

Bronkoalveoler lavaj (BAL) ve bronşiyal lavaj yapılan hastalardaki *Pneumocystis jirovecii* kolonizasyonu ve tanıda kullanılan yöntemlerin karşılaştırması

Ahmet ÖZMEN¹, Reşit MISTIK¹, Oktay ALVER², Funda COŞKUN³, Ahmet URSAVAŞ³, Esra UZASLAN³

¹ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa,

² Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa,

³ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Bronkoalveoler lavaj (BAL) ve bronşiyal lavaj yapılan hastalardaki *Pneumocystis jirovecii* kolonizasyonu ve tanıda kullanılan yöntemlerin karşılaştırması

Giriş: *Pneumocystis jirovecii*'nin neden olduğu *Pneumocystis pnömonisi* (PCP) bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda en sık ve ciddi olarak gözlenen fırsatçı enfeksiyonlardan biridir. Çalışmamızda göğüs hastalıkları anabilim dalı tarafından klinik ya da poliklinik ortamında takip edilen ve tanı amaçlı bronkoskopi yapılan toplam 100 hastaya ait bronkoalveoler lavaj (BAL) ve bronşiyal lavaj örnekleri değerlendirildi.

Materyal ve Metod: Alınan BAL ve bronşiyal lavaj örnekleri metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi O, Wright-Giemsa, boyamaları ve immün floresans antikor (IFA), nested polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile değerlendirildi.

Bulgular: BAL ve bronşiyal lavaj örneklerinde metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi O, Wright-Giemsa boyamaları ile etken saptanmadı. IFA testiyle 13 hastada *P. jirovecii*'nin kistleri saptanırken; nested PCR ile 16 hastada *P. jirovecii*'nin DNA'sı saptandı. Hem PCR hem IFA testi ile *P. jirovecii* saptanan toplam 8 hasta mevcuttu. *P. jirovecii* saptanan hasta örnekleri incelendiğinde bu örneklerin 13'ünün BAL olduğu ve 8'inin bronşiyal lavaj olduğu görüldü. Olgu gruplarında bakılan yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, hipertansiyon, diabetes mellitus, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), serebrovasküler olay (SVO), konjestif kalp yetmezliği (KKY), son üç ayda hastanede yatma öyküsü, antibiyotik kullanımı ve radyolojik bulguları açısından değerlendirildiğinde *P. jirovecii* pozitifliğiyle aralarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. Olgu grupları PCR ve IFA pozitifliklerine göre gruplara ayrılarak değerlendirme yapıldığında IFA veya PCR pozitif olgularda immünsüpresyon açısından anlamlı farklılık saptandı ($p=0.003$). Pozitif olguların %28.6'sı immünsüpresif saptanırken, PCR veya IFA negatif olguların %3.8'i immünsüpresifti. PCR yöntemi tanıda altın standart olarak kabul edilen IFA ile duyarlılık ve özgüllük açısından kıyaslandığında duyarlılık %61.5 ve özgüllük %90.8 olarak belirlendi. McNemar testiyle IFA ve PCR tanı testi sonuçlarının uyumlu oldukları saptandı ($p=0.581$).

Sonuç: Bursa bölgesinde yapılan bu çalışmada HIV negatif olgularda immünsüprese hastalarda *P. jirovecii* göstermeye yönelik boyama yöntemlerinin duyarlılığı düşük olduğu ayrıca IFA ile nested PCR yönteminin paralel sonuçlar vermediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*, bronkoalveoler lavaj, bronşiyal lavaj, immünsüpresyon, IFA, nested PCR.

Yazışma Adresi (Address for Correspondence):

Dr. Funda COŞKUN, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı,
BURSA - TÜRKİYE

e-mail: fundacoskun@gmail.com

SUMMARY

The Pneumocystis jirovecii colonization in bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial washing and the comparison of methods which are used in diagnosis

Ahmet ÖZMEN¹, Reşit MISTIK¹, Oktay ALVER², Funda COŞKUN³, Ahmet URSAVAŞ³, Esra UZASLAN³

¹ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Uludag University, Bursa, Turkey,

² Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Uludag University, Bursa, Turkey,

³ Department of Chest Diseases, Faculty of Medicine, Uludag University, Bursa, Turkey.

Introduction: *Pneumocystis pneumonia* (PCP) which is caused by *Pneumocystis jirovecii* is usually seen in the patients whose immune system is suppressed. It is seriously seen as an opportunist infection. In our study; totally 100 bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial washing samples collected by pulmonary disease department. Which belong to the patients in the clinics, and out patient clinic of the bronchoscopy material were evaluated.

Materials and Methods: The BAL and bronchial washing were evaluated by the help of methenamine silver stain (Gomori/Grocott), toluidine blue O stain, Wright-Giemsa stain, immunofluorescent antibody (IFA) stain, nested polymerase chain reaction (PCR).

Results: In the BAL and bronchial washing samples the agent couldn't be shown by the help of methenamine silver (Gomori/Grocott), toluidine blue O, Wright-Giemsa staining. In 13 patients with IFA test the cysts of *P. jirovecii* were determined. In 16 patients with nested PCR; the DNA of *P. jirovecii* were determined. In 8 patients by using PCR and IFA test *P. jirovecii* was determined. When the samples which had *P. jirovecii* were analyzed; 13 of them were BAL and 8 of them were bronchial washing. When the phenomenon groups were evaluated according to age, gender, smoking, hypertension, diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cerebrovascular accident (CVA), congestive cardiac failure (CCF), staying in the hospital in the last three months, using antibiotics and radiological findings; there wasn't a statistical meaningful relation between *P. jirovecii* positivity and these situations. When the phenomenon groups were evaluated according to PCR and IFA positivity; in IFA and PCR positive patients for immunosuppressive there was a meaningful difference ($p=0.003$). The positive 28.6% of cases were immunosuppressed and the 3.8% of PCR or IFA negative cases were immunosuppressed. When PCR method was compared with IFA which is called gold standard for sensitivity and specificity; sensitivity was found 61.5% and specificity was found 90.8%. IFA and PCR diagnosis test results were compatible (With McNemar test $p=0.581$).

Conclusion: Diagnostic sensitivity of staining methods for *P. jirovecii* in immunocompromised HIV negative patients are found to be low and it was shown that IFA and nested PCR methods have not parallel results.

Key Words: *Pneumocystis jirovecii*, bronchoalveolar lavage, bronchial washing, immunosuppression, IFA, nested PCR.

Tuberk Toraks 2013; 61(4): 303-311 • doi: 10.5578/tt.2954

GİRİŞ

Pneumocystis jirovecii'nin neden olduğu *Pneumocystis* pnömonisi (PCP) immünsüpre hastalarda en sık ve ciddi olarak gözlenen fırsatçı enfeksiyonlardan biridir (1, 2).

P. jirovecii'nin bulaşma yolu tam olarak anlaşılmadığı gibi çevresel kaynağı da tanımlanamamıştır (3). Latent enfeksiyonun reaktivasyonu savunulmakla birlikte; çevresel kaynaklardan bulaşın yanı sıra kişiden kişiye hava yoluyla bulaşın da olası yol olduğuna dair kanıtlar vardır (2,3). İnfekte olmayan kişiler *Pneumocystis*'in asemptomatik taşıyıcısı da olabilirler (3). Güncel çalışmalar; *Pneumocystis*'in immünkompetan bireylerde

veya aktif enfeksiyon veya klinik hastalık bulgusu olmayan HIV pozitif hastalarda da düşük miktarda bulunabildiğini ortaya koymuştur (4,5). Tekrar inceleme ile organizmaların saptanamaması, geçici asemptomatik *P. jirovecii* taşıyıcılığı olabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, sayısı gün geçtikçe artan yayınlarda, altta yatan hastalığı olan bağışıklık sistemi sağlam konaklarda, *P. jirovecii*'nin asemptomatik akciğer kolonizasyonu yapabileceği bildirilmektedir (6-10).

Primer enfeksiyonun çok yaygın ve erkenden geçirildiğine dair kanıtlar serokonversiyona dayalıdır. Yirmi aylık süt çocuklarında antikör pozitifliği oranı %85 olarak bulunmuştur (2).

Duyarlı bir konakta PCP'nin ana semptomları dispne, ateş, balgamsız öksürüktür (11). Hastalığın semptom ve bulgularıyla, göğüs radyolojisi bulgularının hiçbir kombinasyonu PCP için tanı koydurucu değildir (12).

Solunumla ilgili şikayetleri, ateşi ve anormal göğüs radyografileri olan ve immünsüprese herhangi bir hastada PCP düşünülmelidir (11).

PCP'nin kesin tanısı balgam, indüklenmiş balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL), bronşiyal lavaj (BL), trakeal aspirasyon veya bronşiyal fırçalama, AC biyopsisi ve plevral sıvı örneklerinde mantarın morfolojik olarak gösterilmesiyle konur.

Bu örneklerden *Pneumocystis*'i tanımlamak için çeşitli boyalar kullanılmaktadır. Metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi O, gibi boyalar kistlerin hücre duvarlarını boyarken, Wright-Giemsa, Gram-Weigert gibi boyalar trofik formu ve intrakistik cisimcikleri boyar (3,11-13).

Pneumocystis'in kültürde üretilmemesi ve mikroskopik inceleme için çoğu zaman invaziv bir girişim gerekmesi nedeniyle moleküler tanı cazip hale gelmiştir. PCR testleri BAL, indüklenmiş balgam ve ağız yıkama sıvısı örneklerinde çalışılmıştır (12).

Yapılan bu çalışma ile; BAL ve BL yapılan hastalardaki kolonizasyon; klinik ve laboratuvar bulguları uyumlu ise pnömoni tanısının konulması, BAL ve BL örneklerinde *P. jirovecii* saptanan hastaların demografik bilgileri, alta yatan hastalıkları, olası risk faktörleri göz önünde bulundurularak bu unsurların hastalıkla ilişkisi, hastalık semptom ve bulgularını taşımaksızın BAL ve BL örneklerinde *P. jirovecii* tespit edilen hastaların yukarıda bahsedilen hasta bilgileri dikkate alınarak kolonizasyon gelişiminde etkili olabilecek unsurların belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yine bu çalışmada hastalardan alınan BAL ve BL örneklerine May Grunwald/Giemsa, toluidin mavisi, metenamin gümüş (MS), immün floresans antikor (IFA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulayarak bu yöntemlerin tanıdaki duyarlılıkları ortaya konulmaya çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Nisan 2010 ile Mart 2011 arasında bir yıllık süre içerisinde toplam 100 hastanın katılımıyla, yatırılarak ya da ayaktan takip edilen; gerekçesi ne olursa olsun BAL ya da BL yapılan hastalar ve bu hastaların alınan BAL ve BL örneklerinin Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarında incelenmesiyle yapıldı.

Alınan BAL ve BL örnekleri örnekler santrifüj tüplerine ortalama 5 mL olacak şekilde konuldu ve 21°C sıcaklıkta 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında santrifüj tüpünün dibindeki çökeltiden yararlanılarak boyama, PCR, MS, IFA amaçlı 1'er mL Eppendorf tüpüne konuldu.

Boyama olarak Modifiye toluidin mavisi ve May Grünwald-Giemsa yapıldı. Metenamin Gümüş boyama SILVER METHENAMINE P.A.S.M.04-043822/L kiti ile üretici firma olan Bio Optica Milano s.p.a. talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İmmün Floresans Antikor Testi Pneumocel Direct IF Test Ticari Kiti ile gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için alınan materyaller daha sonra çalışılmak üzere -80°C derin dondurucuya kaldırıldı. *Pneumocystis* DNA ekstraksiyonu DNA izolasyon kiti (Dr Zeydanlı DNA İzolasyon Kiti) kullanılarak yapıldı. Kullanılan primerler ile *P. jirovecii* DNA'sının mitokondriyal ribozomal RNA'sının spesifik 362 bp ve 120 bp sekanslarının amplifikasyonu nested PCR ile gerçekleştirildi. **Birinci döngü PCR primer çifti:** pAZ102-E (5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3'), pAZ102-H (5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3'). Birinci PCR ürünü **362 bp**. **İkinci döngü PCR primer çifti (nested PCR; birinci PCR ürünü aşağıdaki primer çifti ile amplifiye edildi):** pAZ102-E (5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3'), pAZ102-L2 (5'-ATAAGGTAGATAGTCGAAAAG-3'). Nested PCR ürünü **120bp**.

İlk aşamada her bir hasta örneği için 5 µL Buffer, 1 µL dNTP (dNTP hazırlamak için dATP, dGTP, dCTP, dTTP her birinden 10 µL alındı 60 µL distile su ilave edilerek 100 µL'ye tamamlandı) (SibEnzyme), 0.5 µL pAZ102-E, 0.5 µL pAZ102-H, 0.4 µL taq (SibEnzyme) ve 32.6 µL distile su ilave edilerek 40 µL reaksiyon karışımı elde edildi. Elde edilen karışımdan 40 µL alındı ve hasta örneğinden 10 µL konuldu. PCR'nin ilk aşaması elde edilen toplam 50 µL örneklerin Thermal Cyclers'a (Esco's Swift Maxi Thermal Cyclers) yerleştirilmesiyle tamamlandı.

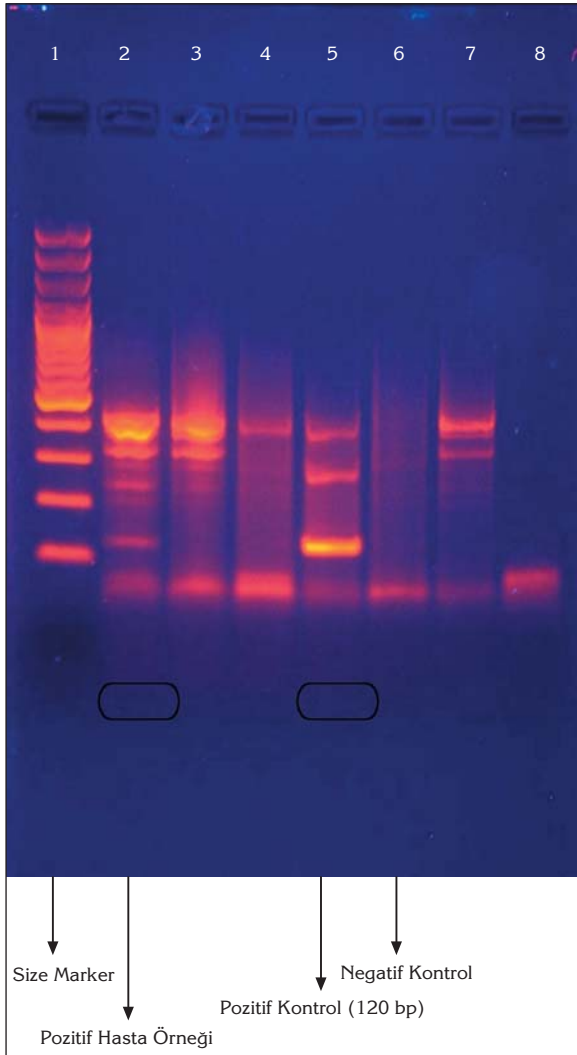
İkinci aşamada her bir hasta örneği için 5 µL Buffer, 1 µL dNTP, 0.5 µL pAZ102-E, 0.5 µL pAZ102-L2, 0.2 µL taq ve 40.8 µL distile su ilave edilerek 48 µL reaksiyon karışımı elde edildi. Elde edilen karışımdan 46 µL alındı ve hasta örneğinden 4 µL konuldu. PCR'nin ikinci aşaması elde edilen toplam 50 µL örneklerin Thermal Cyclers'a yerleştirilmesi ile tamamlandı.

İki aşamalı PCR Thermal Cyclers'da 94°C 5 dakika, 94°C 30 saniye, 56°C 30 saniye, 72°C 30 saniye toplam **40 siklus** ve 72°C 7 dakika şeklinde gerçekleştirildi.

Bantları görüntülemek için PCR ürünleri ethidium bromid içeren %1.5'lik agaroz jelde 45 dakika elektroforez işlemine tabii tutuldu.

Testte pozitif kontrol (9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen mikroskopik olarak PCP tanısı konulan hastadan elde edilen BAL örneği) ve olası kontaminasyonu gözlemlemek için negatif kontrol (steril distile su) çalışmaya dahil edildi.

Olgu grupları SPSS 15.0 programı ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. Kategorize edilen verilerde ki-kare testi kullanarak istatistiksel anlamlılık araştırıldı. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak ka-



Resim 1. PCR sonrası etidyum bromid ile boyanan agaroz jel elektroforezinde; 1. Kolon: Size marker (Her bir fragman 100 bp karşılık gelmektedir), 2. Kolon: Pozitif hasta, 3. Kolon: Negatif hasta, 4. Kolon: Negatif hasta, 5. Kolon: Pozitif kontrol, 6. Kolon: Negatif kontrol, 7. Kolon: Negatif hasta, 8. Kolon: Negatif hasta.

bul edildi. IFA ve PCR sonuçlarının uyumlulukları McNemar testiyle değerlendirildi.

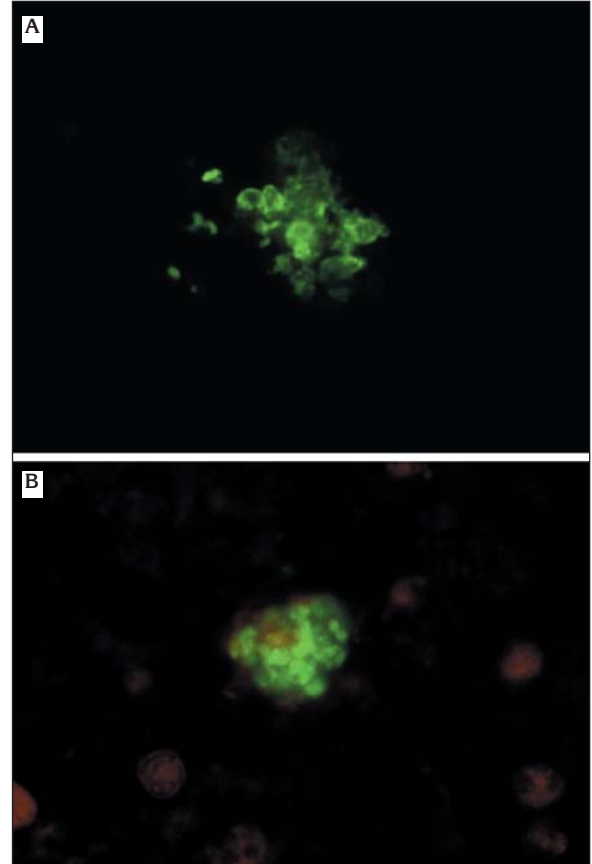
BULGULAR

Alınan örneklerin 47'si BAL, 53'ü BL'di. Bronkoskopi yapılan hastalar 66 (%66) erkek ve 34 (%34) kadından oluşmaktaydı. Hastaların yaşları 30 ile 81 arasında olup, median yaş 58, ortalama yaş 58.89 ± 1.25 olarak bulundu.

P. jirovecii pozitifliği 100 hastanın 21'inde saptandı. Pozitiflik saptanan hasta grubu 12 (%57) erkek, 9 (%43) kadın hastadan oluşmaktaydı. Hastaların yaşları 31 ile 74 arasında olup, median yaş 57; ortalama yaş 57.6 olarak bulundu.

BAL ve BL örneklerinde metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi, Wright-Giemsa boyamaları ile etken saptanmadı. Nested PCR ile 16 hastada *P. jirovecii*'nin DNA'sı saptandı (Resim 1). İmmün floresans antikor (IFA) testiyle 13 hastada *P. jirovecii*'nin kistleri saptandı (Resim 2 A,B).

Hem PCR hem IFA testiyle *P. jirovecii* saptanan toplam 8 hasta mevcuttu. PCR yöntemi tanıda altın standart



Resim 2. *P. jirovecii* DNA'sının jel elektroforezinde ultraviyole ışık altında çekilmiş fotoğrafı görülmektedir. A. Pozitif kontrol IFA, B. Pozitif hasta IFA görülmekte.

olarak kabul edilen IFA ile duyarlılık ve özgüllük açısından kıyaslandığında duyarlılık %61.5 ve özgüllük %90.8 olarak belirlendi. McNemar testiyle IFA ve PCR tanı testi sonuçlarının uyumlu oldukları saptandı (p= 0.581). Ölçümün hassasiyeti %87, prevalans %50, pozitif kestirim değeri %50, negatif kestirim değeri %94, yanlış negatif oran %38.5 ve yanlış pozitif oran % 9.2 olarak belirlendi.

Ek hastalığı olan 11 (%52.3) hasta mevcut olup; 6 (%28.5) hastada birden fazla hastalık mevcuttu. Ek hastalıklar incelendiğinde iki hastada malignite (akciğer kanseri ve primeri belli olmayan metastatik akciğer kanseri), sekiz hastada hipertansiyon, iki hastada diabetes mellitus (DM), dört hastada kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), bir hastada serebrovasküler olay (SVO), üç hastada konjestif kalp yetmezliği (KKY) mevcuttu. Pozitiflik saptanan altı hastada son üç ay içinde immünsüpresif tedavi alım öyküsü vardı

(Tablo 1). İmmünsüpresif tedavi iki hastada malignite nedeniyle diğer hastalarda ise kollajen doku hastalığı nedeniyle verilmekteydi.

Pozitiflik saptanan 21 hastanın 13'ünde son üç ay içinde hastanede yatış öyküsü mevcuttu.

Pozitiflik saptanan hasta grubunda bronkoskopi; akciğer kanseri, tüberküloz, sarkoidoz, kronik infeksiyon, interstisyel akciğer hastalığı, primer hastalığın akciğer tutulumu, lenfoma, eozinofilik alveolit, pnömoni, diyafram yüksekliği, akciğer apsesi, silikozis ve pnömokonoz endikasyonları ile yapıldı. Bronkoskopi sonucunda ise akciğer kanseri, tüberküloz, sarkoidoz, kronik infeksiyon, primer hastalığın akciğer tutulumu, antrakoz, lenfoma, eozinofilik alveolit tanılarına ulaşıldı.

Pozitiflik saptanan hasta grubundaki hastaların klinik bulguları incelendiğinde öksürük, balgam, dispne, hemoptizi, göğüs ağrısı, ateş yüksekliği ve gece terleme-

Tablo 1. Pozitiflik saptanan hastaların ek hastalık ve immünsüpresif tedavi durumları

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Solid TM	İmmünsüpresif tedavi	Ek hastalık
1	57	E	Yok	Metilprednizolon 96 mg/gün, 12 gün	Yok
2	65	E	Yok	Flantadin 3 mg PO 2 ay, değişik dozlarda 10 yıldır kullanıyor	Yok
3	55	E	Yok	Yok	Yok
4	47	K	Yok	Yok	HT, KOAH
5	72	K	Yok	Yok	HT, KOAH, KKY
6	74	E	Yok	Yok	HT
7	57	E	Primeri belli olmayan MET CA	Zoladronik asit 1 x 1, 2 kür	Yok
8	31	E	Yok	Yok	Yok
9	57	K	Yok	Prednizolon 60 mg/gün 7 gün, Prednizolon 20 mg/gün 3 gün, Metilprednizolon 500 mg/gün 2 gün, Endoksan 2 x 1 4 gün, 1 x 1, 3 gün	Yok
10	68	K	Yok	Yok	HT, SVO
11	65	K	Yok	Yok	HT
12	57	K	Yok	Yok	Yok
13	38	K	Yok	Yok	Yok
14	57	E	Yok	Yok	HT
15	61	E	Yok	Yok	Yok
16	68	E	Yok	Yok	HT, KOAH, KKY
17	73	E	AC CA	Deksametazon 8 mg/gün, 18 gün	Yok
18	65	K	Yok	Yok	HT, DM, KKY
19	50	E	Yok	Yok	DM, KOAH
20	50	E	Yok	Yok	Yok
21	42	K	Yok	Metilprednizolon 64 mg/gün	Yok

HT: Hipertansiyon, KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, KKY: Konjestif kalp yetmezliği, SVO: Serebrovasküler olay, DM: Diabetes mellitus.

Tablo 2. Pozitiflik saptanan hastalarda saptanan klinik bulgular

Klinik bulgu	Hasta sayısı	Görülme oranı
Öksürük	2	%9.5
Öksürük, dispne	2	%9.5
Öksürük, göğüs ağrısı	1	%4.7
Dispne	4	%19
Dispne, göğüs ağrısı	1	%4.7
Göğüs ağrısı	1	%4.7
Öksürük, balgam, dispne	5	%23.8
Öksürük, balgam, dispne, göğüs ağrısı, hemoptizi	1	%4.7
Öksürük, balgam, ateş	1	%4.7
Öksürük, dispne, hemoptizi	1	%4.7

si olduğu görüldü. Olgu grubundaki iki hastada ise hiçbir klinik bulgu yoktu (Tablo 2).

Pozitiflik saptanan 10 hastada bronkoskopinin yapıldığı günden itibaren son üç ay içinde takip edildikleri merkezler tarafından ampirik olarak başlanan sefalosporin, kinolon, azol, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonu, makrolit, karbapenem grubu antibiyotiklerin değişen sürelerde kullanımı mevcuttu.

Pozitiflik saptanan hasta grubunda bulunan 12 hastada sigara kullanımı mevcuttu.

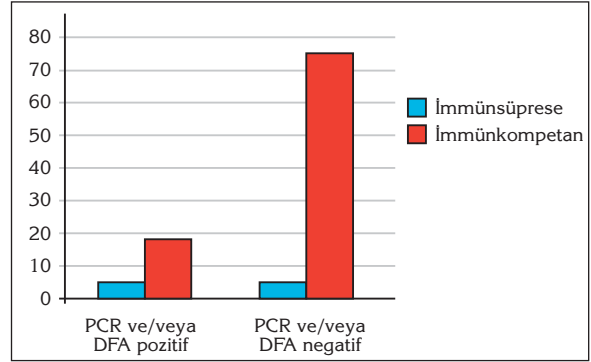
Olgu gruplarında bakılan yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, hipertansiyon, DM, KOAH, SVO, KKY, son 3 ayda hastanede yatma öyküsü ve antibiyotik kullanımı, kullanılan antibiyotiklerin tekli ve çoklu kullanımı değerlendirildiğinde *P. jirovecii* pozitifliğiyle aralarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Olgu grupları PCR ve IFA pozitifliklerine göre gruplara ayrılarak değerlendirme yapıldığında IFA veya PCR pozitif olgularda immünsüpresyon açısından anlamlı farklılık saptandı ($p= 0.003$). Pozitif olguların %28.6'sı immünsüprese iken, PCR veya IFA negatif olguların %3.8'i immünsüprese idi (Şekil 1).

Radyolojik olarak PCP düşünülen 23 hastanın 7'sinde IFA ya da PCR ile pozitiflik saptandı. İstatistiksel farklılık saptanmadı.

TARTIŞMA

P. jirovecii HIV pozitif bireylerde, konnektif doku hastalığı ile hematolojik malignitesi olanlarda ve organ transplantasyonu yapılan hastalarda hayatı tehdit eden infeksiyona neden olan fırsatçı bir patojendir (14).



Şekil 1. PCR ve IFA pozitifliklerine göre immünsüprese ve immünkompetan hastalar.

Özellikle HIV pozitif hastalarda PCP insidansı antiretroviral tedavinin kullanıma girmesiyle belirgin olarak azalmıştır (15).

Yapılan serolojik çalışmalar çok sayıda çocukta etkene karşı yaşamın erken döneminde spesifik antikor oluştuğunu göstermiştir (16-18). Bununla beraber yapılan insan ve hayvan çalışmaları etkenin infeksiyondan sonra vücuttan büyük ölçüde elimine edildiği ancak sınırlı sayıda organizmanın latent kaldığı şeklindedir (19,20).

PCP latent infeksiyonun reaktivasyonundan ya da kendiliğinden meydana gelebilir (21). Bununla beraber mikroskopik ya da immün floresan yöntemlerin kullanıldığı otopsi çalışmaları göstermiştir ki immünkompetan hastalarda *P. jirovecii* yoktur ya da son derece düşük (< %1) düzeydedir (22-24). PCR mikroskopisi ya da immün floresana göre son derece duyarlı bir yöntemdir ve *P. jirovecii* trofozoitlerinin düzeyi çok düşük olsa bile PCR ile saptanmaktadır. Yine de immünkompetan olan pozitiflik saptanmayan bireylerde postmortem akciğer dokusundan çalışılan PCR örnekleri ile *P. jirovecii*'nin varlığı gösterilmiştir (25). Öte yandan kanıtlanmış *P. jirovecii* infeksiyonu olmayan immünsüprese hastaların BAL örnekleri de dahil solunum örneklerinden düşük trofozoid düzeyleri nedeniyle etken mikroskopik yöntemlerle gösterilememekte ama PCR ile saptanmaktadır. Az sayıdaki trofozoit varlığı kolonizasyon olarak yorumlanabilir (26). Yakın zamanda HIV pozitif bireyler arasında yüksek oranda mutant *P. jirovecii* genlerinin bulunduğu bunların belli bölgelerde lokalize olduğu kişiden kişiye direkt ya da çevresel kaynaklardan olmak üzere aktarıldığı kanıtlanmıştır (27). Aynı zamanda *P. jirovecii*'nin yayılımında PCP (+) immünsüprese hastayla teması olan sağlık çalışanlarının da aracı olduğu kanıtlanmıştır (28). PCP'li hastalar, immünsüprese taşıyıcılar ya da immünkompetan olup geçici olarak parazitemili kişiler *Pneumocystis* infeksiyonu için kaynak oluşturmaktadır (29). Herhangi bir

kronik akciğer hastalığı olan immünkompetan bireylerde solunum sistemi örneklerinin immün floresan boyama ve PCR ile incelenmesiyle taşıyıcılık %10-40 olarak bulunmuştur (27,28).

Bizim çalışmamızda bronkoskopi yapılan 100 hastanın 21'inde *P. jirovecii* pozitifliğini IFA ve nested PCR yöntemi ile saptadık. BAL ve BL örneklerinde metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi, Wright-Giemsa boyamaları ile etken saptanmadı. İmmün floresans (IFA) testi ile 13 hastada *P. jirovecii*'nin kistleri saptandı. Nested PCR ile 16 hastada *P. jirovecii*'nin DNA'sı saptandı. Hem PCR hem IFA testi ile *P. jirovecii* saptanan toplam 8 hasta mevcuttu.

Tipirneni ve arkadaşları hastane personeli arasında yaptıkları bir çalışmada göğüs hastalıkları, yoğun bakım HIV/AIDS hastalarının bakımının yapıldığı bölümlerde çalışan HIV ile infekte veya PCP 'li hastalara klinik ve laboratuvar hizmeti vermekte olan 126 personeli incelemişlerdir (30). Katılan personelde *P. jirovecii* majör yüzey glikoprotein düzeylerine bakılmıştır, (MsgC HIV infekte hastalar arasında PCP olanları ayırt etmek için kullanılan temel antijenik belirteçtir). Klinik çalışanlarında MsgC1 antikor düzeyleri klinik dışı çalışma grubuna göre önemli derecede yüksek saptanmıştır. Bu bulgularla PCP'li hastalarla ya da *P. jirovecii* ile kolonize şahıslar ile teması olan hastane personeline *P. jirovecii* ile kolonizasyon olabilir şeklinde bir sonuca varmışlardır.

Medrano ve arkadaşları son bir yıl içinde hastane çevresine maruz kalmamış ve herhangi bir nedenden immünsüpresyonu, malignitesi ya da kronik akciğer hastalığı ya da şüphesi olmayan 50 kişinin katılımıyla bir çalışma yapmıştır (31). *P. jirovecii* PCR'ı yapılmıştır. Olguların %20'sinde pozitifliklik saptanmış. *P. jirovecii*'nin sağlıklı bireylerin solunum sistemlerinden izole edildiği ve genel popülasyondaki bu bireylerin hastalık için kaynak oldukları sonucuna varılmıştır.

Bizim çalışmamızda olgular herhangi bir göğüs hastalıkları semptomu ile bronkoskopi yapılma endikasyonu alan hastalardan oluşmaktaydı. Hastalardaki mevcut klinik bulgular altta yatan akciğer hastalıklarına bağlı olduğu düşünülmüş olup; antibiyotik kullanımı olan hastalarda verilen tedavi nonspesifik olup PCP ile ilişkili değildir. Saptanan pozitiflikler kolonizasyon lehine yorumlanmıştır. Tipirneni ve Medrano'nun çalışmaları da aslında hasta olmayan grupta bile temas ile kolonizasyon gelişebileceğini göstermektedir (30,31).

Takahashi ve arkadaşları solunum sistemi bulguları ya da anormal göğüs radyoloji bulguları olan 81 hastanın BAL örneklerini incelemişlerdir (32). Örnekler HIV po-

zitif, immünsüpre ve primer pulmoner hastalığı olan hastadan elde edilmiş ve PCP tanısı örneklerin boyanması ve *P. jirovecii*'nin DNA'sının PCR ile tesbiti ile konulmuştur. *P. jirovecii* boyama ile HIV pozitif olan olgularda %57.7, HIV negatif olan immünsüprese hastalarda %20 olarak tespit edilmiştir. Boyama negatif olduğu halde PCR ile HIV pozitif 7 (%26.9) hastada; immünsüprese 4 (%8.9) hastada *P. jirovecii* tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda HIV pozitif hasta yoktu. Ancak steroid ve kemoterapotik kullanımı nedeniyle immünsüprese kabul edilen hastalar mevcuttu. Olgular PCR ve IFA pozitifliklerine göre gruplara ayrılarak değerlendirme yapıldığında IFA veya PCR pozitif olgularda immünsüpresyon açısından anlamlı farklılık saptandı ($p=0.003$). Pozitif olguların %28.6'sı immünsüprese saptanırken, PCR veya IFA negatif olguların %3.8'i immünsüpreseydi. Bu da kolonizasyon ya da infeksiyonun doğrudan immünsüpresyon ve/veya immünyetmezlikle ilişkili olduğunu gösterebilir.

Çalışmalar göstermektedir ki IFA geleneksel sitokimyasal boyamalara (Giemsa, metenamin gümüş, ve modifiye toluidin mavisi) göre daha üstündür ve bu yöntem PCP tanısında altın standart olarak kanıtlanmış bir yöntemdir (33,34). PCP'nin laboratuvar tanısında esas olarak BAL ile alınan örnekler kullanılmaktadır. PCP tanısında *P. jirovecii* genlerinin kullanıldığı PCR yöntemi de duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Çalışmamızda alınan BAL ve BL örneklerinde geleneksel sitokimyasal boyama ile *P. jirovecii* saptamadık. Bunun birçok sebebi olabilir. Bunlar arasında laboratuvarımızda daha önce bu çalışmaların yapılmamış oluşu, değerlendirme için deneyim gereksinimi ve aynı zamanda HIV negatif olan olgu grubumuzda ki hastaların mantar yükünün düşük ve belki de geleneksel boyama yöntemlerinin duyarlılığının da düşük oluşu sayılabilir.

Caliendo ve arkadaşlarının solunum yolu örneklerinde PCP tanısını koymada PCR'nin performansını değerlendirmek için yaptıkları çalışmada 168 hastadan 232 klinik örnek (120 indüklenmiş balgam ve 112 BAL) elde edilmiş; hastalar HIV pozitif olanlar, transplant alıcıları ve immünsüpresif tedavi alanlardan oluşuyormuş (35). Alınan örnekler PCR ve IFA ile değerlendirilmiş. BAL örneklerinin PCR ve IFA ile duyarlılığı ve özgüllüğü kıyaslandığında sırasıyla %100 ve %98 bulunmuştur. İndüklenmiş balgam örneklerinin IFA ve PCR ile duyarlılığı sırasıyla %82 ve %95 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda PCR yöntemi IFA'ya göre literatürle uyumsuz şekilde daha az duyarlı çıkmıştır. Bizim çalışmamızda IFA ile 13 hastada *P. jirovecii*'nin kistleri saptandı. Nested PCR ile 16 hastada *P. jirovecii*'nin DNA'sı saptandı.

Hem PCR hem IFA testi ile *P. jirovecii* saptanan toplam 8 hasta mevcuttu. PCR yöntemi tanıda altın standart olarak kabul edilen IFA ile duyarlılık ve özgüllük açısından kıyaslandığında duyarlılık %61.5 ve özgüllük %90.8 olarak belirlendi. McNemar testi IFA ve PCR tanı testi sonuçlarının uyumlu oldukları saptandı ($p=0.581$). PCR'nin tanıda kullanılan son derece duyarlı bir yöntem olmasına rağmen PCR ile IFA arasında tam korelasyonun sağlanamaması kullandığımız nested PCR yönteminin in house olarak optimize edilen ve standartize edilememiş bir yöntem olmasına bağlı olabilir.

P. jirovecii'nin klinik, radyolojik ve laboratuvar yöntemleriyle tanısını koymak son derece güçtür. Ayrıca, pratik uygulamada kolonizasyon ile enfeksiyonu ayırt edecek bir tanı yöntemi de yoktur. PCP ile yapılan çalışmalar HIV pozitif hasta grubu üzerinde yoğunluk kazanmaktadır. Bu hastalarda immünyetmezliğin ciddi boyutlarda olması CD4 hücre sayısının düşüklüğü ve vücutta ki *P. jirovecii* yükünün yüksekliği nedeniyle konvansiyonel boyama yöntemleriyle etkeni ortaya koymak mümkün olmaktadır. Ancak bizim incelediğimiz hasta grubunda etkin bir immünsüpresyonun olmaması ve dolayısıyla etken mikroorganizma yükünün düşüklüğü nedeniyle konvansiyonel boyama yöntemleriyle *P. jirovecii* saptanamadı.

Moleküler yöntemler *P. jirovecii* DNA'sını saptamak amacıyla kullanılan yüksek duyarlılığa sahip yöntemlerdir. PCR kullanılarak asemptomatik (kolonize) ya da subklinik enfeksiyonu olan hastaları ortaya koymak mümkündür. Moleküler yöntemler içinde de real time PCR nested PCR'ye göre üstünlüğü olan bir yöntemdir. Ayrıca, real time PCR'de kantitatif sonuç elde edilmektedir ve belli cut off değerleri baz alınarak hastada PCP ya da kolonizasyon yönünde yorum yapmak mümkün olmaktadır.

SONUÇ

Sonuç olarak Bursa bölgesinde yapılan bu çalışmada HIV negatif olgularda immünsüprese hastalarda *P. jirovecii* göstermeye yönelik boyama yöntemlerinin duyarlılığı düşük olduğu ayrıca IFA ile nested PCR yönteminin paralel sonuçlar vermediği görülmüştür. Aynı hasta örneklerinde altın standart olan IFA standart ticari kiti ile saptanan pozitifliklerin daha anlamlı olacağı açıktır. IFA ile yapılan testlerde deneyimli bir gözle hasta örnekleri değerlendirildiğinde kesin pozitiflikten bahsedilebilir. İmmünsüpresif hastalarda *P. jirovecii* kolonizasyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur fakat bunun hastalık ya da kolonizasyon hakkında yorum yapmak için yeterli olmadığı da görülmüştür.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bildirilmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respalda N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 245-250
2. Stringer JR. Antigenic variation in pneumocystis. *J Eukaryot Microbiol* 2007; 54: 8-13.
3. Thomas CFJ, Limper AH. *Pneumocystis pneumoniae*. *N Engl J Med* 2004; 350: 2487-98.
4. Weishbroth SH. *Pneumocystis*: newer knowledge about the biology of this group of organisms in laboratory rats and mice. *Lab Anim (NY)* 2006; 35: 55-61.
5. Kaneshiro ES. Sterol metabolism in the opportunistic pathogen *Pneumocystis*: advances and new insights. *Lipids* 2004; 39: 753-61.
6. Daly KR, Koch J, Levin L, Walzer PD. Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 848-54.
7. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respalda N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 245-50.
8. Peterson JC, Cushion MT. *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 393-8.
9. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carini* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent healthcare workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3877-82.
10. Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, Denis CM, Miller RF. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2003; 187: 901-8.
11. Walzer PD, Smulian AG. *Pneumocystis* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2010: 3377-87.
12. Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3409-10.
13. Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott WM, Hogg JC, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 408-13.
14. Durand-Joly I, Soula F, Chabe M, Dalle JH, Lafitte JJ, Senchal M, et al. Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: a challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50(Suppl): 614-5.
15. Bartlett MS, Vermund SH, Jacobs R, Durant PJ, Shaw MM, Smith JW, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2511-3.
16. Olsson M, Lidman C, Latouche S, Björkman A, Roux P, Linder E, et al. Identification of *Pneumocystis carini* f. sp. *hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1737-40.

17. Nevez G, Raccurt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. *Pneumocystosis versus pulmonary Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS* 1999; 13: 535-56.
18. Dei-Cas E. *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Med Mycol* 2000; 38(Suppl 1): 23-32.
19. Hughes WT. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *N Engl J Med* 1977; 297: 1381-3.
20. Weverling GJ, Mocroft A, Ledergerber B, Kirk O, González-Lahoz J, d'Arminio Monforte A, et al. Discontinuation of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet* 1999; 353: 1293-8.
21. Meuwissen JH, Tauber I, Leeuwenberg AD, Beckers PJ, Sieben M. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis* 1977; 136: 43-9.
22. Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, Woods D. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics* 1978; 61: 35-41.
23. Medrano FJ, Respaldiza N, Medrano A, Varela JM, Montes-Cano M, de La Horra C, et al. Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in southern Spain. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50(Suppl): 649-50.
24. Chen F, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1993; 61: 5406-9.
25. O'Donnell WJ, Peciak W, Chertow GM, Sanabria J, Lahive KC. Clearance of *Pneumocystis carinii* cystic in acute *P. carinii* pneumonia: assessment serial sputum induction. *Chest* 1998; 114: 1264-8.
26. Vogel CL, Cohen MH, Powell RD, DeVita VT. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Ann Intern Med* 1968; 68: 97-108.
27. Millard PR, Heryet AR. Observations favouring *Pneumocystis carinii* pneumonia as a primary infection: a monoclonal antibody study on paraffin sections. *J Pathol* 1988; 154: 365-70.
28. Peter SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *J Pathol* 1992; 166: 195-8.
29. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3877-82.
30. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Muñoz MP, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1536-8.
31. Eisen D, Ross BC, Fairbairn J, Warren RJ, Baird RW, Dwyer B. Comparison of *Pneumocystis carinii* detection by toluidine blue O staining, direct immunofluorescence and DNA amplification in sputum specimens from HIV patients. *Pathology* 1994; 26: 198-200.
32. Helweg-Larsen J, Jensen JS, Benfield T, Svendsen UG, Lundgren JD, Lundgren B. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2068-72.
33. Tipirneni R, Daly KR, Jarlsberg LG, Koch JV, Swartzman A, Roth BM, et al. Healthcare worker occupation and immune response to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1590-7.
34. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, Horra C, Respaldiza N, Gasch A, Perez-Lozano MJ, Varela JM and Caldero EJ. *Pneumocystis jirovecii* in General Population. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • 2005; 11: 245-50.
35. Hadley WK & NG, V. *Pneumocystis*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington: ASM Press, 1995: 738-48.