

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PNEUMOCYSTIS JIROVECIİ* İSOLATLARINDAKİ GENOTİPİK
VARYASYONLARIN VE SÜLFONAMİD İLAÇ DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ceren ERGÜDEN GÜRBÜZ
0000-0001-7032-2580

TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
Tıbbi Parazitoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR
EKİM 2022

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2015970164

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PNEUMOCYSTİS JIROVECİİ* İSOLATLARINDAKİ GENOTİPİK
VARYASYONLARIN VE SÜLFONAMİD İLAÇ DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ceren ERGÜDEN GÜRBÜZ
ORCID: 0000-0001-7032-2580

TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI
Tıbbi Parazitoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Soykan ÖZKOÇ
ORCID: 0000-0002-05820580

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2018.KB.SAG.103 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
EKİM 2022

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "*Pneumocystis jirovecii* İzolatlarındaki Genotipik Varyasyonların ve Sülfonamid İlaç Direncinin Araştırılması" başlıklı doktora tezimin içinde elde ettiğim bulguları, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım esarlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ceren ERGÜDEN GÖRBÜZ
19.09.2022

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, tez çalışmalarımı yönlendirip her konuda bana destek veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Soykan ÖZKOÇ'a,

İlgisi ve önerileri ile her zaman yanımda olduğunu hissettiğim, hayatıma yaptığı katkıları ile yetişmemde büyük emeği olan Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Songül BAYRAM DELİBAŞ'a ve öğrenimime katkı sağlayan Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Tez çalışmamda Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarının kapılarını bana açan, bilimsel desteğini benden esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın hocam Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER'e ve Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı personeline,

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün hayatıma kattığı, keyifli sohbetleri ve verdiği motivasyon ile hep yanımda olan Moleküler Tıp Anabilim Dalı'ndan sevgili dostum Dr. Nazlı Ecem DAL BEKAR'a

Yardımsever DEÜ SBE yönetimine ve Öğrenci İşleri personellerine,

Sadece doktora sürem boyunca değil yaşamım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiç yalnız bırakmayan başta canım annem Mine ERGÜDEN, canım babam Nevzat ERGÜDEN'e ve sevgili eşim Çağdaş GÜRBÜZ'e sonsuz teşekkür ederim.

Ceren ERGÜDEN GÜRBÜZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	v
TABLOLAR DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçesi	4
2.2. Sistematikteki Yeri	5
2.3. Morfoloji ve Evrim.....	6
2.4. Bulaş ve Kolonizasyon.....	8
2.4.1. Bulaş	8
2.4.2. Pneumocystis jirovecii Kolonizasyonu.....	8
2.5 Epidemiyoloji	9
2.6. Patogenez.....	11
2.7. Klinik.....	12
2.8. Tanı.....	13
2.9. Tedavi.....	16
2.10. Korunma	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Araştırmanın Tipi	21
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı.....	21
3.3. Araştırmanın Evreni ve Çalışma Grupları.....	22
3.4. Örneklerin Alındığı Olguların Değerlendirilmesi	23
3.5. Çalışma Materyali	23

3.6. Araştırmanın Değişkenleri	23
3.7. Veri Toplama Araçları.....	23
3.7.1. BAL Sıvısı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu ve Real Time PZR Yöntemi	25
3.7.2. mtLSU-rRNA Geni Nested PZR Yöntemi.....	26
3.7.3. DNA Sekans Analizi ve mtLSU-rRNA Genotipleme.....	29
3.7.4. Pneumocystis jirovecii DHPS Genine Yönelik PZR ve Sonrasında RFLP Yöntemi	30
3.8. <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pozitif Hastaların Klinik Sınıflandırması.....	32
3.9. İstatistiksel Değerlendirilmesi	33
3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları	33
3.11. Etik Kurul Onayı	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. mtLSU-rRNA Geni Real Time PZR ve Nested PZR Sonuçları.....	34
4.2. Hastane Örneklerinin Klinik Tanımlaması ve Genotip İlişkisi	40
4.3. DHPS Geni Amplifikasyonu	41
4.4 RFLP Analizi Sonuçları	42
5 . TARTIŞMA	44
5.1. mtLSU-rRNA Gen Sekans Verilerinin Tartışılması	46
5.2. DHPS Gen Profiline Yönelik Verilerin Tartışılması.....	49
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	54
7. KAYNAKLAR	56
8. EKLER.....	68
EK-1 : TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYINLAR	68
EK-2 ETİK KURUL	74

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Pneumocystis</i> türlerinin sistematikteki yeri	5
Tablo 2. Tanıda kullanılan boyaların karşılaştırılması	15
Tablo 3. Akut PCP için tedavi şekilleri	18
Tablo 4. Araştırma Planı	21
Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazlar	23
Tablo 6. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	24
Tablo 7. Hastane kökenli ve otopsi olgularının mtLSUrRNA ve DHPS genotip dağılımlarının karşılaştırılması	36
Tablo 8. mtLSUrRNA genotipleme yapılan olguların demografik ve klinik özellikleri.....	39
Tablo 9. PCP ve kolonize hastalardaki demografik verilerin ve genotip dağılımlarının karşılaştırılması	40
Tablo 10. Kolonize ve PCP hastalardaki parazit yükünün genotiplere göre değerlendirilmesi.....	41
Tablo 11. DHPS gen amplifikasyonunun gruplara göre dağılımı	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Pneumocystis jirovecii</i> 'nin yaşam döngüsü	7
Şekil 2. Çalışılan örnek grubundan bir kısmının RT-PZR için RotorGene 6000Q (Qiagen) cihazında kantitasyon analizleri.....	26
Şekil 3. Enzim kesimi sonucunda 55. ve 57. kodondaki bant görüntüleri.....	43



KISALTMALAR

P. jirovecii: *Pneumocystis jirovecii*

PCP: *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi

mtLSU-rRNA: Ribozomal RNA geniş alt ünitesini kodlayan mitokondriyal gen

mtSSU-rRNA: Ribozomal RNA küçük alt ünitesini kodlayan mitokondriyal gen

ITS: Internal transcribed spacers

DHPS: Dihidropteroat sentaz

DHFR: Dihidrofolat redüktaz

TMP-SMZ: Trimetoprim-sülfametaksazol

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

n-PZR: Nested polimeraz zincir reaksiyonu

rt-PZR: Real time polimeraz zincir reaksiyonu

RFLP: Restriction fragment lenght polymorphism

CDC: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi

CMV: Sitomegalovirüs

ETA: endotrakeal aspirat

BAL: bronkoalveolar lavaj

GMS boyası: Gomori'nin metenamin gümüş boyası

ELİSA: Enzyme Linked İmmünosorbent Assay

BDG: (1,3)- β -D-glukan

TS: timidilat sentaz

MSG: major yüzey glikoproteini

KEX1: keksin benzeri serin proteaz

CYB: sitokrom b

SOD: süperoksit dismutaz

α - β -TUB: α ve β tubulin

TRR1: tioredoksin redüktaz

MLST: Multilokus dizi tiplemesi

SSCP: tek sarmallı konformasyon polimorfizm analizi



ÖZET

İnsana özgü bir tür olan *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), immün sistemi zayıflamış kişilerde *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi (PCP) olarak bilinen, ölümlü sonuçlanabilen ciddi interstisyel pnömonilere neden olabilmektedir. Organizmanın tanısında direkt mikroskopi altın standarttır. Düşük organizma yükünün gözlemlendiği durumlarda PZR gibi moleküler yöntemlere de ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda İzmir ili ve çevresinden elde edilen *P. jirovecii* izolatlarındaki mtLSU-rRNA ve DHPS gen polimorfizmi araştırıldı. Bu amaçla hastane kökenli hastaların bronkoalveolar lavaj (BAL) örnekleri ve otopsi vakalarının akciğer doku örneklerinden elde edilen toplam 157 *P. jirovecii* izolatu incelendi. Nested PZR sonrasında Sanger sekanslama ile mtLSU-rRNA genotiplendirmesi yapılırken, RFLP yöntemiyle DHPS polimorfizmi değerlendirildi. mtLSU-rRNA genotiplendirmesi yapılabilen 138 *P. jirovecii* izolatu arasında genotip 2, %58 ile en sık karşılaşılan genotip olarak bulundu. Genotip 2' den sonra en sık saptanan genotipler sırasıyla genotip 3 (13%), genotip 1 (11,6%) ve genotip 4; (5,1%) olarak bulunurken genotip 5 (0,7%) sadece bir otopsi örneğinde saptandı. Bunun yanı sıra 16 (%11,6) olguda ikili veya üçlü koenfeksiyonlar mevcuttu. Yaş, cinsiyet, immün durum ve PCP/kolonizasyon farklılığı gibi özelliklerin genotip dağılımında etkili olmadığı gözlenirken; solid organ tümörlerindeki genotip 2 baskınlığı ve akciğer hastalığı olanlardaki miks enfeksiyon yüksekliği istatistiksel olarak anlamlıydı. DHPS geni, çalışmaya alınan 157 örneğin 137 (%87,3)'sinde çoğaltılabildi. RFLP sonucunda 135 örnekte herhangi bir mutasyona rastlanmazken (vahşi tip); hastane kökenli iki (%1,5) örnekte vahşi tip ve 57. kodon mutasyonun birlikte olduğu miks enfeksiyon (vahşi tip + mut 57) saptandı.

Bu çalışmada ilaç direnci ile ilişkilendirilmiş olan DHPS gen mutasyonlarının toplumumuzda bulunabildiği gösterilirken; mtLSU-rRNA genotiplerinin dağılımı ile ilgili önemli epidemiyolojik veriler elde edilmiş oldu. Öte yandan çalışmamız real-time PZR'ın *P. jirovecii* laboratuvar tanısında etkili bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Konvansiyonel n-PZR yönteminin çok düşük yoğunluktaki etken varlığında real-time PZR'a göre daha başarısız olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*, mtLSU-rRNA, DHPS, RFLP, Genotiplendirme



ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) is a human-specific species known as *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) that can cause severe interstitial pneumonia, which can be fatal, in immunocompromised individuals. Direct microscopy is the gold standard in the diagnosis of the organism. In cases where low organism load is observed, molecular methods such as PCR are also needed.

In our study, mtLSU-rRNA and DHPS gene polymorphism in *P. jirovecii* isolates were investigated from Turkey's Izmir province and its surroundings. For this purpose, a total of 157 *P. jirovecii* isolates obtained from BAL samples of patients of hospital origin and lung tissue samples of autopsy cases were examined. After nested PCR, mtLSU-rRNA genotyping was performed by Sanger sequencing and DHPS polymorphism was evaluated by RFLP method. Among the 138 *P. jirovecii* isolates that can be genotyped, mtLSU-rRNA genotype was found as the most common genotype with 2, 58 %. The most common genotypes found after genotype 2 were genotype 3 (13 %), genotype 1 (11,6 %) and genotype 4 (5,1 %), while genotype 5 (0,7 %) was detected in only one autopsy sample. In addition, 16 (11,6 %) cases had double or triple coinfections. It was observed that features such as age, gender, immune status and PCP/colonization difference did not affect genotype distribution. But, genotype 2 dominance in solid organ tumors and mixed infection height in patients with lung disease were statistically significant. DHPS gene was reproduced in 137 (87,3 %) of 157 samples included in the study. As a result of fragment length polymorphism (RFLP), no mutation was found in 135 samples (wild type). In two hospital-based samples (1,5 %), mixed infection (wild type + mut 57) with wild type and 57th codon mutations were detected.

In this study, it was shown time that DHPS gene mutations associated with drug resistance can be found in our society. In addition, important epidemiological data on the distribution of mtLSU-rRNA genotypes were obtained. On the other hand, our study demonstrated that real-time PCR is the effective method in the diagnosis of *P. jirovecii* laboratory. Conventional n-PCR method was found to be less successful than real-time PCR in the presence of very low density organism.

Key words: *Pneumocystis jirovecii*, mtLSU-rRNA, DHPS, RFLP, Genotyping



1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Pneumocystis sp., immün sistemi baskılanmış memelilerde ölümcül alt solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olabilen atipik bir mantardır (1,2). Son yıllardaki genomik kanıtlar ve filogenetik analizler *Pneumocystis sp*'nin mantarların Ascomycota şubesine dahil olduğunu gösterse de hücre duvar yapısında ergosterol yerine kolesterol bulunması (mantar ilaçlarına direnç) ve kitin içermeyen daha kırılgan dış yapı mantarlarda bulunmayan özelliklerdir (2). Bunun yanı sıra diğer mantarlardan farklı olarak daha kompakt bir genoma sahip olan *Pneumocystis sp.*, birçok metabolik yolağı kaybetmiş olduğundan dolayı paraziter bir yaşam sergilemekte ve konak dışında canlılığını devam ettirememektedir (1,2).

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) insana özelleşmiş bir *Pneumocystis* türü olup, bağışıklık sistemi bozulmuş kişilerde *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi (PCP) olarak adlandırılan fırsatçı akciğer enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. *P. jirovecii*'nin neden olduğu PCP, immün baskılanmış hastalarda ölümle sonuçlanabilen fırsatçı enfeksiyonlar arasındadır (3,4). Son zamanlarda etkili immünosupresif terapilerin kullanıma girmesiyle HIV negatif immün baskılanmış hastalardaki PCP enfeksiyonlarında artış gözlenmektedir (5,6). Ateş, nonproduktif öksürük ve dispne gibi nonspesifik semptomlar ile başlayan PCP, AIDS dışı immünsupresyon hastalarında daha agresif seyretmekte ve bu hastalarda %35-55 oranlarında mortalite gözlenebilmektedir (6–8). Enfeksiyonun tanısındaki zorluklar ve riskli gruplara yeterli profilaksi verilememesi gibi nedenlerle özellikle gelişmekte olan ülkelerde PCP'ye bağlı ölümler günümüzde hala önemli bir halk sağlığı problemidir.

P. jirovecii kültürde üretilemediğinden çevresel dağılım, virulans, ilaç direnci ve olası bulaş yolları gibi epidemiyolojik ve biyolojik özellikleri belirlemede en çok uygulanan yöntem çevresel ve klinik isolatların genotip analizlerini yapmaktır. Bu amaçla daha çok timidilat sentaz, ribozomal RNA geniş alt ünitesini kodlayan

mitokondriyal (mtLSU-rRNA) geni, ribozomal RNA küçük alt ünitesini kodlayan mitokondriyal (mtSSU-rRNA) geni, internal transcribed spacers (ITS) ve dihidropteroat sentaz (DHPS), dihidrofolat redüktaz (DHFR) gibi gen bölgeleri kullanılmaktadır. Özellikle mtLSU-rRNA geni, *P. jirovecii* epidemiyolojisini araştırılmasında en sık tercih edilen genlerden biridir. Temel metabolik fonksiyonlarla ilişkili bulunan bu gen bölgesi, *P. jirovecii*'nin aynı haplotipte birçok mitokondriye sahip olması nedeniyle tanı ve kantitasyonda tek kopyalı genlere göre daha başarılı bulunmuştur.

Sülfonamid grubu ilaçlar (sülfametaksazol, sulfodoksin, dapson) ile trimetoprim, primetamin gibi anti-metabolitlerin kombinasyon formları, PCP tedavisi ve profilaksisinde en sık kullanılan ilaçlardır. Bu kombinasyonların en etkili olarak gösterilen kotrimaksazol (trimetoprim-sülfametaksazol kombinasyonu; TMP-SMZ), 1990'lardan itibaren anti-*Pneumocystis* tedavisinde ve immün baskılanmış hastaların profilaksisinde başarıyla kullanılmaktadır. Kotrimaksazolün etkisini oluşturan esas mekanizma, folik asit biyosentezinde kritik rol oynayan DHPS enziminin sülfametaksazol ile inhibe edilmesidir. Son yıllardaki çalışmalar, bu enzimi kodlayan genin 165 (A→G) ve 171 (C→T) nükleotid pozisyonlarındaki nokta mutasyonların sülfonamid direncine neden olabileceğini göstermektedir. Bu mutasyonlar, sırasıyla 55. ve 57. kodonlarda aminoasit değişimleri yaratarak ilacın enzime bağlanma bölgelerinde yapısal değişiklikler oluşturmaktadır. Sülfonamid kullanımındaki değişkenliklere bağlı olarak dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde % 0-81 arasında mutasyon oranları rapor edilmiştir. DHPS gen mutasyonlarının araştırılması yalnızca ilaç direnci ile ilgili soruların yanıtlanmasında değil; etkenin toplumdaki dağılımını belirlemede epidemiyolojik bir marker olarak kullanılabilir.

Ülkemizde yapılan *P. jirovecii* ile ilgili moleküler çalışmalar son derece sınırlı sayıda olup genellikle tanı yöntemlerinin değerlendirildiği veya bölgesel prevalansların araştırıldığı çalışmalardır. Bununla birlikte ülkemizde şimdiye kadar *P. jirovecii* izolatlarının genotip analizlerinin yapıldığı birkaç küçük popülasyon çalışması dışında geniş çaplı bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise, hem klinik örneklerden hem de otopsi vakalarından elde edilmiş geniş bir örneklem

grubundan elde edilen *P. jirovecii* izolatlarında mtLSU-rRNA ve DHPS geninin polimorfizmi araştırılması planlanmıştır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızda, klinik örneklerden ve otopsi vakalarından elde edilmiş *P. jirovecii* izolatlarında farklı gen bölgeleri araştırılarak, *P. jirovecii* genotiplerinin toplumumuzdaki dağılımı, insanlar arası geçiş özellikleri, tedaviye dirençli suşların var olup olmadığının belirlenmesi ve etken virulansı konularında önemli veriler elde edilmesi amaçlandı.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Çalışmada kullanılan analizlerde;

- ✓ mtLSU-rRNA geni nested-PZR (n-PZR) ile çoğaltıldıktan sonra sekans analizi ile genotip profillerinin ortaya konması,
- ✓ DHPS geninin PZR ile çoğaltılması sonrasında uygulanacak restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemi ile sülfamizid dirençli mutant suşların araştırılması,
- ✓ Genotip profilleri belirlenen izolatların; örneğin gönderildiği birim, hastanın immünsupresyon durumu, yaş ve cinsiyet gibi diğer demografik verilerle ilişkisinin olup olmadığının araştırılması,
- ✓ DHPS gen mutasyonlarının, TMP-SMZ profilaksisi/tedavisi alıp almama durumu ile ilişkisinin araştırılması mevcut mutasyonların oluşumunda ilaç selektif baskılamasının olup olmadığının ortaya konması hedeflendi.

Ayrıca uygulanacak real time PZR (rt-PZR) yöntemini diğer yöntemlere karşı kullanılabilirliği ve hastalık tespitindeki etkinliğinin de test edilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçesi

Pneumocystis ilk kez 1909 yılında *Trypanosoma cruzi* ile enfekte kobayların akciğerlerinde *Trypanosoma*'ların şizogonal evresi olarak Carlos Chagas tarafından tanımlanmıştır. Sau Paulo Pastör Enstitüsü şefi olan Doktor Antonio Carini ise 1910 yılında *Trypanosoma lewisi* ile enfekte sıçanların akciğerinde yine benzer kistlere rastlamış ve histolojik örnekleri, tanımlama için Paris Pastör Enstitüsü'nde çalışan Delanoe çiftine göndermiştir. Pierre ve Me Delone, *Trypanosoma* ile ilgili olmayan ve yeni keşfedilen bu organizmaya Dr. Carini'nin anısına 1912 yılında *Pneumocystis carinii* adını vermiştir (9,10). *Pneumocystis spp*'nin fare, maymun ve tavşan gibi memelileri enfekte edebildiği de yine Brezilya, İngiltere ve İsviçre'de 1913 ve 1917 yıllarında yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (11).

İnsanda *Pneumocystis*'e bağlı plazma hücreli interstisyel pnömoni ilk kez 1938'de Alman araştırmacılar Ammich ve Benecke tarafından malnutrisyonlu yeni doğanlarda gösterilmesine rağmen bu enfeksiyonun *Pneumocystis* nedeniyle olduğu 1942 yılında Hollanda'da Van der Meer ve Brug tarafından tanımlanmıştır (12). Savaş nedeniyle yayınlanamayan bu bilgi savaş sonrasında da vakaların artması nedeniyle araştırmaları yoğunlaştıran Çek parazitolog Jirovec, Vanek ve Lukes tarafından yayımlanarak *Pneumocystis*'in ile plazma hücreli interstisyel pnömoniye neden olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur (13). Daha sonrasında 1960'larda konjenital immün yetmezlikli çocuklar ve malignite tedavisi gören yetişkinlerde nadir sporadik vakalar olarak bildirilmiş, 1980'li yıllarda AIDS hastalığının ortaya çıkıp yayılmasıyla *Pneumocystis* vakalarında artış dikkat çekmiştir. Mikroorganizmayı 1951 yılında yeni doğanlarda interstisyel plazma hücreli pnömoni etkeni olarak ilk kez tanımlayan Çek parazitolog Otto Jirovec'in onuruna, Frenkel tarafından 1999 yılında *Pneumocystis jirovecii* ismi verilmiştir (13). İnsanlardaki *Pneumocystis* enfeksiyonunun bir zoonoz olmadığı anlaşılmış böylece *Pneumocystis carinii* ismi sadece sıçanlarda enfeksiyon etkeni olan türün adı olarak kullanılmaya başlanmıştır (10).

2.2. Sistematikteki Yeri

P. jirovecii tek hücreli, ekstrasellüler yerleşim gösteren, insana spesifik, atipik bir ökaryotik mikroorganizmadır. İlk keşfedildiği 1909 yılından sonra uzunca bir süre morfolojik yapının mantarlara çok benzememesi, antifungal ilaçlara dirençliyen antiprotozoal ilaçlara duyarlı olması ve konak hücredeki patojenitenin protozoonlara benzemesi gibi nedenlerle protozoon olarak kabul edilmiştir. Ancak 1980’li yılların sonlarında yoğunlaşan biyolojik çalışmalarla ve en nihayetinde Edmann ve Stringer’in 1988’de 18S rRNA geni üzerine yaptıkları moleküler çalışmalarla, her ne kadar kist duvarında ergosterol bulunmuyor olsa da etkenin mantarlara daha yakın olduğu anlaşılmıştır (10). Bunun yanı sıra diğer mantarlardan farklı olarak daha kompakt bir genoma sahip olan *P. jirovecii* birçok metabolik yolağı kaybetmiş olduğundan dolayı paraziter bir yaşam sergilemekte ve konak dışında canlılığını devam ettirememektedir (2,14).

Günümüzde *P. jirovecii*’nin filogenetik olarak, “Fungi” aleminde, “Dikarya” alt aleminde, “Ascomycota” bölümünde, “Taphrinomycotina” alt bölümünde, “Pneumocystidomycetes” sınıfında, “Pneumocystidales” takımında ve “Pneumocystiaceae” ailesinde sınıflandırılmaktadır (15,16) (Tablo1).

Tablo 1. *Pneumocystis* türlerinin sistematikteki yeri

Süper alem (Superkingdom)	Eukaryota
Alem (Kingdom)	Fungi
Alt alem (Subkingdom)	Dikarya
Bölüm (Phylum)	Ascomycota
Alt Bölüm (Subphylum)	Taphrinomycotina
Sınıf (Class)	Pneumocystidomycetes
Takım (Order)	Pneumocystidales
Aile (Family)	Pneumocystidaceae
Cins (Genus)	<i>Pneumocystis</i>
Tür (Species)	<i>Pneumocystis canis</i> → köpeklerde <i>Pneumocystis carinii</i> → sıçanlarda <i>Pneumocystis gerbil</i> → gerbillerde <i>Pneumocystis jirovecii</i> → insanlarda <i>Pneumocystis murina</i> → farelerde <i>Pneumocystis oryctolagi</i> → tavşanlarda <i>Pneumocystis wakefieldiae</i> → sıçanlarda

2.3. Morfoloji ve Evrim

İn vitro kültür yapılamadığından *Pneumocystis* türlerinin morfolojik şekilleri ve hayat siklusu ile ilgili karakteristik özellikler daha çok *P. murina* modelleri üzerinde gerçekleştirilen elektron mikroskop çalışmalarıyla belirlenmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucu yaşam döngüsünde trofozoit (trofik evre), prekist (sporosit) ve kist (spor) formlarının bulunduğu saptanmıştır (2,15,17).

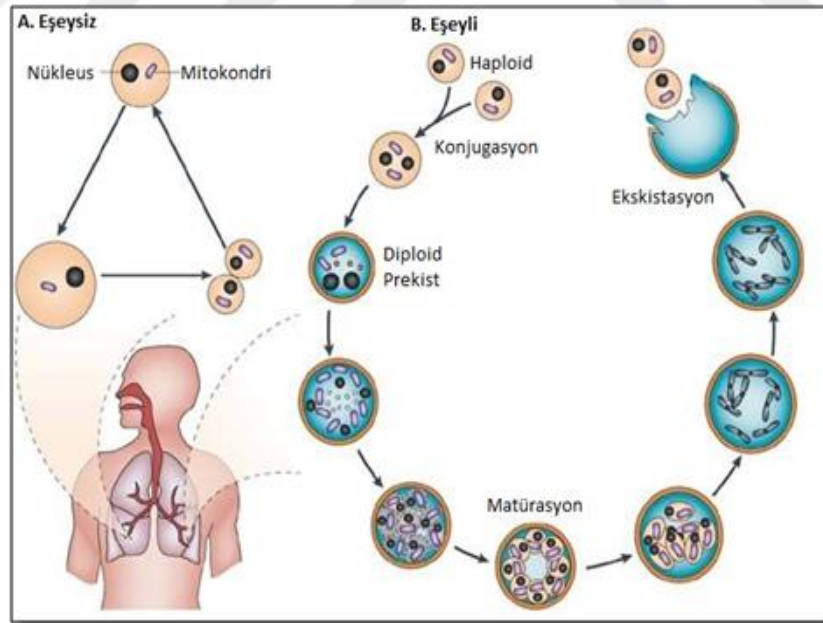
Trofozoit formunun boyutları 2-5 µm çapında olup akciğerde en sık (% 90-95 oranında) rastlanan formdur. Genelde kümeli ameboid şekilde bulunurlar. Hücre dışı çift katlı duvarla çevrili olup iç kısımda daha ince plazma membranı vardır. Trofozoit yüzeyindeki tübüler çıkıntılarının (filopodya), alveolar keselerde tip 1 epitelyal hücrelere tutunmaya yardımcı olduğu düşünülmektedir. Trofozoit merkezinde çok sayıda porları bulunan tipik nükleer zarf ile çevrelenmiş ve dağınık kromatinli, çift çeperli bir adet nükleus bulunur. Ayrıca sitoplazmada veziküllü golgi, mitokondri, çok sayıda serbest ribozomlar, vakuoler boşluklar ve mikrotübüller mevcuttur (2,12).

Prekistler; 5-8 µm büyüklüğündeki trofozoit ve kist formları arasındaki geçiş formlarıdır. Erken, ara ve geç olmak üzere üç evrede görülebilir. Erken prekistler oval şekilde, tek nükleuslu ve hücre duvarı iki katmanlıdır. Ara prekistler daha yuvarlak, 2-4 nükleuslu ve hücre duvarı üç katmanlıdır. Geç prekistler ise hücre nükleus sayısı dördün üzerinde olup yuvarlak şekli ile kiste benzemektedir (2,18).

Kist formu 5-10 µm boyutlarında, yuvarlak veya hilal şekillidir. Kist duvarı büyük ölçüde kompleks bir polisakkarit olan β-glukanlardan oluşur, ayrıca manoprotein, kitin ve diğer proteinler de mevcuttur. Kalınlığı 50-160 nm olup dış, orta ve en içte plazmalemma olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır. Ana işlevi, organizmaya sağlamlık ve desteklik sağlamak ve organizmayı konak dışındaki sert çevre koşullarından korumaktır. Duvar içeriye çıkıntılar yaparak parantez benzeri şekiller oluşturur; bu çıkıntılar kistler için tipiktir. Kist duvarının bozunması, organizmanın yaşam döngüsünü tamamlaması için gereklidir. Bu dinamik süreci kolaylaştırmak için, β-glukan sentetazlar kist duvarını oluşturan (1→3) β-D-glukan (BDG) homopolimerlerinin oluşumunu kolaylaştırır, β-glukanazlar ve diğer

proteinler, aktif bozunma ve duvarın yeniden yapılandırılma sürecini yürütür (19). Kalın kist duvarı içinde yer alan İntrakistik cisimcikler 1-2 µm büyüklüğünde olup çift katlı zara sahiptirler. Bir nükleus, bir mitokondri, endoplazmik retikulum ve birçok serbest ribozom bulunduran bu yapılar kistin yırtılması ile açığa çıkarak trofozoitlere dönüşmektedir (2,12).

P. jirovecii tüm yaşam döngüsünü akciğer alveollerinde hücre dışında nadiren de ekstrapulmoner organlarda geçirmektedir. *Pneumocystis*'in eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki farklı üreme şekli bulunmaktadır. Trofozoitler yaşam döngüsünün eşeysiz kısmında ikiye bölünerek çoğalırlar. Trofozoitlerde saptanan feromon sinyalizasyonu ve sinaptonemal komplekslerin varlığı mayoz bölünmeyi destekler ve *Pneumocystis*'in eşeyli üremesini sağlar. Eşeyli döngüde haploid yapıdaki trofozoitlerin konjugasyonu ile sporozoitler oluşur. Sporozoitler mayoz ve sonrasında mitoz ile bölünerek sekiz adet intrakistik cisimciği oluştururlar. Daha sonrasında trofozoitler kist duvarının parçalanmasıyla serbest hale gelir (Şekil 1) (12).



Şekil 1. *Pneumocystis jirovecii*'nin yaşam döngüsü (20)

2.4. Bulaş ve Kolonizasyon

2.4.1. Bulaş

Pneumocystis spp. ve konakları arasındaki bulaş mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hayvan modellerinde ve insanlarda yapılan çalışmalar, *Pneumocystis*'in en olası bulaş yolunun hava yolu olduğunu göstermektedir (11). Özellikle *Pneumocystis carini* ve rat modelleri ile yapılan çalışmalarda bulaş için bütünlüğü bozulmamış kist formun alınması gerektiği; gıda ve su ile bulaşın mümkün olamadığı anlaşılmıştır. İnsanlar ile ilgili çalışmalar daha çok PCP olan kişilerin bulunduğu hastanelerde yapılan moleküler çalışmalardan ibarettir. Bu çalışmalarda hasta yataklarından farklı mesafelerden alınan hava örneklerinde *P. jirovecii* DNA'sının mesafe arttıkça azaldığı gösterilmiştir (11). Ancak bu bulgular etkenin duyarlı konağa hava yoluyla bulaşını dışlamamakla birlikte; saptanan genetik materyalinin mutlaka canlı etkene ait olup olmadığı ve bulaş için potansiyel taşıyıp taşımadığı sorusuna tam olarak kanıt oluşturmamaktadır (11). Bununla birlikte dünyanın farklı coğrafik lokalizasyonlardaki böbrek, dalak ve karaciğer transplantasyon ünitelerinde meydana gelmiş olan salgın şeklindeki vaka artışları *P. jirovecii* bulaşının anlaşılmasında önemlidir. Bu salgınlarda etkilenen kişilerin örneklerinde aynı genotipte izolatların saptanmış olması insandan insana bulaşın en önemli kanıtı olarak gösterilmektedir. Diğer taraftan, doğrudan temas veya damlacık yayılımının olup olmadığı; konağın bağışıklık durumundan bağımsız olarak, PCP veya kolonizasyon oluşumu için kaç tane enfeksiyöz partikül gerekli olacağı gibi konular halen belirsizliğini korumaktadır (11).

2.4.2. *Pneumocystis jirovecii* Kolonizasyonu

Pnömoni semptomları bulunmayan kişilerin üst veya alt solunum yolu örneklerinde *P. jirovecii* veya DNA'sının varlığı kolonizasyon olarak tanımlanmaktadır (13,21). Dünyanın farklı bölgelerindeki sağlıklı popülasyonlarda, kullanılan yöntem ve klinik örneklere bağlı olarak değişmekle birlikte % 0 - 65 arasında *P. jirovecii* kolonizasyon oranları bildirilmiştir (11,22–26). Diğer taraftan immün baskılanmış hastalardaki kolonizasyonun, immün sağlam kişilere oranla daha

fazla oranda olduğu bilinmektedir (3,4,27). En önemli risk faktörleri arasında kortikostreoid kullanımı gösterilse de yeni nesil immünomodölatör ilaçların kullanıma girmesiyle özellikle organ transplant alıcılarında, hematolojik malignitelerde, inflamatuvar bağ dokusu hastalıklarında yüksek *P. jirovecii* pozitiflikleri bildirilmiştir (5–7,28,29). Organ transplant alıcılarına bakıldığında ise bu riskin kalp-akciğer transplant hastalarında daha yüksek olduğu görölmektedir. Ancak son yıllarda mikofenolat mofetil gibi yeni anti-rejeksiyon ajanlarının kullanıma girmesiyle böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda salgınlar şeklinde PCP enfeksiyonları rapor edilmiştir (30–32).

Kolonizasyonla ilgili olarak iki hipotez öne çıkmaktadır. Birincisi *P. jirovecii*'nin yaşamın erken evresinde, muhtemelen çocuklukta kazanılan ve daha sonra yetişkinliğe devam eden asemptomatik varlığını öne çıkarmaktadır. Bu hipoteze göre doğum esnasında anneden geçişin önemli olabileceği vurgulanmıştır. Sağlıklı çocuklarda anti-*Pneumocystis* antikörlerinin serolojik varlığı veya pozitif PZR, bu organizmaya erken maruziyeti destekler niteliktedir. Diğer hipotez ise *P. jirovecii* kolonizasyonunun de novo oluş şeklidir (33,34). Aynı hastanın farklı PCP episodlarında farklı genotiplerle enfekte olabildiğinin gösterilmesi bu görüşün en önemli kanıtı olarak kabul edilmektedir (11,35,36).

P. jirovecii kolonizasyonunun klinik ve epidemiyolojik önemi tam olarak anlaşılamamış olsa da yapılan çalışmalar, *P. jirovecii* kolonizasyonu olan kişilerin, bulaş açısından önemli bir kaynak oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca bu kişilerin immün baskılanma oluşması durumunda mevcut kolonizasyondan PCP gelişim riski taşıdıkları moleküler çalışmalarla kanıtlanmıştır (13,14,37,38). Diğer taraftan kolonizasyon sonucu oluşan kronik immün yanıt, doku hasarına neden olarak çeşitli akciğer hastalıklarının gelişimini tetikleyebilmekte veya mevcut hastalıkların progresyonlarını hızlandırabilmektedir (6,13).

2.5 Epidemiyoloji

HIV/AIDS epidemisinin ortaya çıktığı 1980'li yıllara kadar sporadik olgular şeklinde bildirilen enfeksiyonun insidansı bu dönemde hızla artış göstermiş ve

AIDS'li bireylerin % 75'inde görülen PCP enfeksiyonlarına ve ayrıca % 40'a varan mortalitelere neden olmuştur. PCP profilaksisinin 1989'da uygulanmaya başlanması ve yine 1996'da HIV'e karşı etkili antiretroviral kombinasyon tedavisinin kullanıma girmesi ile birlikte PCP insidansında önemli düşüşler gözlenmiştir (39). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), PCP insidansının 1992'den 1995'e kadar olan dönemde yıllık % 3,4 azaldığını ve daha sonra antiretroviral tedavide etkili kombinasyonların uygulanmaya başladığı dönem olan 1996'dan 1998'e kadar yıllık % 21,5 azaldığını bildirmiştir. ABD'de son on yılda HIV ile enfekte hastalarda PCP insidansı % 0,7 olarak bildirilmiştir (40). Diğer taraftan özellikle kaynakları kısıtlı olan gelişmemiş ülkelerde HIV enfeksiyonun tanısında yaşanan zorluklar nedeniyle PCP halen fırsatçı enfeksiyon olarak gözlenmeye devam etmektedir (18,39).

Son zamanlarda hematolojik ve solid organ tümörlerinde, organ transplantasyonlarında ve otoimmün hastalıklarda etkili immünosupresif terapilerin kullanıma girmesiyle HIV negatif immün baskılanmış hastalardaki PCP enfeksiyonlarında artış gözlenmektedir (5,6). Ancak HIV negatif immün baskılanmış hastalarda *P. jirovecii* yükünün çoğu zaman düşük bulunması, konvansiyonel yöntemlerin tanıdaki duyarlılığını azaltmakta bu nedenle hastaların tanı ve yönetimi zorlaşmaktadır. Ateş, nonproduktif öksürük ve dispne gibi nonspesifik semptomlar ile başlayan PCP, AIDS dışı immünsupresyon hastalarında daha agresiv seyretmekte ve bu hastalarda % 35-55 oranlarında mortalite gözlenebilmektedir (6–8,39).

Hastalık için HIV dışında birçok risk faktörü mevcuttur. Bunların başında kanserli hastalar (özellikle hematolojik maligniteler), hematopoietik hücre veya solid organ nakli yapılan transplant hastaları, belirli inflamatuvar veya romatolojik durumlar için immünsupresif tedavi alan hastalar gelmektedir (41). Özellikle lösemili (akut lenfatik lösemi gibi) ve lenfoproliferatif bozuklukları (kronik lenfatik lösemi ve Hodgkin olmayan lenfomalar gibi) olan hastalarda önemli ölçüde PCP gelişme riski vardır. Kortikosteroidler, siklofosfamid, metotreksat, vinkristin, sitarabin, fludarabin, temozolomid, rituksimab, alemtuzumab, ibrutinib ve idelalisib dahil olmak üzere belirli kemoterapötik ajanlar PCP'ye daha yatkınlığı arttırmaktadır (39). PCP vakalarının % 20'ye yakını inflamatuvar hastalıkları olan kişilerde görülmektedir.

İnsidans özellikle poliarteritis nodoza, polianjritli granülomatozis, dermatomiyozit/polimiyozit ve romatoid artritli hastalarda interstisyel akciğer hastalıkları vakalarında yüksektir.

2.6. Patogenez

Solunumla alınan *Pneumocystis* akciğer tropizmi gösteren bir mikroorganizmadır. Ancak nadiren de olsa diğer organlara da yayılabildiği bilinmektedir. Özellikle ilerlemiş HIV enfeksiyonu olan hastalarda karaciğer ve dalağa ek olarak göz, kulak, lenf düğümleri, timus, deri, gastrointestinal sistem, plevra, böbrek, kemik iliği, pankreas ve adrenal bez tutulumları bildirilmiştir (42,43).

Enfektif form inhale edildikten sonra üst solunum yolundaki savunma mekanizmalarından kaçarak alveollere ulaşır. Trofik form, alveolar epitel hücrelerine ve hücre dışı matriks proteinlerine sıkıca bağlanır. Çeşitli çalışmalar, mannoz bağlayan reseptörlerin ve hücre dışı matriks proteinlerinin *Pneumocystis*'in akciğer epitel hücrelerine bağlanmasını kolaylaştırdığını göstermiştir. *Pneumocystis* tip I alveolar hücrelere tutunduktan sonra, hücre yüzey glikokaliksinde azalma, alveolar kapiller damarların permeabilitesinde artma meydana gelir. Tip I alveolar hücrelerdeki bu değişim ile tip II epitelyal hücrelerde de hipertrofi ile hiperplazi oluşur. Bunun sonucu olarak, tipik köpüksü eozinofilik eksüdası ve bal peteği görünümü gözlenebilir. Ayrıca PCP'nin şiddeti arttıkça interstisyel fibrosis, hiyalin zar oluşumu da izlenmekte, granülomlar veya mikrokalsifikasyonlar oluşabilmektedir (44).

Pneumocystis hücre duvarı β -glukanların, konakçıda çok sayıda enflamatuar yolu indüklemeye kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, hücre duvarı-glukanlarının alveolar makrofajlar ve solunum epitel hücreleri tarafından ortaya çıkan abartılı enflamatuar tepkilere katkıda bulunduğu, şiddetli *Pneumocystis* pnömonisi olan hastalarda solunum yetmezliğini artırdığı öne sürülmüş, *Pneumocystis* β -glukanların dendritik hücreleri aktive ettiği ve T hücre yanıtlarını modüle ettiği de gösterilmiştir (19). Ayrıca, β -glukanların, T hücrelerini Th17

farklılaşmasına doğru polarize edecek şekilde dendritik hücreleri hazırladığı ve bunun da konakçı antifungal immün direncini daha da artırdığı gösterilmiştir (45).

Patojenin diğer insanlara bulaşmasının yanı sıra kolonize bireyler de bağışıklığın azalması durumunda PCP gelişme riski altındadır. Ayrıca, anti-*Pneumocystis* profilaksisi alan bireylerde uzun süren kolonizasyon, ilaca direncine neden olabilmektedir. Bununla birlikte akciğerlerde bulunan az miktarda patojenin bile konakçı enflamatuvar tepkisini tetikleyerek akciğer hasarına yol açtığı ve bu durumun kronik obstrüktif akciğer hastalığı veya akciğer kanseri gibi hastalıkların gelişmesinde rol oynayabileceği bildirilmiştir. (46).

2.7. Klinik

PCP'nde kuluçka süresinin yaklaşık 3-12 hafta olduğu düşünülmektedir (47). Klinik belirgin hipoksemi, dispne, non-produktif öksürük ve sıklıkla ateş ile kendini göstermektedir. Bazen balgam ve nadirde olsa kanlı balgam görülebilir, hemoptizi ve göğüs ağrısı oluşabilir (48). Klinik belirtiler, immünosupresyonun şiddeti, pulmoner ödem oluşumu, akciğer allograft fonksiyon bozukluğu ve eşlik eden enfeksiyonları içeren süreçlerle değişiklik gösterebilir. PCP'nin tipik belirti ve semptomlar Tablo 1'de özetlenmiştir (43).

HIV hastalarında, yüksek organizma yüküne rağmen klinik tablo genellikle belirsizdir ve ölüm oranı % 10-20'dir. PCP semptomlarının klasik üçlüsü; subakut başlangıçlı efor dispnesi, non-produktif öksürük ve ateşin haftalarca süren subakut seyri, sıklıkla bakteriyel pnömoniden ayırt edicidir. Ayrıca arteriyel kan gazı analizi ile doğrulanması gereken solunum yetmezliği de görülebilmektedir. LDH sıklıkla yüksektir bu yüzden hastalığın seyri için öngörücü bir parametre olarak kullanılmasa da yüksek LDH seviyesi olumsuz bir işarettir. Buna karşılık, C-reaktif protein, eşzamanlı başka bir enfeksiyon olmaması koşuluyla genellikle normaldir (39). Kilo kaybı gibi yapısal belirtiler öne çıkabilir. Sonraki enfeksiyonlar daha hızlı gelişir (49).

HIV olmayan hastalar arasındaki ölüm oranı % 30-60 arasındadır ve kısmen tanıdaki gecikmelere bağlı olarak kanser hastaları arasında daha yüksek ölüm riski vardır (50). HIV olmayan hastalarda PCP daha agresif progresyon ile ilerlemektedir. Öksürük, dispne ve LDH yüksekliği daha az sıklıkta görülürken, derin hipoksi ve solunum yetmezliği daha sık gözlenir (51). İmmüsupresif kişilerde altta yatan hastalık, enfeksiyonun kliniğini etkiler ve tedavi edilmezse ölümle sonuçlanabilir (49). Klinik enfeksiyonun şiddeti, önceden var olan akciğer hastalığıyla (Sitoksan akciğer, pulmoner fibroz, COPD vb.) veya diğer enfeksiyonların (Sitomegalovirüs-CMV, *Legionella*, mikobakteriler vb.) varlığıyla artabilmektedir. *Pneumocystis* ile enfekte hastaların yarısından fazlasında CMV ve diğer patojenlerle birlikte enfeksiyon tespit edilmiştir (43).

PCP deki tipik radyolojik bulgular, homojenliği hastalık ilerledikçe artarak diffüz hale gelen hilus çevresinde iki taraflı interstisiyel infiltratlardır (52,53). HIV ile enfekte olmayan bağışıklığı baskılanmış hastalarda, semptomların akut başlangıcı ve daha hızlı ilerlemesi nedeniyle erken grafilerde bulgular normal olabilmektedir. Bununla birlikte daha az görülen belirtiler arasında, bazen pnömatosel oluşumu ile seyreden konsolidasyonlar veya ince duvarlı kistik lezyonlar yer almaktadır. Kistik lezyonlar sıklıkla küçük, iki taraflı ve çokludur, ancak spontan pnömotoraks geliştirme riski olan daha büyük pulmoner kistik lezyonlar da bildirilmiştir. Akciğer dışı enfeksiyonu olan hastalarda ise solunum belirtileri minimal olabilmekte veya hiç gözlenmeyebilmektedir (39).

2.8. Tanı

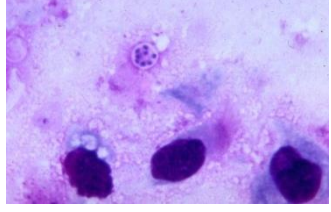
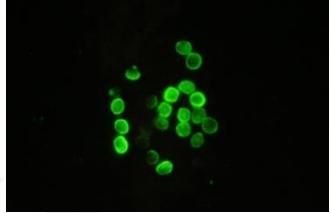
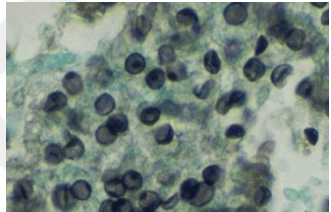
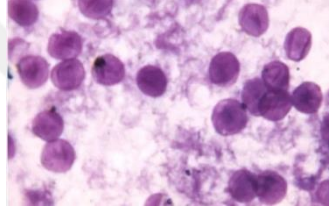
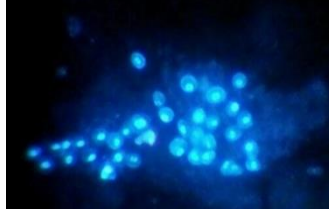
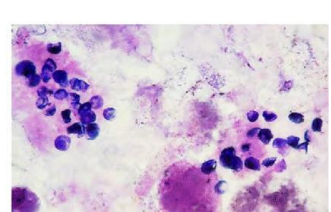
P. jirovecii kültürde üretilmediği için etkenin solunum sistemi örneklerinde mikroskopik olarak saptanması tanıda altın standarttır (3). Tanıda materyal olarak balgam, indüklenmiş balgam, nasofaringeal aspirat sıvısı, bronş lavaj sıvısı veya akciğer doku biyopsisi gibi örnekleri kullanılabilirken; bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı örnekleri en değerli örnek olarak gösterilmektedir (54). BAL örneklerinden sitosantrifüj ile elde edilen preparatlarda etkenin histolojik boyalar ve floresan antikor yöntemleriyle gösterilmesi en klasik mikroskopik tanı yöntemleridir (55).

Bununla birlikte HIV dışı immün baskılanmış hastalarda gözlenen PCP’de *P. jirovecii* yükünün çoğu zaman düşük olması mikroskopik tanının duyarlılığını azaltmaktadır (6,13,55). Bu sorun son yıllarda PZR bazlı metotların geliştirilmesiyle önemli ölçüde aşılmış durumdadır (4,27).

P. jirovecii kist duvarı Gomori’nin metenamin gümüş, toluidin blue, calcofluor white ile boyanabilirken; trofozoit formu ve kist içerisindeki intrakistik cisimciklerin gösterilmesinde giemsa ve gram weigert gibi boyalar kullanılmaktadır (44). Gomori’nin metenamin gümüş (GMS) boyası ile kist duvarı koyu gri boyanır ve organizmalar ezilmiş pinpon topları veya hilal şeklinde katlanmış küreler olarak görünür (56). Giemsa boyası ile kist sitoplazması eflatunumsu pembe boyanırken kist çeperi boyanmaz. Trofozoidler ve intrakistik cisimler ise koyu mor renkte görünür. İmmünofluoresan yönteminde floresan mikroskobu ile boyalı örnekler incelendiğinde mikroorganizmalar parlak elma yeşili renkli tek tek veya kümeler oluşturmuş şekilde görülür (57). Tanıda kullanılan boyalar ve boyama karakteristikleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Sağlıklı insanların çoğunda *P. jirovecii*’ye karşı antikor bulunduğu için, serumda antikorların saptanması tanı için yeterli değildir. Bu yüzden serolojik olarak dolaşımdaki antijenleri doğrudan saptamak daha anlamlıdır (58). Bu alanda en çok kullanılan serolojik marker BDG molekülüdür. Türe spesifite göstermeyen ve tüm maya ve küf mantarlarının hücre duvarında bulunan bu karbonhidrat molekülü, BAL sıvısında ve kanda tespit edilebilmektedir (13,59). Serumdaki BDG seviyesi birçok fungal enfeksiyonun erken evrelerinde yükselir. PCP tanısında BDG testinin duyarlılığı % 90-100, özgüllüğü % 88-96 olarak bildirilmiştir (60,61).

Tablo 2. Tanıda kullanılan boyaların karşılaştırılması

Boya	Boyama süresi	Kist Duvarı	Trofozoitler	Mikroskop görüntüsü
Giemsa	30-60 dk	Boyanmaz, Berrak halka görünümü	Çekirdek kırmızı-mor, sitoplazma açık/koyu mavi	
Direkt / İndirekt florasan	15-30 dk	Boyanır, Elma yeşili	Boyanır, Elma yeşili	
Metanamin gümüş	30-60 dk	Boyanır, Kahverengi-siyah	Boyanmaz	
Toluidine blue	1-6 saat	Boyanır, Eflatun-mor	Boyanmaz	
Calcofluor white	<5dk	Boyanır, Mavi-beyaz veya yeşil	Boyanmaz	
Gram-Weigert	<5dk	Boyanmaz, İntrakistik cisimcikler mor boyanır	Soluk olarak görülür	

PCP hastalarının serumlarındaki yükselmiş LDH enzim düzeyleri altta yatan akciğer inflamasyonu ve hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu prensiple değerlendirildiğinde LDH, tanıda özgül bir belirteç olmaktan çok genellikle PCP hastalarında tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (62,63).

Moleküler tanı yöntemlerinin *P. jirovecii* tanısında kullanımı ilk kez 1990 yılında Wakefield ve arkadaşlarının hem sıçan hem de insan örneklerinde *P. jirovecii* mitokondriyal ribozomal RNA dizilerini amplifiye etmesiyle başlamıştır (64). Yüksek duyarlık ve özgüllüğe sahip PZR bazlı yöntemler tanısal anlamda elimizi çok güçlendirmiş durumdadır ancak etken DNA'sının varlığı her zaman aktif enfeksiyon anlamına gelmemektedir (65). Son zamanlarda geliştirilen rt-PZR yöntemleri her ne kadar *P. jirovecii* yükü ve kantitasyonu hakkında bilgi veriyor olsa da kolonizasyonu aktif PCP'den ayırmak için standart bir kantitasyon sınır değeri belirlenmiş değildir.

Klinik örneklerde *P. jirovecii* DNA'sının saptanması için, mtLSU-rRNA, mtSSU-rRNA, ITS bölgeleri, 5S ribozomal RNA (5S rRNA), 18S ribozomal RNA (18S rRNA), DHPS, DHFR, timidilat sentaz (TS), major yüzey glikoproteini (MSG), keksin benzeri serin proteaz (KEX1), sitokrom b (CYB), süperoksit dismutaz (SOD), α ve β tubulin (α - β -TUB), tioredoksin redüktaz (TRR1) gibi *P. jirovecii* genlerini hedefleyen çeşitli PZR protokolleri geliştirilmiştir (66,67). Tanı için daha çok mtLSU-rRNA veya MSG gibi çok kopyalı genleri hedef alan protokoller kullanılırken diğer gen bölgeleri etkenin yayılımı, bulaşı, ilaç direnci gibi karakteristik özelliklerini ve genotipik varyantlarını belirlemeye yönelik epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu çalışmalarda tek lokuslu Sanger DNA sekansı, Multilokus dizi tiplemesi (MLST), RFLP analizi, tek sarmallı konformasyon polimorfizm analizi (SSCP) gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır (68,69) .

2.9. Tedavi

Pneumocystis enfeksiyonunda hastanın kliniği hızla bozulabilmekte ve tedavi edilmezse ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Risk altında olan hastaların başında; yüksek

doz kemoterapi hastaları, hematolojik malignite hastaları, AIDS hastaları ve yüksek dozda kortikosteroid kullanan hastalar gelmektedir (70–72).

Akut PCP tedavisinde alternatif birçok ilaç olmasına rağmen tedavinin temelini TMP-SMX ve pentamidin izetionat oluşturur. Hem yetişkinlerde hem de çocuklarda tedavi için önerilen doz 15- 20 mg/kg/gün (TMP bileşenine göre) oral veya IV olup, 21 gün boyunca günde üç ila dört doza bölünmüş şekilde olmalıdır (73). Pentamidin IV kullanımıyla hastalık tedavisinde ve aerosolize edilmiş formu ile profilakside kullanılabilir (43). Ekinokandinlerin (caspofungin vs.) düşük dozlarda kotrimoksazol ile birlikte kullanımının PCP enfeksiyonu tedavisinde başarılı olduğu, daha hafif hastaların tedavisinde ise atovaquone ve klindamisin-primakin gibi ikincil tedavilerin kullanılabileceği bildirilmiştir (74). Kortikosteroidler ise orta ve ağır klinik gösteren hastaların PCP tedavisine ek olarak klinik durumları düzeltmek için verilebilmektedir (44). Akut PCP için tedavi şekilleri tablo 3’ de verilmiştir.

PCP'nin tedavisi ve profilakside TMP-SMX'in yaygın kullanımı, ilaç direncinin gelişmesine ilişkin endişeleri artırmıştır. Bir kültür sisteminin olmaması, ilaç direncini belirlemek için in vitro duyarlılık testlerinin kullanımını engellemekte ve moleküler incelemeleri ön plana çıkarmaktadır. Folik asit sentezinde rol alan DHPS ve DHFR genlerindeki nokta mutasyonların TMP-SMZ profilaksisi ve tedavisini etkileyebilen, potansiyel olarak sülfadiazin direnci ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (75,76).

P. jirovecii ilaç direnci ile ilgili araştırılan polimorfizmlerin çoğu, DHPS geninin mutasyonları üzerinedir. Bu çalışmalarda özellikle DHPS'nin 165 ve 171. bazlarındaki (55 ve 57. amino asit kodonları) tek nükleotid polimorfizmlerinin muhtemel ilaç direncinde önemli olabileceği ortaya konmuştur. Dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde yapılan çalışmalarda bu genin belirtilen bölgeleri ile ilgili % 0-81 arasında mutasyon oranları saptanmıştır (77–83). Spesifik DHPS mutasyonlarının PCP hastalarında ilaç direncinin etkili bir nedeni olup olmadığı hala belirsiz olsa da bu mutasyonların TMP-SMZ veya dapson (DHPS inhibitörleri) kullanımıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (69).

Tablo 3. Akut PCP için tedavi şekilleri (39)

Tedavi rejimleri	Yol	Dozaj	Süre	Açıklama
İlk Tercih				
TMP/SMX	i.v. p.o.	TMP 15–20 mg ve SMX 75–100 mg/kg/gün her 6 veya 8 saatte bir verilir (yani bölünür).	21 gün	hafif ila orta PCP için: p.o. 3 bölünmüş dozda veya TMP/SMX DS – 2 tablet t.i.d.; orta ila şiddetli PCP için: i.v. ve p.o'ya geçin.
Alternatif				
Dapson+TMP	p.o.	dapson 100 mg p.o. günlük + TMP 15 mg/kg/gün p.o. (3 bölünmüş doz)	21 gün	hafif ila orta dereceli hastalık seçeneği
Klindamisin+primakin	i.v. p.o.	klindamisin (6 saatte bir i.v. 600 veya 8 saatte bir 900 mg) veya (p.o. 6 saatte bir 450 mg veya 8 saatte bir 600 mg) + primakin 30 mg (baz) p.o. günde bir kez	21 gün	hafif ila orta PCP ve orta ila şiddetli PCP seçeneği; hafif ila orta dereceli PCP durumunda: öncelikle klindamisin p.o.
Atovaquone	p.o.	750 mg p.o. b.i.d. yemekle	21 gün	hafif ila orta dereceli hastalık seçeneği
Pentamidin	i.v.	4 mg/kg i.v. günde bir kez en az 60 dakika boyunca verilir	21 gün	orta ila şiddetli hastalık seçeneği; dozu 3 mg/kg i.v.'ye düşürebilir. Toksikite durumunda günde bir kez
Kaspofungin (yalnız veya TMP/SMX kombiniyle)	i.v.	kaspofungin 70 mg günde 1/50 mg 2. günden başlayarak	21 gün	ikinci basamak (kurtarma) tedavisi
Ek tedavi				
Prednizon	p.o.	1-5 arası günler: 40 mg günde iki kez; 6-10. günler: günde 40 mg; 11-21 günler: günde 20 mg	21 gün	orta ila şiddetli PCP için (1) oda havasında PaO ₂ <70 mm Hg veya (2) alveolararteryal O ₂ gradyanı ≥35 mm Hg ise

b.i.d., günde iki kez; DS, iki kat güçlü; i.v., intravenöz; p.o., işletim başına; PCP, *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi; SMX, sülfametoksazol; t.i.d., günde üç kez; TMP, trimetoprim.

2.10. Korunma

Yoğun tedaviye rağmen, PCP'nin mortalitesi yüksek olabilmektedir. Hematolojik hastalıklar, solid organ tümörlü hastalar ve hematopoetik kök hücre nakli alıcıları için PCP'ye karşı profilaksi için kılavuzlar bulunmaktadır. Altta yatan başka hastalıkları olan bağışıklığı baskılanmış kişilerde, hepatotoksikite ve kemik

iliği depresyonu dikkate alınarak profilaksi endikasyonu mutlaka değerlendirilmelidir (84).

Profilaksi, daha önce PCP atağı geçirmemiş kişilerde ilk atağı önlemeye yönelik, atak geçiren kişilerde ise yeni atakları önlemeye yönelik olmaktadır. Kullanılan ilaçlar *P. jirovcii*'ye karşı öldürücü olmadığından profilaksiye hastanın bağışıklığı baskılandığı süre boyunca devam edilmesi önerilmektedir (85).

TMP-SMX, HIV ile enfekte ve HIV bağışıklığı baskılanmış kişilerde ilk tercih edilecek profilaktik ilaçtır. Genellikle önerilen doz, günde bir tablet (80 mg TMP ve 400 mg SMX) veya haftada 3 kez iki tablettir. Alternatif profilaksi seçenekleri arasında atovaquone (günde iki kez 750 mg) veya aerosol haline getirilmiş pentamidin (ayda bir kez 300 mg) yer almaktadır(84).

HIV hastaları arasında PCP profilaksileri için kılavuzlar spesifik ve evrensel olarak kabul edilmiş olsa da, diğer bağışıklığı baskılanmış kişilerde profilaksi konusunda fikir birliği yoktur (50). Ayrıca malignitesi olan bağışıklığı baskılanmış hastalar ve bir ay veya daha uzun süre günde 20 mg'dan fazla glukokortikoid alan hastalar, kemik iliği baskılayıcı / antineoplastik tedavi alan hastalar ve hematopoietik hücre veya katı organ nakli geçirmiş olanlar, *Pneumocystis* için birincil profilaksi tercih edilmelidir (41).

İmmünsüpresif ilaç almaya devam eden hastalarda altı aydan uzun süre profilaksi önerilir. Otolog kök hücre nakli alıcılarında PCP oranı, allojenik alıcılara göre çok daha düşüktür ve profilaksi yalnızca multipl miyelomlu hastalara veya yüksek doz kortikosteroid alan yüksek riskli popülasyonlara önerilir. Bu hastalarda PCP profilaksisinin süresi değerlendirilmemiştir, ancak yaygın uygulama profilaksinin transplantasyon sonrası 3-6 aya kadar uzatılması şeklindedir. Diğer hematolojik ve solid organ tümörlü hastalar arasında, akut lenfoblastik lösemili (ALL), uzun süreli CD4 sayımları 200/ μ L'den az olan veya uzun süreli steroid tedavisi olan hastalarda PCP riskinde artış bulunduğundan tedavi süresince veya CD4 sayısı >200/ μ L olana kadar profilaksi önerilir. Lenfoma, akut miyeloid lösemili olan hastalarda risk durumu daha belirsizdir ve kemoterapi süresince profilaksi

önerilmektedir. Solid organ nakli alıcıları için, nakil sonrası en az 6-12 ay boyunca anti-*Pneumocystis* profilaksisi önermektedir. Akciğer ve ince bağırsak nakli alıcılarının yanı sıra önceden PCP enfeksiyonu veya kronik CMV hastalığı öyküsü olan herhangi bir nakil hastası için yaşam boyu profilaksi endikasyonu olabilir. Ek olarak, böbrek nakli alıcılarına akut rejeksiyon tedavisi sırasında ve sonrasında en az altı hafta süreyle PCP profilaksisi önerilmektedir (50).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Çalışmamız, klinik örneklerden ve otopsi vakalarından elde edilmiş *P. jirovecii* izolatlarındaki farklı gen bölgelerinin araştırıldığı, *P. jirovecii*'nin toplumumuzdaki dağılımının, insanlar arası geçiş özelliklerinin, tedaviye dirençli suşların var olup olmadığının belirlendiği tanımlayıcı araştırma niteliğindedir.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne (DEÜH) gelen hastaların BAL örneklerinde *P. jirovecii* varlığı rt-PZR ile DEÜH Merkez Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda taranmış; diğer moleküler yöntemler DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Ayrıca sekans analizleri için hizmet alımı yapılmıştır. Tablo 4'de araştırma planı sunulmuştur.

Tablo 4. Araştırma Planı

Nisan 2018	Projenin Kabul edilmesi (<i>BAP-2018.KB.SAG.103</i>)
Kasım 2018	Tez önerisi hazırlanması
Aralık 2018	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Mart 2019	Etik kurul onayının alınması (<i>Etik Kurul Onay Tarihi: 27.03.2019, Karar No: 2019/07-39, Protokol No: 2685-GOA</i>)
Ekim 2018 - Ekim 2019	Örnek toplama süreci
Kasım 2018	Malzeme alımları
Aralık 2018 – Aralık 2019	DNA ekstraksiyonu ve Real time PZR
Kasım 2019 – Nisan 2020	mtLSU-rRNA geni nested PZR yöntemi
Mayıs 2020 – Ağustos 2020	Sekans analizleri
Eylül 2020 – Ekim 2020	DHPS genine yönelik PZR ve sonrasında RFLP
Aralık 2020- Ocak 2021	İstatistiksel analizler
Şubat 2021	Tez yazımına başlanması

3.3. Araştırmanın Evreni ve Çalışma Grupları

Çalışmamızda iki farklı gruptan elde edilen toplam 157 *P. jirovecii* izolatu, mtLSU-rRNA ve DHPS genleri için retrospektif olarak analiz edildi.

Birinci grup hastane kaynaklı örneklerden oluşturuldu. İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde Ocak 2011-Ekim 2019 tarihleri arasında bronkoskopi yapılan 699 PCP şüpheli hastanın bronkoalveolar lavaj (BAL) örneğinden elde edilen 120 *P. jirovecii* izolatu çalışmaya alındı.

1. Bu izolatların 32' si DEÜH Merkez Parazitoloji Laboratuvarı'na Ocak 2011-Nisan 2014 tarihleri arasında *P. jirovecii* tanısı için gönderilen 92 hastanın BAL sıvısı örneklerinden yine başka bir çalışma kapsamında nested PZR (n-PZR) ile elde edilmişti (DEÜTF Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı; karar no:2014/23-04) (86).

2. Diğer 88 izolat ise bu çalışma kapsamında mtLSU-rRNA genini hedefleyen ticari FTD *P. jirovecii* real-time PZR (rt-PZR) kiti (Fast Tract Diagnostic, Luxemburg; Cat no: FTD-27-32) ile saptandı. Mayıs 2014- Ekim 2019 tarihlerin arasında *P. jirovecii* şüphesi ile DEÜH Merkez Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen toplam 607 örneğin rt-PZR testleri DEÜH Merkez Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

İkinci grubu ise, önceki çalışmamızda (TÜBİTAK 1002 projesi; proje no: 214S052 “Adli Otopsi Vakalarında *Pneumocystis jirovecii* ve *Microsporidia spp.* Kolonizasyon Prevalanslarının Araştırılması”) otopsi vakalarından elde edilen toplam 37 *P. jirovecii* pozitif DNA örneği oluşturdu. Bu çalışma, Şubat 2015 - Nisan 2015 tarihleri arasında İzmir Adli Tıp Kurumu, İzmir Grup Başkanı Morg Anabilim Dalı'nda otopsi yapılan 200 vakadan akciğer dokusu örnekleri (sağ üst lobdan 1 gr) alınarak yapıldı. Çalışma için gerekli etik onaylar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (Karar no: 2019/07-39, Protokol No: 2685-GOA) alındı.

3.4. Örneklerin Alındığı Olguların Değerlendirilmesi

Hastaların tıbbi kayıtlarından yaş, cinsiyet, immünsüpresif tedavi, klinik tanı (hematolojik maligniteler, solid tümörler, solid organ nakilleri, otoimmün hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları vb.) hakkında bilgiler içeren demografik ve klinik veriler elde edildi. Ayrıca otopsi vakalarının yaşadığı yerler ve otopside tespit edilen ölüm nedenleri not edildi.

3.5. Çalışma Materyali

mtLSU-rRNA ve DHPS genleri çalışılacak olan DNA örnekleri (otopsi akciğer dokularından elde edilmiş 37; BAL örneklerinden elde edilmiş olan 120 DNA örneği çalışılincaya kadar -20° C'de saklandı.

3.6. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: Genotipik varyasyonlar; sülfonamid ilaç direnci (55. ve 57. kodonlardaki mutasyonlar)

Bağımsız değişken: Cinsiyet, yaş, altta yatan hastalık, immünsupresyon durumu PCP/kolonizasyon durumu

3.7. Veri Toplama Araçları

Çalışmamızda kullanılan cihazların, sarf malzemelerin ve diğer gereçlerin özellikleri tipleri markaları, lot numaraları ve kullanım amacı Tablo 5 ve 6'de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz / Malzeme Adı	Markası / Kod	Kullanım amacı
Mikroskop	Olympus / CX31	Boyalı preparatların incelenmesi
Thermal cycler	Techne / TC-412	PZR amplifikasyonu
Vorteks	Labnet / VX100	DNA ekstraksiyonu ve PZR amplifikasyonu
Sınıf II Biyogüvenlik kabini	Biosan DNA/RNA UV-Cleaner / UVT-S-AR	DNA ekstraksiyonu ve PZR miksinin hazırlanması

Sınıf II Biyogüvenlik kabini	metiSafe	DNA ekstraksiyonu ve PZR miksini hazırlanması
Mikrosantrifüj	Labnet Spectrafuge / 7M Labnet Spectrafuge / 16M	Örneklerin hazırlanması ve DNA ekstraksiyonu
Dijital kuru ısıtıcı ve alüminyum blok	Grant-bio / PCH-1	DNA ekstraksiyonu ve RFLPde amplikonların kesim inkübasyonu
Transilüminatör cihazı	ER Biyotek UV-BOX	Jel görüntüleme
Elektroforez cihazı	BIO-RAD / Power Pac 300	Jel yürütülmesi
Mikrodalga fırın	Beko / D1500	Jelin hazırlanması
Buzdolabı (+4°C)	Altus / AL 355	BAL örneklerinin, amplifikasyon ürünlerinin, çalışma kitlerin saklanması
Derin dondurucu (-20°C)	Zanussi, Beko / BK 7971 DF	DNA örneklerinin saklanması
Mikropipet seti	Thermo Finnpiptette	DNA ekstraksiyonu, PZR miks hazırlanması, RFLP yöntemi, elde edilen PZR ürünü ve RFLP ürününün görüntülenmesi
Hassas terazi	Scaltec / SBA31	Kimyasal hazırlama

Tablo 6. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Ethanol	Sigma-Aldrich	Ortam sterilizasyonu
EDTA	AppliChem	TBE buffer hazırlama
Borik asit	AppliChem	TBE buffer hazırlama
Tris	Ambresco	TBE buffer hazırlama
Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific	PZR, DNA ekstraksiyonu
dNTP Miks	Thermo Scientific	PZR, DNA ekstraksiyonu
6X DNA Loading dye	Fermentas	Jel yürütülmesi
100 bp Ladder	Biolabs	Jel yürütülmesi
1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific	Jel yürütülmesi
Primerler	Microsynth	DNA ekstraksiyonu
FastDigest BsuRI	Thermo Scientific	RFLP, enzim kesimi
FastDigest XmiI	Thermo Scientific	RFLP, enzim kesimi
2X PZR Mastermiks	Norgen Biotek Corp.	DNA ekstraksiyonu
Xpert Hotstart Mastermiks	Grisp	DNA ekstraksiyonu
Boya	Xpert Green DNA Stain	Jel görüntüleme
Mikropipet ucu (10µl, 200µl, 1000µl)	Neptüne	DNA ekstraksiyonu, PZR miks hazırlanması, RFLP

		yöntemi, elde edilen PZR ürünü ve RFLP ürününün görüntülenmesi
Mikrosantrifüj tüpü (0,5 ml ve 2ml)	Eppendorf	DNA Ekstraksiyon ve RFLP ürününün hazırlanması ve saklanması
Agaroz	Prona Basica Le	Jel hazırlama

3.7.1. BAL Sıvısı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu ve Real Time PZR Yöntemi

3.7.1.1. DNA Ekstraksiyonu

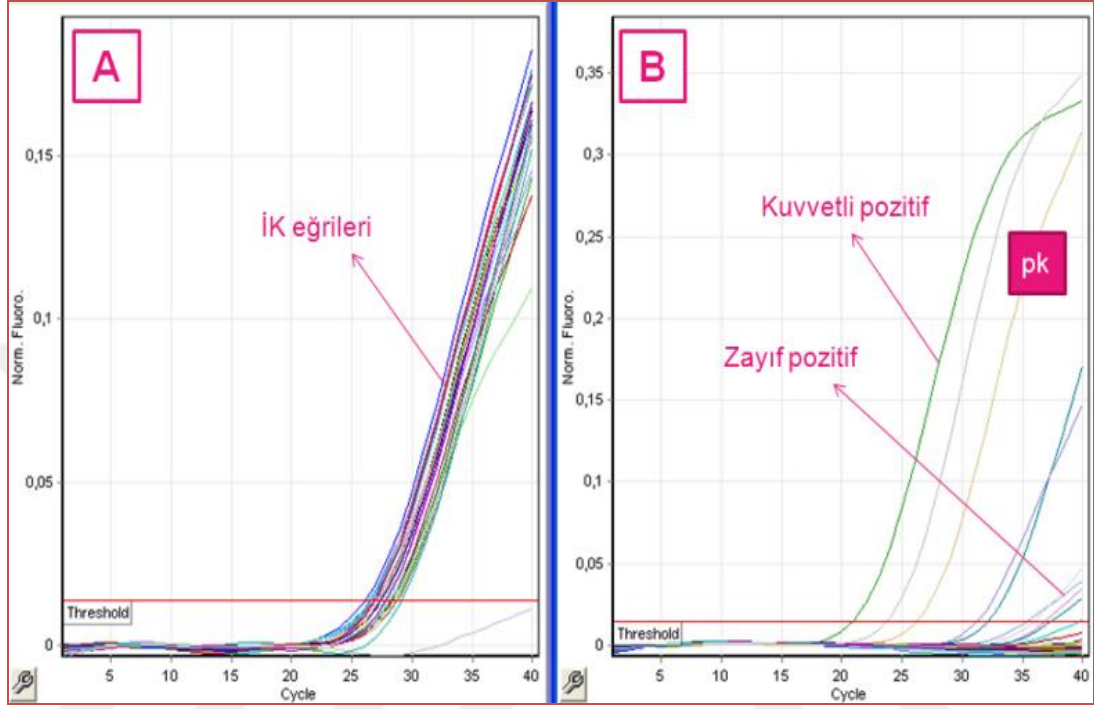
BAL sıvısı örnekleri ilk olarak 1500 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen pelletin 200 µl’si ayrıldıktan sonra ekstraksiyon işlemi, DNA ekstraksiyon kiti (Mo Bio, kat no:12334-50) ile üretici firma prosedürlerine uyularak gerçekleştirildi. Elde edilen DNA, PZR reaksiyonları yapılncaya kadar -20°C’de saklandı. *P. jirovecii* pozitif kontrolü olarak daha önceki çalışmamızda PCP olduğu mikroskobik ve klinik olarak tanımlanmış bir hastanın BAL örneği kullanıldı (87).

3.7.1.2. Real Time PZR

Bu yöntem Mayıs 2014 - Ekim 2019 tarihleri arasında PCP şüphesiyle DEÜH Merkez Parazitoloji Laboratuvarı’na gönderilen toplam 607 örneğe uygulandı. rt-PZR için ticari FTD *P. jirovecii* (kat no: FTD-27-32/Fast Tract Diagnostic, Lüksemburg) kiti kullanıldı. Kullanılan kit konvansiyonel PZR yöntemleriyle benzer bir şekilde *P. jirovecii* mtLSU-rRNA gen bölgesini hedeflemektedir. Amplifikasyon, revers transkripsiyon basamağını takiben aynı tüp içinde RotorGene 6000Q (Qiagen, Almanya) cihazında üretici firma önerilerine göre çalışıldı (Şekil 2). Kit içeriğinde; pozitif kontrol olarak *P. jirovecii* plazmit, negatif kontrol, primerler, çift etiketli proplar yer alırken; PZR inhibisyonu ise yine kit içeriğindeki internal kontrol (Equine arterit virüs) ile değerlendirildi ($C_T < 33$). Pozitif örneklerdeki göreceli *P. jirovecii* kantitasyonu kit prosedüründe önerilen formülasyona göre hesaplandı.

$$X = e^{[(y-42,347)/-1,348]}$$

(X= Gen Kopya/ml, y = Örneğin C_T değeri; C_T = cycle threshold, e = 2,718)



Şekil 2. Çalışılan örnek grubundan bir kısmının rt-PZR’da kantitasyon analizi
(A) Internal kontrol-İK eğrileri; (B) Çalışılan örnekler pk: pozitif kontrol

3.7.2. *mtLSU-rRNA Geni Nested PZR Yöntemi*

mtLSU-rRNA geni sekans analizi öncesinde gerekli ampikonu elde etmek amacıyla; sarf malzeme alımına göre bazı örneklerle klasik in-house n-PZR yöntemi uygulanırken bir kısım örneğe de aynı amaçla hazır PZR miksinin kullanıldığı n-PZR yöntemi uygulandı. Her iki PZR yönteminde de *P. jirovecii* mtLSU-rRNA gen bölgesi hedeflendi ve aynı oligonükleotid primerler kullanıldı. Birinci PZR döngüsünde pAZ102-E (5’-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3’) ve pAZ102 H (5’-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3’) primerleri; ikinci PZR döngüsünde ise pAZ102-X (5’-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3’) ve pAZ102-Y (5’-TCA

CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3') primerleri ile istenen bölgenin amplifikasyonu yapıldı (64).

Birinci aşama amplifikasyon için PZR miksi buz üzerine yerleştirilen 0,2 ml'lik amplifikasyon tüplerinde toplam hacim 25 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı;

10x buffer	: 2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM stok)	: 2,5 µl
dNTP (2 mM stok)	: 2,5 µl
Primer pAZ102-E (10 µM stok)	: 0,75 µl
Primer pAZ102-H (10 µM stok)	: 0,75 µl
Taq DNA polimeraz (1U/µl stok)	: 1 µl
DNA ekstraktı	: 2 µl
Apirojen su	: son hacim 25 µl' ye tamamlandı

Thermal cycler ile aşağıda belirtilen programda amplifikasyon yapıldı.

94°C → 10 dk. ön denatürasyon

94°C → 1 dk. (denatürasyon)	}	(35 döngü)
56°C → 1 dk. (bağlanma)		
72°C → 1,5 dk. (uzama)		

72°C → 5 dk. son uzama (32).

İkinci aşama amplifikasyon için (n-PZR) PZR miksi, yine buz üzerine yerleştirilen 0,2 ml' lik amplifikasyon tüplerinde son hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

10x buffer	: 5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	: 5 µl
dNTP (2 mM)	: 5 µl
Primer pAZ102-X (10 µM)	: 0,75 µl

Primer pAZ102-Y (10 µM) : 0,75 µl
Taq DNA polimeraz (1U/µl) : 2 µl
DNA ekstraktı (1. amplifikasyon ürünü) : 2 µl
Apirojen su : son hacim 50 µl' ye tamamlandı

Thermal cycler ile birinci döngüde kullanılan program kullanıldı. Elde edilen PZR ürünü görüntüleme yöntemi uygulanıncaya kadar +4°C' de saklandı.

Master miks (Norgen Biotek 2X PZR Master Miks; Product #28009) kullanılarak uygulanan n-PZR yöntemindeki içerik ve döngü farklılıkları ise aşağıdaki gibidir:

1 örnek için PZR reaksiyon miksi;

PZR reaksiyon miksi	1.Döngü	2. Döngü
2x PZR master miks	10 µl	25 µl
DNA ekstraktı	2 µl	2µl
Primer E/X	0,75 µl	0,75 µl
Primer H/Y	0,75 µl	0,75 µl
Apirojen su	20 µl'ye tamamlandı	50 µl'ye tamamlandı

Thermal cycler ile aşağıda belirtilen programda amplifikasyon yapıldı.

94°C → 2 dk. ön denatürasyon

94°C → 30 sn. (denatürasyon)
56°C → 30 sn. (bağlanma)
72°C → 30 sn. (uzama)

(35 döngü)

72°C → 5 dk. son uzama

Thermal cycler ile her iki döngüde de aynı program kullanıldı. Elde edilen PZR ürünü görüntüleme yöntemi uygulanıncaya kadar +4°C' de saklandı.

3.7.2.1. PZR Ürünlerinin Değerlendirilmesi

Hedef DNA amplifikasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini konfirm etmek amacıyla tüplerden alınan 10 µl amplicona 2 µl gel loading dye karışımı eklendi. %1,5'luk agaroz jelde 100 volt altında 45 dk elektroforeze tabi tutulduktan sonra 1 µg/ml etidiyum bromür ile boyanarak UV ışık altında görüntülendi.

P. jirovecii pozitif amplifikasyon ürününün birinci reaksiyon için 346 bp; n-PZR sonucunda da 267 bp uzunlukta olması beklenmiştir (88).

3.7.3. DNA Sekans Analizi ve mtLSU-rRNA Genotipleme

PZR ürünleri, İsviçre'deki Microsynth şirketi tarafından sekanslandı. Sekanslama, hem ileri hem de ters yönde bir ABI 3730XL otomatik sekanslama aparatı-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, ABD) ile Sanger dideoksi sekanslama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Nükleotid dizileri, DNA Dynamo 2004-2019 programı (Bluetractor yazılımı, İngiltere) kullanılarak hizalandı ve düzenlendi.

- Forward Primer: pAZ102-X (5'- GTGAAATACAAATCGGACTAGG -3');
- Revers Primer: pAZ102-E (5'- GATGGCTGTTTCCAAGCCCA -3') kullanıldı.

P. jirovecii'nin genotipleri, mtLSU-rRNA'nın 85 ve 248. pozisyonlarında polimorfizm tanımlanarak ayırt edilmiş ve daha önce açıklanan yöntem kullanılarak gruplandırıldı. mtLSU-rRNA gen bölgesinin sekans analizi sonucunda 85. ve 248. bazlardaki polimorfizme göre:

- ✓ 85C/248C; genotip 1,
- ✓ 85A/248C; genotip 2,
- ✓ 85T/248C; genotip 3,
- ✓ 85C/248T; genotip 4 ve
- ✓ 85A/248T; genotip 5 olarak tanımlandı (89,90).

3.7.4. *Pneumocystis jirovecii* DHPS Genine Yönelik PZR ve Sonrasında RFLP Yöntemi

P. jirovecii rt-PZR ile pozitif saptanan örnekler DHPS geni yönünden incelendi. Bu aşamada rt-PZR öncesi elde edilen DNA örnekleri kullanıldı.

3.7.4.1. *P. jirovecii* DHPS Genine Yönelik Touchdown PZR

P. jirovecii DHPS gen bölgesi DHPS geninin amplifikasyonu, DHPS-3 (5'-GCGCCTACACATATTATGGCCATTTTAAATC-3') ve DHPS-4 (5'-GGAAGTTTCAACTTGGCAACCAC-3') primerleri kullanılarak touchdown-PZR prosedürü ile gerçekleştirildi.

Touchdown PZR'nin negatif olması durumunda, DHPS NF (5'-AAATGCAGGGGCGACGATAAT-3') ve DHPS-NR (5'-GCCTTAATTGCTTGTCTGCAA-3') primerleri kullanılarak n-PZR testi, daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi (91–93).

PZR miksi buz üzerine yerleştirilen 0,2 ml' lik amplifikasyon tüplerinde toplam hacim 30 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

10x reaksiyon buffer	: 3 µl
MgCl ₂ (25 mM stok)	: 3 µl
dNTP (2 mM stok)	: 3 µl
Primer DHPS-3 (10 µM stok)	: 1,2 µl
Primer DHPS-4 (10 µM stok)	: 1,2 µl
Taq DNA polimeraz (5Ü/µl stok)	: 0,9 µl
DNA ekstraktı	: 2 µl
Apirojen su	: son hacim 30 µl'ye tamamlandı.

Thermal cycler ile aşağıda belirtilen programda amplifikasyon yapıldı.

94°C → 10 dk. hot start başlangıç

94°C → 15 sn. (denaturasyon)

72-62°C'de	→ 30 sn. (bağlanma)	}	(10 döngü)
72°C	→ 15 sn. (uzama)		
94°C	→ 15 sn. (denaturasyon)	}	(40 döngü)
62°C'de	→ 30 sn. (bağlanma)		
72°C	→ 15 sn. (uzama)		

72°C → 5 dk. son ekstansiyon (92).

3.7.4.2. *P. jirovecii* DHPS Genine Yönelik Nested PZR

İkinci aşama amplifikasyon (n-PZR) için PZR miksi yine buz üzerine yerleştirilen 0,2 ml' lik amplifikasyon tüplerinde gerçekleştirildi.

10x reaksiyon buffer	: 2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	: 1,5 µl
dNTP (2 mM)	: 2,5 µl
Primer DHPS-NF (10 µM)	: 0,75 µl
Primer DHPS-NR (10 µM)	: 0,75 µl
Taq DNA polimeraz (5Ü/µl)	: 1 µl
DNA ekstraktı	: 1 µl
Apirojen su	: son hacim 25 µl'ye tamamlandı

PZR sonrası amplifikasyon ürünleri 3 (5 µl, 10 µl, 10 µl) parçaya alikotlandı ve bunlardan 5 µl' lik alikot DHPS gen konfirmasyonu için %1,5 'lük agaroz jelde 100 volt altında 40 dk elektroforeze tabi tutulduktan sonra UV ışık altında görüntülendi (64). Touchdown PZR sonrası birinci aşamada 370 bp, ikinci aşamada (n-PZR) 186 bp uzunlukta DNA amplikonu hedeflendi (92,93).

3.7.4.3. *RFLP Analizi Sulfa Dirençli Mutant İzolatların Belirlenmesi*

Touchdown (birinci amplikon) ve n-PZR (ikinci amplikon) ile elde edilip alikotlanan diğer DHPS amplikonları, XmiI (AccI'in bir izoşizomeri; Thermo Scientific, ABD) ve BsuRI (HaeIII'ün bir izoşizomeri; Thermo Scientific, USA)

FastDigest restriksiyon enzimleriyle RFLP tekniği kullanılarak incelendi (92,93). Daha sonra etidyum bromür ile % 2 agaroz jel üzerinde her ürünün elektroforezi ile görüntülendi.

Elli beşinci kodonu değerlendirmek üzere Acc I enzimi ile hiç kesim saptanmayan (370 bp) izolatlar mutant suşlar; 229 bp ve 141 bp uzunlukta iki band görülen izolatlar ise mutasyon olmayan (vahşi) suşlar olarak değerlendirildi (94,95). Aynı şekilde 57. kodonu değerlendirmek üzere Hae III enzimi ile hiç kesim saptanmayan (370 bp) izolatlar mutant suşlar; 221 bp ve 149 bp uzunlukta iki band görülen izolatlar ise mutasyon olmayan (vahşi) suşlar olarak değerlendirildi (94,95). Her iki enzim kesimini takiben yapılan elektroforez sonucu üçlü bant profili gözlenmesi durumunda, bu durumun yetersiz enzim kesimi sonucunda mı oluştuğunu yoksa gerçekten miks enfeksiyonumu (mutant ve vahşi suş birlikteliği) gösterdiğini anlamak için amplikonlar dilüe edildikten sonra (1/2, 1/4 dilüsyon) RFLP testleri tekrar edildi.

Touchdown PZR'nin negatif olması durumunda, DHPS NF (5'-AAATGCAGGGGCGACGATAAT- 3') ve DHPS-NR (5'-GCCTTAATTGCTTGTCTGCAA- 3') primerleri kullanılarak n-PZR testi yapıldı. 55. kodonu değerlendirmek üzere Acc I enzimi ile kesim işlemi yapıldıktan sonra DHPS NF ve NR primerleri ile 148 ve 38 bp'da çift bant görülen örnekler mutasyon olmayan (vahşi) suş olarak kabul edildi. Aynı şekilde 57. kodonu değerlendirmek üzere Hae III enzimi ile kesim işlemi yapıldıktan sonra DHPS NF ve NR primerleri ile 140 ve 46 bp'da çift bant görülen örnekler mutasyon olmayan (vahşi) suş olarak kabul edildi.

3.8. *Pneumocystis jirovecii* Pozitif Hastaların Klinik Sınıflandırması

PCP tanısı için uluslararası bir standart bulunmadığı için, n-PZR pozitif saptanan hastalarda, Maillet ve arkadaşlarının kullandığı aşağıdaki kriterlere göre vaka tanımlaması yapıldı.

- 1: Ani başlangıçlı ateş, nonproduktif öksürük ve dispne şikayetlerinin olması,

2:Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografide yaygın buzlu cam opasitelerinin gösterilmiş olması,

3: PCP tedavisine yanıt alınması veya tedavi almayan hastaların eksitus olması (96).

Dosya bilgilerine göre kriterlerin tümünü karşılayanlar veya mikroskopisi yapıp *P. jirovecii* kist ve/veya trofozoitleri gösterilebilen hastalar PCP olarak kabul edildi. n-PZR pozitif saptanan ancak tipik PCP klinik ve radyolojik bulguları olmayan veya başka bir etiyolojik ajan saptanan ve bu etiyolojik ajana karşı uygulanan tedaviyle klinik bulguları düzelenler “kolonizasyon” olarak değerlendirildi (32).

3.9. İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Genotip dağılımlarının etkileyen faktörlerin belirlenmesinde ve istatistiksel farkların değerlendirilmesinde parametrik testlerden student t testi, nonparametrik testlerden Mann-Witney U testleri kullanıldı. Olası DHPS gen mutasyonlarının oluşumunda TMP-SMZ kullanıp kullanmama gibi faktörlerin etkisi ise χ^2 ve McNemar testi kullanılarak değerlendirildi.

3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızda kullanılan BAL örnekleri 2011-2019 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastalara ait örneklerdir. Otopsi örnekleri ise çoğunluğu İzmir bölgesi olmak üzere Ege bölgesindeki illerden İzmir Adli Tıp Kurumu'na gelen vakalardan elde edilmiştir. Çalışma Türkiye'nin farklı şehirlerinden gelecek örneklerle genişletilebilir.

3.11. Etik Kurul Onayı

2018.KB.SAG.103 (201876) numaralı proje DEÜ Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 27.03.2019 tarihinde, karar no: 2019/07-39, Protokol No: 2685-GOA ile onay aldı. Etik kurul onayı Ek 2 de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. mtLSU-rRNA Geni Real Time PZR ve Nested PZR Sonuçları

Hastane kaynaklı 120 *P. jirovecii* izolatının 106 tanesinde genotiplendirme yapılabildi. Genotiplendirmesi yapılamayan 14 hastanın altısında n-PZR ile elde edilen amplikonlardan sağlıklı bir sekans okuması yapılamadı. Sekiz örnek ise n-PZR'ı negatif çıktığı için sekanslamaya gönderilemedi. Bu örneklerin ikisinde önceki çalışmamızda n-PZR ile pozitif saptanmış olmasına rağmen bu çalışmada n-PZR ile herhangi bir amplikon elde edilemedi. Diğer taraftan bu çalışmada rt-PZR ile pozitif saptanan 88 örneğin altısı da yine n-PZR ile çoğaltılamadığından sekans analizine gönderilemedi. Bu altı örneğin rt-PZR' daki C_T değerlerinin ortalaması (C_T ort = 36,7) ile diğer 82 örneğin C_T değerlerinin ortalaması (C_T ort = 29,2) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,01$).

Otopsi vakalarından elde edilen toplam 37 *P. jirovecii* pozitif DNA örneğinin ise beş tanesi n-PZR ile çoğaltılamadığı için sekansa gönderilmez iken 32 örnek sekans analizi başarıyla yapıldı.

4.2. mtLSU-rRNA Genotip Analizi ve Demografik Verilerle İlişkisi

Sekans analizi yapılan 138 örnekte (106 BAL sıvısı, 32 otopsi akciğer) şimdiye kadar belirlenmiş olan beş genotipin tümüne farklı oranlarda rastlandı. Olguların geneline bakıldığında genotip 2, % 58 ile en sık karşılaşılan genotip olarak bulundu ($p<0.01$). Genotip 2' den sonra en sık saptanan genotipler sırasıyla genotip 3 (% 13), genotip 1 (% 11,6) ve genotip 4; (% 5,1) şeklindeydi. Genotip 5, en az sıklıkta gözlenen genotip (% 0,7) olarak sadece bir otopsi olgusunun akciğer örneğinde bulundu. Bunun yanısıra olguların % 11,6' inde ikili veya üçlü koenfeksiyonlar mevcuttu (Tablo 7).

İncelenen örnek tipine göre karşılaştırıldığında her iki grup arasında (BAL/otopsi örnekleri) genotip dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. Genotip 2 yine her iki grup için de en sık karşılaşılan genotipti. Miks

enfeksiyonların dağılımı incelendiğinde ise % 87,5 (14/16)'inin hastane kökenli BAL örneklerinde saptandığı görüldü ($\chi^2=1,161$; $p=0,281$). Saptanan mtLSU-rRNA genotiplerinin BAL ve akciğer doku örneklerine göre dağılımları Tablo 7'de verilmiştir.



Tablo 7. Hastane kökenli ve otopsi olgularının mtLSU-rRNA ve DHPS genotip dağılımlarının karşılaştırılması

Bölge*	Nükleotid (Kodon)	Genotip	Klinik BAL örnekleri (n= 120)	Otopsi örneği (n= 37)	akciğer P değeri	Toplam (n= 157)
mtLSU-rRNA	ND	ND	14	5	-	19
	85C/248C	1	13 (% 12,3)	3 (% 10,7)	0,655	16 (% 11,9)
	85A/248C	2	61 (% 57,5)	17 (% 59,4)	0,854	80 (% 58)
	85T/248C	3	12 (% 11,3)	6 (%18,8)	0,274	18 (% 13)
	85C/248T	4	6 (% 5,7)	1 (% 3,1)	0,567	7 (% 5,1)
	85A/248T	5	0 (% 0)	1 (% 3,1)	0,068	1 (% 0,7)
		miks	14 (% 13,2)	2 (% 6,3)	0,281	16 (% 11,6)
	85C/248C; 85A/248C	1 & 2	1	0	-	1
	85C/248C; 85C/248T	1 & 4	3	0	-	3
	85A/248C; 85T/248C	2 & 3	2	0	-	2
	85C/248C;85A/248C; 85T/248C	1 & 2 & 3	6	0	-	6
	85C/248C; 85T/248C; 85C/248T	1 & 3 & 4	2	0	-	2
DHPS	ND	ND	16	4	-	20
	165(55)A(Thr); 171(57)C(Pro)	Vahşi suş	102 (27/75)	33 (8/25)	-	135
	165(55)G(Ala); 171(57)C(Pro)	Mut 55	0	0	-	0
	165(55)A(Thr); 171(57)T(Ser)	Mut 57	0	0	-	0
	165(55)G(Ala); 171(57)T(Ser)	Mut 55 + Mut 57	0	0	-	0
	165(55)A/G(Thr/Ala); 171(57)C(Pro)	Vahşi + Mut 55	0	0	-	0
	165(55)A(Thr); 171(57)C/T(Pro/Ser)	Vahşi + Mut 57	2 (% 1,8)*	0	-	2 (% 1,5)

ND:belirlenemedi

*: İki hastanın biri AML hastası (mtLSU-rRNA genotip1-2-3); diğeri akciğer Ca (mtLSU-rRNA genotip 2)

Genotipleme yapılan 138 olgunun yaş ortalaması 52,7 (1-94) olarak bulunurken; bu olguların 52 (37,7%) 'si kadın, 86 (62,3%) 'si erkekti. Saptanan genotiplerin yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımı incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($\chi^2=2,476$; $p=0,780$; $\chi^2=1,975$; $p=0,853$). Ancak otopsi olguları arasındaki infant örneklerinde (n=5) sadece genotip 2 tanımlanmış olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($\chi^2=4,055$; $p=0,044$).

BAL örneklerinin alındığı hastane kökenli olgular, klinik tanılarına göre hematolojik maligniteler (% 22,6), organ transplantasyonları (% 18,9), otoimmün hastalıklar (% 17,0), solid organ tümörleri (% 15,1), akciğer hastalıkları (% 7,5) ve diğer hastalıklar (% 18,9) olmak üzere altı gruba ayrıldı. Yine tüm klinik gruplarda genotip 2 baskınlığı mevcuttu ancak gruplar arasında genotip sıklıkları açısından istatistiksel bir farklılık yoktu ($\chi^2=25,884$; $p=0,398$). Tanı grupları kendi içinde değerlendirildiğinde ise solid organ tümörlerindeki genotip 2 oranı (% 81,3) ve akciğer hastalıklarındaki miks enfeksiyon oranı (% 37,5), BAL örneklerinin geneline göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($\chi^2=4,334$; $p=0,037$; $\chi^2=4,455$ $p=0,035$).

Akciğer doku örneklerinin alındığı adli otopsi olguları da kendi arasında medikal ölüm sebebi olanlar (% 59,3), nonmedikal ölüm sebebi olanlar (% 34,4) ve ölüm sebebi belirlenemeyenler (% 6,3) olmak üzere üç gruba ayrılarak değerlendirildi. Her ne kadar genotip 2 baskınlığı ölüm sebebi medikal kökenli olanlarda daha fazla olsa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($\chi^2=9,532$; $p=0,482$). Tüm olguların genotip dağılımları ve demografik özellikleri Tablo 8' de gösterilmiştir.

Genotipleme yapılan 32 otopsi örneğinin coğrafik orijinlerine bakıldığında; İzmir (23), Manisa (6), Aydın (3) şehirlerinde yaşamış olan kişilere ait oldukları görüldü. İzmir örneklerinden elde edilen *P. jirovecii* izolatlarında genotip 2 (16/23) başta olmak üzere 5 genotipin hepsine rastlanırken Manisa ve Aydın örneklerinin % 67'sinde sırasıyla genotip 3 ve genotip 1 varyasyonları saptandı.

Genotip dağılımları son olarak saptandıkları olguların immün durumuna göre de karşılaştırıldı. Olguların 43'ü immün sağlamken 95'inde çeşitli nedenlerle oluşmuş immün baskılanma durumu mevcuttu. Tüm otopsi örnekleri biri dışında (griscelli sendromu) immün sağlam kişilere aitti. Tam tersine BAL örnekleri alınan olguların ise sadece 12' si immün sağlam; 94' ü çeşitli sebeplerle immün baskılanmış hastalardı. İmmün baskılanmış ve immün sağlam gruplar arasındaki genotip dağılımları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($\chi^2=3,179$; $p=0,672$).



Tablo 8. mtLSU-rRNA genotiplemeesi yapılan olguların özelliklerin demografik ve klinik özellikleri

mtLSU-rRNA genotiplemeesi yapılan olgular	Hastane örnekleri (n= 106)	Otopsi örnekleri (n= 32)	Genotip							
			1	2	3	4	5	6 (Miks)	P değeri	Toplam (n= 138)
Yaş;main (aralık)	56,5 (4-91)	40 (1-74)	54,2 (29-75)	52,6 (1-91)	49,1 (23-65)	53,7 (5-83)	62 (62)	54,8 (25-79)	0,780	52,7 (1-91)
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	41/65	11/21	4/12	32/48	7/11	3/4	0/1	6/10	0,853	52/86
İmmün sağlam/ İmmün baskılanmış	12/94	31/1	5/11	25/55	6/12	1/6	1/0	5/11	0,672	43/95
Hastane olgularının klinik tanımı										
Hematolojik maligniteler	24 (%22,6)	–	3 (%12,5)	16 (%66,7)	1 (%4,2)	2 (%8,3)	0 (%0)	2 (%8,3)	0,591	24 (%100)
Solid organ tümörleri	16 (%15,1)	–	1 (%6,1)	13*(%81,3)	1 (%6,1)	1 (%6,1)	0 (%0)	0 (%0)	0,037*	16 (%100)
Solid organ tx	20 (%18,9)	–	2 (%10)	11 (%55)	4 (%20)	1 (%5)	0 (%0)	2 (%10)	0,739	20 (%100)
Otoimmün hastalıklar	18 (%17,0)	–	1 (%5,6)	10 (%55,6)	4 (%22,2)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%16,7)	0,341	18 (%100)
Akciğer hastalıkları	8 (%7,5)	–	0 (%0)	4 (%50)	0 (%0)	1 (%12,5)	0 (%0)	3*(%37,5)	0,035*	8 (%100)
Diğer (DM-KAH, Epilepsi vs)	20 (%18,9)	–	6*(%30)	7(%35)	2 (%10)	1 (%5)	0 (%0)	4 (%20)	0,051	20 (%100)
Adli tıp ölüm nedenleri										
Medikal nedenli ölümler ^a	–	19 (%59,4)	1 (%5,3)	13 (%68,4)	1 (%5,3)	1 (%5,3)	1 (%5,3)	2 (%10,5)	0,079	19 (%100)
Medikal nedenli olmayan ölümler ^b	–	11 (%34,4)	2 (%18,2)	5 (%45,5)	4 (%36,4)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0,256	11 (%100)
Belirsiz	–	2 (%6,3)	0 (%0)	1(%50)	1(%50)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	-	2 (%100)
Toplam	106 (%100)	32 (%100)	16 (%11,9)	80 (%58)	18 (%13)	7 (%5,1)	1 (%0,7)	16 (%11,6)		138 (%100)

^a : Miyokard infarktüsü (n=11; G1,G2(7),G3,G5,G6), Pnömoni (n=6;G2(5),G4) Subaraknoid hemoraji (n=1; G2), Epileptik snöbet (n=1; G2); kardiyak tamponad (n=1; G6) ^b:Trafikkazası (n=2; G2,G3), Ateşli silah yaralanması (n=3; G1,G2,G3), Asılma (n=2;G3(2)) Yüksekten düşöe (n=1;G2), Yanma (n=1; G1), Kesici alet yaralanması (n=1;G2), Zehirlenme (n=1;G2)

4.2. Hastane Örneklerinin Klinik Tanımlaması ve Genotip İlişkisi

Genotiplendirmesi yapılabilen toplam 106 klinik örneğin sadece 94 'ünde kolonizasyon ve PCP ayrımı yapılabildi. Kolonize ve PCP hastaları arasında yaş ortalaması ve cinsiyet bakımından bir farklılık gözlenmezken PCP hastalarındaki immün durum yetersizliği istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.000$). Genotip gruplarının her iki grup arasındaki dağılımı incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 9).

Tablo 9. PCP ve kolonize hastalardaki demografik verilerin ve genotip dağılımlarının karşılaştırılması

	PCP (n=60; 100%)	Kolonize (n=46; 100%)	P değeri	Toplam (n=106; 100%)
Yaş	54,76	58,82	0,193	56,52 (4-91)
Cinsiyet (K/E)	25/35	16/30	0,471	41/65
İmmün sağlam/ immün baskılanmış	1/59	11/35	0,000	12/94
Genotip dağılımı				
1	7 (%11,7)	6 (%13)	0,830	13 (12,3%)
2	33 (%55)	28 (%61)	0,545	61 (57,5%)
3	9 (%15)	3 (%6,5)	0,172	12 (11,3%)
4	3 (%5)	3 (%6,5)	0,737	6 (5,7%)
Miks	8 (%13.3)	6 (%13)	0,965	14 (13.2%)
1 & 2	0	1	-	1
1 & 4	2	1	-	3
2 & 3	2	0	-	2
1 & 2 & 3	3	2	-	5
1 & 3 & 4	1	1	-	2

Rt-PZR uygulamasında pozitif saptanan 88 hasta parazit yüküne göre değerlendirildiğinde genotip 2'nin PCP hastalarındaki Ct ortalaması kolonize hastalardakine oranla istatistiksel olarak anlamlı olarak fazla bulundu ($P=0,000$). Her iki gruba ait veriler Tablo 10 da verilmiştir.

Tablo 10. Kolonize ve PCP hastalardaki parazit yükünün genotiplere göre değerlendirilmesi

	Rt-PZR sonuçları C_T mean (C_T range)			<i>P. jirovecii</i> yükü kopya range /ml	
<i>P. jirovecii</i> genotipleri	PCP	Kolonize	P değeri	PCP	Kolonize
Genotip 1	26.84 (18.54 ≤ C_T ≤ 34.07)	31.41 (28.10 ≤ C_T ≤ 36.42)	0.063	4.6 x 10 ² – 4.7x 10 ⁷	8.1 x 10 ¹ – 38.9 x 10 ³
Genotip 2	27.85 (18.33 ≤ C_T ≤ 35.72)	31.70 (24.14 ≤ C_T ≤ 38.59)	0.000	1.4 x 10 ² – 5.5 x 10 ⁷	6.9 x 10 ¹ – 7.3 x 10 ⁵
Genotip 3	25.60 (18.17 ≤ C_T ≤ 34.23)	30.27 (27.65 ≤ C_T ≤ 32.04)	0.102	4.1 x 10 ² – 6.2 x 10 ⁷	2.1 x 10 ³ – 5.4 x 10 ⁴
Genotip 4	23.84 (20.87 ≤ C_T ≤ 29.71)	29.48 (24.32 ≤ C_T ≤ 33.62)	0.127	11.8 x 10 ³ – 8.3 x 10 ⁶	6.5 x 10 ² – 6.4 x 10 ⁵
Miks	28.05 (21.39 ≤ C_T ≤ 36.29)	31.24 (29.40 ≤ C_T ≤ 33.53)	0.092	8.9 x 10 ¹ – 8.1 x 10 ⁵	6.9 x 10 ² – 14.8 x 10 ³
Toplam	27.01 (18.17 ≤ C_T ≤ 36.29)	31.48 (24.14 ≤ C_T ≤ 38.59)	0.000	8.9 x 10¹ – 6.2 x 10⁷	6.9 x 10¹ – 7.3 x 10⁵

4.3. DHPS Geni Amplifikasyonu

BAL örneklerinden elde edilen ve rt-PZR ile *P. jirovecii* pozitif saptanan 120 DNA örneğinin 27'sinde DHPS 3 ve 4 primerleri kullanılarak yapılan touchdown PZR ile; 77'sinde ise DHPS NF ve NR primerleri kullanılarak yapılan n-PZR ile olmak üzere toplam 106 örnekte DHPS gen amplifikasyonu gerçekleştirilebildi. Diğer taraftan otopsi vakalarından elde edilen ve *P. jirovecii* pozitif saptanan 33 DNA örneği DHPS geni yönünden incelendiğinde; sekiz tanesi DHPS 3 ve 4 primerleri kullanılarak yapılan touchdown PZR ile pozitif bulunurken, 25 örnek ise DHPS NF ve NR primerleri kullanılarak yapılan n-PZR sonucunda pozitif saptanabildi. Dört örnekte ise herhangi bir amplifikasyon sağlanamadı (Tablo 11).

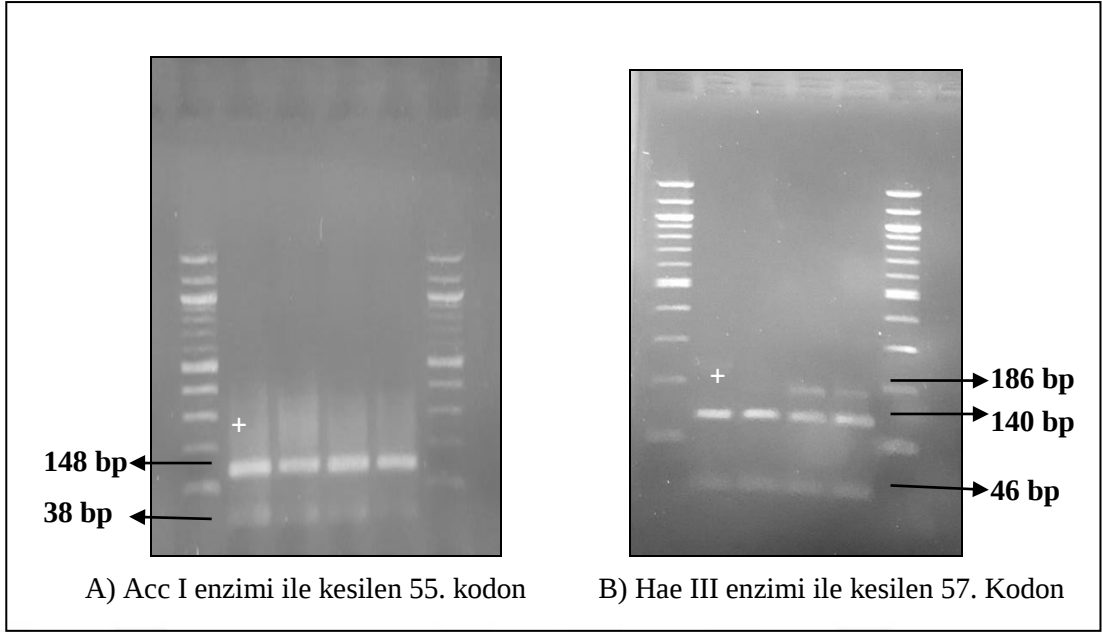
Tablo 11. DHPS gen amplifikasyonunun gruplara göre dağılımı

1. grup ^a	2. grup ^b	Toplam
27 örnek → DHPS 3-4	8 örnek → DHPS 3-4	35
77 örnek → DHPS NF NR	25 örnek → DHPS NF-NR	102
16 örnek → negatif	4 örnek → negatif	20
120	37	157

^a: DEÜH Merkez Parazitoloji Laboratuvarı'na Mayıs 2011 – Eylül 2019 tarihlerin arasında *P. jirovecii* şüphesi ile gönderilen BAL sıvısı örnekleri; ^b: TÜBİTAK proje no: 214S052, *P. jirovecii* pozitif saptanan 37 DNA örneği

4.4 RFLP Analizi Sonuçları

Elli beşinci kodonu değerlendirmek üzere DHPS 3 ve 4 primerleri ile pozitif çıkan 27 örneğin tamamında Acc I enzimi ile kesim işlemi yapıldıktan sonra 229 ve 141 bp'da bant görülürken, DHPS NF ve NR primerleri ile pozitif çıkan 77 örneğin tamamında 148 ve 38 bp'da çift bant görüldüğü için örnekler mutasyon olmayan (vahşi) suş olarak değerlendirildi. Aynı şekilde 57. kodonu değerlendirmek üzere Hae III enzimi ile kesim işlemi yapıldıktan sonra DHPS 3 ve 4 primerleri ile pozitif çıkan 27 örneğin tamamında Hae III enzimi ile kesim işlemi yapıldıktan sonra 221 ve 149 bp'da çift bant görülürken, DHPS NF ve NR primerleri ile pozitif çıkan 75 örnekte 140 ve 46 bp'da çift bant görüldüğü için örnekler mutasyon olmayan (vahşi) suş olarak değerlendirildi. DHPS NF ve NR primerleri ile pozitif çıkan dört örnekte ise 186, 140 ve 46 bp'da üçlü bant görüldü. Bu durumun yetersiz enzim kesimi sonucunda mı oluştuğunu yoksa gerçekten miks enfeksiyonu (mutant ve vahşi suş birlikteliği) mu gösterdiğini anlamak için amplikonlar dilüe edildikten sonra (1/2, 1/4 dilüsyon) RFLP testleri tekrar edildi. İşlem sonrasında iki örnekte tekrar üçlü bant görüldü ve bu sebeple örnekler vahşi suş ile birlikte 57. kodonda mutasyonun birlikte olduğu miks enfeksiyon olarak değerlendirildi (Şekil 3).



Şekil 3. Enzim kesimi sonucunda 55. ve 57. kodondaki bant görüntüleri;

A) 148 ve 38 bp’da ikili bant → vahşi suş; B) 186, 140 ve 46 bp’da üçlü bant görü → miks enfeksiyon

Sonuç olarak çalışmaya alınan toplam 157 örneğin 35 (% 22,3)’i touchdown PZR ile ve 102 (% 64,9)’ si n-PZR ile olmak üzere 137 (% 87,3)’sinde DHPS geni çoğaltılabildi. RFLP sonucunda 135 örnekte herhangi bir mutasyon saptanmazken (vahşi suş); hastane kökenli iki (% 1,5) örnekte vahşi suş ve 57. kodon mutasyonun birlikte olduğu miks enfeksiyon (vahşi suş +mut 57) saptandı (şekil 2). Bu iki örnek için de enzim kesimi ancak n-PZR sonrası yapılabilirdi. mtLSU-rRNA gen profillerine bakıldığında birinin miks (genotip 1/2/3) diğerinin de genotype 2 olduğu görüldü. Bu iki izolatın elde edildiği hastaların profilaksi veya tedavi amacıyla sulfonamid aldığına dair bir bilgiye ulaşılamadı. Saptanan DHPS genotiplerinin BAL ve akciğer doku örneklerine göre dağılımları Tablo 7’de verilmiştir.

5 . TARTIŞMA

P. jirovecii kültürde üretilmediği için etkenin solunum sistemi örneklerinde mikroskopik olarak saptanması enfeksiyonun tanısında altın standarttır (3). Fakat immünbaskılanmış hastalardaki (AIDS dışı) PCP’de parazit yükünün genelde düşük olması mikroskopik tanının duyarlılığını azaltmaktadır (6,13). Günümüzde bu sorun PZR bazlı metodların kullanılmasıyla önemli derecede aşılmış görünmektedir (4,27). Ancak klinik örneklerde *P. jirovecii*’nin veya DNA’sının saptanması mutlaka enfeksiyon anlamına gelmemekte, klinik semptom vermeyen kişilerde organizmanın veya DNA’sının tespit edilmesi kolonizasyon olarak tanımlanmaktadır (13,28). Bu yüzden mikroskopisi negatif, PZR pozitif olan hastalarda enfeksiyonun tanısı ve tedavisi için klinik değerlendirme son derece önemlidir.

P. jirovecii’nin laboratuvar tanısında moleküler yöntemler oldukça önemlidir (97,98). Konvansiyonel PZR yöntemleri, başta mikroskobinin duyarlılık sorununu iyileştirmek için kullanılmış olsa da günümüzde daha çok genotiplendirme gibi epidemiyolojik çalışmalar için tercih edilmektedir (37,67,90,99). Rutin tanıda ise daha çok rt-PZR yöntemi gibi daha gelişmiş yöntemlerin kullanımı önerilmektedir. Kantitasyon imkanı sunması nedeniyle kolonizasyon/enfeksiyon ayırımında fikir veriyor olması yöntemin en önemli üstünlüğüdür (96,100,101). Uygulanması kolay ve hızlı bir yöntem olması yanı sıra kapalı sistemler olması nedeniyle dışarıdan kontaminasyon riskini de en aza indiriyor olması yöntemin diğer avantajları olarak sayılmaktadır (43,96,100,102–105). Tüm bu nedenlerle çalışmamızda pozitif hastaların saptanması ve etken yükünü göstermek için rt-PZR yöntemini, genotiplendirmede kullanılacak amplikonların eldesi için de konvansiyonel n-PZR yöntemlerini tercih ettik. Bununla birlikte çalışmamızın en önemli kısıtlılığı n-PZR yönteminin, 2014 sonrası rutine gelen BAL örnekleri için sadece rt-PZR’ da pozitif saptanan örneklerle uygulanabilmesiydi. Bu nedenle yöntemler için özgüllük ve duyarlılık hesaplaması yapmaktan çok oransal olarak karşılaştırma yapmanın daha uygun olacağı düşüncesindeyiz.

Kullandığımız FTD-*P.jirovecii* rt-PZR kiti iyi laboratuvar uygulamaları kılavuzuna uygun bir in-vitro diagnostik test konumundadır (106). Kit içeriğinde standart bir DNA bulunmadığından gerçek bir kantifikasyon yapma şansı bulunmamaktadır. Ancak üretici firmanın kantifikasyon formülasyonu üzerinden hedef bölge kopya sayısı hesaplanarak göreceli bir kantifikasyon imkanı sağlanmıştır. Çalışmamız FTD-*P. jirovecii* rt-PZR yönteminin $6,9 \times 10^1$ kopya/ml gibi düşük yoğunluktaki örneklerde bile *P. jirovecii*'yi saptayabildiğini göstermiştir. Bununla birlikte konvansiyonel n-PZR yönteminin real-time pozitif olguların sadece % 93,1'inde pozitif sonuç verdiği görülmüştür. n-PZR ile saptanamayan altı örneğin rt-PZR'daki C_T değerlerinin ortalaması (C_T ort = 36,7) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulundu. Bu durum konvansiyonel n-PZR yönteminin; çok düşük yoğunluktaki etken varlığında negatif sonuç verebildiğini göstermektedir. Diğer taraftan önceden yine konvansiyonel n-PZR yöntemiyle *P. jirovecii* pozitifliği saptanmış toplam 69 BAL ve otopsi doku örneğinin yedisinde bu çalışmada herhangi bir pozitiflik elde edilemedi. Bu da, daha önceki proje çalışmaları kapsamında yapılan dondurma-çözme gibi prosedürlerin bazı DNA örneklerinde degradasyona yol açmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Şimdiye kadar yapılan rt-PZR çalışmalarında genellikle PCP/kolonizasyon olguları veya HIV-pozitif/HIV-dışı immünosupresif gruplar arasında karşılaştırmalı değerlendirmeler yapıldığı görülmektedir (96,101,104,107). Bu çalışmalarda PCP hastalarının kolonize vakalara göre, HIV pozitif hastalarının da HIV-dışı immünosupresif gruplara göre daha yüksek miktarda etken yükü tespit edildiği bildirmektedir (98,100,103,107). Biz de çalışmamızda kolonize ve PCP olarak değerlendirdiğimiz hastaları gerek genotip çeşitliliği gerekse parazit yükü açısından karşılaştırdık. Dahası *P. jirovecii* yükü özelinde diğer çalışmalardan farklı olarak kolonize /PCP hastalarında genotip bazlı karşılaştırma yapma imkanı bulduk Diğer çalışmalara paralel olarak çalışmamızda da PCP hastalarındaki *P. jirovecii* yük kolonize hastalardakine oranla daha yüksek bulundu. Ancak bu farklılık sadece genotip 2 özelinde istatistiksel olarak anlamlıydı. Diğer taraftan her iki grup hasta arasında genotip dağılımı açısından anlamlı bir farklılık bulunamadı. Bu durum

genotiplerin arasında hastalık oluşturma potansiyelleri açısından bir üstünlük olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak bu çalışma kapsamında hastaların prognozları hakkında çok sağlıklı veriler elde edememiş olduğumuzdan virulans/prognoz yönünden bir değerlendirmenin bu aşamada çok sağlıklı olmayacağı düşüncesindeyiz.

5.1. mtLSU-rRNA Gen Sekans Verilerinin Tartışılması

P. jirovecii hakkındaki biyolojik, ekolojik ve epidemiyolojik bilgiler güvenilir bir in vitro kültürasyon yapılamadığından dolayı son derece eksiktir. Bu nedenle popülasyon çeşitliliği, bulaş dinamikleri ve ilaç direnci gibi konuların anlaşılmasında son 20 yıldır en çok kullanılan yöntem çevresel ve klinik örneklerden elde edilen izolatların genotip analizinin yapılmasıdır (2,40,67,108). *P. jirovecii* genotipik tiplendirmede mtLSU-rRNA, mtSSU-rRNA, DHPS, ITS, TS, CYB, SOD gibi birçok gen bölgesi tekli veya çoklu olarak kullanılmıştır (2,66,76,109–111). Bunlar içinde temel metabolik fonksiyonlarla ilişkili bulunan mtLSU-rRNA geni oldukça korunmuş bir yapıya sahip olduğundan genetik varyasyonların belirlenmesinde sıklıkla tercih edilmektedir. Dahası her bir organizmada aynı haplotipte birçok mitokondri bulunmasından dolayı tek kopyalı genlere göre daha kolay çoğaltılabilmektedir (2,90,92). Tüm bu nedenlerden dolayı biz de çalışmamızda bu gen bölgesi ile çalışmayı tercih ettik.

mtLSU-rRNA gen bölgesinin sekans analizi sonucunda 85. ve 248. bazlardaki polimorfizme göre: 85C/248C genotip 1; 85A/248C genotip 2; 85T/248C genotip 3; 85C/248T genotip 4 ve 85A/248T genotip 5 olarak tanımlanmış bunların birlikte saptandığı örnekler miks enfeksiyon olarak değerlendirilmiştir (66,77,90). *P. jirovecii* mtLSU-rRNA geninin kullanıldığı genotipleme çalışmalarında genotip 1, 2 ve 3 ön plana çıkarken miks enfeksiyonların daha az saptandığı gözlenmektedir. Birbirinden farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda farklı genotip sıklıklarının gözlenmesi, dağılımın coğrafik ve iklimsel epidemiyolojik faktörlerden etkilenebildiğini göstermektedir. Esteves ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Portekizli hastalarda % 49 ve İspanyol hastalarda % 64 ile genotip 1'i ilk sırada

saptarken, de Armas ve arkadaşları PCP li hastaların akciğer otopsi dokularını inceledikleri çalışmalarında İspanyol hastalarda yine genotip 1'i % 53,1 ile ilk sırada saptamışlardır (90,112). Aynı çalışmada Fransız hastalarda genotip 2, % 50 ile ve Kübalı hastalarda genotip 3, % 81,3 ile en sık saptanan *P. jirovecii* genotipleri olarak rapor edilmiştir. İtalya'da yapılmış bir çalışmada ise Dimonte ve arkadaşları, HIV pozitif hastalarda genotip 2'yi % 36,4 ile ilk sırada saptamışlardır (67). Araştırmacılar aynı çalışmada HIV negatif immün baskılanmış grupta ise genotip 1 (% 50)'i daha sık gözlemişlerdir (67). Başka bir çalışmada Monroy-Vaca ve arkadaşları boğmaca hastalığı olan Kübalı bebeklerde saptadıkları *P. jirovecii* izolatlarını sırasıyla genotip 2 (% 48), genotip 1 (% 23) ve genotip 3 (% 19) olarak saptamışlardır (99).

Ülkemizde *P. jirovecii* üzerine yapılan moleküler çalışmaların daha çok yöntemlerin tanısal etkinliğini değerlendirmek veya etkenin bölgesel prevalanslarını belirlemek için yapıldığı görülmektedir (32,85,102,113–115). Bu çalışmalarda mtLSU-rRNA, ITS veya major surface glikoprotein geni gibi farklı bölgeler n-PZR yöntemleriyle çoğaltılmış ve hastalarda % 8-70 arasında *P. jirovecii* pozitiflikleri saptanmıştır (32,86,113,116). *P. jirovecii* genotiplendirmesiyle ilgili olarak Türkiye'de daha önce yapılmış sadece iki çalışma bulunmaktadır (117). Süreç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 31 klinik izolatta mtLSU-rRNA (mt26S), SOD ve CYB lokuslarındaki genetik çeşitlilik araştırılmıştır (117). Süreç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada en yaygın genotipler genotip 2 (n: 11; % 37,9) genotip 3 (n: 11; % 37,9), genotip 1 (n: 5; % 17,2) ve genotip 4 (n: 2; % 6,9) şeklinde gösterilmiştir. Yine Gülbudak ve arkadaşları, Mersin'de yaptıkları çalışmada ancak 16 izolatin genotipik analizini yapabilmışler ve sırasıyla genotip 2 (n: 7; % 43,75) genotip 1 (n: 6; % 37,5), genotip 3 (n: 3; % 18,75) mtLSU-rRNA profillerini saptamışlardır (118). Bizim çalışmamızda ise iki farklı popülasyondan elde edilen *P. jirovecii* izolatları incelendi. PCP şüphesi ile bronkoskopi yapılan ve daha çok immünsupresyon hastaların oluşturduğu hastane kaynaklı olgulardan ve farklı sebeplerle ölümleri gerçekleşen çoğu immün sağlam adli otopsi vakalarından elde edilen 138 *P. jirovecii*

izolatında mtLSU-rRNA ve DHPS gen varyasyonları gösterildi. Bu nedenle ülkemizde yapılan en kapsamlı genotipik çalışma olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda, mtLSU-rRNA geninin 85. ve 248. nükleotid polimorfizmine göre daha önce tanımlanmış olan beş genotipin de toplumumuzda farklı oranlarda bulunduğu saptandı. Hem hastane kökenli hem de toplum kökenli olgularda en sık gözlenen tekli genotip; genotip 2 (% 58) idi. Bu oran hematolojik maligniteler ve solid organ tümörleri gibi alt gruplarda sırasıyla % 67 ve % 81 gibi çok daha yüksek seviyelerde bulundu (Tablo 8). Dahası solid organ tümörlerindeki genotip 2 fazlalığı istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p<0.05$). Tüm olgular birlikte değerlendirildiğinde genotip 2' den sonra en sık saptanan genotiplerin sırasıyla genotip 3 (% 13), genotip 1 (% 11,6) ve genotip 4; (% 5,1) olduğu görüldü. Bu sonuçlar daha önce yine bölgemizde yapılmış olan diğer çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermekle birlikte biz genotip 2 oranını çok daha yüksek bulduk. Sürgeç ve arkadaşlarının çalışmalarında en sık saptanan genotipler sırasıyla genotip 2 (n:11; % 37,9) ve genotip 3 (n:11; % 37), genotip 1 (n:5; % 17,2) ve genotip 4 (n:2; % 6,9) olarak bulunmuştu. Gülbudak ve arkadaşlarının çalışmalarında ise yine en sık genotip 2 saptanmış olmakla birlikte ikinci sıklıkta genotip 1 ve üçüncü sıklıkta genotip 3 polimorfizmi göze çarpmaktadır. Her ne kadar bizim çalışmamızda otopsi örneklerinden elde edilen izolatlarda hastane kökenli izolatlardan farklı olarak genotip 1 ikinci sıklıkta saptanmış olsa da biz tüm olguları birlikte değerlendirerek bir sıralama yapmayı uygun bulduk. Çünkü diğer iki çalışmada olduğu gibi genotip 3 ve genotip 1 izolat sayılarının olgu kökenlerine göre değerlendirilmesi için yeterli çoklukta olmadığı düşüncesindeyiz.

Çalışmada yer alan adli otopsi olgularının biri haricinde tümü immün sağlam kişilerden oluştuğundan toplumun immün sağlam bir kesimini temsil ettiği söylenebilir. Hastane kökenli olguların % 87 (82 / 94)'si ise altta yatan hastalıklar veya aldığı İmmunomodulator / supresif tedaviler nedeniyle immün baskılanmış hastalardı. Hastaların immün durumu PCP enfeksiyonunun gelişiminde önemli görünse de hastanın immün durumunun genotip dağılımını etkilemediği görüldü. Diğer taraftan infant olgular dışında yaş ve cinsiyet gibi demografik verilerle

genotipik varyasyonların ilişkisi tespit edilemedi. İnfant otopsi örneklerindeki genotip 2 varlığı erişkin otopsi örneklerindeki göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) görünse de bu birlikteliğin değerlendirilmesi için daha fazla *P. jirovecii* pozitif infantın değerlendirilmesine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda adli otopsilerin yapıldığı merkez İzmir olmasına rağmen Manisa ve Aydın gibi komşu bölgelerden otopsi için gönderilen olgular da incelendi. İzmir’de yaşayan olgularda baskın genotip, genotip 2 olarak saptanırken Manisa bölgesinden gelen vakalarda genotip 3; Aydın’dan gönderilenlerde ise genotip 1 fazlalığı görüldü. Her ne kadar vaka sayıları az olsa da bu farklılık Ege bölgesi içindeki coğrafik değişkenliği yansıtır olabilir.

Şimdiye kadar yapılmış birçok genotiplendirme çalışmasında, kullanılan lokus ve yöntemle göre değişmekle birlikte % 0-92 oranında miks enfeksiyon varlığı bildirilmiştir (2). Yeni nesil sekanslama ve high-resolution gel electrophoresis gibi yöntemlerin miks enfeksiyonları saptamada daha spesifik olduğu; Sanger sekanslama yönteminin ise azınlıkta olan genotiplerin %10-20 arası olması halinde çok başarılı olmadığı bildirilmiştir (2,119). Çalışmamızda, mtLSU-rRNA geni özelinde değerlendirdiğimizde % 11,6 oranında ikili veya üçlü miks enfeksiyonlar saptandı. Ancak Sanger sekanslama yöntemini kullandığımız için gerçekte bu oran çok daha fazla olabilir. İlginç bir şekilde miks enfeksiyonlar çoğunlukla hastane kökenli olgularda (14 / 16) saptanırken otopsi örneklerinin sadece ikisinde pozitiflik vardı. Çalışmamızda altta yatan akciğer hastalığının miks enfeksiyonlar (3 / 8) için risk faktörü olabileceği gösterilmiş olsa da bahsedilen durum, hastaların yaş ve cinsiyet özellikleriyle veya immün durumlarıyla ilişkilendirilemedi. Miks enfeksiyon saptanan hastaların hastanede kalış süreleri ile ilgili bir değerlendirme yapamadık. Ancak yine de hospitalizasyonun miks enfeksiyonların oluşmasında önemli olabileceğini düşünüyoruz.

5.2. DHPS Gen Profiline Yönelik Verilerin Tartışılması

PCP tedavisi ve profilaksisinde ilk seçenek olarak TMP-SMZ veya Fansidar (Primetamin-sülfadoksin) gibi sülfon kombinasyonlu ilaçlar kullanılmaktadır. Bu

ilaçlar etkilerini folat biyosentezindeki DHPS ve DHFR enzim inhibisyonları üzerinden gösterirler. Deney hayvanı modelleri, *P. jirovecii* üzerine olan ilaç etkinliğinin daha çok sülfometaksazolün DHPS üzerine etkisinden kaynaklandığını göstermiştir. *P. jirovecii* izolatlarının kültürü yapılamadığından, ilaç direnci çalışmaları genellikle bu enzimleri kodlayan genlerin moleküler incelenmesi ve mutasyonların ortaya konması şeklindedir (75,76). *P. jirovecii* kolonizasyonu bulunan ve farklı nedenlerle kotrimaksazol kullanan kişilerde ilaç direncinin gelişebileceği ve bu izolatların o kişide veya diğer duyarlı bireylerde PCP gelişmesi halinde tedavi direncine yol açabilecekleri bilinmektedir (76). Yapılan çalışmalar DHPS genindeki 165. ve 171. pozisyonadaki nükleotid mutasyonlarının, enzimi kodlayan 55. ve 57. aminoasit kodonlarını etkilediğini ortaya koymuştur. Normalde 55. kodona karşılık gelen threonin yerine alanin geçmesi ve 57. kodona karşılık gelen prolin yerine serin aminoasitinin yer alması sonucu sülfamida grubuna dirençli mutant şuşların oluştuğu saptanmıştır (76,120).

Çalışmamızda incelediğimiz örneklerin hiçbirinde 55. kodon mutasyonu saptanmazken, sadece iki (% 1,5) izolatda 57. kodon mutasyonu ve vahşi tip birlikteliği saptandı. Daha az sayıda örneği incelediğimiz önceki çalışmamızda ise herhangi bir mutasyona rastlayamadık (114). Diğer taraftan ülkemizde yapılmış olan diğer bir çalışmada ise Gülbudak ve arkadaşları, inceledikleri 16 örneğin dördünde (% 25) 55. kodon mutasyonu saptadıklarını bildirmişlerdir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar, toplumumuzdaki DHPS gen çeşitliliğinin, Türkiye ile benzer coğrafik ve iklimsel koşullara sahip İspanya, İtalya, Portekiz, Fransa, Tunus ve İran gibi ülkelerdekine oranla düşük olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda bu ülkelerdeki DHPS mutasyon oranları % 8,4 – 35,5 arasında rapor edilmiştir (37,67,92,94,95,112,121,122).

DHPS genindeki ilgili bölgenin PZR ile çoğaltılması ve sonrasında elde edilen amplikonun RFLP yöntemiyle incelenmesi *P. jirovecii* 55. ve 57. kodon mutasyonlarının gösterilmesinde basit, hızlı ve etkin bir teknik olarak

gösterilmektedir (67,92,94,123). Ayrıca bu yöntemin miks enfeksiyonların tanımlanmasında direkt sekanslamaya göre daha başarılı bulunduğu da bildirilmiştir (124). Biz de bu nedenle pozitif örneklerin mutasyon analizinde PZR-RFLP yöntemini kullandık. Ancak elde ettiğimiz sonuçlarla bu yöntemin sensitivitesini ve spesifitesini etkileyen başlıca iki faktörün olduğunu söyleyebiliriz. Birinci faktör olarak enzim kesimi öncesi uygulanan amplifikasyon metodu gösterilebilir. Sadece touchdown-PZR kullandığımız önceki çalışmada DHPS genini % 41 duyarlılıkla çoğaltabilmiştik. Yine bu çalışmamızda touchdown-PZR ile % 22,3 oranında pozitiflik sağlarken; DHPS-NF ve DHPS-NR primerlerini içeren nested-PZR yöntemi ile amplifikasyon duyarlılığını % 87,3'e çıkarmayı başardık. Dahası saptadığımız iki mutant genotipi de ancak n-PZR sonrasında belirleyebildik. Benzer şekilde Tyagi ve arkadaşları, touchdown-PZR sonrası aynı primerleri kullandıkları n-PZR ile 16 örneğin tümünde başarı sağladıklarını rapor etmişlerdir (82). Costa ve arkadaşları da yine aynı metodla duyarlılığı % 12,5'den % 77,5'e yükseltmişlerdir (93). Bu nedenle özellikle düşük parazit yükünün olduğu HIV dışı PCP vakaları ve kolonizasyon olgularındaki DHPS gen mutasyonlarının tanımlanmasında bu yöntemin daha etkili olacağı düşüncesindeyiz.

İkinci faktör olarak da RFLP işleminde kullanılan enzim miktarının sonuçların spesifitesinde oldukça önemli olduğunu düşünüyoruz. Optimum kesim şartlarında amplifikasyon ürününde hiç enzim kesiminin saptanamaması gerçekten mutant bir izolatın saptandığı olarak yorumlanabilir. Ancak amplifikasyon ürününün çok yoğun olduğu durumlarda kesim profili yanı sıra kesilmeyen ürünün beraber saptandığı ve miks enfeksiyon olarak yorumlanabilecek bir durum da gözlenebilir. Daha önceki çalışmamızda enzim miktarını artırarak kesilmeyen ve mutasyon nedeniyle oluştuğunu düşündüğümüz bu kesim profilinin ortadan kalktığını gözlemlemiştik. Bu yüzden bu çalışmamızda RFLP sonrası üçlü bant profili gözlemlediğimiz örnekleri dilüsyonlar halinde çalışarak DNA yoğunluğunu azaltma yoluna gittik. Her durumda ve dilüsyonda da aynı profili gözlemlediğimiz sadece iki örneğin gerçekten vahşi ve mutant izolatın beraber olduğu miks enfeksiyon olarak değerlendirdik.

DHPS gen mutasyonlarının dağılımında coğrafik özellikler yanısıra sülfonamid kullanım alışkanlıkları gibi faktörlerin de etkili olduğu rapor edilmiştir (75,76). Gelişmiş olan ülkelerde profilaksi ve tedavi uygulamalarının daha sağlıklı olması ve ilaca ulaşımındaki kolaylıklar, bu ülkelerde saptanan mutasyon sıklıklarının daha yüksek olmasının nedenleri olarak gösterilmektedir (76). Gerçekten de Amerika gibi gelişmiş ülkelerde % 81'e ulaşan DHPS mutasyonları bildirilirken; gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkeler arasında sayılan Brezilya'da % 0, Güney Afrika'da % 3,8 Hindistan'da % 0-6, Çin'de % 0-7, Zimbabve'de % 7,1 gibi düşük oranlar rapor edilmiştir (77,78,80-83,125). Güney Afrika'da 2010 yılında yapılan başka bir çalışmada ise mutasyonların % 56'ya yükselmiş olması, ülkede son yıllarda gözlenen HIV prevalansındaki ve buna bağlı TMP-SMZ profilaksi uygulamalarındaki artışa bağlanmıştır (126). Kazanjian ve arkadaşları sulfa dozundan bağımsız olarak bir yıl ve üzerinde profilaksi uygulanması ile mutasyon oluşumu arasında istatistiksel bir bağlantı olduğunu; mutant suşların kısa süreli profilaksilerde oluşamayabileceğini belirtmişlerdir (79). Diğer taraftan herhangi bir sulfa grubu ilaç almamış olmasına rağmen dirençli suşların saptandığı çalışmalar da mevcuttur. Jarboui ve arkadaşları daha önceden herhangi bir profilaksi almamış olan iki AIDS hastasında mutant suşlar saptadıklarını bildirmişlerdir (94). Valerio ve arkadaşları ise PCP gelişmiş hastalardan izole ettikleri ve mutasyon saptadıkları *P. jirovecii* suşlarının %71,4'ünde önceden herhangi bir sülfä profilaksisi alınmadığını rapor etmişlerdir (121). Totet ve arkadaşları ise yeni doğan bebeklerde mutant suşların saptanabildiğini göstermişlerdir (124). Tüm bu bulgular profilaksi kullanmamış hastalarda spontan mutasyonların gelişebileceğini ekarte ettirmemekle birlikte daha büyük olasılıkla mutant suşların insanlar arasında geçiş yapabileceği şeklinde yorumlanmaktadır. Nahimana ve arkadaşları, hospitalizasyonun bu geçişte büyük bir risk faktörü olduğunu belirtmiştir (127).

Bizim de bu çalışmamızdaki diğer bir amacımız; saptanacak olası DHPS gen mutasyonlarının oluşumunda ilaç selektif baskılamasının olup olmadığının ortaya konmasıydı. DHPS gen mutasyonlarının bildirildiği ülkemizdeki diğer çalışmada 55. kodon mutasyonu bildirilen dört hastadan üçünün daha önceden kısa sürelerle de olsa

TMP-SMX tedavileri veya profilaksileri aldığı bir HIV hastasının ise uzun süreli profilaktik tedavi aldığı bildirilmişti. Ancak çalışmamızda sadece iki izolatta 55. kodon mutasyonu tespit edebildik. Bu hastaların ise daha önce PCP veya başka bir hastalık nedeniyle tedavi ve/veya profilaksiye yönelik sülfonamid aldıklarına yönelik bir bilgiye ulaşamadık.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak daha önce küçük klinik örnek gruplarında gösterilmiş olan mtLU-rRNA genetik çeşitliliği bu çalışmada bir kez daha ortaya kondu. Buna ek olarak ülkemizde ilk kez toplum kökenli örneklerde de bu genetik varyasyonların varlığı saptandı. Yaş, cinsiyet ve immün durum gibi faktörlerin genotip dağılımında çok etkili olmadığı anlaşılrken altta yatan akciğer hastalıklarının ve hospitalizasyonun miks enfeksiyonların oluşumunda kolaylaştırıcı bir faktör olabileceği gösterildi. Bununla birlikte genotip farklılığının PCP hastalığının oluşumunda belirleyici bir faktör olmadığına dair önemli veriler elde edilmiş oldu. Diğer taraftan ilaç direnci ile ilişkilendirilmiş olan DHPS gen mutasyonlarının, toplumumuzda düşük prevalansta da olsa bulunabildiği, yine bu çalışmada gösterilmiş oldu. Saptanan genotiplerin ve mutasyonların hastalığın şiddeti ve prognozu üzerine etkilerini değerlendirmek için PCP tanısı almış hastalar üzerinde ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmada kullanılan rt-PZR yönteminin optimizasyonu ve rutin olarak uygulanabilirliğinin sağlanması hastaların tanısındaki sensitivite ve spesifiteyi artırmanın yanı sıra; etken kantitasyonu sağlaması nedeniyle kolonizasyon-enfeksiyon ayırımında klinisyene yol gösterici olacaktır.

Son olarak sulfonamid grubu ilaçlara (sulfametaksazol, sulfadoksin, dapson) dirençli olan veya olmayan *P. jirovecii* izolatlarının insanlar arasındaki dağılımının belirlenmesi ve risk grubunda bulunan hastaların tedavi ve profilaksi yönetimini kolaylaştırması açısından önemlidir. Bu amaçla DHPS nokta mutasyonlarının yeni nesil sekanslama gibi daha etkin metodlarla araştırılması başarı şansını artıracaktır. Diğer taraftan yine özel problemlerin kullanıldığı ileri rt-PZR uygulamalarıyla bu mutasyonların saptanmasına yönelik ileri projeler tasarlanabilir. DHPS mutasyonlarının bu şekilde amplifikasyon ile eş zamanlı gösterilmesi gerek maliyet gerek de hız açısından laboratuvar hekiminin ve klinisyenin elini oldukça güçlendirecektir.

Projeden elde ettiğimiz birikimlerin, Avrupa Birliği Çerçeve Programlarına dahil olabilme olasılığımızı arttırıp, verilerimizi uluslararası platforma taşıma olanağı

sağlayabilir. Ayrıca elde edilen verilerin “Hastane Enfeksiyonları Kontrol Komitesi” ile paylaşılması, *P. jirovecii* enfeksiyonlarının (hastane kökenli) bulaş ve yayılımının önlenmesi konusunda yapılacak çalışmalara yol gösterici olacağını ve hastaların hastanede kalım süresini ve prognozlarını etkileyeceğini düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Gigliotti F, Limper AH, Wright T. Pneumocystis. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2014 Dec 1;4(12):a019828–a019828. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019828>
2. Ma L, Cissé OH, Kovacs JA. A Molecular Window into the Biology and Epidemiology of Pneumocystis spp. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2018;31(3). Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00000-18>
3. Krajicek BJ, Limper AH, Thomas CJ. Advances in the biology, pathogenesis and identification of Pneumocystis pneumonia. Curr Opin Pulm Med. 2008;14(3):228–34.
4. Lu JJ, Lee CH. Pneumocystis pneumonia. Vol. 107, Journal of the Formosan Medical Association. Scientific Communications International Ltd; 2008. p. 830–42.
5. Bollée G, de Miranda S, Azoulay E. Pneumocystis Pneumonia in Non-AIDS Immunocompromised Patients. In: Intensive Care Medicine Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, vol 2007. 2007. p. 157–70.
6. Tasaka S, Tokuda H. Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. J Infect Chemother [Internet]. 2012;18(6):793–806. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X12702039>
7. Enomoto T, Azuma A, Kohno A, Kaneko K, Saito H, Kametaka M, et al. Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromized patients with and without HIV infection. Respiriology. 2010;15(1):126–31.
8. 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.
9. Despommier DD, Gwadz RW, Hotez PJ. Pneumocystis carinii (Delanoe and Delanoe 1912). In: Parasitic Diseases Springer, New York, NY . Springer, New York, NY; 1995. p. 219–23.
10. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A New Name (Pneumocystis jiroveci) for Pneumocystis from Humans. Vol. 8, Emerging Infectious Diseases •. 2002.
11. Vera C, Rueda ZV. Transmission and colonization of pneumocystis jirovecii. Vol. 7, Journal of Fungi. MDPI; 2021.
12. Aliouat-Denis C-M, Martinez A, Aliouat EM, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. The Pneumocystis life cycle. Vol. 104, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2009.

13. Morris A, Norris KA. Colonization by pneumocystis jirovecii and its role in disease. Vol. 25, Clinical Microbiology Reviews. 2012. p. 297–317.
14. Gigliotti F, Limper AH, Wright T. Pneumocystis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4(12).
15. 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. Vol. 11, FEMS Yeast Research. 2011. p. 2–17.
16. Taxonomy - Pneumocystis jirovecii (species) [Internet]. UniProt. [cited 2022 Jul 11]. Available from: <https://www.uniprot.org/taxonomy/42068>
17. Skalski JH, Kottom TJ, Limper AH. Pathobiology of Pneumocystis pneumonia: Life cycle, cell wall and cell signal transduction. Vol. 15, FEMS Yeast Research. Oxford University Press; 2015.
18. Tlamçani Z, Er-Rami M. Pneumocystis jiroveci: Epidemiology and diagnosis [Internet]. Vol. 3, Afro-Egypt J Infect Endem Dis. 2013. Available from: www.mis.zu.edu.eg/ajied/home.aspx
19. Carmona EM, Limper AH. Update on the diagnosis and treatment of Pneumocystis pneumonia. Vol. 5, Therapeutic Advances in Respiratory Disease. 2011. p. 41–59.
20. Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of Pneumocystis pneumonia. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2007 Apr;5(4):298–308. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1621>
21. Cushion MT. Are Members of the Fungal Genus Pneumocystis (a) Commensals; (b) Opportunists; (c) Pathogens; or (d) All of the Above? Madhani HD, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2010 Sep 23;6(9):e1001009. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1001009>
22. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. Pneumocystis jirovecii in General Population. Emerg Infect Dis [Internet]. 2005 Feb;11(2):245–50. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/2/04-0487_article.htm
23. Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juarez G. Pregnancy and Asymptomatic Carriage of Pneumocystis jiroveci. Emerg Infect Dis [Internet]. 2003 May;9(5):605–6. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/9/5/02-0660_article.htm
24. Maskell NA. Asymptomatic carriage of Pneumocystis jiroveci in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. Thorax [Internet]. 2003 Jul 1;58(7):594–7. Available from: <https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thorax.58.7.594>
25. Nevez G, Magois E, Duwat H, Gouilleux V, Jounieaux V, Totet A. Apparent Absence of Pneumocystis jirovecii in Healthy Subjects. Clin Infect Dis [Internet]. 2006 Jun 1;42(11):e99–101. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/503908>

26. Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. Pneumocystis Colonization Is Highly Prevalent in the Autopsied Lungs of the General Population. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 Feb;50(3):347–53. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/649868>
27. 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 Sep 4;8(9).
28. Fritzsche C, Riebold D, Munk-Hartig A, Klammt S, Neeck G, Reisinger E. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among patients with autoimmune inflammatory diseases and corticosteroid therapy. *Scand J Rheumatol*. 2012;41(3):208–13.
29. Cooley L, Dendle C, Wolf J, Teh BW, Chen SC, Boutlis C, et al. Consensus guidelines for diagnosis, prophylaxis and management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014. *Intern Med J* [Internet]. 2014 Dec;44(12b):1350–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imj.12599>
30. Schmoldt S, Schuëgger R, Wendler T, Huber I, Söllner H, Hogardt M, et al. Molecular Evidence of Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* Transmission among 16 Patients after Kidney Transplantation. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2008 Mar;46(3):966–71. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02016-07>
31. Yazaki H, Goto N, Uchida K, Kobayashi T, Gatanaga H, Oka S. Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Renal Transplant Recipients: *P. jirovecii* Is Contagious to the Susceptible Host. *Transplantation* [Internet]. 2009 Aug 15;88(3):380–5. Available from: <https://journals.lww.com/00007890-200908150-00015>
32. Özkoç S, Bayram Delibaş S. İyatrojenik İmmünoşüpresif ve İmmünokompetan Hastalarda *Pneumocystis jirovecii* Pnömonisi ve Kolonizasyonunun Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2015 Apr 1;49(2):221–30.
33. Miller RF, Ambrose HE, Novelli V, Wakefield AE. Probable Mother-to-Infant Transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* Infection. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2002 Apr;40(4):1555–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.40.4.1555-1557.2002>
34. Vargas SL, Ponce CA, Gallo M, Pérez F, Astorga J-F, Bustamante R, et al. Near-Universal Prevalence of *Pneumocystis* and Associated Increase in Mucus in the Lungs of Infants With Sudden Unexpected Death. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2013 Jan 15;56(2):171–9. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis870>
35. 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* [Internet]. 1995 Aug 1;172(2):595–8. Available

from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/172.2.595>

36. Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic Diversity at the Internal Transcribed Spacer Regions of the rRNA Operon among Isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS Patients with Recurrent Pneumonia. *J Infect Dis* [Internet]. 1996 Jul 1;174(1):141–56. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/174.1.141>
37. Friaza V, Morilla R, Respaldiza N, de la Horra C, Calderón E. *Pneumocystis jirovecii* Dihydropteroate Synthase Gene Mutations among Colonized Individuals and *Pneumocystis* Pneumonia Patients from Spain. *Postgrad Med*. 2010;122(6):24–8.
38. Mekinian A, Durand-Joly I, Hatron P-Y, Moranne O, Denis G, Dei-Cas E, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology* [Internet]. 2011 Mar 1;50(3):569–77. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/keq314>
39. Salzer HJF, Schäfer G, Hoenigl M, Günther G, Hoffmann C, Kalsdorf B, et al. Clinical, Diagnostic, and Treatment Disparities between HIV-Infected and Non-HIV-Infected Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. Vol. 96, *Respiration*. S. Karger AG; 2018. p. 52–65.
40. Alanio A, Bretagne S. *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: What does its natural history tell us? Vol. 6, *F1000Research*. Faculty of 1000 Ltd; 2017.
41. Truong J, Ashurst J V. *Pneumocystis Jirovecii* Pneumonia [Internet]. *StatPearls*. [cited 2022 Jul 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482370/>
42. Panos GZ, Karydis I, Velakoulis SE, Falagas ME. Multi-skeletal *Pneumocystis jirovecii* (carinii) in an HIV-seropositive patient. *Int J STD AIDS*. 2007 Feb;18(2):134–7.
43. Fishman JA. *Pneumocystis jirovecii*. Vol. 41, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. Thieme Medical Publishers, Inc.; 2020. p. 141–57.
44. Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* Pneumonia. *N Engl J Med* [Internet]. 2004;350(24):2487–98. Available from: www.nejm.org
45. Zelante T, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Bellocchio S, Bonifazi P, et al. Receptors and Pathways in Innate Antifungal Immunity. In: Katsikis PD., Schoenberger SP., Pulendran B, editors. *Crossroads between Innate and Adaptive Immunity*. Springer; 2007. p. 209–2021.
46. Probst M, Ries H, Schmidt-Wieland T, Serr A. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(8):644–5.

47. Manoloff ES, Francioli P, Taffé P, Van Melle G, Bille J, Hauser PM. Risk for *Pneumocystis carinii* Transmission among Patients with Pneumonia: a Molecular Epidemiology Study. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(1):132–4.
48. Wilkin A, Feinberg J. *Pneumocystis carinii* Pneumonia: A Clinical Review. *Am Fam Physician*. 1999;60(6):1699–708.
49. Dahlin JL, Kottom T, Han J, Zhou H, Walters MA, Zhang Z, et al. *Pneumocystis jirovecii* Rtt109, a novel drug target for *Pneumocystis* pneumonia in immunosuppressed humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3650–9.
50. Stern A, Green H, Paul M, Vidal L, Leibovici L. Prophylaxis for *Pneumocystis* pneumonia (PCP) in non-HIV immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;10.
51. Huang L, Cattamanchi A, Davis JL, Den Boon S, Kovacs J, Meshnick S, et al. Hiv-associated *Pneumocystis* pneumonia. In: *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2011. p. 294–300.
52. Block BL, Mehta T, Ortiz GM, Ferris SP, Vu TH, Huang L, et al. Unusual Radiographic Presentation of *Pneumocystis* Pneumonia in a Patient with AIDS . *Case Rep Infect Dis*. 2017;2017:1–6.
53. Govender I, Maphasha OM, Rangiah S, Steyn C. An overview of *pneumocystis jirovecii* pneumonia for the African generalist practitioner. *Afr Health Sci*. 2019 Dec 1;19(4):3200–7.
54. Luísa Tomás A, Matos O. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: Current Advances in Laboratory Diagnosis. *OBM Genet* [Internet]. 2018 Aug 21;2(4):1–1. Available from: <http://www.lidsen.com/journals/genetics/genetics-02-04-049>
55. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ. *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Differences in Lung Parasite Number and Inflammation in Patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1989 Nov 17 [cited 2022 Jul 11];140(5):1204–9. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/140.5.1204>
56. Azar MM, Slotkin R, Abi-Raad R, Liu Y, Grant MH, Malinis MF. Gomori methenamine silver stain on bronchoalveolar lavage fluid is poorly sensitive for diagnosis of *pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-negative immunocompromised patients and may lead to missed or delayed diagnoses. *Arch Pathol Lab Med*. 2020 Aug 1;144(8):1003–10.
57. Elbüken G. *Pneumocystis Jirovecii* Enfeksiyonu ve Akciğer Tutulumu. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg*. 2007;33(2):97–103.
58. Ishimaru T, Shimono N, Sawae Y, Niho Y. Purification of *Pneumocystis carinii* Trophozoites and Identification of Their Circulating Antigens. Vol. 30, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1992.
59. Li WJ, Guo YL, Liu TJ, Wang K, Kong JL. Diagnosis of *pneumocystis*

- pneumonia using serum (1-3)- β -D-Glucan: A bivariate meta-analysis and systematic review. *J Thorac Dis.* 2015;7(12):2214–25.
60. Sax PE, Komarow L, Finkelman MA, Grant PM, Andersen J, Scully E, et al. Blood (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan as a diagnostic test for HIV-related pneumocystis jirovecii pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2011 Jul 15;53(2):197–202.
 61. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2012 Jan;50(1):7–15.
 62. Quist J, Hill AR. Serum Lactate Dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* Pneumonia, Tuberculosis, and Bacterial Pneumonia. *Chest.* 1995;108(2):415–8.
 63. Butt A, Michaelsc S, Kissinger P. The association of serum lactate dehydrogenase level with selected opportunistic infections and HIV progression. *Int J Infec Dis.* 2002;6:178–81.
 64. Wakefield A., Pixley F., Banerji S, Sinclair K, Moxon E., Miller R., et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet [Internet].* 1990 Aug;336(8713):451–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0140673690920086>
 65. Hauser PM, Bille J, Lass-Flörl C, Geltner C, Feldmesser M, Levi M, et al. Multicenter, prospective clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for *Pneumocystis jirovecii* infection by use of a commercial real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2011 May;49(5):1872–8.
 66. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Samantaray JC, Kumar L, et al. Genotypic variation of *Pneumocystis jirovecii* isolates in India based on sequence diversity at mitochondrial large subunit rRNA. *Int J Med Microbiol.* 2011 Mar 1;301(3):267–72.
 67. Dimonte S, Berrilli F, D’Orazi C, D’Alfonso R, Placco F, Bordi E, 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 Mar 1;14(1):68–72.
 68. Alvarez-Martínez MJ, Miró jM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Solé M., et al. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006 Oct;56(2):153–60.
 69. Matos O, Esteves F. Laboratory diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Microbiol Respir Syst Infect Clin Microbiol Diagnosis, Treat Prophyl Infect.* 2016;1:185–210.
 70. Sokulska M, Kicia M, Wesołowska M, Hendrich AB. *Pneumocystis jirovecii*—from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. Vol. 114, *Parasitology Research.* Springer Verlag; 2015. p. 3577–85.

71. Kotani T, Katayama S, Miyazaki Y, Fukuda S, Sato Y, Ohsugi K. Risk Factors for the Mortality of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Non-HIV Patients Who Required Mechanical Ventilation: A Retrospective Case Series Study. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
72. Liu Y, Su L, Jiang S-J, Qu H. Risk factors for mortality from *pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in non-HIV patients: a meta-analysis [Internet]. Vol. 8. 2017. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
73. Avino LJ, Naylor SM, Roecker AM. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in the Non-HIV-Infected Population. *Ann Pharmacother*. 2016 Aug 1;50(8):673–9.
74. Huang YS, Liu CE, Lin SP, Lee CH, Yang CJ, Lin CY, et al. Echinocandins as alternative treatment for HIV-infected patients with *Pneumocystis pneumonia*. *AIDS*. 2019;33(8):1345–51.
75. Huang L, Crothers K, Atzori C, Benfield T, Miller R, Rabodonirina M, et al. Dihydropteroate Synthase Gene Mutations in *Pneumocystis* and Sulfa Resistance. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2004;10(10):1721–8. Available from: www.cdc.gov/eid
76. Matos O, Esteves F. Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite* [Internet]. 2010;17(3):219–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2010173219>
77. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* . 2000;6(3):265–72.
78. Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE. Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* Isolates Obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Dec;47(12):3979–81.
79. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee C-H, et al. *Pneumocystis carinii* Mutations Are Associated with Duration of Sulfa or Sulfone Prophylaxis Exposure in AIDS Patients. *J Infect Dis* [Internet]. 2000;182(2):551–7. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/182/2/551/2191531>
80. Robberts FJL, Chalkley LJ, Weyer K, Goussard P, Liebowitz LD. Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J Clin Microbiol*. 2005 Mar;43(3):1443–4.
81. Li K, He A, Cai WP, Tang XP, Zheng XY, Li ZY, et al. Absence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among samples from a group of AIDS patients in China. *Scand J Infect Dis*. 2009;41(2):152–4.
82. Tyagi AK, Mirdha BR, Luthra K, Guleria R, Mohan A, Singh UB, et al. Dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutation study in HIV-infected Indian

- patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(11):761–6.
83. 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 Dec 1;8(6):1825–30.
 84. Tasaka S. Recent advances in the diagnosis and management of *Pneumocystis* pneumonia. Vol. 83, *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. Korean National Tuberculosis Association; 2020. p. 132–40.
 85. Tekinşen F, Koç N. Klinik Örneklerde Çeşitli Yöntemlerle *Pneumocystis jirovecii* Araştırılması* Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in Clinical Specimens by Different Methods. *Mikrobiyol Bul*. 2013;47(4):658–67.
 86. Özkoç S, Alpaydın AÖ, Delibaş SB, Ergüden C, Akkoçlu A. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in a Patient with Interstitial Lung Disease. *Türkiye Parazitol Derg*. 2015;39(1):66–9.
 87. Özkoç S, Inceboz T, Sifil A, Tuncay S, Akisü Ç. [Pneumocystis pneumonia in a renal transplant recipient]. *Türkiye Parazitol Derg*. 2010;34(4):186–9.
 88. Tia T, Putaporntip C, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S. A highly sensitive novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(6):598–603.
 89. Wakefield AE. VI. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998;22(1–2):59–65.
 90. de Armas Y, Friaza V, Capó V, Durand-Joly I, Govín A, de La Horra C, et al. Low genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* among Cuban population based on two-locus mitochondrial typing. *Med Mycol* [Internet]. 2012 May [cited 2022 Jul 10];50(4):417–20. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.3109/13693786.2011.607474>
 91. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate Synthase Polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* [Internet]. 1997;175:482–5. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/175/2/482/816896>
 92. Montes-Cano MA, De La Horra C, Martín-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* Genotypes in the Spanish Population [Internet]. Vol. 39, *Clinical Infectious Diseases*. 2004. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/39/1/123/315555>
 93. Costa MC, Gaspar J, Mansinho K, Esteves F, Antunes F, Matos O. Detection of *pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms in patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Scand J Infect Dis*. 2005;37(10):766–71.
 94. Jarboui MA, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, Ayadi A.

- Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains isolated from immunocompromised patients. *Pathol Biol* [Internet]. 2011 Aug;59(4):222–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036981141000026X>
95. Calderon E, de la Horra C, Medrano FJ, Lopez-Suarez A, Montes-Cano MA, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(7):545–9.
 96. Maillet M, Maubon D, Brion JP, François P, Molina L, Stahl 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 Mar;33(3):331–6.
 97. Dellièvre S, Gits-Muselli M, Bretagne S, Alanio A. Outbreak-Causing Fungi: *Pneumocystis jirovecii*. *Mycopathologia* [Internet]. 2019 Nov 28; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-019-00408-w>
 98. Doyle L, Vogel S, Procop GW. *Pneumocystis* PCR: It Is Time to Make PCR the Test of Choice. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2017 Oct 1;4(4). Available from: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofx193/4103041>
 99. Monroy-Vaca EX, De Armas Y, Illnait-Zaragozí MT, Toraño G, Diaz R, Vega D, et al. Prevalence and genotype distribution of *pneumocystis jirovecii* in cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol*. 2014 Jan;52(1):45–51.
 100. 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. Warnock DW, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2016 Jun;54(6):1487–95. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.03174-15>
 101. Hoarau G, Le Gal S, Zunic P, Poubeau P, Antok E, Jaubert J, et al. Evaluation of quantitative FTD- *Pneumocystis jirovecii* kit for *Pneumocystis* infection diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017 Nov;89(3):212–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889317302420>
 102. Töz S, Gündüz C, Tetik A, Taşbakan M, Pullukçu H, Bacakoğlu F, et al. The comparison of microscopy and real time polymerase chain reaction methods for the diagnosis of *Pneumocystis Jirovecii* pneumonia: evaluation of clinical parameters. *Tuberk Toraks*. 2017;65(3):220–6.
 103. Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P, et al. Development and Evaluation of a Quantitative, Touch-Down, Real-Time PCR Assay for Diagnosing *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2002 Feb;40(2):490–4. Available from:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.40.2.490-494.2002>

104. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2011 Oct;17(10):1531–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14618735>
105. 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* [Internet]. 2016;92(3):144–9. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/448626>
106. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* [Internet]. 2009 Apr 1;55(4):611–22. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/55/4/611/5631762>
107. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2008 Oct;75(2):258–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701208002364>
108. Parobek CM, Jiang LY, Patel JC, Alvarez-Martínez MJ, Miro JM, Worodria W, et al. Multilocus microsatellite genotyping array for investigation of genetic epidemiology of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1391–9.
109. Hauser PM, Francioli P, Bille J, Telenti A, Blanc DS. Typing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* by Single-Strand Conformation Polymorphism of Four Genomic Regions [Internet]. Vol. 35, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1997. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
110. Maitte C, Leterrier M, Le Pape P, Miegerville M, Morio F. Multilocus sequence typing of *Pneumocystis jirovecii* from clinical samples: How many and which loci should be used? *J Clin Microbiol*. 2013 Sep;51(9):2843–9.
111. Sokulska M, Kicia M, Wesołowska M, Piesiak P, Kowal A, Lobo M, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in colonized patients with various pulmonary diseases. *Med Mycol*. 2018;56(7):809–15.
112. Esteves F, Montes-cano MA, De La Horra C, Costa MC, Calderón EJ, Antunes F, et al. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(4):356–62.
113. Özmen A, Mıstık R, Alver O, Coskun F, Ursavaş A, Uzaslan E. The *Pneumocystis jirovecii* colonization in bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial washing and the comparison of methods which are used in diagnosis. *Tuberk Toraks*. 2013;61(4):303–11.

114. 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 Oct 1;117(10):3103–8.
115. Qoraan I. The investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in adult individuals of Turkish population. *Biometrics Biostat Int J.* 2018 Jul 31;7(4).
116. Güneş I, Kalkanci A, Kuştımur S, Ergüven S, Özet G, Ekim N. Comparison of the methenamine silver staining, direct fluorescent antibody and nested-polymerase chain reaction methods in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Mikrobiyol Bul.* 2004;38(1–2):105–12.
117. Sürgeç E, Can H, Döşkaya M, Karakavuk M, Atalay Şahar E, Değirmenci Döşkaya A, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* isolates obtained from clinical samples by multilocus sequencing: a molecular epidemiology study conducted in Turkey. *Arch Microbiol.* 2020;202(7):1647–52.
118. Gülbudak H, Öztürk C, Kuyugöz S, Tezcan Ülger S. Dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutations and mitochondrial large subunit (mtLSU) rna genotype variations in *pneumocystis jirovecii* strains. *Mikrobiyol Bul.* 2021;55(1):41–52.
119. Alanio A, Olivi M, Cabaret O, Foulet F, Bellanger A, Millon L, et al. Correlation Between *Pneumocystis jirovecii* Mitochondrial Genotypes and High and Low Fungal Loads Assessed by Single Nucleotide Primer Extension Assay and Quantitative Real-Time PCR. *J Eukaryot Microbiol.* 2015;62(5):650–6.
120. Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA. *Pneumocystis carinii* Dihydropteroate Synthase but Not Dihydrofolate Reductase Gene Mutations Correlate with Prior Trimethoprim-Sulfamethoxazole or Dapsone Use [Internet]. Vol. 180, *The Journal of Infectious Diseases.* 1999. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/180/6/1969/871736>
121. Valerio A, Tronconi E, Mazza F, Fantoni G, Atzori C, Tartarone F, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Italian AIDS Patients. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45(5):521–8.
122. Sheikholeslami MF, Sadraei J, Farnia P, Forozandeh Moghadam M, Emadikochak H. Dihydropteroate synthase gene mutation rates in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from Iranian HIV-positive and non-HIV-positive patients. *Med Mycol.* 2015 Jan 27;53(4):361–8.
123. Helweg-Larsen J, Eugen-Olsen J, Lundgren B. Rapid Detection of Dihydropteroate Polymorphism in AIDS-related *Pneumocystis carinii* Pneumonia by Restriction Fragment Length Polymorphism. *Scand J Infect Dis.* 2000;32(5):481–3.
124. Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard J, Jounieaux V, Raccurt C, et al. *Pneumocystis jirovecii* Dihydropteroate Synthase Genotypes in Immunocompetent Infants and Immunosuppressed Adults, Amiens, France. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):667–73.

125. Kazanjian PH, Fisk D, Armstrong W, Shulin Q, Liwei H, Ke Z, et al. Financial support: National Institutes of Health (grant [Internet]. Vol. 189, The Journal of Infectious Diseases. 2003. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/189/9/1684/874237>
126. Dini L, du Plessis M, Frean J, Fernandez V. High Prevalence of Dihydropteroate Synthase Mutations in *Pneumocystis jirovecii* Isolated from Patients with *Pneumocystis* Pneumonia in South Africa. J Clin Microbiol. 2010;48(6):2016–21.
127. Nahimana A, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J, Meneau I, Francioli P, Bille J, et al. Sulfa Resistance and Dihydropteroate Synthase Mutants in Recurrent *Pneumocystis carinii* Pneumonia.



8. EKLER

EK-1 : TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYINLAR

1. Özkoç S, Bayram Delibaş S, Erbaycu AE, Ergüden C, Akısü Ç. Akciğer Hastalığı Olan Hastalarda Pneumocystis Jirovecii Kolonizasyonunun Araştırılması [Investigation of Pneumocystis jirovecii colonization in patients with pulmonary diseases]. Türkiye Parazitoloj Derg. 2014 Dec;38(4):214-9. Turkish. doi: 10.5152/tpd.2014.3611. PMID: 25732877.

[Arama](#)
[Gelişmiş](#) [Uyarı oluştur](#) [RSS oluştur](#) [Kullanıcı rehberi](#)

p.jirovecii ceren ergüden için 1 sonuç bulundu

[Kaydetmek](#) [E-posta](#) [Gönderildi](#) [görüntüleme seçenekleri](#)

> Türkiye Parazitoloj Derg.2014 Aralık;38(4):214-9. doi: 10.5152/tpd.2014.3611.

[Akciğer hastalığı olan hastalarda Pneumocystis jirovecii kolonizasyonunun araştırılması]

[Türkçe Makale]
Soykan Özkoç¹, Songül Bayram Delibaş, Ahmet Emin Erbaycu, Ceren Ergüden, Çiler Akısü

Bağlantılar + genişletmek
PMID: 25732877 DOI: 10.5152/tpd.2014.3611
[Ücretsiz makale](#)

Soyut

Amaç: Pnömoni belirti veya semptomları olmayan bireylerden alınan solunum örneklerinde Pneumocystis jirovecii veya DNA'sının saptanması kolonizasyon olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, çeşitli akciğer hastalıkları olan hastalarda P.jirovecii kolonizasyonu prevalansını araştırmayı amaçladık.

Yöntemler: Çalışmaya altta yatan farklı hastalıklar veya akciğer bulguları nedeniyle bronkoskopi yapılan ve takip edilen 30 hasta dahil edildi. Bu hastaların bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvıları, P.jirovecii'nin mt-LSUrRNA geninin nPCR amplifikasyonu ile analiz edildi. Tüm örneklerde nPCR'ye ek olarak giemsa, Gomori'nin metenamin gümüşü (GMS) ve dolaylı floresan antikor (IFA) boyama testleri uygulandı.

Bulgular: nPCR ile 30 BAL örneğinin 21'inde (%70) P.jirovecii DNA tespit edildi. Ancak, giemsa ve GMS ile 21 nPCR pozitif örneğin 1'inde P.jirovecii kistleri bulundu. IFA testi altı örneğin pozitif olduğunu gösterdi, ancak nPCR ile bunlardan sadece dördünün pozitif olduğu bulundu.

Sonuç: Çalışmamızın sonucu, özellikle kronik akciğer hastalığı olan hastalarda P.jirovecii kolonizasyon prevalansının yüksek olduğunu ve nPCR'nin P.jirovecii kolonizasyonunu değerlendirmek için iyi bir test olduğunu göstermiştir.

TAM METİN BAĞLANTILARI



HAREKETLER

[« Anmak](#)
[Favoriler](#)

PAYLAŞMAK



SAYFA GEZİNME

[< Başlık ve yazarlar](#)
[Soyut](#)
[benzer makaleler](#)
[alıntı yapan](#)
[MeSH terimleri](#)
[maddeler](#)
[İlgili bilgi](#)

2. Özkoç S, Bayram Delibaş S, Erbaycu AE, Ergüden C, Akısü Ç. Akciğer Hastalığı Olan Hastalarda Pneumocystis Jirovecii Kolonizasyonunun Araştırılması [Investigation of Pneumocystis jirovecii colonization in patients with pulmonary diseases]. Türkiye Parazitol Derg. 2014 Dec;38(4):214-9. Turkish. doi: 10.5152/tpd.2014.3611. PMID: 25732877.


[Gelişmiş](#) [Uyarı oluştur](#) [RSS oluştur](#) [Kullanıcı rehberi](#)

[pjirovecii ceren ergüden için 1 sonuç bulundu](#) [Kaydetmek](#) [E-posta](#) [Gönderildi](#) [görüntüleme seçenekleri](#)

[Türkiye Parazitol Derg.2014 Aralık;38\(4\):214-9. doi: 10.5152/tpd.2014.3611.](#)

[Akciğer hastalığı olan hastalarda Pneumocystis jirovecii kolonizasyonunun araştırılması]

[Türkçe Makale]
[Soykan Özkoç¹](#), [Songül Bayram Delibaş](#), [Ahmet Emin Erbaycu](#), [Ceren Ergüden](#), [Çiler Akısü](#)

[Bağlantılar + genişletmek](#)
PMID: 25732877 DOI: 10.5152/tpd.2014.3611
[Ücretsiz makale](#)

Soyut

Amaç: Pnömoni belirti veya semptomları olmayan bireylerden alınan solunum örneklerinde Pneumocystis jirovecii veya DNA'sının saptanması kolonizasyon olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, çeşitli akciğer hastalıkları olan hastalarda P. jirovecii kolonizasyonu prevalansını araştırmayı amaçladık.

Yöntemler: Çalışmaya altta yatan farklı hastalıklar veya akciğer bulguları nedeniyle bronkoskopi yapılan ve takip edilen 30 hasta dahil edildi. Bu hastaların bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvıları, P. jirovecii'nin mt-LSUrRNA geninin nPCR amplifikasyonu ile analiz edildi. Tüm örneklerde nPCR'ye ek olarak giemsa, Gomori'nin metenamin gümüşü (GMS) ve dolaylı floresan antikor (IFA) boyama testleri uygulandı.

Bulgular: nPCR ile 30 BAL örneğinin 21'inde (%70) P. jirovecii DNA tespit edildi. Ancak, giemsa ve GMS ile 21 nPCR pozitif örneğin 1'inde P. jirovecii kistleri bulundu. IFA testi altı örneğin pozitif olduğunu gösterdi, ancak nPCR ile bunlardan sadece dördünün pozitif olduğu bulundu.

Sonuç: Çalışmamızın sonucu, özellikle kronik akciğer hastalığı olan hastalarda P. jirovecii kolonizasyon prevalansının yüksek olduğunu ve nPCR'nin P. jirovecii kolonizasyonunu değerlendirmek için iyi bir test olduğunu göstermiştir.

TAM METİN BAĞLANTILARI



HAREKETLER

[Anmak](#)

[Favoriler](#)

PAYLAŞMAK



SAYFA GEZİNME

[Başlık ve yazarlar](#)

[Soyut](#)

[benzer makaleler](#)

[alıntı yapan](#)

[MeSH terimleri](#)

[maddeler](#)

[İlgili bilgi](#)

3. 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 Oct;117(10):3103-3108. doi: 10.1007/s00436-018-6004-6. Epub 2018 Jul 19. PMID: 30027382.



Advanced

Search

User Guide

SaveEmailSend toDisplay options

> [Parasitol Res.](#) 2018 Oct;117(10):3103-3108. doi: 10.1007/s00436-018-6004-6. Epub 2018 Jul 19.

Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains isolated from Aegean region of Turkey

Soykan Ozkoc¹, Ceren Erguden², Songul Bayram Delibas²

Affiliations + expand
PMID: 30027382 DOI: 10.1007/s00436-018-6004-6

Abstract

Sulfonamide group drugs and their antimetabolite combinations are the most preferred drugs in the treatment and prophylaxis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP). Especially with the long-term use of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) and dapson, certain point mutations in the *Pneumocystis jirovecii* (P. jirovecii) dihydropteroate synthase (DHPS) gene are known to play an important role in the development of resistance. In the present study, we investigated the 165th and 171st nucleotide mutations in the DHPS gene in the P. jirovecii isolates from immunosuppressed and immunocompetent cases. P. jirovecii isolates from the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples of 31 hospitalized cases and lung tissue samples of 37 autopsy cases were included in the study. For the analysis of wild-type and mutant genotypes, after the touchdown-PCR amplification method, the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method was used. In this study, P. jirovecii DHPS gene was amplified in 28 of 68 (41%) of the samples. The RFLP method revealed that all the isolates in which the DHPS gene was amplified were considered as wild-type genotypes. To our knowledge, this present study is the first study in Turkey investigating P. jirovecii DHPS gene mutations associated with the sulfonamide resistance. All the isolates showed a wild-type pattern indicating that the occurrence of P. jirovecii DHPS mutations in Turkey is very low or absent.

Keywords: Cotrimaxazole; Mutation; *Pneumocystis jirovecii*; Turkey; dihydropteroate synthase gene.

FULL TEXT LINKS

 [SpringerLink](#)
PAID LINK SERVICE

ACTIONS

“ Cite

☆ Favorites

SHARE



PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Similar articles

Cited by

References

MeSH terms

Substances

70

4. Özkoç S, Ergüden Gürbüz C, Sayiner AA, Bayram Delibaş S. Pneumocystis jirovecii Laboratuvar Tanısında Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Değerlendirilmesi [Evaluation of Real-Time Polymerase Chain Reaction in Pneumocystis jirovecii Laboratory Diagnosis]. Mikrobiyol Bul. 2020 Jul;54(3):418-428. Turkish. doi: 10.5578/mb.69711. PMID: 32755518.

PubMed.gov
Advanced

Search

User Guide

Save Email Send to Display options

[Mikrobiyol Bul. 2020 Jul;54\(3\):418-428. doi: 10.5578/mb.69711.](#)

[Evaluation of Real-Time Polymerase Chain Reaction in Pneumocystis jirovecii Laboratory Diagnosis]

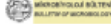
[Article in Turkish]
Soykan Özkoç ¹, Ceren Ergüden Gürbüz ¹, Ayça Arzu Sayiner ², Songül Bayram Delibaş ¹

Affiliations + expand
PMID: 32755518 DOI: 10.5578/mb.69711
Free article

Abstract

Pneumocystis jirovecii is a human-specific species and causes fatal infections like P.jirovecii pneumonia (PCP) in immunocompromised persons. Although direct microscopy is the gold standard in the diagnosis of the microorganism, molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) are needed in non-human immune deficiency virus (HIV) immunosuppressive patients with low P.jirovecii burden. In this study, we aimed to evaluate the value of real-time PCR (Rt-PCR) in the laboratory diagnosis of P.jirovecii. Bronchoalveolar lavage (BAL) specimens of 658 patients sent to Dokuz Eylül University Hospital Central Medical Parasitology Laboratory on suspicion of PCP were included in the study. BAL fluids were evaluated for identification of P.jirovecii mitochondrial gene coding ribosomal large subunit (mtLSUrRNA) using Rt-PCR. In addition, Giemsa and Gomori's methenamine silver (GMG) staining assays were applied to all samples and nested PCR (n-PCR) assay was applied to positive samples detected by real time PCR. Ninety-two (14.3%) of these samples were positive by Rt-PCR. Of these 92 patients, 85 (92.4%) were positive with n-PCR. Only seven of the specimens had P.jirovecii cysts and trophozoites with microscopic examination. The mean cycle threshold (CT) value of Rt-PCR positive patients was 29.7 (18.17 ≤ CT ≤ 37.96). P.jirovecii load in these patients was calculated as 2.6 x 10¹-6.15 x 10⁷ copies/ml. The difference between the mean CT values of n-PCR positive and negative results was statistically significant (p< 0.01). The CT values of Rt-PCR of the samples with positive microscopy were; 18.2, 20.9, 22.2, 24.3, 24.7, 26.5, 29.7. The difference between the CT means of the samples with positive and negative microscopy was statistically

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

Cite

Favorites

SHARE



PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Similar articles

Cited by

MeSH terms

Related information

LinkOut - more resources

5. Ozgen Alpaydin A, Avkan Oguz V, Cakmakci S, Erguden C, Egeli T, Yildiz S, Derici S, Ozkoc S. Pneumocystis jirovecii Pneumonia in Solid-Organ Transplant Recipients: A National Center Experience. Exp Clin Transplant. 2020 Nov 27. doi: 10.6002/ect.2020.0080. Epub ahead of print. PMID: 33272151.



[Advanced](#)
[Create alert](#)
[Create RSS](#)
[User Guide](#)

Found 1 result for *pjirovecii ceren erguden*

[Exp Clin Transplant.](#) 2020 Nov 27. doi: 10.6002/ect.2020.0080. Online ahead of print.

Pneumocystis jirovecii Pneumonia in Solid-Organ Transplant Recipients: A National Center Experience

Aylin Ozgen Alpaydin ¹, Vildan Avkan Oguz, Selin Cakmakci, Ceren Erguden, Tufan Egeli, Serkan Yildiz, Serhan Derici, Soykan Ozkoc

Affiliations [+ expand](#)
PMID: 33272151 DOI: 10.6002/ect.2020.0080
[Free article](#)

Abstract

Objectives: Immunosuppressive therapies have improved survival in solid-organ transplant recipients at the expense of increased prevalence of opportunistic infections. We investigated the prevalence, risk factors, and prognosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in solid-organ transplant recipients who were followed by our transplant unit.

Materials and methods: We conducted a retrospective observational study using medical record reviews to identify all adult solid-organ transplant recipients who underwent bronchoscopy and bronchoalveolar lavage between January 2011 and 2018. We collected clinical characteristics, including risk factors and prognosis. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia symptoms compatible with microscopy and/or positive nucleic acid amplification assays were defined as proven infection by *P. jirovecii* pneumonia.

Results: We identified 312 adult solid-organ transplants (114 renal, 1 kidney and pancreas, 197 liver) in this period. Overall, 113 (36.2%) pulmonary disease consultations were performed in the posttransplant stage, and 46 (40.7%) patients underwent bronchoalveolar lavage with *P. jirovecii* screening. We identified 18 patients who tested positive for *P. jirovecii* infection according to nucleic acid amplification assay; 3 were not proven, and 7 had a transplant date before 2011. The prevalence was 8/312 (2.6%); of these 8 patients, 5 had the same genotype cluster. Median *P. jirovecii* pneumonia development time was longer in renal transplant recipients ($P = .016$). Only renal transplant recipients were offered *Pneumocystis* prophylaxis for 6 months. Concomitant viral infection including cytomegalovirus was the only significant factor for *P. jirovecii* pneumonia development ($P = .028$). Intensive care admission was 40% ($n = 6$), and disease-related mortality was 33% ($n = 5$).

Conclusions: The overall prevalence of *P. jirovecii* pneumonia in solid-organ transplant recipients was similar to other single-center reports. Prophylaxis prevented early posttransplant *P. jirovecii* pneumonia. However, *P. jirovecii* pneumonia may develop at any posttransplant stage, and viral infections other than cytomegalovirus should also be considered as a predictor.

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

SHARE





PAGE NAVIGATION

[Title & authors](#)

[Abstract](#)

[Similar articles](#)

[Related information](#)

[LinkOut - more resources](#)

6. Gurbuz CE, Delibas SB, Alpaydin AO, Sayiner AA, Ozkoc S. Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* isolates among Turkish population based on mitochondrial large subunit ribosomal RNA and dihydropteroate synthase gene typing. *Med Mycol.* 2021 Jul 14;59(8):813-820. doi: 10.1093/mmy/myab004. PMID: 33709136.



[Advanced](#)
[User Guide](#)

[Search results](#)

[Med Mycol.](#) 2021 Jul 14;59(8):813-820. doi: 10.1093/mmy/myab004.

Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* isolates among Turkish population based on mitochondrial large subunit ribosomal RNA and dihydropteroate synthase gene typing

[Ceren Erguden Gurbuz](#)¹, [Songul Bayram Delibas](#)¹, [Aylin Ozgen Alpaydin](#)², [Ayca Arzu Sayiner](#)³, [Soykan Ozkoc](#)¹

[Affiliations](#) + expand
 PMID: 33709136 DOI: 10.1093/mmy/myab004

Abstract

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) is an atypical fungus that can cause severe interstitial pneumonia in immunocompromised patients. In this study, mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtLSU-rRNA) and dihydropteroate synthase (DHPS) gene polymorphism in *P. jirovecii* isolates were investigated in Western Turkey's Izmir province and its surroundings. For this purpose, a total of 157 *P. jirovecii* isolates obtained from bronchoalveolar lavage samples of hospitalized cases and lung tissue samples of autopsy cases who died outside hospital were examined. Genotypes were identified by direct sequencing of mtLSU-rRNA restriction fragment length polymorphism analysis of the DHPS gene amplicons. The mtLSU-rRNA analysis revealed that genotype 2 was the most common genotype with 58%. The following genotypes were genotype 3 (13%), genotype 1 (11.6%) and genotype 4 (5.1%), while genotype 5 (0.7%) was detected in only one autopsy case. In addition, 16 (11.6%) cases had dual or triple different genotypes (mixed infection). It was observed that the genotype

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

SHARE





PAGE NAVIGATION

- < Title & authors
- Abstract
- Similar articles
- Cited by
- MeSH terms

EK-2 ETİK KURUL

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/07-39	Tarih:27.03.2019			
	Doç.Dr.Soykan ÖZKOÇ'un sorumlusu olduğu "Türkiye'de Saptanan Pneumocystis Jirovecii İzolatlarındaki Genotipik Varyasyonların ve Sülfonamid İlaç Direncinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait 11.03.2019 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; -Çalışma adının "Pneumocystis Jirovecii İzolatlarındaki Genotipik Varyasyonların ve Sülfonamid İlaç Direncinin Araştırılması" olarak değiştirilmesi, -Çalışma süresinin Ekim 2018 – Ekim 2021 tarihine kadar uzatılması, ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Can SEVİNÇ (Başkan)	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan Yardımcısı)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Pinar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KATKI

Bu tez çalışması YÖK 100/2000 Doktora Bursu kapsamında Hastane Enfeksiyonlarını Önleme alt alanından kabul almış olup tez çalışmasını yürüten doktora öğrencisi YÖK 100/2000 bursuyla desteklenmiştir.

Tez çalışmasını yürüten doktora öğrencisi aynı zamanda 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programı 2019 (Ek çağrı) ile desteklenmiştir.



CEREN ERGÜDEN GÜRBÜZ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2016 - Şu Anda (6 yıl 2 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, PARAZİTOLOJİ (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.97 / 4.0

01 Şubat 2012 - 01 Aralık 2015 (3 yıl 11 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, PARAZİTOLOJİ (DR)
Tez Başlığı: Uçucu Yağların Acanthamoeba Spp. Kist Ve Trofozoitleri Üzerine Etkisi
Tez Konusu: Acanthamoeba Türleri Dünya Üzerinde Geniş Dağılıma Sahip Serbest Yaşayan Amiplerdir. İnsanlara Deri, Solunum Ve Göz Yolu İle Bulaşabilen Bu Parazit, Görmeyi Bozan Ve Hatta Körlüğe Yol Açabilen Acanthamoeba Keratitinin (ak) Yanı Sıra Immünbaskılanmış Kişilerde Ölümcül Granümatöz Amebik Ensefalite (gae) Ve Deri Lezyonlarına Neden Olabilmektedir. Günümüzde Özellikle Ak Vakalarının Tedavisinde Antifungallerden Ve Antiseptiklerden Yararlanılmakta Ancak Parazitin Kist Formlarının İlaçlara Dirençli Olması Nedeniyle Yeni İlaç Arayışları Devam Etmektedir. Şimdiye Kadar Bitkisel Ekstrelerin Ve Bitkisel Kaynaklı Uçucuyağların Acanthamoeba Spp. Üzerine Etkili Olabileceğini Bildiren Bazı Raporlar Yayınlanmıştır. Biz De Çalışmamızda Lamiaceae Ailesinden Mentha X Piperita L., Melissa Officinalis L. Ve Ocimum Basilicum L. Uçucu Yağlarının Acanthamoeba Castellani Kist Ve Trofozoitleri Üzerine In Vitro Etkilerini Araştırdık.
Tarih: 2015
Tez Danışmanı: SONGÜL DELİBAŞ

21 Ocak 2008 - 21 Ocak 2012 (4 yıl 1 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
DENİZ BİLİMLERİ VE TEKNOLOJİSİ ENSTİTÜSÜ, DENİZ BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
Tez Başlığı: İzmir Körfezi'nde Su Kalitesi Ve Organoklorlu Pestisitleri'nin Mi'dye (Mytilus Galloprovincialis Lamarck, 1819) Dağılımına Etkisi?
Tez Konusu: Bu Çalışmada İzmir Körfezi'ndeki Kara Midye Mytilus Galloprovincialis'de Bulunan Organoklorlu Maddeler Araştırılmıştır. Çalışmalar Esnasında İstasyonlardan Toplanan Midyelerde Organoklorlu Pestisit Seviyeleri, Aynı İstasyonlardan Eşzamanlı Alınan Su Örneklerinde Fizikokimyasal (sıcaklık, İletkenlik, Tuzluluk, Ph, Çözünmüş Oksijen, Askıda Katı Madde) Ve Besin Tuzu (fosfat, Nitrat, Nitrit, Amonyum, Silikat) Parametreleriyle Birlikte Değerlendirilmiştir. Farklı Seviyelerde Kirliliğin Mevcut Olduğu İstasyonların Tümünde Pestisitler Düşük Seviyede Tayin Edilmiştir. Düşük Değerlerde İzlenmiş Olan Organoklorlu Pestisitlerin Kalitatif Ve Kantitatif Benzerlikleri Kümeleme (cluster) Ve Çok Boyutlu Ölçeklenme (mds) Analizleri İle Açıklanmaya Çalışılmıştır. Araştırmalarımız Sonunda Elde Edilen Bulgulara Göre; Mytilus Galloprovincialis'in İçerdiği Organoklorlu Pestisit Seviyelerinin İnsan Sağlığı Açısından Bir Risk Taşımadığı Gözlenmiştir.

Tarih: 2012
Tez Danışmanı: NİHAYET BİZSEL

28 Ağustos 2004 - 28 Ağustos 2008 (4 yıl 1 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

C. E. GURBUZ, S. B. DELİBAS, A. O. ALPAYDIN, A. A. SAYINER & S. OZKOC, Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* isolates among Turkish population based on mitochondrial large subunit ribosomal RNA and dihydropteroate synthase gene typing, *MEDICAL MYCOLOGY*, 2021, 1369-3786, 59, 8, 813-820.

S. OZKOC, C. E. GURBUZ, A. A. SAYINER & S. B. DELİBAS, Evaluation of Real-Time Polymerase Chain Reaction in *Pneumocystis jirovecii* Laboratory Diagnosis, *MIKROBİYOLOJİ BULTENİ*, 2020, 0374-9096, 54, 3, 418-428.

S. OZKOC, C. ERGUDEN & S. B. DELİBAS, Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains isolated from Aegean region of Turkey, *PARASITOLOGY RESEARCH*, 2018, 0932-0113, 117, 10, 3103-3108.

N. EROL, N. EROL, S. B. DELİBAS, S. B. DELİBAS, S. OZKOC, S. OZKOC, C. ERGUDEN, C. ERGUDEN, U. AKSOY & U. AKSOY, Investigation of parasitic and viral pathogens in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Gulf of Izmir, Turkey, *SAUDI MEDICAL JOURNAL*, 2016, 0379-5284, 37, 6, 703-706.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, C. ERGÜDEN, C. ERGÜDEN, S. ÖZKOÇ, S. ÖZKOÇ, B. ÖZTÜRK, B. ÖZTÜRK, S. BAYRAM DELİBAŞ & S. BAYRAM DELİBAŞ, *Melissa officinalis* L., *Mentha x piperita* L. ve *Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae) Uçucu Yağlarının *Acanthamoeba castellanii* Kist ve Trofozoitleri Üzerine İn Vitro Etkisinin Araştırılması, *MIKROBİYOLOJİ BULTENİ*, 2016, 0374-9096, 4, 50, 569-579.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. ÖZKOÇ, S. ÖZKOÇ, A. AÖ, A. AÖ, S. BAYRAM DELİBAŞ, S. BAYRAM DELİBAŞ, C. ERGÜDEN, C. ERGÜDEN, AKKOÇLU, AKKOÇLU, ATILLA & ATILLA, *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in a Patient with Interstitial Lung Disease, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2015, 1300-6320, 1, 39, 66-9.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. ÖZKOÇ, S. ÖZKOÇ, S. BAYRAM DELİBAŞ, S. BAYRAM DELİBAŞ, A. E. ERBAYCU, A. E. ERBAYCU, C. ERGÜDEN, C. ERGÜDEN, Ç. AKISÜ & Ç. AKISÜ, Investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with pulmonary disease, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2014, 1300-6320, 4, 38, 214-9.

Bildiriler

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. ÖZKOÇ & S. BAYRAM DELİBAŞ, Türk Toplumundan Elde Edilen *Pneumocystis jirovecii* İzolatlarında Dihidropteroat Sentetaz Gen Mutasyonlarının Araştırılması, Poster Sunumu, Uluslararası Katılımlı 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 25 Eylül 2017, 29 Eylül 2017.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. ÖZKOÇ & S. BAYRAM DELİBAŞ, Adli Otopsi Vakalarında Pneumocystis Jirovecii Kolonizasyon Prevalansının Araştırılması, Poster Sunumu, 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi & Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, 05 Ekim 2015, 09 Ekim 2015.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. BAYRAM DELİBAŞ, S. ÖZKOÇ & B. ÖZTÜRK, Mentha X Piperit , Melissa Officinalis Ve Ocimum Basilicum Bitkilerinden Elde Edilen Uçucu Yağların Acanthamoeba Spp. Kist Ve Trofozoitleri Üzerine In Vitro Etkisi, Poster Sunumu, 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi & Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, 05 Ekim 2020, 09 Ekim 2015.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. BAYRAM DELİBAŞ, N. YAPAR, M. ÇELİK, S. ÖZKOÇ & Ç. AKISÜ, Uzun Süreli Ateşle Seyreden Bir Fascioliasis Olgusu, Poster Sunumu, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül 2013, 05 Ekim 2013.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. BAYRAM DELİBAŞ, S. ÖZKOÇ & B. ÖZTÜRK, Uçucu Yağların Acanthamoeba Spp. Trofozoitleri Üzerine In Vitro Etkisi, Poster Sunumu, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül 2013, 05 Ekim 2013.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. BAYRAM DELİBAŞ, S. ÖZKOÇ, N. EROL & Ü. AKSOY, Investigation Of Toxoplasma Gondii And Hepatitis A Virus In Mussels (mytilus Galloprovincialis) In Different Localizations Of İzmir Bay Coastline, Sözlü Sunum, The International Conference On Water, Energy And Environment (icwee), 21 Eylül 2013, 24 Eylül 2013.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, S. BAYRAM DELİBAŞ, S. ÖZKOÇ & Ç. AKISÜ, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Parazitoloji Laboratuvar'na 2010-2012 Yıllar Arasında Kistik Ekinokokkozis Şüphesi İle Başvuran Hastaların Serolojik Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi, Poster Sunumu, 6.ulusal Hidatidoloji Kongresi, 12 Eylül 2012, 15 Eylül 2012.

T. TÜMER, C. ERGÜDEN GÜRBÜZ & N. BİZSEL, İzmir Körfezi'nde Dağılım Gösteren Potansiyel Zararlı Fitoplankton Türlerinin Akdeniz Midyesi, (mytilus Galloprovincialis), 1819 Üzerine Etkisi, Sözlü Sunum, 10. Ulusal Ekoloji Ve Çevre Kongresi, 04 Ekim 2011, 07 Ekim 2011.

C. ERGÜDEN GÜRBÜZ, Ü. AKSOY, İ. Ö. CAN, H. RESMİ, S. USLUCA, R. SÖNMEZ, B. KIVRAKDAL & M. ÖZAYDINLI, İnsan Sağlığını Tehdit Eden Farklı Kaynaklı Organik Kirlenimlerin Bayraklı Kıyıda Şeridindeki Midyelerde (mytilus Galloprovincialis) Araştırılması, Poster Sunumu, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 05 Eylül 2011, 08 Eylül 2011.

Projeler

BAP, ARAŞTIRMACI, ADLİ OTOPSİ VAKALARINDA PNEUMOCYSTIS JIROVECIİ VE MICROSPORIDİA SPP. KOLONİZASYON PREVALANSLARININ ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Ocak 2015, 01 Ocak 2016.

BAP, BURSIYER, İZMİR KÖRFEZİ'NİN KIYI ŞERİDİNDEKİ -KARA- MİDYELER - MYTİLUS GALLOPROVINCIALIS-DE SU KAYNAKLI PARAZİTLER VE VİRAL PATOJENLERİN İZLENMESİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Haziran 2012, 01 Haziran 2013.

BAP, BURSIYER, İNSAN SAĞLIĞINI TEHDİT EDEN FARKLI KAYNAKLI ORGANİK KİRLİTİCİLERİN İZMİR KÖRFEZİ KIYI ŞERİDİNDEKİ MİDYELER-MYTİLUS GALLOPROVINCIALIS-DE ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Ağustos 2008, 01 Ağustos 2012.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

108Y185, İnsan Sağlığını Tehdit Eden Farklı Kaynaklı Organik Kirleticilerin İzmir Körfezi Kıyı Şeridindeki Midyeler (*Mytilus Galloprovincialis*)'de Araştırılması, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, ÇAYDAG - Çevre, Atmosfer, Yer Ve Deniz Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.10.2009 - 01.06.2012, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.12.2008 - 01.06.2012. 112Y020, İzmir Körfezi'nin Kıyı Şeridindeki (Kara) Midyeler (*Mytilus Galloprovincialis*)'de Su Kaynaklı Paraziter Ve Viral Patojenlerinin İzlenmesi, 1002 - Hızlı Destek, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, ÇAYDAG - Çevre, Atmosfer, Yer Ve Deniz Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.06.2012 - 01.06.2013, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.06.2012 - 01.06.2013.

BİDEB Destekleri

CEREN ERGÜDEN GÜRBÜZ, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Bursu Bitti (Mezun), 2014 - 1, 01.04.2014 - 02.08.2014. CEREN ERGÜDEN GÜRBÜZ, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı, Bursu Kesildi, 2019 - 2, 01.06.2019 - 31.05.2022.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0