı. Tamamen çözüldükten sonra 500 ml’ye tamamlandı. 5X TBE tamponu hazırlanmış oldu. Mezüre 500 ml 5XTBE tamponu döküldü. Deiyonize suyla 1 lt’ye tamamlandı ve üzerine 4.5 lt deiyonize su eklenerek toplam 5 lt’ye tamamlandı.

3.1.4.3.2. Etidyum Bromür Solüsyonu

Etidyum bromür 10 mg/ml olacak şekilde 10 ml distile su içerisinde çözüldü ve oda ısısında ışıktan korunarak saklandı.

3.1.4.4. Giemsa boyasının hazırlanması

Giemsa stok solüsyonundan 1ml alındı. 2ml distile su ile 10ml PBS sulandırıldı.

3.2. METOD

3.2.1. Hasta Örneklerinin Hazırlanması

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı’na gönderilen örnekler, steril falkon tüpüne konuldu. Üzerine örnek hacmi kadar SF eklendi. İyice vortexlendi. Sonra 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Dipte 1ml pellet kalacak şekilde, supernatan atıldı. Bunun üzerine 1ml SF eklenip, vortexlendi. 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Dipte 500 ml pellet kalacak şekilde, üstteki supernatan atıldı. Sonrasında IFA ve PZR işlemleri için numune bölünerek -70 °C’de saklandı.

3.2.2. İndirekt IF Testi

İndirekt IF testi için PNEUMO CEL INDIRECT (Cellabs) kiti kullanılarak yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce tüm reaktifler oda ısısına getirildi. Balgam ve mukuslu BAL örnekleri için; örnek ile eşit hacimde DTT solüsyonu (%0.3 dithiothreitol) karıştırıldı. İyice vortekslendi. 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. 1500 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet, 500 μ l PBS ile resüspanse edildi. İyice vortekslendi. Mukoid olmayan BAL

örnekleri için; örnek 1500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibinde 0.5 ml pellet kalacak şekilde süpernatant atıldı.

3.2.2.1. Lamların Hazırlanması

25 µl hasta örneği lam üzerine damlatıp, kuruması sağlandı. Lam asetonla 5 dakika fikse edildi. Aseton, örneğin üstünü tamamen kaplayacak şekilde döküldü. Şayet lamlar hemen boyanmayacaksa 0°C' nin altında birkaç hafta saklandı.

3.2.2.2. İFA Boyama

Fikse edilen örneğin üzerine 25µl RP2 monoklonal reagent eklendi. Lamlar 37°C'de 30 dakika nemli ortamda inkübe edildi. Daha sonra lamlar PBS ile 1 dakika nazikçe yıkanıp, kuruması sağlandı. 25µl anti-mouse Ig FITC reagent örneğin üzerine eklendi. Lamlar 37°C'de 30 dakika nemli ortamda inkübe edildi. Lamlar PBS ile 1 dakika nazikçe yıkanıp, tekrar kurumaya bırakıldı. Lam üzerine 1 damla RMF eklendi. Hava kabarcığı kalmayacak şekilde RMF'nin üzerine lamel kapatıldı. Örnekler floresans mikroskopunda (EUROStar-fluorescence microscope Euroimmun, Almanya) 400x büyütmede bakıldı. Hemen değerlendirilemeyecek lamlar karanlıkta 24 saate kadar 2-8°C'de saklandı.

3.2.3. *Pneumocystis jirovecii* PZR

Hasta örneklerinden *P. jirovecii* DNA izolasyonu prosedürüne başlamadan önce 200 µl örneğe 7 µl litikaz (0.665mg/ml) eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. DNA izolasyonu 'High Pure PCR Template Preparation Kit' (Roche Katolog no:11796828001) kullanılarak yapıldı. Önce elution buffer 70°C' ye konuldu.

- 1.5 ml steril mikrosantrifüj tüpüne 200µl örnek materyali ve 200 µl binding buffer ilave edildi, sonra 40 µl proteinaz K ilave edildi.
- Daha sonra vortekslenip, 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra süspansiyona 100 µl isopropanol eklenerek iyice karıştırıldı.
- Bir toplama tüpüne bir filtreli tüp yerleştirip, filtreli tüpün içine örnek pipetlendi.
- Tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra, filtreli tüp toplama tüpten çıkarılıp ve içindeki sıvıyla birlikte toplama tüpü atıldı.
- Filtreli tüpler yeni bir toplama tüpünün içerisine yerleştirilip 500µl inhibitör removal buffer ilave edildi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler toplama tüpten çıkarıldı ve içindeki sıvıyla birlikte toplama tüpü atıldı.
- Filtreli tüpler toplama tüplerin içerisine yerleştirilip 500µl wash buffer ilave edilerek 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.

- Filtreli tüpler toplama tüpten çıkarılıp ve içindeki sıvıyla birlikte atıldı. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpe yerleştirildi.
- Filtreli tüpler toplama tüplerin içerisine yerleştirilip 500µl wash buffer ilave edilerek 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler toplama tüpten çıkarılıp ve içindeki sıvıyla birlikte atıldı.
- Filtreli tüp yeni bir toplama tüpe yerleştirildi.20.000 rpm de 10 saniyede santrifüj yapıldı. Filtreli tüp toplama tüpten çıkarıldı ve toplama tüp atıldı.
- En son aşamada filtreli tüpler steril bir eppendorf tüpünün içerisine yerleştirilerek 70 °C ısıtılmış 200µl elution buffer eklenerek 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- DNA örnekleri bölünerek -20°C'de daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Çalışmamızda, solunum yolu örneklerinden izole edilen DNA'lar *P. jirovecii* aranmasına yönelik olarak amplifikasyona tabi tutuldu. Amplifikasyon için bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Amplifikasyon için Tablo 1'de verilen primerler kullanıldı (93).

Tablo 1: *Pneumocystis jirovecii* Araştırılmasında Kullanılan Primerler

Primer	Sekans(5'-3')	Ürün uzunluğu (bp*)
1724F	5'-AAGTTGATCAAATTTGGTC-3'	693
ITS2R	5'-CTCGGACGAGGATCCTCGCC-3'	
ITS1F	5'-CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC-3'	550
ITS2R1	5'-GTTCAGCGGGTGATCCTGCCTG-3'	

*bp: Baz pair

3.2.5. Master Mix Hazırlanması

Master mix hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 2'da verilmiştir.

Tablo 2: Nested PZR İçin Master mix1 ve Master mix2 Bileşenleri ve Miktarları

Komponent	Stok Konsantrasyonu	Master mix 1	Master mix 2
		Miktar(1x) μ l	Miktar(1x) μ l
Buffer	10x	5	5
dNTP	2.5mM	4	4
Primer mix ITS-1	10pmol	2.5	
Primer mix ITS-2	10pmol		2.5
Taq polimeraz	5u/ μ l	0.3	0.3
Ddw		28.2	36.2
Template		10	2
Toplam hacim		50	50

Master mix için gerekli malzemeler buz üzerinde bekletilerek çözülmesi sağlandı. dNTP ve Primerler bir saniye vortekslendi. Deiyonize su konulduktan sonra tüp 30sn vortekslenerek master mix karıştırıldı. Reaksiyon karışımı 50 μ l hacimde hazırlandı. Nested PZR 2 türlü yapıldığı için hazırlanan 1. master mix 40 μ l olacak şekilde, 2.master mix 48 μ l olacak şekilde 0.2ml'lik PZR tüplerine pipetlendi. İzole edilen DNA'lardan 1.tur için 10 μ l konuldu. Negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak da daha önceden pozitif bulunan hastanın DNA örneğinden 10 μ l eklendi. Bu şekilde hazırlanan tüpler thermal döngü cihazına (ABI 9700, Applied biosystems) yerleştirildi. İşlem bittiğinde 1.tur tamamlanmış oldu. Burada çoğaltılan DNA'lar 2.tur için kullanıldı. Hazırlanan master mix 2'ye 2 μ l ilave edildi. Tekrar thermal döngü cihazına yerleştirildi. PZR için termal döngü cihazında kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

ITS mastermix için Thermocycler koşulları:

Başlangıç denatürasyonu	94 °C'de	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C'de	1 dakika	} Toplam 35 siklus
Primer bağlanması	47 °C'de	1 dakika	
Primer uzaması	72 °C'de	2 dakika	
Başlangıç denatürasyonu	94 °C'de	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C'de	1 dakika	} Toplam 35 siklus
Primer bağlanması	59 °C'de	1 dakika	
Primer uzaması	72 °C'de	2 dakika	
Ek uzama	72 °C'de	5 dakika	

3.2.6. PZR Ürünlerinin Gösterilmesi:

Sonuçların değerlendirilmesinde agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı. Elektroforez için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 1 gram agaroz tartıldı. Erlenmayer'e konuldu. 50 ml 0.5XTBE erlenmayerdeki agarozun üzerine eklendi. Mikrodalga fırında 3 dakika agarozun erimesi sağlandı. Hazırlanan agaroz, el yakmayacak bir sıcaklığa kadar soğutuldu. Son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde Etidyum bromür eklendi. Jel dökme standına taraklar yerleştirildi. Hazırlanan agaroz solüsyonu jel dökme standına döküldü. Oda sıcaklığında agaroz solüsyonunun jele dönüşmesi (katılaşması) beklendi.

3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi :

Katılaştıran agarozdan tarak çıkarıldıktan sonra stand ile birlikte elektroforez tankının (Midwest scientific) içine yerleştirildi ve üzerini kapatacak şekilde TBE tamponu döküldü. 10 µl PZR ürünü kuyucuklara pipetlendi. Master mix hazırlarken kullanılan buffer renkli olduğundan jele PZR ürünlerinin yüklenmesi sırasında loading buffer kullanılmadı. Örnekler ilk 10 dk 70 voltta yürütüldükten sonra volt 100'e çıkarılarak 20 dk daha yürütüldü.

3.2.8. PCR Ürünlerinin UV Transilluminatör'de Görüntülenmesi :

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeldeki bantlar UV ilüminatörde (Cleaver) 254 nm dalga boyunda incelendi ve VersaDoc (Bio-Rad, ABD) ile fotoğrafı çekildi. Elde edilen bant büyüklükleri pozitif kontrol ve negatif kontrolle karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.2.9 Örneklerin Giemsa Boyası İle Boyanması

Hasta örneklerinden lamlara 25µl konuldu. Havada kurutuldu. Metanol ile tesbit edildi. örneklerin üzerini kaplayacak şekilde giemsa boyası döküldü. 30 dakika bekletildi. Musluk suyu ile yıkandı. Kurutma kağıdı ile kurutuldu. İmmersiyon yağı damlatıp mikroskopta incelendi.

4. BULGULAR

KTÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AbD Hasta Hizmetleri Laboratuvarına değişik servis ve polikliniklerden atipik pnömoni tanısı ile gönderilen hastaların solunum yolu örneklerinde *P. jirovecii* araştırıldı. *P. jirovecii* DNA varlığı nested PZR yöntemiyle incelendi. Boyama yöntemi olarak Giemsa boyama ve daha duyarlı olan İFA yöntemi tercih edildi. PZR, İFA ve Giemsa ile negatif bulunan hastaların klinikleri tekrar gözleendiğinde bir hastada aspergillus pnömonisi, diğer hastalarda bakteriyel pnömoni geliştiği görüldü. Hastalarda antibiyotik tedavisi ile düzelme görülmesi ve radyolojik bulgularında gerileme olması üzerine bizim sonuçlarımız teyid edildi.

Mayıs 2011 ile Ocak 2012 tarihleri arasında toplam 35 hastadan alınan solunum örnekleri çalışmaya dahil edildi. Hastaların klinik bilgileri Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Hasta örneklerinin kliniklere göre dağılımı

Örnek no	Materyal	Elde edildiği birim	Klinik tanı
1	BAL	Göğüs hast.polk	Pnömoni
2	BAL	Göğüs hast servisi	Pnömoni
3	BAL	Göğüs hast YB	Pnömoni
4	BAL	Hematoloji servisi	Malignite
5	BAL	Gastroenteroloji servisi	Pnömoni
6	Balgam	Gastroenteroloji servisi	Ülseratif kolit
7	Balgam	Göğüs hast servisi	Pnömoni
8	Balgam	Enfeksiyon hast.servisi	HIV
9	Balgam	Enfeksiyon hast.servisi	Pnömoni
10	Balgam	Göğüs hast YB	Malignite
11	Balgam	Nefroloji servisi	Transplantasyon
12	BAL	Enfeksiyon hast.servisi	Pnömoni
13	Tr.asp	Enfeksiyon hast.servisi	Pnömoni
14	Balgam	Enfeksiyon hast.servisi	HIV
15	BAL	Göğüs hast servisi	Pnömoni
16	BAL	Nefroloji servisi	Böbrek yetmezliği
17	Balgam	Enfeksiyon hast.servisi	Pnömoni
18	BAL	Enfeksiyon hast. servisi	Pnömoni

Tablo 3. Hasta örneklerinin kliniklere göre dağılımı (devamı)

19	Tr.asp	Nöroloji YB	Pnömoni
20	BAL	Göğüs hast servisi	Pnömoni
21	BAL	Göğüs hast servisi	Böbrek yetmezliği
22	Balgam	Nöroloji YB	Pnömoni
23	BAL	Göğüs hast servisi	Malignite
24	Balgam	Nöroloji servisi	Pnömoni
25	BAL	Göğüs hast servisi	Malignite
26	BAL	Göğüs hast servisi	Pnömoni
27	BAL	Göğüs hast servisi	HIV
28	Balgam	Hematoloji servisi	Transplantasyon
29	Balgam	Nefroloji servisi	Nefrotik sendrom
30	BAL	Nefroloji servisi	Pnömoni
31	Tr.asp	Göğüs hast YB	Pnömoni
32	Balgam	Enfeksiyon hast. servisi	Akut böbrek yetmezliği
33	BAL	Enfeksiyon hast. servisi	Pnömoni
34	BAL	Göğüs hast servisi	Pnömoni
35	BAL	Nefroloji servisi	Pnömoni

Tr.asp: trakeal aspirat, Göğüs hast.YB: Göğüs hastalıkları yoğun bakım

Hastaların 21'inde (%60) pnömoni saptandı. 4 (%11.4) hastada malignite, 3 (%8.5) hastada HIV, 3 (%8.5) hastada böbrek yetmezliği, 2 (%6) hastada transplantasyon, 1 (%2.8) hastada nefrotik sendrom, 1 (%2.8) hastada ülseratif kolit saptandı. Örneklerin 10'u (%28.5) göğüs hastalıkları servisinden, 9'u (%26) enfeksiyon servisinden, 1'i (%3) göğüs hastalıkları polikliniğinden, 5'i (%14) yoğun bakım servislerinden, 10'u (%28.5) dahiliye servislerinden gönderildi. Örneklerin klinik materyallere göre dağılımı şu şekilde idi. (Tablo 4)

Tablo 4. Örneklerin klinik materyallere göre dağılımı

Örnek Tipi	Sayı	%
BAL	19	54.3
Balgam	13	37.2
Tr.asp	3	8.5
Toplam	35	100

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik bulguları, altta yatan hastalıkları, kullandıkları antibiyotikler ve steroidler ile akciğer grafileri incelendi. Hastaların 25'i (%71) steroid tedavisi almaktaydı. Hastaların 3'ü (%8.5) profilaktik olarak TMP-SMX kullanmaktaydı. Hastaların akciğer grafilerininin 23'ünde (%65.7) infiltrasyon, 1'inde (%3) atelettazi, 2'sinde (%5.6) kalsifikasyon, 9'unda (%25.7) buzlu cam dansiteleri saptandı. CD4 sayısı sadece 4 hastada bakıldı ve 200 hücre/ml altında bulundu. Hastaların klinik bulguları Tablo 5'da verilmiştir.

Tablo 5. Hastaların klinik bulguları

Örnek no	Eşlik eden hastalık	CD4 sayısı	Antibiyotik kullanımı	AC grafisi	Steroid kullanımı	PCP varlığı
1	Astım	-	Sefaperazon	Yamalı infiltrasyon	Prednizon	-
2	AC kanseri	-	Amoksisilin-klavulanik asit	Yaygın infiltrasyon	Prednizon	-
3	Solunum yetmezliği		İmipenem	Bilateral infiltrasyon	Metatreksan	-
4	Lenfoma	-	-	Bilateral infiltrasyon	Prednizon	-
5	Ülseratif kolit	-	-	Yaygın infiltrasyon	Prednizon	-
6	Tiroidit	-	Levofloksasin	İnfiltrasyon	Prednizon	-
7	HIV+HBV	84	Ampisilin-sülbactam	Bilateral infiltrasyon	-	IFA+,PZR+ Giemsa-
8	KOAH+H CV	-	TMP-SMX	Atelaktezi	-	-
9	SVO+HCV	-	Meropenem	Bazalde infiltrasyon	Prednizon	-
10	Nefrotik sendrom+H BV	200<	PTZ	Işınsal infiltrasyon	Prednizon	IFA+,PZR+ Giemsa-
11	Brucella+E BV	-	Rifampin	Buzlu cam dansiteleri	Prednizon	-
12	ABY+KK Y	-	İmipenem+Kolistin	Buzlu cam dansiteleri	-	-
13	Tbc	-	Levofloksasin	Bilateral infiltrasyon	Prednizon	-
14	ABY	-	Seftriakson	Bilateral infiltrasyon	-	-
15	Nefrotik sendrom	200<	PTZ	Buzlu cam dansiteleri	-	IFA+,PZR+ Giemsa-
16	HBV+HIV	-	Ampisilin	Buzlu cam	Prednizon	-
17	HIV	53	Levofloksasin	Buzlu cam dansiteleri	-	IFA+,PZR- Giemsa-
18	ABY	-	PTZ	Bilateral infiltrasyon	Prednizon	-
19	AML+Tbc	-	Rifampisin	İnfiltrasyon	-	-
20	KBY+Tbc	-	Amoksisilin-klavulanik asit	İnfiltrasyon	-	-

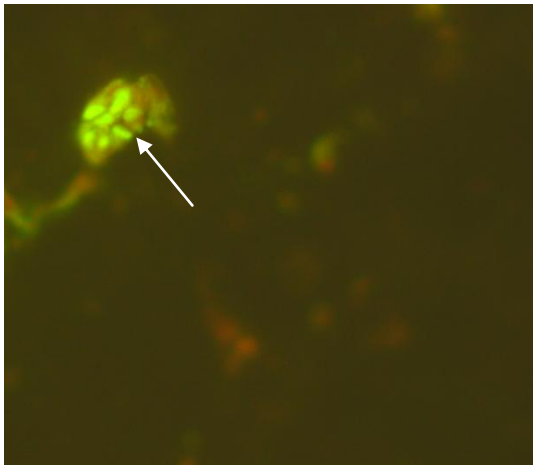
21	Parkinson	-	Seftriakson	İnfiltrasyon	Prednizon	-
22	Kronik ITP+Lenfoma	-	Seftriakson	İnfiltrasyon	-	-
23	KBY+Tbc	-	Klaritromisin	İnfiltrasyon	Prednizon	-
24	Aspergilloz	-	AmfoterisinB	Buzlu cam	Prednizon	-
25	AC kanseri	-	Klaritromisin	Yaygın infiltrasyon	-	-
26	KİT+AML	-	Amoksisilin-klavulanik asit	Buzlu cam dansiteleri	Prednizon	-
27	KBY	-	TMP-SMX	Buzlu cam dansiteleri	Deltacortil	-
28	KBY	-	Levofloksasin	Buzlu cam dansiteleri	Deltacortil	-
29	KİT+AML	-	Levofloksasin	Yaygın infiltrasyon	-	-
30	Leptospirozis	-	TMP-SMX	İnfiltrasyon	Prednizon	-
31	Kronik bronşit+MDS	-	Seftriakson	Sol bazalde infiltrasyon	Prednizon	-
32	ABY	-	Tigesiklin	Yaygın infiltrasyon	Prednizon	-
33	HCV+bronşit	-	Meropenem	İnfiltrasyon	Prednizon	-
34	Nefrotik sendrom +Tbc	-	Moksifloksasin	Kalsifiye granülom	Prednizon	-
35	ABY+Tbc	-	Ampisilin-sülbactam	Milimetrik kalsifikasyon	Prednizon	-

PTZ: piperasilin-tazobaktam, ABY: akut böbrek yetmezliği, KKY: konjestif kalp yetmezliği, ITP: idiyopatik trombositopenik purpura, MDS: miyeloid displastik sendrom, TMP-SMX: trimetoprim sülfametaksazol, KİT: kemik iliği transplantasyonu, AML: akut miyeloid lösemi.

İFA yöntemiyle 4 (%11) BAL örneğinde PCP pozitif sonuç bulundu. İFA yönteminde pozitif sonucun görünümü resim 1’de verilmiştir. Giemsa boyasıyla boyanan örneklerin tamamı negatif bulundu. Nested PZR yöntemiyle 3 (%8.6) BAL örneğinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Örneklerden bir tanesi sadece İFA yöntemi ile pozitif bulunmuş, nested PZR yöntemi ile negatif sonuç alınmıştır. PZR yöntemiyle pozitif sonuç alınıp İFA yöntemi ile negatif sonuç alınan örneğe rastlanmamıştır. İFA yöntemiyle negatif sonuç elde edilen örnek sayısı ise 31 olarak saptanmıştır. Nested PZR yöntemiyle negatif sonuç alınan örnek sayısı 32 olarak saptanmıştır. PCP pozitif olan örneklerin tamamı BAL örneklerinde saptanmıştır. Hastaların sonuçları Tablo 6’de gösterilmiştir.

Tablo 6. Hastaların PCP sonuçları

	Pozitif	Negatif	Toplam
PZR	3	32	35
İFA	4	31	35
Giemsa boyama	-	35	35

Resim 1. *P.jirovecii* kistlerinin İFA yöntemiyle görüntüsü

PCP pozitif olan birinci hasta; öksürük, ateş, balgam çıkarma, göğüs ağrısı, nefes darlığı, üşüme, titreme, halsizlik şikayetleriyle başvurmuş. Akciğer grafisinde bilateral infiltrasyon, CRP 3, LDH 800, CD4 84 görülmüş. HIV (+), HBV olan hastadan tbc, balgam, BAL, mantar kültürleri gönderilmiş ve negatif gelmiştir. Hastaya 10 gün ampicilin-sulbaktam tedavisi uygulanmış düzelme olmaması üzerine bronkoskopi yapılmıştır. Laboratuvarımıza gönderilen BAL örneğinde İFA ve PZR ile PCP pozitif bulundu. Giemsa boyamada *P.jirovecii* görülemedi. Bunun üzerine TMP-SMX tedavisi başlanan hastanın durumunun düzelmesi üzerine taburcu edildi.

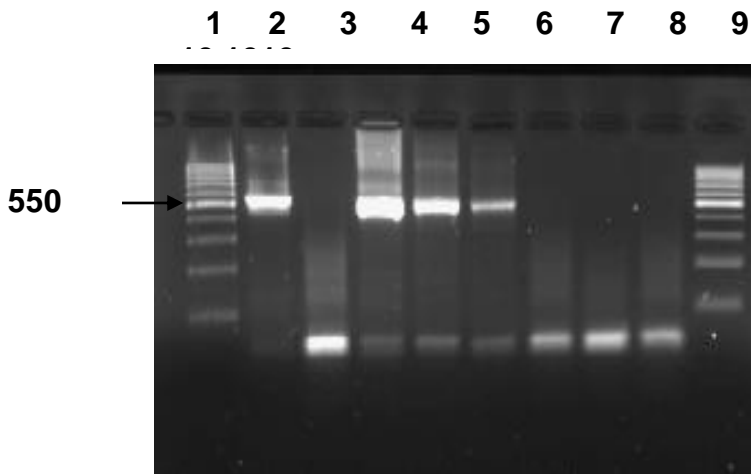
İkinci hasta; öksürük, ateş, balgam çıkarma, dispne, ses kısıklığı şikayetleriyle gelmiş. Akciğer grafisinde bilateral infiltrasyon, orta zonlarda yoğun opasiteler ve nodüler görünüm tesbit edilmiş. Hastaya pnömoni ile HBV, nefrotik sendrom tanıları konmuş. Prednizolon, piperasilin-tazobaktam, siklosporin, moksifloksasin tedavisi başlanmış. Balgam ve BAL kültüründe üreme olmamış, tbc, CMV negatif çıkmış. BAL örneği PCP için gönderildiğinde PCR ve İFA ile pozitif bulundu. Giemsa boyamada *P.jirovecii* görülemedi. Hastaya 14 gün TMP-SMX tedavisi verildi. Pnömoni bulguları düzelen hastanın nefrotik sendrom nedeniyle tedavisine devam edildi.

Üçüncü hasta; öksürük, ateş, kilo kaybı, balgam çıkarma, halsizlik şikayetleri ile başvurmuş. Akciğer grafisinde infiltrasyon, CRP 3, LDH 468, CD4 sayısı 53, lokosit 6600 u/l olan hastada 2 ay önce HIV (+)'liği tesbit edilmiş. Levofloksasin tedavisi 6 gün verildikten sonra düzelme görülmemiş. BAL örneğinde İFA ve PZR ile PCP pozitif bulundu. Giemsa boyamada *P.jirovecii* görülemedi. PCP klinik ve radyolojik bulguları ile uyumlu. Levofloksasin tedavisi kesildi. Hastaya 14 gün TMP-SMX tedavisi verildi. Genel durumu düzelen, vital bulguları stabil seyreden hasta taburcu edildi.

Dördüncü hasta; ateş, öksürük, balgam çıkarma, nefes darlığı şikayetleri olan hastanın, genel durumu orta idi ve akciğer grafisinde solda infiltrasyon tesbit edilmişti. Akciğer biyopsi sonucu Aspergillozis tanısı konmuş ve amfoterisin B başlanmış olan hastanın BAL örneğinde PCP çalışıldı. PZR negatif, İFA pozitif bulundu. Giemsa boyamada *P.jirovecii* görülemedi. İkinci kez tekrar çalışıldığında sonuç değişmedi. TMP-SMX tedavisi verilmeden hasta taburcu edildi.

PZR ile Yapılan yöntemlere göre alınan pozitif sonuçların görüntüleri Resim 2' de verilmiştir.

Resim 2. *P.jirovecii* 'ye ait DNA ürünlerinin jeldeki görüntüsü



1: moleküler ağırlık standardı (100bp), 2: pozitif kontrol, 3: negatif kontrol, 4-5-6: pozitif hasta, 7-8-9: negatif hasta, 10: moleküler ağırlık standardı (100bp)

5. TARTIŞMA

Pneumocystis türleri dünyada HIV hastalarının en fazla görüldüğü Afrika, Asya, Latin Amerika ülkelerinde yaygın olarak saptanan oportunistik patojendir (1). PCP genellikle AIDS olan hastaların %80'de görülmekte ve AIDS' lı hastaların %60'da başlangıç bulgusu olarak görülmektedir (7). Bizim çalışmamızda, HIV (+) olan iki hastada PCP pozitif saptandı.

Kortikosteroid kullanımı PCP'ye yatkınlık oluşturan en önemli etkenler arasında yer almaktadır (60). Rodriguez ve arkadaşları (48) prednizonun iki haftayı aşan bir süre içerisinde günde 20 mg ve üzerinde alınması durumunda anti-*Pneumocystis* profilaksisi endikasyonu olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki hastaların çoğunda steroid tedavisi aldıkları görüldü.

PCP epidemiyolojisi HIV/AIDS salgınının ortaya çıkması ile dramatik olarak değişmiştir. ABD'de 1980'lerde PCP, AIDS tanımlayıcı hastalık olarak erişkin ve adolesanların üçte ikisinde bildirilmiştir. HIV ile infekte kişilerin yaşamları boyunca %75'inde PCP geliştiği belirtilmiştir. Epideminin erken dönemlerinde CD4+ T hücre sayısı <200/ml olan HIV ile infekte kişilerde PCP insidansı, 20 olgu/100 kişi-yıl iken 1989 yılında PCP profilaksisinin uygulanmaya başlanması ve etkili kombine antiretroviral tedavinin kullanımı ile PCP insidansında önemli bir azalma sağlamıştır. 1995'de 4.9 olgu/100 kişi-yıl'a düşmüş olan insidans 1998'de 0.3 olgu/kişi-yıl'a kadar gerilemiştir. İnsidansın azalmasına rağmen PCP hala HIV ile infekte hastalarda en sık görülen ciddi fırsatçı infeksiyonlar arasındadır. PCP düşük-orta gelirli ülkelerde artan oranlarda bildirilmektedir. Uganda'da yapılan bir çalışmada pnömoni tablosu ile başvuran 83 HIV ile infekte hastanın % 38.6'sına PCP tanısı konduğu bildirilmiştir (82). HIV ile infekte kişilerde PCP tablosu diğer immünsüpresif olan hastalardan farklıdır. Hastalık genelde subakut başlangıçlıdır, semptomlar diğer immünsüprese kişilere göre daha uzun süredir mevcuttur. İki grubun karşılaştırıldığı çalışmalarda HIV ile infekte kişilerde yüksek arteriyel oksijen basıncı ve düşük alveoler-arteriyel oksijen gradyanı, BAL örneklerinde anlamlı olarak daha yüksek sayıda mikroorganizmaya karşılık daha düşük sayıda nötrofil varlığı bildirilmiştir (90). Akciğer grafisinde genellikle bilateral, diffüz, simetrik retiküler ya da granüler opasiteler saptanır. Semptom, fizik muayene ve akciğer grafi bulgularının kombinasyonu PCP için tanı

koydurucu değildir, tanı için boyanmış solunum yolu örneklerinde karakteristik kist ve/veya trofozoitlerin mikroskopik olarak görülmesi gerekmektedir. Bronkoskopi ve BAL, PCP tanısı için tercih edilen yöntemdir, sensitivitesi %89-98'dir (82).

Sağlıklı insan topluluklarının enfeksiyon kaynağı olabileceğine dair kanıtlar artmaktadır. Altta yatan bir akciğer hastalığı bulunmayan yada bağışıklık sistemi baskılanmamış insanlarda yürütülen son yıllara ait bir çalışmada, 50 kişiden alınan orofarengiyal yıkama örneklerinin %20'sinde, mitokondriyal geniş alt birim ribozomal geni hedefleyen nested PZR ile *P.jirovecii* pozitif bulunmuştur (87).

PCP gelişmesinde en temel risk faktörü immünsüpresyon düzeyidir. Hastalık gelişenlerde CD4 düzeyi, profilaksi uygulanan olgularda yaklaşık 100/ml, uygulanmayanlarda yaklaşık 20/ml'dir. CD4 sayısı 200/ml'nin üzerinde olan hastalarda son derece ender görülür. HIV (+) hastalarda klasik klinik tabloda, haftalar içinde gelişen kuru öksürük, ateş ve dispne vardır. En sık görülen radyografik özellik, bilateral interstisyel infiltrasyonlar (buzlu cam görünümü) olmasıdır. Buna karşılık, özellikle inhale pentamidin ile profilaksi alan hastalarda atipik radyografik *Pneumocystis* kolonizasyonu ile CD4 lenfosit sayının ilişkisinin araştırıldığı çalışmada CD4 sayısındaki artış ile kolonizasyon riskinin azaldığı (53), diğer bir çalışmada ise CD4 sayısı ile kolonizasyonun ilişkili olmadığı bildirilmiştir (88,96). Çalışmamızda PCP pozitif olan hastaların CD4 düzeyleri 20 ile 200/mm³ arasında değişmekteydi.

Pneumocystis kolonizasyonu ile ilgili olabilecek diğer başka faktörler araştırılmış, kişinin oturduğu bölge ve sigara içiminin kolonizasyon riskini arttırdığı bildirilmiştir (96). Epidemiyolojik çalışmalarda PCP hastalarından izole edilen *P. jirovecii* genotiplerinin hastanın doğduğu yere değil hastanın tanısının konulduğu bölgeye ait olduğu gösterilmiştir (88). Başka bir çalışmada *P. jirovecii* ile enfekte hastalarının BAL örneklerinde ilk olarak saptanan genotiplerin 6 ay sonra saptanan genotiplerle farklılık gösterdiği bildirilmiştir (96). Bu hasta grubu içerisinde, bilinen HIV/AIDS hastaları, yüksek doz glukokortikoid alanlar, yeni biyolojik ajanlar da dahil olmak üzere çoklu immünsüpresan ilaç tedavisi alanlar, özellikle hematolojik kökenliler olmakla beraber, malignite tanısı alanlar, organ transplantasyonu ve PCP profilaksisi almamış veya profilaksiyi kesmiş olan hastalar sayılabilir. Bu hastalarda, klinik olarak ilişkili yerlerden indüklenmiş balgam veya BAL örnekleri alınmalıdır. Özellikle real time PCR ile olmak üzere, moleküler yöntemlerin duyarlılığının yüksek olması nedeniyle bu tanı modalitelerinin kullanılması önerilmektedir. Bu teknolojiye henüz sahip olmayan klinik laboratuvarlarda, mikroskopik inceleme, yerel

laboratuvar personelinin en deneyimli olduğu histokimyasal boya kullanılarak yapılmalıdır (33).

Pnomosistozis tanısında altın standart mikroskopi ile *Pneumocystis* türlerinin kist veya trofozoit formunun gösterilmesidir. Son yıllarda *Pneumocystis* türlerinin tanısında özgülüğü ve duyarlılığı yüksek olan PZR yöntemi, mikroskopi ile birlikte kullanılmaya başlanmıştır (98). Sing ve ark.'larının (91) 574 solunum yolu örneği ile yaptığı çalışmada klasik PZR, nested PZR ile boyama yöntemleri karşılaştırıldı. HIV(+) hastalarda her üç yöntemle duyarlılık %100 bulundu. Bu hasta grubunda nested PZR'ın spesifitesi daha yüksekti. Diğer immunsupresif hastalarda da klasik PZR'ın ve nested PZR'ın duyarlılığı %100 iken boyama yöntemlerinin duyarlılığı %80 idi. Vargas ve ark. (54) yaptıkları çalışmalarda ise Giemsa ve onun hızlı çeşidi olan Diff-Quik boyamasının duyarlılığının % 50- 84 arasında Toluidin mavisi O ile Gomori metanamin gümüş boyalarının duyarlılığının % 49-60 arasında olduğu bildirilmiştir

Yaptığımız bu çalışmada, immun sistemi baskılanmış ve klinik olarak atipik pnomoni bulguları olan hastalarda Giemsa boyası, İFA ve nested PZR yöntemini kullanarak *P.jirovecii* varlığının araştırılması hedeflenmiştir. Giemsa boyasıyla hiçbir hastada pozitiflik bulunmadı. Klasik boyama yöntemlerinin maliyeti ucuz, çalışma süresi daha kısa olması gibi avantajları olmasına rağmen, değerlendirmenin subjektif olması ve tecrübeli teknisyen gerektirmesi gibi dezavantajları vardır. Ayrıca örneğin kalitesi ve alınma zamanı da önemlidir. TMP-SXT kullanılmadan önce örneğin alınması gerekmektedir. Bu nedenle boyama yöntemlerinin başarısı kısıtlıdır.

İndirekt floresan antikor testi, Gomori metanamin gümüş boyasına göre yüksek duyarlılık ve özgülüğe sahiptir (97). Çalışmamızda İFA yöntemiyle 4 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Khan ve ark.'larının (97) yaptığı çalışmaya göre PZR yönteminin, *P.carinii*'yi tespit etmekte mikroskopi ve İFA'dan 10^4 ile 10^6 kat duyarlı olduğunu göstermiştir. Klinik örnekte 0.5-1 organizma/mikrolitre bulunması durumunda bile PZR tespit etmektedir. Özellikle nested PZR yapılması halinde duyarlılığın daha fazla arttığı ifade edilmektedir. Nested PZR ile basit PZR yönteminin karşılaştırıldığı bu çalışmada hedef bölge ilk turda 3200 kat, ikinci turda 12800 kat çoğaltıldığı tespit edilmiştir. 46 örneğin % 23.9'unda basit PZR ile pozitiflik saptanırken, nested PZR'da % 45.6 olduğu rapor edilmiştir. Yine bu çalışmada örneklerin % 4.3'ünde İFA pozitifliği tespit edilmiştir (97).

Sing ve ark.'larının çalışmasında AIDS hastalarının BAL örneklerinde PCP tanısında mikroskopi ve PZR yöntemleri birlikte uygulandığında %100 duyarlı ve özgül olduğu saptanmıştır. Bu hastalarda sadece nested PZR uygulanmasında %100 duyarlı ancak % 97.5 özgül olduğu tespit edilmiştir (91). Bizim çalışmamızda bir hastada İFA ile pozitif, nested PZR yöntemiyle negatiflik bulunmuştur. Bu hastanın klinik bulguları ile radyolojik bulguları tekrar değerlendirildiğinde PCP ile uyumlu olduğu görülmüştür. Nested PZR'da negatif bulunmasının nedeni, PZR'ı inhibe eden bir sebepten olduğu düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda PCP tanısının İFA ile nested PZR yöntemlerindeki duyarlılık oranları sırasıyla % 8,6 ile % 11 olarak bulunmuştur. Hastaların PCP tanısı klinik, radyolojik bulgular ve tedaviye verdikleri cevap ile doğrulanmıştır.

PCP hastalarında serum LDH düzeylerinde yükselme de görülmektedir. Ancak bu özgül bir belirteç olmaktan çok altta yatan akciğer inflamasyonunun ve hasarın göstergesi olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle LDH düzeyleri tedaviye takip amacıyla kullanılmaktadır (99). Mermut G. ve ark. yaptıkları bir çalışmada Pneumocystis pnömonisinde yüksek serum LDH seviyelerinin duyarlılığı %82 ile %100 arasında bildirilmektedir. Ancak LDH nonspesifik bir testtir. Pulmoner ve non pulmoner birçok durumda yüksekliği görülür (100). Bizim hastalarımızda da LDH düzeyleri başlangıçta yüksekken tedavi sonrası düşme görüldü.

AIDS ve diğer risk grubundaki hastalarda yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan PCP'nin tanısının hızlı konması ve tedaviye erken başlanması çok önemlidir. Ayrıca hastalardan mikroorganizma oranının çok fazla olduğu BAL ve indüklenmiş balgam gibi örnekler istenmelidir. Tanı için en uygun örnek BAL'dır. Bizim çalışmamızda da tüm pozitiflik BAL örneklerinde bulunmuştur.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1-Örneklerin 10'u (%28.5) göğüs hastalıkları servisinden, 9'u (%26) enfeksiyon servisinden, 1'i (%3) göğüs hastalıkları polikliniğinden, 5'i (%14) yoğun bakım servislerinden, 10'u (%28.5) dahiliye servislerinden gönderildi.

2-Örneklerin 19'u (%54.3) BAL, 13'ü (%37.2) balgam, 3'ü (%8.5) tr. asp. örneklerinden elde edildi.

3-Nested PZR yöntemiyle değerlendirmeye alınan örneklerden 3'ü (% 8.6) pozitif saptandı. İFA yöntemiyle değerlendirmeye alınan örneklerden 4'ü (% 11) pozitif saptandı.

4- Giemsa boyasıyla boyanan örneklerde pozitiflik bulunmadı.

5-Pozitif bulunan örneklerin tamamı BAL örneğiydi.

6- Örneklerden bir tanesi sadece İFA yöntemi ile pozitif bulunmuş, nested PZR yöntemi ile negatif sonuç alınmıştır.

7-Solunum örneklerinde Giemsa boyama, nested PZR ve İFA yöntemiyle *P.jirovecii* araştırıldığında, İFA'nın PZR'a göre *P.jirovecii* saptamada anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak özellikle immun supresif tedavi alan, AIDS ve hematoloji hastalarında PCP akılda tutulmalıdır. Pneumocystis pnömonisinin klinik bulgularının özgün olmaması sebebiyle kesin tanı için laboratuvar tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Uygun örnek, zamanında gönderilmelidir. Mikrobiyolojik boyalarla negatif çıkan sonuçlar duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan nested PZR ve İFA gibi yöntemlerle tekrar çalışılmalıdır rutin tanı için kullanımı önerilmektedir.

.

.

ÖZET

Solunum Yolu Örneklerinde İzole Edilen *Pneumocystis jirovecii* Varlığının Araştırılması.

P.jirovecii bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli fırsatçı pnömoni etkenidir. Bu çalışmada, Mayıs 2011-Ocak 2012 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarına farklı klinik ve polikliniklerden atipik pnömoni ön tanısı ile gönderilen solunum yolu örneklerinde *Pneumocystis* varlığı araştırılmıştır. Toplam 35 hastanın solunum örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada immun sistemi baskılanmış hastalardan izole edilen örneklerde Giemsa boyama, indirekt floresan antikor (İFA), iki türlü polimeraz zincir reaksiyonu (nPCR), yöntemleri kullanılarak *P.jirovecii*'nin varlığı araştırılmıştır. Örneklerin 3'ü (%8.6) nPCR ile 4'ü (%11) İFA yöntemiyle pozitif bulunmuştur. Giemsa boyama yöntemiyle boyanarak mikroskopik olarak incelendi. *P.jirovecii* görülemedi.

Sonuç olarak hastalığın erken tanı konulması ve tedaviye zamanında başlanması amacıyla hızlı ve güvenilir tanı yöntemi olan İFA ve PCR'm rutin uygulanması gerektiği düşünülmüştür

Anahtar sözcükler: *Pneumocystis jirovecii*; tanı yöntemleri; Giemsa boyama, PCR, İFA.

SUMMARY

Detecting of *Pneumocystis jirovecii* in Respiratory System Samples

P.jirovecii is an important opportunistic pneumonia agent in immunosuppressed patients. The aim of this study was to investigate *Pneumocystis jirovecii* isolated from clinical specimens in the Laboratories of Karadeniz Technical University Hospital between May 2011 January 2012. In this study, presence of *Pneumocystis jirovecii* was investigated in immunocompromised patients who were presenting with the clinical symptoms of atypical pneumonia, Giemsa stain, indirect fluorescent antibody (IFA) test and nested polymerase chain reaction (nPCR) methods. 35 patients were included in the study. Three of the sample (%8.6) were found to be positive by the nPCR, four of them (%11) were found to be positive by IFA method. Samples were stained Giemsa staining methods and examined microscopically. All samples remain negative for fungus including *Pneumocystis jirovecii*.

As a result, for the appropriate treatment and prophylaxis of *P.jirovecii* infections, IFA and PCR rapid and reliable diagnostic test should be used for diagnosis.

Key words: *Pneumocystis jirovecii*; diagnosis method; Giemsa stain, PCR, IFA

9. KAYNAKLAR

1. Wazir J F, Ansari N A: Pneumocystis carinii Infection Update and Review ,Arch Pathol Lab Med Vol 128, September, 2004.
2. Pinlaor S, Mootsikapun P, Pinlaor P, Phunmanee A, Pipitgool V, Sithithaworn P, Chumpia W, Sithithaworn J: PCR diagnosis of Pneumocystis carinii on sputum and bronchoalveolar lavage samples in immunocompromised patients. Received: 12 May 2004
3. Stringer J R, Beard C B, Miller R F, Wakefield A E: A new name (Pneumocystis jirovecii) for pneumocystis from humans, Emerging Infectious Diseases. Vol. 8, No. 9, September, 2002.
4. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L: Epidemiology and clinical significance of pneumocystis colonization, The Journal of Infectious Diseases. 197:10 –7, 2008.
5. Delanoe P, Delanoe M, De la Ra Re te de : Pneumocystis carini chez les cobayes de la region de Paris, absence de kystes chez d'autre animaux (lapin, grenouille, 3 anguilles). Bull.Soc.Pathol. Exot. 7: 271-212, 1914.
6. Csillag A: Contribution to the taxonomical classification of the so called Pneumocystis carini. Acta Microbiol. Acad.Sci Hung. 4:1-8, 1957.
7. Likar M, Kresrik V: Experimentally induced Pneumocystis granuloma in mice. Zentbl. Allg.Pathol.94: 335-340, 1956.
8. Redhead S, Cushion M T, Frenkel J K, Stringer J R: Pneumocystis and Trypanosoma cruzi nomenclature and typifications. J.Eukaryot.Microbiol.53:2-11, 2006.
9. Edman J C, Kovacs J A, Masur H, Sand D V, Elwood H V, Sogin M L: Ribosomal RNA sequence shows Pneumocystis carini to be a member of the fungi. Nature 11 334:519-522, 1988.
10. Stringer S L, Hudson K, Blase M A, Walzer P D, Cushion M T, Stringer J R: Sequence from ribozomal RNA of Pneumocystis carini compared to those of four fungi suggest on ascomycetous affinity. J.Protozool. 36: 143-169, 1989.
11. Stringer S L, Stringer J R, Blase M A, Walzer P D, Cushion M T: Pneumocystis carini .Sequence from ribozomal RNA implies a close relationship with fungi.Exp.Parasitol.68:450-461,1989.
12. Cushion M T: Pneumocystis unraveling the cloak of obscurity. Trends Microbiol.12: 243-249, 2004.

13. Cushion M T, Slaven B E, Smulian A G: Pneumocystis genome project and genome organization, p.163-182 Walzer P D, Cushion M T: Pneumocystis pneumonia. Marcel-Dekker, New York, N.Y, 2005.
14. Alexopoulos C J, Mims C W, Blackwell M: Introductory Mycology, 4th ed.p.258-271 John Wiley and Sons, Inc,New York, N.Y, 1996.
15. Eriksson O E: Pneumocystis carinii, a parasite in lungs of mammals referred to a new family and order (Pneumocystidaceae, Pneumocystidales, Ascomycota). Syst. Ascomycetum 13: 165-180, 1994.
16. Vavra J, Kucera K: Pneumocystis carinii Delanoe: its ultrastructure and ultrastructural affinities. J Protozool. 17: 463- 83, 1970.
17. Edman J C, Edman U, Cao M, Lundgren B, Kovacs J A, Santi D V: Isolation and expression of the Pneumocystis carinii dihydrofolate reductase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 8625- 8629, 1989.
18. Edman J C, Kovacs J A, Masur H, Santi D V, Elwood H J, Sogin M L: Ribosomal RNA genes of Pneumocystis carinii. J Protozool. 36: 18-20,1989.
19. Lin H, Niu M T, Yoganathan T, Buck G A: Characterization of the rRNA encoding genes and transcripts, and a group- I self splicing intron in Pneumocystis carinii. Gene. 119: 163-73, 1992.
20. Liu Y, Rocourt M, Pan S, Liu C, Leibowitz M J: Sequence and variability of 5.8S and 26S rRNA genes of Pneumocystis carinii. Nucleic acids Res. 20: 3763- 72, 1992.
21. Lee C H, Helweg- Larsen J, Lundgren B, Lundgren J D, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett M S, Lu J J, Olsson M, Luvass S B, Roux P, Cargnel A, Atzori C, Matos O, Smith J W: Update on P.carinii f. sp. hominis typing based on nucleotide sequence variations in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. J Clin Microbiol. 36: 734-41, 1998.
22. Tang X, Bartlett M S, Smith J W, Lu J J, Lee C H: Determination of copy number of rRNA genes in Pneumocystis carinii f. sp. hominis. J Clin Microbiol. 36: 2491- 94, 1998.
23. Hughes W T: Prologue to AIDS: the recognition of infectious opportunists. Medicine (Baltimore). 77: 227-32, 1998.
24. Hughes W T: Pneumocystis carinii pneumonia. N Engl J Med. 297: 1381- 83, 1977.
25. Weverling G J, Mocroft A, Ledergerber B et al: Discontinuation of Pneumocystis carinii pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. Lancet. 353: 1293- 98, 1999.

26. Vargas S L, Ponce C A, Gigliotti F, Ulloa A V, Prieto Munoz M P, Hughes W T : Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol.* 38: 1536- 38, 2000.
27. Bartlett M S, Smith J W: *Pneumocystis carinii*, an opportunist in immunocompromised patients *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. p. 137-149, 1991.
28. Klastersky J, Aoun M: Opportunistic infections in patients with cancer. *Annals of Oncology* 15: 329-35, 2004.
29. Gordon S M, La Rosa S P, Kalmadi S, Arroliga A C, Avery R K, Truesdell-La Rosa L, Longworth D L: Should prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in solid organ transplant recipients ever be discontinued? *Clin Infect Dis.* Feb;28(2):247-9, 1999.
30. Soave R: Prophylaxis strategies for solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis* 33 (Suppl 1): 26-31, 2001.
31. *Pneumocystis pneumonia*, Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 30: 250-2, 1981.
32. Sepkowitz K A: Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 34:1098–1107, 2002.
33. Thomas C F, Limper A H: *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med* 350:2487–2498, 2004.
34. Bollee G, Sarfati C, Thiery G, et al. Clinical picture of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in cancer patients. *Chest* 132:1305–1310, 2007.
35. Dungarwalla M, Marsh J C, Tooze J A et al: Lack of clinical efficacy of rituximab in the treatment of autoimmune neutropenia and pure red cell aplasia: implications for their pathophysiology. *Ann Hematol* 86:191–197, 2007.
36. Kolstad A, Holte H, Fossa A et al: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in B-cell lymphoma patients treated with the rituximab-CHOEP-14 regimen. *Haematologica* 92:139– 140, 2007.
37. Kalyoncu U, Karadag O, Akdogan A, et al: *Pneumocystis carinii* pneumonia in a rheumatoid arthritis patient treated with adalimumab. *Scand J Infect Dis* 39:475– 478, 2007.
38. Kaur N, Mahl T C: *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) pneumonia after infliximab therapy: a review of 84 cases. *Dig Dis Sci* 52:1481–1484, 2007.
39. Harigai M, Koike R, Miyasaka N: *Pneumocystis pneumonia* associated with infliximab in Japan. *N Engl J Med* 357:1874–1876, 2007.
40. Lahiff C, Khiaron O B, Nolan N et al: *Pneumocystis carini* pneumonia in a patient on etanercept for psoriatic arthritis. *Ir J Med Sci* 176:309–311, 2007.

41. Amit Z, Kaneshiro E S: Heterogeneity of Pneumocystis sterol profiles of samples from different sites in the same pair of lungs suggests coinfection by distinct organism populations, *J Clin Microbiol*, 39(3):1137–9p, 2001.
42. Casanova-Cardiel L and Leibowitz M J Presence of Pneumocystis carinii DNA in pond water, *J Eukaryot Microbiol*, 44(6):28p, 1997.
43. Bauer N L, Paulsrud J R, Bartlett M S: Pneumocystis carini organisms obtained from rats, ferrets, and mice are antigenically different, *Infect Immun*, 61(4):1315–9p,1993.
44. Olsson M, Sukura A, Lindberg L A, et al: Detections of Pneumocystis carinii DNA by filtration of air. *Scan J Infect Dis*. 28: 279-82,1996.
45. Lundgren B, Elvin K, Rothman L P, et al: Transmission of Pneumocystis carinii from patients to hospital staff. *Thorax*. 52:422- 4,1997.
46. Calderon E J: Epidemiology of Pneumocystis infection in Human. *Journal de Mycologie Médicale* 19, 270—275, 2009.
47. Miller R F: Pneumocystis carinii infection in non AIDS patients. *Current Opin. Infec.Dis*. 12:371, 1999.
48. Rodriguez M, Fishman J A: Prevention of infection due to Pneumocystis spp. in human immunodeficiency virus negative immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 17:770-82, 2004.
49. Nevez G, Guyot K, Totet A, Raccurt C, Dei- Cas E: Pulmonary colonisation with Pneumocystis carinii in an immunosuppressed HIV negative patient: detection and typing of the fungus by PCR. *J Med Microbiology*. 50: 198- 200, 2001.
50. Ng V L, Yajko D M, Hadley W K: Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev*. 10: 401–18,1997.
51. Walzer P D: Pneumocystis carinii- New clinical spectrum? *N England J Med*. 324: 263-265, 1991.
52. Wakefield A E, Pixley F J, Banerji S : Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from Pneumocystis carinii DNA of rat and human origin, *Mol Biochem Parasitol*, 43(1):69–76p, 1990.
53. Leigh T R, Gazzard B G, Rowbottom A, Collins J V: Quantitative and qualitative comparison of DNA amplification by PCR with immunofluorescence staining for diagnosis of Pneumocystis carini pneumonia, *J Clin Pathol*, 46(2):140–4p, 1993.
54. Vargas S L, Ponce C A, Sanchez C A: Pregnancy and asymptomatic carriage of Pneumocystis jiroveci, *Emerg Infect Dis*, 9(5):605–6p, 2003.

55. Peters S E, English K, Laakkonen J, Gurnell J: DNA analysis of *Pneumocystis carinii* infecting Finnish and English shrews, *J Eukaryot Microbiol* 41(5):108p, 1994.
56. Nevez G, Magois E, Duwat H: Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects, *Clin Infect Dis* 42(11): 99–101p, 2006.
57. Alison M, Scirba F C, Lebedeva I P, Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization, *Am J Respir Crit Care Med*, 170(4):408–13p, 2004.
58. Nevez G, Pruna A, Jounieaux V: A search for *Pneumocystis carinii* DNA by polymerase chain reaction on bronchoalveolar lavage fluids from patients with Wegener's granulomatosis, *Rheumatology*, 38(10):1025–7p,1999.
59. Maskell N A, Waine D J, Lindley A: Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study, *Thorax*, 58(7):594–7.p, 2003.
60. Fishman J A: Prevention of infection due to *Pneumocystis carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 995-1004,1998.
61. Alan M S: *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi. *Klimik 2007 XIII. Türk klinik mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları kongresi*,2007.
62. Miller R F, Ambrose H E, Wakefield A E: *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent healthcare workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 39:3877–3882, 2001.
63. Wakefield A E, Lindley A R, Ambrose H E et al: Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 187:901–908, 2003.
64. Montes-Cano M A, de la Horra C, Dapena F J et al: Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 13:1008–1011, 2007.
65. Morris A, Scirba F C, Lebedeva I P et al: Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med* 170:408–413, 2004.
66. Calderon E J, Rivero L, Respaldiza N et al: Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis* 45:e17–e19, 2007.
67. Peterson J C, Cushion M T: *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Curr. Opin. Microbiol.*8: 393-398,2005.

68. Icenhour C R, Rebholz S L, Collins M S, Cushion M T: Widespread occurrence of *Pneumocystis carini* in commercial not colonies detected using targeted PCR and oral swabs. *J.Clin.Microbiol.* 39: 3437-3441,2001.
69. Limper A H, Martin W J: *Pneumocystis carini*: Inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment, *J Clin Invest.*85:391- 396p, 1990.
70. Pottratz S T, Paulsrud J R, Smith J S, Martin, W J: Evidence for *Pneumocystis carini* binding to a cell- free substrate: Role of the adhesive protein fibronectin, *J Lab Clin Med,* 123:273–81p,1994.
71. Steele C, Shellito J E, Kolls, J K: Immunity against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis*, *Med Mycol,* 43(1):1–19p, 2005.
72. Koziel H, Eichbaum Q, Kruskal B A: Reduced binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor downregulation. *J Clin Invest,* 102(7):1332–44p,1998.
73. Zhang J, Zhu J, Imrich A: *Pneumocystis* activates human alveolar macrophage NF-kappaB signaling through mannose receptors, *Infect Immun,* 72(6):3147–60p, 2004.
74. De Stefano J A, Cushion M T, Puvanesarajah V, Walzer P D: Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. II. sugar composition, *J Protozool,* 37(5):43–41p, 1990.
75. Vassallo R, Thomas C F, Vuk-Pavlovic Z, Limper A H: Alveolar macrophage interactions with *Pneumocystis carini*, *J Lab Clin Med,* 133(6):535–40p.1999.
76. Fleury J, Escudier E, Pocholle M J: Cell population obtained by bronchoalveolar lavage in *Pneumocystis carinii* pneumonitis, *Acta cytol.* 29(5):721–6p,1985.
77. Wallace J M, Hansen N I, Lavange L: Respiratory disease trends in the pulmonary complications of HIV infection study cohort, pulmonary complications of hiv infection study group, *Crit Care Med,* 155(1):72– 80p,1997.
78. Walzer P D, La Bine M, Redington T J and Cushion M T: Lymphocyte changes during chronic administration of and withdrawal from corticosteroids: relation to *Pneumocystis carinii* pneumonia, *J Immunol,* 133(5):2502–8p,1984.
79. Beck J M, Newbury R L, Palmer B E: Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice, *J Lab Clin Med,* 128(5):477–87p,1996.
80. Walzer P D: *Pneumocystis carinii*. In: Mandell G L, Bennet JE, Dolin R, (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases.* New York: Churchill Livingstone, 2475, 1995.
81. Hughes W T: *Pneumocystis carinii* pneumonia. In: Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR (eds), *Infectious Diseases.* Philadelphia: W.B. Saunders Co, 601, 1998.

- 82.** Huang L, Morris A, Limper A H, et al: An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in Pneumocystis pneumonia (PCP). Proc Am Thorac Soc 3:655–664, 2006.
- 83.** Wang Y, Doucette S, Qian Q, et al: Yield of primary and repeat induced sputum testing for Pneumocystis jirovecii in human immunodeficiency viruspositive and negative patients. Arch Pathol Lab Med 131:1582–1584,2007.
- 84.** De Lorenzo L J, Huang C T, Maguire G P, Stone D J: Roentgenographic patterns of Pneumocystis carinii pneumonia in 104 patients with AIDS. Chest.91:323-7,1987.
- 85.** Bergin C J, Wirth R L, Berry G J, Castellino R A: Pneumocystis carinii pneumonia: CT and HRCT observations. J Comput Assist Tomogr.14:756-9, 1990.
- 86.** Medrano F J, Montes Caro M, Conde M, Horra de la C, Respaldiza N, Gasch A, Perez-lozano M J, Varela Calderon E J: Pneumocystis jirovecii in general population. Emerg. Infect.Dis. 11: 245-250,2005.
- 87.** Huang L, Crothers K, De Oliveira A: Application of an mRNAbased molecular viability assay to oropharyngeal washes for the diagnosis of Pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients, A pilot study, J Eukaryot Microbiol, 50:618–20p, 2003.
- 88.** Rabodonirina M, Raffenet D, Cotte L, Bobbieux A, Mayenc M, Bayle G , Persat F, Rabatel F, Trepo C, Peyramond D, Piens M A: Rapid detection of Pneumocystis carinii in bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency virus-infected patients: Use of a simple DNA extraction procedure and Nested PCR, J. Clin. Microbiol ,Nov. p. 2748–2751,1997.
- 89.** Leibovitz E, Pollack H, Moore T, Papellas J, Gallo L, Krasinski K, Borkowsky W: Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of Pneumocystis carinii from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. J. Clin. Microbiol. Nov. p. 3004–3007,1995.
- 90.** Krajicek B J, Thomas C F and Limper A H: *Pneumocystis* pneumonia: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment, Clin Chest Med, 30(2):265–78p, 2009.
- 91.** Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, et al: Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for Pneumocystis carini in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. J.Clin.Microbiol. 38:1461-1467, 2000.
- 92.** Elbüken Gülşah: Pneumocystis jiroveci enfeksiyonu ve akciğer tutulumu,Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 33 (2) 97-103, 2007.

93. Lu J J, Chen C, Bartlett M S, Smith J W, Lee C H: Comparison of Six Different PCR Methods for Detection of *Pneumocystis carinii*. *J.Clin.Microbiol. Oct.*, p. 2785–2788, 1995.
94. Walzer P D, Smulian A G: *Pneumocystis*, p.3080-3094. In Mandell G L, Bennet J E, Dolin P: *Principles and practice of infections diseases*. Elsevier, Inc.2005.
95. Icenhour C R, Rebholz S L, Collins M S, Cushion M T: Early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. *Eukaryot.Cell* 1:414-419, 2002.
96. Tsolaki A G, Miller R F, Underwood A P: Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia, *J Infect Dis*, 174(1):141–56p,1996.
97. Khan M A, Farrag N, Butcher P: Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Immunofluorescence staining, simple PCR or nPCR. *Jour. Infect.* 39. 77-80, 1999.
98. Charles F, Thomas J R, Andrew H, Limper M D: *Pneumocystis Pneumonia*, *Engl J Med*, 350:2487–98p, 2004.
99. Özkoç S, İnceboz T, Sifil A, Tuncay S, Akısü Ç: Böbrek transplantasyonlu bir hastada *Pneumocystis pnömonisi*. *Türkiye Parazitoloji Derg*, 34: 186-9, 2010.
100. Mermut G, Avcı M, Zencir M: *Pneumocystis pnömonisi*. *Bamçag Bülteni*. Aralık; 1: D7 – 10, 2010.