

BURCU SAPMAZ

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



DOKTORA TEZİ

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL – 2021

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

AKCİĞER HASTALIĞI TANISI ALAN BİREYLERDE
PNEUMOCYSTIS JIROVECII ARAŞTIRILMASI

BURCU SAPMAZ

DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK ŞATANA

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL – 2021

İTHAF

Koşulsuz sevgilerini her daim hissettiğim kıymetli aileme...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimime başladığım günden beri her konuda destek, yardım ve ilgisini esirgemeyerek bana yol gösteren, içten tavrı ile her zaman yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Dilek ŞATANA'ya rehberliği, öğrettikleri ve emeği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimime başladığım günden beri beni yüreklendiren, değerli katkılarını ve eleştirilerini benden esirgemeyen, içten, anlayışlı tez izleme komitesi üyesi değerli hocam Prof. Dr. Hrisi Bahar TOKMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince değerli katkılarını ve eleştirilerini benden esirgemeyen, tez izleme komitesi üyesi değerli hocam Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Betigül ÖNGEN, Prof. Dr. Meltem UZUN, Prof. Dr. Zayre ERTURAN, Prof. Dr. Özden BÜYÜKBABA BORAL, Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU, Doç. Dr. Gülseren AKTAŞ, Doç. Dr. Lütfiye ÖKSÜZ, Doç. Dr. Hayriye KIRKOYUN UYSAL, Doç. Dr. Sevim MEŞE ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖNEL'e teşekkür ederim.

Doktora tez sürecim boyunca beni yüreklendiren, anlayışlı, güler yüzü, yakınlığı ile her konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Gonca ERKÖSE GENÇ'e teşekkür ederim.

Doktora tez sürecimde, klinik örneklerin toplanmasında yardımcı olan Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa ERELEL'e teşekkür ederim.

Doktora tezimin deneysel aşamalarında bana büyük bir özveriyle yol gösteren, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER'e; verdiği destek ve gösterdiği hoşgörü için teşekkür ederim.

Doktora tez sürecimin deneysel ve yazım aşamalarında, emeklerinin karşılığını ödeyemeyeceğim, karşılıksız desteği ile her zaman yanımda olan sahici dostum, kardeşim Dr. Öğr. Üyesi Özer AKGÜL'e, tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Doktora tez sürecimde yanımda olarak destek veren, yardımlarını, hoşgörülerini ve manevi desteklerini her anımda hissettiğim tüm dostlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince, maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyerek özveriyle bana güç veren, hayatımın her anında yanımda olan, birlikte büyüdüğüm, değerli eşim Çağatay Candaş SAPMAZ'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31228.

İÇİNDEKİLER

İTHAF	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	X
ABSTRACT	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Sınıflandırma	4
2.3. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü	5
2.4. <i>Pneumocystis</i> Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri.....	8
2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş	8
2.6. Patogenezi	10
2.7. İmmün Yanıt.....	11
2.7.1. Doğal İmmün Yanıt.....	12
2.7.2. Kazanılmış İmmün Yanıt	13
2.7.2.1. Hücresel İmmün Yanıt	13
2.7.2.2. Humoral İmmün Yanıt.....	13
2.8. PCP	14
2.9. Mikrobiyolojik Tanı.....	15
2.9.1. Mikroskopik Tanı	16
2.9.2. PCR	17
2.9.3. Serolojik Testler	18
2.10. İlaç Direnci.....	20
2.11. Tedavi ve Korunma	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Olgular.....	24
3.2. Çalışma Örneklerinin Saklanması	25

3.3. Mikroskopik İnceleme.....	25
3.3.1. <i>Pneumocystis jirovecii</i> İndirekt Floresan Antikor Testi	25
3.3.1.1. Lamların Hazırlanması.....	25
3.3.1.2. İmmünflorasan Boyama Prosedürü	25
3.4. Moleküler Yöntemler	26
3.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	26
3.4.2. Amplifikasyon	27
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA.....	39
KAYNAKLAR	49
FORMLAR	70
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen olgulara ait yaş verileri	30
Tablo 2. Çalışmaya dahil edilen olguların cinsiyet dağılımları	30
Tablo 3. Çalışmaya dahil edilen olguların akciğer hastalıkları gruplarına göre dağılımı	31
Tablo 4. IFA ve PCR inceleme sonuçları	33
Tablo 5. PCR ile <i>P. jirovecii</i> açısından pozitif olarak saptanan örneklerle ait veriler	33
Tablo 6. PCR ile <i>P. jirovecii</i> saptanan/saptanmayan olguların demografik ve klinik verilerine ait karşılaştırmalı istatistiki sonuçlar	35
Tablo 7. IFA ve PCR yöntemlerinin <i>P. jirovecii</i> saptamadaki uyumlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	36
Tablo 8. <i>P. jirovecii</i> DHPS mutasyon analizi.....	37
Tablo 9. PCR ile DHPS bölgesinde amplifikasyon saptanan örneklerle ait veriler	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>Pneumocystis jirovecii</i> yaşam döngüsü	6
Şekil 2. <i>Pneumocystis jirovecii</i> kist form	7
Şekil 3. <i>Pneumocystis jirovecii</i> trofik form	7
Şekil 4. Folat sentezinin sülfametoksazol ve trimetoprim ile inhibisyonu	21
Şekil 5. IFA ile pozitif saptanan bazı hastalara ait görüntüler	32
Şekil 6. Çalışmaya dahil edilen örneklerin Texas red (orange) ile elde edilen amplifikasyon eğrileri	34



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome/Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu

ART: Antiretroviral Tedavi

BAL: Bronkoalveolar lavaj

BG: (1->3)- β -D-glukan

CD4: Cluster of Differentiation 4

CD8: Cluster of Differentiation 8

DHFR: Dihidrofolat redüktaz

DHPS: Dihidropteroat sentaz

DNA: Deoksiribonükleik Asit

HIV: Human Immunodeficiency Virus/İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü

IFA: İndirekt Floresan Antikor

KL-6: Krebs von den Lungen-6 antijeni

KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

LDH: Laktat dehidrojenaz

MSG: Major yüzey glikoproteini

MtLSU: Mitochondrial large subunit

PCP: Pneumocystis Pnömonisi

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Real-time qPCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

SAM: S-Adenozil metiyonin

TMP/SMX: Trimetoprim/sulfametoksazol

ÖZET

Sapmaz B. Akciğer Hastalığı Tanısı Alan Bireylerde *Pneumocystis jirovecii* Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul 2021.

Fırsatçı mantarlar grubunda yer alan *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*)'nin akciğer hastalıklarındaki kolonizasyonu güncel araştırmalarda popüler bir konu haline gelmiştir. Bu çalışmada akciğer hastalığı tanısı alan kişilerde konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile *P. jirovecii* varlığının araştırılması ve tedaviyi negatif yönde etkileyen Dihidropteroat sentaz (DHPS) mutasyon varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya Eylül 2018-Eylül 2020 tarihlerinde akciğer hastalığı nedeni ile izlenen 20-85 yaş aralığındaki ($53,22 \pm 16,47$) toplamda 94 hastadan (%38,4 kadın; %61,7 erkek) alınan bronkoalveolar lavaj (BAL) örneği dahil edilmiştir. BAL örneklerindeki *P. jirovecii* varlığı konvansiyonel olarak İndirekt Floresan Antikor (IFA) testi ile, moleküler olarak mtLSU gen bölgesinin hedeflendiği kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile belirlenmiş, olası ilaç direnç durumu ise DHPS fas gen bölgesini hedefleyen qPCR ile araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 94 BAL örneğinin PCR ile 22 (%23,4)'sinde, IFA ile ise 20 (%21,3)'sinde *P. jirovecii* tespit edilmiş ve yöntemlerin orta derecede uyumlu olduğu belirlenmiştir ($\kappa = 0,387$; $p < 0,001$). PCR ile *P. jirovecii* varlığı saptanan hastaların 12'sinin (%54,5) akciğer kanseri, 8'inin (%36,4) KOAH, 1'inin (%4,5) interstisyel akciğer hastalığı ve yine 1'inin (%4,5) pnömoni tanısı aldığı ($p < 0,001$) ve DHPS amplifikasyon profili ile bu 22 hastanın 12'sinde (%54,5) wild tip *P. jirovecii* var olduğu belirlenmiştir. Bu araştırma ile kronik akciğer hastalığı olan kişilerde saptanan %23,4'lük *P. jirovecii* pozitifliği ağırlıklı olarak kolonizasyon lehine değerlendirilmiş olsa da immün sistemin baskılanması ile bu kişilerin PCP gelişimi için risk altında olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, çalışmada sadece wild tip *P. jirovecii* saptanmış olması ülkemiz için umut verici bir bulgu olmakla birlikte hem *P. jirovecii* varlığı hem de ilaç direnç durumlarının inceleneyeceği ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

Anahtar Kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*, PCP, PCR, DHPS mutasyon, Akciğer hastalığı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31228.

ABSTRACT

Sapmaz B. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in Patients Diagnosed with Lung Disease. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology. Ph. D. Thesis. Istanbul 2021.

Colonization with *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), which is in the group of opportunistic fungi, in patients with lung diseases has become a popular topic in current research. In this study, it was aimed to investigate the presence of *P. jirovecii* with conventional and molecular methods and to perform Dihydropteroate synthase (DHPS) mutation analysis. Bronchoalveolar lavage (BAL) samples taken from a total of 94 patients (38.4% female; 61.7% male) between the ages of 20-85 (53.22 ± 16.47) who were followed-up for lung diseases between September 2018 and 2020 were included in this study. The presence of *P. jirovecii* in BAL samples was conventionally determined by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFA) and by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) with targeted mtLSU gene region, and the possible drug resistance status was investigated by qPCR with DHPS primers. *P. jirovecii* was detected in 22 (23.4%) of 94 BAL samples by PCR and in 20 (21.3%) by IFA, and the methods were found to be moderately compatible ($\kappa=0.387$; $p < 0.001$). It was determined that *P. jirovecii* PCR positive patients have diagnosed with lung cancer in 12 (%54.5), COPD in 8 (%36.4), interstitial lung disease in 1 (%4.5) and pneumonia in 1 (%4.5) ($p < 0.001$), and only wild type *P. jirovecii* was detected in 12 of these 22 patients (54.5%) with the DHPS amplification profile. Although the *P. jirovecii* positivity of 23.4% found in people with chronic lung disease was predominantly evaluated in favor of colonization, it was thought that these patients might be at risk for the development of PCP with suppression of the immune system. Moreover, despite the fact that only wild type *P. jirovecii* was detected in this study is a promising finding for our country, it is clear that further studies are needed to evaluate both the presence of *P. jirovecii* and drug resistance status.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, PCP, PCR, DHPS mutations, Lung disease

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.
Project No. 31228

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğere tropizm gösteren tek hücreli atipik fırsatçı bir mantar olan *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde pnömoniye neden olarak dünya çapında dağılım gösterir ¹. İlk keşfedildiği dönemde protozoon olarak değerlendirilen *P. jirovecii*'nin yapılan moleküler çalışmalardan elde edilen veriler sonucunda bir mantar türü olduğu kabul edilmiştir ².

P. jirovecii nadiren farklı klinik tablolara neden olmakla birlikte klinikte en sık pnömoni etkeni olarak görülmektedir. *P. jirovecii* pnömonisi (PCP) 1960'lı yıllarda konjenital immün yetmezliği olan çocuklar ve malignite tedavisi gören yetişkinlerde nadir sporadik vakalar olarak bildirilmiş, 1980'li yıllarda ise kazanılmış immün yetmezlik sendromunun (AIDS) ortaya çıkmasıyla vaka sayılarında artış gözlenmiştir ³⁻⁵.

P. jirovecii'nin özellikle AIDS hastalarında, malignitesi olan, organ transplantasyonu yapılan, steroid veya kronik immünsüpresif tedavi alan immün sistemi baskılanmış kişilerde ağır solunum yetmezliği tablosuna neden olabileceği bilinmektedir. Günümüzde HIV pozitif kişilerde antiretroviral tedavi (ART)'nin yaygın olarak uygulanması hastalığın insidansını önemli ölçüde azaltmıştır. Ancak PCP özellikle gelişmekte olan ülkelerde, immün sistemi baskılanmış HIV negatif bireylerdeki pnömoninin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir ⁶⁻⁹. Ek olarak, asemptomatik *P. jirovecii* kolonizasyonu immünokompetan bireylerde giderek daha fazla tanımlanmaktadır ^{10,11}.

P. jirovecii kolonizasyonu saptanan kişilerin, rezervuar rolü oynadığı ve bu kişilerin duyarlı hale gelmeleri durumunda mevcut kolonizasyondan PCP gelişim riski taşıdıkları belirtilmektedir ¹². *P. jirovecii* varlığı için zemin hazırlayıcı konumda bulunan patolojiler arasındaki en önemli yerin, patojenin doğası gereği kronik akciğer hastalıkları olduğu bilinmektedir. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), astım, bronşiolit gibi akciğerde sık saptanan ve kronik gidişat gösteren bu hastalıklarda, immün sistemin pro-inflamatuvar sitokin yönünde kaydığı, *P. jirovecii* kolonizasyonunun sık gözlenebileceği veya hastalık şiddetinde artış oluşabileceği düşünülmektedir ^{1,12-14}. Son yıllarda yapılan çalışmalar iyatrojenik olarak immün baskılanma gelişen hastaların yanı sıra akut ve kronik birçok

akciğer hastalığında %2,6-70 arasında *P. jirovecii* kolonizasyonunun saptandığını bildirmektedir ^{1,12,15-19}.

Hastalığın kliniğinde dispne, takipne, non-produktif öksürük, ateş ve siyanoz görülmektedir. Hastalığın fizik muayenesinde spesifik bir bulgunun olmadığı ancak radyolojik görüntüleme yöntemleri ile olgularda interstisyel pnömoni tablosunun hâkim olduğu bildirilmektedir ²⁰⁻²². Etkenin erken dönemde konulan mikrobiyolojik tanısı ile PCP kaynaklı morbidite ve mortalite oranlarının azalabileceği bildirilmektedir. *P. jirovecii* kültürde üretilmediğinden etkenin kesin tanısı bronkoalveolar lavaj (BAL), indüklenmiş balgam ya da akciğer biyopsi örneği gibi solunum yolu örneklerinde organizmanın mikroskopik olarak konvansiyonel boyalar veya monoklonal antikorların kullanıldığı immünfloresan yöntemler ile gösterilmesi ve moleküler yöntemlerle spesifik *P. jirovecii* DNA'sının saptanmasıyla konulabilmektedir ^{1,23}. *P. jirovecii*'nin moleküler tanısında polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) çoğaltılmak üzere büyük yüzey glikoprotein geni (MSG), mitokondriyal büyük alt birim (mtLSU) rRNA geni, dihidropteroat sentaz (DHPS) geni, ısı şok protein (HSP) 70 geni, beta-tubulin geni ve cyclin-dependent kinase (cdc2) geni gibi farklı gen bölgeleri hedeflenmektedir ²⁴.

Klinik örneklerden *P. jirovecii* tespitinde moleküler yöntemlerin kullanılması tanı duyarlılığını arttırmıştır. Özellikle yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip real-time PCR yöntemi; kantitasyonu mümkün hale getirmesi, mikroskobinin negatif fungal yükün düşük olduğu hastalarda erken tanı sağlayabilmesi ve kolonizasyon/infeksiyon ayırımına olanak sağlaması açısından üstün olarak değerlendirilmektedir ^{25,26}. Ancak, yine de, PCR'ın pozitif mikroskobinin negatif olduğu durumlarda, sonuçların klinik ve radyolojik bulgular ile birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir ¹¹.

P. jirovecii infeksiyonunun profilaksi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaç trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX)'dür. Mikroorganizmanın DHPS enzimini kodlayan folik asit sentez (fas) geninde oluşan mutasyonlar nedeniyle bu ilaca direnç gelişebilmekte ve bu durum tedavi ve profilaksi başarısızlığına neden olmaktadır ^{27,28}.

Çalışmamızda altta yatan akciğer hastalığı veya pulmoner semptomlar nedeni ile izlenen ve tanısal amaçla bronkoskopi yapılarak BAL örneği alınan

hastalardaki *P. jirovecii* varlığının İndirekt Floresan Antikor (IFA) testi ile mikroskopik ve qPCR yöntemi ile moleküler olarak araştırılması ve *P. jirovecii* tanısında iki yöntemin birbirlerine olan üstün/zayıf olan yönlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, profilaksi ve özellikle tedavi başarısını olumsuz yönde etkileyen etkendeki olası ilaç (TMP-SMX) direnç durumunun moleküler yöntemler ile incelenerek *P. jirovecii* DHPS mutasyon analizinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Pneumocystis türleri filamentöz yapıda olmayan, memelilerin akciğerlerinde yerleşim gösteren ve dünyada yaygın olarak saptanan mantarlardır ²⁹.

Pneumocystis ilk defa 1909 yılında Carlos Chagas tarafından keşfedilmiş ve yanlışlıkla *Trypanosoma*'nın yeni bir formu olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra Doktor Antonio Carini de 1910 yılında, *Trypanosoma lewisi* ile infekte sıçanların akciğerinde benzer kistler saptadığını bildirmiştir. Üç sene sonra Paris Pasteur Enstitüsü'ndeki Delanöe çifti *Trypanosoma* ile infekte olmayan sıçanların akciğerlerinde de benzer yapıları saptamışlar, yeni bir tür olarak tanımlamışlar ve daha önce sıçanlar üzerinde etkeni saptamış olan Carini'ye atfen *P. carinii* olarak isimlendirmişlerdir ³⁰.

İnsanda ilk *Pneumocystis carinii* enfeksiyonu, 1942'de iki Hollandalı araştırmacı; Van der Meer ve Brug tarafından 3 olguda gözlenmiştir ³¹. İkinci Dünya Savaşı sonrası Avrupa'da bir bakımevinde kalan yetersiz beslenen çocuklarda görülen interstisyel plazma hücreli pnömoni epidemisi ile Vanek ve Jirovec tarafından tanımlanmıştır ^{32,33}. Daha sonra 1960'lı yıllarda malignite tedavisi alan yetişkinler ve konjenital immün yetmezlikli çocuklarda sporadik vakalar olarak bildirilmiştir ³⁴. 1980'li yıllarda AIDS hastalığının ortaya çıkmasıyla PCP vaka sayısında artış gözlenmiştir ³⁵. İmmünitesi baskılanmamış bireylerde mikroorganizmanın hastalık oluşturmadığı bildirilmektedir ³⁶. Eski terminolojide *Pneumocystis carinii* olarak adlandırılan etkene, 1999 yılında Frenkel tarafından, 1951 yılında yeni doğanlarda mikroorganizmayı tanımlamış olan Çek parazitolog Otto Jirovec'in ismine atfen *Pneumocystis jirovecii* adı verilmiştir. Bu değişiklikle *Pneumocystis carinii* adı sadece sıçanlarda enfeksiyon etkeni olan tür için kullanılmaya başlanmıştır ³⁷.

2.2. Sınıflandırma

Keşfedildikten sonra yıllarca, *Pneumocystis*'in protozoaya özgü morfolojik özellikler sergilemesi, trofozoit ve kist yaşam formlarının olması ve ayrıca *Pneumocystis*'in pentamidin, trimetoprim ve sülfametoksazol gibi anti-protozoon

ilaçlara duyarlı olması nedeniyle bir protozoon olduğu düşünülüyordu. Ancak, 1988'de, 16S, 5.8S ve 26S ribozomal RNA alt biriminin filogenetik analizlerinden sonra, *Pneumocystis* cinsinin mantarlar alemine ait olduğu doğrulanmıştır. Günümüzde *Pneumocystis* cinsinin mantar taksonomisi içindeki filogenetik sınıflandırması: *Ascomycota* filumu, *Taphrinomycotina* altfilumu, *Pneumocystidomycetes* sınıfı, *Pneumocystidales* takımı, *Pneumocystidaceae* ailesi ve *Pneumocystis* cinsi şeklindedir ^{38,39}.

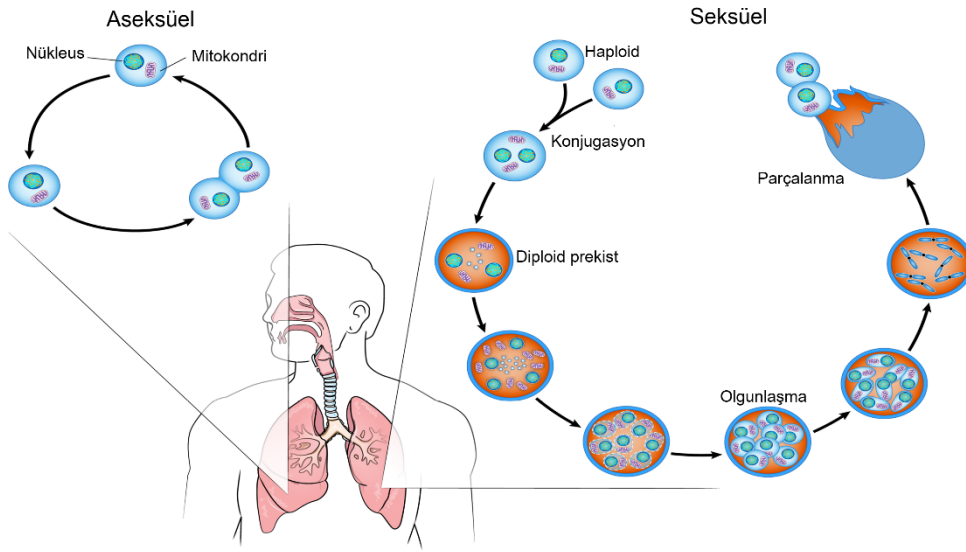
İnsan ve diğer memeli konakçı türlerinden izole edilen *Pneumocystis* organizmaları ile yapılan DNA sekans analizleri *Pneumocystis*'in birden fazla tür içeren bir organizma kompleksi olabileceğini ve *Pneumocystis* infeksiyonunun konakçı türe spesifik olduğunu göstermiştir ^{40,41}.

1999'da insanlara bulaşan patojenin, daha önce insanlarda patojeni tanımlayan Çek parazitolog Otto Jirovec'in onuruna *Pneumocystis jirovecii* (eski adı ile *P. carinii* f. sp. *hominis*) olarak yeni bir binom terimiyle yeniden adlandırılması önerilmiştir ³⁷.

İnsanlarda infeksiyon etkeni olan *P. jirovecii*, rat kaynaklı olan *P. carinii* ve *Pneumocystis wakefieldiae*, laboratuvar farelerinden izole edilen *Pneumocystis murina*, tavşanlardan izole edilen ise *Pneumocystis oryctolagi* olarak adlandırılan türlerdir ^{42,43}.

2.3. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

Pneumocystis uzun süreli, güvenilir ve devamlı bir kültür sistemi ile üretilmediği için, *Pneumocystis*'in morfolojisi ve yaşam döngüsüne ait çalışmalar, mikroorganizmanın infekte akciğerlerde veya kısa süreli kültürlerinde görülen formlarının, ışık ve elektron mikroskobu ile tanımlanan çeşitli yaşam döngüsü aşamalarına dayanmaktadır ^{44,45}.



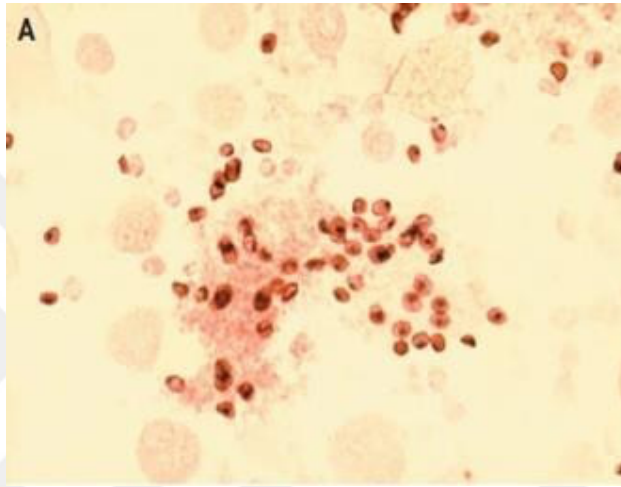
Şekil 1. *Pneumocystis jirovecii* yaşam döngüsü ⁴⁶

Organizmaya ait olarak gözlenen üç gelişim basamağı trofik (trofozoit), prekist (sporosit) ve kist formu olarak isimlendirilmektedir ⁴⁷.

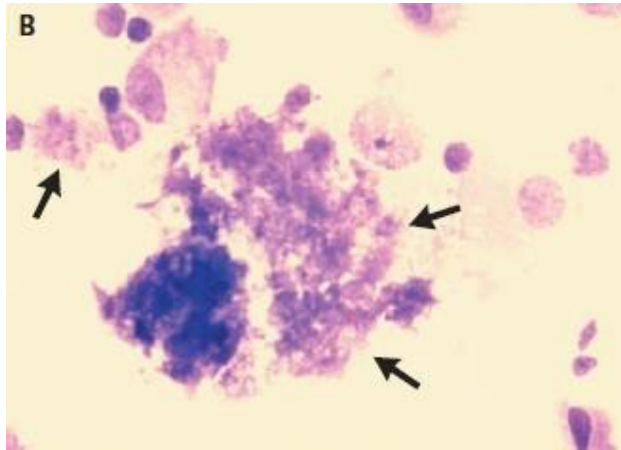
Trofik formlar; küçük yapıda (2-8 μm), ince hücre duvarlı ve pleomorfik yapıdadırlar. Bu formlar çoğunlukla gruplar şeklinde bulunur ve enfeksiyon süresince kist formuna göre yaklaşık 1/10 oranında daha baskın durumdadır ⁴⁸. Trofik formun yüzeyinde, alveolar keselerde tip-I pnömositlere tutunmaya ve konak membranından besin alımına yardımcı olan çok sayıda tübüler çıkıntılar (veya filopodya) bulunur ^{10,49}. Trofik formlar haploid hücrelerden oluşur ve her birinde çok sayıda porları olan nükleer zarf ile çevrili tek nükleus bulunur. Sitoplazmada mitokondri, veziküllü Golgi, endoplazmik retikulum (ER), sitoplazmik vakuoller, ribozomlar gibi organeller, glikojen benzeri parçacıklar, mikrotübül ve muhtemel lipid kökenli serbest osmofilik granüller bulunur ^{35,50-52}.

Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalara göre, *Pneumocystis* aseksüel ve seksüel olmak üzere iki farklı şekilde üreme gösterir; trofik formlar yaşam siklusunun aseksüel fazında ikiye bölünerek çoğalırlar. Seksüel fazda ise haploid iki trofik form eşleşir mayoz ve sonrasında mitoz ile bölünerek kistleri meydana getirir ^{42,53}. Trofik formlardan kist oluşumunda erken, ara ve geç prekist olmak üzere 3 aşamalı prekist fazı görülür. Prekist formu, trofik form ve kist formu arasındaki şekiller olarak tanımlanmaktadır. Erken prekist fazında hücre duvarı

trofik formlar gibi iki katmanlıdır, tek nükleusludur ve mayoz bölünme ile alakalı sinaptonemal kompleksler oluşur. Ara prekist fazında hücre duvarı daha kalındır ve nükleer bölünme ile 2 veya 4 nükleus gözlenir. Geç prekist fazında ise hücre duvarı 3 katmanlı olup, sekiz nükleus gözlenmektedir ^{54,55}. Kist formu; 5-10 μm boyutlarında olup yuvarlak veya hilal şekillidir. Düzgün ve kalın kist duvarı β -glukan bakımından zengindir. Tübüler çıkıntılar nadiren bulunur. Olgun kist en fazla sekiz spor (intrakistik cisim) içermektedir ^{50,56}. İntrakistik cisimler 1-2 μm boyutunda olup çift katlı bir zara sahiptir ¹⁰.



Şekil 2. *Pneumocystis jirovecii* kist form ⁵⁷



Şekil 3. *Pneumocystis jirovecii* trofik form ⁵⁷

İntrakistik cisimlerde bir nükleus, mitokondri, ER ve birçok serbest ribozom bulunur. Kistin yırtılması ile açığa çıkan bu yapılar gelişerek trofozoitlere dönüşür. Cisimciklerin içinde nükleus, mitokondri, endoplazmik retikulum ve birçok serbest

ribozom bulunmaktadır. Kist içerisindeki intrakistik cisimler, kist duvarındaki porlardan salınarak yeni trofik formlara dönüşür ve hayat döngüsü tekrar başlar⁴⁵.

2.4. *Pneumocystis* Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri

Pneumocystis jirovecii'nin yüzeyi glukoz/mannoz, N-asetilglukozamin ve galaktoz/N-asetilgalaktozaminden zengindir⁴⁷. Hücre duvarının esas yapısını β -1,3 glukan oluştururken plazma membranında sterol olarak %78 oranında kolesterol baskındır^{35,47,58}. 95-104 kDa ağırlığındaki majör yüzey glikoproteini (MSG) en önemli antijenik yapılarından biridir⁵⁹. MSG türe özgü ve ortak epitoplar içerir, humoral ve hücresele bağışık yanıtların oluşmasına neden olur ve mantarın konak ile etkileşiminde kilit bir rol oynar^{47,59}. *Pneumocystis*'in kendi memeli konağında bağışıklık yetmezliğinin bahsedilemeyeceği şartlarda, kendisini antijenik varyasyonlarla gizlediği düşünülmektedir. Antijenik varyasyonlardan sorumlu tutulan gen MSG antijenlerini kodlayan MSG gen ailesidir⁶⁰. MSG'nin önemli fonksiyonlarından bir diğeri de hücre dışı matriks proteinleri, fibronektin, vitronektin, surfaktan A ve D proteinleri ve mannoz reseptörleri gibi yapılara bağlanarak konak ile iletişimi sağlamasıdır⁴⁷. Diğer antijenik yapıları arasında 35-45 kDa ve 45-55 kDa glikoprotein, Tip II major yüzey glikoprotein (MSR), kistlerde bulunan disintegrin ve metalloproteaz PcADAM, kexin benzeri bir serin proteaz PRT 1 (Kex 1) bulunmaktadır. *Pneumocystis jirovecii*'de bulunan ve Golgi aygıtında eksprese edilen tek gen kopyası olan Kex 1 serin endoproteaz, MSG'nin proteolitik aktivitesi ile birlikte organizmanın patojenitesini arttırabilmektedir⁶¹.

2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş

Pneumocystis jirovecii'nin sebep olduğu *Pneumocystis* pnömonisi (PCP) bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda çok sık ve ciddi seyreden fırsatçı infeksiyonlardan bir tanesidir^{62,63}. Günümüzde mikroorganizma ile ilişkili bir isim değişikliği olsa da, PCP kısaltması korunarak, *Pneumocystis* pnömonisi anlamında kullanılmaktadır^{37,64}.

Dünyada yaygın olarak bulunan *P. jirovecii*'nin bulaş yolu tam olarak anlaşılamadığı gibi doğadaki kaynağı da bilinmemektedir^{35,57}.

P. jirovecii'nin insanlar tarafından edinilmesinin, çevresel kaynaklar ve kişiden kişiye solunum yolu yoluyla gerçekleştiği varsayılmaktadır ^{65,66}. Bu teori, hem sağlıklı hem de bağışıklığı zayıflamış bireylerin solunum yollarında *P. jirovecii*'nin varlığı ile desteklenmektedir ^{66,67}. Enfeksiyonun daha çok hava yolu ile bulaşı düşünülmeyle birlikte birçok çalışmada anneden bebeğe plasenta yolu ile de geçiş olabileceği bildirilmiştir ⁶⁸⁻⁷⁰.

İmmünkompetan konaklarda PCP ile primer enfeksiyon erken yaşta görülür ve genellikle asemptomatik seyreder. Şili, Santiago'da yapılan sero-epidemiolojik çalışmalarda, *P. jirovecii*'ye maruziyetin yaşamın erken dönemlerinde meydana geldiği, 8 aylık çocukların % 50'sinden fazlasında ve 2 yaşındaki çocukların %85-100'ünde *Pneumocystis*'e karşı antikor saptandığı bildirilmiştir ⁷¹.

İmmün sistemi zayıflamış hastalardaki *Pneumocystis* enfeksiyonunun, erken çocukluk döneminde mikroorganizmanın alınması nedeniyle konakta mevcut olan latent enfeksiyonun endojen reaktivasyonu sonucu geliştiği teorisi yıllarca savunulmuştur. Ancak günümüzde enfeksiyonun yeni bir bulaş sonucu geliştiğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır ¹¹. Yapılan bir çalışmada PCP sonrası etkenin temizlendiği ve immünsupresyon gelişmesi durumunda reaktivasyon göstermediği bildirilmiştir ^{72,73}. HIV ile infekte PCP'li hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, tekrarlayan (rekürren) *Pneumocystis* enfeksiyonlarına latent enfeksiyonun reaktivasyonundan ziyade farklı genotipe sahip suşların neden olduğu tespit edilmiştir ⁷⁴. Ayrıca, PCP de genotiplerin coğrafik dağılımı araştırıldığında, genotip paternlerinin bireylerin doğum yerine göre değil, yaşadığı yer ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ⁷⁵.

İnfekte olmayan bireyler *Pneumocystis*'in asemptomatik taşıyıcısı da olabilirler ⁵⁷. Yapılan çalışmalar; *Pneumocystis*'in sağlıklı bireylerde veya aktif enfeksiyon veya klinik hastalık bulgusu olmayan HIV ile infekte bireylerde de düşük miktarda bulunabildiğini ortaya koymuştur ^{11,12}. Sağlıklı bireylerde yüksek oranda (%20 ve %65) kolonizasyon bildirilen çalışmalar da vardır ^{62,76}. Ayrıca yapılan son çalışmalarda, altta yatan hastalığı olan, immünkompetan konaklarda, *P. jirovecii*'nin asemptomatik akciğer kolonizasyonu yapabileceği bildirilmektedir ⁷⁷.

PCP epidemiyolojisi 1981'de HIV/AIDS epidemisi ile dramatik bir artış göstermiştir. Anti- *Pneumocystis* profilaksisi uygulanmadan önce PCP, HIV-1 ile infekte bireylerin % 60'ında AIDS'i tanımlayan hastalık olarak rapor edilmiştir ⁷⁸. 1989 yılında Anti-*Pneumocystis* profilaksisinin, ART (Antiretroviral Tedavi) uygulamasının da 1996-1998 yıllarında uygulamaya girmesiyle PCP insidansı %21,5'e düşmüştür ^{77,79}. PCP insidansındaki düşüşe rağmen, PCP bugün hala HIV ile infekte bireylerde en önemli fırsatçı enfeksiyon olarak önemini sürdürmektedir ⁷⁷.

Erişkinlerde PCP gelişimi için en önemli risk faktörü CD4+ sayısının 200 hücre/ μ L'nin altına düşmesidir. PCP olgularının yaklaşık %90'ı CD4+ sayısı 200 hücre/ μ L'nin altında olan hastalarda ortaya çıkmaktadır ⁸⁰. HIV negatif bireylerde PCP gelişimi için en önemli risk faktörleri hücresel bağışıklıkla ilgili bozukluklar ve kortikosteroid kullanımıdır ⁷⁷. Sağlıklı bireylerin *P. jirovecii* taşıyıcısı olup olmadıklarını saptamaya yönelik çalışmalardan %20 ve %65 gibi yüksek oranlar bildirilmiştir ^{62,81}.

Kolonizasyon aktif hastalık gelişmesinde veya hastalığın bulaşmasında rol oynayabilir. Epidemiyolojik çalışmalar, asemptomatik taşıyıcılardan diğer bireylere bulaş olduğunu göstermiş ve bu asemptomatik taşıyıcılara profilaksi uygulaması yapılmadığı zaman *Pneumocystis* yayılımında artış olacağı bildirilmiştir ⁸².

2.6. Patogenez

Pneumocystis, yüksek bir akciğer tropizmine sahip olup, infeksiyöz form inhale edildikten sonra alveollere kadar ulaşır ⁴⁸. Trofik formun alveollerdeki tip-I pnömositlere ve hücre dışı matriks proteinlerine bağlanması ile enfeksiyonun başladığı düşünülmektedir ⁸³. Fibronektin, vitronektin ve konak hücre üzerindeki mannoz bağlayan reseptörlerin, *Pneumocystis*'in epitel hücrelerine bağlanmasında önemli rol oynadıkları bildirilmektedir. *Pneumocystis*'in tip-I pnömositlere tutunmasını takiben, bir takım kinaz uyarı yolları aktive olur ve mikroorganizmanın proliferasyonunu başlatarak enfeksiyonu kolaylaştırır. *Pneumocystis*'in hücre duvarında yer alan β -1,3 glukanın, akciğer hücrelerindeki laktosilseramide bağlanmasıyla tip-I pnömositlerde inflamasyon uyarısı başlatılır

⁷⁹. Tip-I pnömositlere bağlanma sonucunda, pnömositlerin çoğalması ve tamirinde bir baskılanma ve birçok immünolojik yolakta aktivasyon başlar ⁸³.

Pneumocystis'e karşı savunmada ilk basamak alveolar makrofajlardır ve mantarın akciğerden temizlenmesinde başlıca rolü oynarlar ^{47,79}. Ancak, CD4+ hücreleri yok ise aktive olmuş makrofajlar *P. jirovecii* infeksiyonunu kontrol edemezler. $\beta - 1,3$ glukanın akciğer hücreleriyle etkileşimi sonucunda makrofajlar tarafından inflamatuvar yanıtların başlatılması önemlidir. Mantar alveolar makrofajlardaki mannoz reseptörlerine MSG yardımıyla bağlanır ve yakalanır ⁷⁹. İnfeksiyon sırasında fosfolipit salınımının MSG tarafından baskılanmasına bağlı olarak surfaktan fosfolipitlerinde azalma ortaya çıkar ⁴⁷. Pnömoni sırasında hidrofobik surfaktanlar olan SP-B ve SP-C'nin salınımı önemli düzeyde baskılanır ve sonrasında da surfaktan fonksiyonları bozulur. Aksine, infeksiyon sırasında hidrofilik olan SP-A ve SP-D surfaktan proteinleri aşırı miktarda yüksek bulunur ⁷⁹. *Pneumocystis*'e ait virulans faktörleri MSG, glukan ve melanin gibi hücre duvarına ait bazı yapılardır ⁸⁴.

Konak savunması bozuldukça *Pneumocystis* çoğalmaya ve alveolar boşlukları doldurmaya başlar. Burada gözlenen esas histopatolojik bulgu, köpüksü ve eozinofilik bir alveolar eksüdanın ortaya çıkmasıdır. Bu sırada doku tamirine yönelik olarak, tip-II hücrelerin proliferasyonunun arttığı gözlenir ⁴⁷.

İçinde *Pneumocystis*'in yer aldığı granülom oluşumu akciğerde nadiren gözlenir. PCP olgularının %3-5'inin granülomatöz tipte seyrettiği ve esas olarak da HIV ile infekte bireylerde görüldüğü bildirilmektedir ⁸⁵.

2.7. İmmün Yanıt

Pneumocystis jirovecii infeksiyonun kontrolünde hem doğal hem de kazanılmış immün yanıt etkili olup, doğal immün yanıtta alveolar makrofajlar, kazanılmış immün yanıtta ise özellikle hücresel immün yanıt önemli olmakla birlikte humoral immün yanıtın da rolü olduğu belirtilmiştir ^{50,86,87}. Ancak, aşırı immün yanıt akciğer hasarına da neden olmaktadır. Şiddetli PCP, nötrofilik akciğer inflamasyonu ile karakterize olup, bu durum yaygın alveoler hasar, gaz değişiminin bozulması ve solunum yetmezliği ile sonuçlanabilir ⁵⁷.

2.7.1. Doğal İmmün Yanıt

Genelde *P. jirovecii*'ye karşı konaktaki esas etkili hücrenin, alveolar makrofaj olduğu düşünülmektedir. Mikroorganizma alveolar makrofaja Fc, fibronektin ve mannoz reseptörleri gibi birkaç yol aracılığı ile bağlanabilmektedir. Alveolar makrofajların mannoz reseptörleri aracılığıyla *P. jirovecii*'nin hücre yüzeyindeki MSG'ye ve de alveolar makrofajın dektin-1 reseptörü ile *P. jirovecii*'nin hücre yüzeyindeki β glukana bağlanarak organizmayı içine aldığı; bu reseptörlerin fagositoz için yeterli olduğu bildirilmektedir ^{88,89}. *P. jirovecii*'nin makrofaj tarafından fagositozu, muhtemelen opsoninler gibi davranan, antikorlarca güçlendirilmektedir. Alveolar makrofajlar fagositozla aldıkları *P. jirovecii*'nin antijenlerini işleyip naif T lenfositlere sunar ve onların sitotoksik T (Tc) ya da yardımcı T (Th) hücrelerinden herhangi birine diferansiye olarak aktive olmasını sağlarlar ⁹⁰. Bunun yanı sıra *Pneumocystis jirovecii*'nin hücre duvarın bileşeni β glukana, çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-1 ve TNF- α) ve kemokinlerin alveolar makrofajlardan salınımını başlatır. TNF- α ; nötrofillerin, lenfositlerin ve monositlerin infeksiyon sırasında bölgeye gelmesini uyararak mikroorganizmaların temizlenmesinde önemli bir rol oynar ⁵⁷.

Alveolar makrofajların *Pneumocystis* türlerine karşı savunmadaki bir diğer görevi de surfaktan protein (SP) üretimidir. Surfactan protein, iki gruba ayrılır: Hidrofobik protein SP-B ve SP-C, yüzey gerilimini kontrol etmede primer rol oynar. Hidrofilik protein SP-A ve SP-D ise doğal bağışıklıkta rol oynar ⁴⁸. İnfeksiyon sırasında hidrofobik surfaktanlar olan SP-B ve SP-C'nin salınımı önemli düzeyde baskılanır ve sonrasında da surfaktan fonksiyonları bozulur. Aksine infeksiyon sırasında hidrofilik olan SP-A ve SP-D surfaktan proteinleri aşırı miktarda yüksek bulunur ve *Pneumocystis* yüzeyindeki glikoprotein A bileşenleriyle etkileşime girer ⁷⁹. SP-A, alveolar makrofajların *Pneumocystis* ile etkileşimini düzenlerken, SP-D ise mikroorganizmaların agregasyonuna aracılık eder. Ancak büyük agregasyonlar oluşturarak, alveolar makrofajlar tarafından *Pneumocystis* türlerinin alınmasını ve fagositozunu engellediği düşünülmüştür ⁹¹. Makrofajların yanı sıra, dendritik hücreler de akciğerlerdeki önemli efektör hücreler olup, solunum yolu epitelinde ve pulmoner damarların etrafında bulunan antijenlere hızlı yanıt verirler ⁴⁸.

2.7.2. Kazanılmış İmmün Yanıt

Hücresel immün yanıt yanında B hücreleri aracılığıyla oluşturulan humoral immün yanıtın da *Pneumocystis* türlerinin akciğerlerden temizlenmesinde önemli rol aldığı belirtilmiştir ⁹².

2.7.2.1. Hücresel İmmün Yanıt

CD4+ T lenfositleri konağın PCP'ye karşı savunmasında önemli bir role sahip olup, CD4+ T lenfosit sayısı 200 hücre/ μ L altında olan hastalarda PCP riski artmaktadır. CD4+ T lenfositleri *Pneumocystis jirovecii*'ye karşı efektör hücrelerin aktivasyonunda ve inflamatuvar sürecin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İnsan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, HIV enfeksiyonunda CD4+ T lenfositlerinin yokluğunun, PCP gelişimine katkıda bulunduğu, antiretroviral tedavi ile CD4+ T lenfositlerinin artırılması durumunda ise PCP riskinin azaldığı gösterilmiştir ^{93–95}.

Pneumocystis'e karşı savunmada CD8+ T lenfositlerinin de önemli bir role sahip olduğu belirtilmektedir. *Pneumocystis jirovecii* hücre dışı patojen olmasına karşın CD8+ T lenfositlerinin, PCP'li fare ve insanlarda CD4+ T lenfositleri yetmezliği durumunda, akciğerlerde predominant lenfosit olarak görev yaptığı bildirilmiştir. Ancak; CD4+ T lenfositlerinin yokluğunda, CD8+ T lenfositlerinin patojeni tek başına temizleyemediği tespit edilmiştir. CD8+ T lenfositlerin akciğer hasarına katkıda bulunup bulunmadığı konusu henüz netlik kazanmamıştır ^{96–98}.

İnfeksiyonun kontrolünde ve patojenin temizlenmesinde T lenfositleri gerekli olup hem CD4+ T hem de CD8+ T lenfositlerinin yokluğunda enfeksiyonun daha hızlı seyrettiği bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalar T lenfosit yanıtının enfeksiyon sırasında önemli derecede pulmoner bozukluğa yol açabileceğini göstermiştir ⁹⁵.

2.7.2.2. Humoral İmmün Yanıt

Hayvan modellerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, *Pneumocystis jirovecii* enfeksiyonunun kontrolünde humoral immün yanıtın önemli olduğu gösterilmiş ve B lenfositleri olmayan farelerin enfeksiyona duyarlı olduğu bildirilmiştir ⁹⁹.

B lenfositlerin antikör üretiminin yanı sıra, enfeksiyon sırasında CD4+ T lenfosit aktivasyonunu kolaylaştırarak immün yanıtı da düzenlediği bildirilmiştir.

Ayrıca, B lenfositlerinin akciğerlerdeki *Pneumocystis jirovecii* enfeksiyonuna yanıt olarak CD4+ bellek T lenfositlerinin oluşumunda hayati bir rol oynadığı bildirilmiştir. *Pneumocystis* enfeksiyonunun kontrolünde hem doğal hem de kazanılmış immün yanıt önemlidir. Humoral ve hücrel immün yanıt aynı zamanda doğal immün yanıtı arttırmak ve uzun süreli bellek korumasını devam ettirmek için kritik bir öneme sahiptir ^{95,99}.

2.8. PCP

PCP, 1980'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde AIDS'i tanımlayan en yaygın fırsatçı enfeksiyon olarak bilinmesine rağmen, son zamanlarda hematolojik ve solid organ tümörleri, organ transplantasyonları ve otoimmün hastalıklarda etkili immünoşüpresif tedavilerin kullanıma girmesiyle, HIV ile enfekte olmayan immün sistemi baskılanmış hastalarda da yaygın olarak görülmektedir ¹⁰⁰. En sık akciğer tutulumu (PCP) olmakla birlikte AIDS hastalarında akciğer dışı klinik tablolar da görülebilir. Kemik iliği, lenf bezleri, karaciğer, kalp, dalak, göz, kulak, mastoid, tiroid bezi ve genitoüriner kanal tutulumu bildirilmiştir ^{101,102}.

PCP'de ateş, nefes darlığı ve balgamsız öksürük altta yatan hastalıktan bağımsız olarak en sık karşılaşılan semptomlardır. AIDS hastalarında PCP semptomları haftalarca sürebilir ve genelde sinsi bir seyir gösterir. Bu hastalarda nötrofil sayısı az ve fungal yük yüksek olmakla birlikte, akciğer hasarı o oranda ciddi değildir ^{79,103}.

Hastalığın akut seyrettiği hastalarda fizik muayenede tipik olarak takipne ve taşikardi bulunur ^{83,103}. Çocuklarda siyanoz ve ciddi olgularda interkostal çekilmeler gözlelenebilir. Akciğer oskültasyonunda bir bulgu saptanmamakla birlikte, erişkin hastaların üçte birinde raller duyulabilir ¹⁰⁴. PCP gelişen AIDS hastalarının çoğunda, ilk enfeksiyon sırasında mortalite oranı %10-20'dir ⁵⁷.

AIDS olmayan hastalarda tipik olarak ani bir solunum yetmezliği ile ortaya çıkar. Bu ani klinik durum, bağışıklığı baskılayan ilaçların dozunun azaltılması ya da arttırılmasıyla birliktelik gösterebilir. Bu hastalarda fungal yük, AIDS'li hastaların aksine daha azdır. Bu grupta mortalite oranı %35-55 olmakla birlikte, risk altındaki popülasyona göre bu oran değişiklik gösterebilir ⁵⁷.

PCP' de hipoksi hastalığın en karakteristik bulgusudur ve enfeksiyonun ilerlemesiyle birlikte artış gösterir. PCP'nin kliniği alveolar-arteriyel oksijen gradiyentine göre hafif (35 mmHg'nın altında), orta (35-45 mmHg arasında) ve ağır (45 mmHg'nın üzerinde) olarak sınıflandırılmaktadır ¹⁰⁵. PCP'ye diğer mikroorganizmaların neden olduğu pulmoner enfeksiyonların da eklenmesi durumunda hastalığın kliniği daha karmaşık bir hale gelmektedir. AIDS hastalarında enfeksiyonun tekrarlama riski daha yüksektir ¹⁰³.

PCP'li hastalarda en sık rastlanan tipik radyolojik bulgular, hastalık ilerledikçe homojenliği artan ve hilustan kelebek şeklinde yayılan diffüz, bilateral, interstisyel veya alveolar infiltrasyondur. PCP tanısında, yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografinin (BT) sensitivitesi akciğer grafisine göre yüksektir; radyografik bulgular normal olsa bile, PCP ile karakterize simetrik, geniş buzlu cam opasiteleri BT ile gözlenebilir ¹⁰⁶.

Tüm bunlara rağmen hastalığın semptom ve bulgularıyla, radyolojik bulguların hiçbir kombinasyonu PCP için tanı koydurucu olmayıp, tanı koymak için klinik ile uyumlu bir örnekte *P. jirovecii*'nin morfolojik olarak ya da DNA'sının gösterilmesi gereklidir ¹⁰⁷.

Akciğer dışı *Pneumocystis* enfeksiyonunun çoğunlukla AIDS hastalarında, özellikle de PCP profilaksisi için aerosol şeklinde pentamidin alanlarda daha çok gözlemlendiği bildirilmiştir ^{107,108}. Akciğer dışı *Pneumocystis* enfeksiyonu akciğerden diğer organ ve dokulara yayılım ile gerçekleşir ¹⁰⁹. Tutulumun en çok gözlemlendiği yerler lenf nodları, karaciğer, dalak, böbrek, gözler, tiroid, kemik iliği, gastrointestinal sistem, pankreas, kalp, kas, beyin korteksi ve meninkslerdir. Biyopsi veya ince iğne aspirasyonlarında içi köpüğümsü materyal ile dolu nekroz alanları gözlenir ¹⁰⁸. HIV ile ilişkili olmayan akciğer dışı *Pneumocystis* enfeksiyonu nadir olarak bildirilmiştir ¹⁰⁷.

2.9. Mikrobiyolojik Tanı

P. jirovecii kültür sistemi ile üretilmediği için PCP'nin kesin tanısı, uyumlu klinik bulgularla beraber mikroorganizmanın Bronkoalveolar lavaj (BAL), balgam, indüklenmiş balgam, trakeal aspirasyon veya bronşiyal fırçalama ile elde edilen klinik örnek ve akciğer biyopsi örneği gibi solunum yolu örneklerinde kist ve trofozoitlerinin mikroskopik olarak gösterilmesi veya moleküler tekniklerle

saptanması ile konulabilmektedir. *P. jirovecii* normal balgam örneğinde nadiren bulunur ve tanısal değeri düşüktür. Hipertonik salin inhalasyonu sonrası elde edilen indüklenmiş balgam örneğinde ise daha fazla mantar bulunur. Ancak, BAL altın standart olarak değerlendirilmektedir ve duyarlılığı %90-98 arasında bildirilmektedir ^{47,107}.

2.9.1. Mikroskopik Tanı

Klinik örneklerden *P. jirovecii*'yi tanımlamak için çeşitli boyalar kullanılmaktadır. Toluidin mavisi O (TBO), Gomori-Grocott metenamin gümüş (GMS), kalkoflor beyazı veya cresyl echt violet gibi boyalar seçici olarak sadece kistlerin hücre duvarlarını; Giemsa, Diff-Quick, modifiye Papanicolaou ve Gram-Weigert boyama yöntemleri ise *P. jirovecii*'nin tüm gelişim evrelerini boyamak için kullanılır ⁵⁷. Boyamada kullanılan TBO, GMS ve kalkoflor beyazı *Pneumocystis* kistlerinin yanında diğer mantarların da hücre duvarını boyadığı için *Pneumocystis* doğru tanısı için aynı klinik örnek Giemsa yöntemi ile de boyanmalıdır. Giemsa boyası ile trofik formlar ve intrakistik cisimler koyu mor, kist sitoplazması pembe boyanır kist duvarı boyanmaz ve kistlerin etrafında boşluk oluşur. Böylelikle *Pneumocystis* diğer mantarlardan ayırt edilir ¹¹⁰. Papanicolaou boyası ise sitopatologlar tarafından kullanılmakta ve *Pneumocystis* türlerini boyamamasına karşın çevresindeki köpüksü eozinofilik materyali saptamada çok yararlı olduğu belirtilmektedir ¹⁰⁹.

Bir diğer mikroskopik tanı yöntemi, *P. jirovecii*'ye özgül monoklonal antikorlarının kullanıldığı direkt ve indirekt immünfloresan (IF) boyama yöntemidir. Floresan ile işaretli monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan IF boyama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü diğer konvansiyonel boyama yöntemlerinden daha yüksek olarak bildirilmiştir ^{23,110}. Monoklonal antikorların bir avantajı *Pneumocystis*'in hem kist hem de trofik formlarını boyayabilmesidir, bu durum PCP sırasında trofik formların kistlerden daha baskın olması nedeni ile önem taşımaktadır ⁵⁷. Boyalı örnekler floresan mikroskopu ile incelendiğinde mikroorganizmalar tek tek veya kümeler halinde elma yeşili renkte parlak cisimcikler olarak görülür ⁵⁰.

Bu yöntemlerin; PCP'li hastaların bir kısmının balgam indüksiyonunu tolere edememesi, BAL ve akciğer biyopsilerinin invaziv olması, *Pneumocystis*

jirovecii'nin histolojik tespiti için deneyimli bir laboratuvar personeli gerekliliği gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca, mikroskopinin duyarlılığı daha düşük mantar yükü nedeniyle AIDS hastalarına kıyasla AIDS olmayanlarda daha düşüktür ¹¹¹.

2.9.2. PCR

P. jirovecii'nin tespiti için çeşitli moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiş ve yapılan çalışmalarda moleküler tanı yöntemlerinin, mikroskopik tanı yöntemlerine göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir ¹¹². Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile BAL, indüklenmiş balgam, balgam, biyopsi, orofaringeal ve nazofaringeal yıkama örneği gibi çeşitli klinik örneklerden *Pneumocystis* DNA'sı başarılı bir şekilde amplifiye edebilir ¹¹³.

PCP tanısında PCR için, büyük yüzey glikoprotein (major surface glycoprotein; MSG), mitokondriyal büyük alt birim (mitochondrial large subunit; mtLSU) rRNA, dihydropteroate synthase (DHPS), ısı şok protein (heat shock protein; HSP) 70 ve cyclin-dependent kinase (cdc2) gibi farklı gen bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır ^{114,115}. Ancak PCR'ın özgüllüğü ve duyarlılığı, kullanılan primerlere ve hedeflenen genin özgül bölgesine göre değişir. MtLSU rRNA ve MSG gibi çok kopyalı genlerin duyarlılığı yüksektir bu yüzden en yaygın olarak bu gen bölgeleri kullanılmaktadır ¹¹⁶.

Klinik örneklerden *Pneumocystis*'in moleküler yöntemler ile tespitinde konvansiyonel PCR, nested-PCR, revers-transkriptaz PCR ve kantitatif real-time PCR (qPCR) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Nested-PCR, mikroskopinin negatif olduğu mantar yükü düşük olan hastalarda erken tanı konmasında ve kolonizasyon tespitinde etkilidir ^{19,117}. Ancak, mikroskopisi negatif PCR sonucu pozitif olan klinik örnekler PCR'ın özgüllüğünü düşürmektedir. Bundan dolayı kolonizasyon ve infeksiyon ayrımı için PCR sonuçları hastalardaki patolojik duruma ait klinik, radyolojik ve laboratuvar bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır ¹¹⁸.

Meta-analiz çalışmaları, kantitatif real-time PCR (qPCR) testlerinin qPCR olmayan testlerden daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu göstermiştir ^{118,119}. Kantitatif real-time PCR yönteminde amplifikasyon ve döngü eşik (CT) değeri, klinik örnekteki mantar yükü ile ilişkili olduğu için kolonizasyon

ve infeksiyon ayrımı yapılabileceği gösterilmiştir ¹²⁰. Mantar yükünün artması, tanının pnömoni olma olasılığını da artırır ¹²¹. Kantitatif PCR sonuçlarının değerlendirmesi önemlidir. IFA pozitif örnekler PCP tanısı sağlarken, IFA negatif; qPCR-pozitif örnekler, infeksiyon veya kolonizasyona karşılık gelir. Kolonizasyon, pnömoni belirtileri olmayan bireylerin klinik örneklerinde *Pneumocystis*'in veya DNA'sının saptanması olarak tanımlanır ²⁵. Konu üzerinde yapılan bazı araştırmalarda PCP'yi tanımlayan ve dışlayan iki cut-off değeri ile kolonizasyon ve infeksiyon ayrımı yapılabileceği belirtilmiştir ^{26,111,120}. Ancak bazı çalışmalarda ise qPCR ile kolonizasyon ve infeksiyon ayırt edilememiştir ¹²². *P. jirovecii* tespiti için moleküler yöntemlerin kullanımı, tanısal objektiflik ve mikroorganizmanın mikroskopik tanımlanmasına kıyasla daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olup, ayrıca epidemiyolojik açıdan mikroorganizmanın kantitasyonu ile infeksiyon yükünün ve cut-off değerinin belirlenmesi, spesifik genotipler ile virülans, bulaşabilirlik veya ilaç duyarlılığı arasındaki ilişkinin araştırılmasına yardımcı olabilir ^{26,123}.

2.9.3. Serolojik Testler

Son yıllarda, PCP tanısı için pahalı ve invaziv olmayan serolojik temelli testler üzerinde de çalışılmıştır. Serum (1->3)- β -D-glukan (BG) ve / veya S-adenozil metiyonin seviyesinin, uygun klinik bağlamda PCP için tanısal olduğu ve düşük özgüllüğüne rağmen tanısal değer sunan laktat dehidrojenaz seviyesinin erken bir aşamada yükseldiği öne sürülmüştür ^{124,125}.

(1->3)- β -D-glukan *Pneumocystis* ve diğer mantarların hücre duvarında bulunan ana yapısal polisakkarittir. Bu polisakarit, doğal immün yanıtı tetikler ve hem serum, hem de BAL örneklerinde ölçülebilir ^{126,127}. Serum BG seviyesinin PCP için tanısal doğruluğunun değerlendirildiği bir meta analizde 23 çalışma incelenmiş ve ortalama duyarlılık ve özgüllük sırasıyla; 91% (95%CI 87–94%) ve 79% (95%CI 72–84%) olarak bildirilmiştir ¹²⁸. PCP'li hastalarda yüksek serum BG düzeyleri saptanmış ve uyumlu bir şekilde de bu düzeylerin etkin bir anti-*Pneumocystis* tedavisiyle düştüğü bildirilmiştir ¹⁰⁷. Serumda BG tespitindeki yüksek duyarlılık dikkate alındığında, serum BG seviyesinin negatif olması infeksiyon riski bulunan hastalarda PCP'yi dışlamak için faydalı olabilir ¹²¹. Ancak, BG testinin *Pneumocystis* için spesifik olmaması, invaziv mantar infeksiyonlarının

da serum BG düzeylerinde artışa sebep olması ve yalancı pozitif BG sonucunu açıklayabilecek diğer faktörlerden dolayı PCP tanısını doğrulamak için serum BG sonucunun pozitif olmasının yeterli olmayacağı bilinmelidir ¹²⁹.

Akciğer parankim harabiyetini gösteren yükselmiş serum laktat dehidrojenaz düzeyi (LDH) PCP ile ilişkili olabilir ancak PCP için özgül değildir ve başka hastalıklarda da serum seviyelerinde artış gözlenir ¹³⁰. PCP'li hastalarda artmış LDH düzeyi başarılı bir tedavinin ardından normale döner. Bu nedenle PCP hastalarındaki LDH seviyeleri genellikle tedaviye yanıtın değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır ¹³¹.

S-Adenozil metiyonin (SAM), metilasyon reaksiyonunun ve poliamin sentezinin anahtar bir bileşenidir ve metil donörü olarak rol oynar ¹³². Canlılar SAM sentetaz ile SAM sentezleyebilirken; *Pneumocystis* SAM sentetaz (SAMS) aktivitesinden yoksundur ve konak olarak kullandığı canlıdan elde ettiği eksojen SAM'a muhtaçtır ^{133,134}. Yapılan çalışmalarda, PCP'li hastalarda plazma SAM düzeylerinde azalmalar ve ardından PCP'nin başarılı bir şekilde tedavi edilmesinden sonra SAM'ın plazma seviyesinde kademeli bir artış bildirilmiştir. Bu veriler, plazma SAM düzeyinin PCP tanısı için non-invaziv bir tanı yöntemi olarak kullanılması fikrini doğurmuştur. Ancak SAM'ın *Pneumocystis* pnömonisi için tanısal bir belirteç olarak kullanımı, SAM ölçümlerinin laboratuvarlar arası farklılık göstermesi, hastaların açlık durumu, diyetle metiyonin alımı SAM sentetazlarını kodlayan genlerinin varlığı gibi bazı faktörler nedeniyle hala tartışmalıdır ¹³⁵.

Krebs von den Lungen-6 (KL-6), esas olarak tip II alveolar epitel hücre yüzeyinde eksprese edilen müsin benzeri bir glikoproteindir. Tip II alveoler pnömositlerden ve bronşiyal epitel hücrelerden, hasarlanma ve rejenerasyon sırasında KL-6 ekspresyonu önemli ölçüde artar ve KL-6 hasarlı alveolar bazal membrandan kan dolaşımına salgılanır ¹³⁶.

KL-6, PCP tanısında diğer bir belirteç olarak düşünülmüş ancak PCP'li hastalarda seviyesi yüksek bulunmuş olmakla birlikte, mantar dışı infeksiyonlarda hatta interstisyel akciğer hastalığı olanlarda da KL-6 seviyesi yüksek bulunmuştur ^{137,138}. Bu nedenle PCP hastalarındaki KL-6 yüksekliğinin *Pneumocystis*'e

spesifik olmadığı, akciğerlerdeki hasar ve rejenerasyon sırasında yükseldiği düşünülmüştür ¹³⁸.

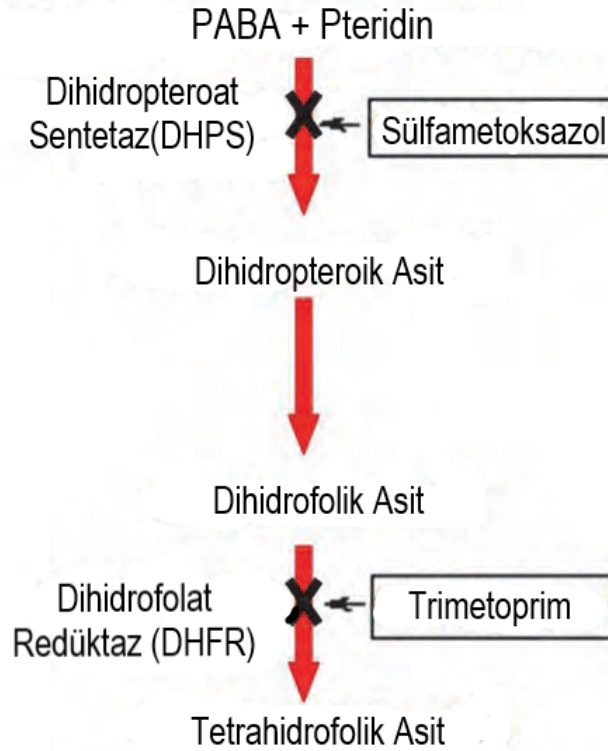
260 hastanın BG, KL-6, SAM ve LDH serum düzeylerinin değerlendirildiği çok merkezli bir çalışmada; PCP tanısında BG testinin, LDH ve KL-6'dan daha anlamlı olduğu tespit edilmiş, BG ve KL-6 kombinasyonu %94,3 duyarlılık ve %89,6 özgüllük ile en doğru PCP serolojik tanı yaklaşımı olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre BG / KL-6 testi, PCP teşhisi için tek bir test olarak kullanılmamalı ve hastanın kliniği ile birlikte yorumlanmalıdır ¹³³.

2.10. İlaç Direnci

Trimetoprim-sulfametoksazol, *P. jirovecii* infeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavide ilk seçenek ilaç olarak kullanılmaktadır ¹³⁹. Memeliler kendisi için gerekli folik asidi dışarıdan alırken mikroorganizmalar RNA ve DNA sentezinde kullanmak üzere folik asidi dışarıdan alamadığından dolayı hücre içerisinde sentezlemesi gerekir ¹⁴⁰.

Trimetoprim ve sülfametoksazol, folik asitin metabolik sentez yolunda anahtar rol oynayan dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve dihidropteroat sentaz (DHPS) enzimlerini inhibe ederek; pürin, timidin, metionin ve glisin sentezi için gerekli olan folik asidin fizyolojik olarak aktif formu tetrahidrofolik asit sentezini bloke eder ¹³⁹.

Sülfonamidler, folik asit metabolik sentez yolunda para-aminobenzoik asidin (pABA) analoglarıdır ve pABA ile 7,8-dihidro-6 hidroksimetilpterin-pirofosfatın dihidropteroik aside reaksiyonunda DHPS enzimi için pABA ile yarışarak folik asit sentezine girerler ve folik asit sentezini inhibe ederler.



Şekil 4. Folat sentezinin sülfametoksazol ve trimetoprim ile inhibisyonu ¹⁴¹

Trimetoprim ise folik asidin yapısal bir analogu olup bu sentez yolağı üzerinde dihidrofolatın tetrahidrofolata indirgenmesinde DHFR enzimini inhibe eder ¹⁴¹ (Şekil 4).

DHPS ve DHFR genlerinde sinonim ve non-sinonim mutasyon gösteren polimorfizmler tanımlanmış olup, DHFR genindeki non-sinonim polimorfizmlerle önceki profilaksi arasında tam bir ilişki saptanamamıştır. Bunun aksine, DHPS enzimini kodlayan folik asit sentez (fas) genindeki non-sinonim iki nokta mutasyonlarının varlığı, daha önce sülfonamid grubu ilaç kullanılması ile ilişkilendirilmiştir ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Yapılan çalışmalarda DHFR üzerinde DHPS'ye göre daha az seçici baskı olduğu bildirilmiş, bunun yanı sıra DHPS genindeki mutasyonların *P. jirovecii*'de sülfadirencinin gelişiminde muhtemelen rol oynadığını belirtmişlerdir ^{145,146}. *Pneumocystis* organizmasında, DHPS, dihidroneopterin aldolazı ve hidroksimetil-dihidropterin pirofosfokinazı kodlayan

multifonksiyonel folik asit sentezi (fas) geni tarafından kodlanır. DHPS gen bölgesindeki en yaygın nonsinonim tek nükleotid polimorfizmleri 165(A[^]G) ve 171(C[^]T) nükleotid pozisyonlarında bulunur ve enzimin varsayılan aktif bölgelerinden birinin oldukça korunmuş bir bölgesinde, 55. (Thr'den Ala'ya) ve 57. kodonda (Pro'den Ser'e) amino asit değişimine neden olurlar. Sülfat türevi ilaçların proteine bağlanma yerinde meydana gelen farklılıklar ilacın afinitesini ve inhibitör etkisini azaltarak tedavi başarısızlığına katkıda bulunmaktadır ^{27,147}.

İlaç direnci çalışmaları, model sistem araştırmalarına ve moleküler yöntem analizlerine dayanır. Bu testler ile DHPS gen bölgesinde mutasyonların sülfat grubu ajanlara karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. DHPS geninde yapılan mutasyon analizi ile DHPS gen bölgesi nested PCR ile çoğaltılarak, elde edilen PCR ürünlerinden dizileme analizi yapılarak genetik varyasyonlar araştırılabilir veya dizi analizi yerine PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemi uygulanarak enzim kesim profillerine göre muhtemel mutasyonlar belirlenebilir ^{148,149}. DHPS genindeki mutasyonlar tedavi ve korunmayla ilişkili olmasına rağmen PCP hastalarının yanı sıra, DHPS mutasyonlarına sahip *P. jirovecii* suşlarını barındıran kolonize bireyler de tespit edilmektedir. Bu durum DHPS genindeki mutasyonun taşıyıcılardaki yayılımı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, DHPS mutasyonları ilaç direncinin yanında epidemiyolojik açıdan önemli bir biyo-belirteç olarak kullanılabilir ^{121,150}.

2.11. Tedavi ve Korunma

PCP tedavi edilmediğinde yüksek mortalite ile seyreden bir enfeksiyondur. Trimetoprim-sülfametoksazol hem tedavi hem de profilaksi için ilk olarak tercih edilecek ilaçtır ¹²⁶. Trimetoprim-sülfametoksazolu tolere edebilen tüm hastalarda bu ilaç ilk seçenektir ve tüm anti-*Pneumocystis* ilaçları arasında en hızlı klinik yanıt oluşturmaktadır ¹⁵¹. Tedavi başarısızlığı durumunda alternatif tedavide primakin/klindamisin kombinasyonu veya tek başına atovakuon ya da pentamidin kullanılır. Antibiyotiklere ek olarak PCP hastalığı orta veya ciddi şekilde (arteriyel-alveoler O₂ gradyenti >35 mmHg) seyreden hastalarda kortikosteroidlerin kullanılması önerilmektedir ¹⁵². PCP tespit edilen tüm immün sistemi baskılanmış

hastaların tedavi edilmesi gerekir. TMP-SMX, yeni ajanlara rağmen, ilk basamak tedavide en etkili ilaç olmaya devam etmektedir ¹⁵¹.

HIV ile infekte bireyler ve HIV ile infekte olmayan immün sistemi baskılanmış hastalar PCP gelişimi açısından en fazla risk altında olanlardır. Bu her iki grup için de profilaksi önerilmektedir ¹⁵³. PCP profilaksisinde önerilen ilaçlardan ilk tercih TMP-SMX olup, ayrıca dapson, dapson + primetamin + lökovorin kombinasyonu, aerosol olarak pentamidin ve atovaquone diğer alternatif ilaçlardır ¹⁵¹.

HIV ile infekte bireylerde, CD4+ T lenfosit sayısı <200 hücre/μl olduğunda ya da orofarengeal kandidiyaz öyküsü varsa primer profilaksi önerilir ve CD4+ T lenfosit sayısı 200 hücre/μl'nin üzerinde bulunana kadar en az üç ay süreyle devam edilir. HIV ile infekte olmayan immün sistemi baskılanmış hastalarda PCP'nin ortaya çıkmaya oranının %7,5 olduğu ve TMP-SMX alan hastalarda kontrollere göre PCP oluşumunda %91'lik azalma kaydedildiği belirtilmektedir ⁴⁷.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 10.08.2018 tarih ve 1107 sayılı kurul kararı ile Etik Kurul Onay'ını almıştır. Bu çalışmaya, Eylül 2018 – Eylül 2020 tarihleri arasında altta yatan akciğer hastalığı veya pulmoner semptomlar nedeni ile İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları servisinde izlenen ve tanısıl amaçla bronkoskopi yapılan hastalardan alınan 94 adet Bronkoalveolar Lavaj (BAL) örneği dahil edilmiştir. Hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj örnekleri rutin test işlemleri yapıldıktan sonra çalışmada kullanılmak üzere saklamaya alınmıştır. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda BAL örneklerinden mikroskopik inceleme ve PCR yapılarak *P. jirovecii* araştırılmıştır. Mikroskopik inceleme için üretici firmanın önerileri doğrultusunda immünflorasan boyama yöntemi uygulanmıştır. Örneklerdeki *P. jirovecii* varlığının tespiti ve bu mikroorganizmanın tedavisinde yaygın olarak kullanılan sülfonamid grubu antibiyotik direncini göstermek amacıyla real-time PCR yöntemi uygulanmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılan real-time PCR yönteminde; *P. jirovecii* varlığının saptanması amacıyla mtLSU gen bölgesi, ilaç direncinin belirlenmesi amacıyla ise dihidropteroat sentaz (DHPS) fas gen bölgesi hedeflenmiş ve bu iki bölgenin erime eğrileri gerçek zamanlı olarak belirlenmiştir.

3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Olgular

Çalışmamıza yaşları 20 ile 85 arasında değişen toplamda 94 adet bilinen akciğer hastalığı olan birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyduğu belirlenen olgular çalışmanın kapsam ve içeriği hakkında bilgilendirilmiştir. Bilgilendirme sonrasında çalışmaya katılmayı kabul eden olgular çalışma ile ilgili bilgi sahibi olduklarını ve çalışmaya katılmayı kabul ettiklerini gösteren onam formunu imzalamışlardır (Form 1). Çalışmaya dahil edilen olgulara ilişkin sosyodemografik ve klinik veriler, hastaları takip eden klinisyenler tarafından kayıt altına alınmıştır.

3.2. Çalışma Örneklerinin Saklanması

Çalışmaya dahil edilen hastaların takip edildikleri kliniklerde alınan BAL örnekleri, onam ve olgu takip formları uygun koşullar altında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiştir. Kabul edilen örnekler mikroskopi ve moleküler yöntemlerde kullanılmak üzere bekletilmeden santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında örneklerdeki süpernatant uzaklaştırılmış ve altta kalan çökeltinin 20µL'si alınarak mikroskopik incelemeye başlanmıştır. Mikroskopi sonrasında kalan çökelti kısmı ise moleküler incelemeler için eppendorf tüplerine alınmış ve -20°C'de çalışma tamamlanıncaya kadar saklanmıştır.

3.3. Mikroskopik İnceleme

3.3.1. *Pneumocystis jirovecii* İndirekt Floresan Antikor Testi

Monoklonal immünfloresan boyama yöntemi, MONOFLUO™ *Pneumocystis jirovecii* (*P. carinii*) IFA Test (BIO-RAD, USA) kiti kullanılarak yapılmış ve test tamamen üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır.

Kit içeriği

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

3.3.1.1. Lamaların Hazırlanması

Kabul edilen BAL örnekleri mikroskopik inceleme için 1500 x G'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra örneklerdeki süpernatant uzaklaştırılmış ve altta kalan çökeltiden her bir lam kuyusuna 20 µL örnek eklenerek havada kurutulmuş ve 10 dakika aseton ile fikse edilmiştir.

3.3.1.2. İmmünflorasan Boyama Prosedürü

1. Hazırlanmış ve fikse edilmiş lamalar ve pozitif kontrol lamı için ayrı bir nemli plak hazırlanarak, lamalar bu plaklara yerleştirilmiş ve üzerlerine 2-3 damla *P. jirovecii* boya (R1) eklenmiştir.
2. Lamalar 37°C'de 30 dakika karanlık ve nemli ortamda inkübe edilmiştir.

3. İnkübasyon sonunda boyanın fazlası kurutma kâğıdı ile uzaklaştırılmıştır.
4. Lamlar hafif çalkalama uygulanarak deiyonize su ile 1dk yıkanmış ve 37°C'de kurumaya bırakılmıştır.
5. Lamların üzerine 1-2 damla Mounting medium (R2) damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamelle kapatıldı.
6. Lamlar floresan mikroskopta (515 nm dalga boyu) X400 büyütmede incelenmiştir.
7. Değerlendirme: IFA boyama sonunda *Pneumocystis jirovecii* ile infekte olmuş örnekler hem tek tek hem de kümeler halinde bulunan, parlak elma yeşili tipinde büyük, yuvarlak-eliptik şekilli kistler içermesi beklenmektedir. Floresan mikroskobunda tüm örnek alanı yeşil elma tipinde floresan veren yapıları saptamak amacı ile incelenmiştir. İki veya daha fazla kist görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiş, karakteristik şekilde floresan gözlenmeyen örnekler ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.4. Moleküler Yöntemler

3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya dahil edilen olgulardan alınan BAL örneklerindeki olası *P. jirovecii* varlığını DNA amplifikasyonu yaparak saptamak için uygulayacağımız PCR yöntemi öncesi bu türe ait DNA'ları ekstrakte etme amacı ile QIAGEN DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN GmbH, Almanya) kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan QIAGEN DNeasy Blood & Tissue kitinin içeriği ve firmanın önerileri doğrultusundaki kullanım şekli aşağıda belirtilmiştir:

1. DNA izolasyonu yapılacak her örnek için 20 µL QIAGEN proteaz 1.5 mL'lik ependorf tüplere pipetlenmiş ve üzerine santrüfjü edilen BAL örneğinin çökelti kısmından 100 µL eklenmiştir.
2. Ependorf tüplere 200 µL Buffer AL eklenerek 15 sn vortekslenmiş ve oluşturulan karışım 56°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon süresi sonunda tüplere 200 µL etanol (%96-100) eklenmiş ve vortekslenmiştir.

4. Tüplerdeki karışım DNeasy mini spin kolonuna aktarılmış ve 1 dakika boyunca 8,000rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonrası DNeasy mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne konulmuş ve üzerine 500 µL Buffer AW1 eklenerek 8,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
6. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne konulmuş ve üzerine 500 µL Buffer AW2 eklenerek 3 dakika 14,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
7. Spin kolon yeni bir ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 200 µL Buffer AE eklenerek oda ısısında bekletildikten sonra 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ve 260 nm/280 nm'deki Optik Dansite (OD)'leri, NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı ile ölçülmüştür. Firmanın önerileri doğrultusunda uygun konsantrasyon aralığı (ng/µL cinsinden) ve uygun saflıkta (A 260/280 oranına göre) bulunan ekstraktlar PCR yapılacağı zamana kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.4.2. Amplifikasyon

Moleküler tanı alanında kullanılan tekniklerden biri olan PCR; güvenli, spesifik ve hassas bir yöntemdir. Akciğer hastalığı tanısı alan bireylerdeki *P. jirovecii* varlığının saptanması amacıyla uygulanan real-time PCR yöntemi, aşağıda detayları belirtilen üretici firma önerilerine uygun olarak LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve etkenin kantitatif pozitifliği elde edilen C_T (Cycle Threshold) noktalarına göre değerlendirilmiştir.

Ekstraksiyon sonrası elde edilen ve uygunlukları kontrol edilmiş DNA'ların kantitatif olarak saptanabilmesi için öncelikle LightCycler® 480 II cihazı, LightMix® Hexaplex Color Compensation Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak aranılan etkenin deteksiyonuna uygun hale getirilmiştir. Elde edilen DNA ekstraktları DHPS fas için kanal 580'de, mtLSU için kanal 610'da ve internal control (IC) için kanal 660'da saptanmıştır. Her bir örnek için içerisinde 10 µL PneumoGenius mastermix + 9 µL dilüsyon buffer + 1 µL Taq polimeraz bulunan

totalde 20 μL 'lik amplifikasyon karışımı PCR kuyucuklarına pipetlenmiştir. Her bir döngü için, amplifikasyon karışımı pipetlenmiş PCR kuyucuklarına sırasıyla 5 μL pozitif kontrol (PneumoGenius PC), 5 μL dilüsyon buffer (NTC için), 5'er μL LSU standartları ve her bir örnekten ekstrakte edilen DNA ekstraktları 5 μL 'lik hacimde ayrı ayrı pipetlenerek kuyucuklarda toplamda 25'er μL 'lik son hacim elde edilecek şekilde dağıtılmış ve cihaz aşağıdaki amplifikasyon programına göre çalıştırılmıştır.

Amplifikasyon Programı:

- Taq aktivasyonu 95°C'de 2 dakika
 - Denatürasyon 94°C'de 15 saniye
 - Birleşme ve uzama 60°C'de 60 saniye
 - Denatürasyon 95°C'de 2 dakika
 - Soğuma 45°C'de 90 saniye
- } 45 siklus

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Olgulara ait verilerin değerlendirilmesinde ve olgu genişliğinin belirlenmesinde, çalışmanın bir etkiyi, farklılığı veya ilişkiyi gösterebilme konusundaki duyarlılığının anlaşılmasını sağlayan güç (power) analizi yapılmıştır. Bu analizde 1. tip hata %5, 2. tip hata %20, gruplar arasında yaklaşık %30 etki büyüklüğü öngörüsü (power=%81,542) ile en az 80 adet BAL örneğinin araştırmaya dahil edilmesi gerektiği anlaşılmıştır. Normallik denetimi Shapiro Wilk testi, Histogram, Q-Q plot ve box plot grafikleri çizilerek yapılmıştır. Veriler niteliklerine göre ortalama, standart sapma, minimum, maksimum veya frekans ve yüzde şeklinde verilmiştir. Elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel karşılaştırma yapılırken normal dağılım gösteren değişkenler bağımsız gruplarda t testi ile normal dağılım göstermeyen değişkenler ise Mann Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki nicel değişkenlere ilişkin karşılaştırmalar ise Kruskal Wallis parametrik olmayan tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiş, analiz sonrası çoklu karşılaştırmalar Dunn testi ile yapılmıştır. Kategorik değişkenler ki kare, Yates düzeltilmeli ki kare ve Fisher kesin olasılık testleri ile

değerlendirilmiştir. Altta yatan akciğer hastalığı olan bireylerdeki *P. jirovecii* varlığının IFA ve moleküler yöntemlerle saptanması arasındaki uyumu Cohen's Kappa (κ) testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ ve çift yönlü olarak alınmıştır. Analizler NCSS 10, SPSS 25, G Power 3.1.9.6 programları ve <http://vassarstats.net/> web sitesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında herhangi bir akciğer hastalığı tanısı ile takip edilen toplamda 94 hasta dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen olguların en az 20, en çok 85 yaşında olduğu ve bu olguların yaş ortalamalarının $53,22 \pm 16,47$ yıl olduğu hesaplanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen olgulara ait yaş verileri

	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
Yaş (Yıl)	20	85	53,22	16,47

Çalışmaya dahil edilen toplamda 94 hastanın 36'sının (%38,4) kadın, 58'inin (%61,7) ise erkek cinsiyette olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmaya dahil edilen olguların cinsiyet dağılımları

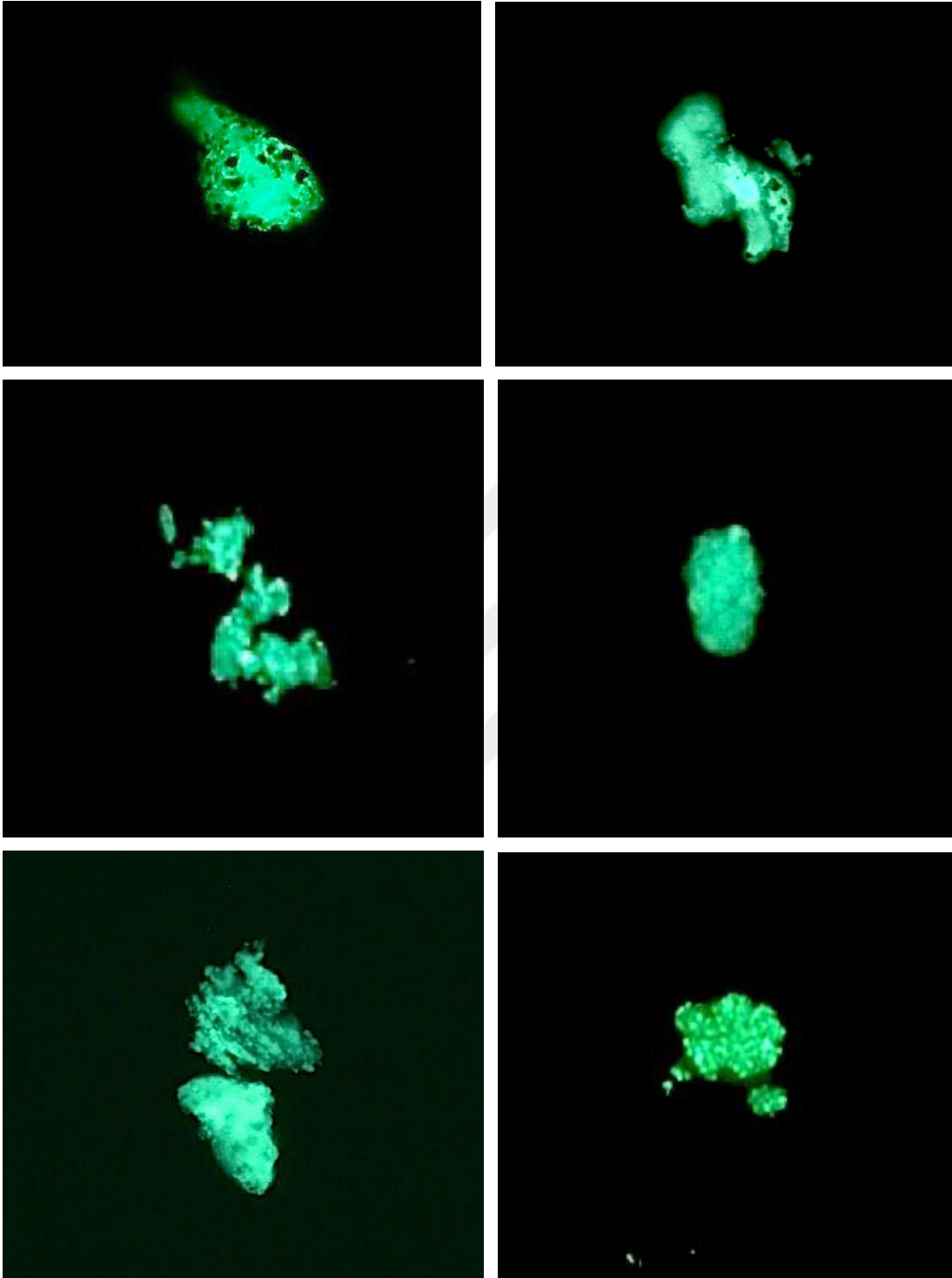
		Sayı (n)	Yüzde (%)
Cinsiyet	Kadın	36	38,4
	Erkek	58	61,7

Akciğer hastalığı tanısı alan toplamda 94 olgu ile gerçekleştirilen çalışmamıza dahil edilen hastalardaki akciğer hastalıklarının 4 ana grupta toplandığı belirlenmiştir. Hastaların 38'inin (%40,4) intersitisyel akciğer hastalığı, 11'inin (%11,7) Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), 28'inin (%29,8) pnömoni ve 17'sinin (%18,1) akciğer kanseri tanısı ile takip edildikleri belirlenmiştir. Çalışmaya alınan hastaların akciğer hastalığına ilişkin sahip oldukları tanılar Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmaya dahil edilen olguların akciğer hastalıkları gruplarına göre dağılımı

		Sayı (n)	Yüzde (%)
Tanı	İntersitisyel Akciğer Hastalığı	38	40,4
	KOAH	11	11,7
	Pnömoni	28	29,8
	Akciğer Kanseri	17	18,1

Akciğer hastalığı nedeniyle takip edilen 94 hastanın dahil edildiği çalışmamızın amaçlarından biri bu hasta grubundaki *P. jirovecii* varlığının gösterilmesi olarak belirlenmiştir. Bu amaçla hastalardan alınan BAL örnekleri mikroskopik (IFA) ve moleküler (PCR) yöntemler ile *P. jirovecii* varlığı açısından incelenmiştir. *P. jirovecii* varlığının belirlenmesinde rutinde sıklıkla kullanılan IFA incelemesi, etkene spesifik monoklonal antikorlardan faydalanılan bir boyama yöntemidir. Bu yöntemde tanısal duyarlılık/özgüllük oranları *P. jirovecii*'ye ait kist ve trofozoit formlar birlikte boyanabildiği için diğer boyama yöntemlerine kıyasla daha yüksek olarak bildirilmektedir. Örneklerdeki *P. jirovecii* varlığı IFA yöntemi ile araştırılmış; 20 olguda (%21,3) *P. jirovecii* saptanmış, 74 olguda (%78,7) ise *P. jirovecii* kist/trofozoit formuna rastlanmamıştır (Şekil 5). *P. jirovecii* varlığının saptanmasında mikroskopik yöntemlere ek olarak moleküler temelli yöntemler de uygulanmaktadır. *P. jirovecii* varlığının araştırılmasında IFA yönteminin rutinde kullanılmasına, infeksiyon/kolonizasyon ayırımında daha başarılı olduğu bildirilmiş olmasına rağmen PCR gibi moleküler temelli testlerin etkene yönelik spesifik gen bölgelerini saptayabilme yetenekleri nedeniyle duyarlılık ve özgüllük oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Çalışmamıza dahil edilen BAL örneklerindeki *P. jirovecii* varlığı mtLSU gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak PCR ile araştırılmış, 22 örnekte (%23,4) PCR ile *P. jirovecii* pozitifliği saptanmış buna karşın 72 örnek (%76,7) ise *P. jirovecii* açısından negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4).



Şekil 5. IFA ile pozitif saptanan bazı hastalara ait görüntüler

Tablo 4. IFA ve PCR inceleme sonuçları

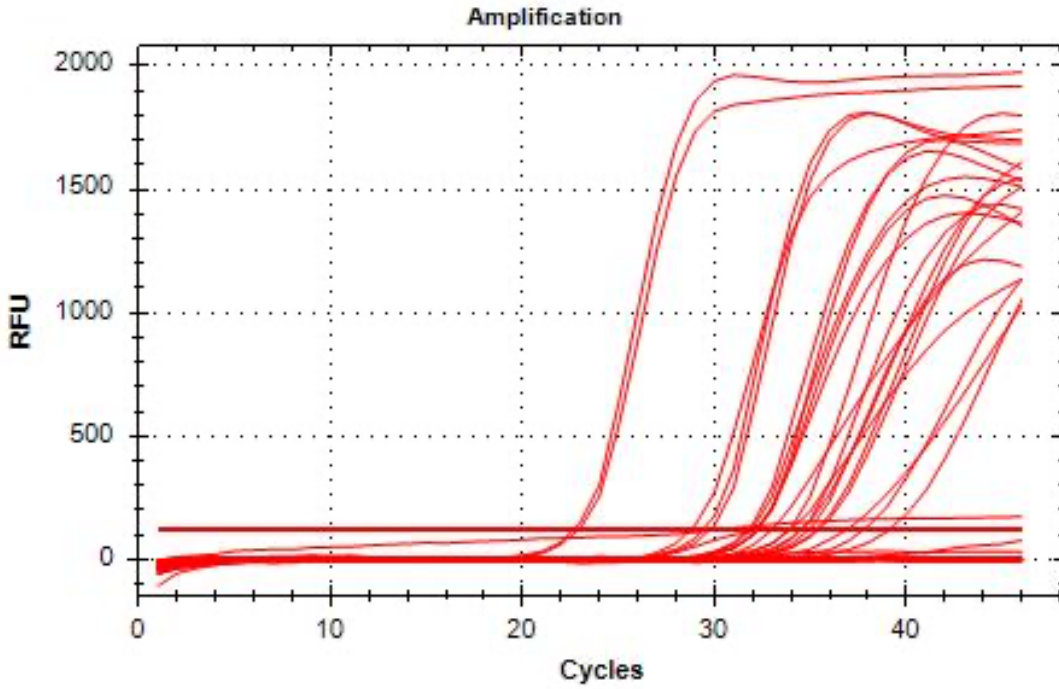
		Sayı (n)	Yüzde (%)
IFA	Pozitif	20	21,3
	Negatif	74	78,7
PCR	Pozitif	22	23,4
	Negatif	72	76,6

Çalışmaya dahil edilen 94 olgunun 22'sinde (%23,4) *P. jirovecii* PCR yöntemi ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. PCR ile *P. jirovecii* açısından pozitif olarak saptanan bu örneklerin quantification cycle (Cq) değerleri ve örneklerle ait ek veriler Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. PCR ile *P. jirovecii* açısından pozitif olarak saptanan örneklerle ait veriler

Olgu No.	Cinsiyet	Yaş	Tanı	IFA	Cq değeri
3	Kadın	65	Akciğer Kanseri	Pozitif	22,67
7	Kadın	42	İnterstisyel Akciğer Hastalığı	Pozitif	41,72
10	Erkek	70	KOAH	Pozitif	39,14
13	Erkek	55	KOAH	Negatif	33,92
16	Kadın	58	Akciğer Kanseri	Pozitif	37,80
17	Kadın	56	Akciğer Kanseri	Pozitif	36,97
21	Kadın	39	KOAH	Negatif	33,04
25	Erkek	52	KOAH	Pozitif	35,45
28	Kadın	67	KOAH	Negatif	29,42
29	Erkek	62	Akciğer Kanseri	Negatif	32,19
32	Erkek	47	KOAH	Pozitif	35,31
34	Erkek	21	Pnömoni	Pozitif	34,98
41	Erkek	49	Akciğer Kanseri	Negatif	30,50
44	Erkek	64	Akciğer Kanseri	Pozitif	34,53
48	Erkek	66	KOAH	Pozitif	34,52
52	Erkek	57	Akciğer Kanseri	Pozitif	34,00
56	Erkek	80	KOAH	Negatif	32,23
62	Kadın	68	Akciğer Kanseri	Negatif	29,78
72	Kadın	55	Akciğer Kanseri	Negatif	32,23
79	Kadın	45	Akciğer Kanseri	Negatif	31,95
83	Kadın	63	Akciğer Kanseri	Negatif	31,73
91	Kadın	61	Akciğer Kanseri	Negatif	22,96

Çalışmaya dahil edilen BAL örnekleri mtLSU gen bölgesine spesifik kantitatif real-time PCR yöntemi ile *P. jirovecii* varlığı açısından incelenmiş ve amplifikasyon eğrileri Texas red (orange) ile elde edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Çalışmaya dahil edilen örneklerin Texas red (orange) ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Çalışmaya dahil edilen olgulardaki *P. jirovecii* saptanmasında duyarlılık ve özgüllük oranları daha yüksek olan moleküler yöntemler temel alınmış ve olguların sosyodemografik ve klinik verileri ile *P. jirovecii* pozitif/negatifliği arasındaki ilişki uygun istatistiksel yöntemler ile değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması *P. jirovecii* pozitif grupta $56,45 \pm 12,67$ yıl, negatif grupta ise $52,24 \pm 17,43$ yıl olduğu belirlenmiş ve yaşa göre *P. jirovecii* pozitif/negatif oranları istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p=0,296$). Çalışmaya dahil edilen olgulardaki kadın ve erkek oranı *P. jirovecii* saptanan hastalarda sırasıyla %50 ve %50 olarak, saptanmayan hastalarda ise %34,7 ve %65,3 olarak hesaplanmış ve cinsiyetler arası fark *P. jirovecii* varlığı açısından benzer olarak değerlendirilmiştir ($p=0,218$). Çalışma grubunu oluşturan hastaların sahip oldukları akciğer hastalıkları ile bu hastalardaki *P. jirovecii* varlığı

da karşılaştırılmıştır. Buna göre, *P. jirovecii* pozitif olarak saptanan 22 hastanın 12'sinde (%54,5) akciğer kanseri, 8'inde (%36,4) KOAH, 1'inde (%4,5) interstisyel akciğer hastalığı ve yine 1'inde (%4,5) pnömoni olarak belirlenmiştir. Hastaların sahip oldukları akciğer hastalıkları ve *P. jirovecii* pozitifliği arasındaki ilişki ise istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olarak bulunmuştur ($p < 0,001$). Çalışma grubunun sosyodemografik ve klinik verileri ile moleküler yöntemler kullanılarak *P. jirovecii* varlığının gösterilmesi arasındaki ilişkiyi özetler nitelikteki istatistiksel veriler Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. PCR ile *P. jirovecii* saptanan/saptanmayan olguların demografik ve klinik verilerine ait karşılaştırmalı istatistikî sonuçlar

		PCR ile <i>P. jirovecii</i> Varlığı		p değeri
		Pozitif	Negatif	
Yaş (Yıl) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)		56,45 $\pm$ 12,67	52,24 $\pm$ 17,43	0,296
Cinsiyet n (%)	Kadın	11 (%50)	25 (%34,7)	0,218
	Erkek	11 (%50)	47 (%65,3)	
Tanı n (%)	İnterstisyel Akciğer Hastalığı	1 (%4,5)	37 (%51,4)	<0,001
	KOAH	8 (%36,4)	3 (%4,2)	
	Pnömoni	1 (%4,5)	27 (%37,5)	
	Akciğer Kanseri	12 (%54,5)	5 (%6,9)	

Çalışmaya katılan 94 olgudaki *P. jirovecii* varlığı IFA ve PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. Literatür bilgisinde iki yöntemin birbirine karşı zayıf/üstün yönlerinin bulunduğu bildirilmektedir. Ancak genel kanı olarak moleküler temelli olan PCR yönteminin duyarlılık ve özellikle özgüllük verilerinin mikroskopik yöntemlere göre daha üstün olduğuna inanılmaktadır. Bu perspektiften yola çıkarak çalışmamızdaki 94 olgudan alınan BAL örneklerindeki *P. jirovecii* varlığının saptanmasında PCR yöntemi baz alınarak IFA'nın bu yöntem ile

arasındaki uyum istatistiksel yöntemler ile belirlenmeye çalışılmıştır. Testlerin tanısal güçlerinin kıyaslanmasında kullanılan Cohen's Kappa (κ) analizinde elde edilen değer <0 ise hiç uyum olmadığı, $0,0 - 0,20$ ise çok düşük uyum, $0,21 - 0,40$ ise orta derecede uyum, $0,41 - 0,60$ ise iyi derecede uyum, $0,61 - 0,8$ önemli derecede uyum ve $0,81 - 1,00$ ise neredeyse mükemmel uyum olduğu yönünde değerlendirilmektedir. Çalışmamızdan elde edilen IFA ve PCR yöntem karşılaştırmasına ilişkin κ değeri $0,387$ olarak hesaplanmış ve bu değer iki yöntem arasındaki uyumun orta derecede olduğu yönünde değerlendirilmiştir ($p < 0,001$). (Tablo 7).

Tablo 7. IFA ve PCR yöntemlerinin *P. jirovecii* saptamadaki uyumlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

		PCR		Cohen's Kappa (κ) Değeri $\pm$ Standart Hata	p değeri
		Pozitif	Negatif		
IFA n	Pozitif	11	9	$0,387 \pm 0,112$	$<0,001$
	Negatif	11	63		

Trimetoprim-Sulfametoksazol *P. jirovecii*'nin yaşam döngüsünde gerekli olan folat sentezi üzerine etki gösteren ve bu nedenle etkenle oluşan infeksiyon tedavisinde en sık olarak kullanılan ilaçtır. Ancak bazı kökenlerde gözlenen DHPS bölgesindeki mutasyonun Sulfometoksazol ve DHFR bölgesindeki mutasyonların ise Trimetoprim direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda ilaç direnci için DHPS bölgesi PCR ile araştırılmış ve *P. jirovecii* pozitif olan (mtLSU bölgesinde pozitiflik saptanan) 22 örneğin 12'sinde (%54,5) DHPS bölgesinde amplifikasyon gözlenmiştir. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda DHPS bölgelerinde saptanan mutasyon analizlerine ilişkin veriler Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. *P. jirovecii* DHPS mutasyon analizi

DHPS genotipleri		Nükleotit (Aminoasit)		Olgular n (%)
		165 (55)	171 (57)	
1	Wild tip (W165/W171)	A (Thr)	C (Pro)	12 (%54,5)
2	Mutant tip (M165/W171)	G (Ala)	C (pro)	0 (%0)
3	Mutant tip (W165/M171)	A (Thr)	T (Ser)	0 (%0)
4	İkili mutant tip (M165/M171)	G (Ala)	T (Ser)	0 (%0)

DHPS amplifikasyonu saptanan bu 12 örneğin ilgili gen bölgesindeki 165. ve 171. nükleotid pozisyonlarında sırasıyla 55. ve 57. aminoasitlerde herhangi bir mutasyon saptanmamış ve tespit edilen DHPS pozitiflikleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda Wild tip (W165/W171) olarak değerlendirilmiştir. DHPS bölgesinde pozitiflik saptanan olgulara ait veriler Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. PCR ile DHPS bölgesinde amplifikasyon saptanan örneklere ait veriler

Cinsiyet	Yaş	Tanı	PCR Cq Değerleri		DHPS tip
			mtLSU	DHPS	
Kadın	61	Akciğer Kanseri	22,96	27,52	W165/W171 (Wild tip)
Kadın	63	Akciğer Kanseri	31,73	27,74	
Kadın	55	Akciğer Kanseri	32,23	33,10	
Kadın	45	KOAH	31,95	35,52	
Kadın	57	Akciğer Kanseri	34,00	36,48	
Kadın	49	Akciğer Kanseri	30,50	36,96	
Kadın	80	Akciğer Kanseri	32,23	37,13	
Erkek	39	Pnömoni	33,04	37,30	
Kadın	55	Akciğer Kanseri	33,92	38,26	
Erkek	64	KOAH	34,53	38,75	
Erkek	47	KOAH	35,31	39,38	
Erkek	66	Akciğer Kanseri	34,52	39,73	

5. TARTIŞMA

Pneumocystis jirovecii (eski adıyla *Pneumocystis carinii* f. *Sp. hominis*), başta HIV ile infekte bireyler olmak üzere immün sistemi baskılanmış kişilerde şiddetli pnömoniye neden olan, dünya çapında dağılıma sahip, pulmoner tropizmlili atipik fırsatçı bir mantardır ¹⁷. *Pneumocystis* türü mikrobiyolojik özellikleri nedeniyle daha önce parazit olarak sınıflandırılırken, rRNA'sı, hücre duvar özellikleri ve sahip olduğu enzim çeşitliliği nedeniyle günümüzde mantar olarak kabul edilmektedir. Ancak bu etken günümüzde mantar kültürlerinde üreyememesi, çeşitli anti-parazitik ilaçlardan etkilenmesi ve hücre duvar yapısında ergosterol yerine kolesterol bulundurması nedenleri ile atipik bir mantar olarak kabul edilmektedir ¹⁵⁴.

Sınıflandırmasında net bir konsensüs bulunmayan *P. jirovecii*'nin temel olarak hava yoluyla bulaş gösterdiği bilinmektedir. Etkenle oluşacak primer infeksiyonun özellikle erken çocukluk döneminde geçirildiği ve sıklıkla basit üst solunum yolu hastalığı şeklinde bir kliniğe neden olduğu bildirilmektedir. PCP'nin ise latent olarak kalan *P. jirovecii*'nin immün sistemin baskılandığı durumlarda reaktif olarak veya etkenle ilk maruziyet sonucu da oluşabileceği düşünülmektedir ¹⁵⁴. Fransa'da 2010 yılında gerçekleştirilen bir araştırmaya PCP tanılı 40 olgu dahil edilmiş, bu olguların 1, 3, 5 ve 8 metre mesafelerinden hava yolu örnekleri alınarak bu örneklerdeki *P. jirovecii* varlığı PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Yazarlar bu araştırma sonucunda, önceki literatür verilerini destekler nitelikte, *P. jirovecii*'nin özellikle yakın temastaki kişiler arasında hava yolu ile bulaştığını doğrulamışlar ve kolonize durumdaki kişilerin de bulaşta etkin bir rolü olabileceğini bildirmişlerdir ¹⁵⁵.

Hava yolu ile bulaştığı için global olarak saptanan bu etkenin prevalans verilerindeki farklılığın çeşitli faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Dünya çapında PCP prevalansına ilişkin epidemiyolojik verilerde sosyoekonomik düzey, coğrafik konum ve altta yatan hastalıklara bağlı olarak farklılık olduğu bilinmektedir. Güncel olarak yapılan bir araştırmada, %10-60 arasında değişen mortalite oranlarına sahip bu infeksiyon etkeninin altta yatan hastalık, komorbidite

ve tanı zamanına bağlı olarak her yıl 400.000'den fazla kişide saptandığı bildirilmiştir ¹⁵⁶.

Eski dönemlerde PCP, etkin bir tedavisinin olmaması ve tanı alma zamanlarının gecikmiş olması nedeniyle sıklıkla HIV/AIDS olgularında saptanmaktaydı. Ancak PCP prevalansının son dönemde kullanımı yaygınlaşan ve klinik etkinlik sağlayan ART sonrası HIV ile infekte bireylerde azalma eğiliminde olduğu bildirilmektedir. HIV/AIDS olgularındaki azalmayla ters orantılı olarak PCP prevalansının HIV enfeksiyonu olmayan bireylerdeki saptanma oranları ile ilgili güncel yayın sayısında ise artış gözlenmektedir. Buna ek olarak, asemptomatik *P. jirovecii* kolonizasyonunun immünokompetan bireylerde daha sık tanımlandığı vurgulanmaktadır ^{10,157}.

Global olarak farklılık bulunan *P. jirovecii* prevalans verilerine ilişkin ülkemizden bildirilen çalışma sayısının kısıtlı olduğu görülmektedir. Ülkemizde saptanan *P. jirovecii* oranlarının dünyada bildirilen veriler ile özellikle kolonizasyon çalışmalarında benzer ancak altta yatan hastalığı olanlarda daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Türkiye'de 2018 yılında Qoraan ve arkadaşları tarafından sağlıklı gönüllü, sağlık çalışanı ve immünsüpresif bireylerin dahil edildiği bir araştırma yapılmıştır. Yazarlar bu araştırma sonucunda %21 ile %28 arasında değişen *P. jirovecii* pozitiflik oranı bildirmiş ve *P. jirovecii*'nin çalışma genelinde saptanma oranını ise %23 olarak hesaplamışlardır ¹⁵⁸. *P. jirovecii*'nin immün sistem ile yakın ilişkide olduğu ve immün sistemi baskılanmış olan gruplarda daha sık enfeksiyon etkeni olarak saptandığı bilinmektedir. Güncel bir veri olarak 2020 yılında gerçekleştirilen bir tez çalışmasının ise bu hipotetik yaklaşımı doğrular nitelikte olduğu düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında yazarlar, %75'i immün sistemi baskılanmış olan toplamda 96 hastanın solunum yolu örneklerinde nested-PCR ile *P. jirovecii* varlığını araştırmış ve %16,7 oranında pozitiflik saptamışlardır. Dünya verilerinde gözlenen heterojen dağılım ülkemizde *P. jirovecii* saptanmasını amaçlayan çalışmalarda da bildirilmektedir. Ülkemizde 2015 ve 2013 yıllarında immün sistemi baskılanmış bireyler ile gerçekleştirilen iki araştırmada, benzer moleküler yöntemler ile saptanan *P. jirovecii* pozitiflik oranlarının sırasıyla %33,7 ve %8 olduğu belirlenmiştir ^{159,160}. Prospektif temelde tasarlanan bu çalışmamıza sadece akciğer hastalığı olan olgular dahil edilmiş ve

P. jirovecii için PCR ile saptanan pozitiflik oranı %23,4 (22/94) olarak hesaplanmıştır.

P. jirovecii'ye bağlı olarak sıklıkla akut (PCP) ve kronik akciğer patolojileri gelişmektedir. Bu hastalıklardan en sık olarak gelişen PCP ise klasik olarak ateş, öksürük ve nefes darlığı ile karakterizedir. Genel olarak, HIV ile infekte bireyler diğer bağışıklığı baskılanmış kişilere göre sub-akut bir seyir ve daha uzun semptom süresi ile başvururlar. Solunum kısıtlılığı, yüksek arteriyel oksijen basıncı ve daha düşük solunum hızı gibi klinik belirtiler HIV ile infekte kişilerde genellikle daha az şiddetlidir ¹⁰³. PCP prevalansı yapılan çalışmalarda birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. İspanya'da yapılan bir araştırmada farklı akciğer hastalıklarına sahip toplamda 80 olgu alınmış, bunlardan 37'si çalışmaya pnömoni tanısı nedeniyle dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen pnömoni hastalarının 14/37 (%37,8)'sinde nested-PCR ile *P. jirovecii* pozitif olarak saptanmıştır ¹⁷. Ülkemizde 2014 yılında akciğer hastalığı olan 30 olgu dahil edilmiş, bu hastalardan pnömoni ile takip edilen olguların 3 tanesinde (%10) *P. jirovecii* pozitif olarak saptanmıştır ¹⁹. Bizim çalışmamızda ise *P. jirovecii* pozitif bulunan olgulardan sadece 1 tanesinin pnömoni tanısı olduğu belirlenmiş ve genel pozitiflik oranına göre pnömoni tanısındaki *P. jirovecii* pozitiflik oranı %4,5 olarak hesaplanmıştır.

P. jirovecii prevalans farklılığındaki en önemli etkenlerden birinin altta yatan hastalık olduğu düşünülmektedir. *P. jirovecii* varlığı için zemin hazırlayıcı konumda bulunan patolojiler arasındaki en önemli yerin, patojenin doğası gereği kronik akciğer hastalıkları olduğu bilinmektedir ^{1,12-14}. İmmünsupresyon olmaksızın kronik akciğer hastalığı olan hastalarda *P. jirovecii* kolonizasyonunun bildirilen ilk kanıtları, etkene spesifik monoklonal antikorlardan faydalanan immünfloresan ve standart boyama yöntemleri kullanılarak gözlenmiş ve hastaların %10'unun kolonize olduğu bildirilmiştir ¹⁶¹. *P. jirovecii* varlığının saptanması mikroskopik yöntemlere ek olarak PCR gibi hassas moleküler tekniklerin geliştirilmesi ile büyük ölçüde kolaylaştırılmıştır ¹⁰⁷. Kronik akciğer hastalıklarında bildirilen *P. jirovecii* kolonizasyon oranı, çalışmanın yapıldığı coğrafik alan ve buna bağlı olarak değerlendirilen popülasyon, çalışılan klinik örneğin cins ve kalitesi, mikroorganizmanın tanısında kullanılan laboratuvar

yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir ¹⁶². Hayvan modellerinde yapılan araştırmalar *P. jirovecii*'nin alveolar makrofaj aktivasyonu, proinflatuar interlökin seviyelerinde yükselme, akciğer yüzey aktif maddesi değişiklikleri, tip I pnömositlerdeki dejeneratif değişiklikler, tip II pnömosit kaynaklı onarıcı özellikteki hipertrofi, alveol-kapiller geçirgenlikte farklılaşmalar, diffüz alveolar hasar ve akciğer fibrozu gibi durumları indüklediği bildirilmiştir ^{163,164}. Buna ek olarak, hücre kültür sisteminin kullanıldığı bir çalışmada, *Pneumocystis* majör yüzey glikoproteininin, insan alveolar epitel hücre hattından interlökin (IL) -8 ve monosit kemoatraktan protein-1 salımını indüklediği ortaya konmuştur ¹⁶⁵. Bu veriler, *Pneumocystis*'in kronik akciğer hastalıklarının ilerlemesinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir ¹. Çalışmamıza dahil edilen olguların önemli bir bölümünü kronik akciğer hastalığı olan hastalar oluşturmaktadır. Kronik akciğer hastalığı nedeniyle takip edilen hastalardan alınan BAL örnekleri PCR ile incelenmiş ve bu olgu grubunda %95,5 (21/22) *P. jirovecii* pozitifliği saptanmıştır.

Kronik akciğer hastalıklarından olan interstisyel akciğer hastalıkları akciğer parankimindeki hasara bağlı olarak akciğer fibrozuna neden olan bir dizi inflamatuvar ve immün süreçler ile ilişkili alt solunum yolunun heterojen bir bozukluk grubu olarak tanımlanmaktadır. Bazı durumlarda bağ dokusunda meydana gelen proliferasyonun kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, infeksiyöz ajanların interstisyel akciğer hastalıklarının patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Pulmoner inflamasyon ile karakterize olan *P. jirovecii*'nin, alveolar hasarın tetiklendiği kazanılmış immün yanıt ile birlikte, interstisyel akciğer hastalığı patogenezinde ve bu hastalığın fibroza ilerlemesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür. İnterstisyel akciğer hastalığı olan olgularda *P. jirovecii* kolonizasyon oranlarının %30 ile %34 arasında değiştiği bildirilmiş ^{17,166,167} ve bu oranların farklı tipteki interstisyel akciğer hastalıklarında benzer olduğu gösterilmiştir ¹⁶⁶. İlginç bir şekilde, 240 interstisyel akciğer hastalığı olan olgularda yürütülen büyük bir çalışmada ¹⁶⁶, *P. jirovecii*'nin kolonize olan olgularda kolonize olmayanlara kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek periferik kan total lökosit ve eozinofil seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca bronkoalveolar lavaj sıvısındaki hücre sayıları kolonize hastalarda düşük CD4/CD8 oranı ile ilişkilendirilmiş, bu durumun ise CD8 + T hücre sayısındaki artma ile ilgili olduğu bildirilmiş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulunamamıştır. Çalışma sonucunda yazarlar, *P. jirovecii* kolonizasyonunun hastalığın alevlenmesi ile ilişkili olabileceğini bildirmiş ve elde edilen verilerin klinik öneminin doğrulaması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir. Ülkemizde 2015 yılında yapılan bir araştırmada, klinik durumları farklı toplamda 92 olguya ait BAL örneklerinin dahil edildiği bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada yazarlar, interstisyel akciğer hastalığı olan olgulardaki *P. jirovecii* pozitiflik oranını %1,1 (1/92) olarak hesaplamış ve tespit edilen bu olgunun kolonizasyon değil klinik olarak PCP olduğunu bildirmişlerdir ¹⁵⁹. Bizim çalışmamızda da bu araştırmayla benzer olarak, *P. jirovecii* pozitif olan sadece 1 olgunun (%1,1) interstisyel akciğer hastalığı nedeniyle takip edildiği belirlenmiştir.

Kronik akciğer hastalıklarından bir diğeri ise global ölümler ile ilişkilendirilen KOAH olarak sınıflandırılmaktadır. KOAH yılda yaklaşık 2,75 milyon ölüme neden olduğu ve bu ölüm oranlarının son dönemde artış gösterdiği bildirilmiştir. Güncel olarak KOAH yetişkinler arasında en sık 4. ölüm nedeni olarak bilinmekte ve 2020 sonrası döneme kadar 3. sırada yer alacağı tahmin edilmektedir ^{168,169}. KOAH tamamen geri döndürülemeyen hava kısıtlaması ile karakterize ve yavaş ilerleyen bir kliniğe sahiptir. Hastalıkta görülen hava kısıtlamasının hem hava yollarında hem de akciğer parankiminde kronik bir inflamatuvar yanıt ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir ¹⁷⁰. Sigara içmek KOAH'ın ana nedeni olarak kabul edilir, ancak tüm sigara içenlerin sadece küçük bir kısmı hastalığı geliştirir. Sigara dışında *P. jirovecii* kolonizasyonu gibi ko-faktörlerin de KOAH gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir ¹⁷¹. Ayrıca sigara içmek, *P. jirovecii* kolonizasyonunu kolaylaştırabilecek mukosiliyer klirensin bozulmasına neden olmaktadır. Özetle, *P. jirovecii*'nin alt solunum yolu kolonizasyonunun, sigara ile birlikte, inflamatuvar yanıtı artıran, sürdüren ve/veya KOAH ilerlemesini hızlandıran bir ko-faktör olduğuna inanılmaktadır. KOAH'lı hastalar arasında bildirilen *P. jirovecii* kolonizasyon oranı genel prevalans oranlarına göre daha yüksektir. Bununla birlikte, *P. jirovecii* prevalansında coğrafi bölge değişime bağlı önemli farklılıklar (%16 - %55) bildirilmektedir ^{81,172}. Aynı coğrafi bölgedeki KOAH hastaları arasında *P. jirovecii* kolonizasyonunun şiddetli KOAH'lılarda daha yaygın olduğu bildirilmiştir ¹⁷³. *P. jirovecii*'ye karşı gelişen pulmoner inflamatuvar yanıtın KOAH ile ilişkili olarak gelişen yanıtı benzer olduğu

ve bu nedenle KOAH hastalarında hava yolu ve parankim hasarının patogeneze katkıda bulunabileceği düşünülmektedir ¹⁷¹.

2004 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada, *P. jirovecii* kolonizasyonunun sigara öyküsünden bağımsız olarak hava yolu tıkanıklığının derecesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ¹⁷³. Yazarlar bu araştırma ile hava yolu tıkanıklığının nedenini kanıtlamış olsa da *P. jirovecii* kolonizasyonunun KOAH ilerlemesine katkı sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir. Benzer bir mekanizma ile *P. jirovecii* tarafından kolonize edilmiş KOAH hastalarının, kolonize olmayan hastalara göre daha yüksek bir sistemik inflamatuvar yanıt (IL-8, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler ve akut faz reaktanlarının seviyelerindeki artış) geliştirdiği bildirilmiştir ¹⁷². KOAH hastalarında sistemik inflamatuvar yanıtın ise, kilo kaybı, kas kaybı ve akciğer fonksiyonundaki azalmayı hızlandırabileceği belirtilmiştir ¹⁷⁴. Ülkemizde 2020 yılında yapılan bir araştırmaya farklı hastalıkları olan 96 olgu dahil edilmiş, bu olguların %16,6 (16/96)'sında *P. jirovecii* pozitif olarak belirlenmiştir. Araştırmada *P. jirovecii* pozitif olan 16 olgunun ise 2 tanesinde (%12,5) altta yatan hastalığın KOAH olduğu bildirilmiştir ¹⁷⁵. Bizim çalışmamızda ise, toplamda 11 KOAH tanısı olan hasta araştırmaya dahil edilmiş ve bu olguların %36,4 (8/11)'ünde *P. jirovecii* pozitif olarak belirlenmiştir.

Tütün ürünlerinin tüketimi akciğer kanserinde en önemli etken konumundadır. Ancak sistemik olan bu hastalık için tütün ürünü kullanımı dışında birçok risk faktörü tanımlanmış durumdadır. Birçok infeksiyöz ajanın ise insan tümörlerinin gelişimindeki rolü yakın zamana kadar gösterilmemiştir ¹⁷⁶. Ancak, dünya çapındaki tüm kanserlerin %15'inin bulaşıcı bir kökene sahip olduğu tahmin edilmektedir ¹⁷⁷. Son zamanlarda, küçük hücreli akciğer karsinomu ile *P. jirovecii* kolonizasyonunun varlığı arasındaki ilişkinin ilk kanıtı bildirilmiştir. Bu çalışmada incelenen tüm küçük hücreli akciğer karsinomu örneklerinde *P. jirovecii* tespit edilmiş ancak bu etken metastazlarda gösterilememiştir. Ancak *P. jirovecii* ve akciğer kanseri arasındaki etyolojik ilişkinin yapısı net olarak ortaya çıkarılamamıştır. Ayrıca, yazarlar tarafından *P. jirovecii* ile kolonizasyonun etyolojik olarak tümör gelişimi için bir risk faktörü olabileceği ve/veya tümörü olanlarda *P. jirovecii* kolonizasyonunun daha kolay oluşabileceği konusundaki ayrımı yapmanın henüz mümkün olmadığı bildirilmiş ve konu ile ilgili ileri

araştırmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir ¹⁸. 2017 yılında 105 çeşitli akciğer hastalığı olan olgunun dahil edildiği bir araştırmada, PCR ile %16,2 (17/105) oranında *P. jirovecii* pozitif olarak belirlenmiştir. Çalışmada pozitif olarak saptanan olguların altta yatan tanılarında ise akciğer kanseri %52,9 (9/17)'luk oranla en sık tanı olarak bildirilmiştir ¹⁷⁸. Bizim çalışmamızda ise akciğer kanseri olan olgu oranı %18 (17/94) olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda PCR ile *P. jirovecii* açısından pozitif olarak saptanan olguların 12 tanesinde (22/12; %54,5) ise altta yatan hastalığın akciğer kanseri olduğu kaydedilmiş ve *P. jirovecii* pozitifliğinin en sık akciğer kanseri olan olgularda saptandığı belirlenmiştir.

P. jirovecii tanısında altın standart olarak kabul edilen yöntem akciğer biyopsi ile yapılan histolojik incelemelerin invaziv temelde, zor ve zaman alıcı olması nedeniyle günümüzde BAL ve indüklenmiş balgam örneklerinde IFA ile *P. jirovecii*'ye ait kist/trofozoit aranması olarak kabul görmektedir ¹⁷⁹. Ancak IFA duyarlılık oranlarının *Pneumocystis* fungal yükünün düşük olduğu, onkolojik ve/veya romatolojik tanı gibi AIDS dışı nedenler ile immün sistemi baskılanmış hastalarda düşük olabileceği bilinmektedir. Ayrıca, BAL ve indüklenmiş balgam örneklerinde IFA testi sonucunda yalancı negatiflik veya artefaktlar ile oluşan olumsuz durumlar ile karşılaşılabilinmektedir ¹⁸⁰. Tanıda kısıtlılığa yol açan bu ve bunun gibi nedeler ile, günümüzde *P. jirovecii* tanısında duyarlılık oranları daha yüksek olan PCR temelli moleküler yöntemler kullanıma girmiştir. Düşük *P. jirovecii* yükü olan, asemptomatik ve immün sistemi baskılanmış bireylerin örnekleri PCR ile pozitif saptanırken, IFA ile negatif olarak belirlenebilmekte ve bu durumda saptanan PCR pozitifliği ise yüksek olasılıkla kolonizasyonu düşündürmektedir. Ancak genel olarak etkendeki genetik elemene spesifik olan PCR ile *P. jirovecii* saptanması özellikle son yıllarda daha sık kullanılmakta ve *P. jirovecii* tanısı alanında PCR ile yapılan araştırma sayısında kayda değer artışlar gözlenmektedir ^{119,180}.

2008 yılında yapılan bir araştırmada 131 hastada *P. jirovecii* pozitifliklerini farklı yöntemler ile araştırmışlardır. Yazarlar *P. jirovecii* varlığını PCR ile 56 hastada (%42,7) ve IFA ile 28 hastada (%21,4) tespit etmişler ve BAL örneklerinin indüklenmiş balgam örneklerine kıyasla daha yüksek duyarlılık/özgüllük oranlarına sahip olduğunu bildirmişlerdir ¹⁸¹. *P. jirovecii* tanısında yapılacak daha

kapsamlı ve güncel araştırma sonuçları ile PCR yönteminin, altın standart olarak kabul edilen IFA yerine geçebileceği rapor edilmektedir. Tayland'da 406 hastanın dahil edildiği bir araştırmada, *P. jirovecii* pozitiflik oranının IFA ile %7, buna karşın PCR ile bu oranın %91,9 olduğu belirlenmiştir ¹⁸². Londra'da HIV ile infekte olan ve olmayan toplamda 46 olgunun dahil edildiği bir araştırmada, *P. jirovecii* pozitifliği IFA ve PCR ile araştırılmış, pozitiflik oranı IFA ile %4,3 olarak bulunurken nested-PCR ile %45,6 olarak belirlenmiştir. Yazarlar elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda klinik olarak PCP şüphesi taşıyan ancak IFA ile negatif olan olgulardaki *P. jirovecii* tanısında PCR yönteminin kullanılmasını önermişlerdir ¹⁸³. Ülkemizde yapılan bir tez çalışmasında ise 96 hasta araştırmaya dahil edilmiş ve bu hastalardaki *P. jirovecii* pozitifliği PCR ile 16 (%16,7), IFA ile ise 5 (%5,2) hastada belirlenmiştir ¹⁷⁵. İmmün yetmezliği olan toplamda 50 bireyin dahil edildiği ülkemizde yapılan bir araştırmada ise *P. jirovecii* pozitifliği IFA yöntemi ile 7 (%14) ve PCR ile 11 (%22) hastada tespit edilmiştir ¹⁸⁴. Bizim çalışmamızda ise akciğer hastalığı olan toplamda 94 hastaya ait BAL örnekleri *P. jirovecii* varlığı açısından IFA ve PCR yöntemleri ile incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen BAL örneklerinde olguların IFA ile 20 (%21,3), PCR ile ise 22 (%23,4) tanesinde *P. jirovecii* pozitifliği saptanmıştır. Sahip olduğu yüksek duyarlılık/özellik oranları, güncel çalışmalarla altın standart olarak kabul görebileceğine ilişkin biriken literatür desteği ve daha gelişmiş bir yöntem olması gibi nedenler ile PCR yöntemi referans olarak kabul edilmiş ve iki yöntem arasındaki uyum Cohen's Kappa (κ) testi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki tanısal uyumu gösteren değerin ($\kappa=0,387$) orta derecede bir uyum ile ilişkili olduğu hesaplanmıştır ($p<0,001$).

P. jirovecii'nin etken olduğu PCP tedavisinde kullanılan ilk seçenek ilaç Trimetoprim-Sülfametoksazol olarak tanımlanmaktadır ¹³⁹. *P. jirovecii*'nin ise bazı kökenlerinde bu ilaca karşı DHPS ve DHFR gen bölgelerindeki mutasyonlar ile direnç geliştirebileceği ve bu durumun da hastalardaki tedavi başarısını negatif yönde etkileyebileceği bildirilmektedir ¹⁸⁵. Hava yolu ile yayılan ve bu nedenle coğrafi olarak farklı prevalans oranlarına sahip olan bu etkene ait DHPS mutasyonlarının oranının ise %0 - %81 arasında değiştiği rapor edilmektedir ¹⁸⁶. DHPS mutasyonlarındaki coğrafi farklılıkların incelendiği araştırmalarda ise bu mutasyon oranları ABD'de en yüksek %81, İtalya'da %9, Fransa'da %33,

Almanya’da %1,2, Portekiz’de %7 ve İsveç’te %0 olarak bildirilirken gelişmekte olan Çin’de %12, Hindistan’da %4,1 ve Brezilya’da %0 olarak bildirilmiştir 75,148,149,187–195.

DHPS mutasyonlarına ilişkin dünya verileri bu konuda yapılan fazla araştırma sayısı nedeniyle çeşitlilik göstermektedir. Ancak ülkemizde *P. jirovecii*’nin sahip olduğu DHPS mutasyonlarının araştırıldığı çalışma sayısının oldukça kısıtlı sayıda olduğu görülmektedir. 2020 yılında ülkemizde yapılan bir araştırmada PCR *P. jirovecii* pozitif saptanan toplamda 16 hastanın sadece 4’ü (%25) Mutant tip olarak saptanırken bu hastaların 12’sinin (%75) ise Wild tip olduğu ve herhangi bir ilaca direnç mutasyonu göstermediği belirlenmiştir ¹⁹⁶. Yapılan çalışma sayısı kısıtlı olmakla birlikte ülkemizdeki DHPS mutant tip oranlarının diğer ülkelere kıyasla düşük olduğu görülmektedir. Ülkemizde 68 olgunun dahil edildiği bir diğer araştırmada ise 28 olguda DHPS gen amplifikasyonu belirlenmiştir. Yazarlar bu araştırmada amplifiye olan 28 olgunun hiç birinde DHPS bölgesine ilişkin bir mutasyon olmadığını ve amplifiye olan tüm örneklerin Wild tip olduğunu raporlamışlardır ¹⁹⁷.

PCR ile *P. jirovecii* pozitif olarak bulunan örneklerin DHPS bölgesindeki mutasyon oranlarının bildirildiği araştırmalarda farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bu farklılığın olası nedeni olarak *P. jirovecii* varlığının saptandığı mtLSU bölgesinin çok kopyalı genler arasında olmasına karşın bu etkendeki DHPS mutasyon bölgesinin ise tek kopya içeren gen ile ilişkili olduğu ve bu durumun mutasyon saptanma oranlarını etkileyebileceği düşünülmektedir ²⁴. Bizim çalışmamızda ise, PCR ile *P. jirovecii* pozitifliği saptanan 22 örneğin 12’sinde DHPS bölgesinde amplifikasyon saptanmış ancak çalışmaya dahil edilen örneklerin hiçbirinde DHPS mutasyonu saptanmamış ve DHPS amplifikasyonu olan tüm örnekler Wild tip olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamız ülkemizde akciğer hastalığı tanısı alanlarda *P. jirovecii* DHPS gen mutasyonlarını araştıran ilk çalışma olma özelliğindedir. Ancak, araştırmamıza bu hastalık grubunda ülkemizde İstanbul ilinde yaşayan kısıtlı sayıdaki olgu dahil edilmiş ve mutant tip *P. jirovecii* varlığına rastlanmamıştır. Dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde DHPS mutasyonlarına ait veriler çeşitlilik gösterdiğinden, ülkemizde DHPS mutasyon varlık/yaygınlığının daha açık bir

şekilde anlaşılabilmesi için farklı bölgelerde yaşayan daha fazla sayıdaki olgunun ekonomik nedenlerden ötürü araştırmaya dahil edilememiş olması çalışmamızın kısıtlılığını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, *P. jirovecii*'nin bağışıklık sistemi normal olan bireylerde asemptomatik bir karakterde olduğu ancak immün sistemdeki zayıflama ve/veya bozukluğa sekonder olarak ciddi infeksiyonlara neden olabileceği bilinmektedir. Çeşitli coğrafi bölgelerdeki yaygınlığının değişken olduğu bilinen *P. jirovecii*'nin erken ve etkili tanısı ile patojenin immün sistemi sağlıklı olan bireylerdeki kolonizasyonunun azalacağı ve böylelikle *P. jirovecii* prevalansının da toplumda kayda değer biçimde düşüş gösterebileceği düşünülmektedir. Kolonizasyonun azalmasına ek olarak etkeni saptamaya yönelik daha duyarlı tanı yöntemleri ile yapılacak incelemelerin *P. jirovecii*'nin esas komplikasyon yarattığı immün sistemi zayıf grupta yer alan kişilerdeki morbidite ve mortalite oranlarındaki azalmaya önemli katkılar sağlayacağına inanılmaktadır. Hastalarda saptanan akciğer patolojilerinde primer veya sekonder olarak gözlenebilen *P. jirovecii* varlığı durumunda ise bu hastalarda yaygın olarak kullanılan ilaçlar ile etkenin tedavisi gündeme gelmektedir. Ancak birçok mikroorganizmada olduğu gibi *P. jirovecii*'de de tedavide kullanılan bu ilaçlara çeşitli mekanizmalar ile direnç gelişme olasılığı olduğu bilinmektedir. *P. jirovecii* ile oluşan kolonizasyon/infeksiyonunun mikroskopik yöntemlere ek olarak duyarlılık/özgüllük oranları daha yüksek moleküler yöntemler ile araştırılmasının toplumsal yaygınlığı azaltabileceği ve/veya bireylerdeki yaşam kalitesini arttırabileceği düşünülmektedir. Özellikle immün sistemdeki baskılanma, doku/organ nakli gibi faktörler nedeniyle risk altında olan ve tedavi başarısı elde edilemeyen grupta, ilaç direncinin moleküler yöntemler ile araştırılması başta hasta sağlığı olmak üzere direnç profilinin ülkesel olarak izlenmesi açılarından da önem taşımaktadır. *P. jirovecii* kolonizasyonu ve bu etken ile oluşan infeksiyonların aydınlatılmasında çeşitli gruplardan daha fazla hasta sayılarının dahil edildiği ve ileri tanısal yöntemlerden de yararlanılan araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Gutiérrez S, Respaldiza N, Campano E, Martínez-Risquez MT, Calderón EJ, De La Horra C. Pneumocystis jirovecii colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite*. 2011;18(2):121-126. doi:10.1051/parasite/2011182121
2. Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, et al. Pneumocystis species, co-evolution and pathogenic power. *Infect Genet Evol*. 2008;8(5):708-726. doi:10.1016/j.meegid.2008.05.001
3. Calderón EJ, Varela JM, Durand-Joly I, Dei-Cas E. In: *Pneumonia: Symptoms, Diagnosis and Treatment Pneumocystis Jirovecii Pneumonia*.; 2011.
4. Mogoye BK, Du Plessis D, Poonsamy B, Frean J. Characterisation of Pneumocystis jirovecii DHPS genotypes using a simple, inexpensive restriction fragment length polymorphism analysis. *South African J Infect Dis*. 2015;30(2):46-50. doi:10.1080/23120053.2015.1054180
5. Liu Y, Su L, Jiang SJ, Qu H. Risk factors for mortality from pneumocystis carinii pneumonia (PCP) in non-HIV patients: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(35):59729-59739. doi:10.18632/oncotarget.19927
6. Wieruszewski PM, Barreto JN, Frazee E, et al. Early Corticosteroids for Pneumocystis Pneumonia in Adults Without HIV Are Not Associated With Better Outcome. *Chest*. 2018;154(3):636-644. doi:10.1016/j.chest.2018.04.026
7. Omer O, Cohen P, Neong SF, Smith G V. Pneumocystis pneumonia complicating immunosuppressive therapy in Crohns disease: A preventable problem? *Frontline Gastroenterol*. 2016;7(3):222-226. doi:10.1136/flgastro-2014-100458
8. Ye WL, Tang N, Wen YB, et al. Underlying renal insufficiency: the pivotal risk factor for Pneumocystis jirovecii pneumonia in immunosuppressed patients with non-transplant glomerular disease. *Int Urol Nephrol*. 2016;48(11):1863-1871. doi:10.1007/s11255-016-1324-x
9. Xue T, Ma Z, Liu F, et al. Pneumocystis jirovecii colonization and its association with pulmonary diseases: A multicenter study based on a

- modified loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Pulm Med*. 2020;20(1):1-13. doi:10.1186/s12890-020-1111-4
10. Ma L, Cissé OH, Kovacs JA. A molecular window into the biology and epidemiology of *Pneumocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(3). doi:10.1128/CMR.00009-18
 11. Morris A, Norris KA. Colonization by *pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):297-317. doi:10.1128/CMR.00013-12
 12. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis*. 2008;197(1):10-17. doi:10.1086/523814
 13. Norris KA, Morris A. *Pneumocystis* infection and the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol Res*. 2011;50(2-3):175-180. doi:10.1007/s12026-011-8218-x
 14. Khalife S, Aliouat EM, Aliouat-Denis CM, et al. First data on *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with respiratory diseases in North Lebanon. *New Microbes New Infect*. 2015;6:11-14. doi:10.1016/j.nmni.2015.02.006
 15. Khodavaisy S, Mortaz E, Mohammadi F, Aliyali M, Fakhim H, Badali H. *Pneumocystis jirovecii* colonization in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Curr Med Mycol*. 2015;1(1):42-48. doi:10.18869/acadpub.cmm.1.1.42
 16. Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol*. 2012;50(5):556-560. doi:10.3109/13693786.2011.645892
 17. Vidal S, de la Horra C, Martín J, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(3):231-235. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01337.x
 18. De La Horra C, Varela JM, Fernández-Alonso J, et al. Association between human-*Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. *Eur J Clin Invest*. 2004;34(3):229-235. doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01317.x
 19. Özkoç S, Bayram Delibaş S, Erbaycu AE mi., Ergüden C, Akısü Ç. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with pulmonary diseases. *Türkiye Parazitol Derg*. 2014;38(4):214-219.

- doi:10.5152/tpd.2014.3611
20. Tasaka S, Tokuda H. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected adults. *Expert Opin Med Diagn.* 2013;7(1):85-97. doi:10.1517/17530059.2012.722080
 21. Reittner P, Ward S, Heyneman L, Johkoh T, Müller NL. Pneumonia: High-resolution CT findings in 114 patients. *Eur Radiol.* 2003;13(3):515-521. doi:10.1007/s00330-002-1490-3
 22. Özkoç S, Alpaydın AÖ, Delibaş SB, Ergüden C, Akkoçlu A. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in a Patient with Interstitial Lung Disease. *Turkiye Parazitol Derg.* 2015;39(1):66-69. doi:10.5152/tpd.2015.3476
 23. Kovacs JA, Ng VL, NG VL, et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Improved Detection in Sputum with Use of Monoclonal Antibodies. *N Engl J Med.* 1988;318(10):589-593. doi:10.1056/nejm198803103181001
 24. Dimonte S, Berrilli F, D'Orazi C, et al. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infect Genet Evol.* 2013;14(1):68-72. doi:10.1016/j.meegid.2012.11.012
 25. Maillet M, Maubon D, Brion JP, et al. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(3):331-336. doi:10.1007/s10096-013-1960-3
 26. Hoarau G, Le Gal S, Zunic P, et al. Evaluation of quantitative FTD-*Pneumocystis jirovecii* kit for *Pneumocystis* infection diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;89(3):212-217. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.001
 27. Meneau I, Sanglard D, Bille J, Hauser PM. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms confer resistance to sulfadoxine and sulfanilamide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2610-2616. doi:10.1128/AAC.48.7.2610-2616.2004
 28. Ma L, Kovacs JA, Cargnel A, Valerio A, Fantoni G, Atzori C. Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii*

- isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis. *J Infect Dis.* 2002;185(10):1530-1532. doi:10.1086/340220
29. Cushion MT, Stringer JR. Stealth and Opportunism: Alternative lifestyles of species in the fungal genus *Pneumocystis*. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:431-452. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134335
 30. Delanoe P, Delanoe M. Sur le reprints des kystes de Carinii du poumon des rats avec *Trypanosoma lewisi*. *Acad Sci.* 1912;155:658-660. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=295016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 31. Van der Meer MG, Brug SL. Infection a *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1942;22:301-309.
 32. Jirovec O. *Pneumocystis carinii* puvodcet. Zv interstitialnich plasmocelularnich pneumonii kojence. *Csl Hyg Epidemiol Mikrobiol.* 1952;1:141.
 33. Gajdusek DC. *Pneumocystis carinii*; etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Pediatrics.* 1957;19(4):543-565.
 34. Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, et al. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist.* 2002;153(3):303-310. doi:10.1078/1434-4610-00107
 35. Chabé M, Aliouat-Denis CM, Delhaes L, Aliouat EM, Viscogliosi E, Dei-Cas E. *Pneumocystis*: From a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS Yeast Res.* 2011;11(1):2-17. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00698.x
 36. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* Pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol.* 2000;38(4):1536-1538. doi:10.1128/jcm.38.4.1536-1538.2000
 37. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):891-896. doi:10.3201/eid0809.020096
 38. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi D V., Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of

- the Fungi. *Nature*. 1988;334(6182):519-522. doi:10.1038/334519a0
39. Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT. Pneumocystis carinii: Sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol*. 1989;68(4):450-461. doi:10.1016/0014-4894(89)90130-6
 40. Demanche C, Berthelemy M, Petit T, et al. Phylogeny of Pneumocystis carinii from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. *J Clin Microbiol*. 2001;39(6):2126-2133. doi:10.1128/JCM.39.6.2126-2133.2001
 41. Keely SP, Fischer JM, Stringer JR. Evolution and Speciation of Pneumocystis. In: *Journal of Eukaryotic Microbiology*. Vol 50. J Eukaryot Microbiol; 2003:624-626. doi:10.1111/j.1550-7408.2003.tb00655.x
 42. Cushion MT, Keely SP, Stringer JR. Molecular and phenotypic description of Pneumocystis wakefieldiae sp. nov., a new species in rats. *Mycologia*. 2004;96(3):429-438. doi:10.1080/15572536.2005.11832942
 43. Keely SP, Fischer JM, Cushion MT, Stringer JR. Phylogenetic identification of Pneumocystis murina sp. nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology*. 2004;150(5):1153-1165. doi:10.1099/mic.0.26921-0
 44. MATSUMOTO Y, YOSHIDA Y. Sporogony in Pneumocystis carinii: Synaptonemal Complexes and Meiotic Nuclear Divisions Observed in Precysts. *J Protozool*. 1984;31(3):420-428. doi:10.1111/j.1550-7408.1984.tb02989.x
 45. VOSHIDA Y. Ultrastructural Studies of Pneumocystis carinii. *J Protozool*. 1989;36(1):53-60. doi:10.1111/j.1550-7408.1989.tb02696.x
 46. Skalski JH, Kottom TJ, Limper AH. Pathobiology of Pneumocystis pneumonia: Life cycle, cell wall and cell signal transduction. *FEMS Yeast Res*. 2015;15(6):46. doi:10.1093/femsyr/fov046
 47. Walzer P., Smulian A. Pneumocystis species. In: Mandell GL, Bennett JE DR, ed. *Principles and Practatice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2010:3377-3390.
 48. Kelly MN, Shellito JE. Current understanding of pneumocystis immunology. *Future Microbiol*. 2010;5(1):43-65. doi:10.2217/fmb.09.116
 49. Aliouat-Denis CM, Martinez A, Aliouat EM, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas

- E. The pneumocystis life cycle. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(3):419-426. doi:10.1590/S0074-02762009000300004
50. Walzer P, Cushion T. *Lung Biology in Health and Disease Book*. 3rd ed; Vo. New York: Marcel Dekker Inc.; 2005.
 51. Vavra J, Kucera K. Pneumocystis carinii Delanoë, its Ultrastructure and Ultrastructural Affinities. *J Protozool*. 1970;17(3):463-483. doi:10.1111/j.1550-7408.1970.tb04715.x
 52. Calderón EJ, Varela JM, Durand-Joly I, Dei-Cas E. Pneumocystis jirovecii pneumonia. *Pneumonia Symptoms, Diagnosis Treat*. 2011;2(2):1-35. doi:10.5005/jp/books/13112_25
 53. JJ R. Pneumocystis carinii cell structure. In: PD W, ed. *Pneumocystis Carinii Pneumonia*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1994:3-24.
 54. B Ö. AIDS'li ve diğer immün Suprese Hastalarda Pneumocystis Carini Pnömonisinin Tanısında Çeşitli Yöntemlerin Karşılaştırılması. Published online 1993.
 55. M.T C. Pneumocystis. In: PR M, EJ B, JH J, MA P, RH Y, eds. *Manual of Clinical Microbiol*. 9th ed. ASM Pres, Washington DC; 2007:1789-1801.
 56. Wazir JF, Ansari NA. Pneumocystis carinii infection: Update and review. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(9):1023-1027. doi:10.1043/1543-2165(2004)128<1023:PCI>2.0.CO;2
 57. Thomas CF, Limper AH. Medical progress: Pneumocystis pneumonia. *N Engl J Med*. 2004;350(24):2487-2498+2533. doi:10.1056/NEJMra032588
 58. Kaneshiro ES. Sterol metabolism in the opportunistic pathogen Pneumocystis: Advances and new insights. *Lipids*. 2004;39(8):753-761. doi:10.1007/s11745-004-1292-5
 59. Daly KR, Koch J, Levin L, Walzer PD. Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Serologic Responses to Pneumocystis jirovecii. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(5):848-854. doi:10.3201/eid1005.030497
 60. Stringer JR. Antigenic variation in Pneumocystis. *J Eukaryot Microbiol*. 2007;54(1):8-13. doi:10.1111/j.1550-7408.2006.00225.x
 61. Esteves F, Tavares A, Costa MC, Gaspar J, Antunes F, Matos O. Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of Pneumocystis jirovecii. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(2):175-178. doi:10.1007/s10096-008-

0596-1

62. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, et al. Pneumocystis jirovecii in general population. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2):245-250. doi:10.3201/eid1102.040487
63. Sokulska M, Kicia M, Wesołowska M, Hendrich AB. Pneumocystis jirovecii—from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitol Res.* 2015;114(10):3577-3585. doi:10.1007/s00436-015-4678-6
64. Agarwal R, Reddy C, Aggarwal AN, Saxena AK. It's Pneumocystis jirovecii not Pneumocystis carinii. *Chest.* 2006;129(2):498. doi:10.1378/chest.129.2.498
65. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. Pneumocystis carinii f. sp. hominis DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with P. carinii pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2001;39(11):3877-3882. doi:10.1128/JCM.39.11.3877-3882.2001
66. Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, et al. Immunocompetent hosts as a reservoir of Pneumocystis organisms: Histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23(2):89-97. doi:10.1007/s10096-003-1092-2
67. Hauser PM, Blanc DS, Bille J, Nahimana A, Francioli P. Carriage of Pneumocystis carinii by immunosuppressed patients and molecular typing of the organisms. *AIDS.* 2000;14(4):461-463. doi:10.1097/00002030-200003100-00022
68. Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, et al. Vertical transmission of Pneumocystis jirovecii in humans. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):125-127. doi:10.3201/eid1501.080242
69. Cere N, Drouet-Viard F, Dei-Cas E, Chanteloup N, Coudert P. In utero transmission of Pneumocystis carinii sp. f. oryctolagi. *Parasite.* 1997;4(4):325-330. doi:10.1051/parasite/1997044325
70. Hong ST, Park YK, Kim J, Kim DH, Yun CK. Is Pneumocystis carinii vertically transmitted to neonatal rats? *Korean J Parasitol.* 1999;37(3):149-156. doi:10.3347/kjp.1999.37.3.149
71. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, et al. Search for primary infection by Pneumocystis carinii in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect*

- Dis.* 2001;32(6):855-861. doi:10.1086/319340
72. Chen W, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* 1993;61(12):5406-5409. doi:10.1128/iai.61.12.5406-5409.1993
 73. Vargas SL, Hughes WT, Wakefield AE, Oz HS. Limited persistence in and subsequent elimination of *pneumocystis carinii* from the lungs after *P. Carinii* pneumonia. *J Infect Dis.* 1995;172(2):506-510. doi:10.1093/infdis/172.2.506
 74. Keely SP, Stringer JR, Baughman RP, Linke MJ, Walzer PD, Smulian AG. Genetic variation among *pneumocystis carinii* hominis isolates in recurrent pneumocystosis. *J Infect Dis.* 1995;172(2):595-598. doi:10.1093/infdis/172.2.595
 75. Beard CB, Carter JL, Keely SP, et al. Genetic variation in *pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: Implications for transmission. *Emerg Infect Dis.* 2000;6(3):265-272. doi:10.3201/eid0603.000306
 76. Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin Infect Dis.* 2010;50(3):347-353. doi:10.1086/649868
 77. Morris A, Lundgren JD, Masur H, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(10):1713-1720. doi:10.3201/eid1010.030985
 78. Chaisson RE, Keruly J, Richman DD, Moore RD. *Pneumocystis* Prophylaxis and Survival in Patients With Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection Treated With Zidovudine. *Arch Intern Med.* 1992;152(10):2009-2013. doi:10.1001/archinte.1992.00400220041007
 79. Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM. An official ATS workshop summary: Recent advances and future directions in *Pneumocystis* pneumonia (PCP). *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(8):655-664. doi:10.1513/pats.200602-015MS
 80. Constance AB, Jonathan EK, Henry M, Alice P, King KH, America CNI of HIDS of. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and

- adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*. 2004;17(53):1-112.
81. Nevez G, Magois E, Duwat H, Gouilleux V, Jounieaux V, Totet A. Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clin Infect Dis*. 2006;42(11):e99-e101. doi:10.1086/503908
 82. Yiannakis EP, Boswell TC. Systematic review of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: Evidence that *P. jirovecii* is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. *J Hosp Infect*. 2016;93(1):1-8. doi:10.1016/j.jhin.2016.01.018
 83. Carmona EM, Limper AH. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *Ther Adv Respir Dis*. 2011;5(1):41-59. doi:10.1177/1753465810380102
 84. Vuk-Pavlović Z, Mo EK, Icenhour CR, Standing JE, Fisher JH, Limper AH. Surfactant protein D enhances *Pneumocystis* infection in immune-suppressed mice. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(3). doi:10.1152/ajplung.00112.2005
 85. Totet A, Latouche S, Lacube P, et al. *Pneumocystis jirovecii* Dihydropteroate Synthase Genotypes in Immunocompetent Infants and Immunosuppressed Adults, Amiens, France. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(4):667-673. doi:10.3201/eid1004.030451
 86. Heinz M. *Encyclopedia of Parasitology*. Springer Berlin Heidelberg; 2008. doi:10.1007/978-3-540-48996-2
 87. Walzer PD. Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(2):149-155. doi:10.1128/cdli.6.2.149-155.1999
 88. Steele C, Marrero L, Swain S, et al. Alveolar Macrophage-mediated Killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris Involves Molecular Recognition by the Dectin-1 β -Glucan Receptor. *J Exp Med*. 2003;198(11):1677-1688. doi:10.1084/jem.20030932
 89. Hoving JC, Kolls JK. New advances in understanding the host immune response to *Pneumocystis*. *Curr Opin Microbiol*. 2017;40:65-71. doi:10.1016/j.mib.2017.10.019

90. Lu JJ, Lee CH. Pneumocystis pneumonia. *J Formos Med Assoc.* 2008;107(11):830-842. doi:10.1016/S0929-6646(08)60199-0
91. Zhang J, Zhu J, Imrich A, Cushion M, Kinane TB, Koziel H. Pneumocystis activates human alveolar macrophage NF- κ B signaling through mannose receptors. *Infect Immun.* 2004;72(6):3147-3160. doi:10.1128/IAI.72.6.3147-3160.2004
92. Blount RJ, Daly KR, Fong S, et al. Effects of clinical and environmental factors on bronchoalveolar antibody responses to *Pneumocystis jirovecii*: A prospective cohort study of HIV+ patients. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180212. doi:10.1371/journal.pone.0180212
93. de la Rua NM, Samuelson DR, Charles TP, Welsh DA, Shellito JE. CD4+ T-cell-independent secondary immune responses to *Pneumocystis pneumonia*. *Front Immunol.* 2016;7(MAY). doi:10.3389/fimmu.2016.00178
94. Rapaka RR, Ricks DM, Alcorn JF, et al. Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*. *J Exp Med.* 2010;207(13):2907-2919. doi:10.1084/jem.20100034
95. Eddens T, Kolls JK. Pathological and protective immunity to *Pneumocystis* infection. *Semin Immunopathol.* 2015;37(2):153-162. doi:10.1007/s00281-014-0459-z
96. Gigliotti F, Crow EL, Bhagwat SP, Wright TW. Sensitized CD8+ T cells fail to control organism burden but accelerate the onset of lung injury during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun.* 2006;74(11):6310-6316. doi:10.1128/IAI.00668-06
97. Bhagwat SP, Gigliotti F, Xu H, Wright TW. Contribution of T cell subsets to the pathophysiology of *Pneumocystis*-related immunorestitution disease. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(6):1256-1266. doi:10.1152/ajplung.00079.2006
98. Swain SD, Meissner NN, Harmsen AG. CD8 T cells modulate CD4 T-cell and eosinophil-mediated pulmonary pathology in *Pneumocystis pneumonia* in B-cell-deficient mice. *Am J Pathol.* 2006;168(2):466-475. doi:10.2353/ajpath.2006.050724
99. Lund FE, Hollifield M, Schuer K, Lines JL, Randall TD, Garvy BA. B Cells

- Are Required for Generation of Protective Effector and Memory CD4 Cells in Response to Pneumocystis Lung Infection. *J Immunol.* 2006;176(10):6147-6154. doi:10.4049/jimmunol.176.10.6147
100. Tasaka S, Tokuda H. Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother.* 2012;18(6):793-806. doi:10.1007/s10156-012-0453-0
 101. De Armas Rodríguez Y, Wissmann G, Müller AL, et al. Pneumocystis Jirovecii pneumonia in developing countries. *Parasite.* 2011;18(3):219-228. doi:10.1051/parasite/2011183219
 102. Ng VL, Yajko DM, Hadley WK. Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):401-418. doi:10.1128/cmr.10.3.401-418.1997
 103. Catherinot E, Lanternier F, Bougnoux ME, Lecuit M, Couderc LJ, Lortholary O. Pneumocystis jirovecii Pneumonia. *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24(1):107-138. doi:10.1016/j.idc.2009.10.010
 104. Wormser GP, Mutton KJ. Pneumocystis Pneumonia, 3rd Edition Edited by Peter D. Walzer and Melanie T. Cushion New York: Marcel Dekker, 2005. 715 pp., \$229.95 (cloth). *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):919-919. doi:10.1086/432811
 105. Miller RF, Huang L, Walzer PD. Pneumocystis Pneumonia Associated with Human Immunodeficiency Virus. *Clin Chest Med.* 2013;34(2):229-241. doi:10.1016/j.ccm.2013.02.001
 106. Vogel MN, Vatlach M, Weissgerber P, et al. HRCT-features of Pneumocystis jirovecii pneumonia and their evolution before and after treatment in non-HIV immunocompromised patients. *Eur J Radiol.* 2012;81(6):1315-1320. doi:10.1016/j.ejrad.2011.02.052
 107. Calderón EJ, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E. Pneumocystis infection in humans: Diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(6):683-701. doi:10.1586/eri.10.42
 108. Henry R. Etymologia: Pneumocystis jirovecii. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(8):1245-1245. doi:10.3201/eid2308.et2308
 109. Gigliotti F, Limper AH, Wright T. Pneumocystis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(12). doi:10.1101/cshperspect.a019828
 110. Krajicek BJ, Limper AH, Thomas CF. Advances in the biology,

- pathogenesis and identification of *Pneumocystis pneumonia*. *Curr Opin Pulm Med*. 2008;14(3):228-234. doi:10.1097/MCP.0b013e3282f94abc
111. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1531-1537. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03400.x
 112. Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;45(3):405-410. doi:10.1016/j.femsim.2005.06.006
 113. Yang SL, Wen YH, Wu YS, et al. Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* by real-time PCR in patients with various underlying diseases. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;53(5):785-790. doi:10.1016/j.jmii.2019.08.012
 114. Bandt D, Monecke S. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *Transpl Infect Dis*. 2007;9(3):196-202. doi:10.1111/j.1399-3062.2007.00246.x
 115. Cooley L, Dendle C, Wolf J, et al. Consensus guidelines for diagnosis, prophylaxis and management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014. *Intern Med J*. 2014;44(12):1350-1363. doi:10.1111/imj.12599
 116. Robberts FJL, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58(4):385-392. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.02.014
 117. Olsson M, Strålin K, Holmberg H. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7(9):492-497. doi:10.1046/j.1469-0691.2001.00309.x
 118. Lu Y, Ling G, Qiang C, et al. PCR diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: A bivariate meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(12):4361-4363. doi:10.1128/JCM.06066-11
 119. Fan LC, Lu HW, Cheng K Bin, Li HP, Xu JF. Evaluation of PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: A Bivariate Meta-Analysis and Systematic Review. *PLoS One*.

- 2013;8(9). doi:10.1371/journal.pone.0073099
120. Fauchier T, Hasseine L, Gari-Toussaint M, Casanova V, Marty PM, Pomares C. Detection of pneumocystis jirovecii by quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-Positive and HIV-Negative Patients. *J Clin Microbiol.* 2016;54(6):1487-1495. doi:10.1128/JCM.03174-15
 121. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, et al. ECIL guidelines for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9). doi:10.1093/jac/dkw156
 122. Robert-Gangneux F, Belaz S, Revest M, et al. Diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in immunocompromised patients by real-time PCR: A 4-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 2014;52(9):3370-3376. doi:10.1128/JCM.01480-14
 123. Unnewehr M, Friederichs H, Bartsch P, Schaaf B. High diagnostic value of a new real-time pneumocystis PCR from bronchoalveolar lavage in a real-life clinical setting. *Respiration.* 2016;92(3):144-149. doi:10.1159/000448626
 124. Vogel MN, Weissgerber P, Goeppert B, et al. Accuracy of serum LDH elevation for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia. *Swiss Med Wkly.* 2011;141(APRIL). doi:10.4414/smw.2011.13184
 125. Passos AIM, Dertkigil RP, Ramos M de C, et al. Serum markers as an aid in the diagnosis of pulmonary fungal infections in AIDS patients. *Brazilian J Infect Dis.* 2017;21(6):606-612. doi:10.1016/j.bjid.2017.07.002
 126. Salzer HJF, Schäfer G, Hoenigl M, et al. Clinical, Diagnostic, and Treatment Disparities between HIV-Infected and Non-HIV-Infected Immunocompromised Patients with Pneumocystis jirovecii Pneumonia. *Respiration.* 2018;96(1):52-65. doi:10.1159/000487713
 127. Morjaria S, Frame J, Franco-Garcia A, Geyer A, Kamboj M, Esther Babady N. Clinical Performance of (1,3) Beta-D Glucan for the Diagnosis of Pneumocystis Pneumonia (PCP) in Cancer Patients Tested with PCP Polymerase Chain Reaction. *Clin Infect Dis.* 2019;69(8):1303-1309. doi:10.1093/cid/ciy1072

128. Del Corpo O, Butler-Laporte G, Sheppard DC, Cheng MP, McDonald EG, Lee TC. Diagnostic accuracy of serum (1-3)- β -D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(9):1137-1143. doi:10.1016/j.cmi.2020.05.024
129. Hammarström H, Grankvist A, Broman I, et al. Serum-based diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* by detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA and 1,3- β -D-glucan in HIV-infected patients: A retrospective case control study. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1). doi:10.1186/s12879-019-4289-4
130. Deng C, Li Y, Li Y. Systemic review: The accuracy of lactic dehydrogenase in the diagnosis of pneumocystis pneumonia. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2018;30(4):322-326. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.04.007
131. Esteves F, Lee CH, De Sousa B, et al. (1-3)-Beta-D-glucan in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of *Pneumocystis pneumonia* (PcP) in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(7):1173-1180. doi:10.1007/s10096-014-2054-6
132. Merali S, Clarkson AB. S-Adenosylmethionine and *Pneumocystis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;237(2):179-186. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09694.x
133. Esteves F, Calé SS, Badura R, et al. Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: Evaluation of four serologic biomarkers. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(4):379.e1-379.e10. doi:10.1016/j.cmi.2014.11.025
134. Perez-Leal O, Moncada C, Clarkson AB, Merali S. *Pneumocystis* S-adenosylmethionine transport: A potential drug target. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(6):1142-1146. doi:10.1165/rcmb.2011-0009OC
135. Skelly M, Merali S, Clarkson AB. *Pneumocystis pneumonia* and S-adenosylmethionine plasma levels. *J Infect.* 2011;62(6):490-492. doi:10.1016/j.jinf.2011.04.012
136. Ma H, Lu J, Song Y, Wang H, Yin S. The value of serum Krebs von den lungen-6 as a diagnostic marker in connective tissue disease associated with interstitial lung disease. *BMC Pulm Med.* 2020;20(1). doi:10.1186/s12890-019-1043-z
137. Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, et al. Serum indicators for the

- diagnosis of pneumocystis pneumonia. *Chest*. 2007;131(4):1173-1180. doi:10.1378/chest.06-1467
138. Nakamura H, Tateyama M, Tasato D, et al. Clinical utility of serum β -D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Intern Med*. 2009;48(4):195-202. doi:10.2169/internalmedicine.48.1680
 139. Szydlowicz M, Jakuszko K, Szymczak A, et al. Prevalence and genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in renal transplant recipients—preliminary report. *Parasitol Res*. 2019;118(1):181-189. doi:10.1007/s00436-018-6131-0
 140. Masters PA, O'Bryan TA, Zurlo J, Miller DQ, Joshi N. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Arch Intern Med*. 2003;163(4):402-410. doi:10.1001/archinte.163.4.402
 141. Pytliak M, Vargova V, Mechirov V. Drugs and Hypoglycemia. In: *Hypoglycemia - Causes and Occurrences*. InTech; 2011. doi:10.5772/20563
 142. Long Y, Zhang C, Su L, Que C. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations in a group of HIV-negative immunocompromised patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Exp Ther Med*. 2014;8(6):1825-1830. doi:10.3892/etm.2014.2002
 143. Nahimana A, Rabodonirina M, Bille J, Francioli P, Hauser PM. Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(11):4301-4305. doi:10.1128/AAC.48.11.4301-4305.2004
 144. Costa MC, Esteves F, Antunes F, Matos O. Genetic characterization of the dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(6):1246-1249. doi:10.1093/jac/dkl411
 145. Takahashi T, Endo T, Nakamura T, et al. Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in Japan. *J Med Microbiol*. 2002;51(6):510-515. doi:10.1099/0022-1317-51-6-510
 146. Siripattanapipong S, Leelayoova S, Mungthin M, Worapong J, Tan-Ariya P. Study of DHPS and DHFR genes of *Pneumocystis jirovecii* in Thai HIV-infected patients. *Med Mycol*. 2008;46(4):389-392. doi:10.1080/13693780701883722

147. Montesinos I, Delforge ML, Ajjaham F, et al. Evaluation of a new commercial real-time PCR assay for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and identification of dihydropteroate synthase (DHPS) mutations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87(1):32-36. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.005
148. Le Gal S, Damiani C, Perrot M, et al. Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(2):119-124. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.002
149. Crothers K, Beard CB, Turner J, et al. Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS.* 2005;19(8):801-805. doi:10.1097/01.aids.0000168974.67090.70
150. Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, et al. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. *Clin Infect Dis.* 2010;51(4):e28-e33. doi:10.1086/655145
151. Avino LJ, Naylor SM, Roecker AM. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in the Non-HIV-Infected Population. *Ann Pharmacother.* 2016;50(8):673-679. doi:10.1177/1060028016650107
152. Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(1):96-128. doi:10.1164/rccm.2008-740ST
153. Huang YS, Yang JJ, Lee NY, et al. Treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: a review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(9):873-892. doi:10.1080/14787210.2017.1364991
154. Ataman Hatipoğlu Ç. *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi. *Türk HIV AIDS Derg.* 2016;13(1):13-20.
155. Choukri F, Menotti J, Sarfati C, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2010;51(3):259-265. doi:10.1086/653933
156. Firacative C. Invasive fungal disease in humans: Are we aware of the real impact? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115(9):1-9. doi:10.1590/0074-

02760200430

157. Beard CB, Fox MK, Lawrence GG, et al. Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: Epidemiological implications. *J Infect Dis.* 2005;192(10):1815-1818. doi:10.1086/497381
158. Qoraan I. The investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in adult individuals of Turkish population. *Biometrics Biostat Int J.* 2018;7(4). doi:10.15406/bbij.2018.07.00223
159. Özkoç S, Bayram Delibaş S. İyatrojenik İmmünoşüpresif ve İmmünokompetan Hastalarda *Pneumocystis jirovecii* Pnömonisi ve Kolonizasyonunun Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(2):221-230. doi:10.5578/mb.9344
160. Tekinşen FF, Koç NA. Klinik Örneklerde Çeşitli Yöntemlerle *Pneumocystis jirovecii* Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(4):658-667. Accessed May 14, 2021. http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/2013-04/html/2013-47-4-658-667.htm
161. Calderon EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease [22]. *Lancet.* 1996;347(9006):977. doi:10.1016/S0140-6736(96)91468-3
162. Varela JM, Regordán C, Medrano FJ, et al. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(8):770-772. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00937.x
163. Aliouat EM, Escamilla R, Cariven C, et al. Surfactant changes during experimental pneumocystosis are related to *Pneumocystis* development. *Eur Respir J.* 1998;11(3):542-547.
164. Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(4):298-308. doi:10.1038/nrmicro1621
165. Benfield TL, Lundgren B, Shelhamer JH, Lundgren JD. *Pneumocystis carinii* major surface glycoprotein induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 release from a human alveolar epithelial cell line. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(8):717-722. doi:10.1046/j.1365-2362.1999.00517.x

166. Martín-Juan J, Izquierdo LG, Becerra ER, Horra C De. Factores relacionados con la infección por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa (EPID). *Neumosur (Sevilla)*. 2008;20(2):65-73.
167. Shimizu Y, Sunaga N, Dobashi K, et al. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: A prospective study. *BMC Infect Dis*. 2009;9. doi:10.1186/1471-2334-9-47
168. Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB, et al. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2006;27(1):188-207. doi:10.1183/09031936.06.00024505
169. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: Current burden and future projections. *Eur Respir J*. 2006;27(2):397-412. doi:10.1183/09031936.06.00025805
170. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. In: *Proceedings of the American Thoracic Society*. Vol 2. Proc Am Thorac Soc; 2005:258-266. doi:10.1513/pats.200504-045SR
171. Morris A, Sciurba FC, Norris KA. *Pneumocystis*: A novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2008;5(1):43-51. doi:10.1080/15412550701817656
172. Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N, et al. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis*. 2007;45(2). doi:10.1086/518989
173. Morris A, Sciurba FC, Lebedeva IP, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(4):408-413. doi:10.1164/rccm.200401-094OC
174. Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: A systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004;59(7):574-580. doi:10.1136/thx.2003.019588
175. Gülbudak H, Öztürk C, Kuyugöz S, Tezcan Ülger S. Investigation of *pneumocystis jirovecii* infection and colonization in immunocompromised patients with pneumonia. *Mikrobiyol Bul*. 2021;54(4):583-595. doi:10.5578/MB.69853

176. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med.* 2000;248(3):171-183. doi:10.1046/j.1365-2796.2000.00742.x
177. Pisani P, Parkin DM, Muñoz N, Ferlay J. Cancer and infection: Estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6(6):387-400.
178. Sokulska M, Kicia M, Wesołowska M, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in colonized patients with various pulmonary diseases. *Med Mycol.* 2018;56(7):809-815. doi:10.1093/mmy/myx121
179. Kovacs JA, Masur H. Evolving health effects of *Pneumocystis*: One hundred years of progress in diagnosis and treatment. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2009;301(24):2578-2585. doi:10.1001/jama.2009.880
180. Bossart S, Mühlethaler K, Garzoni C, Furrer H. Is real time PCR preferable to the direct immunofluorescence in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients? *BMC Res Notes.* 2020;13(1):1-5. doi:10.1186/s13104-020-05075-5
181. Aderaye G, Woldeamanuel Y, Asrat D, et al. Evaluation of toluidine blue O staining for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* in expectorated sputum sample and bronchoalveolar lavage from HIV-infected patients in a tertiary care referral center in Ethiopia. *Infection.* 2008;36(3):237-243. doi:10.1007/s15010-007-7191-8
182. Chotiprasitsakul D, Pewloungsawat P, Setthaudom C, Santanirand P, Pornsuriyasak P. Performance of real-time PCR and immunofluorescence assay for diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in real-world clinical practice. *PLoS One.* 2021;15(12 December):e0244023. doi:10.1371/journal.pone.0244023
183. Musa MO, Al Douri M, Khan S, Shafi J, Al Humaidh A, Al Rasheed AM. Fulminant septicaemic syndrome of *Bacillus cereus*: Three case reports. *J Infect.* 1999;39(2):154-156. doi:10.1016/S0163-4453(99)90009-9
184. Tosun I, Buruk K, Dede R, Kaklikkaya N. Immün yetmezliği olan hastaların solunum yolu örneklerinde PCR, IFA ve giemsa boyama yöntemleriyle *pneumocystis jirovecii*'nin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(1):195-197. doi:10.5578/mb.4292

185. Armstrong W, Meshnick S, Kazanjian P. Pneumocystis carinii mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *Microbes Infect.* 2000;2(1):61-67. doi:10.1016/S1286-4579(00)00284-7
186. Matos O, Esteves F. Epidemiology and clinical relevance of Pneumocystis jirovecii Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite.* 2010;17(3):219-232. doi:10.1051/parasite/2010173219
187. Deng X, Zhuo L, Lan Y, et al. Mutational analysis of Pneumocystis jirovecii dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase genes in HIV-infected patients in China. *J Clin Microbiol.* 2014;52(11):4017-4019. doi:10.1128/JCM.01848-14
188. Tyagi AK, Mirdha BR, Luthra K, et al. Pneumocystis jirovecii dihydropteroate synthase (DHPS) genotypes in non-HIV-immunocompromised patients: A tertiary care reference health centre study. *Med Mycol.* 2011;49(2):167-171. doi:10.3109/13693786.2010.505584
189. Huang L, Beard CB, Creasman J, et al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the Pneumocystis carinii dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis.* 2000;182(4):1192-1198. doi:10.1086/315824
190. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, et al. Pneumocystis carinii mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis.* 2000;182(2):551-557. doi:10.1086/315719
191. Valerio A, Tronconi E, Mazza F, et al. Genotyping of Pneumocystis jirovecii pneumonia in Italian AIDS patients: Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45(5):521-528. doi:10.1097/QAI.0b013e3180decbe2
192. Suárez I, Roderus L, van Gumpel E, et al. Low prevalence of DHFR and DHPS mutations in Pneumocystis jirovecii strains obtained from a German cohort. *Infection.* 2017;45(3):341-347. doi:10.1007/s15010-017-1005-4
193. Beser J, Dini L, Botero-Kleiven S, Krabbe M, Lindh J, Hagblom P. Absence

- of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from Swedish patients. *Med Mycol.* 2012;50(3):320-323. doi:10.3109/13693786.2011.593051
194. Hauser P, Rabodonirina M, Nevez G. Hypothetical *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):506-507. doi:10.3201/eid1503.081350
 195. Wissmann G, Alvarez-Martinez MJ, Meshnick SR, Dihel ARS, Prolla JC. Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53(4):305-307. doi:10.1111/j.1550-7408.2006.00104.x
 196. Gülbudak H, Öztürk C, Kuyugöz S, Tezcan Ülger S. Dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutations and mitochondrial large subunit (mtLSU) rRNA genotype variations in *pneumocystis jirovecii* strains. *Mikrobiyol Bul.* 2021;55(1):41-52. doi:10.5578/MB.20140
 197. Ozkoc S, Erguden C, Bayram Delibas S. Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains isolated from Aegean region of Turkey. *Parasitol Res.* 2018;117(10):3103-3108. doi:10.1007/s00436-018-6004-6

FORMLAR**GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR (RIZA) FORMU****Bilgilendirilmiş Onam Formu**

Akciğer problemlerimden dolayı İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Dahili Bilimler Göğüs Hastalıkları birimine başvurumu yaptım. Hastalığımın tanısının konulabilmesi için bronkoscopi işlemi yapılması gerektiği tarafıma aktarıldı. Hastalığımın tanısının daha kolay yollarla konulabilmesi için tahliller yapıldığını biliyor ve gönüllü olarak onaylıyorum.

Tarih

Katılımcının Adı, soyadı

Doğum Tarihi

Adres/Tel

İmza

Gözlem tanığı :

İmza:

Katılımcı ile görüşen Hekim:

Tarih:

İmza:

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKCİĞER HASTALIĞI TANISI ALAN BİREYLERDE PNEUMOCYSTİS JİROVECİİ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 8	% 4	% 11
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Mersin Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 6
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 3
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
4	docobook.com İnternet Kaynağı	% 1
5	TÖZ, Seray, GÜNDÜZ, Cumhur, TETİK, Aslı, PULLUKÇU, Hüsnü, BACAKOĞLU, Feza, TAŞBAKAN, Mehmet Sezai, GÜLEN, Figen, TURGAY, Nevin and TAŞBAKAN, Meltem. "Pneumocystis jirovecii pnömonisi tanısında mikroskopi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması: Klinik bulgular ile yorumlanması", Türk Tüberküloz ve Toraks Derneği, 2017. Yayın	% 1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	