Pneumocystis jirovecii Laboratuvar Tanısında Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Değerlendirilmesi

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

Soykan ÖZKOÇ¹ (ID), Ceren ERGÜDEN GÜRBÜZ¹ (ID), Ayça Arzu SAYINER² (ID), Songül BAYRAM DELİBAŞ¹ (ID)

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, İzmir, Turkey.

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, İzmir.

² Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Division of Medical Virology, İzmir, Turkey.

Makale Atfı: Özkoç S, Ergüden Gürbüz C, Sayiner AA, Bayram Delibaş S. *Pneumocystis jirovecii* laboratuvar tanısında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2020;54(3):418-428.

ÖZ

İnsana özgül bir tür olan *Pneumocystis jirovecii*, immün sistemi baskılanmış kişilerde *P.jirovecii* pnömonezi (PCP)'ne neden olarak ölümcül enfeksiyonlara yol açmaktadır. Mikroorganizmanın tanısında direkt mikroskopi altın standart olsa da düşük *P.jirovecii* yükünün gözlemlendiği insan immün yetmezlik virüsü (HIV) dışı immünsupresif hastalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmada gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) yönteminin *P.jirovecii* laboratuvar tanısındaki değerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarına PCP şüphesiyle gönderilen 658 hastanın bronkoalveoler lavaj (BAL) örneği çalışmaya dahil edilmiştir. BAL sıvısı örnekleri *P.jirovecii* ribozomal RNA büyük alt ünitesini kodlayan mitokondriyal geni (mtLSUrRNA) çoğaltan Rt-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tüm örnekler Giemsa ve Gomori'nin metenamin gümüş (GMG) boyaları uygulanırken Rt-PCR ile pozitif saptanan örnekler ayrıca nested-PCR (n-PCR) yöntemi ile de değerlendirilmiştir. Bu örneklerin 92 (%14.3)'si Rt-PCR ile pozitif olarak bulunmuştur. n-PCR ile 92 hastanın 85 (%92.4)'inde pozitiflik saptanmıştır. Mikroskobik inceleme sonucunda ise örneklerin yalnızca yedisinde *P.jirovecii* kist ve trofozoitlerine rastlanmıştır. Rt-PCR pozitif hastaların ortalama "cycle threshold (C_T)" değeri 29.7 ($18.17 \leq C_T \leq 37.96$) olarak saptanmıştır. Bu hastalardaki *P.jirovecii* yükü 2.6×10^1 - 6.15×10^7 kopya/ml olarak hesaplanmıştır. n-PCR ile pozitif saptanan örneklerin Rt-PCR'deki C_T değerlerinin ortalaması ($C_{Tort} = 29.2$) ile negatif bulunanların ortalaması ($C_{Tort} = 36.7$) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Mikroskopisi pozitif olan örneklerin Rt-PCR'deki C_T değerlerinin sırasıyla; 18.2, 20.9, 22.2, 24.3, 24.7, 26.5, 29.7 olduğu görülmüştür. Mikroskopisi pozitif ve negatif olan örneklerin C_T ortalamaları arasındaki fark yine istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Pozitif bulunan hastalar tanılarına göre gruplandırıldığında; en düşük C_T değer ortalamasının ($C_{Tort} = 24.8$) HIV pozitif hastalarda olduğu görülmüştür. Organ transplantasyonu hastaları ($C_{Tort} = 26.15$) ve kolajen-vasküler-enflamatuvar hasta grubunda ($C_{Tort} = 27.8$) saptanan C_T değer ortalamaları diğer grup-

lardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu çalışma, Rt-PCR'nin *P.jirovecii* laboratuvar tanısında etkili bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Konvansiyonel n-PCR yönteminin çok düşük yoğunluktaki etken varlığında Rt-PCR'ye göre daha başarısız olduğu; direkt mikroskopinin ise genellikle etkenin yoğun olduğu örneklerde pozitif sonuç verdiği anlaşılmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; nested-PCR; mikroskopi.

ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii is a human-specific species and causes fatal infections like *P.jirovecii* pneumonia (PCP) in immunocompromised persons. Although direct microscopy is the gold standard in the diagnosis of the microorganism, molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) are needed in non-human immune deficiency virus (HIV) immunosuppressive patients with low *P.jirovecii* burden. In this study, we aimed to evaluate the value of real-time PCR (Rt-PCR) in the laboratory diagnosis of *P.jirovecii*. Bronchoalveolar lavage (BAL) specimens of 658 patients sent to Dokuz Eylül University Hospital Central Medical Parasitology Laboratory on suspicion of PCP were included in the study. BAL fluids were evaluated for identification of *P.jirovecii* mitochondrial gene coding ribosomal large subunit (mtLSURRNA) using Rt-PCR. In addition, Giemsa and Gomori's methenamine silver (GMG) staining assays were applied to all samples and nested PCR (n-PCR) assay was applied to positive samples detected by real time PCR. Ninety-two (14.3%) of these samples were positive by Rt-PCR. Of these 92 patients, 85 (92.4%) were positive with n-PCR. Only seven of the specimens had *P.jirovecii* cysts and trophozoites with microscopic examination. The mean cycle threshold (C_T) value of Rt-PCR positive patients was 29.7 ($18.17 \leq C_T \leq 37.96$). *P.jirovecii* load in these patients was calculated as 2.6×10^1 - 6.15×10^7 copies/ml. The difference between the mean C_T values of n-PCR positive and negative results was statistically significant ($p < 0.01$). The C_T values of Rt-PCR of the samples with positive microscopy were; 18.2, 20.9, 22.2, 24.3, 24.7, 26.5, 29.7. The difference between the C_T means of the samples with positive and negative microscopy was statistically significant ($p < 0.05$). When positive patients were grouped according to their diagnosis; the lowest mean C_T value ($C_{Tmean} = 24.8$) was found in HIV-positive patients. On the other hand, C_T values were found to be significantly lower in the organ transplantation patients ($C_{Tmean} = 26.15$) and in the collagen-vascular-inflammatory patient group ($C_{Tmean} = 27.8$). This study demonstrated that Rt-PCR was the effective method in the diagnosis of *P.jirovecii* in the laboratory. Conventional n-PCR method was found to be more unsuccessful than Rt-PCR in the presence of very low density organism; direct microscopy is generally found to be positive in samples with a higher burden of *P.jirovecii*.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*; real-time polymerase chain reaction; nested-PCR; microscopy

GİRİŞ

Pneumocystis jirovecii, bağışıklığı baskılanmış kişilerde ölümcül akciğer enfeksiyonlarına neden olabilen fırsatçı bir mikroorganizmadır¹. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte kişilerdeki *P.jirovecii* pnömonisi (PCP) insidansı yüksek etkinliğe sahip antiretroviral tedavi ve profilaksinin uygulamaya girmesiyle oldukça azalmış durumdadır. Ancak, yeni nesil immünsupresif tedavilerin artmasına paralel olarak, organ transplantasyonlarında, malignitelerde ve otoimmün hastalıklarda enfeksiyonun görülme sıklığı son yıllarda dramatik bir artış göstermiştir^{2,3}. Bu grup immünsupresif hastalarda gözlenen *P.jirovecii* enfeksiyonunun daha fulminan seyretmesi ve tedavi edilmediği durumlarda gözlenen %30-50 mortalite oranları enfeksiyonun tanısını daha da önemli hale getirmektedir^{4,5}.

P.jirovecii, diğer mantarların aksine parazitik bir yaşam şekli sergilemektedir^{1,6}. Alveoler boşlukta tip 1 pnömositlere tutunarak yaşayan bu mikroorganizmanın şimdiye kadar başarılı bir kültürü yapılamamıştır¹. Bu nedenle boyalı mikroskopik inceleme, *P.jirovecii* laboratuvar tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Gram, Weigert ve Giemsa

aseksüel trofik formların gösterilmesinde en sık tercih edilen boya olurken seksüel kistik formların tanısında metenamin gümüş ve toluidin boyamanın yanı sıra immünfloresan yöntemler kullanılmaktadır⁷⁻⁹. Diğer taraftan mikroorganizma yoğunluğunun düşük olduğu özellikle HIV dışı immünsupresif hastalarda mikroskopinin duyarlılığı oldukça azalmaktadır². Etkenin mikroskobik olarak gösterilemediği bu tip hastalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli moleküler yöntemlerin kullanılması önerilmektedir^{10,11}.

Temel metabolik fonksiyonlarla ilişkili bulunan ve ribozomal RNA geniş alt ünitesini kodlayan mitokondriyal (mtLSU-rRNA) geni, *P.jirovecii* moleküler tanısında en sık tercih edilen genlerden biri konumundadır. Her bir mikroorganizmada aynı haplotipte birçok mitokondri bulunmasından dolayı bu gen bölgesi *P.jirovecii* tanısında ve kantitasyonunda tek kopyalı genlere göre daha başarılı bulunmuştur¹²⁻¹⁴. Bu çalışmada, *P.jirovecii* rutin tanısında kullandığımız *P.jirovecii* gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) yönteminin tanısal değerlerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.05.2016 ve Karar no: 2016/12-28).

Hasta Örneklerinin Toplanması ve İşlenmesi

Haziran 2011-Temmuz 2019 tarihleri arasında farklı pulmoner semptomları nedeniyle bronkoscopi yapılan *P.jirovecii* tanısı düşünülerek Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Parazitoloji Merkez Laboratuvarına gönderilen 658 hastanın klinik örneği çalışmaya dahil edildi. Hastane ve laboratuvar bilgi sistemi üzerinden hastalara ait bilgiler kayıt altına alındı. Hastaların bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı örnekleri; boyama yöntemleri (Giemsa, Metenamin gümüş) ve moleküler yöntemin uygulanması amacıyla iki kısma ayrıldı. Nükleik asit izolasyonu için 600 µl BAL sıvısı kullanıldı. EZ1 virüs mini kit (kat no: 955134) (Qiagen, Fransa) ile üretici firma önerileri doğrultusunda elde edilen ekstratlar yöntem uygulanıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Boyalı Örneklerin Hazırlanması ve Mikroskobik Değerlendirme

Örnekler 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra her bir boyama yöntemi için iki adet preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar Giemsa ve metenamin gümüş (kat no: 04-043822) (Bio Optica, Milano, İtalya) ile boyandıktan sonra 1000x büyütme- de ışık mikroskobu altında incelendi¹⁵.

Gerçek Zamanlı PCR (Rt-PCR)

Rt-PCR için ticari FTD *P.jirovecii* (kat no: FTD-27-32) (Fast Tract Diagnostic, Lüksemburg) kiti kullanıldı. *P.jirovecii* mtLSU-rRNA gen bölgesi hedefleyen kit içeriğinde; pozitif kontrol olarak *P.jirovecii* plazmit, negatif kontrol, primerler, çift etiketli proplar ve internal kontrol (Equine arterit virüs) yer almaktaydı. Amplifikasyon, revers transkripsiyon basamağını takiben aynı tüp içinde RotorGene 6000Q (Qiagen, Almanya) cihazında üretici firma önerilerine göre çalışıldı. PCR inhibisyonu internal kontrol ile değerlendirildi ($C_T < 33$). İzolasyon aşamasında

örneklere eklenen internal kontrol ile yöntem kontrolü yapıldı. Pozitif örneklerdeki göreceli *P.jirovecii* kantitasyonu kit önerilerinde belirtilen aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$x=e^{[(y-42.347)/-1.348]}$$

(X= Gen Kopya/ml, Y= Örneğin C_T değeri; C_T = cycle threshold, $e= 2.718$)

Nested-PCR (n-PCR)

n-PCR yöntemi yalnızca Rt-PCR pozitif saptanan örnekler üzerine uygulandı. Bu yöntemde de yine Rt-PCR yönteminde olduğu gibi *P.jirovecii* mtLSU-rRNA gen bölgesi hedeflendi. Birinci PCR döngüsünde pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3') ve pAZ102 H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3') primerleri; ikinci PCR döngüsünde ise pAZ102-X (5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3') ve pAZ102-Y (5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3') primerleri kullanıldı¹⁰. Her bir reaksiyon için 2.5 µl 10x reaksiyon tamponu, 2.5 µl $MgCl_2$ (25 mM stok çözelti), 2.5 µl dNTP (2 mM stok çözelti), 1 µl Taq DNA polimeraz (1 U/µl stok çözelti), 0.75 µl primer (10 µM stok çözelti) ve 1 µl DNA örneği eklendikten sonra steril distile su ile son hacim 25 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon, 94°C'de 5 dakikalık ön denatürasyonun ardından 40 döngü; 94°C'de 1 dakika, 56°C'de 1 dakika, 72°C'de 1.5 dakika ve son uzama basamağı için 72°C'de 5 dakika olacak şekilde düzenlendi^{10,15}. Her iki döngü için aynı miktar ve süreler uygulandı. Reaksiyon sonunda 10 µl PCR ürünü, %1.5'lik agaroz jelde 100 volt altında 40 dakika agaroz jelde elektroforezde yürütüldükten sonra 1 µg/ml etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık altında görüntülendi. n-PCR sonunda 267 baz çifti (bp) uzunluğunda ampikon saptanması durumunda örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 15.0 programı ile yapıldı. Karşılaştırılan grupların analizinde student-t testinin yanı sıra Mann-Whitney U ve Fisher's Exact testleri kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda Rt-PCR kiti ile hastaların %14.3'ünde (92/644) pozitiflik saptanmıştır (Şekil 1). Bu hastaların 38 (%41.3)'ünün kadın, 54 (%58.7)'ünün erkek, yaş aralığının ise 4-91 (ortalama 57.2) arasında olduğu tespit edilmiştir. Rt-PCR testlerinde kullanılan pozitif kontrollerin ortalama C_T değeri 25.19 (3.9×10^5 kopya/ml) bulunurken; pozitif hastaların ortalama C_T değeri 29.7 ($18.17 \leq C_T \leq 37.96$) olarak saptanmıştır. Hastalardaki *P.jirovecii* yükü ise 2.6×10^1 - 6.15×10^7 kopya/ml olarak hesaplanmıştır. Kadın ve erkek hastalar arasında; yaş, C_T değerleri ve *P.jirovecii* yükü açısından istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Konvansiyonel n-PCR yöntemi ise Rt-PCR ile pozitif saptanan 92 hastanın 85 (%92.4)'ünde pozitif sonuç vermiştir (Şekil 2). n-PCR ile saptanamayan yedi örneğin Rt-PCR'deki C_T değerlerinin ortalaması ($C_{Tort} = 36.7$) ile pozitif olanların ortalaması ($C_{Tort} = 29.2$) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

Şekil 1. Çalışılan örnek grubundan bir kısmının Rt-PCR için RotorGene 6000Q (Qiagen) cihazında kantitasyon analizi (A) Internal kontrol-İK eğrileri; (B) Çalışılan örnekler; pk: pozitif kontrol.

Diğer taraftan; mikroskopik inceleme sonucunda sadece 7 (%0.8) hasta örneğinde *P.jirovecii* kist ve trofozoitleri saptanabilmıştır (Şekil 3). Mikroskopisi pozitif olan örneklerin tümü her iki PCR yöntemi ile de pozitif olarak saptanırken, Rt-PCR'deki C_T değerleri sırasıyla; 18.2, 20.9, 22.2, 24.7, 24.3, 26.5, 29.7 olarak bulunmuştur. Mikroskopisi poziti-

Şekil 2. A. n-PCR jel görüntüsü. M: Moleküler ağırlık standardı (1 kb), 1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol, 3-7: Pozitif hasta örnekleri. B. Metenamin gümüş ile boyanmış *P.jirovecii* kistleri (üst); Giemsa ile boyanmış *P.jirovecii* trofozoitleri (alt).

tif ve negatif olan örneklerin C_T ortalamaları arasındaki fark yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

P.jirovecii saptanan olguların gönderildikleri birimlerdeki tanılarına göre sayısal dağılımı; hematolojik maligniteler ($n = 18$), organ transplantasyonları ($n = 17$), kolajen-vasküler-enflamatuvar hastalıklar ($n = 12$), solid organ maligniteleri ($n = 9$), HIV pozitifliği olanlar ($n = 3$) şeklindeydi. Altta yatan başka bir hastalığı (örn. diabetes mellitus, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kalp yetmezliği vb.) olan veya yalnız tanısız amaçla bronkoskopi yapılan hastaların (örn. pnömoni etiolojisi vb.) sayısı ise 33 olarak belirlenmiştir. Her bir grup, Rt-PCR C_T değerleri ve parazit yükü yönünden değerlendirildiğinde organ transplantasyonu hastalarında ($C_{Tort} = 26.15$), kolajen doku ve enflamatuvar hastalığı olanlarda ($C_{Tort} = 27.8$) ve HIV pozitif hastalarda ($C_{Tort} = 24.8$) C_T değerleri ve parazit yükü (kopya sayısı/ml) yönünden diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır (Şekil 4). Hasta gruplarına ait mikroskopi, n-PCR ve Rt-PCR sonuçları Tablo I'de verilmiştir.

Şekil 3. A. n-PCR sonucu pozitif (1) ve negatif (0) olan hastaların C_T karşılaştırmaları, B. Mikroskopi pozitif (1) ve negatif (0) olan hastaların C_T karşılaştırmaları.

Şekil 4. Farklı hasta gruplarındaki Rt-PCR sonuçlarının karşılaştırılması.

Tablo 1. Rt-PCR Testi Pozitif Hastalara Ait Mikroskopi ve PCR Sonuçları				
Rt-PCR pozitif hasta	Mikroskopi pozitifliği (n)	n-PCR pozitifliği n (%)	Rt-PCR C_{Tort} (C_T aralığı)	<i>P.jirovecii</i> yükü aralığı (kopya/ml)
Hematolojik malignite (n= 18)	0	16 (89)	31.75 (24.14 ≤ C_T ≤ 37.96)	2.6×10^1 - 7.3×10^5
Solid organ malignitesi (n= 9)	0	8 (89)	31.02 (20.94 ≤ C_T ≤ 36.39)	8.1×10^1 - 7.8×10^6
Organ transplantasyonu (n= 17)	3	17 (100)	26.15 (21.52 ≤ C_T ≤ 24.92)	24.7×10^1 - 5.1×10^6
Kolajen-vasküler-enflamatuvar hastalık (n= 12)	0	12 (100)	27.78 (18.33 ≤ C_T ≤ 35.79)	12.9×10^1 - 5.4×10^7
HIV pozitifliği (n= 3)	0	3 (100)	24.78 (21.72 ≤ C_T ≤ 29.80)	11×10^3 - 4.4×10^6
Diğer-tanısız bronkoskopi yapılanlar (n= 33)	4	29 (88)	31.39 (18.17 ≤ C_T ≤ 37.92)	2.7×10^1 - 6.15×10^7
Toplam (n= 92)	7	85 (92.4)	29.7 (18.17 ≤ C_T ≤ 37.96)	2.6×10^1 - 6.15×10^7
n-PCR: Nested polimeraz zincir reaksiyonu, Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, C_T : Cycle threshold, HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü.				

TARTIŞMA

PCP enfeksiyonunda çok farklı klinik ve radyolojik bulgular gözlenebildiğinden tanıda mutlaka etkenin kendisinin veya DNA'sının gösterilmesi gerekmektedir^{9,16}. Örneğin, HIV pozitif olgularda ateş, kuru öksürük ve dispne gibi bulgular ön plandayken, HIV dışı immünsupresif hastalarda enfeksiyon daha ani başlangıçlı olabilmekte ve hızla solunum yetmezliğine giderek kötü prognoz sergileyebilmektedir^{5,17}. Yine radyolojik olarak özellikle yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografilerde saptanan buzlu cam görüntüsü bazı olgularda görülmeyebilmekte hatta multinodüler yapılar, kavitasyon odakları ve kistik yapılar gibi atipik görüntüler ortaya çıkabilmektedir^{18,19}. Diğer taraftan etkenin DNA'sının saptanması da tek başına anlamlı değildir. Klinik ve radyolojik bulguları olmayan hastalarda sadece etken DNA'sının gösterilmesi "*P.jirovecii* kolonizasyonu" olarak tanımlanmaktadır^{16,20}. Tüm bu nedenlerle PCP tanısında klinik ve laboratuvarın multidisipliner bir yaklaşım sergilemesi gerekmektedir.

P.jirovecii kültürde üretilemediğinden direkt mikroskopi uzun zaman tanıda altın standart olarak kullanılmıştır. Farklı disiplinlerde yayımlanmış birçok rehberde göre de "kesin PCP" denilebilmesi için *P.jirovecii*'nin mikroskopik olarak gösterilmesi gereklidir^{5,16,21}. Ancak mikroskopinin duyarlılığı etken yükünün düşük olduğu HIV dışı immünsupresif hastalarda çoğu zaman tatmin edici değildir⁹. Çalışmamızda da Rt-PCR ile pozitif olan 92 örneğin yalnız yedisinde mikroskopik tanı konulabilmiştir. Mikroskopisi pozitif olan örneklerin Rt-PCR sonucundaki C_T değer ortalaması, negatif saptanan örneklerinkinden istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sonuç mikroskopik incelemenin genellikle etken yoğunluğunun fazla olduğu örneklerde başarılı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle mikroskopinin *P.jirovecii* tanısında tek başına kullanılmasının birçok pozitif olgunun atlanmasına neden olacağı düşüncesindeyiz. Diğer taraftan çalışmanın dikkat çekici sonuçlarından biri de C_T değeri düşük olan örneklerin birçoğunda mikroskopi sonucunun negatif bulunmasıydı. C_T değeri 18.33 (kopya sayısı $5.4 \times 10^7/\text{ml}$) olan bir örneğin yanı sıra HIV pozitif üç hastanın örneklerinde de *P.jirovecii* kist veya trofozoitleri saptanamamıştır. Bu durum bazı hastalar için önceden başlanmış ampirik tedavilerin etkeni morfolojik olarak parçalamasıyla açıklanabilir. Bununla birlikte personel deneyimine bağlı olarak preparatların hazırlanması ve boyanması aşamalarında standardizasyon probleminin yaşanmış olabilmesi de duyarlılığı düşüren olası bir diğer faktör olabilir.

P.jirovecii'nin laboratuvar tanısında moleküler yöntemler son derece önemli bir yere sahiptir^{6,11}. Konvansiyonel PCR yöntemleri, başlangıçta mikroskopinin duyarlılık sorununu iyileştirmek için kullanılmış olsa da günümüzde daha çok genotiplendirme gibi epidemiyolojik çalışmaların bir basamağı olarak tercih edilmektedir^{12-14,16}. Rutin tanıda ise daha çok Rt-PCR yöntemi gibi daha gelişmiş yöntemlerin kullanımı önerilmektedir. Kantitasyon olanağı sunması nedeniyle kolonizasyon/enfeksiyon ayırımında fikir veriyor olması yöntemin birincil üstünlüğü olarak gösterilmektedir²²⁻²⁴. Uygulamasının kolay ve hızlı bir yöntem olmasının yanı sıra kapalı sistem olması nedeniyle dışarıdan kontaminasyon riskini en aza indirmesi, yöntemin diğer avantajları olarak öne çıkmaktadır^{8,22,23,25-27}.

Çalışmamızda Rt-PCR yönteminin oldukça duyarlı bir yöntem olduğu görülmüştür. Yöntem, 2.6×10^1 kopya/ml gibi düşük yoğunluktaki örneklerde bile başarılı sonuç vermiştir. Konvansiyonel n-PCR yönteminin ise Rt-PCR pozitif olguların %92.4 (85/92)'ünde pozitif saptandığı; çok düşük yoğunluktaki etken varlığında negatif sonuç verebildiği görülmüştür. n-PCR ile saptanamayan yedi örneğin Rt-PCR'deki C_T değerlerinin ortalaması ($C_{Tort} = 36.7$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$). Bununla birlikte çalışmamızın en önemli kısıtlılığı n-PCR yönteminin yalnız Rt-PCR'de pozitif saptanan hastalara uygulanabilmesidir. Bu nedenle, yöntemlerin özgüllük ve duyarlılık değerlerinin hesaplanmasından çok oransal olarak karşılaştırma yapılması uygun bulunmuştur.

Günümüze kadar yapılan Rt-PCR çalışmalarında C_T ortalamaları veya *P.jirovecii* yükü (kopya sayısı/ml) açısından yapılan karşılaştırmalı değerlendirmelerin genellikle PCP/kolonizasyon olguları veya HIV pozitif/HIV dışı immünsupresif gruplar arasında yapılan çalışmalar olduğu görülmektedir^{22-24,26,28}. Bu çalışmalarda genel olarak ortak bulunan sonuç; PCP hastalarında kolonize olgulara göre, HIV pozitif hastalarda da HIV dışı immünsupresif gruplara göre parazit yükünün daha yüksek olduğudur^{11,23,25,28}. Çalışmamızda farklı hasta grupları göreceli olarak parazit yükü yönünden değerlendirilmiştir. Öncelikli değerlendirmede kadın ve erkek hastalar arasında *P.jirovecii* yükü açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Çalışmamızda her ne kadar yalnız üç HIV pozitif hasta bulunuyor olsa da bu grupta literatüre uyumlu olarak en yüksek *P.jirovecii* yükü saptanmıştır ($C_{Tort} = 24.78$). Çalışmamızda olguları PCP pnömonisi (kesin/olası) veya kolonizasyon diye klinik olarak tanımlama yapma olanağı bulunamamıştır. Buna rağmen HIV dışı immünsupresif grup hastalar, kendi içinde dört farklı kategoride değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda organ transplantasyonu hastaları ve kolajen-vasküler-enflamatuvar hastalığı olan HIV dışı immünsupresif gruptaki *P.jirovecii* yük ortalamaları hematolojik maligniteler ve solid organ tümörlerine göre daha fazla bulunmuştur (Tablo I). Bu sonuç, HIV dışındaki immünsupresif hastaların da kendi içinde farklılıklar gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Bu durumun PCP pnömonisi veya kolonizasyonu olma durumundan çok bu gruplarda kullanılan immünsupresif ilaçların yarattığı immün baskılamının doğasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Diğer taraftan tanısal amaçlı bronkoskopi yapılan hastalarda gözlenen düşük C_{Tort} değerinin ise, daha çok kolonizasyon olarak değerlendirilebileceği kanısı doğmuştur.

Çalışmada kullanmış olduğumuz FTD-*P.jirovecii* Rt-PCR kiti, iyi laboratuvar uygulamaları rehberine uygun bir in vitro diagnostik test konumundadır²⁹. Kit içeriğinde standart bir DNA bulunmadığından gerçek bir kantitasyon yapma şansı bulunmamaktadır. Ancak üretici firmanın kantitasyon formülasyonu üzerinden hedef bölge kopya sayısı hesaplanarak göreceli bir kantitasyon imkanı sağlanmıştır. Hoauro ve arkadaşları FTD-*P.jirovecii* kitini değerlendirdikleri çalışmada²⁴ PCP hastaları ve kolonize hastalar için ortalama kopya sayılarının sırasıyla 1.35×10^8 /ml ve 1.45×10^5 /ml olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada, C_T : 22 ve C_T : 25 değerleri PCP/kolonizasyon ayırımında alt ve üst cut-off değerleri olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda FTD-*P.jirovecii* kiti ile pozitif olan 92 hastanın BAL sıvılarındaki en yüksek kopya sayısı 6.15×10^7 /ml olarak saptanmıştır. Her ne kadar PCP ve kolonize

hastaları tam olarak ayırmamış olsak da testin çalışma grubundan elde edilecek cut-off değerlerinin daha yüksek olacağına inanıyoruz. Hoauro ve arkadaşlarının²⁴ saptamış oldukları düşük cut-off değerleri çalışma gruplarının az sayıda hasta içeriyor olması ve yedi HIV'lı PCP hastasının bulunmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışma, *P.jirovecii* laboratuvar tanısında Rt-PCR yönteminin son derece duyarlı bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Konvansiyonel n-PCR yönteminin çok düşük yoğunluktaki etken varlığında negatif sonuç verebildiği görülürken direkt mikroskopinin ise daha çok etkenin yoğun olduğu örneklerde başarılı olduğu anlaşılmaktadır. Diğer taraftan Rt-PCR yönteminin göreceli bir kantitasyon yapma olanağı sunması, klinik kararın verilmesinde ve tedavi yanıtının izleminde katkı sağlayabilir. Klinik tanıları netleşmiş olan; kesin PCP, olası PCP ve kolonize hastaların örnekleri üzerinde yapılacak çalışmalar ile testlerin cut-off değerlerini belirlemek *P.jirovecii* tanısını koymanın yanı sıra klinisyenlere PCP/kolonizasyon ayırımında da yol gösterici olabileceği kanaatindeyiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.05.2016 ve Karar no: 2016/12-28).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Otieno-Odhiambo P, Wasserman S, Hoving JC. The contribution of host cells to *Pneumocystis* immunity: An update. *Pathogens* 2019; 8(2): 52.
2. Tasaka S, Tokuda H. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother* 2012; 18(6): 793-806.
3. Roux A, Gonzalez F, Roux M, Mehrad M, Menotti J, Zahar JR, et al. Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Med Mal Infect* 2014; 44(5): 185-98.
4. Tasaka S. Recent advances in the diagnosis and management of *Pneumocystis pneumonia*. *Tuberc Respir Dis* 2020; 83(2): 132-40.
5. Cordonnier C, Alanio A, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly P, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients-authors' response. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72(4): 1266-8.
6. Delliére S, Gits-Muselli M, Bretagne S, Alanio A. Outbreak-causing fungi: *Pneumocystis jirovecii*. *Mycopathologia* 2019; Nov 28.
7. Song Y, Ren Y, Wang X, Li R. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Med Mycol J* 2016; 57: 111-6.
8. Töz S, Gündüz C, Tetik A, Taşbakan M, Pullukçu H, Bacakoğlu F, et al. The comparison of microscopy and real time polymerase chain reaction methods for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: evaluation of clinical parameters. *Tuberc Toraks* 2017; 65(3): 220-6.
9. White PL, Backx M, Barnes RA. Diagnosis and management of *Pneumocystis jirovecii* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017; 15: 435-47.
10. Tia T, Putaporntip C, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S. A highly sensitive novel PCR assay for detection of *P.jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavagespecimens from immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(6): 598-603.

11. Doyle L, Vogel S, Procop GW. *Pneumocystis* PCR: it is time to make PCR the test of choice. *Open Forum Infect Dis* 2017; 4: 4.
12. de Armas Y, Friaia V, Capo V, Durand-Joly I, Govín A, de la Horra C, et al. Low genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* among Cuban population based on two-locus mitochondrial typing. *Med Mycol* 2012; 50(4): 417-20.
13. Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragozi MT, Torano G, Diaz R, Vega D, et al. Prevalence and genotype distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol* 2014; 52(1): 45-51.
14. Dimonte S, Berrilli F, D'Orazi C, D'Alfonso R, Placco F, Bordi E, et al. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infect Genet Evol* 2013; 14: 68-72.
15. Özkoç S, Bayram Delibaş S. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in iatrogenically immunosuppressed and immunocompetent patients. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(2): 221-30.
16. Calderon EJ, Dei-Cas E. *Pneumocystis* infection: unraveling the colonization-to-disease shift. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(3): 259-62.
17. Festic E, Gajic O, Limper AH, Aksamit TR. Acute respiratory failure due to *Pneumocystis* pneumonia in patients without human immunodeficiency virus infection: outcome and associated features. *Chest* 2005; 128(2): 573-9.
18. Salzer HJF, Schäfer G, Hoenigl M, Günther G, Hoffmann C, Kalsdorf B, et al. Clinical, diagnostic, and treatment disparities between HIV-Infected and non-HIV-Infected immunocompromised patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Respiration* 2018; 96(1): 52-65.
19. Cereser L, Dallorto A, Candoni A, Volpetti S, Righi E, Zuiani C, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia at chest high-resolution computed tomography (HRCT) in non-HIV immunocompromised patients: Spectrum of findings and mimickers. *Eur J Radiol* 2019; 116: 116-27.
20. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(2): 297-317.
21. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJ, Helweg-Larsen J, Matos O, et al. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71(9): 2386-96.
22. Maillet M, Maubon D, Brion JP, François P, Molina L, Stahl JP, et al. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33(3): 331-6.
23. Fauchier T, Hasseine L, Gari-Toussaint M, Casanova V, Marty PM, Pomares C. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in Immunocompromised HIV-positive and HIV-negative patients. *J Clin Microbiol* 2016; 54(6): 1487-95.
24. Hoarau G, Le Gal S, Zunic P, Poubeau P, Antok E, Jaubert J, et al. Evaluation of quantitative FTD-*Pneumocystis jirovecii* kit for *Pneumocystis* infection diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 89(3): 212-7.
25. Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P, et al. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2): 490-4.
26. Alanio A, Desoubreux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(10): 1531-7.
27. Unnewehr M, Friederichs H, Bartsch P, Schaaf B. High diagnostic value of a new real-time pneumocystis PCR from bronchoalveolar lavage in a real-life clinical setting. *Respiration* 2016; 92(3): 144-9.
28. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods* 2008; 75(2): 258-61.
29. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.