



doi • 10.5578/tt.58625

Tuberk Toraks 2017;65(3):220-226

Geliş Tarihi/Received: 10.08.2017 • Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 30.08.2017

KLİNİK ÇALIŞMA
RESEARCH ARTICLE

Pneumocystis jirovecii pnömonisi tanısında mikroskopi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması: Klinik bulgular ile yorumlanması

Seray TÖZ¹
Cumhur GÜNDÜZ²
Aslı TETİK²
Meltem TAŞBAKAN³
Hüsnü PULLUKÇU³
Feza BACAĞOĞLU⁴
Mehmet Sezai TAŞBAKAN⁴
Figen GÜLEN⁵
Ayşegül ÜNVER¹
Nevin TURGAY¹

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

¹ Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Ege University, Izmir, Turkey

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

² Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Ege University, Izmir, Turkey

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ege University, Izmir, Turkey

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁴ Department of Chest Diseases, Faculty of Medicine, Ege University, Izmir, Turkey

⁵ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁵ Department of Children Health and Diseases, Faculty of Medicine, Ege University, Izmir, Turkey

ÖZET

Pneumocystis jirovecii pnömonisi tanısında mikroskopi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması: Klinik bulgular ile yorumlanması

Giriş: *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi (PCP) özellikle immünsüpresif hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu çalışmada iki farklı yöntemle PCP araştırılmış olan örneklerin sonuçlarının klinik veriler ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Direkt Tanı Laboratuvarına gönderilen bronkoalveoler lavaj (BAL) örnekleri mikroskopi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile çalışılmıştır. Retrospektif olarak hastaların demografik özellikleri, klinik ve laboratuvar verileri kaydedilmiştir. Veriler SPSS 16.0 programı ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Toplam 42 hastanın (24 erkek, ortalama yaş: 31.49 ± 26.14) BAL örnekleri çalışılmıştır. Pozitif tespit edilen toplam 16 örneğin tümüne gerçek zamanlı PCR, üçüne ise mikroskopi ile *P. jirovecii* tanısı konmuştur. Hastaların altta yatan hastalıkları incelendiğinde en sık malignite olduğu saptanmıştır. *P. jirovecii* pozitif bulunan hastalardan 11 tanesi PCP olarak değerlendirilerek trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) tedavisi başlanmış, altı hasta kaybedilmiştir.

Yazışma Adresi (Address for Correspondence)

Dr. Meltem TAŞBAKAN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İZMİR - TÜRKİYE

e-mail: tasbakan@yahoo.com

Sonuç: Günümüzde gelişen tetkik ve tedavi olanaklarına rağmen PCP yüksek mortalite ile seyreden bir hastalıktır. Klinik verilerin dikkatle değerlendirilmesi ve hastaların immün durumlarının göz önünde bulundurulması önemlidir. PCP'nin erken tanısında multidisipliner yaklaşıma ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*, pnömoni, gerçek zamanlı PCR

SUMMARY

The comparison of microscopy and real time polymerase chain reaction methods for the diagnosis of *Pneumocystis Jirovecii* pneumonia: evaluation of clinical parameters

Introduction: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) causes serious infections, especially in patients with immunosuppressive diseases. In this study, it was aimed to evaluate the results of samples obtained from PCP suspected patients using two different methods together with clinical data.

Materials and Methods: Microscopy and real time polymerase chain reaction (real time PCR) methods were performed with bronchoalveolar lavage (BAL) samples sended to Ege University Medical Faculty Direct Parasitology Diagnostic Laboratory between March 2009 and June 2010. Demographic characteristics, clinical and laboratory data were also recorded retrospectively. The data were evaluated using the SPSS 16.0 program.

Results: A total of 42 BAL samples collected from patients (24 males, mean age: 31.49 ± 26.14) were included. There were totally 16 *P. jirovecii* positives either one of the tests. Sixteen and three samples were detected positive by real time PCR and microscopy, respectively. Trimethoprim-sulfamethoxazole was prescribed in 11 PCP diagnosed cases and 6 of them died.

Conclusion: Today, despite the growing opportunities in diagnosis and treatment, PCP pneumonia is associated with high mortality. Careful examination of clinical data and immune status of the patients are important. Multidisciplinary approach is required for early PCP diagnosis.

Key words: *Pneumocystis jirovecii*, pneumonia, real time PCR

GİRİŞ

Pneumocystis jirovecii tek hücreli, ökaryotik bir mikroorganizmadır. İlk tanımlandığında protozoon olarak kabul edilmiş sonra yapılan ultrasrütürel çalışmalar sonucu mantarlara benzer olduğu kanıtlanmıştır. *P. jirovecii* başlıca hava yolu ile bulaşır. Nadiren farklı klinik tablolara neden olmakla birlikte en sık pnömoni tablosu ile karşımıza çıkmaktadır. *P. jirovecii* pnömonisi (PCP)'nin, immünsüpresif hastalarda ciddi solunum yetmezliğine neden olduğu bilinmektedir. Özellikle kazanılmış immünyetmezlik sendromu (AIDS), malignite, organ transplantasyonu, steroid veya immünsüpresif tedavi alanlar başlıca risk gruplarını oluşturmaktadırlar (1,2).

Hastalığın kliniğinde dispne, takipne, nonprodüktif öksürük, ateş ve siyanoz görülebilir (2). Fizik muayenede spesifik bir bulgu yoktur ve radyolojik olarak interstisyel pnömoni görünümü hakimdir. Erken dönemde PCP'nin klinik olarak düşünülmesi, uygun örnekleme ve uygun yöntemler ile etkenin araştırılması hayat kurtarıcı olmaktadır. Etken kültürde üretilemediğinden kesin tanı, alınan örneklerde organizmanın mikroskopik olarak gösterilmesi, floresan monoklon antikorları ile antijenin veya moleküler yöntemlerle spesifik DNA'nın saptanmasıyla konulabilmektedir (3,4). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nda çoğaltılmak

üzere büyük yüzey glikoprotein geni (major surface glycoprotein; MSG), mitokondriyal büyük alt birim (mitochondrial large subunit; mtLSU) rRNA geni, dihidropteroate synthase (DHPS) geni, ısı şok protein (heat shock protein; HSP) 70 geni, beta-tubulin geni ve cyclin-dependent kinase (cdc2) geni gibi farklı gen bölgeleri hedeflenebilmektedir (5,6). Bunlardan mtLSU ve MSG gibi çok kopyalı genler *P. jirovecii*'nin saptanmasında en yüksek hassasiyeti göstermektedirler. PCR kolonizasyon olduğu halde hastalık oluşmayan olguları da saptaması nedeniyle düşük pozitif prediktif değer ve yüksek negatif prediktif değer göstererek özellikle PCP tanısının dışlanmasında önem taşımaktadır (6).

Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Direkt Tanı Laboratuvarına PCP ön tanısıyla gönderilen bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinde, Gram Weigert ve Giemsa boyama yöntemleri uygulanarak mikroskopik bakı ve gerçek zamanlı PCR ile *P. jirovecii* araştırılmış ve sonuçların hastaların klinik verileri eşliğinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışılan Örnekler

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Direkt Tanı Laboratuvarına gönderilen toplam 42 hastaya ait BAL örnekleri, Gram Weigert ve Giemsa boya-

ma yöntemleri uygulanarak mikroskopik bakı ve gerçek zamanlı PCR yöntemleri ile çalışılmıştır. Gerçek zamanlı PCR yöntemi, *P. jirovecii* mtLSU rRNA geninin kısmi dizisine göre yeni tasarlanan spesifik primer ve probalar ile uygulanmıştır.

Retrospektif olarak hastaların demografik (yaş, cinsiyet), klinik (ateş, solunum sıkıntısı, hemoptizi, eşlik eden hastalık, tanı, tedavi) ve laboratuvar verileri (hemogram, CRP, akciğer görüntülemesi, HIV) kaydedilmiştir. Veriler SPSS 16.0 programı ile değerlendirilmiştir.

Örneklerin Boyama ve Gerçek Zamanlı PCR için Ön Hazırlığı

Mukus içeren BAL örnekleri, iki kat %0.1 dithioreitol eklendikten sonra 1500 g devirde 5 dakika santrifüj edilerek, üst kısımları atılmıştır. Eritrosit içeren örnekler ise, aynı miktarda %0.1 saponin eklendikten sonra 1500 g devirde 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısımları uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelletler PBS tamponu ile sulandırıldıktan sonra, 200 µl örnek DNA izolasyonu için -20°C'ye konmuş ve kalan örnek 1500 g devirde 5 dakika sitosantrifüj edilerek (Hettich, Universal 320) havada kurutulduktan sonra Giemsa ve Gram Weigert boyama işlemleri uygulanmıştır.

Boyama İşlemleri

Giemsa boyama işlemi için, metanol ile fikse edilen örnekler havada kurutulup, %10 Giemsa solüsyonu ile kaplanmış ve oda ısısında 30 dakika inkübe edilmiştir. Preparatlar çeşme suyunda yıkanıp daha sonra kurutulmuştur.

Gram Weigert boyama işlemi için, örnekler oda ısısında %1 Eosin-Y solüsyonunda 5 dakika boyanarak distile su ile 2 dakika çalkalanmış, sonra 5 dakika kristal viyole solüsyonu (%5 kristal viyole; %10 etanol; %2 anilin yağı) ile boyanıp, Gram iodin solüsyonuna (3.61 mM potasyum iyot; 1.18 mM iodin) daldırılıp çıkartılarak 5 dakika beklenmiş ve distile su ile çalkalanıp kağıt havlu ile örneğin çevresi temizlenerek kurutulmuş, son olarak anilin yağı/ksilen solüsyonunda (%50 anilin yağı; %50 ksilen) yıkanıp, ksilen ile boyama durdurulmuştur. Preparatlar x1000 büyütmede ışık mikroskopunda deneyimli uzman tarafından incelenmiştir (5,7,8)

DNA İzolasyonu

Olgulardan alınan BAL örneklerinden hazırlanan ve -20 °C'de saklanan 200 µl pelletlerden High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kullanılarak DNA izolasyonu protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Gerçek Zamanlı PCR

Elde edilen DNA örneklerinden *P. jirovecii* varlığının saptanabilmesi için total hacim 10 µl olacak şekilde 20-50 ng genomik DNA, 400 nM forward ve reverse primerler (Forward: 5'-GTAGGTATAGCACTGAATATCTCG-3', Reverse: 5'-TTTAGATATCCAACAACCTTTTATTTTCAC-3'), 200 nMprobar(Probe1:ATAATCAGACTATGTGCGATAAGGTAGAF, Probe 2: LC640-CGAAAGGGAAACAGCCCAGAAC -PH), 2 mM MgCl₂, 1 µl LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation probe (Roche Applied Science) ve 1.7 µl PCR suyu (Roche Applied Science) ile örnekler hazırlanarak gerçek zamanlı PCR'yi, LightCycler 2.0 (Roche Applied Science; Mannheim, Germany) cihazında gerçekleştirilmiştir. Olgulara ait sonuçlar, analiz sonucunda elde edilen erime eğrisi pik derecelerine göre pozitif ve negatif olarak belirlenmiştir. Erime eğrisi analizi Kanal 2' den gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisinde pozitif örnekler 56°C ile 63°C de pik vermektedir (Resim 1).

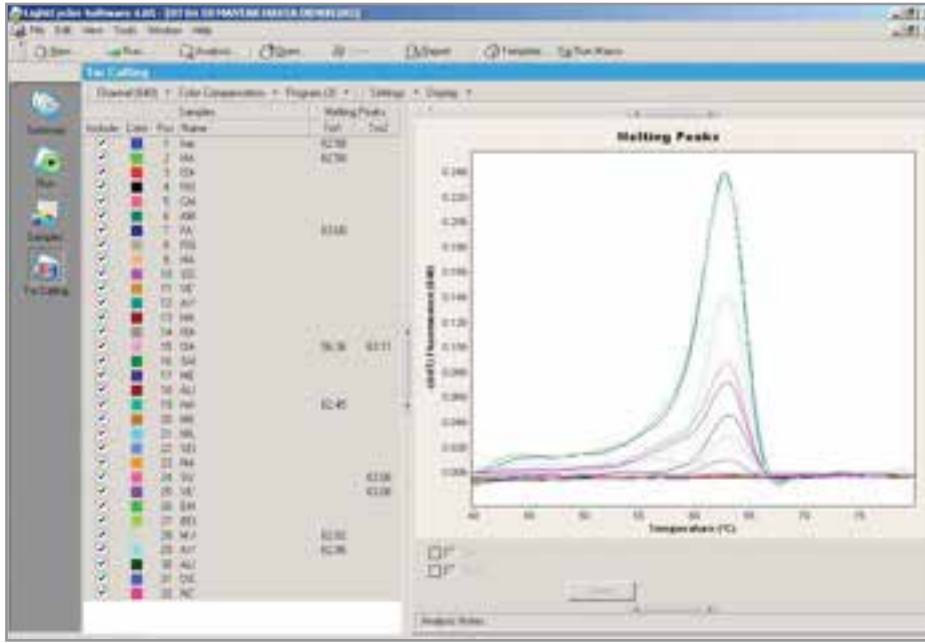
BULGULAR

Toplam 42 hastanın (24 erkek, yaş ortalaması 31.29 ± 26.43 (min: 1-max: 85) BAL örneği çalışılmıştır. On altı örnekte herhangi bir test yöntemi ile pozitiflik saptanmıştır. Üç örnek, gerçek zamanlı PCR ve mikroskopi ile pozitif saptanmış iken 13 örnek sadece gerçek zamanlı PCR ile pozitif bulunmuştur. Mikroskopik bakı altın standart olarak alınarak PCR yönteminin hassasiyet ve özgünlük değerleri hesaplanmıştır (Tablo 1).

Hastaların klinik, laboratuvar bulguları, ek hastalıklar ve test sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. Hastaların altta yatan risk faktörleri incelendiğinde en sık malignite ve romatolojik hastalığa bağlı immünsüpresan ilaç kullanımı saptanmıştır.

P. jirovecii tanısı alan hastaların 13'ünde solunum sıkıntısı, 12'sinde ateş görülmüştür. Lökositöz beş hastada, lökopeni ise bir hastada saptanmıştır. Hastaların akciğer grafilerinde en sık görülen radyolojik bulgunun pnömonik infiltrasyon olduğu tespit edilmiştir. Yüksek rezolusyonlu akciğer tomografisi (HRCT) çekilen hastaların 11 tanesinde pulmoner infiltrasyon, beşinde buzlu cam görünümü ve bir hastada ise nodüler patern görülmüştür. Örneklerinde *P. jirovecii* pozitifliği saptanan hastalardan, PCP olarak değerlendirilen 11'ine trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) tedavisi başlanmış, altı hasta kaybedilmiştir.

Ön tanıda PCP düşünülen ancak sonrasında PCP ile uyumlu klinik bulgusu olmayan, fakat sadece gerçek zamanlı PCR ile *P. jirovecii* pozitifliği saptanan ve



Resim 1. *Pneumocystis jirovecii* gerçek zamanlı PCR ve erime eğrisi analiziyle pozitifliğinin değerlendirilmesi. Pozitif örnekler erime eğrisinde 56°C ve 63°C de pik vermektedir. Hassasiyet ve özgünlük hesaplaması Medcalc® (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) programı kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 1. Mikroskopi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırmalı sonuçları

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu	Mikroskopik bakı		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	3	13	16
Negatif	-	26	26
Toplam	3	39	42
Hassasiyet	%100 (%95 CI: %29.24-100)		
Özgünlük	%66.67 (%95 CI:%49.78-80.91)		
Pozitif prediktif değer	%18.75		
Negatif prediktif değer	%100		

yabancı cisim aspirasyonu, fungal pnömoni, bronşiektazi, influenza pnömonisi ve pnömoni tanılarıyla takip edilen beş olguya tedavi uygulanmamıştır.

TARTIŞMA

Günümüzde gelişen tetkik ve tedavi olanaklarına rağmen PCP yüksek mortalite ile seyreden bir hastalıktır. Klinik verilerin dikkatle değerlendirilmesi, hastaların immün durumlarının göz önünde bulundurulması önemlidir. Bunun yanı sıra erken tanı konulabilmesi için multidisipliner yaklaşım ve laboratuvar ile iletişim

kolaylık sağlayabilmektedir. Laboratuvara gönderilen örneğin miktarı, yoğunluğu ve etkenin akciğer dokusunda homojen dağılmaması laboratuvar testlerinin başarısını etkilemektedir (9). Kesin tanıda parazitin direkt görülmesi yanında spesifik antijen ve DNA'nın saptanması da önemlidir. Çalışmamızda, gerçek zamanlı PCR ile spesifik DNA çoğaltılmasının, tanının sensitivitesini artırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, toplumda yüksek *P. jirovecii* taşıyıcılık oranı göz önünde bulundurulmalıdır ve *P. jirovecii* pozitif saptanan hastalarda tedaviye karar verilirken klinik bulgular

Tablo 2. Klinik ve laboratuvar bulgular ile ek hastalıklar

	<i>P. jirovecii</i> pozitif (n= 16)	<i>P. jirovecii</i> negatif (n= 26)	Toplam (n= 42)
Ateş, n (%)	12	15	27
Solunum sıkıntısı	13	17	30
Hemoptizi	1	1	2
Lökositoz	5	12	17
Lökopeni	1	4	5
CRP yüksekliği (0.5 mg/dL)	12	19	31
Risk faktörleri			
Malignite	4	5	9
İmmünsüpresif ilaç kullanımı	4	2	6
Diyabet	-	2	2
Kronik böbrek yetmezliği	2	1	3
Atektazi	-	2	2
Konjenital anomali	-	2	2
Tüberküloz	1	2	3
Böbrek transplantasyonu	1	-	1
Akciğer transplantasyonu	1	-	1
Bronşektazi	1	-	1
AIDS	-	2	2
Astim	-	1	1
Koroner arter hastalığı	-	2	2
Akciğerde yabancı cisim	-	1	1
Risk faktörü olmayan	3	4	7

* Bazı hastalarda birden fazla risk faktörü bulunmaktadır.

dikkatle değerlendirilmelidir. PCP kuşkusuz olan hastalarda, gerçek zamanlı PCR yanında en az bir tanısal yöntemin uygulanmasının ve tedavi için hastalık semptomlarının değerlendirilmesinin kolonizasyon ve hastalık ayırımında yararlı olduğu kanısındayız. Çalışmamızda mikroskopi pozitif olan üç örnek gerçek zamanlı PCR ile de pozitif bulunmuş ve bu hastalar tedavi görmüşlerdir. Sadece gerçek zamanlı PCR'nin pozitif bulunduğu sekiz örnekte ise tedavi kararı hastaların klinik bulguları, görüntüleme yöntemlerinin bulguları ve ayırıcı tanıda düşünülen diğer hastalıkların test sonuçlarına göre verilmiştir. Gerçek

zamanlı PCR yanında uygulanan diğer bir yöntem sensitivitesi daha düşük bile olsa, klinisyenin PCP tanısını erken koymasına ve tedaviye başlamasına, sadece klinik bulgulara göre profilaktik tedaviye başlandıysa devamına karar vermesine destek sağlamaktadır.

P. jirovecii morfolojisini tanımlamak için Giemsa, Gram Weigert, Papanicolau, Gomori-Grocott, Toluidine blue O gibi pek çok farklı boya kullanılabilir. Bu boyaların bir kısmı trofozoit formları boyarken bir kısmı sadece kist duvarını boyar (3,4). Çalışmamızda biri kist duvarını boyayan Gram Weigert, diğeri ise intrakistik cisimleri ve trofozoitleri boyayan Giemsa boyaları uygulanmıştır.

Direkt floresan antikor (DFA) yöntemi yüksek duyarlılık ve özgüllük nedeniyle tanıda tercih edilen bir antijen saptama yöntemidir. Kolay uygulanabilen bir yöntem olması ve sonucun kısa sürede alınabilmesi gibi önemli avantajları olmakla beraber floresan mikroskopi gerektirmesi de dezavantajdır. Ülkemizde dokuz yıllık sürede parazitoloji laboratuvarına gönderilen örneklerin DFA yöntemi ile değerlendirildiği bir çalışmada %54'lük pozitiflik saptanmıştır. Bu çalışmada pozitiflik oranının yüksek olmasının; kullanılan yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması, alınan örneklerin uygun ve risk grubundaki hastalardan istenmiş olması ile testi çalışan ve değerlendiren personelin deneyimli olmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (10).

Moleküler yöntemler de yüksek duyarlılığa sahip olmakla birlikte kolonizasyon-infeksiyon ayırımında sorunlara neden olmaktadır (6). Klinik bulgular ise altta yatan hastalığa göre değişebilmektedir. PCP, akciğer nakli hastalarında uzun süre nonspesifik bulgularla karşımıza çıkabilmektedir (11). Klinik belirtisi olan PCP hastalarında en sık görülen bulgular dispne, taşipne, öksürük, hemoptizi, ateş ve siyanozdur (2). Çalışmamızda, *P. jirovecii* pozitif saptanan 16 hastanın 13'ünde solunum sıkıntısı mevcuttu. Hastaların laboratuvar incelemelerinde beş hastada lökositoz, bir hastada lökopeni, 12 hastada ise C-reaktif protein (CRP) yüksekliği saptanmıştır. Ancak bu testlerin tanıyı desteklemede rolleri kısıtlıdır. Radyolojik incelemelerden akciğer grafisi önemli bir tanı aracıdır. Hastaların bir bölümü normal akciğer grafisi ile başvurursa da, klasik olarak bilateral difüz, simetrik retiküler (intersitisel) veya granüler opasiteler görülebilir. Başlangıçta bilateral ve simetrik olan opasiteler, difüz tutulumla

doğru ilerleyebilir. Akciğer grafisi normal olanlarda prognoz daha iyi seyretmekle birlikte hastalarda tedaviye başladıktan sonra akciğer grafisinde iyileşme olmayabilir veya kötüleşme gözlenebilir. Ağır PCP olgularında; klinik ve radyolojik düzelmelerin uzun süreceği unutulmamalıdır (12). Daha ileri radyolojik incelemelerden HRCT'de buzlu cam opasitelerin varlığı ve kistik lezyonlar görülebilir. Özellikle akciğer grafisi normal olan hastalarda HRCT yararlıdır. Çalışmamızdaki, pozitif ve negatif grup karşılaştırıldığına, HRCT sonuçlarının PCP hastalarında klinik değerlendirmeye katkı sağladığı gözlenmiş olup, hastalarımızda en sık görülen HRCT bulgusu pulmoner infiltrasyon olarak tespit edilmiştir.

Tedavide TMP-SMZ ilk önerilen ilaçtır. Pentamidin isotiyonat, klindamisin, primakin de alternatif olarak kullanılabilir ilaçlardır. TMP-SMZ'nin (15-20 mg/kg/gün/75-100 mg/kg/gün) 14 gün, insan immünyetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte hastalarda ise 21 gün süre ile uygulanması önerilmektedir (6). Çalışmamızda 11 hasta TMP-SMZ ile tedavi edilmiştir. Beş hastada gerçek zamanlı PCR ile *P. jirovecii* saptanmasına rağmen kolonizasyon olarak düşünülerek tedavi verilmiştir. *P. jirovecii* kolonizasyonunun epidemiyolojik ve klinik anlamı tam anlaşılacakla birlikte özellikle akciğer hastalığı olanlarda %2.6-55 arasında kolonizasyon saptandığı bildirilmiştir. İzmir'de pnömöni bulgusu olmayan 30 hastanın 21 (%70)'inde PCR, altı hastada DFA ve bir hastada mikroskopi ile *P. jirovecii* pozitifliği bulunmuştur. Bu hastaların 4'ünde hem PCR hem de DFA ile pozitiflik görülmüş ve PCR'nin kolonizasyonu göstermede iyi bir yöntem olduğu belirtilmiştir (13).

Uyguladığımız *P. jirovecii* gerçek zamanlı PCR ile erime eğrisi analizinde tüm örnekler 63°C de pik veren bir örnekte 63°C'nin yanı sıra 56°C'de ikinci bir pik gözlenmiştir. Bu sonuç bu hastanın genetik olarak farklı iki suş ile olasılıkla farklı zamanlarda iki kez *P. jirovecii* ile karşılaştığını göstermektedir. Genotiplerin farklılığının saptanması ve karşılaştırılması özellikle salgınlarda önem kazanmaktadır (9). Çalışmamızda örneklerle sekans analizi uygulanmamıştır. Daha fazla sayıda örnek ile çalışılarak farklı genotip olduğu düşünülen örneklerde sekans analizinin yapılması ileride oluşabilecek salgınlara için temel bilgi oluşturabilecek tir.

Döşkaya ve arkadaşlarının çalışmasına dahil edilen aynı laboratuvar da mikroskopik bakışı yapılan 42 örneğin 9 tanesinin, bu çalışmadaki 9 örnekle aynı

örnekler olduğu saptanmıştır (5). Ancak bizim çalışmamızda seçilen ve ekibimiz tarafından primer ve problemleri yeni düzenlenen gerçek zamanlı PCR yönteminin, hedef gen bölgesi *P. jirovecii* mtLSU rRNA geninin bir bölümü iken, daha önce yayınlanan çalışmadaki gerçek zamanlı PCR yönteminin hedef gen bölgesi cdc2 gen bölgesidir. Ortak olarak çalışılan 9 örnek retrospektif olarak incelendiğinde, cdc2 PCR ile dokuz örnekten dördünün, çalışmamızda uygulanan mtLSU PCR ile ise altı örneğin pozitif sonuçlandığı, mikroskopik bakı ile ise dokuz örnekten sadece birisinin pozitif saptandığı ve bu örneğin PCR ile sadece bizim çalışmamızda pozitif bulunduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, ülkemizde PCP tanısında PCR yöntemi için farklı gen bölgeleri hedef seçilerek validasyon çalışmalarının yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, özellikle immünsüpresif hasta gruplarında yüksek mortaliteye neden olabilen bu enfeksiyonun erken tanısı ve tedavisi için multidisipliner yaklaşım ve laboratuvar ile iletişimin kolaylık sağlayacağı, moleküler çalışmaların devamının, tanıda hassasiyetin artırılmasında ve etkenin genotiplendirilmesinde yarar sağlayacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sokulska M, Kicia M, Wesolowska M, Hendrich AB. *Pneumocystis jirovecii*—from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitol Res* 2015;114:3577-85.
2. Carmona EM, Limper AH. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis pneumonia*. *Ther Adv Respir Dis* 2011;5:41-59.
3. Elbüken G. *Pneumocystis jirovecii* enfeksiyonu ve akciğer tutulumu. *Uludağ Üniv Tıp Fak Derg* 2007;33:97-103.
4. Garcia LS. Tissue protozoa. In: *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed. Washington: ASM Press, 2001:132-58.
5. Döşkaya M, Caner A, Degirmenci A, Wengenack NL, Yolasıgımaz A, Turgay N, et al. Degree and frequency of inhibition in a routine real-time PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in Turkey. *J Med Microbiol* 2011;60:937-44.
6. Cooley L, Dendle C, Wolf J, Teh BW, Chen SC, Boutlis C, et al. Consensus guidelines for diagnosis, prophylaxis and management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014. *Intern Med J* 2014;44:1350-63.
7. Gill VJ, Nelson NA, Stock F, Evans G. Optimal use of the cytocentrifuge for recovery and diagnosis of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage and sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:1641-4.
8. Markell EK, John DT, Krotoski WA (eds). *Examination of*

- blood, other body fluids and tissues, sputum and urine. In: *Markell and Voge's Medical Parasitology*. 8th ed. WB Saunders Company, 1999:456-71.
9. Alanio A, Bretagne S. *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Res* 2017;23:739.
10. Yanık K, Karadağ A, Usta E, Ünal N, Yılmaz H, Hökelek M. *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi şüphesi ile 2003-2011 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına gönderilen solunum yolu örneklerinde direkt floresans antikor test sonuçlarının değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2012;42:132-6.
11. Girginkardeşler N, Ok ZÜ, Korkmaz M. *Pneumocystis pnömonisi*. Özcel'in tıbbi parazit hastalıkları. Özcel MA (ed). İzmir: Meta Basım Matbaacılık, 2007:452-47.
12. Mermut G, Avcı M, Zincir M. *Pneumocystis pnömonisi*. *Bamçag Bülteni* 2010;1:7-10.
13. Özkoç S, Bayram Delibaş S, Erbaycu AE, Ergüden C, Akisü Ç. Akciğer hastalığı olan hastalarda *Pneumocystis jirovecii* kolonizasyonunun araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 2014;38:214-9.