

**İMMÜN SİSTEMİ BASKILANMIŞ HASTALARDA
PNEUMOCYSTIS JIROVECII'NİN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HARUN GÜLBUDAK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
OCAK 2020**

**İMMÜN SİSTEMİ BASKILANMIŞ HASTALARDA
PNEUMOCYSTIS JIROVECI'NİN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HARUN GÜLBUDAK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**




**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK**

**MERSİN
OCAK 2020**

ONAY

Harun GÜLBUDAK tarafından Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK danışmanlığında "İmmün sistemi baskılanmış hastalarda *Pneumocystis jirovecii*'nin çeşitli yöntemlerle araştırılması" başlıklı bu çalışmada aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 08/Ocak/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Gönül ASLAN	
Üye	Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK	
Üye	Prof. Dr. M. Sami SERİN	
Üye	Prof. Dr. Ayşen BAYRAM	
Üye	Prof. Dr. Burçin ÖZER	

Yukarıdaki jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 09.01.2020 tarih ve 2020-01/23 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

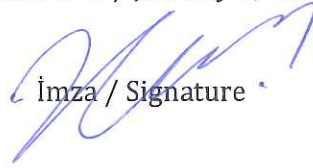
- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazınsal tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written information and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works. I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

8 Ocak 2020 / January 8, 2020


İmza / Signature

Harun GÜLBUDAK

ÖZET

İMMÜN SİSTEMİ BASKILANMIŞ HASTALARDA *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*'NİN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Pneumocystis jirovecii, önceki adıyla *Pneumocystis carinii*, HIV/AIDS ve immün sistemi baskılanmış hastalarda *Pneumocystis* pnömonisine (PCP) neden olan atipik bir mantardır. Günümüzde, *P. jirovecii* immün sistemi baskılayıcı tedaviler sonucu HIV-negatif immünsupresif hastalarda artış göstermiştir. Bu çalışmada immün sistemi baskılanmış hastalarda *P. jirovecii* prevalansının belirlenmesi ve pozitif örneklerde DHPS mutasyon analizi ve mtLSU-rRNA genotip karakterizasyonu yapılması amaçlanmıştır. Ağustos 2016 - Şubat 2018 tarihleri arasında, atipik pnömoni bulgusu olan, %75'i immünsupresif tedavi alan 96 hastanın solunum yolu örneğinde nested PCR ve mikroskopik yöntemler ile *P. jirovecii* araştırılmıştır. DHPS mutasyon analizi PCR-RFLP ile ve mtLSU-rRNA genotiplendirme sekans analizi ile yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 96 hasta örneğinin 16 (%16,7)'sında PCR ile, 5 (%5,2)'inde IFA ile, 3 (%3,1)'ünde TBO ile ve 2 (%2,1)'sinde Giemsa yöntemi ile *P. jirovecii* tespit edilmiştir. Çalışmada IFA referans alındığında; Giemsa için duyarlılık %40, özgüllük %100; TBO için duyarlılık %60, özgüllük %100; PCR için duyarlılık %100, özgüllük %87,9 bulunmuştur. *P.jirovecii* pozitif 16 hastanın 5'i (IFA pozitif) kesin PCP (3 HIV/AIDS, 1 akciğer kanseri, 1 interstisyel akciğer hastalığı), 3'ü olası PCP (1 Multipl myelom, 1 interstisyel akciğer hastalığı, 1 kolanjiosellüler karsinom) ve diğer 8'i kolonizasyon olarak tanımlanmıştır. DHPS mutasyon analizinde 4/16 (%25) mutant tip (M165/W171) tespit edilmiştir. Çalışmada profilaksi öyküsü olan hasta 3/16 (%19)'dır. Mutant tiplerin 2'si HIV/AIDS pozitif PCP'li ve profilaksi öyküsü olan; diğer 2'si kolonizasyon tespit edilen hastalardır. mtLSU-rRNA sekans analizine göre 3 farklı genotip elde edilmiştir; en sık G2 %43,75 (n=7), ikinci sıklıkta G1 %37,5 (n=6) ve en az G3 %18,75 (n=3;) tespit edilmiştir. DHPS ve mtLSU-rRNA multilokus değerlendirildiğinde 5 genotip gözlenmiş ve 3 olası nozokomiyal bulaş (1 mutant, 2 wild tip) tespit edilmiştir. Bulaş sonucu bu hastaların 2'sinde olası PCP ve birinde kolonizasyon görülmüştür. Sonuç olarak bu bulgular bölgemizde önemli oranda *P. jirovecii* prevalansı olduğunu ve ilaç dirençli suşların immünsupresif hastalarda nozokomiyal bulaş ile yayılma riski taşıdığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*, PCP, nested PCR, Genotip, DHPS mutasyon, KL-6

Danışman: Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Mersin Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* IN IMMUNOSUPPRESSED PATIENTS BY DIFFERENT METHODS

Pneumocystis jirovecii, previously known as *Pneumocystis carinii*, is an atypical fungus causing *Pneumocystis* pneumonia (PCP) primarily in HIV/AIDS and immunosuppressed patients. Currently, *P. jirovecii* has increased in HIV-negative immunosuppressive patients as a result of immunosuppressive therapies. This study aimed to determine the prevalence of *P. jirovecii* in immunocompromised patients and to determine DHPS mutation analysis and mtLSU-rRNA genotype characterization in positive samples. Between August 2016 and February 2018, nested PCR and microscopic methods of *P. jirovecii* were investigated in 96 patients with atypical pneumonia, 75% of whom received immunosuppressive therapy. DHPS mutation analysis was performed by PCR-RFLP and mtLSU-rRNA genotyping by sequence analysis. *P. jirovecii* was detected in 16 (16.7%) samples by PCR, in 5 (5.2%) samples by IFA, in 3 (3.1%) samples by TBO and in 2 (2.1%) samples by Giemsa method of 96 patients samples. When IFA is taken as a reference in the study; Sensitivity for Giemsa was 40%, specificity was 100%; for TBO, sensitivity was 60%, specificity was 100%; the sensitivity and specificity for PCR were 100% and 87.9%, respectively. 5 out of 16 *P. jirovecii* positive patients (IFA positive) definite PCP (3 HIV/AIDS, 1 lung cancer, 1 interstitial lung disease), 3 possible PCP (1 Multiple myeloma, 1 interstitial lung disease, 1 cholangiocellular carcinoma) and the other 8 were identified as colonization. In the DHPS mutation analysis, 4/16 (25%) mutant type (M165 / W171) was detected. In the study, the patient with a prophylaxis history was 3/16 (19%). Two mutant types belonged to HIV/AIDS positive patients with PCP and had a history of prophylaxis; the other 2 patients had colonization. According to the mtLSU-rRNA sequence analysis, 3 different genotypes were obtained; the most common G2 was 43.75% (n = 7), the second was G1 37.5% (n = 6) and the least G3 was 18.75% (n = 3). When DHPS and mtLSU-rRNA multilocus were evaluated, 5 genotypes were observed and 3 possible nosocomial transmission (1 mutant, 2 wild type) were detected. nosocomial transmission resulted in possible PCP in 2 of these patients and colonization in one. In conclusion, these findings showed that there is a significant prevalence of *P. jirovecii* in our region and that drug resistant strains carry the risk of spread by nosocomial transmission in immunosuppressive patients.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, PCP, nested PCR, Genotype, DHPS mutation, KL-6

Advisor: Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Department of Medical Microbiology, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim, heyecanla başladığımız, süreç ilerledikçe zorlandığımız, öğrendikçe keyif aldığımız, hiç bitmeyecekmiş gibi hissettiğimiz ve bittiğinde zamanın çok hızlı geçtiğini fark ettiğimiz bir yolculuktur. Doktora eğitimi, yüksek lisanstan farklı olarak, yolculuğun farkında olduğumuz ama yol almakta zorlandığımız yolun son bölümüdür. Bu yolculukta en önemli ihtiyaç moralli kalmak ve kendine güvenmektir. Bu yüzden yüreklendirici ve yol gösterici bir danışman önemlidir. Lisansüstü eğitim sürecinde her zaman yüreklendirici ve yol gösterici olan Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ hocama teşekkür ederim. Yüksek lisans ve Doktora eğitimi sürecinde her zaman destekleyici olan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN hocama teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamda her zaman yardımcı olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki hocalarım Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER'e ve Anabilim Dalından emekli olan Sayın Prof. Dr. Feza OTAĞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda, hastaların tanısında ve örnek toplanmasında yardımcı olan Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalında asistan Arş. Gör. Dr. Sibel KUYUGÖZ'e, Göğüs Hastalıkları ve İç Hastalıkları Anabilim Dalındaki asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimde istatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Didem DERİCİ YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim boyunca beraber yol aldığımız dönem arkadaşlarıma, asistan arkadaşlarıma ve laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamızı destekleyen Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Aileme ve vazgeçmemeyi öğreten anneme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması MEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2017-1-TP3-2262 numaralı BAP projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. <i>Pneumocystis</i> Tarihçe	3
2.2. Taksonomik Sınıflandırma Protozoondan Fungusa <i>Pneumocystis</i>	4
2.3. <i>Pneumocystis</i> Türleri ve Konak Özgüllüğü	5
2.4. <i>Pneumocystis</i> Morfolojik Özellikleri ve Hipotetik Yaşam Döngüsü	6
2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş	7
2.6. <i>Pneumocystis</i> Pnömonisi (PCP)	9
2.7. <i>Pneumocystis</i> Enfeksiyonlarında Konak İmmün Yanıtı	11
2.8. Mikrobiyolojik Tanı	13
2.9. Genotiplendirme	18
2.10. İlaç Direnci	19
2.11. Tedavi ve Korunma	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	23
3.2. Hasta Örnekleri	25
3.3. Mikroskopik İnceleme	25
3.4. KL-6 ELISA Testi	28
3.5. <i>P. jirovecii</i> PCR	30
3.6. <i>Pneumocystis jirovecii</i> Genotiplendirme	32
3.7. PCP ve Kolonizasyon Sınıflandırması	35
3.8. İstatistiksel Yöntem	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	63

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo.2.1. <i>P. jirovecii</i> pnömonisinde tedavi seçenekleri	22
Tablo.2.2 <i>P. jirovecii</i> profilaksi seçenekleri	22
Tablo 3.1. mtLSU-rRNA PCR amplifikasyon koşulları	32
Tablo3.2. Çalışmada kullanılan primerler	32
Tablo.4.1. Hasta örneklerinin kliniklere göre dağılımı	36
Tablo.4.2. Hastaların alta yatan hastalık gruplarına göre dağılımı	37
Tablo.4.3. PCR ve mikroskopik inceleme sonuçları	38
Tablo.4.4.Hastaların klinik ve demografik özellikleri	38
Tablo4.5. <i>P. jirovecii</i> tespit edilen hastaların klinik bilgileri	40
Tablo.4.6. <i>P.jirovecii</i> DHPS mutasyon analizi	41
Tablo.4.7. <i>P. jirovecii</i> mtLSU-rRNA genotip analizi	42
Tablo 4.8. <i>P. jrovecii</i> mtLSU-rRNA ve DHPS multilokus genotipleri	42



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil.2.1. Folat sentezinin sülfametoksazol ve trimetoprim ile inhibisyonu	20
Şekil. 4.1. KL-6'nın PCP ve kolonizasyon örnekler arasındaki değerlendirilmesi	39
Şekil.4.2. mtLSU-rRNA genotip 1'de kümelenen hastaların yattığı klinik haritası	43
Şekil.4.3. mtLSU-rRNA genotip 2'de kümelenen hastaların yattığı klinik haritası	43
Şekil.4.4. mtLSU-rRNA genotip 3'de kümelenen hastaların yattığı klinik haritası	44



KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
PCP	<i>Pneumocystis</i> Pnömonisi
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
nested-PCR	İki turlu PCR
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
KL-6	Krebs von den lungen antijeni
DHPS	Dihidropteroat sentaz
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
MtLSU	Mitochondrial large subunit
ITS	Internal transcribed spacer
f.sp	Formae speciales
BAL	Bronkoalveolar lavaj
TBO	Toluidin blue O
KT	Kemoterapi
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi

1.GİRİŞ

Pneumocystis jirovecii, önceki adıyla *Pneumocystis carini*, akciğer tropizmi gösteren atipik bir fungustur, immün sistem bozukluğu olan hastalarda fırsatçı enfeksiyona, özellikle de pnömونيye neden olur. *Pneumocystis* memeli türlerinden izole edilen ökaryotik bir mikroorganizmadır [1]. İlk tanımlandığı yıllardan 1980'lerin sonuna kadar protozoon olduğu düşünülen *Pneumocystis*, günümüzde mantarlar aleminde sınıflandırılır ve memelilerde konağa spesifiktir [2,3]. Primer konağı insan olan *Pneumocystis* türü *P. jirovecii*'dir [4,5]. Memeli konaklarda, *Pneumocystis* akciğer alveollerinde tip-I alveolar epitellere tutunarak enfeksiyona neden olur [6,7]. *Pneumocystis* pnömönisi (PCP), 1980'li yıllarda HIV/AIDS ilişkili bir hastalık olarak bilinirken, günümüzde kanser, hematolojik malignite, organ transplantasyonu ve otoimmün hastalığı olan hasta sayısındaki artış ve bu hastalara uygulanan immün sistemi baskılayıcı tedaviler PCP'yi HIV-negatif immunsupresif hastalarda daha yaygın hale getirmiştir [1,8]. AIDS'li hastalarda *Pneumocystis*'e bağlı mortalite oranı %10-20 arasında iken HIV negatif immunsupresif hastalarda %20-60 arasında bildirilmiştir [7-10].

P. jirovecii'nin in vitro kültürü yapılamadığı için enfeksiyon tanısı klinik bulguların yanında mikroorganizmanın bronkoalveolar lavaj (BAL), indüklenmiş balgam ya da akciğer biyopsi örneği gibi solunum yolu örneklerinde mikroskopik olarak görülmesine ve moleküler yöntemler ile tespit edilmesine dayanır [1,11]. Mikroskopik incelemede toluidin blue O (TBO), Gomori-Grocott methenamine silver nitrat (GMS) ve kalkoflor beyazı *Pneumocystis* kist formlarını; Giemsa ve benzeri panoptik boyama yöntemleri ise trofik formları boyamak için kullanılır [7]. Bu yüzden *Pneumocystis* tanısı için kist ve trofik formları içeren iki farklı boyama stratejisi önerilir [1]. Kist ve trofik formları hedefleyen monoklonal antikörlerin kullanıldığı immünfloresan yöntemler, diğer boyama yöntemlerine göre duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksektir [1,12].

PCP tanısında, konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve real time PCR yöntemlerinde en yaygın kullanılan hedef mtLSU rRNA (mitochondrial large subunit ribosomal RNA) gen bölgesidir [1]. Bu bölgenin kopya sayısının fazla olmasından dolayı duyarlılığı yüksektir [11,13]. Klinik örneklerden *Pneumocystis* tespitinde moleküler yöntemlerin kullanılması tanı duyarlılığı arttırmıştır. Özellikle nested-PCR (iki turlu PCR) kullanılması mikroskopinin negatif olduğu düşük parazit yükü bulunan hastalarda tanının erken sağlanmasında ve kolonizasyon tespitinde etkilidir [14-16]. Ancak, PCR'ın pozitif, mikroskopik yöntemlerin negatif olduğu durumlarda, kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımı yapılması gerekir, buyüzden sonuçlar klinik bulgularla birlikte yorumlanmalıdır.

PCP tespitinde krebs von den lungen antijeni (KL-6), β -D-glukan (BG) ve S-adenosylmethionine (AdoMet) gibi serum markırları tanıya yardımcı olarak kullanılabilir [1]. Bu markırlardan KL-6 yüksek moleküler ağırlığı olan epitelyal müsün ve membran glikoproteinidir.

Tip 2 alveolar pnömosit ve bronşiyal epitel hücrelerden eksprese edilir; çeşitli interstisyel pnömonilerde ve tip 2 pnömosit yaralanmalarında serumda KL-6 seviyesi artar [17-19]. Tasaka ve ark[20]'nın bildirdiği bir çalışmada; KL-6 seviyesi PCP pozitif hastalarda, PCP negatif hastalardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak idiyopatik interstisyel pnömoni ya da kollajen vasküler ilişkili akciğer hastalığı olanlarda da altta yatan hastalıkla ilişkili olarak KL-6 seviyesi yüksek bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, interstisyel pnömoni ve PCP pozitif hastalarda KL-6 seviyesi kronik bronşit ve pnömonili hastalara göre daha yüksek bildirilmiştir[19].

Trimetoprim-sulfametoksazol gibi Sülfonamid grubu içeren ilaçların, PCP profilaksi ve tedavisinde yaygın kullanılması *P. jirovecii*'nin dihidropteroat sentaz (DHPS) lokusunda mutasyonlara neden olmaktadır [21-23]. DHPS lokusunda 165(A[^]G) ve 171(C[^]T) nükleotit pozisyonlarında meydana gelen mutasyonlar, enzimin aktif bölgesindeki proteinde, 55 (Thr[^]Ala) ve 57 (Pro[^]Ser) amino asit dizilerinde yapısal değişikliğe neden olur. Sülfü türevi ilaçların bağlanma bölgesinde meydana gelen bu değişiklikler ilacın afinitesini ve inhibitör etkisini azaltarak tedavi ve profilakside başarısızlığa neden olur [21-23].

Pneumocystis epidemiyolojisini ve suş varyasyonlarını incelemek için çeşitli moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler, *P. jirovecii* genomunu üzerinde farklı lokusların kullanıldığı suş tiplendirme sistemleridir [24]. *Pneumocystis* genotiplenmesinde MtLSU rRNA ve ITS lokusları en sık kullanılan bölgelerdir. ITS bölgesi yüksek düzeyde polimorfizm gösterir, bu yüzden genotiplendirme yöntemleri arasında ayırt ediciliği daha yüksektir [25]. MtLSU rRNA tiplendirme için bildirilen polimorfizm miktarı ITS'den daha azdır ancak, gözlenen varyasyonlar, epidemiyolojik soruların ele alınmasında yardımcıdır. Bu yöntemde amplifikasyon için nested PCR kullanılması duyarlılığı arttırmıştır [25,26]. mtLSU rRNA tiplendirme 85. ve 248. nükleotit pozisyonlarında görülen polimorfizmlere dayanarak belirlenir [26,27].

P. jirovecii genotipleri ve DHPS lokus mutant suşları coğrafik bölgelere ve şehirlere göre farklılık gösterir [27]. DHPS lokus mutant suşlar, hastanın daha önce kullandığı antibiyotikle ilişkili olabildiği gibi hastanın yaşadığı şehirdeki mutant suşların varyasyonları ile de ilişkili olabilir. Bu yüzden DHPS lokusu mutasyon analizi yapılması ve MtLSU rRNA genotiplerinin belirlenmesi, *P. jirovecii* ilaç direnci ve epidemiyolojisi hakkında veri sağlar. Bu çalışmada, immün sistemi baskılanmış hastalarda *P. jirovecii* prevalansının belirlenmesi ve pozitif örneklerde DHPS mutasyon analizi ve mtLSU-rRNA genotip karakterizasyonu yapılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. *Pneumocystis* Tarihçe

Pneumocystis ilk olarak 1909 yılında, Brezilya'da demiryolu işçilerini etkileyen bir hastalık üzerinde çalışan Carlos Chagas tarafından tanımlanmıştır. Chagas, *Pneumocystis* kistlerini *Trypanosoma cruzi* ile enfekte hastaların kanı inoküle edilen Gine domuzlarının akciğerinde gözlemlemiş ve bunların *Trypanosoma cruzi*'nin yeni bir şizogonik formu olduğunu düşünmüştür [28,29]. Ayrıca Chagas, aynı kistik cisimleri akut akciğer trypanosomiasis olgusunun otopsi incelemesinde gözlemlediğini bildirmiştir [2,29]. 1910 yılında, Sao Paulo Pasteur Enstitüsü'nde, Antonio Carini, *Trypanosoma lewisi* ile enfekte ratların akciğerinde aynı organizma kistlerini tanımlamış ve Chagas'ın bulgularını desteklemiştir [29,30]. Ayrıca, Carinii örneklerini Paris Pasteur Enstitüsü'ndeki meslektaşı Charles Louis Alphonse Laveran'a göndermiştir [2,29]. 1912 yılında, Paris Pasteur Enstitüsü'nde Laveran'ın iki öğrencisi Pierre ve Marie Delanoe, *Trypanosoma* ile enfekte olmayan ratlarda benzer pulmoner kistleri gözlemlemişler; daha önceki çalışmaları ve Carinii'nin örneklerini yeniden değerlendirerek Chagas ve Carinii'nin tanımladığı kistlerin *Trypanosoma* ile ilişkisi olmayan yeni bir mikroorganizma olduğunu ve hava yoluyla bulaştığını açıklamışlardır [29,31]. Delanoe'ler bu yeni mikroorganizmaya *Pneumocystis carini* ("Pneumo-" akciğer tropismi, "cystis" karakteristik şekli ve "carini" Antonio Carini onuruna) ismini önermişlerdir [29,31]. Daha sonra Chagas ve Carinii ilk sonuçlarını geri çekmişlerdir [2,29].

Avrupa'da 1938 yılında prematüre veya yetersiz beslenen çocuklarda etiyolojisi bilinmeyen interstisyel plazma hücreli pnömoni tanımlanmış ve bu pnömoni İkinci Dünya Savaşı döneminde epidemik oranlara ulaşmıştır [29,32,33]. 1942 yılında *Pneumocystis* kistleri ile interstiyel plazma hücreli pnömoni arasındaki ilişki histolojik olarak ilk kez Van der Meer ve Brug tarafından gösterilmiştir [29,34]. On yıl sonra bu tip pnömonilerde *Pneumocystis*'in etiyolojik ajan olduğu 3 Çek araştırmacı Vanek, Jirovec ve Lukes tarafından tekrar tanımlanmış ve bu araştırmacıların keşfi yaygın olarak kabul görmüştür [29,35]. 1955 yılında ise Türkiye'den ilk *Pneumocystis* olgusu bildirilmiştir [36]. *Pneumocystis*'in interstiyel plazma hücreli pnömoni etkeni kabul edildiği dönemde etkin bir mevcut tedavisi yoktur. 1958 yılında iki Macar araştırmacı Ivady ve Paldy daha önce tripanomiyazis ve leishmaniasis tedavisinde kullanılan pentamidinin *Pneumocystis*'e karşı etkili olduğunu keşfetmişlerdir [29,37]. Bu ilacın tedavide kullanılması sonucu Avrupa'da *Pneumocystis* pnömonisine bağlı mortalite oranı azalmış ve savaş sonrası yaşam kalitesinin düzelmesiyle birlikte çocuklardaki *Pneumocystis* epidemileri kaybolmuştur. Ancak, Amerika ve Avrupa'da immün sistem yetersizliği olan çocuklarda ve immün sistemi baskılanmış yetişkinlerde sporadik *Pneumocystis* olguları tanımlanmaya devam etmiştir [29]. *Pneumocystis* enfeksiyonlarında pentamidin tedavisine bağlı ciddi yan etkilerin görülme

sıklığındaki artış yeni tedavi arayışlarını gerektirmiş ve 1975 yılında Hughes ve arkadaşları[38] günümüzde tedavi ve profilaksinin temelini oluşturan trimetoprim-sülfametoksazol kombine tedavisinin etkinliğini keşfetmişlerdir.

ABD, Atlanta Hastalık Kontrol Merkezi (CDC), Paraziter Hastalıklar İlaç Servisinde ilaç teknisyeni olarak çalışan Sandra Ford, 1981 yılında, *Pneumocystis* vakalarının tedavisi için talep edilen pentamidin sayısında olağandışı bir artış olduğunu fark etmiştir [39]. Olguların alışıldan farklı olarak çocuklar yerine erişkin erkek hastalardan oluştuğu, daha önce bilinen immünsupresyonu olmadığı ve eşcinsel erkek hastalar olduğunu öğrenmiştir [39]. Aynı zamanda, büyük tıbbi merkezlerdeki klinisyenler ilk kez Kaposi sarkomu, *Pneumocystis* pnömonisi, sitomegalovirüs enfeksiyonu ve diğer fırsatçı enfeksiyonları olan eşcinsel hastalarla karşılaştıklarını bildirmişlerdir [39,40]. Bu ilk bulgular, AIDS epidemisinin başlangıcı olmuştur. Bu noktadan sonra artış gösteren *Pneumocystis* pnömonisi, AIDS hastalarının %60'ından fazlasında görülen en önemli fırsatçı enfeksiyonlardan biri haline gelmiştir [41]. *Pneumocystis* pnömonisine karşı profilaksinin yaygın kullanılması, 1995 ve 1996 yıllarında HAART (yüksek düzey aktif antiretroviral tedavi) kombine HIV/AIDS tedavisinin tanıtılması ve yaygın kullanılmaya başlamasıyla birlikte HIV/AIDS'li hastalarda *Pneumocystis* insidansı büyük oranda azalmıştır [42]. Ancak gelişmekte olan ülkelerde, HIV pozitif olduğunu bilmeyen ya da HAART tedavisine ulaşamayan ve tedavi rejimine uymayan hastalarda, HIV/AIDS ilişkili *Pneumocystis* enfeksiyonu daha sık görülmeye devam etmiştir [1].

Günümüzde *Pneumocystis* enfeksiyonu; kanser, hematolojik malignite, transplantasyon ve otoimmün hastalıklar için immünsupresif tedavi alan hasta sayısının artmasıyla birlikte HIV negatif hastalarda daha sık görülmektedir ve mortalite oranı daha yüksektir [1,8,43].

2.2. Taksonomik Sınıflandırma: Protozoondan Fungusa *Pneumocystis*

Pneumocystis tek hücreli ökaryotik bir mikroorganizmadır ve ilk tanımlandığı yıllardan 1980'lerin sonuna kadar protozoon parazit olduğu düşünülmüştür. *Pneumocystis*'in invitro kültürde üretilmemesi, morfolojik görüntüsü, trofozoit ve kist yaşam formları olması, antifungallerle elimine edilememesi ve protozoon tedavisinde kullanılan trimetoprim-sülfametoksazol ve pentamidin gibi ajanlarla tedavi edilmesinden dolayı protozoon olarak kabul edilmiştir [1]. Ancak günümüzde *Pneumocystis* mantarlar grubunda sınıflandırılmaktadır. Bu yeniden sınıflandırma, 1988 yılında başlayan ve 1990'larda devam eden birbirinden bağımsız çeşitli çalışmaların bulgularına dayanmaktadır. Örneğin *Pneumocystis*'in ribozomal RNA sekans analizi verileri ile protozoonlardan çok mantarlarla daha yakın ilişkili olduğu tespit edilmiş [44,45] ve mitokondriyel gen sekansları fungal DNA ile homoloji göstermiştir [46,47]. Daha sonra

yapılan filogenetik analizler ve *Pneumocystis* genom projesi *Pneumocystis*'in mantarlar alemine ait olduğunu doğrulamıştır [48,49].

Günümüzde *Pneumocystis* cinsinin filogenetik sınıflandırması: Mantarlar alemi, *Ascomycota* filumu, *Taphrinomycotina* altfilumu, *Pneumocystidomycetes* sınıfı, *Pneumocystidales* takımı, *Pneumocystidaceae* ailesi ve *Pneumocystis* cinsi şeklindedir, en yakın akraba olduğu tür *Schizosaccharomyces pombe*'dir [2]. *Pneumocystis* günümüzde mantarlar aleminde sınıflandırılmasına rağmen, sahip olduğu farklı özelliklerden dolayı atipik bir fungal mikroorganizmadır. Mantar kültür besiyerlerinde üreyemez, pentamidin ve kotrimoksazol gibi antiparaziter ajanlara cevap verir, hücre duvarında diğer mantarlardan farklı olarak ergosterol yerine kolesterol bulunur ve bu yüzden tipik bir antifungal olan amfoterisin B'ye dirençlidir [24,50].

2.3. *Pneumocystis* Türleri ve Konak Özgüllüğü

Pneumocystis taksonomisi 1994 yılına kadar tür düzeyinde değişikliğe uğramadan sınıflandırılmıştır. Bu süreçte sadece Frenkel 1976 yılında insan ve rat kaynaklı *Pneumocystis* suşlarının yapısal ve antijenik farklılıklarına dayanarak konağa spesifik farklı türler olduğunu belirtmiş ve insanlarda enfeksiyon yapan tür için *Pneumocystis jirovecii* (insanlardaki *Pneumocystis* enfeksiyonunu tanımlayan Çek parazitolog Otto Jirovec onuruna) adını önermiştir [3,51]. Ancak Frenkel'in önerisi o dönemde kabul görmemiştir. *Pneumocystis* cinsinin tek tür olarak sınıflandırıldığı dönemde *Pneumocystis* enfeksiyonları zoonoz bir patern olarak kabul edilmiştir [2]. Ancak, günümüzde 5 farklı *Pneumocystis* türü tanımlanmış ve araştırılan her memeli konak türünden elde edilen *Pneumocystis* suşlarının konağa özgüllük gösteren farklı suşlar olduğu ortaya konmuştur [3,24,52,53].

İnsanlardan ve laboratuvar hayvanlarından izole edilen *Pneumocystis* organizmaları arasındaki ilk moleküler fark protein boyutları analizinden elde edilmiştir [54]. Ancak, protein boyutlarında gözlenen farklılıkların, türler arası değişkenlikten kaynaklandığının gösterilmesi zordur. Çünkü *Pneumocystis* proteinleri doğrudan konak akciğerinden alınan örneklerden elde edildiği için *Pneumocystis* proteinlerinin olası konak aracılı modifikasyonu, konak proteinleri ile kontaminasyon ve diğer organizmaların varlığı gibi sonucu etkileyebilecek faktörler bulunmaktadır [5]. DNA analizleri insanlardan ve diğer hayvanlardan izole edilen *Pneumocystis* organizmalarının oldukça farklı olduğunu ortaya koymak için gereken bilgileri sağlamıştır. İnsan ve rat kaynaklı *Pneumocystis* suşlarının 18S rRNA sekans analizi sonucunda % 5 oranında farklılık olduğu görülmüştür [5,50]. Ayrıca diğer gen veya gen fragmenti analizleri, farklı konak türlerindeki *Pneumocystis*'lerin farklı olduğunu ortaya koymuştur [2,5,55-58].

Hayvan deneyleri ile yapılan çapraz bulaş çalışmaları sonucu *Pneumocystis* enfeksiyonlarının memelilerde konak türlerine özgüllük gösterdiği ortaya konmuştur [52,53]. *Pneumocystis* taksonomisindeki ilk düzenleme, 1994 yılında yapılan 3. Uluslararası Fırsatçı Protistler Çalıştayında (Cleveland, ABD) yapılmıştır. Farklı memeli konak türlerine özgüllük gösteren *Pneumocystis* suşlarını adlandırmak için, mantarları da kapsayan, Uluslararası Botanik Adlandırma Kuralları (ICBN) ile belirlenen geçici trinom isimlendirme kullanılması kabul edilmiştir [2,3]. Bu adlandırma bir fungal parazit türü içerisinde, farklı konaklara adapte olan özel formları "formae speciales" (f.sp.) ayırt etmek için kullanılır. Örneğin; insanlarda bulunan *Pneumocystis* suşu *P. carinii* f.sp. *hominis*, farelerdeki *Pneumocystis* formu *P. carinii* f.sp. *murina*, ratlardaki form *P. carinii* f.sp. *carinii* ve tavşanlardaki suş *P. carinii* f.sp. *oryctolagi* şeklinde adlandırılmıştır [2,3]. Daha sonra yapılan filogenetik analizler, popülasyon genetiği ve yapısal çalışmalar, *Pneumocystis* formlarının mantar türleri seviyesinde farklılıklara sahip olduğunu ortaya koymuştur [2,3,5]. Buna uygun olarak, 2001 yılında 7. Uluslararası Fırsatçı Protistler Çalıştayında (Cincinnati, ABD) *P. carinii* özel formlarının *Pneumocystis* cinsinde türler olarak yeniden adlandırılma önerisi oybirliğiyle kabul edilmiş ve yeni tür adlarının oluşturulması için rehber hazırlanmıştır [5]. Uluslararası botanik adlandırma kurallarına uygun olarak; insanlarda enfeksiyon etkeni olan tür *P. jirovecii*, rat (*Rattus norvegicus*) kaynaklı olan tür ise *P. carinii* olarak Frenkel'in 1999 yılında önerdiği şekliyle adlandırılmıştır [4,5]. Daha sonra üç *Pneumocystis* türü resmi olarak tanımlanmıştır; bunlar *Pneumocystis wakefieldiae* ratlardan (*Rattus norvegicus*), *Pneumocystis murina* laboratuvar farelerinden (*Mus musculus*), *Pneumocystis oryctolagi* Eski Dünya tavşanlarından (*Oryctolagus cuniculus*) izole edilen türlerdir [59-61].

2.4. *Pneumocystis* Morfolojik Özellikleri ve Hipotetik Yaşam Döngüsü

Pneumocystis türlerinin uzun süreli in vitro kültürü yapılamadığı için yaşam döngüsü ile ilgili hipotezler; transmisyon elektron mikroskobu (TEM) migrografları, üç boyutlu organizma rekonstrüksiyonu ve moleküler çalışmalardan elde edilen verilere dayanır [6]. Hücre dışı yerleşim gösteren organizmanın bilinen yaşam döngüsü evreleri, enfekte memelilerin akciğerinde ve nadiren ekstrapulmoner organlarda bulunur [2,3,6]. *Pneumocystis*'in yaşam döngüsünde iki primer morfolojik form ve ara formlar tespit edilmiştir; trofik form (trofozoit), intrakistik cisimler içeren kist form (askus, spor) ve ara kist evleri [6,24]. "Trofozoit" ve "kist" terimleri *Pneumocystis*'in protozoon olarak sınıflandırıldığı dönem kullanılan tanımlardır. Trofozoit aktif formdur, konakta çoğalır ve patogenez ile ilişkilidir. Kist form dormant evreyi ifade eder, kalın koruyucu hücre duvarı ile parazitin dış ortamda hayatta kalmasını sağlar. *Pneumocystis*'in mantar olarak tanımlanmasıyla birlikte, trofik form vejetatif mayaya, kist form ise ascomycetes mantarlarının askusuna eşdeğer olduğu düşünülmektedir [24].

Pneumocystis'in trofik formu; pleomorfik yapıda, ince ve esnek hücre duvarlı ve 2-8 µm arasında değişen boyutlardadır [6]. Enfeksiyon sırasında trofik formlar tip I alveolar epitel hücrelere tropizm gösterir ve genellikle kist formdan 10 ile 20 kat daha fazladır. Çoğunluğu haploid ökaryotik hücrelerden oluşur, ancak küçük bir popülasyon diploid yapıdadır [24,62]. Her trofik formda bir nükleus, mitokondri, endoplazmik retikulum (ER), Golgi vezikülleri ve sitoplazmik vakuoller gibi organeller bulunur [24,63,64]. Trofik formun yüzeyinde, genellikle konak hücreye doğru çıkıntı yapan veya konak hücrenin invaginasyonlarına penetre olan, çok sayıda tübüler uzantılar veya filopodlar bulunur [24,63]. Bu yapıların işlevi tam olarak bilinmemektedir. Ancak konak membranından besin alımında rol oynadığı ve tip-I pnömositlere bağlanmayı sağladığı ileri sürülmüştür [6,24,64]. *Pneumocystis*'in yaşam döngüsünde trofik formlar aseksüel olarak ikiye bölünerek çoğalır ya da seksüel olarak iki trofik form eşleşir mayoz ve mitoz bölünme geçirerek kistleri meydana getirir [6]. Son dönemdeki genomik çalışmalara göre *Pneumocystis* türlerindeki eşeyli üremenin primer homothallizm ile olabileceği gösterilmiştir [65]. Trofozoitlerden kist oluşum sürecinde 3 evreden oluşan prekist fazı görülür. Erken prekist fazında pseudohifalar kaybolur ve mayoz bölünme ile ilişkili sinaptonemal kompleksler meydana gelir. Orta prekist fazında hücre duvarı kalınlığı artar ve nükleer bölünme gerçekleşir. Son prekist fazında ise nükleus sayısı sekize çıkar [66].

Kist form; askus benzeri bir yapıda, 4-8 µm arasında değişen boyutlarda, β-glukan bakımından zengin ve kalın (100-160 nm) hücre duvarı ile karakterize bir spor kılıfıdır. Hücre duvarı üzerinde dış membran bulunur. Olgun bir kist içerisinde tipik olarak sekiz spor (intrakistik cisim) vardır [24,62,66]. Her intrakistik cisimde bir nükleus, mitokondri ve ER bulunur. Kist formlarda tübüler uzantılar nadiren bulunur ve konak hücre invajinasyonuna uzanmaz [24]. *Pneumocystis* hücrelerinde mayalardaki gibi tomurcuklanma görülmez. Kist içerisindeki sekiz haploid askospor, kist duvarındaki porlardan salınarak yeni trofik formlar meydana getirir ve hayat döngüsü tekrar başlar [66].

Pneumocystis ile enfekte fareler β-glukan sentez inhibitörü ekinokandin ile tedavi edildiğinde enfeksiyonun diğer farelere bulaşmadığı gösterilmiştir [67]. Bu, *Pneumocystis* enfeksiyonunun yeni konaklara bulaşmasında kist formun sorumlu olduğunu göstermektedir [67].

2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş

Pneumocystis enfeksiyonlarında rezervuar kaynağı tam olarak anlaşılmamıştır. *Pneumocystis* DNA'sı gölet suyu ve meyve bahçeleri gibi yerlerde tespit edilmiş olmasına rağmen memeli konakların dışında hiçbir canlı organizma rezervuarı bulunmamıştır [66,68]. Aktif PCP yeni bulaş sonucu gelişen bir enfeksiyon olarak kabul edilir ve en olası enfeksiyon kaynakları

çevre ya da diğer insanlardır. Kişiden kişiye bulaş aktif PCP'li, prodromal fazdaki hastalar ve asemptomatik taşıyıcılarla temas sonucu hava yoluyla gerçekleşir ve geniş yayılım gösterir [69]. İnsanlarda tavşanlarda ve ratlarda anneden bebeğe plasenta yoluyla da geçiş olabileceğini destekleyen çalışmalar bildirilmiştir [70-72].

İmmün sistemi yetkin (immünokompetan) konaklarda PCP ile primer enfeksiyon erken yaşta görülür ve genellikle asemptomatik seyrederek. Çoğu klinik enfeksiyon belirtisi göstermeyen ve yaşları 20 aya ulaşan çocukların %85'inde *Pneumocystis*'e karşı antikor tespit edilmiştir [73]. *Pneumocystis* toplumda rezervuar olarak bulunabilir ve immün sistemi baskılanmış bir konağa ulaşıncaya kadar kişiden kişiye bulaşarak subklinik kolonizasyona neden olarak yayılabilir. PCP'li hastalar enfeksiyon sırasında etkeni solunum yoluyla havaya yayarlar. Bir hava örnekleme çalışmasında, PCP'li hastaların bulunduğu servislerden ve bitişik koridorlardan alınan hava örnekleri analiz edildiğinde PCP'li hastaların 8 m'ye kadar uzağında *P. jirovecii* tespit edilmiş ve organizma yükü hastalardan uzaklaştıkça orantılı olarak azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca servislere bitişik koridorlarda da *Pneumocystis* pozitifliği devam etmiştir [74]. Başka bir çalışmada *Pneumocystis* enfeksiyonu olmayan hastaların bulunduğu yoğun bakım ünitelerinden ve hastanedeki boş odalardan alınan hava örneklerinden de *Pneumocystis* saptanmıştır [75]. İmmün sistemi baskılanmış hastaların bulunduğu hastane servisleri ve yoğun bakım ünitelerinde *Pneumocystis*'in hastalar arasında kişiden kişiye bulaşarak yayıldığı ve salgınlara neden olduğu moleküler tiplendirme çalışmaları ile gösterilmiştir [69].

Geleneksel olarak, immün sistemi baskılanmış hastalardaki aktif PCP'nin erken çocukluk döneminde alınan etkenin latent kolonize formun reaktivasyonu sonucunda geliştiğine inanılıyordu. Ancak günümüzde enfeksiyonun yeni bir bulaş sonucu geliştiğini gösteren raporlar vardır. Normal bir immün sistem yanıtı *Pneumocystis* enfeksiyonunu tamamen temizlemek için yeterli görülmektedir. Ratlarda ve farelerde yapılan çalışmalarda PCP sonrası parazitin temizlendiği ve immüsupresyon gelişmesi durumunda reaktivasyon göstermediği bildirilmiştir [76,77].

HIV pozitif PCP'li hastalarda görülen tekrarlayan (rekürren) *Pneumocystis* enfeksiyonlarına farklı genotipe sahip suşların neden olduğu tespit edilmiştir [78]. Ayrıca, *Pneumocystis* enfeksiyonlarında genotiplerin coğrafik dağılımı araştırıldığında genotip paternleri hastaların doğum yerine göre değil, mevcut ikamet ettiği ve tanının bulunduğu yer ile ilişkili bulunmuştur [27]. Bununla birlikte, bu çalışmalarda olduğu gibi solunum örneklerinden PCP suşunun epidemiyolojik analizleri dikkatli yorumlanmalıdır çünkü solunum örneklerinin analizi otopsi analizine kıyasla hasta tarafından taşınan tüm PCP suşlarını tanımlamamaktadır [79].

P. jirovecii kolonizasyonu, mikroorganizmanın solunum sistemi örneklerinden tespit edilebildiği, ancak klinik bir enfeksiyon kanıtının bulunmadığı durumlardır ve bu durumlar asemptomatik taşıyıcılık olarak değerlendirilir. Kolonizasyonda parazit yükü düşük olduğu için

mikroorganizma tespiti PCR tekniklerine dayanır ve en sık mtLSU lokus nested PCR yöntemi kullanılır [11].

Bazı çalışmalarda, immün sistemi etkin bireylerde *Pneumocystis* kolonizasyonuna dair herhangi bir kanıt bulunmamıştır [11,80,81]. Sağlıklı bireylerde kolonizasyon olsa bile parazit yükü çok düşük olduğu için tespit edilemeyebilir. Ancak, yüksek oranda (%20 ve %65) kolonizasyon bildirilen çalışmalar da vardır [82,83]. Özellikle, Şili Santiago'da, travma ve şiddet sonucu ölen sağlıklı bireylerin otopsi örneği ile yapılan çalışmada, akciğer sağ üst lobunun toplam ağırlığının % 3-7'sinden PCR ile *P. jirovecii* araştırılmış ve %65 oranında kolonizasyon tespit edilmiştir [83]. Bu sonuç sağlıklı insanlarda da *Pneumocystis* kolonizasyonu olabileceğini, ancak mikroorganizma yükü düşük olduğu için klasik yöntemlerle tespit edilemediğini göstermektedir.

Pneumocystis kolonizasyonu için risk faktörleri [11]

- Çocuklarda yetişkinlerden daha yüksek kolonizasyon prevalansı görülmektedir.
- Hamilelikte, bağışıklık sistemindeki değişiklikler kolonizasyona yatkın hale getirir.
- İmmünoşüpresif tedavi
- Organ transplantasyonu
- Otoimmün hastalıklar
- Maligniteler
- HIV/AIDS enfeksiyonu (%20-69 oranında kolonizasyon)
- Kronik akciğer hastalıkları
 - Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH)
 - Kistik fibroz
 - İnterstisyel akciğer hastalıkları
 - Kronik bronşit
- Sigara kullanımı
- Coğrafya (Toplumdaki *P. jirovecii* prevalansı) kolonizasyon için risk faktörleri arasındadır.

Kolonizasyon aktif hastalık gelişmesinde veya hastalığın bulaşmasında rol oynayabilir. Epidemiyolojik çalışmalar, asemptomatik taşıyıcılardan diğer hastalara bulaş olduğunu göstermiş ve bu asemptomatik hastalara profilaksi uygulanmadığı zaman *Pneumocystis* yayılımının artış göstereceği belirtilmiştir [69].

2.6. *Pneumocystis* Pnömonisi (PCP)

P. jirovecii, kistlerin solunum yoluyla alınması sonucu bulaşır ve genellikle asemptomatik seyreder. Ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda ve özellikle HIV/AIDS'lilerde ciddi pnömoniye neden olur. AIDS ilişkili PCP, T-helper hücre sayısı (CD4+) < 200 hücre/mm³ olduğu durumlarda daha sık görülür ve nadiren diğer organlara yayılım gösterir [1,7,84]. Günümüzde HIV

pozitif hastaların dışında, hematolojik maligniteler, otoimmün hastalıklar, organ transplantasyonu ve solid tümör sayısındaki artış ve bu hastalarda uygulanan immunsupresif tedaviler (kortikosteroid, kemoterapi, anti-rejeksiyon) PCP'yi HIV-negatif immunsupresif hastalarda daha yaygın hale getirmiştir [1,8]. HIV-negatif hastalarda PCP ile ilişkili alta yatan durumlar; hematolojik maligniteler (Lösemi tipleri, lenfoma, multipl miyelom), solid tümörler (Akciğer kanseri ve diğer kanserler), otoimmün ve kronik enflamatuar hastalıklar (Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, Wegener granülomatozis), organ veya kemik iliği transplantasyonu, konjenital immün yetmezlik, kemoterapi ve steroid tedavisidir[1,8].

PCP'de yaygın olarak görülen semptomlar; progresif dispne, nonproduktif öksürük, hipoksi (arteriyel oksijen basıncı < 70 mmHg), düşük dereceli ateş, halsizlik ve bazen göğüs ağrısıdır. Fizik muayenede tipik olarak takipne, taşikardi ve akciğer oskültasyonunda normal bulgular görülür. Akut dispne ile birlikte plöretik göğüs ağrısı, pnömotoraks gelişimini gösterebilir [1,7,85]. Ya da pürülan balgamlı öksürük semptomları akut bir bakterial pnömoniye veya tüberküloz gibi alternatif bir enfeksiyöz tanıya işaret edebilir. Yükselmiş serum laktat dehidrojenaz (LDH) seviyeleri PCP ile ilişkili olabilir ve muhtemel akciğer parankimal hasarı yansıtır, ancak spesifik değildir.

Akciğer grafisinde bilateral perihiler interstisyel infiltratlar görülür ve hastalık sürecinde giderek homojen ve yaygın hale gelir. PCP'nin erken döneminde göğüs grafisi %25 oranında normal görülebilir [1,7]. Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (BT) incelemesi akciğer grafisinden daha duyarlıdır; radyografik bulgular normal olsa bile, PCP ile karakterize simetrik, geniş buzlu cam opasiteleri BT ile tespit edilebilir [86].

AIDS'li PCP pozitif hastalarda akciğer *Pneumocystis* yükü, HIV negatif immunsuprese hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek, nötrofil sayısı ise anlamlı olarak daha az olduğu bildirilmiştir. Buyüzden AIDS'li hastalarda *Pneumocystis* mikrobiyolojik tanısı daha duyarlıdır ve nötrofil sayısının az olmasından dolayı oksijenasyon ve sağkalım daha iyidir [10,87].

PCP, HIV negatif immunsupresif hastalarda HIV pozitiflere göre daha hızlı başlangıçlıdır ve semptomlar daha progresiftir. Bu hasta grubunda yoğun bakım ve mekanik ventilasyon gerektiren ciddi solunum sıkıntısı daha fazla görülür [1,85]. PCP'li HIV pozitif hastalarda mortalite oranı %10-20 arasındadır ve hastanın mekanik ventilasyon ihtiyacı mortalite oranını yükseltmektedir. HIV negatif hastalarda ise mortalite oranı %20-60 arasında bildirilmiş ve kanserli hastalarda mortalite riski daha yüksek bulunmuştur [7-10]. Bunun nedeni, alta yatan durumlarla ilişkili olabilir; mekanik ventilasyon gerektiren olguların oranı HIV negatif PCP'li hastalarda daha fazladır. BAL örneklerinde gözlenen nötrofil sayısı HIV negatif hastalarda daha fazladır, bu da PCP kaynaklı akciğer hasarının HIV negatif hastalarda daha fazla olduğunu gösterir [10]. Ayrıca HIV negatif PCP'li hastaların yaş ortalaması HIV pozitif hastalardan daha yüksektir [8,10].

Ekstrapulmoner *Pneumocystis* enfeksiyonu çoğunlukla HIV pozitif hastalarda ve özellikle PCP için aerosol pentamidin profilaksisi alanlarda bildirilmiştir. Ekstrapulmoner enfeksiyon akciğerden diğer organ ve dokulara yayılım sonucu gerçekleşir ancak ekstrapulmoner lezyonlar tespit edildiğinde pulmoner enfeksiyon görülmeyebilir [1,88]. Göz ya da kulak (Dış kulak yolu, orta kulak) ile sınırlı olan ekstrapulmoner *Pneumocystis* enfeksiyonları daha iyi prognoza sahiptir ve spesifik tedaviye yanıt verir. Yaygın enfeksiyonlarda ise genellikle etkilenen organlara göre semptomlar görülür ve lenf nodları, karaciğer, dalak, böbrek, tiroid, kemik iliği, gastrointestinal sistem, pankreas, kalp, kas, beyin korteksi ve meninkslerde *Pneumocystis* enfeksiyonu tespit edilmiştir [88].

2.7. *Pneumocystis* Enfeksiyonlarında Konak İmmün Yanıtı

Konağın *Pneumocystis* enfeksiyonunu kontrol edilebilmesi için etkili bir inflamatuvar cevap gereklidir. Ancak, aşırı immün reaksiyon pulmoner hasara da neden olur. Şiddetli *Pneumocystis* pnömonisi, nötrofilik akciğer inflamasyonu ile karakterizedir [7]. Bu durum alveoler hasar, gaz değişiminin bozulması ve solunum yetmezliği ile sonuçlanabilir. Bu yüzden solunum yetmezliği ve mortalite fungal yükten çok inflamasyon derecesi ile ilişkilidir [7].

2.7.1. Makrofaj ve Doğal İmmün Yanıt

Pneumocystis enfeksiyon sırasında konağın akciğerlerinde alveollere yerleşerek tip I pnömositlere tutunur, ve genellikle konak hücrelere invaze olmaz [7]. *Pneumocystis*'in epitele bağlanması, *Pneumocystis* yüzeyine bağlanan ve alveoler epitel üzerinde bulunan integrin reseptörlerine bağlanmaya aracılık eden fibronektin ve vitronektin proteinlerinin etkileşimleri ile kolaylaştırılır [89,90]. *Pneumocystis*'in hücrelere tutunması trofozitlerin çoğalması için gereklidir. Bu bağlanma akciğer epitel hücrelerini parçalamaz ancak büyümesini inhibe eder [7,91]. Patojenin epitel hücrelere tutunması ile epitel hücreler inflamatuvar sitokinler ve kemokinler (IL-6, IL-8 ve monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, nötrofil kemoatraktan proteini MIP-2) salgılayarak patogeneizde önemli rol oynar [92]. *Pneumocystis* kistlerinin hücre duvarında bulunan β -glukan ve trofozoitlerin majör yüzey glikoproteini (MSG), konak inflamatuvar cevabın başlatılmasında önemlidir [92]. *Pneumocystis* enfeksiyonu sırasında meydana gelen konak immün yanıtı; alveolar makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller, CD4+ T hücreler ve CD8+ T hücrelerin kompleks etkileşimini içerir [92].

Alveolar makrofajlar, enfeksiyona karşı ilk konak savunma hattını oluşturur ve *Pneumocystis* kist ve trofozoitlerinin akciğerden temizlenmesinde önemli rol oynar. Makrofaj sayısı ile PCP'nin şiddeti arasında ters orantı görülür [92,93].

Pneumocystis major yüzey antijeni mannoz ile glikozillenmiş bir glikoprotein A'dır ve majör yüzey glikoprotein (MSG) olarak adlandırılır. Makrofajlar mannoz reseptörü ile *Pneumocystis* major yüzey glikoproteinini; makrofaj dektin-1 reseptörü ile *Pneumocystis* hücre duvarındaki β -glukanların etkileşimi sonucu, makrofajlar mikroorganizmayı bağlayarak fagosite edebilir [92,93]. *Pneumocystis*'in IgG ile opsonizasyonu makrofajın fagositozunu kolaylaştırılabilir. Fagositozla alınan mikroorganizma, fagolizozom içerisine alınarak indirgenir [7,92]. Alveolar makrofajlar fagositozla aldıkları mikroorganizmaların antijenlerini işleyerek lenf nodlarında naif T lenfositlere sunar ve onların T helper ve sitotoksik T hücre olmaları yönünde aktive olmasını sağlar [93] Makrofajlara ek olarak, dendritik hücreler de akciğerdeki önemli efektör hücrelerdir. Solunum yolu epitelinde, alveoler septa ve pulmoner damarların çevresinde yer alan antijenlere hızlı cevap verirler [92]. Bunun dışında makrofajlar çeşitli proinflamatuvar sitokinler ve TNF- α gibi kemokinler üretir. TNF- α enfeksiyon sırasında, nötrofillerin, lenfositlerin ve monositlerin enfeksiyon bölgesine gelmesini uyararak mikroorganizmaların temizlenmesinde önemli rol oynar [7]. Bu immün sistem hücreleri, alveollerin *Pneumocystis*'ten temizlenmesinde önemli rol oynasalar da aynı hücrelerden salınan oksidan, katyonik protein ve proteazlar akciğer hücrelerine zarar verebilir [7].

Pulmoner sürfaktan, alveolar tip II hücreler tarafından salgılanan bir lipid ve protein kompleksidir. Hava-sıvı arasındaki yüzey gerilimini azaltır, düşük akciğer hacimlerinde alveolar kollapsı önler ve doğal bağışıklıkta rol oynar [92]. İşlevsel olarak dört ana sürfaktan protein, iki gruba ayrılır: Hidrofobik protein SP-B ve SP-C, yüzey gerilimini kontrol etmede birincil rol oynar. Hidrofilik protein SP-A ve SP-D ise akciğer bağışıklığında rol oynar [92]. Yapılan çalışmalarda, *Pneumocystis* enfeksiyonu sırasında SP-B ve SP-C'nin aşağı regüle olduğu; bunun sonucunda PCP'li hastalarda hipoksemik solunum yetmezliğine katkıda bulunduğu ve yüzey gerilimde belirgin artış görüldüğü bildirilmiştir [94,95].

SP-A ve SP-D, *Pneumocystis* yüzeyindeki glikoprotein A bileşenleriyle etkileşime girer. SP A, alveolar *Pneumocystis*'in makrofajlarla etkileşimini düzenler [7]. SP-D mikroorganizmaların agregasyonuna aracılık eder. Ancak, kümelenmiş mikroorganizmaların makrofajlar tarafından alınması aşırı derecede zayıflar, bu sayede birçok mikroorganizma makrofaj eliminasyonundan kaçabilir [7].

2.7.2. Lenfositler ve Adaptif Bağışıklık

Konağın *Pneumocystis*'e karşı savunmasında CD4+ T lenfositler çok önemlidir. CD4+ T hücreler, *Pneumocystis*'i elimine eden immün efektör hücrelerin aktive edilmesi ve olay yerine gelmesi için konak inflamatuvar yanıtını düzenleyen bellek hücreler olarak rol oynar [92]. *Pneumocystis* enfeksiyonunda CD4+ T hücrelerin aracılık ettiği immün reaksiyon makrofaj

kaynaklı TNF- α ve interlökin-1 ile aktive edilir [7]. İnsanlarda PCP riski, CD4+ T hücre sayısı <200 hücre/mm³ olduğunda önemli ölçüde artar. HIV pozitif hastalarda HAART tedavisi ile T-hücre sayısının yeniden yükselmesi sonucu PCP riski azalır [84,92,96]. Hayvan modellerde yapılan çalışmalarda, CD4+ T hücreler, anti-CD4 ile inhibe edildiğinde memelilerin *Pneumocystis* pneumonisine duyarlı hale geldiği gösterilmiştir [92,97].

Enfeksiyonun kontrolünde ve patojenin temizlenmesinde T hücreler gereklidir, ancak araştırmalar T hücresi cevabının hastalık sırasında önemli derecede pulmoner bozukluğa yol açabileceğini göstermiştir [98]. Özellikle immunsupresif durumda gelişen enfeksiyonlarda, altta yatan immunsupresif durum ortadan kalktığında ya da bağışıklık sistemi yeniden yeterli düzeye ulaştığında, enfeksiyona karşı oluşan CD4 T hücre tepkisi patolojik hale gelebilir. Bu durum immün rekonstitüsyon inflamatuvar sendrom (IRIS) olarak adlandırılan klinik bir fenomendir [98]. IRIS tipik olarak HIV/AIDS hastalarında antiretroviral tedavi sonrası gözlenir ve kötüleşen nefes darlığı, ateş ve öksürük şeklinde ortaya çıkabilir [92,98]. CD4+ T hücreler, pulmoner fizyolojinin bozulduğu IRIS akut fazında CD8+ T hücrelerden daha fazlayken; *Pneumocystis* klirensini izleyen enfeksiyonun çözüldüğü fazda ise CD8+ T hücreler daha fazla bulunmuştur [99]. CD8+ T lenfositlerin inflamasyon sırasında konak savunmasında rol aldığı ve CD4+ T lenfositleri modüle ettiği, ancak; CD4+ T hücrelerin yokluğunda, CD8+ T hücrelerin patojeni tek başına temizleyemediği tespit edilmiştir. CD8+ T lenfositlerin akciğer hasarına katkıda bulunup bulunmadığı kesin değildir [99-101].

B lenfositler, *Pneumocystis* enfeksiyonuna karşı duyarlılıkta önemlidir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, B hücresi olmayan farelerin enfeksiyona duyarlı olduğunu göstermiştir [102]. B lenfositler antikör üretiminin yanında, enfeksiyon sırasında antijen sunarak antijen spesifik CD4+ T hücre immün cevabını da düzenlediği bildirilmiştir [98,102]. Ayrıca, B lenfositlerin, *Pneumocystis* enfeksiyonlarında protein antijenlere cevap veren bellek T hücrelerin oluşmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [102]. *Pneumocystis* enfeksiyonunun çözülmesinde hem doğal hem de adaptif immün yanıt önemlidir. Adaptif immün yanıt aynı zamanda doğal immün cevabı arttırmak ve uzun süreli bellek korumasını sürdürmek için kritik öneme sahiptir.

2.8. Mikrobiyolojik Tanı

P. jirovecii'nin in vitro kültürü yapılamadığı için PCP tanısı klinik bulguların yanında mikroorganizmanın Bronkoalveolar lavaj (BAL), indüklenmiş balgam ve akciğer biyopsi örneği gibi solunum yolu örneklerinde mikroskopik olarak görülmesine ve moleküler yöntemlerle tespit edilmesine dayanır [1,11]. Hipertonik salinle indüklenmiş balgam örneği özellikle HIV pozitif hastalarda ilk prosedür olarak uygulanır ve tanı değeri %50-90 oranındadır [7]. Ancak,

bronkoalveolar lavaj altın standart prosedür olarak kabul edilir ve duyarlılığı %90-98 oranında raporlanmıştır [1].

2.8.1. Mikroskopik Yöntemler

Mikroskopik incelemede toluidin blue O (TBO), Gomori-Grocott methenamine silver nitrat (GMS), kalkoflor beyazı *Pneumocystis* kist formlarını; Giemsa, Diff-Quick, modifiye Papanicolaou ve Gram-Weigert boyama yöntemleri ise trofik formları boyamak için kullanılır [7]. Boyamada kullanılan TBO, GMS ve kalkoflor beyazı kist duvarı bileşenlerine iyi afinite göstererek kistleri boyar. Ancak, bu boyalar *Pneumocystis* kistlerinin yanında diğer mayaların da hücre duvarını boyar. Bu yüzden *Pneumocystis* doğru tanısı için aynı klinik örnek Giemsa yöntemi ile de boyanmalıdır. Giemsa ve benzer panoptik boyama yöntemleri trofik formların nükleusunu ve sitoplazmasını boyar, kist duvarını boyamaz ve kistlerin etrafında boşluk oluşur. Bu boyama stratejisi ile *Pneumocystis* diğer mantarlardan ayırt edilir [1]. Mikroskopik yöntemlerin diğer bileşeni, anti-*P. jirovecii* monoklonal antikörlerinin kullanıldığı direkt ve indirekt immünfloresan (IF) boyama yöntemidir. IF yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü özellikle indüklenmiş balgam örneklerinde diğer boyama yöntemlerinden daha yüksek bildirilmiştir [12,103]. Monoklonal antikörlerin avantajı *Pneumocystis*'in kist ve trofik formlarını hedeflemesidir, PCP sırasında trofik formlar kistlerden on kat fazladır [7]. Bu yöntemlerin bazı kısıtlamaları vardır. PCP'li hastaların bir kısmı balgam indüksiyonunu tolere edemeyebilir. BAL ve akciğer biyopsileri invazivdir. *Pneumocystis*'in histolojik tespiti personel deneyimine dayanır. Ayrıca, özellikle HIV negatif hastalarda, mantar yükünün düşük olması yanlış negatif sonuca yol açabilir.

2.8.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Pneumocystis tanısında PCR yöntemleri BAL, indüklenmiş balgam, balgam, biyopsi, orofaringeal ve nazofaringeal yıkama örneği gibi farklı klinik örneklerde etkilidir [1,11]. PCP tanısında PCR için birçok farklı sekans (mtLSU rRNA, ITS, MSG, Timidilat Sentaz, Dihidrofolat Redüktaz, Hsp70) hedef olarak kullanılmaktadır. Ancak en yaygın kullanılan hedef mtLSU rRNA (mitochondrial large subunit ribosomal RNA) gen bölgesidir [1]. Bu bölgenin kopya sayısının fazla olmasından dolayı duyarlılığı yüksektir [11,13]. Klinik örneklerden *Pneumocystis* tespitinde moleküler yöntemlerin kullanılması tanı duyarlılığı arttırmıştır. Özellikle nested-PCR (iki turlu PCR) kullanılması mikroskopinin negatif olduğu düşük parazit yükü bulunan hastalarda tanının erken sağlanmasında ve kolonizasyon tespitinde etkilidir [14-16]. Ancak, PCR pozitif ve mikroskopik sonucu negatif olan örnekler PCR'in özgüllüğünü düşürmektedir. Bu yüzden bu tip sonuçlarda kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımı için PCR sonuçları klinik bulgularla birlikte

yorumlanmalıdır. Bir meta-analiz çalışmasında BAL örneklerinde PCR'ın duyarlılığı %98.3 (%91.3-99.7) ve özgüllüğü %91 (%82.7-95.5) olarak bildirilmiştir [104]. Yapılan çalışmalarda ticari real-time PCR yöntemlerinin in-house PCR ile uyumlu sonuç verdiği tespit edilmiştir [105]. Meta-analiz çalışmalar, kantitatif real-time PCR (qPCR) testlerin duyarlılık ve özgüllük açısından qPCR olmayan testlerden daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir [104,106]. Bunun nedeni kantitatif real-time PCR testlerin yayınlanabilmesi için gereken minimum bilgi rehberi (MIQE) yayınlanmış olması olabilir. MIQE qPCR testlerinin doğrulanması (Testin analitik validasyonu, tespit limitinin tanımlanması, amplifikasyon verimi, amplifikasyonun internal kontrolü, vd.) için gereken bilgileri tanımlayan bir kılavuzdur [107]. Ayrıca, qPCR yöntemi kullanıldığında amplifikasyon ve döngü eşik (CT) değeri, örnekteki mantar yükü (mikroorganizma sayısı) ile ilişkili olduğu için kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımı yapılabileceği gösterilmiştir [108]. Mantar yükü arttıkça, tanının pnömoni olma olasılığı da artar. Ancak, farklı klinik örneklerde (alveollerde yüksek, ağız boşluğunda düşük) farklı mantar yükü beklendiği için değerlendirme örneğe göre yapılmalıdır [109]. Kantitatif PCR sonuçlarının değerlendirmesi önemlidir. IF pozitif örnekler PCP tanısı sağlar. Ancak, IF-negatif; qPCR-pozitif örnekler, enfeksiyon veya taşıyıcıya (kolonizasyon) karşılık gelir. Taşıyıcı, klinik pnömoni yokluğunda mantar veya DNA'nın varlığını ifade eder [109]. Bazı araştırmacılar iki cut-off değeri (PCP'yi tanımlayan ve dışlayan) ile kolonizasyon-enfeksiyon ayrımı yapılabileceğini ve arada tanının kesin olmadığı gri-zon belirlemeyi önermişlerdir [108-110]. Gri-zonda kalan örnekler, klinik değerlendirmelere göre yorumlanmalıdır. Ancak bazı çalışmalarda qPCR ile kolonizasyon ve PCP ayırt edilememiştir [111].

PCP tanısında her ne kadar PCR ve qPCR yöntemlerinin duyarlılığı daha yüksek olsa da PCP tanısında IF mikroskopisi tememl tanı yöntemi olmaya devam etmektedir [109].

2.8.3. Diğer Testler

- **(1->3)-β-D-glukan (BG)**

(1->3)-β-D-glukan (BG) *Pneumocystis* ve tıbbi öneme sahip *Aspergillus* ve *Candida* gibi en sık görülen enfeksiyon etkenleri dahil diğer birçok mantarın hücre duvarında bulunan polisakkarittir. Bu yüzden "pan-fungal" markırı olarak kabul edilir [109,112]. BG doğal immün yanıtı tetikler ve hem kanda, hem de BAL örneğinde tespit edilebilir. Yapılan çalışmalarda serum BG seviyesinin derin mikoz enfeksiyonlarında olduğu gibi PCP tanısında da etkili olabileceği bildirilmiştir [112]. Serum BG seviyesinin belirlenmesi ile PCP ve *Pneumocystis* kolonizasyonunu ayırt edilebilir; enfeksiyonda yüksek, kolonizasyonda düşük serum BG seviyesi görülür. Buna karşılık PCP'de bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı örneklerinde BG seviyesiyisi ile ilgili veriler azdır ve kolonizasyon-enfeksiyon ayrımında olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Serum BG seviyesinin

PCP tanısındaki doğruluğunun değerlendirildiği bir meta-analizde 14 çalışma incelenmiş ve ortalama duyarlılık ve özgüllük sırasıyla; %94.8 (%90.8-97.1) ve %86.3 (%81.7-89.9) olarak tespit edilmiştir [113]. On iki çalışmanın değerlendirildiği başka bir meta analizde ise duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %96 (%92-98) ve %84 (%83-86) olarak bildirilmiştir [114]. Serumda BG tespitindeki yüksek duyarlılık göz önüne alındığında, serum BG sonucunun negatif olması enfeksiyon riski bulunan hastalarda PCP'yi dışlamak için yararlı olabilir [109]. Ancak, BG testinin *Pneumocystis* için spesifik olmaması (pan-fungal yapısı) ve yanlış pozitif BG sonucunu açıklayabilecek birçok diğer faktörlerden dolayı PCP tanısını doğrulamak için pozitif bir BG sonucunun yeterli olmayacağı; ek bir tanı testi çalışılması gerektiği bilinmelidir [109]. Mikroskopik incelemesi negatif, PCR ve BG sonuçları pozitif hastalarda anti-PCP tedavisinin hayatta kalma oranını arttırdığı gösterilmiştir. PCR yöntemi ile birlikte BG testinin PCP ve kolonizasyon ayırımında yararlı olduğu bildirilmiştir [115].

- **S-adenosylmethionine (AdoMet)**

S-adenosylmethionine (AdoMet) biyokimyasal reaksiyonlarda metil donörü olarak rol oynar. AdoMet sentetaz, metionin ve ATP'den AdoMet oluşumunu katalize eder. AdoMet, hücrel metabolizmada önemli bir moleküldür; proteinlerin, nükleik asitlerin, lipidlerin ve polisakaritlerin metilasyonu gibi çoğu metilasyon reaksiyonu için metil donördür [116]. AdoMet esansiyel poliaminler spermidin ve spermin sentezinde gereklidir. Memeli hücrelerinin, AdoMet'i %95 transmetilasyon reaksiyonlarında %2-5 poliamin sentezinde kullandığı tahmin edilmektedir [116]. Canlılar AdoMet sentetaz ile AdoMet sentezleyebilirken; *Pneumocystis*'in AdoMet sentezleyemediği ve memeli konağından almak zorunda olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [1,116]. Buna paralel olarak, PCP'li hastalarda plazma AdoMet düzeylerinin düşük olduğu ve tedaviyle kademeli olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, plazma AdoMet düzeyinin non-invaziv bir PCP tanı yöntemi olarak kullanılması fikrini doğurmuştur [1].

Bir çalışmada AdoMet plazma konsantrasyonu ile PCP tanısı ve hastalarında tedaviye cevabı araştırılmış, çalışmaya viroloji asemptomatik HIV-1 pozitif hastalar ya da ateşli hastalıklar ile hastaneye başvuran 48 hasta; 12sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Hastaların 15'inde PCP, 18'inde bakteriyel pnömoni, 4'ünde kriptokokkoz, 6'sında HIV-1, birinde viral menenjit, birinde pulmoner aspergilloz ve birinde bronşit ile komplike konjestif kalp yetmezliği tespit edilmiştir. PCP pozitif 14 hastada AdoMet tespit edilmemiş, bir hastada 8 nmol/L tespit edilmiş, diğer hasta gruplarının AdoMet seviyeleri kontrol grubu ile anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Bakteriyel pnömonili 13/18 hasta ve PCP'li 10/15 hastada AdoMet konsantrasyonu birden fazla test edilmiş, bakteriyel pnömonide AdoMet konsantrasyonunda düşüş görülmezken, PCP'li hastalarda tedaviyle birlikte AdoMet seviyeleri artmıştır. PCP tanısında AdoMet konsantrasyonunun tespiti

duyarlı ve tedavinin gösterilmesinde yararlı bulunmuştur [117]. Başka bir çalışmada 28 PCP pozitif, 28 PCP negatif (19 Bakteriyel pnömoni, 9 Tüberküloz) hastada AdoMet konsantrasyonu PCP'li hastalarda anlamlı olarak daha düşük bulunmuş ve tedavi ile birlikte AdoMet konsantrasyonun yükseldiği bildirilmiştir [118]. Ancak önceki çalışmaların sonuçlarına aykırı olarak daha sonra yapılan çalışmalarda *Pneumocystis* türlerinin fonksiyonel bir AdoMet sentetaz kodlayan *sam1* genine sahip olduğu ve kendi AdoMet'lerini sentezleyebileceği bildirilmiştir [119].

- **Krebs von den lungen antijeni (KL-6)**

Krebs von den lungen antijeni (KL-6), yüksek moleküler ağırlığı olan epitelyal müsin ve membran glikoproteinidir. Tip 2 alveolar pnömosit ve bronşiyal epitel hücrelerden ekspres edilir; çeşitli interstisyel pnömonilerde ve tip 2 pnömosit yaralanmalarında, serumda KL-6 seviyesi artar [17-19]. PCP enfeksiyonu sırasında nötrofil ve CD8 lenfositler toplanır ve makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, interlökin (IL)-8, tümör nekroz faktör (TNF)- α gibi inflamatuvar mediatörler salınır. PCP'de inflamasyon mediatörlerinin tip 2 pnömosit hasarını ya da hiperplazisini indüklemesi sonucu serumda KL-6 seviyesi yükselir [19]. Tasaka ve ark[20]'nın bildirdiği bir çalışmada; KL-6 seviyesi PCP pozitif hastalarda, PCP negatif hastalardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak idiyopatik interstisyel pnömoni ya da kollajen vasküler ilişkili akciğer hastalığı olanlarda da KL-6 seviyesi yüksek sonuç vermiştir. Bu durumdaki yüksek KL-6 seviyesi yanlış pozitiflik yerine altta yatan hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmiştir. İntertisyel pnömonili (idiyopatik pulmoner fibroz, kollajen vasküler ilişkili interstiyel pnömoni ve PCP) hastalardaki KL-6 seviyesi kronik bronşit ve pnömonili hastalara göre daha yüksek bulunmuş ancak, *P. jirovecii* kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımının yapılamadığı bildirilmiştir [19]. HIV negatif PCP pozitif hastalarda serum KL-6 ve BG seviyesi, HIV pozitif PCP pozitif hastalardan daha düşük olduğu bildirilmiştir [120].

Son olarak; BG, KL-6, SAM ve LDH serum seviyelerinin değerlendirildiği çok merkezli bir çalışmada (145 hasta Portekiz'den, 50 hasta Hollanda'dan, 25 hasta İspanya'dan ve 40 kan donörü Portekiz'den); BG en güvenilir serolojik markır olarak bulunmuş ve bunu KL-6, LDH ve SAM izlemiştir. BG ve KL-6 kombinasyonu %94,3 duyarlılık ve %89,6 özgüllük ile en doğru PCP serolojik tanı yaklaşımı olarak tespit edilmiştir [121]. Bu sonuçlara göre BG/KL-6 testi, PCP şüphesinde ön tarama testi olarak kullanılabilir ya da solunum yetmezliği olan hastalarda ve bronkoskopi uygulanması komplikasyona neden olabilecek hastalarda, solunum yolu örneği alınmadığı durumlarda alternatif tanı testleri olabilir.

2.9. Genotiplendirme

Pneumocystis epidemiyolojisini ve suş varyasyonlarını incelemek için çeşitli moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler, *P. jirovecii* genomu üzerinde farklı lokusların kullanıldığı suş tiplendirme sistemleridir [24,25].

2.9.1. Tek lokus DNA sekans analizi

Geleneksel Sanger DNA sekans analizine dayanan, *P. jirovecii*'nin tek lokus tiplendirmesi en yaygın kullanılan yaklaşımdır. Bu yöntem, hedef bölgelerdeki bilinen veya potansiyel olarak yeni tüm dizi değişkenlerini saptayabilme avantajına sahiptir.

Pneumocystis genotiplenmesinde birçok gen bölgesi kullanılmıştır. Bunlar: Internal transcribed spacer 1 ve 2 (ITS1 ve ITS2) bölgeleri, mitokondriyal büyük alt ünite rRNA (mitochondrial large subunit; mtLSU rRNA), sitokrom b (CYB), dihidropteroat sentaz (DHPS), dihidrofolat redüktaz (DHFR), majör yüzey glikoproteini (major surface glycoprotein; MSG), beta-tubulin (beta-tub), kexin-like serin proteaz (kex1), süperoksit dismutaz (SOD) ve tioredoksin redüktaz 1 (Trr1) şeklindedir [122-130].

MtLSU rRNA ve ITS lokusları tiplendirmede en sık kullanılan bölgelerdir. ITS1 dizisi, 18S ve 5.8S rRNA genleri arasındaki nükleer rRNA operonunda bulunurken ITS2 dizisi, 5.8S ve 26S rRNA genleri arasında yer alır. Bu kodlama yapmayan lokus rRNA sentezi sırasında birleştirilir. ITS bölgesi yüksek düzeyde polimorfizm gösterir, bu yüzden genotiplendirme yöntemleri arasında ayırt ediciliği diğerlerinden daha yüksektir [25]. ITS tiplerini adlandırmada ITS1 alleleri için büyük harf, ITS2 alleleri için küçük harf kullanılır ve haplotipler iki lokustaki allellerin kombinasyonuna göre belirlenir. ITS1 için 15 allel (A-O), ITS2 için 14 allel (a-n) tanımlanmıştır [122,131]. Bu yöntemde göre toplam 210 *P. jirovecii* tipi teorik olarak mümkündür. Dünya genelinde bazıları küresel olarak yaygın, bazıları lokal olarak var olan yaklaşık 105 ITS haplotipi raporlanmıştır. *P. jirovecii* örneklerinde en sık görülen iki ITS haplotipi Eg ve Ne sırasıyla yaklaşık %50 ve %15-20 oranında tanımlanmıştır [123].

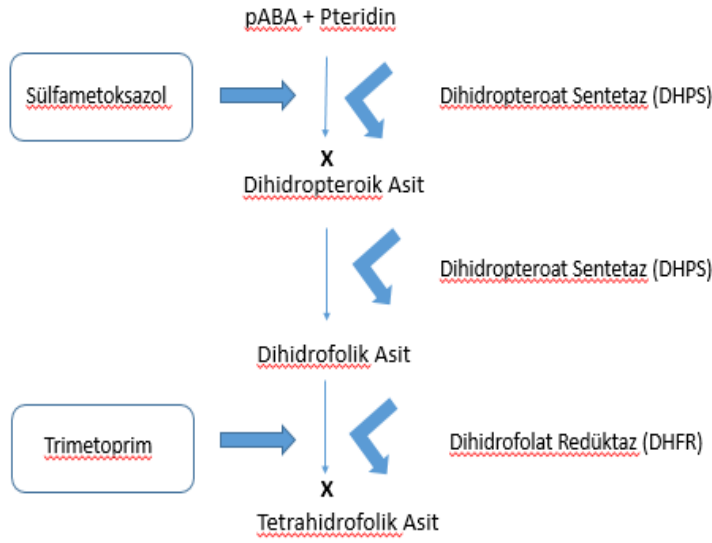
MtLSU rRNA tiplendirme için bildirilen polimorfizm miktarı ITS'den daha azdır ancak, gözlenen varyasyon, bazı önemli epidemiyolojik soruların ele alınmasına yardımcı olmuştur. Bu yöntemde amplifikasyon için nested PCR kullanılması duyarlılığı arttırmıştır [25,26]. mtLSU rRNA tiplendirme yönteminde genotipler, 85. ve 248. nükleotit pozisyonlarındaki polimorfizme göre belirlenir. Buna göre *P. jirovecii* için genotip 1: 85C/248C, genotip 2: 85A/248C, genotip 3: 85T/248C ve genotip 4: 85C/248T olmak üzere dört genotip tanımlanmıştır [26,27].

2.9.2. Multi-lokus sekans analizi

Multi-lokus genotipleme sisteminde, birden fazla gen bölgesi amplifiye edilerek DNA sekans analizleri sonucu izolatların allel kombinasyonlarına göre tiplendirme yapılır. *P.jirovecii*'nin neredeyse bilinen tüm genetik markırları, potansiyel bir MLST sistemi geliştirmek için değerlendirilmiştir [24,132-134]. MLST, tek lokus tiplendirme yöntemlerinden daha yüksek ayırım gücüne sahiptir, ancak; şu anda fikir birliği sağlanmış bir MLST sistemi mevcut değildir [24]. Genotiplendirmede markır olarak kullanılan çeşitli alellerinin ortak olarak isimlendirilmesine ihtiyaç vardır [109]. Bu hedefe ulaşmak için alellerin tanımlanmasını sağlayan (<http://mlst.mycologylab.org>) bir web sitesi oluşturulmuştur. MLST tiplendirme yaklaşımı *P.jirovecii* suş karakterizasyonunda alternatif bir tiplendirme sistemi olabilir.

2.10. İlaç Direnci

Trimetoprim-sulfametoksazol, HIV pozitif ve HIV negatif immün sistemi baskılanmış hastalarda profilaksi ve tedavi için standart ilaç olarak kullanılmaya devam etmektedir [109]. Trimetoprim ve sulfametoksazol mikroorganizmalar için selektif bir antibiyotiktir. Memeliler folik asidi besinler ile dışarıdan alırken mikroorganizmalar folik asit transport sistemine sahip olmadığı için hücre içerisinde sentezlemesi gerekir [135]. Trimetoprim ve sulfametoksazol, mikroorganizmada folik asidin fizyolojik olarak aktif formu olan, tetrahidrofolik asidin sentezini inhibe eder. Bu molekül timidin, pürin ve DNA sentezinde gerekli kofaktördür [136]. Sülfonamid, folik asit biyosentez yolağında para-aminobenzoik asidin (pABA) yapısal bir analogudur. pABA ile 7,8-dihidro-6-hidroksimetilpterin-pirofosfatın dihidropteroik aside reaksiyonunda dihidropteroat sentaz (DHPS) enzimi sulfametoksazolün etkisiyle kompetitif şekilde inhibe edilir. Trimetoprim, folik asidin yapısal bir analogudur ve dihidrofolatın tetrahidrofolata indirgenmesinde dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini kompetitif şekilde inhibe eder [135,136] (Şekil.2.1).



Şekil.2.1. Folat sentezinin sülfametoksazol ve trimetoprim ile inhibisyonu [136]

DHPS ve DHFR gen bölgesinde sinonim ve non-sinonim mutasyon gösteren polimorfizmler tanımlanmıştır. DHFR gen bölgesindeki non-sinonim polimorfizmler ile daha önceki profilaksi arasında tam bir ilişki belirlenememiştir [126,137,138]. Ancak, DHPS enzimini kodlayan folik asit sentez (*fas*) gen bölgesindeki non-sinonim iki nokta mutasyon, daha önce sülfonamid grubu ilaç kullanılması ile ilişkili bulunmuştur [21-23]. Yapılan çalışmalarda DHFR üzerinde DHPS'den daha az seçici baskı (selective pressure) olduğu bildirilmiştir [109,126]. DHPS lokusunda 165(A[~]G) ve 171(C[~]T) nükleotit pozisyonlarında meydana gelen mutasyonlar, enzimin aktif bölgesindeki proteinde, 55 (Thr[~]Ala) ve 57 (Pro[~]Ser) amino asit dizilerinde yapısal değişime neden olur. Sülfü türevi ilaçların bağlanma bölgesinde meydana gelen değişiklikler ilacın afinitesini ve inhibitör etkisini azaltarak tedavi ve profilaksiste başarısızlığa neden olur [21-23].

P. jirovecii kültür sistemleri ile üretilemediği için ilaç duyarlılık testleri in vitro yöntemlerle test edilemez. Bu yüzden ilaç direnci çalışmaları moleküler yöntemlere ve model sistem çalışmalarına dayanır. Model çalışmaları ile yapılan *P. jirovecii* ilaç direnç testi; DHPS gen bölgesi inaktive edilen *E. coli* suşlarında mutant *P. jirovecii fas* geni fonksiyonel komplemantasyon ekspresyonu ile ve *P. jirovecii fas* geni benzerliğinden yararlanan *Saccharomyces cerevisiae fol1* genindeki analog pozisyonlarda oluşturulan mutasyonların ekspresyonu ile yapılan testlerdir [23,139]. Bu testlerde DHPS gen bölgesindeki mutasyonların sülfü grubu ilaç direncine neden olduğu gösterilmiştir. DHPS gen bölgesi mutasyon analizi için; DHPS gen bölgesi nested PCR ile amplifiye edilir ve elde edilen PCR ürünlerinden sekans analizi yapılarak genetik polimorfizmler araştırılabilir [27]. Ya da sekans analizi yerine PCR ürünleri iki bölüme ayrılarak *AccI* ve *HaeIII*, kesim enzimleri ile restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemi uygulanarak

restriksiyon profillerine göre olası mutasyonlar tespit edilebilir [127]. DHPS mutasyonları tedavi ve profilaksi ile ilişkili olmasına rağmen *P. jirovecii* kolonizasyonu olan ve sülf ilaç kullanmamış taşıyıcılarda da tespit edilmektedir. Bu durum, DHPS mutant suşların kişiden kişiye bulaşması ile açıklanabilir. Bu nedenle, DHPS mutasyonları ilaç direncinin yanında epidemiyolojik belirteç olarak da kullanılabilir [109].

2.11. Tedavi ve korunma

Pneumocystis pnömonisi tedavi edilmediğinde mortal seyreden bir enfeksiyondur. *P.jirovecii* mantar olarak sınıflandırılmasına rağmen amfoterisin ve azol grubu gibi geleneksel anti-fungallere dirençlidir. Tedavi ve profilaksi için kullanılan primer ilaç, trimetoprim-sülfametoksazoldür [140].

Risk altındaki hastalarda PCP'den korunma için profilaksi önerilir. HIV pozitif hastalarda, CD4+ hücre sayısı <200 hücre/ μ l olduğunda ya da orofaringeal kandidiyazis tespit edildiğinde primer profilaksi önerilir ve CD4+ hücre sayısı 200 hücre/ μ l'nin üzerine çıkıncaya kadar üç aylık süreyle devam edilir. Hematolojik malignite ve solid tümör için sitotoksik kemoterapi alan hastalarda, organ transplantasyonu ve inflamatuvar hastalıklar için immün supresif tedavi rejimi uygulanan hastalarda immün supresyon süresi boyunca profilaksi önerilir [140]. HIV-negatif immunsupresif hastalarda, prednizon dozu 1 aydan uzun süre boyunca 20 mg/gün'ü aştığında, özellikle hastanın T hücre defekti varsa veya başka sitotoksik ilaçlar veya anti-TNF ajanları alıyorsa, profilaksi düşünülmelidir. Ayrıca profilaksi ihtiyacını belirlemek için CD4 hücre sayısı 200 hücre/ μ l eşiği kullanılabilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların profilaksisi, bu enfeksiyonun yükünü büyük ölçüde azaltmıştır [140].

PCP tespit edilen tüm immunsupresif hastaların tedavi edilmesi gerekir. Yeni ajanlara rağmen, trimetoprim-sülfametoksazol, şiddetli PCP tedavisinde en etkili rejim olmaya devam etmektedir.

Tablo 2.1. *P. jirovecii* pnömonisinde tedavi seçenekleri [140]

İlaçlar	Doz	Kullanım şekli	Yorum
Trimetoprim/ Sulfametoksazol	Günlük 15–20 mg/kg; 75–100 mg/kg, Genellikle 3 hafta	Oral veya İV	İlk seçenek
Primakin+ Klindamisin	Günlük 30 mg Günde üç kez 600mg Genellikle 3 hafta	Oral	Alternatif seçenek
Atovakuon	Günde iki kez 750 mg Genellikle 3 hafta	Oral	Alternatif seçenek
Pentamidin	4mg/kg/gün veya 600 mg/gün, Genellikle 3 hafta	İV veya aerosol	Alternatif seçenek
Yardımcı kortikosteroidler (antibiyotik ajanına ek olarak verilir)	Prednizon (veya eşdeğer başka kortikosteroid dozu) 5 gün boyunca günde iki kez 40mg, daha sonra 6-11. günlerde günde 40mg ve sonra 21. güne kadar günde 20mg	Oral veya İV	Orta ila şiddetli PCP'si olan hastalarda kullanılması önerilir (oda havasında PaO ₂ , <70 mm Hg veya alveoler-arteriyel oksijen gradyanı >35) *

IV; intravenöz.

*HIV ile ilişkili PCP için kesinlikle önerilir. AIDS ile ilişkili olmayan PCP'de düşünülebilir.

Tedavi başarısızlığı durumunda ikinci seçenek ilaçlar primakin, klindamisin kombinasyonu ya da tek başına atovakuon ya da pentamidin kullanılır. Antibiyotiklere ek olarak orta ve şiddetli PCP'si olan hastalarda kortikosteroidlerin kullanılması önerilir (oda havasında PaO₂, <70 mm Hg veya alveoler-arteriyel oksijen gradyanı >35) [140].

Tablo 2.2 *P. jirovecii* profilaksi seçenekleri [140]

İlaçlar	Doz	Kullanım şekli	Yorum
Trimetoprim/ Sulfametoksazol	Günde 1, çift tablet (160mg TMP/800 mg SMX) veya Günde 1, tek tablet (80 mg TMP/400 mg SMX) veya Haftada 3 kez, 1 çift tablet, (immün baskılanma süresi boyunca)	Oral	İlk seçenek
Dapson	Günde iki kez 50 mg veya günlük 100 mg	Oral	Hastanın glukoz-6PD eksikliği olmadığından emin olun.
Dapson + Primetamin + lökovorin	Günlük 50 mg Haftada 50 mg Haftada 25 mg	Oral	Alternatif seçenek
Dapson + Primetamin + lökovorin	Haftada 200 mg Haftada 75 mg Haftada 25 mg	Oral	Alternatif seçenek
Atovakuon	Günde iki kez 750 mg	Oral	Maksimum emilim için, yüksek yağlı öğünler önerilir.
Pentamidin	Aylık 300 mg	Aerosol	Nadiren kullanılmış; üst lob relapsı ile ilişkili olabilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 09.06.2016 tarih ve 2016/117 sayılı kurul kararı ile "Etik Kurul Onayı" nı almıştır.

Bu çalışmaya, Ağustos 2016 - Şubat 2018 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, çeşitli klinik ve yoğun bakım ünitelerinde takip edilen, klinik ve radyolojik bulguları ile (dispne, non-produktif öksürük, ateş, intertisyel pnömoni) atipik pnömoni (PCP şüphesi olan) tespit edilen hasta örnekleri dahil edildi. Hastalar hematolojik malignite, kanser, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve organ transplantasyonu gibi immün sistemi baskılayıcı tedavi gerektiren altta yatan hastalığı bulunan ya da kemoterapi tedavisi uygulanan hastalardan oluşmaktadır. Hastalardan alınan alt solunum yolu (bronkoalveolar lavaj sıvısı, indüklenmiş balgam, balgam, derin endotrakeal aspirat sıvısı örnekleri) ve serum örnekleri, rutin test işlemleri yapıldıktan sonra çalışmada kullanılmak üzere saklamaya alındı.

Solunum yolu örneklerinden mikroskopik inceleme ve PCR yapılarak *P. jiroveci* araştırıldı. Mikroskopik inceleme için Toluidin Blue O (TBO), Giemsa ve Monoklonal immünflorasan boyama yöntemi uygulandı. *P. jirovecii* nükleik asit tespiti için mtLSU rRNA gen bölgesini hedefleyen nested PCR yapıldı. Hastalardan alınan serum örneklerinde KL-6 glikoprotein seviyesi araştırıldı. *P. jirovecii* tespit edilen örneklerden trimetoprim sülfametoksazolün hedef bölgesi olan ve ilaç direnciyle ilişkilendirilen dihidropteroat sentaz (DHPS) gen bölgesi mutasyon analizi RFLP yöntemi uygulanarak, mtLSUrRNA genotiplenmesi sekans analizi yapılarak araştırıldı.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Etüv (Memmert, Almanya)
- -20°C, Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- Pasteur fırını (Memmert UE 500)
- Işık mikroskobu (Olympus cx22, Japonya)
- PH metre (Hanna, İtalya)
- Otoklav (Hirayama HV-L Series 50L, Japonya)
- +4°C, Buzdolabı (Indesit, İtalya)
- Santrifüj (Hettich-Rotofix 32A, Almanya)
- Floresan mikroskobu (EurostarII, Euroimmun, Almanya)
- Elisa okuyucu (Bitoek ELX800, ABD)

- Mikrosantrifüj (Hettich-Mikro20, Almanya)
- PCR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler, Almanya)
- Biyogüvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe, Almanya)
- Vortex (NM- 110)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30, Almanya)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra, Almanya)
- Jel dökümantasyon Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa)
- Su Banyosu (Memmert, Almanya)
- Hassas Terazı (Scaltec, Almanya)
- Mikrodalga Fırın (Beko MD 1500, Türkiye)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108, Türkiye)
- Mikropipet Seti (Brand- 0,2-2 mikrolitre, 2-20 mikrolitre, 20-200 mikrolitre)
- Isı bloğu (VWR, ABD)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- 1,4-dithiothreitol (DTT) (Merck, Almanya)
- Toluidine Blue O (Sigma, ABD)
- Hydrochloric Acid %37 (VWR, ABD)
- Acetic acid (glacial) %100 (VWR, ABD)
- Sulfiric Acid %95-97 (VWR, ABD)
- Xylene (VWR, ABD)
- Entellan (Merck, Almanya)
- Giemsa (Merck, Almanya)
- Agarose (Sigma, ABD)
- 10X TBE Electrophoresis Buffer (Thermo Scientific, ABD)
- Etidyum Bromid (Sigma, ABD)
- DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Scientific, ABD)
- 10X PCR Buffer (KCl/NH₄) (Thermo Scientific, ABD)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, ABD)
- 10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific, ABD)
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD)
- Etanol absolut (Merck, Almanya)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Fosfat buffer saline (ChemBio, Türkiye)

3.1.3. Kullanılan Enzimler

- Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific, ABD)
- AccI Restriksiyon Enzimi (Thermo Scientific, ABD)
- HaeIII Restriksiyon Enzimi (Thermo Scientific, ABD)

3.1.4. Kullanılan Kitler

- QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Almanya)
- Pneumo Cel IFA, (Cellabs, Avustralya)
- KL-6 Human Elisa Kit (Sunredbio, Çin)

3.2. Hasta Örnekleri

Hastalardan alınan alt solunum yolu örnekleri (bronkoalveolar lavaj sıvısı, indüklenmiş balgam/balgam ya da endotrakeal aspirat sıvısı) rutin işlemleri yapıldıktan sonra buzdolabında +4°C'de bekletildi. Mukoid yapıda olan solunum yolu örnekleri, distile su ile hazırlanan % 0,3'lük 1,4-dithiothreitol (DTT) ile muamele edilerek homojenize hale getirildi. Bu işlem sırasında solunum yolu örnekleri ile DTT solüsyonu eşit hacimde karıştırılarak kümelerin dağılması için iyice vortekslendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet 0,5-1 ml PBS ile resüspanse edilerek vortekslendi. Mukoid olmayan örnekler 1500 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve pellet 0,5-1 mL PBS ile resüspanse edilerek vortekslendi. İşlem sonunda konsantre hale getirilen örnekler mikroskopik inceleme ve PCR çalışmaları için ependorf tüplere bölünerek -20°C'de derin dondurucuda saklandı. Kan örnekleri 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek serumları ayrıldı ve KL-6 testleri için ependorf tüplerde -20°C'de saklandı.

3.3 Mikroskopik İnceleme

Solunum yolu örneklerinden lamlara yayma hazırlanarak kurultuldu ve preparatlar Giemsa ve toluidin blue O (TBO) boyama yöntemleri ile boyandı.

3.3.1. Giemsa Boyama

Preparatlar metanol ile tespit edilerek, stok Giemsa (Merck, Almanya) boyasından %5 oranında seyreltilen çalışma boyası ile 30 dakika boyandı. Preparatlar ışık mikroskobu ile 40x ve 100x objektifler kullanılarak incelendi.

3.3.2. Modifiye Toluidin Blue O (TBO) boyama

Toluidin blue O boyama yöntemi, Gosey ve arkadaşlarının önerdiği prosedür referans alınarak uygulandı [141].

3.3.2.1. Boyama Solusyonlarının Hazırlanması:

Sulfasyon reaktifi: Soğuk su bulunan kabın içerisine yerleştirilen cam şale içerisine 45 ml glasiyel asetik asit eklendi, üzerine 15 ml sülfürik asit yavaşça eklendi. Bu aşamada sıçramaya neden olmamak için dikkatli olunması gerekir. Solusyon cam çubukla karıştırıldı. Sulfasyon solusyonu oda ısısında bekletilerek bir hafta kullanılabilir.

TBO solusyonu: 0,3 g TBO, 60 ml distile su içerisinde çözüldü, içerisine 2 ml hidroklorik asit ve 140 ml absolut etanol eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan solusyon oda ısısında saklanarak bir yıl kullanılabilir.

Diğer reaktifler: 2 cam şale %95 etil alkol, 2 cam şale absolut etil alkol ve ksilen (ksilen yerine xyless kullanılabilir) hazırlandı. Solusyonlardan %95'lik etil alkol rengi koyulaştığında, absolut alkol ve ksilen ayda bir ya da rengi koyulaştığında değiştirilir.

3.3.2.2. TBO Boyama Prosedürü:

- TBO boyama için hazırlanan preparatlar kuruduktan sonra pens yardımıyla sülfasyon solusyonu içeren şaleye yerleştirildi ve cam çubukla karıştırıldı, bu işlem 5 dakika sonra tekrarlandı ve lamalar toplam 10 dakika sulfasyon solusyonunda bekletildi.
- Sulfasyon solusyonundan çıkartılan preparatlar cam lam tutacağına yerleştirilerek soğuk çeşme suyu altında 5 dakika yıkandı.
- Preparatlar TBO boya şalesi içerisinde 3 dakika bekletilerek boyandı.
- Preparatlar %95'lik etil alkol şalelerine (2 şale) daldırılıp çıkartıldı, yaklaşık 10'ar saniye bekletildi.
- Preparatlar absolut etil alkol şalelerine (2 şale) daldırılıp çıkartıldı, yaklaşık 10 saniye bekletilerek ileri dekolarizasyon işlemi yapıldı.

- f) Lamlar ksilen şalelerine (2 şale) daldırılıp çıkartıldı, yaklaşık 10 saniye bekletilerek temizlenmesi sağlandı.
- g) Lamların arkası ve buzlu cam bölgesi kağıt havlu ile silinerek kurutuldu. Steril pastör pipeti ile lamın üzerine az miktarda entellan eklenerek lamın örnek bulunan kısmı lamelle kapatıldı.
- h) Preparatlar ışık mikroskobu ile 20x, 40x ve 100x objektifte incelendi. İmmersiyon yağı ile incelemek için lamın kurumuş olması gerekir.
- i) **Değerlendirme:** TBO boyama yöntemi, *Pneumocystis*'in kist formlarını boyar ve kistler lavanta renginde görünür. Sülfasyon solusyonu preparatın arka planında kalan materyalleri parçalayarak uzaklaştırır ve zeminin temiz olmasını sağlar. Fungal elementler sülfasyon işleminden etkilenmez. Preparatta tek kist görüldüğünde kist kümesi aranması gerekir çünkü TBO boyama ile mayalar ve diğer mantar elemanları da boyanır. *Pneumocystis* kistleri tomurcuk yapmaz, bu yüzden tomurcuk oluşturmayan maya hücreleri (mayalar daha ovaldir) *Pneumocystis* kistlerine benzer görünür. Kistler lavanta renginde, yaklaşık 5 µm çapında biçimsiz bir yapıda görülür. Kistler bal peteği şeklinde yapı gösterebilir ve çoğunlukla küme şeklindedir.

3.3.3. İmmünflorasan Boyama Yöntemi

Monoklonal immünfloresan boyama yöntemi, Pneumo Cel Indirect IF Test (Cellabs, Avustralya) kiti kullanılarak yapıldı. İmmünfloresan boyama için mukoid yapıda olan solunum yolu örnekleri, daha önce %0,3'lük 1,4-dithiothreitol ile muamele edilerek homojenize hale getirildi ve santrifüjlenerek konsantre edildi.

3.3.3.1. Lamların Hazırlanması:

Her bir lam kuyusuna 25 µl örnek eklenerek havada kurutuldu ve 5 dakika aseton ile fikse edildi. Hazırlanan lam hemen boyanmayacaksa 0°C'nin altında bir sıcaklıkta birkaç hafta bekletilebilir.

3.3.3.2. İmmünflorasan Boyama Prosedürü

- a) Fikse edilmiş lamların her kuyucuğuna 25 µl RP2 monoklonal reaktifi eklendi.
- b) Lamlar 37°C'de karanlık ve nemli ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- c) İnkübasyon sonunda lamlar PBS banyosunda yavaşça yıkandı ve fazla nemi gidermek için kuruması sağlandı.

- d) Lam kuyularına 25 µl anti-mouse Ig FITC reaktifi RM örneğe eklendi.
- e) Lamalar 37°C'de 30 dakika karanlık ve nemli ortamda inkübe edildi.
- f) İnkübasyon sonunda lamalar PBS banyosunda yavaşça yıkandı ve fazla nemi gidermek için kuruması sağlandı.
- g) Lam kuyusu üzerine bir damla RMF eklenerek hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamelle kapatıldı.
- h) Lamalar floresan mikroskopta (530 nm dalga boyu) 40x ve 100x objektifler ile incelendi.
- i) **Değerlendirme:** İmmün floresan boyama sonunda *Pneumocystis*'in kalın kist duvarı ve pleomorfik trofozoitleri parlak, elma yeşili floresans verir. Organizma tekli ya da daha yaygın olarak küme şeklinde görülür. İki ya da daha fazla kist görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Karakteristik morfolojik şekilde floresans vermeyen örnekler negatif olarak değerlendirildi.

3.4. KL-6 ELISA Testi

Serum örneklerinden KL-6 seviyesi tespiti için Human KL-6 ELISA Kit (SunRed, Çin) kullanıldı. KL-6'nın tam adı Human Krebs von den Lundgen-6 (KL-6)'dır ve test serumdaki KL-6 seviyesini tespit eder. Test kiti çift antikor sandviç ELISA yöntemine dayanır. KL-6, enzim işaretli antikorla kaplandıktan sonra biotin işaretli antikorlarla bağlanır ve streptavidin-HRP eklenir. Yıkama işlemi ile serbest enzimler uzaklaştırılır. Kromojen içeren solusyon (solusyon A, B) eklenir, sıvının rengi mavi olur ve asit etkisiyle sarıya döner. Renk yoğunluğu KL-6 konsantrasyonuyla korelasyon gösterir.

3.4.1. Kit İçeriği

Standart (1600U/mL), Standart diluent, Mikroelisa Strip Plak, Str-HRP-konjugat reaktifi, 30X yıkama solusyonu, Biotin-KL-6 Ab, Kromojen Solusyon A ve B, Stop Solusyon ve Mikroplak kapatma membranı.

3.4.2. Test Prosedürü

Kit kullanılmadan önce oda ısısına gelmesi sağlandı. Kantitasyon, test örneklerinin ve standartların kantitasyonuna bağlıdır. Kantitasyon gerekliliğine göre her örnek çiftler halinde çalışılabilir. Bu çalışmada her örnek tek mikroplak kuyusunda çalışıldı.

3.4.2.1. Standart reaktiflerin hazırlanması:

- a) 800U/ml Standart 5 hazırlamak için 120 µl orijinal standart ile 120 µl standart diluent karıştırıldı.
- b) 400U/ml Standart 4 hazırlamak için 120 µl standart 5 ile 120 µl standart diluent karıştırıldı.
- c) 200U/ml Standart 3 hazırlamak için 120 µl standart 4 ile 120 µl standart diluent karıştırıldı.
- d) 100U/ml Standart 2 hazırlamak için 120 µl standart 3 ile 120 µl standart diluent karıştırıldı.
- e) 50U/ml Standart 1 hazırlamak için 120 µl standart 2 ile 120 µl standart diluent karıştırıldı.

3.4.2.2. Örneklerin Mikroplak Kuyularına Eklenmesi:

- a) Blank kuyuları: Sadece kromojen solusyon A, B ve stop solusyon eklendi. Diğer solusyonlar ya da örnek serumu eklenmedi.
- b) Standart kuyuları: 50 µl standart, 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Standartlar biotin işaretli antikorla kombine olduğu için antikor eklenmesine gerek yoktur.
- c) Test kuyuları: 40 µl örnek eklendi, sonra 10 µl KL-6 antikor ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Mikroplak sızdırmaz membran ile kapatıldı ve yavaşça çalkalanarak 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- d) 30x yıkama tamponu, distile su ile 30 kat sulandırıldı.
- e) Yıkama işlemi: Mikroplak üzerinden membran kaldırıldı, kuyulardaki sıvı uzaklaştırıldı ve kuyulara 350 µl yıkama tamponu eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi, kalan su sallanarak uzaklaştırıldı.
- f) Her kuyuya 50 µl kromojen solusyon A ve 50 µl kromojen solusyon B eklendi. Yavaşça karıştırılarak karanlık ortamda 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- g) Reaksiyonu durdurma: Her kuyuya 50 µl stop solusyonu eklendi, bu aşamadan sonra sıvının rengi asit etkisiyle maviden sarıya döner.
- h) Sonuçların elde edilmesi: Blank kuyusu sıfır olarak alındı. Stop solusyonu eklendikten sonra ki 15 dakika içerisinde mikroplak okuyucu ile optik dansite 450 nm dalga boyu altında hesaplandı.
- i) Standartların konsantrasyonlarına ve karşılık gelen OD değerlerine göre standart eğri oluşturuldu. Daha sonra örneklerin OD değerlerine uygulanarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

- j) Hesaplama: Standart yoğunluklar yatay, OD değerler dikey alınır ve standart eğri grafiği çizilir. Test aralığı: 5U/ml-1500U/ml

3.5. *P. jrovecii* PCR

PCR işlemlerinde olası kontaminasyonları önlemek için, ekstraksiyon, reaktiflerin hazırlanması ve amplifikasyon prosedürleri farklı mikropipet setleri ile ayrı odalarda yapıldı.

3.5.1. Nükleik Asit İzolasyonu:

DNA izolasyonu QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Almanya) ile kan ve vücut sıvılarından DNA izolasyonu protokolü uygulanarak yapıldı.

3.5.1.1. Kit İçeriği:

QIAamp Mini Spin Kolonlar, Toplama Tüpleri, Buffer AL, Buffer AW1 (konsantre), Buffer AW2, Buffer AE, QIAGEN proteaz, Proteaz çözücü.

3.5.1.2. DNA İzolasyon Prosedürü: Kan ve vücut sıvılarından DNA izolasyonu prosedürü uygulandı.

Reaktiflerin Hazırlanması: Proteaz çözücü liyofilize Qiagen proteaz flakonuna pipetlenerek kullanıma hazır hale getirildi. Konsantre olarak bulunan Buffer AW1 ve Buffer AW2'ye kullanmadan önce şişe etiketinde yazan miktar kadar etanol eklendi.

- 1) İlk olarak DNA izolasyonu yapılacak her örnek için 20 µl QIAGEN proteaz 1.5 ml'lik ependorf tüplere pipetlendi ve üzerine 200 µl örnek eklendi. Eğer örnek 200 µl'den az ise üzeri uygun hacimde PBS eklenerek tamamlandı.
- 2) Ependorf tüplere 200 µl AL buffer eklenerek 15 sn vortekslendi. Lizisin etkili olması için AL buffer ve örnek homojen olarak karışmalıdır. Proteaz enzimi doğrudan AL buffer üzerine eklenmemelidir.
- 3) Örnek karışımı 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 4) İnkübasyon sonunda örneklerin üzerine 200 µl etanol (%96-100) eklenerek 15 sn vortekslendi.
- 5) Örnek karışımı bu aşamada QIAamp mini spin kolonuna (2 ml toplama tüpü) aktarıldı ve 6000 g (8000rpm)'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası mini spin kolon temiz toplama

tüpüne aktarıldı ve filtrat içeren tüp atıldı. Eğer lizatın tamamı kolondan geçmemişse daha hızlı santrifüjleyerek örneğin tamamının kolondan geçmesi sağlandı.

- 6) Spin kolon dikkatlice açılarak 500 µl buffer AW1 eklendi ve 6000 g (8000rpm)'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolon temiz toplama tüpüne aktarıldı ve filtrat atıldı.
- 7) Spin kolon dikkatlice açılarak 500 µl buffer AW2 eklendi ve yüksek hızda (20,000 g; 14000 rpm) 3 dk santrifüj edildi.
- 8) Alltaki filtrat atılarak yüksek hızda 1 dk daha santrifüj edildi.
- 9) Spin kolon temiz 1.5 ml ependorf tüpe aktarıldı ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı. Spin kolon dikkatlice açılarak 120 µl buffer AE eklendi. Oda ısısında 5 dk inkübe edilerek 6000 g (8000rpm)'de 1 dk santrifüj edildi.
- 10) Elde edilen DNA örnekleri PCR çalışmaları için -20°C'de saklandı.

3.5.2. PCR Reaksiyonu

Çalışmada PCR ile *Pneumocystis* tanısı nested PCR (iki turlu PCR; nPCR) yöntemi ile mtLSU rRNA (mitochondrial large subunit ribosomal RNA) gen bölgesi hedeflenerek yapıldı. PCR için kullanılan primerler: Birinci tur için, pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3') ve pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3'); ikinci tur için, 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 kullanıldı [142-144]. PCR reaksiyon karışımı her bir örnek için 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Birinci tur PCR amplifikasyon karışımı; 5 µl 10x reaksiyon tamponu, 4 µl MgCl₂ (25 mM stok), 1 µl dNTP miks (10 mM stok), 0,5 µl her primerden (100 µM stok), 0,25 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl stok), 8 µl DNA ekstraksiyon örneği ve son hacmi 50 µl'ye tamamlayacak miktarda steril distile su eklenerek hazırlandı. İkinci tur PCR bileşenleri benzer şekilde hazırlandı ve birinci tur PCR amplifikasyon ürününden 3 µl örnek, nested PCR için kalıp DNA olarak kullanıldı. Termal döngü profili, ilk amplifikasyon için 40 döngü, nested PCR amplifikasyonu için 35 döngü olarak uygulandı. Termal döngü programı, 94°C'de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından 40 döngü; 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 1,5 dakika ve son uzama basamağı için 72°C'de 5 dakika olacak şekilde düzenlendi (Tablo3.1). İkinci tur amplifikasyon için termal döngü koşulları primer bağlanma sıcaklığı (annealing) 50°C hariç aynı termal döngü programı kullanıldı.

Tablo 3.1. mtLSU-rRNA PCR amplifikasyon koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	5	1
Denatürasyon	94	1	40 (ikinci tur için 35)
Primer bağlanması (annealing)	55 (ikinci tur için 50)	1	
Zincir uzaması (extension)	72	1,5	
Son uzama (Final extension)	72	5	1
Muhafaza	4	∞	∞

Thermal Cycler cihazında amplifiye edilen ürünler, etidyum bromür (0.1 µl/ml) içeren %1'lik agaroz jelde 120-volt altında 40 dakika elektroforeze tabi tutulduktan sonra ultraviyole ışık altında görüntüledi. Birinci ve ikinci tur PCR ürünlerinden sırasıyla 346 ve 263 baz çifti (bç) uzunluğunda bant elde edilen örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

3.6. *Pneumocystis jirovecii* Genotiplendirme

Bu çalışmada, DHPS lokus mutasyon analizi için nested PCR ve RFLP yöntemi, mtLSU rRNA genotiplendirmesi için nested PCR ve sekans analizi yapıldı.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan primerler

Hedef Bölge	PCR	Primerler
MtLSU RNA	1.Tur	pAZ102-E 5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3' pAZ102-H 5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3'
	2.Tur	pAZ102-X 5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3' pAZ102-Y 5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3'
DHPS	1.Tur	F1 5'-CCT GGT ATT AAA CCA GTT TTG CC-3' B45 5'-CAA TTT AAT AAA TTT CTT TCC AAA TAG CAT C-3'
	2.Tur	AHUM 5'-GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AAT C-3' BN 5'-GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC-3'

3.6.1. DHPS Lokus Mutasyon Analizi

3.6.1.1. DHPS Gen Bölgesi Amplifikasyonu

Çalışmada DHPS lokus mutasyon analizi için DHPS gen bölgesi nested PCR yöntemi ile amplifiye edildi. PCR için kullanılan primerler: Birinci tur için F1 (5'-CCT GGT ATT AAA CCA GTT TTG CC-3') ve B45 (5'-CAA TTT AAT AAA TTT CTT TCC AAA TAG CAT C-3'); ikinci tur için AHUM (5'-GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AAT C-3') ve BN (5'-GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC-3') primerleri kullanıldı [27,127].

PCR reaksiyon karışımı her bir örnek için 50 µl hacimli olacak şekilde hazırlandı. Birinci tur PCR amplifikasyon karışımı; 5 µl 10x reaksiyon tamponu, 4 µl MgCl₂ (25 mM stok), 1 µl dNTP miks (10 mM stok), 0,5 µl her primerden (100 µM stok), 0,25 µl Taq DNA polimeraz (5 U/µl stok), 6 µl DNA ekstraksiyon örneği ve son hacmi 50 µl'ye tamamlayacak miktarda steril distile su eklenerek hazırlandı. İkinci tur PCR bileşenleri benzer şekilde hazırlandı ve birinci tur PCR amplifikasyon ürününden 3 µl örnek, nested PCR için kalıp DNA olarak kullanıldı. Termal döngü profili, ilk amplifikasyon için 40 döngü, nested PCR amplifikasyonu için 35 döngü olarak uygulandı. Termal döngü programı, 94°C'de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonun ardından 40 döngü; 94°C'de 1 dakika, 53°C'de 1 dakika, 72°C'de 1,5 dakika ve son uzama basamağı için 72°C'de 5 dakika olacak şekilde düzenlendi. İkinci tur amplifikasyon için termal döngü koşulları primer bağlanma sıcaklığı (annealing) 55°C hariç aynı termal döngü programı kullanıldı.

Thermal Cycler cihazında amplifiye edilen ürünler, etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 120-volt altında 40 dakika elektroforeze tabi tutulduktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülendi. Birinci ve ikinci tur PCR ürünlerinden beklenen bantlar sırasıyla 895 ve 371 baz çifti (bç) uzunluğundadır [127]. İkinci tur PCR sonucu pozitif olan örneklerden mutasyon analizi için RFLP yöntemi uygulandı. RFLP yöntemi için *AccI* (Thermo Scientific) ve *HaeIII* (Thermo Scientific) restriksiyon enzimleri kullanıldı.

3.6.1.2. DHPS Gen Bölgesi RFLP Reaksiyonu

DHPS bölgesi restriksiyon işlemi, her bir örnek için hem *AccI* hem de *HaeIII* enzimi ile 21 µl hacimli reaksiyon karışımı hazırlanarak yapıldı. Reaksiyon karışımı; 9 µl PCR ürünü, 2 µl 10x reaksiyon buffer, 9 µl steril distile su ve 1 µl restriksiyon enzimi (10 U/µl stok) eklenerek hazırlandı. Örnekler thermal cycler cihazında 37°C'de 16 saat inkübe edildikten sonra 80°C 20 dakika termal inaktivasyon yapıldı. RFLP reaksiyonu ile kesim işlemi yapılan ürünler, etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde 120-volt altında 50 dakika elektroforeze tabi tutulduktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülendi.

AccI (XmiI) enzimi (5'...G T ↓ M K A C...3'); (3'...C A K M ↑ T G...5').

HaeIII (BsuRI) enzimi: (5'...G G ↓ C C...3'); (3'... C C ↑ G G...5').

3.6.1.3. RFLP Sonuçlarının Değerlendirilmesi

DHPS gen bölgesindeki 165. ve 171. nükleotit pozisyonlarındaki olası mutasyonlar elektroforez görüntülerinden elde edilen restriksiyon profillerine göre belirlendi. Mutasyonlar restriksiyon enzim aktivitesini inhibe eder. Restriksiyon profillerine göre 165. ve 171. nükleotit pozisyonlarındaki mutasyonlar aşağıdaki gibidir [127].

- **Wild type (W165/W171):** 165. ve 171. nükleotit pozisyonlarında mutasyon olmadığına *AccI* enzimi ile kesim yapıldığında 229 ve 142 bç uzunluğunda 2 fragment; *HaeIII* ile kesim yapıldığında 221, 131 ve 19 bç uzunluğunda 3 fragment elde edilir.
- **Mutant (M165/W171):** 165. pozisyonundaki nükleotit mutasyonunda *AccI* ile kesim yapıldığında 371 bç kesilmemiş fragment, *HaeIII* ile kesim yapıldığında 221,131 ve 19 bç uzunluğunda 3 fragment elde edilir.
- **Mutant (W165/M171):** 171. nükleotit pozisyonunda mutasyon, *AccI* ile kesim yapıldığında 229 ve 142 bç uzunluğunda 2 fragment, *HaeIII* ile kesim yapıldığında 352 ve 19 bç uzunluğunda 2 fragment elde edilir.
- **İkili mutasyon (M165/M171)** 165. ve 171. nükleotit pozisyonlarında mutasyon durumunda *AccI* ve *HaeIII* ile kesim yapıldığında sırasıyla 371 bç kesilmemiş fragment, 352 ve 19 bç uzunluğunda 2 fragment görüntülenir.

3.6.2. mtLSU rRNA Gen Bölgesine Göre Genotiplendirme

3.6.2.1. mtLSU rRNA Gen Bölgesi Amplifikasyonu

Çalışmada PCR ile *Pneumocystis* tanısı nested PCR yöntemi ile mtLSU rRNA gen bölgesi hedeflenerek yapıldı. Örneklerin amplifikasyonu ve jel elektroforezi yukarıda "3.5.2. PCR reaksiyonu" başlıklı bölümde anlatıldığı gibi yapıldı. Jel elektroforezi sonunda birinci ve ikinci tur PCR ürünlerinden sırasıyla 346 ve 263 baz çifti (bç) uzunluğunda bant elde edilen örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

3.6.2.2. Sekans Analizi

Nested PCR ile *P. jirovecii* tespit edilen örneklerin amplifikasyon ürünleri dış merkezde Sanger dizileme yöntemi ile ABI Prism 3130 Genetic Analyzer cihazı kullanılarak DNA dizileri elde edildi. Sekans sonuçları Chromas programı (versiyon 2.6.6 Technelysium Pty Ltd, Avustralia) ile değerlendirildi. Elde edilen diziler ve referans *Pneumocystis* sekansı (Genbank accession number M58605.1) [58], Clustal X (versiyon 2.1) programı ile hizalanarak karşılaştırıldı ve genotip analizi yapıldı.

3.6.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Genotipler 85. ve 248. nükleotit pozisyonundaki polimorfizmlere göre belirlendi. *Pneumocystis* mtLSU rRNA polimorfizmine göre tanımlanmış genotipler; genotip 1: 85C/248C, genotip 2: 85A/248C, genotip 3: 85T/248C ve genotip 4: 85C/248T şeklindedir [27].

3.7. PCP ve Kolonizasyon Sınıflandırması

P. jirovecii araştırılan örneklerde mikroskopik inceleme negatif, PCR pozitif olduğu durumlarda kolonizasyon ve PCP ayrımı için daha önce araştırmacılar tarafından tanımlanan kriterler kullanılmıştır [145,15].

a) Kesin PCP: Dispne, öksürük, ateş gibi tipik klinik belirtilerin olması, akciğer grafisinde infiltratların tespit edilmesi ya da bilgisayarlı tomografide buzlu cam opasitelerinin görülmesi, solunum yolu örneklerinde kültür negatifliği, anti-PCP tedavisi ile semptomların çözülmesi veya tedavi almayan hastaların eksitus olması, *P. jirovecii* kist ve trofik yapılarının mikroskopik yöntemlerle gösterilmesi PCP tanısını sağlar.

b) Muhtemel PCP: Tipik klinik ve radyolojik bulguların olması, solunum yolu örneklerinde kültür negatifliği, anti-PCP tedavisine yanıt alınması ve mikroskopik yöntemler ile negatif sonuç alınması muhtemel PCP olarak tanımlanmıştır.

c) Olası PCP: Tipik klinik bulguların yanında değişken radyolojik bulguların olması, mikroskopik yöntemler ile negative sonuç alınması ve anti-PCP ile semptomların çözülmesi, olası PCP olarak tanımlanmıştır.

d) Kolonizasyon: PCR pozitif, mikroskopik yöntemlerin negatif olduğu durumlarda atipik klinik ve radyolojik bulguların olması, solunum yolu örneklerinden başka bir etkenin üremesi ve antibiyotik tedavisi ile semptomların çözülmesi kolonizasyon olarak tanımlanmıştır.

3.8. İstatistiksel Yöntem

Sürekli değişkenler normal dağılım varsayımı sağlandığı durumda ortalama (değişim aralığı), sağlanmadığı durumda medyan [min-max] şeklinde özetlenmiştir. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde cinsinden özetlenmiştir. Sürekli bir değişken bakımından iki grup arasında fark olup olmadığını incelemek için Mann Whitney U testinden yararlanılmıştır. Oranlar arasındaki farklılıklar için iki oran z testinden yararlanılmıştır. KL-6 parametresinin grupları ayırmadaki başarısını değerlendirmek için ROC analizinden yararlanılmış ve kesim noktası elde edilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Değerlendirilmesi

Bu çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde, Ağustos 2016 - Şubat 2018 tarihleri arasında, çeşitli klinik ve yoğun bakım ünitelerinde yatan ve atipik pnömoni bulgusu olan, 96 hastanın solunum yolu ve serum örneği dahil edildi. Çalışmaya alınan hasta örneklerinin 88 (%91,6)'i balgam/indiklenmiş balgam, 6 (%6,3)'sı trakeal aspirat ve 2 (%2,1)'si bronko alveolar lavaj örneğidir. Örneklerin 79 (%82,3)'ü servis ve 17 (%17,7)'si YBÜ'de yatan hasta örneklerinden oluşmaktadır (Tablo 4.1).

Çalışmadaki 96 hastanın 64 (%67)'ü erkek, 32 (%33)'si kadın olup, hastaların yaş ortalaması 60 ve yaş aralığı 18 ile 90 yıl arasında değişmektedir. Hastaların 39 (%40,62)'u solid organ tümörü, 27 (%28,12)'si hematolojik malignite, 5 (%5,20)'i organ transplantasyonu, 4 (%4,16)'ü HIV/AIDS, 3 (%3,13)'ü otoimmün hastalıklar, 12 (%12,50)'si KOAH, 3 (%3,13)'ü intersitisyel akciğer hastalığı ve 3 (%3,13)'ü diğer hastalıklar nedeniyle tedavi görmektedir (Tablo 4.2). İmmüsupresif tedavi alan 72 (%75) hastanın 44'ü sadece kemoterapi, 15'i sadece steroid, 8'i kemoterapi ve steroid, 5'i anti-rejeksiyon tedavisi alan hastalardan oluşmaktadır.

Tablo 4.1. Hasta örneklerinin kliniklere göre dağılımı

Bölümler		Hasta Sayısı n (%)	Toplam n (%)
Servis	Göğüs hastalıkları	23 (23,97)	79 (82,30)
	Hematoloji	21 (21,88)	
	Onkoloji	19 (19,79)	
	Nefroloji	7 (7,29)	
	Enfeksiyon hastalıkları	3 (3,13)	
	Beyin cerrahi	1 (1,04)	
	Endokrinoloji	1 (1,04)	
	Fizik tedavi	1 (1,04)	
	KBB hastalıkları	1 (1,04)	
	Nöroloji	1 (1,04)	
	Üroloji	1 (1,04)	
Yoğun bakım ünitesi	Göğüs hastalıkları	5 (5,20)	17 (17,70)
	Nefroloji	4 (4,16)	
	Hematoloji	3 (3,13)	
	Onkoloji	3 (3,13)	
	Enfeksiyon hastalıkları	1 (1,04)	
	Göğüs cerrahi	1 (1,04)	

Tablo 4.2. Hastaların alta yatan hastalık gruplarına göre dağılımı

Alta yatan hastalıklar	Toplam hasta sayısı n: 96 (%)	<i>P. jirovecii</i> pozitif hasta sayısı n: 16 (%)
<i>Hematoloji maligniteler</i>	27 (28,12)	3 (18,75)
• Lösemi	15 (15,62)	-
• Lenfoma	4 (4,17)	2 (12,5)
• Multiple myeloma	6 (6,25)	1 (6,25)
• Myelodisplastik sendrom	2 (2,08)	-
<i>Solid tümörler</i>	39 (40,62)	6 (37,5)
• Akciğer kanseri	22 (22,91)	4 (25,0)
• Diğer kanserler	17(17,71)	2 (12,5)
<i>Organ nakli</i>	5 (5,20)	-
• Böbrek nakli	5 (5,20)	-
<i>HIV/AIDS</i>	4 (4,16)	3 (18,75)
<i>Otoimmün hastalıklar</i>	3 (3,13)	-
• Romatoid artrit	2 (2,08)	-
• Ankilozan spondilit	1 (1,04)	-
<i>Diğer hastalıklar</i>	18 (18,75)	4 (25,0)
• KOAH	12 (12,50)	2 (12,5)
• intersitisyel akciğer hastalığı	3 (3,13)	2 (12,5)
• Kronik böbrek yetmezliği, DM	2 (2,08)	-
• Kronik kalp yetmezliği, DM	1 (1,04)	-
<i>İmmüsupresif tedavi</i>	72 (75)	11 (68,75)
• Sadece kemoterapi	44 (45,83)	6 (37,5)
• Anti-rejeksiyon	5 (5,21)	-
• Sadece steroid	15 (15,62)	4 (25,0)
• Kemoterapi ve steroid	8 (8,33)	1 (6,25)

4.2. Mikroskopik İnceleme ve PCR Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 96 hastanın 16 (%16,7)'sında PCR, 5 (%5,2)'inde IFA, 3 (%3,1)'ünde TBO ve 2 (%2,1)'sinde Giemsa yöntemi ile *P. jirovecii* tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Boyama yöntemlerinden Giemsa ve TBO ile pozitif olan örnekler IFA yöntemi ile de pozitif bulunmuştur. IFA referans alındığında; Giemsa için duyarlılık %40, özgüllük %100; TBO için duyarlılık %60, özgüllük %100; PCR için duyarlılık %100, özgüllük %87,9 tespit edilmiştir. *P. jirovecii* tespit edilen hastaların 11 (%69)'i erkek, 5 (%31)'i kadın ve yaş ortalaması 61 (yaş aralığı 40-82)'dir. PCR pozitif hastaların alta yatan hastalıkları; 6 kanser, 3 hematolojik malignite, 3 HIV/AIDS, 2 KOAH ve 2 intersitisyel akciğer hastalığı şeklindedir (Tablo 4.2). *P. jirovecii* saptanan hastaların 11 (%68,75)'i immüsupresif tedavi alan, 3 (%18,75)'ü ise immünkompetandır. Çalışmaya dahil edilen 4 HIV/AIDS pozitif hastanın 3'ünde *P. jirovecii* saptanmıştır.

PCR pozitif 16 hastadan mikroskopik incelemenin de pozitif olduğu 5 hasta kesin PCP (3 HIV/AIDS, 1 akciğer kanseri, 1 interstisyel akciğer hastalığı), 3 hasta olası PCP (1 multipl myelom, 1 interstisyel akciğer hastalığı, 1 kolanjiyosellüler karsinom) olarak tanımlanmıştır. PCR pozitif

diğer 8 hasta kolonizasyon olarak kabul edilmiştir (Tablo 4.3). *P. jirovecii* tespit edilen hastaların bilgileri tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. PCR ve mikroskopik inceleme sonuçları

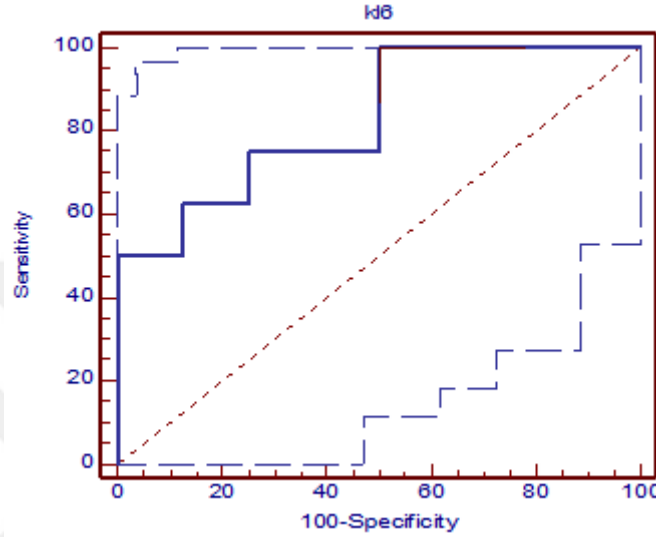
Hasta no	PCR	IFA	TBO	Giemsa	Klinik değerlendirme
2	pozitif	-	-	-	Kolonizasyon
6	pozitif	-	-	-	Kolonizasyon
8	pozitif	pozitif	-	-	PCP
20	pozitif	-	-	-	Kolonizasyon
28	pozitif	-	-	-	Olası PCP
32	pozitif	-	-	-	Kolonizasyon
56	pozitif	pozitif	-	-	PCP
60	pozitif	pozitif	pozitif	-	PCP
62	pozitif	-	-	-	Olası PCP
68	pozitif	-	-	-	Kolonizasyon
70	pozitif	-	-	-	Kolonizasyon
73	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	PCP
85	pozitif	-	-	-	Kolonizasyon
86	pozitif	-	-	-	Olası PCP
90	pozitif	-	-	-	Kolonizasyon
98	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	PCP

Tablo 4.4. Hastaların klinik ve demografik özellikleri

	PCR Pozitif n=16	PCR Negatif n= 80	P değeri
Yaş ortalama (yaş aralığı yıl)	61 (40-82)	60 (18-90)	0,743
Cinsiyet, erkek	11 (%69)	53 (%66)	0,846
Hematoloji maligniteler	3 (%18,75)	24 (%30,0)	0,542
Solid tümörler	6 (% 37,5)	33 (%41,25)	1,000
Organ nakli	-	5 (%6,25)	-
HIV/AIDS	3 (%18,75)	1 (%1,25)	0,012*
Otoimmün hastalıklar	-	3 (%3,75)	-
KOAH	2 (%12,5)	10 (%12,5)	0,678
intersitisyel akciğer hastalığı	2 (%12,5)	1 (%1,25)	0,115
Diğer hastalıklar	-	3 (%3,75)	-
İmmüsupresif tedavi	11 (%68,75)	61 (%76,25)	0,752
• Sadece kemoterapi	6 (%37,5)	38 (%47,5)	0,647
• Anti-rejeksiyon	-	5 (%6,25)	-
• Sadece steroid	4 (%25,0)	11 (%13,75)	0,451
• Kemoterapi ve steroid	1 (%6,25)	7 (%8,75)	0,869
Mikrobiyoloji kültüründe üreme	8 (%50,0)	29 (%36,25)	0,453
Trimetropim-Sülfametaksazol tedavi veya profilaksi	4 (%25,0)	18 (%22,5)	0,913
KL-6, medyan[Min-Max]	467,0[49,0-1501,0]	416,4[49,0-1501,0]	0,454

*Yukarıdaki tabloda sadece HIV/AIDS olanların oranı PCR pozitif ve negatif gruplar arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir($p=0,012$). PCR pozitif grupta HIV/AIDS olanların oranı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. KL-6 için PCR pozitif ve negative gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Tablo 4.4).

4.3.KL-6 sonuçları



Şekil 4.1. KL-6'nın PCP ve kolonizasyon örnekler arasındaki değerlendirilmesi

KL-6, kolonizasyon ve PCP/olası PCP olarak tanımlanan hastalar arasında değerlendirildiğinde kesim noktası >485 alındığında; duyarlılık %62,5 (%95 confidence interval (CI) 24,7 – 91,0) ve özgüllük %75 (%95 CI; 35,0 – 96,1) tespit edilmiştir (Şekil4.1).

Tablo 4.5. *P. jirovecii* tespit edilen hastaların klinik bilgileri

Hasta no	Yaş	Cinsiyet	Hastalık	İmmün baskılayıcı	Semptom	Radyoloji	Antibiyotik tedavi	Sonuç	Tanı
2	72	E	Lenfoma, TBC	KT	Öksürük, dispne	İnfiltrasyon	Meropenem	Taburcu	Kolonizasyon
6	45	E	Akciğer kanseri	-	Öksürük, hemoptizi	Konsolidasyon	Meropenem	Taburcu	Kolonizasyon
8	64	E	HIV/AIDS, NHL	KT	Öksürük	Buzlu cam dansitesi	TMP-SMZ, PTZ	Eksitus	PCP
20	82	K	Lenfoma	KT, Kortikosteroid	Öksürük, dispne	Normal	Levofloksasin	Taburcu	Kolonizasyon
28	60	K	Multipl myelom	KT	Öksürük, dispne	İnfiltrasyon	Ertapenem	Eksitus	Olası PCP
32	67	E	KOAH	Kortikosteroid	Öksürük, dispne	Normal	Seftriakson	Taburcu	Kolonizasyon
56	70	E	İntersitisyel akciğer hastalığı	Kortikosteroid	Öksürük, dispne, ateş	İnfiltrasyon	Meropenem, Tigesiklin	Eksitus	PCP
60	64	E	Akciğer kanseri	KT	Öksürük, dispne, ateş	Retikülonodüler konsolidasyon	PTZ	Eksitus	PCP
62	43	E	Kolanjiosellüler karsinoma	KT	Öksürük, ateş	Normal	Meropenem	Eksitus	Olası PCP
68	62	E	Akciğer kanseri	-	Öksürük, dispne	Konsolidasyon	PTZ	Taburcu	Kolonizasyon
70	65	K	Akciğer kanseri	-	Hemoptizi, dispne	Kaviter lezyon	Meropenem, klaritromisin	Taburcu	Kolonizasyon
73	45	E	HIV/AIDS	-	Öksürük, dispne	Buzlu cam dansitesi	TMP-SMZ, klaritromisin, meropenem	Eksitus	PCP
85	70	E	KOAH	Kortikosteroid	Dispne	İnfiltrasyon	Levofloksasin	Taburcu	Kolonizasyon
86	40	K	İntersitisyel akciğer hastalığı	Kortikosteroid	Öksürük, dispne	Konsolidasyon	TMP-SMZ, Meropenem, Klaritromisin,	Eksitus	Olası PCP
90	72	K	Tiroid-özefagus kanseri	KT	Dispne	Normal	Sefoperazon sülbaktam	Taburcu	Kolonizasyon
98	61	E	HIV/AIDS	-	Öksürük, ateş	İnfiltrasyon	TMP-SMZ, levofloksasin	Taburcu	PCP

KT: Kemoterapi, PCP: *Pneumocystis* pnömonisi, PTZ: Piperasilin tazobaktam, TMP-SMZ: Sülfametoksazol trimetoprim, TBC:Tüberküloz, KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, NHL: Non-hodgkin lenfoma, HIV/AIDS: Human immunodeficiency virus/ Acquired immune deficiency syndrome

4.4. Genotiplendirme ve Mutasyon Analizi

4.4.1. DHPS Mutasyon Analizi

DHPS mutasyon analizinde PCR ile *P. jirovecii* tespit edilen 16 hasta örneğinin hepsinden DHPS gen bölgesi PCR ve RFLP yöntemi ile sonuç alınmıştır. DHPS gen bölgesi 165. ve 171. nükleotit pozisyonuna göre çalışmadaki 16 hastanın 12(%75)'sinde mutasyon bulunmayan wild tip (Wild tip; W165/W171), 4 (%75)'ünde mutant tip (Mutant tip; M165/W171) tespit edilmiştir (Tablo 4.6). On altı hastanın 3 (%19)'ünde profilaksi öyküsü vardır ve bu 3 hastanın 2'sinde mutant tip saptanmıştır. Mutant tip tespit edilen hastaların 2'si HIV/AIDS pozitif PCP'li ve profilaksi öyküsü olan hastalardır. Mutant tip bulunan diğer 2 hastada ise *P. jirovecii* kolonizasyonu tespit edilen lenfoma tanılı kemoterapi tedavisi alan ve akciğer kanseri tanısı konmuş kemoterapi planlanan immünkompetan hastadır.

Tablo 4.6. *P.jirovecii* DHPS mutasyon analizi

	DHPS genotipler	Nükleotit (aminoasit)		Hasta sayısı n=16
		165 (55)	171 (57)	
1	Wild tip (W165/W171)	A (Thr)	C (Pro)	12 (%75)
2	Mutant tip (M165/W171) ^a	G (Ala)	C (Pro)	4 (%25)
3	Mutant tip (W165/M171) ^b	A (Thr)	T (Ser)	0
4	İkili Mutant tip (M165/M171) ^c	G (Ala)	T (Ser)	0

DHPS: Dihidropteroatesentaz

a) Mutant tip; 165. nükleotit pozisyonunda (55. aminoasit pozisyonu) mutasyon.

b) Mutant tip; 171. nükleotit pozisyonunda (57. aminoasit pozisyonu) mutasyon.

c) İkili mutant tip; 165. ve 171. nükleotit pozisyonunda mutasyon olan mutant tip.

4.4.2. mtLSU-rRNA Genotiplendirme

Genotip analizi, mtLSU-rRNA lokusu 85. ve 248. nükleotit pozisyonlarındaki polimorfizme göre yapılmıştır. Çalışmada mtLSU nested PCR ile *P. jirovecii* tespit edilen 16 hasta örneğinden sekans analizi yapılarak genotipler belirlenmiştir. On altı *P. jirovecii* izolatından 3 farklı genotip elde edilmiştir. Genotip dağılımına göre bölgemizde en yaygın görülen genotip, (n=7; %43,75) genotip 2 (85A/248C) olurken, ikinci sıklıkta (n=6; %37,5) genotip 1 (85C/248C) ve en az sıklıkta (n=3; %18,75) genotip3 (85T/248C) tespit edilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. *P. jirovecii* mtLSU-rRNA genotip analizi

MtLSU-rRNA Genotip	Nükleotit/İdent	Hasta sayısı n=16
1	85/C; 248/C	6 (%37,5)
2	85/A; 248/C	7 (43,75)
3	85/T; 248/C	3 (%18,75)
4	85/C; 248/T	-

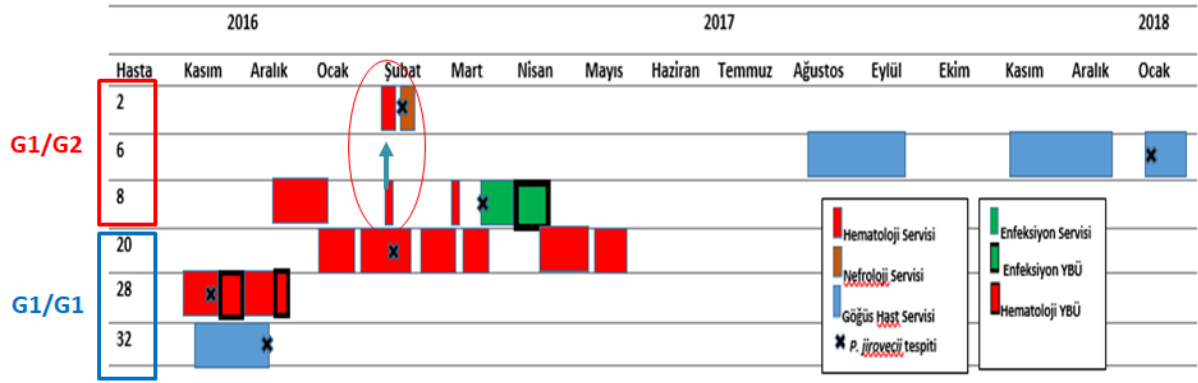
DHPS ve mtLSU-rRNA genetik lokusları birlikte multilokus olarak değerlendirildiğinde iki lokusun olası 16 genotip kombinasyonundan 5'i gözlenmiştir. Multilokus genotipler (mtLSU/DHPS); G2/G1 6(%37,5), G1/G1 3(%18,75), G1/G2 3(%18,75), G3/G1 3(%18,75) ve G2/G2 1(%6,25). En yaygın multilokus genotip, her bir lokustaki en yaygın genotip kombinasyonlarından oluşmuştur (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. *P. jirovecii* mtLSU-rRNA ve DHPS multilokus genotipleri

Hasta no	Örnek tarihi	Klinikler	mtLSU tip	DHPS tip	Profilaksi	Multilokus mtLSU/DHPS
2	21.02.17	Nefroloji Servisi	85C/248C	M165/W171	-	G1/G2
6	11.01.18	Göğüs Hastalıkları Servisi	85C/248C	M165/W171	-	G1/G2
8	31.03.17	Enfeksiyon Servisi	85C/248C	M165/W171	Var	G1/G2
20	6.02.17	Hematoloji Servisi	85C/248C	W165/W171	-	G1/G1
28	24.11.16	Hematoloji Servisi	85C/248C	W165/W171	-	G1/G1
32	2.12.16	Göğüs Hastalıkları Servisi	85C/248C	W165/W171	-	G1/G1
56	27.04.17	Göğüs Hastalıkları Servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
62	9.03.17	Onkoloji Servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
68	11.01.18	Onkoloji Servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
73	4.04.17	Enfeksiyon YBÜ	85A/248C	W165/W171	Var	G2/G1
86	4.05.17	Göğüs Hastalıkları Servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
90	7.02.17	Onkoloji Servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
98	28.02.18	Enfeksiyon Servisi	85A/248C	M165/W171	Var	G2/G2
60	6.02.17	Göğüs Hastalıkları Servisi	85T/248C	W165/W171	-	G3/G1
70	20.03.17	Göğüs Hastalıkları Servisi	85T/248C	W165/W171	-	G3/G1
85	22.04.17	Göğüs Hastalıkları Servisi	85T/248C	W165/W171	-	G3/G1

4.4.3. Olası nozokomiyal bulaş

Multilokus genotiplerin dağılımına göre *P. jirovecii* tespit edilen hastaların hastanede yattıkları süre içerisindeki yer değişiklikleri incelenerek olası nozokomiyal enfeksiyon/kolonizasyon araştırılmıştır.

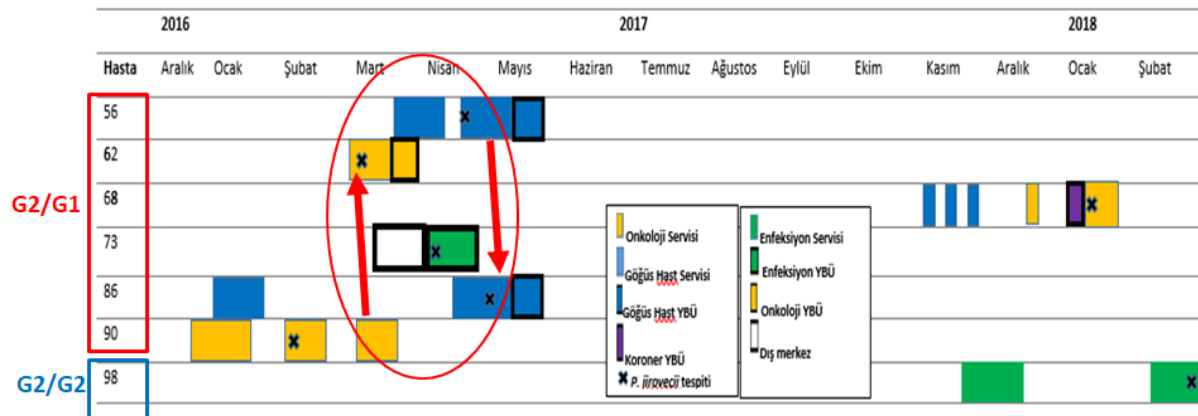


Şekil 4.2. *P. jirovecii* mtLSU-rRNA genotip 1'de kümelenen hastaların yattığı klinik haritası

P. jirovecii mtLSU-rRNA ve DHPS multilokus genotip kombinasyonuna göre hasta 2, 6 ve 8 genotip 1 ve mutant tip (G1/G2); hasta 20, 28, 32 genotip 1 ve wild tip (G1/G1) olarak kümelenmiştir.

G1/G2 genotipi: Hasta 8 PCP, 2 ve 6 kolonizasyon olarak tanımlanmıştır. Hasta 8'in profilaksi öyküsü vardır. Hasta 8 mutant tipin olası kaynağıdır. Hasta 8, hasta 2 ile aynı tarihte aynı serviste bulunmuştur, ancak hasta 6 farklı tarihte farklı bir serviste yattığı için hasta 8 ile ilişkilendirilememiştir (şekil 4.2).

G1/G1 genotipi: Hasta 28 olası PCP, hasta 20 ve 32 kolonizasyon olarak tanımlanmıştır. Hasta 28 ve 20 farklı tarihlerde hematoloji servisinde bulunmuş, hasta 32 ve hasta 28 ile aynı tarihlerde farklı serviste hastanede yatmıştır. Bu genotipte olası kaynak hasta 28 olabilir, ancak hastalar aynı tarihte aynı serviste bulunmadığı için nozokomiyal bulaş olarak değerlendirilmemiştir.

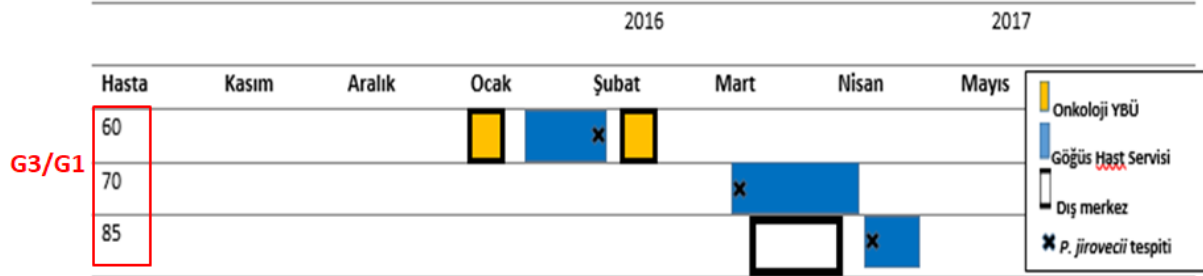


Şekil 4.3. *P. jirovecii* mtLSU-rRNA genotip 2'de kümelenen hastaların yattığı klinik haritası

P. jirovecii multilokus genotip kombinasyonuna göre hasta 56, 62, 68, 73, 86, 90 genotip 2 ve wild tip (G2/G1); hasta 98 genotip 2 ve mutant tip (G2/G2) olarak kümelenmiştir.

G2/G1 genotipi: Burada kümelenen hasta 90, 62, 73, 56, 86 birbirine yakın tarihlerde hastanede yatmışlardır. Hasta 73 dış merkezden transfer olan HIV pozitif PCP'li hastadır ve hastaneye

geldiğinde enfekte olduğu tespit edilmiştir. Hasta 90 (kolonize) ve hasta 62 (olası PCP) aynı tarihte onkoloji servisinde bulunmuşlardır (şekild 4.3). İki hasta arasında hasta 90 olası kaynak olarak tespit edilmiştir. Hasta 56 (PCP) ve 86 (olası PCP) aynı tarihte göğüs hastalıkları servisinde yatmışlardır. İki olgu arasında hasta 56 olası kaynak olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. *P. jirovecii* mtLSU-rRNA genotip 3'de kümelenen hastaların yattığı klinik haritası

P. jirovecii multilokus genotip kombinasyonuna göre hasta 60, 70, 85 genotip 3 ve wild tip (G3/G1) olarak kümelenmiştir. Hasta 60 (PCP), hasta 70 (kolonizasyon) ve hasta 85 (kolonizasyon) farklı tarihlerde göğüs hastalıkları servisinde yatmışlardır (Şekil 4.4). Bu genotip kümesinde hasta 60 olası kaynak olabilir ancak, hastaların farklı tarihlerde hastanede yatmış olması, hasta 70 ve hasta 85'in hastaneye yatışının ikinci gününde alınan örneklerde *P. jirovecii* kolonizasyonu tespit edilmiş olması, olası nozokomiyal bulaş tespitini zorlaştırmış ve bu kümedeki hastalar nozokomiyal bulaş olarak değerlendirilmemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda *P. jirovecii* tespit edilen 16 hastanın 3'ünde olası nozokomiyal bulaş tespit edilmiş, bu hastaların 2'sinde olası PCP ve birinde kolonizasyon görülmüştür.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

P. jirovecii, kistlerin solunum yoluyla alınması sonucu bulaşır ve genellikle asemptomatik seyreder. Ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda ve özellikle HIV/AIDS'lilerde ciddi pnömoniye neden olur. HIV/AIDS ilişkili PCP, T-helper hücre sayısı (CD4+) < 200 hücre/mm³ olduğu durumlarda daha sık görülür [1,7,84]. PCP, HIV/AIDS hastalarının %60'ından fazlasında görülürken, profilaksi ve HAART (yüksek düzey aktif antiretroviral tedavi) tedavisinin tanıtılması ve yaygın kullanılmaya başlamasıyla birlikte HIV/AIDS'li hastalarda *Pneumocystis* insidansı (1996 yılı sonrası %9) büyük oranda azalmıştır [41,146]. Ancak gelişmekte olan ülkelerde, HIV pozitif olduğunu bilmeyen ya da HAART tedavisine ulaşamayan ve tedavi rejimine uymayan hastalarda, HIV/AIDS ilişkili *Pneumocystis* enfeksiyonu sık görülmeye devam etmektedir [1]. Günümüzde, hematolojik maligniteler, solid tümörler, kronik akciğer hastalıkları, organ transplantasyonu ve otoimmün hastalıkların artması ve bu hastalıklar için uygulanan uygulanan immün sistemi baskılayıcı tedaviler (kemoterapi, kortikosteroid, anti-rejeksiyon), PCP'yi HIV-negatif immünsupresif hastalarda daha yaygın hale getirmiştir [8,50,147,148].

Global verilere yıllık ~500.000 *Pneumocystis* olgusu görüldüğü tahmin edilmektedir. Her 100.000'de en fazla olgunun Nijerya (48,2), Kenya (43), Tanzanya(22); en az olgunun Danimarka(0.04), Bangladeş(0.04) ve Macaristan(0.1)'ta olduğu bildirilmiştir. Tüm *Pneumocystis* olgularının %77'si Afrika, %10'u ABD, %7'si Avrupa ve %6'sı Asya'dan raporlanmıştır [149].

Ülkemizden *P. jirovecii* ile ilgili bildirilen çalışmalara baktığımızda, kolonizasyonun araştırıldığı bir çalışmada, adli otopsi yapılan 200 vakanın pulmoner doku örneğinde %18.5 (37/200) *P. jirovecii* tespit edilmiştir [150]. Kolonizasyonun araştırıldığı başka bir çalışmada ise 100 genel popülasyon, 100 sağlık çalışanı ve 50 hasta orofaringeal yıkama örneği, real time PCR ile çalışılmış ve sırasıyla %21, %22 ve %28 oranında *P. jirovecii* kolonizasyonu tespit edilmiştir, çalışmada toplam 250 örnekte %23 oranında *P. jirovecii* bildirilmiştir [151].

Ülkemizde hasta gruplarında *P. jirovecii*'nin araştırıldığı çalışmalarda ise %8-38 arasında pozitiflik bildirilmiştir [152-158]. Töz ve arkadaşları[158], PCP şüphesi olan 42 hastadan alınan BAL örneklerinin %38 (16/42)'inde real time PCR ile; Özkoç ve arkadaşları[157] immün sistemi baskılanmış (~%71) hastalardan alınan BAL örneklerinin %33,7 (31/92)'sinde nested PCR ile; Tekinşen ve arkadaşları[156] immünosüpresif 100 hastanın %8'inde real time PCR ile *P. jirovecii* pozitifliği bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda %75'i immün baskılanmış 96 hastanın 16(%16,7)'sında *P. jirovecii* tespit edilmiştir. Bu oran ülkemizden bildirilen değerler arasındadır.

PCP, HIV negatif immünsupresif hastalarda, HIV pozitif hastalara göre daha akut başlangıçlıdır ve semptomlar daha progresiftir. Bu yüzden HIV negatif immünsupresif hastalarda PCP'nin hızlı tanısı ve tedaviye erken başlanması önemlidir [1,85]. PCP tanısında *P. jirovecii* kist ve trofik formlarının solunum yolu örneklerinde mikroskopik olarak görülmesi standart tanı

yöntemidir [85]. Solunum yolu örneklerinden indüklenmiş balgam örneği %50-90 tanı sağlarken; BAL örneğinin duyarlılığı %90-98 oranında raporlanmıştır [1,7,93]. İmmün floresan mikroskopi yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü diğer boyama yöntemlerinden daha yüksektir [103,159]. Ancak HIV negatif immunsupresif hastalarda akciğer *Pneumocystis* yükünün düşük olması mikroskobik tanının duyarlılığını azaltmaktadır [10,11]. Klinik örneklerden *Pneumocystis* tespitinde PCR yöntemlerinin kullanılması tanı duyarlılığı arttırmıştır. Özellikle mtLSU- rRNA nested-PCR kullanılması mikroskobinin negatif olduğu düşük parazit yükü bulunan hastalarda tanının erken sağlanmasında etkilidir [15,16,104]. Aderaye ve arkadaşları[160], TBO, İFA ve PCR yöntemlerini değerlendirdikleri çalışmada, 131 hastanın 56 (%42,7)'sını PCR, 39 (%29,4)'unu İFA ve 28 (%21,4)'ini TBO yöntemi ile pozitif tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada TBO boyama, İFA ve PCR ile karşılaştırıldığında balgam örneklerinde duyarlılığı %71,4 ve %34,5; BAL örneklerinde duyarlılığı %68 ve %41,5 olarak bildirilmiştir. Ayrıca balgam-PCR, BAL-PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılık %78,9, özgüllük %89 olarak raporlanmıştır [160]. Bizim çalışmamızda 96 hasta örneğinin (88 balgam/indüklenmiş balgam, 6 TA, 2 BAL); 16(%16,7)'sında PCR, 5(%5,2)'inde İFA, 3(%3,1)'ünde TBO ve 2(%2,1)'sinde Giemsa yöntemi ile *P. jirovecii* tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Mikroskobik inceleme (İFA, TBO ve Giemsa) sonuçları hem kendi içinde hem de PCR yöntemi ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmada İFA referans test olarak alındığında; Giemsa boyama için duyarlılık %40, özgüllük %100; TBO duyarlılık %60, özgüllük %100; PCR duyarlılık %100, özgüllük %87,9 tespit edilmiştir.

Nested PCR yönteminin duyarlılığının yüksek olmasından dolayı *P. jirovecii*'nin araştırıldığı klinik örneklerde PCR'in pozitif; mikroskobinin negatif olduğu sonuçlar PCR yönteminin özgüllüğünü düşürmektedir. Bu yüzden bu tip sonuçlarda kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımı yapmak için PCR sonuçları klinik bulgularla birlikte yorumlanmalıdır. Bizim çalışmamızda PCR pozitif bulunan hastaların klinik bulguları, radyolojik ve mikroskobik sonuçları incelenerek, hastalar PCP, olası PCP ve kolonizasyon olarak gruplandırılmıştır. PCR ve mikroskopi pozitif 5 hasta kesin PCP (3 HIV/AIDS, 1 akciğer kanseri, 1 interstisyel akciğer hastalığı); mikroskopi negatif, PCR pozitif olan immün supresif 3 hasta olası PCP (1 Multipl myelom, 1 İnterstisyel akciğer hastalığı, 1 kolanjiosellüler karsinom) olarak tanımlanmıştır. Boyama yöntemleri negatif olan diğer PCR pozitif 8 hasta kolonizasyon olarak değerlendirilmiştir. PCP tespit edilen 5 hastadan HIV/AIDS tanısı olan 3 hasta anti -PCP tedavi almış ve biri iyileşerek taburcu olmuş diğer 4 hasta hastanede yattıkları süreçte kaybedilmiştir. Olası PCP olarak tanımlanan 3 hastadan biri anti-PCP tedavisi almış, ancak 3 hastanın da eksitus olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar etkene yönelik tedavi verilmeyen hastalarda prognozun kötü olabileceğini düşündürmektedir. Mikroskobik yöntemlerin yeterli olmadığı bu tip olası PCP hastalarında *P.jirovecii* varlığının moleküler yöntemlerle gösterilmesi tedavi kararının verilmesinde etkili olabilir. Ayrıca hastanemizde rutin mikrobiyolojik PCP testi yapılmadığı için,

HIV/AIDS hastaları dışında kalan immün sistemi baskılanmış hastalarda PCP'nin önemli bir enfeksiyon etkeni olduğu ve akla ilk gelen enfeksiyonlar arasında bulunması gerektiği tespit edilmiş, PCP profilaksi ve tedavinin göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmüştür.

HIV negatif immünkompetan bireylerde *P. jirovecii* kolonizasyonunu gösteren çalışmalar olmasına rağmen; immünsupresif tedavi alan (kortikosteroid ve/veya kemoteropatik ajanlar) hastalarda daha fazla görülür [11,147,151]. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda *P.jirovecii*'nin en fazla bildirildiği hastalıklar sırasıyla; hematolojik malignite, solid tümör, otoimmün hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları ve organ transplant alıcılarıdır [8,147,148]. Bu çalışmada da *P. jirovecii* saptanan hastaların 11 (%68,75)'i immünsupresif tedavi alan, 3 (%18,75)'ü ise immünkompetandır. PCR pozitif bulunan hastaların altta yatan hastalıkları; 6 (%37,5) kanser, 3 (%18,75) hematolojik malignite, 3 (%18,75) HIV/AIDS, 2 (%12,5) KOAH ve 2 (%12,5) intersitisyel akciğer hastalığı şeklindedir. PCR pozitif ve negatif hasta grupları karşılaştırıldığında sadece HIV/AIDS hastalarında PCR pozitifliği anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,012). Çalışmaya dahil edilen 4 HIV/AIDS pozitif hastanın 3'ünde *P. jirovecii* saptanmıştır. Bu sonuç HIV/AIDS pozitif hastalarda PCP'nin önemli bir etken olmaya devam ettiğini göstermiştir. Bunun nedeni ise HIV pozitif hastaların anti-retroviral tedavi rejimine düzenli uymamasına bağlı olabilir ya da uygulanan profilaksiye bağlı olarak hastalardaki *P. jirovecii* suşları anti-PCP ilaçlara direnç geliştirmiş olabilir ve bunun sonucunda profilaksi ve tedavi başarısızlığı, hastaları PCP'ye duyarlı hale getirmiş olabilir.

Son yıllarda raporlanan çalışmalarda HIV/AIDS pozitif hastalarda PCP azalma eğiliminde olmasına rağmen; DSÖ HIV/AIDS 2018 yılı surveyans verilerine göre AB ülkelerinde, (%21) PCP AIDS'e bağlı en yaygın görülen enfeksiyon olarak bildirilmiştir [147,148,161].

KL-6, interstisyel akciğer hastalıkları ve akut akciğer yaralanmalarında serumda seviyesi artış gösteren bir indikatördür ve PCP'li hastalarda da serumda anlamlı olarak yüksek bildirilmiştir [20,120,162]. Çok merkezli bir çalışmada KL-6 seviyesi PCP'li hastalarda PCP negatif hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek tespit edilmiş ve KL-6 için duyarlılık %71,5 ve özgüllük %78,8 bildirilmiştir [162]. Başka bir çalışmada, serum KL-6 seviyesi HIV pozitif PCP'li hastalarda HIV-negatif PCP'li ve diğer akciğer enfeksiyonlarından anlamlı olarak daha yüksek tespit edilmiş, ancak HIV-negatif PCP'li hastalar ile diğer akciğer hastalığı olan hastalar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır [120]. Bizim çalışmamızda *P. jirovecii* PCR pozitif hastalar ile PCR negatif hastalar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Çalışmadaki hastaların %38,5'inde altta yatan akciğer hastalığı olması ve PCR negatif hastaların %36,25'inde solunum yolu kültürlerinin pozitif olması KL-6 sonucunu etkilemiş olabilir. PCP ve kolonizasyon ayırımındaki etkinliği değerlendirildiğinde duyarlılık % 62,5, özgüllük %75 bulunmuştur. Bazı çalışmalarda KL-6 PCP ve kolonizasyon ayırımında başarılı bulunmamıştır [19,162]. Bu çalışmada PCR pozitif örneklerde kolonizasyon ve PCP ayırımında serum KL-6 seviyesi az kullanışlı bulunmuştur.

PCP, profilaksi ve tedavisinde kullanılan ilk seçenek ilaç trimethoprim sulfametoksazoldür [140]. Sülfametoksazol, para-aminobenzoik asidin (pABA) yapısal analogudur ve pABA, folat sentez yolunun temel bileşeni olan dihidropteroat sentaz (DHPS) enziminin doğal substratıdır [163]. *P. jirovecii*'de, DHPS enzimini kodlayan folik asit sentez (*fas*) genindeki iki sinonim olmayan nokta mutasyon, sülfü türevi ilaçlara önceden maruz kalma ile ilişkilidir [21-23,163]. DHPS lokusu 165(A^G) ve 171(C^T) nükleotid pozisyonlarında meydana gelen bu mutasyonlar, enzimin aktif bölgesindeki proteinde, 55 (Thr^{Ala}) ve 57 (Pro^{Ser}) amino asit dizilerinde, yapısal değişime neden olur. Sülfü türevi ilaçların bağlanma bölgesinde meydana gelen değişiklikler ilacın afinitesini ve inhibitör etkisini azaltarak, tedavi ve profilakside başarısızlığa neden olur [21-23]. *P. jirovecii* kültür yöntemleri ile üretilmediği için, ilaç direnci çalışmaları DHPS lokus mutasyon analizine dayanır. Dünya genelinden bildirilen *P. jirovecii* DHPS mutasyonlarının prevalansı %0-81 arasında değişmektedir [163]. Bizim çalışmamızda *P. jirovecii* tespit edilen 16 hastanın 12(%75)'sinde wild tip (W165/W171), 4(%25)'ünde mutant tip (M165/W171) tespit edilmiştir. On altı hastanın 3 (%19)'ünde profilaksi öyküsü vardır ve bu 3 hastanın 2'sinde mutant tip saptanmıştır. Mutant tip tespit edilen hastaların 2'si HIV pozitif PCP'li ve profilaksi öyküsü olan hastalardır. Mutant tip bulunan diğer 2 hastada ise *P. jirovecii* kolonizasyonu tespit edilen lenfoma tanılı kemoterapi tedavisi alan ve akciğer kanseri tanısı konmuş kemoterapi planlanan immünkompetan hastadır. Ülkemizden DHPS mutasyonu araştırılan sadece bir çalışma bildirilmiştir. Özkoç ve arkadaşları[164] İzmir'de yaptıkları çalışmada DHPS amplifikasyonu elde edilen 28 *P. jirovecii* suşunun tamamını wild tip olarak tespit etmişler ve mutasyon bildirmemişlerdir.

Raporlanan çalışmalarda baktığımızda özellikle gelişmiş ülkelerde daha yüksek mutasyon oranı bildirilmiştir. ABD'de HIV pozitif PCP'li hastalardan izole edilen *P. jirovecii* örnekleri ile yapılan çalışmalarda %81'e ulaşan mutasyon oranı bildirilmiştir [21,27,165,166]. Avrupa ülkelerinde İtalya'dan %0-9, Fransa'dan %3-33, İsviçre'den %7,5, Almanya'dan %1,2, İspanya'dan %22-28, Portekiz'den %7 ve İsveç'ten %0 oranında mutasyon bildirilmiştir [26,127,167-172]. Gelişmekte olan ülkelerde ise Brezilya'dan %0, Şili'den %48, Çin'den %0-12, Hindistan'dan %4,1, Tayland'dan %11,7, Güney Afrika'dan %3,8-56 ve İran'dan %14,7 oranında DHPS mutasyonu bildirilmiştir [173-181].

Yapılan çalışmalarda profilaksi ve HIV pozitif hasta sayısı arttıkça mutasyon oranlarının da artış gösterdiği görülmüştür [21,165,166]. Ancak bazı çalışmalarda daha önce profilaksi ilaç kullanmamış hastalarda da mutant tiplerin tespit edildiği bildirilmiştir [166,169,174]. Son yıllarda Ponce ve arkadaşları[174]'nın Şili'de yaptıkları çalışmada, daha önce sülfü türevi profilaksi ilaç kullanmamış 56 hastanın 27 (%48)'sinde mutant suş tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ülkemizde HIV/AIDS ve organ transplant alıcıları dışındaki, immünoşüpresif hastalarda sulfonamid profilaksisi rutin olarak uygulanmamaktadır [182]. Bizim çalışmamızda,

profilaksi öyküsü olan 3 HIV/AIDS pozitif hastanın 2'sinde mutasyon saptanmıştır ve toplam 4 mutant suşun, 2'sinin HIV/AIDS pozitif hastalarda profilaksi sonucu meydana geldiği, birinin ise nozokomiyal bulaş sonucu, mutant tip ile enfekte hastadan bulaşarak kolonize olduğu tespit edilmiştir. Ancak dördüncü mutant suşun kaynağı tespit edilememiştir. Mutant suş ile meydana gelen enfeksiyonlarda en önemli risk nedeni profilaksi süresinin artması sayılırken, mutant suşların coğrafik dağılımına bağlı olarak, bireylerin yaşadığı şehir ve ülke gibi coğrafik etkenler ya da başvurduğumuz hastane ortamı mutant suşların alınmasındaki önemli risk faktörleri arasındadır [21,27,166,169,174].

Mikroorganizmaların epidemiyolojik bulaş yollarının tespit edilmesi hastalığa karşı kontrol önlemleri geliştirmek açısından önemlidir. Moleküler genotiplendirme çalışmaları, *P. jirovecii* genotiplerinin coğrafik bölgelere ve şehirlere göre farklılık gösterdiği ortaya konmuştur [27]. Ayrıca hastalardan izole edilen genotiplerinin hastaların doğduğu şehirle ilişkili olmadığı, hastanın yaşadığı şehir ya da tanının bulunduğu yer ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [27]. Translasyon sırasında mitokondriyal ribozoma peptidil transferaz aktivitesi sağlayarak temel metabolik mekanizmalarda rol oynayan, mtLSU rRNA geni, farklı coğrafi bölgelerden *P. jirovecii* izolatlarının genetik karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır [26]. Bu çalışmada, mtLSU-rRNA lokusu 85 ve 248. nükleotit pozisyonlarındaki polimorfizme göre 16 *P. jirovecii* suşundan 3 farklı genotip (G) elde edilmiştir. Bölgemizde genotip 2 (n=7; %43,75) en yaygın görülen genotip olurken, ikinci sıklıkta genotip 1 (n=6; %37,5) ve en az genotip 3 (n=3; %18,75) tespit edilmiştir. Ülkemizden daha önce bildirilen mtLSU-rRNA genotiplendirme çalışmasına rastlanmamıştır. Farklı coğrafyalardaki çalışmalarda İtalya, Polonya ve Küba'dan bu çalışmadaki genotip dağılımına benzer şekilde G2 en sık, G1 ikinci sıklıkta ve G3 üçüncü sıklıkta tespit edilmiştir [167,183,184]. Hindistan'dan G2 en sık ve İran'dan ise ikinci sıklıkta tespit edildiği bildirilmiştir [185,186]. ABD, İspanya, Portekiz ve Kore'de G1 en sık tespit edilen genotiplerdir [26,27,124,187]. Genotip dağılımındaki bu farklı epidemiyolojik bulgular, *P. jirovecii*'deki genetik varyasyonların coğrafi bir bileşene sahip olduğunu ve bu coğrafi epidemiyolojik faktörlerin, *P. jirovecii* suşlarının insanlar arasındaki sirkülasyonunu etkileyebileceğini göstermektedir.

Bazı çalışmalar PCP'nin latent enfeksiyonun reaktivasyonu yerine nozokomiyal bulaş sonucu gelişen, yeni kazanılan bir enfeksiyon olduğunu göstermiştir. Çeşitli moleküler yöntemlerle belirlenen aynı genotiplerle kümelenme veya salgın suşları, *P. jirovecii*'nin insandan insana bulaş sonucu yayılabileceğini gösterir [69,134,188,189]. Multilokus genotiplendirme suş tiplendirmede daha fazla bilgi verir. *P. jirovecii* izolatlarını karakterize etmek ve enfekte hastaların klinik ve demografik verileriyle ilişkili olarak *P. jirovecii* suşlarının dağılımını araştırmak için kullanılır [26,27,187].

Bu çalışmada olası nozokomiyal bulaş sonucu gelişen PCP ve kolonizasyonlar araştırılmıştır. DHPS ve mtLSU-rRNA genetik lokusları multilokus olarak tiplendirildiğinde 5

genotip gözlenmiştir. Multilokus genotiplerde (mtLSU/DHPS); G2/G1'de 6, G1/G1'de 3, G1/G2'de 3, G3/G1'de 3, G2/G2'de 1 suş küme oluşturmuştur. Aynı genotip içerisinde kümelenen hastaların hastanede yattıkları süre içerisindeki yer değişiklikleri incelendiğinde 3 olası nozokomiyal bulaş tespit edilmiş, bu hastaların 2'sinde olası PCP ve birinde kolonizasyon tanımlanmıştır. G1/G2 genotipinde kümelenen hasta 8 (PCP) ve hasta 2 (kolonize) aynı tarihte aynı serviste bulunmuşlardır. Hasta 8 HIV/AIDS pozitifdir ve profilaksi öyküsü vardır. Bu kümede hasta 8'in mutant tipin olası kaynağı olduğu ve hasta 2'de nozokomiyal bulaş sonucu kolonize olduğu tespit edilmiştir. G2/G1 genotipinde kümelenen hasta 90 (kolonize) ve hasta 62 (olası PCP) aynı tarihte onkoloji servisinde bulunmuşlardır ve hasta 90'dan hasta 62'ye olası bulaş tespit edilmiştir. Bu genotipte hasta 56 (PCP) ve hasta 86 (olası PCP) aynı tarihte göğüs hastalıkları servisinde yatmışlardır ve İki olgu arasında hasta 56'dan hasta 86'ya olası bulaş tespit edilmiştir.

Spor tuzakları ile yapılan çalışmalar *Pneumocystis*'in çevresel kaynaklardan yayılabileceğini göstermiştir ancak memeli konaklar dışında rezervuar tanımlanmamıştır [66,68]. Bu yüzden, *P. jirovecii* toplumda rezervuar olarak bulunabilir ve immün sistemi baskılanmış bir konağa ulaşıncaya kadar kişiden kişiye bulaşarak subklinik kolonizasyona neden olarak yayılabilir [151]. PCP'li hastalar enfeksiyon sırasında etkeni solunum yoluyla havaya yayarlar [74]. Bir hava örnekleme çalışmasında, PCP'li hastaların bulunduğu servislerden ve bitişik koridorlardan alınan hava örnekleri analiz edildiğinde PCP'li hastaların 8 m'ye kadar uzağında *P. jirovecii* tespit edilmiş, ayrıca servise bitişik koridorlarda da *Pneumocystis* pozitifliğinin devam ettiği görülmüştür [74]. Başka bir çalışmada *Pneumocystis* enfeksiyonu olmayan hastaların bulunduğu YBÜ'lerden ve hastanedeki boş odalardan alınan hava örneklerinde de *Pneumocystis* saptanmıştır [75]. PCP'li hastaların havaya *Pneumocystis*'i yayması sonucu, bu hastalar ile ilgilenen doktor ve hemşirelerin ve hasta yakınlarının *Pneumocystis* ile kolonize olduğu gösterilmiştir [190]. Kolonize olan sağlık çalışanlarının, enfeksiyonu immün sistemi baskılanmış risk altındaki hastalara bulaştırabileceği belirtilmiştir [190]. Bizim çalışmamızda aynı serviste yakın tarihlerde kalan hastalar ya da aynı tarihte farklı serviste kalan hastalar olası nozokomiyal bulaş olarak gruplandırılmamıştır, ancak yapılan çalışmalar bu tip nozokomiyal bulaşların da olabileceğini göstermektedir ve bu durum tahmin edilenden daha fazla nozokomiyal bulaş olabileceğini düşündürmüştür. Salgın analizleri, *Pneumocystis*'in immün sistemi baskılanmış hastaların bulunduğu hastane servisleri ve yoğun bakım ünitelerinde hastalar arasında kişiden kişiye bulaşarak yayıldığı ve salgınlara neden olduğu gösterilmiştir [69]. Bu çalışmada, olası nozokomiyal bulaş sonucu gelişen PCP ve kolonizasyonlar tanımlanmaya çalışılmıştır, ancak kesin ayırım yapmak zordur. Çalışma sürecinde *P. jirovecii* tespit edilen hastaların kaldığı servislerdeki diğer hastalardan, sağlık personellerinden ve servis ortamından *P. jirovecii* araştırması yapılmamıştır. Ayrıca DHPS ve mtLSU genotiplendirme yöntemi

nozokomiyal bulaşlarda klonların tespitinde yeterli olmayabilir. Buyüzden ayırım gücü daha yüksek multilokus genotiplendirme yöntemleri kullanılması gerekebilir.

Sonuç olarak, çalışmada 96 hastanın 16 (%16,7)'sında *P. jirovecii* tespit edilmiştir. IFA referans test olarak alındığında; Giemsa duyarlılık %40, özgüllük %100; TBO duyarlılık %60, özgüllük %100; PCR duyarlılık %100, özgüllük %87,9 olarak tespit edilmiştir. PCR pozitif 16 hastanın 5'i kesin PCP, 3'ü olası PCP ve diğer 8'i kolonizasyon olarak değerlendirilmiştir. *P. jirovecii* tespit edilen 16 hastanın 4 (%25)'ünde mutant tip (mutant tip; M165/W171) tespit edilmiştir. mtLSU rRNA sekans analizinde 3 farklı genotip elde edilmiş ve bölgemizde G2 ve G1 en yaygın görülen genotip olarak belirlenmiştir. Multilokus genotip değerlendirmesinde ise 5 genotip elde edilmiş ve 3 olası nozokomiyal bulaş tanımlanmıştır.

Bu çalışmada yatan hastaların balgam örneklerinden önemli oranda *P. jirovecii* tespit edilmesi hastane ortamında ve belki de genel popülasyonda tahmin edilenden daha yüksek *P. jirovecii* olabileceğini göstermektedir. Hastalardaki kolonizasyon immüsupresyon sürecinde PCP'ye neden olabilir ya da rezervuar görevi görebilir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, immüsupresif hastaların PCP gelişimi açısından risk altında olduklarını göstermiştir. Bu bulgular, yatan hastaların bağışıklık durumuna ve klinik özelliklerine göre PCP'nin ayırıcı tanı listesinde olması gerektiğini göstermektedir. PCP'li hastalar, immün sistemi baskılanmış hastaların olmadığı servis ve YBÜ'lere yatırılması bulaş olasılığını azaltabilir. HIV/AIDS dışındaki immüsupresif hastalarda PCP potansiyel enfeksiyonlar arasında düşünülmelidir. Bu gruplarda daha sağlıklı sonuçlara ulaşmak için daha fazla sayıda hastanın yer aldığı çalışmalar planlanmalıdır. Ayrıca bölgemizdeki ve ülkemizdeki genel durumu anlayabilmek için daha fazla *P. jirovecii* suşunu içeren genotiplendirme ve DHPS mutasyon analizi çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1]. Calderon, E. J., Varela, J. M., Durand-Joly, I., Dei-Cas, E. (2011). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. Saurez, M. L., Ortega, S. M. (Ed.), *Pneumonia: Symptoms, Diagnosis and Treatment* (pp 1-36). Nova Science Publishers, Inc.
- [2]. Chabé, M., Aliouat-Denis, C. M., Delhaes, L., Aliouat, E. M., Viscogliosi, E., & Dei-Cas, E. (2011). *Pneumocystis*: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS yeast research*, 11(1), 2-17.
- [3]. Aliouat-Denis, C. M., Chabé, M., Demanche, C., Viscogliosi, E., Guillot, J., Delhaes, L., & Dei-Cas, E. (2008). *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 708-726.
- [4]. Frenkel, J. K. (1999). *Pneumocystis pneumonia*, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 46(5), 89S-92S.
- [5]. Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F., & Wakefield, A. E. (2002). A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 891-896.
- [6]. Aliouat-Denis, C. M., Martinez, A., Aliouat, E. M., Pottier, M., Gantois, N., & Dei-Cas, E. (2009). The *Pneumocystis* life cycle. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(3), 419-426.
- [7]. Thomas Jr, C. F., & Limper, A. H. (2004). *Pneumocystis pneumonia*. *New England Journal of Medicine*, 350(24), 2487-2498.
- [8]. Liu, Y., Su, L., Jiang, S. J., Qu, H. (2017). Risk factors for mortality from *pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in non-HIV patients: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(35), 59729.
- [9]. Walzer, P. D., Evans, H. E., Copas, A. J., Edwards, S. G., Grant, A. D., & Miller, R. F. (2008). Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985–2006. *Clinical infectious diseases*, 46(4), 625-633.
- [10]. Monnet, X., Vidal-Petiot, E., Osman, D., Hamzaoui, O., Durrbach, A., Goujard, C., ... & Richard, C. (2008). Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis pneumonia* in patients with and without HIV infection. *Critical Care*, 12(1), R28.
- [11]. Morris, A., & Norris, K. A. (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clinical microbiology reviews*, 25(2), 297-317.
- [12]. Kovacs, J. A., Ng, V. L., NG, V. L., Leoung, G., Hadley, W. K., Evans, G., ... & Gill, V. J. (1988). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *New England Journal of Medicine*, 318(10), 589-593.
- [13]. Gupta, R., Mirdha, B. R., Guleria, R., Kumar, L., Samantaray, J. C., Agarwal, S. K., ... & Luthra, K. (2009). Diagnostic significance of nested polymerase chain reaction for sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory clinical specimens. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(4), 381-388.
- [14]. Rabodonirina, M., Raffenetot, D., Cotte, L., Boibieux, A., Mayençon, M., Bayle, G., ... & Piens, M. A. (1997). Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR. *Journal of clinical microbiology*, 35(11), 2748-2751.
- [15]. Olsson, M., Strålin, K., & Holmberg, H. (2001). Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clinical microbiology and infection*, 7(9), 492-497.
- [16]. Özkoç, S., Delibas, S. B., Erbaycu, A. E., Ergüden, C., & Akisü, Ç. (2014). Investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with pulmonary diseases. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 38(4), 214.
- [17]. Nobuoki, K., Seishi, K., Yukikazu, A., Hirofumi, F., Michio, Y., & Mitoshi, A. (1989). New serum indicator of interstitial pneumonitis activity: sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest*, 96(1), 68-73.
- [18]. Ishizaka, A., Matsuda, T., Albertine, K. H., Koh, H., Tasaka, S., Hasegawa, N., ... & Nakamura, M. (2004). Elevation of KL-6, a lung epithelial cell marker, in plasma and epithelial lining fluid in acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(6), L1088-L1094.

- [19]. Shimizu, Y., Sunaga, N., Dobashi, K., Fueki, M., Fueki, N., Makino, S., & Mori, M. (2009). Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC infectious diseases*, 9(1), 47.
- [20]. Tasaka, S., Hasegawa, N., Kobayashi, S., Yamada, W., Nishimura, T., Takeuchi, T., & Ishizaka, A. (2007). Serum indicators for the diagnosis of pneumocystis pneumonia. *Chest*, 131(4), 1173-1180.
- [21]. Kazanjian, P., Armstrong, W., Hossler, P. A., Burman, W., Richardson, J., Lee, C. H., ... & Meshnick, S. R. (2000). *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *The Journal of infectious diseases*, 182(2), 551-557.
- [22]. Ma, L., Kovacs, J. A., Cargnel, A., Valerio, A., Fantoni, G., & Atzori, C. (2002). Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis. *Journal of Infectious Diseases*, 185(10), 1530-1532.
- [23]. Meneau, I., Sanglard, D., Bille, J., & Hauser, P. M. (2004). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms confer resistance to sulfadoxine and sulfanilamide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(7), 2610-2616.
- [24]. Ma, L., Cissé, O. H., & Kovacs, J. A. (2018). A Molecular Window into the Biology and Epidemiology of *Pneumocystis* spp. *Clinical microbiology reviews*, 31(3), e00009-18.
- [25]. Beard, C. B., Roux, P., Nevez, G., Hauser, P. M., Kovacs, J. A., Unnasch, T. R., & Lundgren, B. (2004). Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerging infectious diseases*, 10(10), 1729.
- [26]. Esteves, F., Montes-Cano, M. A., De La Horra, C., Costa, M. C., Calderón, E. J., Antunes, F., & Matos, O. (2008). *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(4), 356-362.
- [27]. Beard, C. B., Carter, J. L., Keely, S. P., Huang, L., Pieniazek, N. J., Moura, I. N., ... & Lee, S. (2000). Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerging infectious diseases*, 6(3), 265.
- [28]. Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiazaea humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1:159-218.
- [29]. Calderón-Sandubete, E. J., Varela-Aguilar, J. M., Medrano-Ortega, F. J., Nieto-Guerrero, V., Respaldiza-Salas, N., De La Horra-Padilla, C., & Dei-Cas, E. (2002). Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist*, 153(3), 303-310.
- [30]. Carini, A. (1910). Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. *Bol Soc de Med e Cir de Sao Paulo*, 18:204
- [31]. Delanoë, P., and Delanoë, M. (1912). Sur les rapports des kystes de *carinii* du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. *CR Acad Sci (Paris)*, 155: 658-660
- [32]. Ammich, O. (1938). Über die nichtsyphilitische interstitielle pneumoniae des ersten kindersalters. *Virchows Arch Pathol Anat*, 302:539-54.
- [33]. Benecke, E. (1938). Eigenartige Bronchiolenerkrankung im ersten Lebensjahr. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 31:402-406.
- [34]. Van der Meer, G., & Brug, S. L. (1942). Infection a *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Ann Soc Belg Med Trop*, 22: 301-307
- [35]. Venek, J., Jirovec, O., & Lukes, J. (1953). Interstitial plasma cell pneumonia in infants. *Ann paediatr. International review of pediatrics*, 180(1):1-21.
- [36]. Unat, E. K. (1955). First *Pneumocystis carini* infection in Turkey. *Turk Tip Cemiyeti mecmuasi*, 21(10), 489-495.
- [37]. Ivady, G., & Paldy, L. (1958). Ein neues Behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen Pneumonie Frühgeborener mit fünfwertigem Stibium und aromatischen Diamidinen. *Monatsschr Kinderheilkd*, 106(1), 10-14.
- [38]. Hughes, W. T., Feldman, S., & Sanyal, S. K. (1975). Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Canadian Medical Association Journal*, 112(13 Spec No), 47-50
- [39]. Schultz, M. G., & Bloch, A. B. (2016). In Memoriam: Sandy Ford (1950-2015). *Emerging infectious diseases*, 22(4), 764.

- [40]. Gottlieb, M. S. (2006). Pneumocystis Pneumonia—Los Angeles. *American journal of public health*, 96(6), 980-981.
- [41]. Selik, R. M., Starcher, E. T., & Curran, J. W. (1987). Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations, and trends. *AIDS (London, England)*, 1(3), 175-182.
- [42]. Kaplan, J. E., Hanson, D., Dworkin, M. S., Frederick, T., Bertolli, J., Lindegren, M. L., ... & Jones, J. L. (2000). Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clinical infectious diseases*, 30(Supplement_1), S5-S14.
- [44]. Edman, J. C., Kovacs, J. A., Masur, H., Santi, D. V., Elwood, H. J., & Sogin, M. L. (1988). Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334(6182), 519.
- [45]. Stringer, S. L., Stringer, J. R., Blase, M. A., Walzer, P. D., & Cushion, M. T. (1989). *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Experimental parasitology*, 68(4), 450-461.
- [46]. Pixley, F. J., Wakefield, A. E., Banerji, S., & Hopkin, J. M. (1991). Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Molecular microbiology*, 5(6), 1347-1351.
- [47]. Wakefield, A. E., Peters, S. E., Banerji, S., Bridge, P. D., Hall, G. S., Hawksworth, D. L., ... & Hopkin, J. M. (1992). *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. *Molecular microbiology*, 6(14), 1903-1911.
- [48]. Cushion, M. T., Smulian, A. G., Slaven, B. E., Sesterhenn, T., Arnold, J., Staben, C., ... & Meller, J. (2007). Transcriptome of *Pneumocystis carinii* during fulminate infection: carbohydrate metabolism and the concept of a compatible parasite. *PLoS One*, 2(5), e423.
- [49]. *Pneumocystis Genome Project*. 5 Mayıs 2019 tarihinde <http://pgp.cchmc.org/> adresinden erişildi.
- [50]. Catherinot, E., Lanternier, F., Bougnoux, M. E., Lecuit, M., Couderc, L. J., & Lortholary, O. (2010). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Infectious Disease Clinics*, 24(1), 107-138.
- [51]. Frenkel, J. K. (1976). *Pneumocystis jirovecii* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *National Cancer Institute Monograph*, 43, 13-30.
- [52]. Gigliotti, F., Harmsen, A. G., Haidaris, C. G., & Haidaris, P. J. (1993). *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infection and immunity*, 61(7), 2886-2890.
- [53]. Aliouat, E. M., Mazars, E., Dei-Cas, E., Cesbron, J. Y., & Camus, D. (1993). Intranasal inoculation of mouse, rat or rabbit-derived *Pneumocystis* to SCID mice. *The journal of protozoology research*, 3(3), 94-98.
- [54]. Walzer, P. D., & Linke, M. J. (1987). A comparison of the antigenic characteristics of rat and human *Pneumocystis carinii* by immunoblotting. *The Journal of Immunology*, 138(7), 2257-2265.
- [55]. Mazars E., Odberg-Ferragut C., Dei-Cas E., Fourmaux M. N., Aliouat E. M., Brun-Pascaud M., Mougeot G., Camus D. (1995). Polymorphism of the thymidylate synthase gene of *Pneumocystis carinii* from different host species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42(1), 26-32.
- [56]. Ma, L., & Kovacs, J. A. (2000). Expression and Characterization of Recombinant Human-Derived *Pneumocystis carinii* Dihydrofolate Reductase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(11), 3092-3096.
- [57]. Denis, C. M., Mazars, E., Guyot, K., Ödberg-Ferragut, C., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., & Wakefield, A. E. (2000). Genetic divergence at the SODA locus of six different formae speciales of *Pneumocystis carinii*. *Medical mycology*, 38(4), 289-300.
- [58]. Sinclair, K., Wakefield, A. E., Banerji, S., & Hopkin, J. M. (1991). *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Molecular and biochemical parasitology*, 45(1), 183.
- [59]. Cushion, M. T., Keely, S. P., & Stringer, J. R. (2004). Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. *Mycologia*, 96(3), 429-438.
- [60]. Keely, S. P., Fischer, J. M., Cushion, M. T., & Stringer, J. R. (2004). Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology*, 150(5), 1153-1165.
- [61]. Dei-Cas, E., Chabe, M., Moukhliis, R., Durand-Joly, I., Aliouat, E. M., Stringer, J. R., ... & Viscogliosi, E. (2006). *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia

in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. *FEMS microbiology reviews*, 30(6), 853-871.

[62]. Martinez, A., Standaert-Vitse, A., Werkmeister, E., Pottier, M., Pinçon, C., Dei-Cas, E., & Aliouat-Denis, C. M. (2011). Ploidy of cell-sorted trophic and cystic forms of *Pneumocystis carinii*. *PLoS One*, 6(6), e20935.

[63]. Yoshikawa, H., Morioka, H., & Yoshida, Y. (1987). Freeze-fracture studies on *Pneumocystis carinii*. *Parasitology research*, 73(2), 132-139.

[64]. Millard, P. R., Wakefield, A. E., & Hopkin, J. M. (1990). A sequential ultrastructural study of rat lungs infected with *Pneumocystis carinii* to investigate the appearances of the organism, its relationships and its effects on pneumocytes. *International journal of experimental pathology*, 71(6), 895.

[65]. Almeida, J. M., Cissé, O. H., Fonseca, Á., Pagni, M., & Hauser, P. M. (2015). Comparative genomics suggests primary homothallism of *Pneumocystis* species. *MBio*, 6(1), e02250-14.

[66]. Skalski, J. H., Kottom, T. J., & Limper, A. H. (2015). Pathobiology of *Pneumocystis pneumonia*: life cycle, cell wall and cell signal transduction. *FEMS yeast research*, 15(6).

[67]. Cushion, M. T., Linke, M. J., Ashbaugh, A., Sesterhenn, T., Collins, M. S., Lynch, K., ... & Walzer, P. D. (2010). Echinocandin treatment of pneumocystis pneumonia in rodent models depletes cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection. *PloS one*, 5(1), e8524.

[68]. Wakefield, A. E. (1996). DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *Journal of clinical microbiology*, 34(7), 1754-1759.

[69]. Yiannakis, E. P., & Boswell, T. C. (2016). Systematic review of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: evidence that *P. jirovecii* is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. *Journal of Hospital Infection*, 93(1), 1-8.

[70]. Montes-Cano, M. A., Chabe, M., Fontillon-Alberdi, M., de la Horra, C., Respaldiza, N., Medrano, F. J., ... & Calderon, E. J. (2009). Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerging infectious diseases*, 15(1), 125.

[71]. Cere, N., Drouet-Viard, F., Dei-Cas, E., Chanteloup, N., & Coudert, P. (1997). In utero transmission of *Pneumocystis carinii* sp. f. *oryctolagi*. *Parasite*, 4(4), 325-330.

[72]. Hong, S. T., Park, Y. K., Kim, J., Kim, D. H., & Yun, C. K. (1999). Is *Pneumocystis carinii* vertically transmitted to neonatal rats?. *The Korean journal of parasitology*, 37(3), 149.

[73]. Vargas, S. L., Hughes, W. T., Santolaya, M. E., Ulloa, A. V., Ponce, C. A., Cabrera, C. E., ... & Gigliotti, F. (2001). Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clinical infectious diseases*, 32(6), 855-861.

[74]. Choukri, F., Menotti, J., Sarfati, C., Lucet, J. C., Nevez, G., Garin, Y. J., & Totet, A. (2010). Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Clinical infectious diseases*, 51(3), 259-265.

[75]. Bartlett, M. S., Vermund, S. H., Jacobs, R., Durant, P. J., Shaw, M. M., Smith, J. W., ... & Lee, C. H. (1997). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *Journal of clinical microbiology*, 35(10), 2511-2513.

[76]. Chen, W., Gigliotti, F., & Harmsen, A. G. (1993). Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infection and immunity*, 61(12), 5406-5409.

[77]. Vargas, S. L., Hughes, W. T., Wakefield, A. E., & Oz, H. S. (1995). Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 172(2), 506-510.

[78]. Keely, S. P., Stringer, J. R., Baughman, R. P., Linke, M. J., Walzer, P. D., & Smulian, A. G. (1995). Genetic variation among *Pneumocystis carinii hominis* isolates in recurrent pneumocystosis. *Journal of Infectious Diseases*, 172(2), 595-598.

[79]. Helweg-Larsen, J., Lundgren, B., & Lundgren, J. D. (2001). Heterogeneity and Compartmentalization of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* Genotypes in Autopsy Lungs. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3789-3792.

[80]. Leigh, T. R., Kangro, H. O., Gazzard, B. G., Jeffries, D. J., & Collins, J. V. (1993). DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect sub-clinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-

positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. *Respiratory medicine*, 87(7), 525-529.

[81]. Nevez, G., Magois, E., Duwat, H., Gouilleux, V., Jounieaux, V., & Totet, A. (2006). Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clinical Infectious Diseases*, 42(11), e99-e101.

[82]. Medrano, F. J., Montes-Cano, M., Conde, M., De La Horra, C., Respaldiza, N., Gasch, A., ... & Calderon, E. J. (2005). *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerging infectious diseases*, 11(2), 245.

[83]. Ponce, C. A., Gallo, M., Bustamante, R., & Vargas, S. L. (2010). *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clinical Infectious Diseases*, 50(3), 347-353.

[84]. Phair, J., Muñoz, A., Detels, R., Kaslow, R., Rinaldo, C., Saah, A., & Multicenter AIDS Cohort Study Group*. (1990). The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine*, 322(3), 161-165.

[85]. Sokulska, M., Kicia, M., Wesołowska, M., & Hendrich, A. B. (2015). *Pneumocystis jirovecii*—from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitology research*, 114(10), 3577-3585.

[86]. Vogel, M. N., Vatlach, M., Weissgerber, P., Goepfert, B., Claussen, C. D., Hetzel, J., & Horger, M. (2012). HRCT-features of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and their evolution before and after treatment in non-HIV immunocompromised patients. *European journal of radiology*, 81(6), 1315-1320.

[87]. Limper, A. H., Offord, K. P., Smith, T. F., & Martin, W. J. (1989). *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am Rev Respir Dis*, 140, 1204-1209.

[88]. Ng, V. L., Yajko, D. M., & Hadley, W. K. (1997). Extrapulmonary pneumocystosis. *Clinical microbiology reviews*, 10(3), 401-418.

[89]. Vassallo, R., Kottom, T. J., Standing, J. E., & Limper, A. H. (2001). Vitronectin and fibronectin function as glucan binding proteins augmenting macrophage responses to *Pneumocystis carinii*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25(2), 203-211.

[90]. Limper, A. H., Standing, J. E., Hoffman, O. A., Castro, M., & Neese, L. W. (1993). Vitronectin binds to *Pneumocystis carinii* and mediates organism attachment to cultured lung epithelial cells. *Infection and immunity*, 61(10), 4302-4309

[91]. Limper, A. H., Edens, M., Anders, R. A., & Leof, E. B. (1998). *Pneumocystis carinii* inhibits cyclin-dependent kinase activity in lung epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 101(5), 1148-1155.

[92]. Kelly, M. N., & Shellito, J. E. (2010). Current understanding of *Pneumocystis* immunology. *Future microbiology*, 5(1), 43-65.

[93]. Lu, J. J., Lee, C. H. (2008). *Pneumocystis* pneumonia. *J Formos Med Assoc*, 107(11), 830-42. doi: 10.1016/S0929-6646(08)60199-0.

[94]. Atochina, E. N., Beers, M. F., Scanlon, S. T., Preston, A. M., & Beck, J. M. (2000). *P. carinii* induces selective alterations in component expression and biophysical activity of lung surfactant. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(3), L599-L609.

[95]. Beers, M. F., Atochina, E. N., Preston, A. M., & Beck, J. M. (1999). Inhibition of lung surfactant protein B expression during *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 133(5), 423-433.

[97]. Shellito, J., Suzara, V. V., Blumenfeld, W., Beck, J. M., Steger, H. J., & Ermak, T. H. (1990). A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation*, 85(5), 1686-1693.

[98]. Eddens, T., & Kolls, J. K. (2015, March). Pathological and protective immunity to *Pneumocystis* infection. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 37, No. 2, pp. 153-162). Springer Berlin Heidelberg.

[99]. Bhagwat, S. P., Gigliotti, F., Xu, H., & Wright, T. W. (2006). Contribution of T cell subsets to the pathophysiology of *Pneumocystis*-related immunorestitution disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(6), L1256-L1266.

- [100]. Gigliotti, F., Crow, E. L., Bhagwat, S. P., & Wright, T. W. (2006). Sensitized CD8+ T cells fail to control organism burden but accelerate the onset of lung injury during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infection and immunity*, 74(11), 6310-6316.
- [101]. Beck, J. M., Newbury, R. L., Palmer, B. E., Warnock, M. L., Byrd, P. K., & Kaltreider, H. B. (1996). Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 128(5), 477-487.
- [102]. Lund, F. E., Hollifield, M., Schuer, K., Lines, J. L., Randall, T. D., & Garvy, B. A. (2006). B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. *The Journal of Immunology*, 176(10), 6147-6154.
- [103]. Cruciani, M., Marcati, P., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, G., & Mengoli, C. (2002). Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. *European Respiratory Journal*, 20(4), 982-989.
- [104]. Fan, L. C., Lu, H. W., Cheng, K. B., Li, H. P., & Xu, J. F. (2013). Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. *PloS one*, 8(9), e73099.
- [105]. Sasso, M., Chastang-Dumas, E., Bastide, S., Alonso, S., Lechiche, C., Bourgeois, N., & Lachaud, L. (2016). Performances of four real-time PCR assays for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of clinical microbiology*, 54(3), 625-630.
- [106]. Lu, Y., Ling, G., Qiang, C., Ming, Q., Wu, C., Wang, K., & Ying, Z. (2011). PCR diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: a bivariate meta-analysis. *Journal of clinical microbiology*, 49(12), 4361-4363.
- [107]. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Vandesompele, J. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.
- [108]. Fauchier, T., Hasseine, L., Gari-Toussaint, M., Casanova, V., Marty, P. M., & Pomares, C. (2016). Detection of *Pneumocystis jirovecii* by quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-positive and HIV-negative patients. *Journal of clinical microbiology*, 54(6), 1487-1495.
- [109]. Alanio, A., Hauser, P. M., Lagrou, K., Melchers, W. J., Helweg-Larsen, J., Matos, O., ... & Cordonnier, C. (2016). ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), 2386-2396.
- [110]. Alanio, A., Desoubreux, G., Sarfati, C., Hamane, S., Bergeron, A., Azoulay, E., ... & Menotti, J. (2011). Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(10), 1531-1537.
- [111]. Robert-Gangneux, F., Belaz, S., Revest, M., Tattevin, P., Jouneau, S., Decaux, O., ... & Gangneux, J. P. (2014). Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients by real-time PCR: a 4-year prospective study. *Journal of clinical microbiology*, 52(9), 3370-3376.
- [112]. Morris, A. M., & Masur, H. (2011). A serologic test to diagnose pneumocystis pneumonia: are we there yet?. *Clin Infect Dis*, 53:203-204.
- [113]. Karageorgopoulos, D. E., Qu, J. M., Korbila, I. P., Zhu, Y. G., Vasileiou, V. A., & Falagas, M. E. (2013). Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. *Clinical microbiology and infection*, 19(1), 39-49.
- [114]. Onishi, A., Sugiyama, D., Kogata, Y., Saegusa, J., Sugimoto, T., Kawano, S., ... & Kumagai, S. (2012). Diagnostic accuracy of serum 1, 3- β -D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical microbiology*, 50(1), 7-15.
- [115]. Matsumura, Y., Ito, Y., Yamamoto, M., Matsushima, A., Nagao, M., Takakura, S., ... & Ichiyama, S. (2014). *Pneumocystis* polymerase chain reaction and blood (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assays to predict survival with suspected *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(2), 109-114.
- [116]. Merali, S., & Allen Boykin Jr, C. (2004). S-adenosylmethionine and *Pneumocystis*. *FEMS microbiology letters*, 237(2), 179-186.

- [117]. Skelly, M., Hoffman, J., Fabbri, M., Holzman, R. S., Clarkson Jr, A. B., & Merali, S. (2003). S-adenosylmethionine concentrations in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *The Lancet*, 361(9365), 1267-1268.
- [118]. Skelly, M. J., Holzman, R. S., & Merali, S. (2008). S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clinical infectious diseases*, 46(3), 467-471.
- [119]. Kutty, G., Hernandez-Novoa, B., Czapiga, M., & Kovacs, J. A. (2008). *Pneumocystis* encodes a functional S-adenosylmethionine synthetase gene. *Eukaryotic cell*, 7(2), 258-267.
- [120]. Nakamura, H., Tateyama, M., Tasato, D., Haranaga, S., Yara, S., Higa, F., ... & Fujita, J. (2009). Clinical utility of serum β -D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Internal Medicine*, 48(4), 195-202.
- [121]. Esteves, F., Calé, S. S., Badura, R., De Boer, M. G., Maltez, F., Calderon, E. J., ... & Matos, O. (2015). Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(4), 379-e1.
- [122]. Lee, C. H., Helweg-Larsen, J., Tang, X., Jin, S., Li, B., Bartlett, M. S., ... & Lucas, S. B. (1998). Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 734-741
- [123]. Le Gal, S., Rouille, A., Gueguen, P., Virmaux, M., Berthou, C., Guillerm, G., ... & Nevez, G. (2013). *Pneumocystis jirovecii* haplotypes at the internal transcribed spacers of the rRNA operon in French HIV-negative patients with diverse clinical presentations of *Pneumocystis* infections. *Medical mycology*, 51(8), 851-862.
- [124]. Cano, M. M., De La Horra, C., Martin-Juan, J., Varela, J. M., Torronteras, R., Respaldiza, N., ... & Calderón, E. J. (2004). *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the Spanish population. *Clinical infectious diseases*, 39(1), 123-128.
- [125]. Walker, D. J., Wakefield, A. E., Dohn, M. N., Miller, R. F., Baughman, R. P., Hossler, P. A., ... & Meshnick, S. R. (1998). Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *The Journal of infectious diseases*, 178(6), 1767-1775.
- [126]. Ma, L., Borio, L., Masur, H., & Kovacs, J. A. (1999). *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *Journal of Infectious Diseases*, 180(6), 1969-1978.
- [127]. Le Gal, S., Damiani, C., Perrot, M., Rouillé, A., Virmaux, M., Quinio, D., ... & Totet, A. (2012). Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutants in France. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 74(2), 119-124.
- [128]. Esteves, F., Tavares, A., Costa, M. C., Gaspar, J., Antunes, F., & Matos, O. (2009). Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of *Pneumocystis jirovecii*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 28(2), 175-178.
- [129]. Esteves, F., Gaspar, J., Tavares, A., Moser, I., Antunes, F., Mansinho, K., & Matos, O. (2010). Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 192-199.
- [130]. Kutty, G., Maldarelli, F., Achaz, G., & Kovacs, J. A. (2008). Variation in the major surface glycoprotein genes in *Pneumocystis jirovecii*. *The Journal of infectious diseases*, 198(5), 741-749.
- [131]. Lu, J. J., Bartlett, M. S., Smith, J. W., & Lee, C. H. (1995). Typing of *Pneumocystis carinii* strains with type-specific oligonucleotide probes derived from nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. *Journal of clinical microbiology*, 33(11), 2973-2977.
- [132]. Desoubeaux, G., Dominique, M., Morio, F., Thepault, R. A., Franck-Martel, C., Tellier, A. C., ... & Bailly, É. (2016). Epidemiological outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia are not limited to kidney transplant recipients: genotyping confirms common source of transmission in a liver transplantation unit. *Journal of clinical microbiology*, 54(5), 1314-1320.
- [133]. Curran, T., McCaughey, C., & Coyle, P. V. (2013). *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in Northern Ireland. *Journal of medical microbiology*, 62(8), 1170-1174.

- [134]. Schmoldt, S., Schuegger, R., Wendler, T., Huber, I., Söllner, H., Hogardt, M., ... & Sing, A. (2008). Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. *Journal of clinical microbiology*, 46(3), 966-971.
- [135]. Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*, 32(3-4), 261-273.
- [136]. Masters, P. A., O'Bryan, T. A., Zurlo, J., Miller, D. Q., & Joshi, N. (2003). Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Archives of Internal Medicine*, 163(4), 402-410.
- [137]. Nahimana, A., Rabodonirina, M., Bille, J., Francioli, P., & Hauser, P. M. (2004). Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(11), 4301-4305.
- [138]. Costa, M. C., Esteves, F., Antunes, F., & Matos, O. (2006). Genetic characterization of the dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), 1246-1249.
- [139]. Iliades, P., Meshnick, S. R., & Macreadie, I. G. (2005). Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS gene confer cross-resistance to sulfa drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 741-748.
- [140]. Limper, A. H., Knox, K. S., Sarosi, G. A., Ampel, N. M., Bennett, J. E., Catanzaro, A., ... & Mody, C. H. (2011). An official American Thoracic Society statement: treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(1), 96-128.
- [141]. Gosey, L. L., Howard, R. M., Witebsky, F. G., Ognibene, F. P., Wu, T. C., Gill, V. J., & MacLowry, J. D. (1985). Advantages of a modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of clinical Microbiology*, 22(5), 803-807
- [142]. Wakefield, A. E., Pixley, F. J., Banerji, S., Sinclair, K., Moxon, E. R., Miller, R. F., & Hopkin, J. M. (1990). Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *The Lancet*, 336(8713), 451-453.
- [143]. Tamburrini, E., Mencarini, P., Visconti, E., Zolfo, M., De Luca, A., Siracusano, A., ... & Wakefield, A. E. (1996). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *Journal of clinical microbiology*, 34(6), 1586-1588.
- [144]. Tia, T., Putaporntip, C., Kosuwin, R., Kongpolprom, N., Kawkitinarong, K., & Jongwutiwes, S. (2012). A highly sensitive novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients. *Clinical microbiology and infection*, 18(6), 598-603.
- [145]. Maillet, M., Maubon, D., Brion, J. P., François, P., Molina, L., Stahl, J. P., ... & Pavese, P. (2014). *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(3), 331-336.
- [146]. Kelley, C. F., Checkley, W., Mannino, D. M., Franco-Paredes, C., Del Rio, C., & Holguin, F. (2009). Trends in hospitalizations for AIDS-associated *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in the United States (1986 to 2005). *Chest*, 136(1), 190-197.
- [147]. Bienvenu, A. L., Traore, K., Plekhanova, I., Bouchrik, M., Bossard, C., & Picot, S. (2016). *Pneumocystis* pneumonia suspected cases in 604 non-HIV and HIV patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 46, 11-17.
- [148]. Pereira-Díaz, E., Moreno-Verdejo, F., de la Horra, C., Guerrero, J. A., Calderón, E. J., & Medrano, F. J. (2019). Changing trends in the epidemiology and risk factors of *Pneumocystis* pneumonia in Spain. *Frontiers in public health*, 7, 275.
- [149]. Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of fungi*, 3(4), 57.
- [150]. Özkoç, S., Köker, M., Önder, M., & Delibaş, S. B. (2016). Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in autopsy cases in Turkey. *Journal of medical microbiology*, 65(10), 1152-1157.
- [151]. Qoraan, I., Oz, Y., Metintas, M., Durmaz, G. (2018). The investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in adult individuals of Turkish population. *Biom Biostat Int J*, 7(4):311–315. DOI: 10.15406/bbij.2018.07.00223

- [152]. Güneş, I., Kalkancı, A., Kuştimur, S., Ergüven, S., Ozet, G., & Ekim, N. (2004). Comparison of the methenamine silver staining, direct fluorescent antibody and nested-polymerase chain reaction methods in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Mikrobiyoloji bulteni*, 38(1-2), 105-112.
- [153]. Döşkaya, M., Caner, A., Değirmenci, A., Wengenack, N. L., Yolasığmaz, A., Turgay, N., ... & Gürüz, Y. (2011). Degree and frequency of inhibition in a routine real-time PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in Turkey. *Journal of medical microbiology*, 60(7), 937-944.
- [154]. Özmen, A., Mıstık, R., Alver, O., Coşkun, F., Ursavaş, A., & Uzaslan, E. (2013). Bronkoalveoler lavaj (BAL) ve bronşiyal lavaj yapılan hastalardaki *Pneumocystis jirovecii* kolonizasyonu ve tanıda kullanılan yöntemlerin karşılaştırması. *Tuberk Toraks*, 61(4), 303-311.
- [155]. Tosun İ, Buruk K, Dede R, Kaklıkkaya N. (2013). İmmün Yetmezliği Olan Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde PCR, IFA ve Giemsa Boyama Yöntemleriyle *Pneumocystis jirovecii*'nin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 47(1), 195-197.
- [156]. Tekinşen FF, Koç AN. (2013). Klinik Örneklerde Çeşitli Yöntemlerle *Pneumocystis jirovecii* Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 47(4), 658-667.
- [157]. Özkoç S, Bayram Delibaş S. (2015). İyatrojenik İmmünoşüpresif ve İmmünokompetan Hastalarda *Pneumocystis jirovecii* Pnömonisi ve Kolonizasyonunun Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 49(2), 221-230.
- [158]. Töz S, Gündüz C, Tetik A, Taşbakan M, Pullukçu H, Bacakoğlu F, Taşbakan MS, Gülen F, Ünver A, Turgay N. *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi tanısında mikroskopi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması: Klinik bulgular ile yorumlanması *Tuberk Toraks* 2017;65(3):220-226
- [159]. Procop, G. W., Haddad, S., Quinn, J., Wilson, M. L., Henshaw, N. G., Reller, L. B., ... & Weinstein, M. P. (2004). Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. *Journal of clinical microbiology*, 42(7), 3333-3335.
- [160]. Aderaye, G., Woldeamanuel, Y., Asrat, D., Lebbad, M., Beser, J., Worku, A., ... & Lindquist, L. (2008). Evaluation of Toluidine Blue O staining for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* in expectorated sputum sample and bronchoalveolar lavage from HIV-infected patients in a tertiary care referral center in Ethiopia. *Infection*, 36(3), 237-243.
- [161]. HIV/AIDS surveillance in Europe 2018. World Health Organization, Europe. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0004/386959/HIVAIDS-surveillance-in-Europe-2018.pdf?ua=1
- [162]. Esteves, F., Calé, S. S., Badura, R., De Boer, M. G., Maltez, F., Calderon, E. J., ... & Matos, O. (2015). Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: evaluation of four serologic biomarkers. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(4), 379-e1.
- [163]. Matos, O., & Esteves, F. (2010). Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite*, 17(3), 219-232.
- [164]. Ozkoc, S., Erguden, C., & Delibas, S. B. (2018). Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains isolated from Aegean region of Turkey. *Parasitology research*, 117(10), 3103-3108.
- [165]. Crothers, K., Beard, C. B., Turner, J., Groner, G., Fox, M., Morris, A., ... & Huang, L. (2005). Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis pneumonia* containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *Aids*, 19(8), 801-805.
- [166]. Huang, L., Beard, C. B., Creasman, J., Levy, D., Duchin, J. S., Lee, S., ... & Navin, T. R. (2000). Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *The Journal of infectious diseases*, 182(4), 1192-1198.
- [167]. Dimonte, S., Berrilli, F., D'Orazi, C., D'Alfonso, R., Placco, F., Bordi, E., ... & Di Cave, D. (2013). Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, 68-72.
- [168]. Valerio, A., Tronconi, E., Mazza, F., Fantoni, G., Atzori, C., Tartarone, F., ... & Cargnel, A. (2007). Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Italian AIDS patients: Clinical outcome

is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 45(5), 521-528.

[169]. Hauser, P. M., Nahimana, A., Taffe, P., Weber, R., Francioli, P., Bille, J., & Rabodonirina, M. (2010). Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. *Clinical Infectious Diseases*, 51(4), e28-e33.

[170]. Suárez, I., Roderus, L., van Gumpel, E., Jung, N., Lehmann, C., Fätkenheuer, G., ... & Rybniker, J. (2017). Low prevalence of DHFR and DHPS mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from a German cohort. *Infection*, 45(3), 341-347.

[171]. Beser, J., Dini, L., Botero-Kleiven, S., Krabbe, M., Lindh, J., & Hagblom, P. (2012). Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from Swedish patients. *Medical mycology*, 50(3), 320-323.

[172]. Friaza, V., Morilla, R., Respaldiza, N., de la Horra, C., & Calderón, E. J. (2010). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among colonized individuals and *Pneumocystis pneumonia* patients from Spain. *Postgraduate medicine*, 122(6), 24-28.

[173]. Wissmann, G., Alvarez-Martinez, M. J., Meshnick, S. R., Dihel, A. R., & Prolla, J. C. (2006). Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(4), 305-307.

[174]. Ponce, C. A., Chabé, M., George, C., Cárdenas, A., Durán, L., Guerrero, J., ... & Vargas, S. L. (2017). High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations in patients with a first episode of *Pneumocystis pneumonia* in Santiago, Chile, and clinical response to trimethoprim-sulfamethoxazole therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(2), e01290-16.

[175]. Long, Y., Zhang, C., Su, L., & Que, C. (2014). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations in a group of HIV-negative immunocompromised patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Experimental and therapeutic medicine*, 8(6), 1825-1830.

[176]. Deng, X., Zhuo, L., Lan, Y., Dai, Z., Chen, W. S., Cai, W., ... & Tang, X. (2014). Mutational analysis of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase genes in HIV-infected patients in China. *Journal of clinical microbiology*, 52(11), 4017-4019.

[177]. Tyagi, A. K., Mirdha, B. R., Luthra, K., Guleria, R., Mohan, A., Singh, U. B., ... & Sreenivas, V. (2011). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) genotypes in non-HIV-immunocompromised patients: a tertiary care reference health centre study. *Medical mycology*, 49(2), 167-171.

[178]. Siripattanapipong, S., Leelayoova, S., Mungthin, M., Worapong, J., & Tan-Ariya, P. (2008). Study of DHPS and DHFR genes of *Pneumocystis jirovecii* in Thai HIV-infected patients. *Medical mycology*, 46(4), 389-392.

[179]. Robberts, F. J. L., Chalkley, L. J., Weyer, K., Goussard, P., & Liebowitz, L. D. (2005). Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1443-1444.

[180]. Dini, L., du Plessis, M., Frean, J., & Fernandez, V. (2010). High prevalence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from patients with *Pneumocystis pneumonia* in South Africa. *Journal of clinical microbiology*, 48(6), 2016-2021.

[181]. Sheikholeslami, M. F., Sadraei, J., Farnia, P., Forozandeh Moghadam, M., & Emadikochak, H. (2015). Dihydropteroate synthase gene mutation rates in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from Iranian HIV-positive and non-HIV-positive patients. *Medical mycology*, 53(4), 361-368.

[182]. Boğa, C., Bolaman, Z., Çağırğan, S., Karadoğan, İ., Özcan, M. A., Özkalemkaş, F., ... & Akova, M. (2015). Recommendations for Risk Categorization and Prophylaxis of Invasive Fungal Diseases in Hematological Malignancies: A Critical Review of Evidence and Expert Opinion (TEO-4). *Turkish Journal of Hematology*, 32(2), 100.

[183]. Sokulska, M., Kicia, M., Wesołowska, M., Piesiak, P., Kowal, A., Lobo, M. L., ... & Matos, O. (2017). Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in colonized patients with various pulmonary diseases. *Medical mycology*, 56(7), 809-815.

- [184]. Monroy-Vaca, E. X., de Armas, Y., Illnait-Zaragozí, M. T., Toraño, G., Diaz, R., Vega, D., ... & Stensvold, C. R. (2014). Prevalence and genotype distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban infants and toddlers with whooping cough. *Journal of clinical microbiology*, 52(1), 45-51.
- [185]. Gupta, R., Mirdha, B. R., Guleria, R., Agarwal, S. K., Samantaray, J. C., Kumar, L., ... & Iyer, V. K. (2011). Genotypic variation of *Pneumocystis jirovecii* isolates in India based on sequence diversity at mitochondrial large subunit rRNA. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(3), 267-272.
- [186]. Fata, A., Abdullahi, B., Rezaeitalab, F., Attaran, D., Najjari, M., & Najafzadeh, M. J. (2019). Molecular diagnosis and genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage samples obtained from patients with pulmonary disorder. *Current Medical Mycology*, 5(3), 13-18.
- [187]. Kim, T., Lee, S. O., Hong, H. L., Lee, J. Y., Kim, S. H., Choi, S. H., ... & Sung, H. (2015). Clinical characteristics of hospital-onset *Pneumocystis pneumonia* and genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in a single tertiary centre in Korea. *BMC infectious diseases*, 15(1), 102.
- [188]. Damiani, C., Choukri, F., Le Gal, S., Menotti, J., Sarfati, C., Nevez, G., ... & Totet, A. (2012). Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging infectious diseases*, 18(5), 877.
- [189]. Höcker, B., Wendt, C., Nahimana, A., Tönshoff, B., & Hauser, P. M. (2005). Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. *Emerging infectious diseases*, 11(2), 330.
- [190]. Vargas, S. L., Ponce, C. A., Gigliotti, F., Ulloa, A. V., Prieto, S., Muñoz, M. P., & Hughes, W. T. (2000). Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *Journal of clinical microbiology*, 38(4), 1536-1538.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Harun GÜLBUDAK

Doğum Tarihi : 01.09.1985

Doğum Yeri : Isparta

İş Adresi : Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

E-mail : harungulbudak@gmail.com

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji/Fen Fakültesi	Hacettepe Üniversitesi	2009
Yüksek lisans	Tıbbi Mikrobiyoloji/Sağlık Bilimler Enstitüsü	Mersin Üniversitesi	2012
Doktora	Tıbbi Mikrobiyoloji/Sağlık Bilimler Enstitüsü	Mersin Üniversitesi	2020

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Biyolog-Mikrobiyolog	Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı	2010-Devam ediyor