İmmün Sistemi Baskılanmış Pnömonili Hastalarda *Pneumocystis jirovecii* Enfeksiyon ve Kolonizasyonlarının Araştırılması

Investigation of *Pneumocystis jirovecii* Infection and Colonization in Immunocompromised Patients with Pneumonia

Harun GÜLBUDAK¹(ID), Candan ÖZTÜRK¹(ID), Sibel KUYUGÖZ²(ID), Seda TEZCAN ÜLGER¹(ID)

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Mersin, Turkey.

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 2017-1-TP3-2262 numaralı proje ile desteklenmiş olup Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora tezi olarak hazırlanan çalışmanın bir bölümünü oluşturmaktadır.

Makale Atfı: Gülbudak H, Öztürk C, Kuyugöz S, Tezcan Ülger S. İmmün sistemi baskılanmış pnömonili hastalarda *Pneumocystis jirovecii* enfeksiyon ve kolonizasyonlarının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2020;54(4):583-595.

ÖZ

Pneumocystis jirovecii, immün sistemi baskılanmış hastalarda *P.jirovecii* pnömonisi (PCP)'ne neden olan atipik bir fungustur. Günümüzde, AIDS ilişkili PCP insidansı azalırken, immün sistemi baskılayıcı tedavi gerektiren hastalıkların artması sonucu PCP, HIV negatif immünsupresif hastalarda daha yaygın hale gelmiştir. Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Hastanesinde yatan immün sistemi baskılanmış, semptomatik ve radyolojik olarak atipik pnömoni bulgusu olan hastalarda mikroskopi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Krebs von den Lungen-6 (KL-6) testleri ile PCP ve kolonizasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ağustos 2016-Şubat 2018 tarihleri arasında, %75'i immünsupresif tedavi alan 96 hasta dahil edilmiştir. Hastalardan alınan solunum yolu örneklerinde [balgam (n= 88), trakeal aspirat (n= 6) ve bronkoalveoler lavaj (n= 2)], mtLSU-rRNA nested-PCR ve mikroskopik boyama yöntemleri [immüno floresan testi "immunofluorescence assay (IFA)", "Toluidine Blue O (TBO)"] ile *P.jirovecii* araştırılmış ve serum örneklerinde KL-6 seviyesi test edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 96 hasta örneğinin 16 (%16.7)'sında PCR, 5 (%5.2)'inde IFA, 3 (%3.1)'ünde ise TBO ile *P.jirovecii* tespit edilmiştir. IFA referans alındığında; TBO için duyarlılık %60, özgüllük %100; PCR için duyarlılık %100, özgüllük %87.9 olarak bulunmuştur. *P.jirovecii* PCR pozitif hastaların altta yatan hastalıklara göre dağılımı; kanser (n= 6), hematolojik malignite (n= 3), HIV/AIDS (n= 3), KOAH (n= 2) ve interstisyel akciğer hastalığı (n= 2) şeklindedir. Pozitif 16 hastanın 11 (%68.75)'i immünsupresif tedavi alan HIV pozitif non-Hodgkin lenfoma, 3 (%18.75)'ü immünkompetan, 2 (%12.5)'si ise yalnız HIV/AIDS tanısı olan hastalardan oluşmuştur. PCR pozitif 16 hastadan mikroskopik incelemesi de pozitif olan beşi, kesin PCP [HIV/AIDS (n= 3), akciğer kanseri (n= 1), interstisyel akciğer hastalığı (n= 1)]; PCR pozitif, mikroskopisi negatif olan üç hasta olası PCP [multipl miyelom (n= 1), interstisyel akciğer hastalığı (n= 1), kolanjiyoselüler karsinom (n= 1)] ve diğer sekiz hasta kolonize olarak

tanımlanmıştır. Çalışmada, altta yatan hastalıklara göre *P.jirovecii* saptanma sıklığı ise sadece HIV/AIDS hastalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p= 0.012$). KL-6, PCP/olası PCP ve kolonizasyon olarak tanımlanan hastalar arasında değerlendirildiğinde, duyarlılık %62.5 ve özgüllük %75 olarak saptanmıştır. Çalışma sonucunda, balgam örneklerinde *P.jirovecii* tespitiinde nested-PCR yöntemi duyarlı ve başarılı bulunmuştur. KL-6 testi, PCR pozitif hastalarda kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımında yeterli bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar, yatan hastaların bağışıklık durumuna ve klinik özelliklerine göre PCP'nin ayıncı tanı listesinde olması gerektiğini göstermiştir. Ayrıca bölgemizde ve ülkemizdeki *P.jirovecii* enfeksiyonlarını anlayabilmek için genotiplendirme ve anti-PCP ilaçlara karşı direnç ile ilişkili moleküler epidemiyolojik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*; *Pneumocystis pnömonisi*; kolonizasyon; nested-PCR; KL-6

ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii is an atypical fungus that causes *P.jirovecii* pneumonia (PCP) in immunocompromised patients. Currently, while the incidence of AIDS-related PCP is decreasing, PCP has become more common in HIV-negative immunosuppressive patients as a result of increased diseases requiring immunosuppressive therapy. In this study, it was aimed to investigate PCP and colonizations by microscopy, polymerase chain reaction (PCR) and Krebs von den Lungen-6 (KL-6) tests in symptomatic immunosuppressive inpatients with the sign of radiologically atypical pneumonia in Mersin University Hospital. A total of 96 patients, between August 2016 and February 2018 were included in the study. Seventy two (75%) of the 96 patients were under immunosuppressive therapy. *P.jirovecii* was investigated in the respiratory tract samples [sputum ($n= 88$), tracheal aspirate ($n= 6$) and bronchoalveolar lavage ($n= 2$)] by mtLSU-rRNA nested PCR and microscopic staining methods [immunofluorescence assay (IFA), Toluidine Blue O (TBO)], and KL-6 levels were tested in serum samples. *P.jirovecii* was detected in 16 (16.7%) samples by PCR, in five (5.2%) samples by IFA, in three (3.1%) samples by TBO stain method. When IFA was taken as a reference test, sensitivity and specificity of TBO and PCR were calculated as 60% and 100%; 100% and 87.9%, respectively. In *P.jirovecii* PCR positive patients, the distribution of underlying diseases; cancer ($n= 6$), hematological malignancy ($n= 3$), HIV/AIDS ($n= 3$), COPD ($n= 2$), and interstitial lung disease ($n= 2$) were found as 11 (68.75%) of the 16 positive patients, received immunosuppressive therapy (HIV positive non-Hodgkin lymphoma); of the 3 (18.75%) patients of were immunocompetent, and only 2 (12.5%) were HIV/AIDS. Five of the 16 PCR positive the patients that have positive microscopic examination were defined PCP [HIV/AIDS ($n= 3$), lung cancer ($n= 1$), interstitial lung disease ($n= 1$)]; three patients were PCR positive and microscopy negative probable PCP [multiple myeloma ($n= 1$), interstitial lung disease ($n= 1$), cholangiocellular carcinoma ($n= 1$)] and eight other patients were identified as colonized. In the study, when the frequency of the detection of *P.jirovecii* was evaluated according to the underlying diseases, it was found statistically significantly higher only in HIV/AIDS patients ($p= 0.012$). When KL-6 was evaluated among the patients defined as PCP/possible PCP and colonization, sensitivity and specificity were determined as 62.5% and 75%, respectively. As a result, nested PCR method was found as sensitive and successful for the detection of *P.jirovecii* from sputum samples. KL-6 test was not found sufficient for the differentiation of colonization and the infection in PCR positive patients. The results obtained in the study showed that PCP should be on the differential diagnosis list according to the immune status and the clinical features of the inpatients. More researchs are required with more patients to achieve for detailed reliable results in these groups. In addition, molecular epidemiological studies related to genotyping and resistance against anti-PCP drugs are needed to understand *P.jirovecii* infections in our region and country.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*; *Pneumocystis pneumonia*; colonization; nested-PCR; KL-6

GİRİŞ

Pneumocystis jirovecii, akciğer tropizmi gösteren ve immün sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı enfeksiyona neden olan atipik bir fungustur¹. *P.jirovecii* pnömonisi (PCP), insan immün yetmezlik virüsü [Human Immunodeficiency Virus (HIV)] pozitif hastalarda

yaygın olarak görülürken, profilaksi ve antiretroviral tedavi ile birlikte kazanılmış immün yetmezlik sendromu [acquired immune deficiency syndrome (AIDS)] ilişkili PCP insidansı büyük oranda azalmıştır^{1,2}. Günümüzde, hematolojik maligniteler, solid organ tümörleri, organ transplantasyonu ve otoimmün hastalıkların artması ile bu hastalıklar için uygulanan immün sistemi baskılayıcı tedaviler (kemoterapi, kortikosteroid, antirejeksiyon), PCP'yi HIV negatif immünsupresif hastalarda daha yaygın hale getirmiştir³⁻⁵.

PCP, HIV negatif immünsupresif hastalarda akut başlangıçlıdır ve semptomlar daha progresiftir^{1,6}. Bu yüzden hızlı tanı önemlidir. *P.jirovecii* kültürü yapılamadığı için mikroorganizmanın kist ve trofozoit formlarının solunum yolu örneklerinde mikroskopik olarak gösterilmesi PCP için standart tanı yöntemidir⁶. Bunun için Giemsa, "Toluidine blue O (TBO)", kalkoflor beyazı, Gomori metenamin gümüş ve monoklonal immünfloresan testi [immunofluorescence assay (IFA)] boyama yöntemleri kullanılmaktadır^{1,6,7}. Bu yöntemler arasında IFA, kist ve trofozoit formları hedef aldığı için duyarlılığı konvansiyonel boyama yöntemlerinden daha yüksektir⁷. Klinik örneklerden *P.jirovecii* tespitinde moleküler yöntemlerin kullanılması tanı duyarlılığını artırmıştır^{7,8}. Ancak, *P.jirovecii* aktif enfeksiyon ve taşıyıcılık (kolonizasyon) durumlarında polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ile pozitif sonuç alınmaktadır^{7,8}. Bu yüzden mikroskopinin negatif, PCR yöntemlerinin pozitif olduğu durumlarda, PCP ve kolonizasyon ayrımının klinik bulgularla birlikte yorumlanarak yapılması gerekir⁸.

P.jirovecii PCR testinin pozitif ve mikroskopinin negatif olduğu durumlarda enfeksiyon-kolonizasyon ayrımı için serum testleri tanıya yardımcı olarak kullanılabilir. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) antijeni, tip 2 alveoler pnömosit ve bronşiyal epitel hücrelerden eksprese edilen bir glikoproteindir^{9,10}. İnterstiyel pnömonilerde ve akciğer hasarında salgılanarak serumda artış gösterir¹⁰. PCP'li hastalarda da artış gösterdiği bildirilmiştir^{9,11,12}.

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Hastanesinde yatan immün sistemi baskılanmış, semptomatik ve radyolojik olarak atipik pnömoni bulgusu olan hastalarda mikroskopi, PCR ve KL-6 yöntemleri ile PCP ve kolonizasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından etik kurul onayı alınarak gerçekleştirildi (Tarih: 09.06.2016 ve Karar no: 2016/177).

Çalışmaya, Ağustos 2016-Şubat 2018 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Hastanesinin çeşitli servis ve yoğun bakım ünitelerinde takip edilen; klinik ve radyolojik bulgularına göre dispne, nonproduktif öksürük, ateş, interstiyel pnömoni şikayetleriyle atipik pnömoni tespit edilen 96 hasta örneği dahil edildi. Hastalardan alınan serum ve alt solunum yolu örnekleri [balgam (n= 88), trakeal aspirat (TA) (n= 6) ve bronkoalveoler lavaj (BAL) (n= 2)], rutin test işlemleri yapıldıktan sonra çalışmada kullanılmak üzere saklandı.

Mukoid yapıda olan solunum yolu örnekleri, distile su ile hazırlanan %0.3 konsantrasyonunda "1,4-dithiothreitol (DTT)" ile muamele edilerek homojenize hale getirildi. İşlem sonunda konsantre olan örnekler, mikrosantrifüj tüplerinde -20°C'de saklandı.

Mikroskopik İnceleme

Solunum yolu örneklerinden üçer adet preparat hazırlanarak havada kurutuldu. *P.jirovecii* trofozoit formlarının görüntülenmesi için Giemsa (Merck, Almanya) ile boyandı. *P.jirovecii* kist formlarının incelenmesi için ise modifiye TBO (Sigma-Aldrich, ABD) boyama yöntemi uygulandı¹³. Preparatlar, ışık mikroskobu ile 40x ve 100x objektifte incelendi. TBO boyama yöntemi, *P.jirovecii* kist formlarını boyayarak lavanta renginde görünüm sağlamaktadır. Preparatta tomurcuk oluşturmayan, lavanta renginde, biçimsiz, bal peteği benzeri küme oluşturan yapılar pozitif olarak değerlendirildi.

P.jirovecii kist ve trofozoit formlarının tespiti için ayrıca monoklonal bir IFA olan "Pneumo Cel Indirect IF Test" (Cellabs, Avustralya) kiti kullanıldı ve üretici firma önerilerine göre uygulandı. Preparatlar floresan mikroskop (530 nm dalga boyu) ile incelendi. İki ya da daha fazla kist (elma yeşili floresans) görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" Testi

Serum örneklerinden KL-6 tespiti için "Human KL-6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (SunRed, Çin) (Test aralığı: 5-1.500 U/ml) kullanıldı ve çalışma, üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Pneumocystis jirovecii Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi

DNA izolasyonu, QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile kan ve vücut sıvılarından DNA izolasyon protokolü uygulanarak yapıldı.

Çalışmada, *P.jirovecii* tespiti için mtLSU rRNA gen bölgesini hedefleyen nested-PCR yöntemi uygulandı. Birinci tur PCR 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 PCR 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 kullanıldı¹⁴. Her bir örneğin PCR amplifikasyonu, 50 µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Birinci tur için PCR reaksiyon karışımı; 5 µl 10 x PCR tampon, 2 µmol/µl MgCl₂, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, 0.25 pmol/µl her bir primer, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve 8 µl örnek DNA'sı içermektedir. İkinci tur PCR bileşenleri benzer şekilde hazırlandı ve birinci tur PCR ürününden 3 µl'lik örnek, kalıp DNA olarak kullanıldı. Örneklerin amplifikasyon koşulları, birinci tur için 94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 40 döngü 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1.5 dakika uzama basamakları ve son olarak 70°C'de 5 dakika son uzama basamağı şeklinde uygulandı. İkinci tur amplifikasyon için ise primer bağlanma sıcaklığı 50°C olacak şekilde aynı termal döngü koşulları kullanıldı. Amplifikasyon ürünleri, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 120 voltta 40 dakika elektroforeze tabi tutulduktan sonra ultraviole ışığı altında görüntüldü. Birinci ve ikinci tur PCR ürünlerinden sırasıyla 346 ve 263 baz çifti (bp) uzunluğunda bant elde edilen örnekler pozitif olarak değerlendirildi¹⁴.

Pneumocystis jirovecii Pnömonisi ve Kolonizasyon Sınıflandırması

P.jirovecii tespit edilen hastalarda klinik sınıflandırma, daha önce araştırmacılar tarafından kullanılan kriterlere göre yapıldı^{15,16}.

Kesin *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi: Dispne, ksrk, ateş gibi tipik kliniğın ilerleyici şekilde seyretmesi ve radyolojik bulguların buzlu cam opasiteleri ya da infiltrasyon şeklinde olması, mikroskopinin pozitifliğı, anti-PCP tedavisi ile enfeksiyonun üzülmesi.

Olası *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi: Uyumlu klinik ve radyolojik bulguları olan hastalarda PCR'nin pozitif, mikroskopinin negatif olması, anti-PCP tedavisi ile enfeksiyonun üzülmesi.

Kolonizasyon: PCR'nin pozitif, mikroskopinin negatif olduğı durumlarda atipik klinik ve radyolojik bulguların olması, antibiyotik tedavisi ile semptomların üzülmesi.

İstatistiksel Analiz

Sürekli değışkenler, normal dağılım varsayımı sağılandığı durumda ortalama (değışim aralığı), sağılanmadığı durumda ise medyan (min-maks) şeklinde özetlendi. Kategorik değışkenler, sayı ve yüzde cinsinden özetlendi. Sürekli bir değışken bakımından iki grup arasında fark olup olmadığını incelemek için Mann-Whitney U testinden yararlanıldı. Oranlar arasındaki farklılıklar için iki oran z testinden yararlanıldı. KL-6 parametresinin grupları ayırmadaki başarısını değıerlendirmek için ROC analizinden yararlanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 96 hastanın 64 (%67)' erkek, 32 (%33)'si kadın olup, yaş ortalaması 60 ± 14.6 (min-maks: 18-90) yıl olarak belirlenmiştir. Hastaların 79 (%82.3)'unu serviste, 17 (%17.7)'sini ise yoğın bakım ünitesinde yatanlar oluşturmuştur. Hastalardan alınan solunum yolu örneklerinin 88 (%91.6)'i balgam, 6 (%6.3)'sı trakeal aspirat ve 2 (%2.1)'si BAL olarak belirlenmiştir.

Hastaların 39 (%40.62)'unun solid organ tümörü, 27 (%28.12)'sinin hematolojik maligniteler, 5 (%5.20)'inin organ transplantasyonu, 4 (%4.16)'ünün HIV/AIDS, 3 (%3.13)'ünün otoimmün hastalıklar, 12 (%12.50)'sinin KOAH, 3 (%3.13)'ünün interstisyel akciğr hastalığı, 18 (%18.75)'inin ise diğr hastalıklar nedeni ile tedavi gördüğü belirlenmiştir (Tablo I).

Çalışmadaki 96 hastanın 72 (%75)'si immünsupresif tedavi almış ve bunların 44' sadece kemoterapi, 15'i sadece steroid, sekizi kemoterapi ve steroid, beşi antirejeksiyon tedavisi alan hastalardan oluşmuştur.

Çalışmadaki 96 hasta örneğinin 16 (%16.7)'sında PCR, 5 (%5.2)'inde IFA, 3 (%3.1)'nde TBO ve 2 (%2.1)'sinde Giemsa yöntemi ile *P.jirovecii* tespit edilmiştir (Resim 1, Tablo II). PCR ve mikroskopik inceleme yöntemlerinin sonuçları uyumlu bulunmuştur.

P.jirovecii tespit edilen 16 hastanın 11 (%69)'i erkek, 5 (%31)'i kadın olup, yaş ortalaması 61 ± 12 (min-maks: 40-82) yıl olarak belirlenmiştir. PCR pozitif hastaların altta yatan hastalıklara göre dağılımı; altı kanser,  hematolojik malignite,  HIV/AIDS, iki KOAH ve iki interstisyel akciğr hastalığı olarak belirlenmiştir (Tablo I). Pozitif 16 hastanın 11 (%68.75)'i immünsupresif tedavi alan (biri HIV pozitif non-Hodgkin lenfoma), 3 (%18.75)' immün-kompetan ve diğr 2 (%12.5)'si yalnızca HIV/AIDS olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1. Hastaların Altta Yatan Hastalık Gruplarına Göre Dağılımı

Altta yatan hastalıklar	Toplam hasta sayısı n= 96 (%)	<i>P.jirovecii</i> pozitif hasta sayısı n= 16 (%)
Hematolojik maligniteler	27 (28.12)	3 (18.75)
Lösemi	15 (15.62)	-
Lenfoma	4 (4.17)	2 (12.5)
Multipl miyelom	6 (6.25)	1 (6.25)
Miyelodisplastik sendrom	2 (2.08)	-
Solid tümörler	39 (40.62)	6 (37.5)
Akciğer kanseri	22 (22.91)	4 (25.0)
Diğer kanserler	17 (17.71)	2 (12.5)
Organ nakli	5 (5.20)	-
Böbrek nakli	5 (5.20)	-
HIV/AIDS	4 (4.16)	3 (18.75)
Otoimmün hastalıklar	3 (3.13)	-
Romatoid artrit	2 (2.08)	-
Ankilozan spondilit	1 (1.04)	-
Diğer hastalıklar	18 (18.75)	4 (25.0)
KOAH	12 (12.50)	2 (12.5)
İnterstisyel akciğer hastalığı	3 (3.13)	2 (12.5)
Kronik böbrek yetmezliği, DM	2 (2.08)	-
Kronik kalp yetmezliği, DM	1 (1.04)	-

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü, AIDS: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu, KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı.

Resim 1. *P.jirovecii* mtLSU nested-PCR agaroz jel elektroforez görüntüsü; Kolon M: Moleküler ağırlık belirteci (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific); Kolon 1-4: Birinci tur PCR ürünleri (346 bp) ve Kolon 5-8: İkinci tur PCR ürünleri (263 bp).

Tablo II. Mikroskopik inceleme ve PCR 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

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu IFA: İmmünfloresan testi, TBO: "Toluidine Blue O", PCP: *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi.

IFA ile pozitif bulunan beş hastanın tamamı erkek ve yaş ortalaması 61 ± 9 (min-maks: 45-70) yıl olup, bu hastaların üçünde HIV/AIDS, birinde akciğer kanseri ve birinde interstisyel akciğer hastalığı tanısı gözlenmiştir.

IFA yöntemi referans alındığında: Giemsa için duyarlılık %40 (%95 güven aralığı (GA): 6.49-84.60), özgüllük %100 (%95 GA: 95.99-100); TBO için duyarlılık %60 (%95 GA: 15.40-93.51), özgüllük %100 (%95 GA: 95.99-100); PCR için duyarlılık %100 (%95 GA: 47.95-100), özgüllük %87.9 (%95 GA: 79.40-93.80) olarak hesaplanmıştır.

PCR ile *P.jirovecii* saptanan 16 hastadan IFA sonucu da pozitif olan beş hasta kesin PCP [HIV/AIDS (n= 3), akciğer kanseri (n= 1), interstisyel akciğer hastalığı (n= 1)]; PCR pozitif, IFA negatif üç hasta, olası PCP [multipl miyelom (n= 1), interstisyel akciğer hastalığı (n= 1), kolanjiyoselüler karsinom (n= 1)] ve diğer sekiz hasta kolonize olarak değerlendirilmiştir (Tablo II). *P.jirovecii* tespit edilen hastaların bilgileri ise Tablo III'te görülmektedir.

Çalışmada, altta yatan hastalıklara göre *P.jirovecii* saptanma sıklığı ise sadece HIV/AIDS hastalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p= 0.012$) (Tablo IV). Çalışmaya dahil edilen HIV/AIDS pozitif dört hastanın üçünde IFA ve PCR ile *P.jirovecii* saptanmış olup, kliniği ile değerlendirildiğinde kesin PCP olarak tanımlanmıştır.

Serum KL-6 seviyesi, PCP/olası PCP ve kolonizasyon olarak tanımlanan hastalar arasında değerlendirildiğinde, kesim noktası > 500 alındığında; duyarlılık %62.5 (%95 GA: 24.7-91.0) ve özgüllük %75 (%95 GA: 35.0-96.1) olarak tespit edilmiştir (Şekil 1).

Tablo III. *Pneumocystis 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	MEM	Taburcu	Kolonizasyon
6	45/E	Akciğer kanseri	-	Öksürük, hemoptizi	Konsolidasyon	MEM	Taburcu	Kolonizasyon
8	64/E	HIV/AIDS, NHL	KT	Öksürük	Buzlu cam dansitesi	SXT/PTZ	Eksitus	PCP
20	82/K	Lenfoma	KT, KS	Öksürük, dispne	Normal	LEV	Taburcu	Kolonizasyon
28	60/K	Multipl miyelom	KT	Öksürük, dispne	İnfiltrasyon	ETP	Eksitus	Olası PCP
32	67/E	KOAH	KS	Öksürük, dispne	Normal	CRO	Taburcu	Kolonizasyon
56	70/E	İAH	KS	Öksürük, dispne, ateş	İnfiltrasyon	MEM/TGC	Eksitus	PCP
60	64/E	Akciğer kanseri	KT	Öksürük, dispne, ateş	Retikülodüler konsolidasyon	PTZ	Eksitus	PCP
62	43/E	Kolanjiyoselüler karsinoma	KT	Öksürük, ateş	Normal	MEM	Eksitus	Olası PCP
68	62/E	Akciğer kanseri	-	Öksürük, dispne	Konsolidasyon	PTZ	Taburcu	Kolonizasyon
70	65/K	Akciğer kanseri	-	Hemoptizi, dispne	Kaviter lezyon	MEM/CLR	Taburcu	Kolonizasyon
73	45/E	HIV/AIDS	-	Öksürük, dispne	Buzlu cam dansitesi	SXT/CLR/MEM	Eksitus	PCP
85	70/E	KOAH	KS	Dispne	İnfiltrasyon	LEV	Taburcu	Kolonizasyon
86	40/K	İAH	KS	Öksürük, dispne	Konsolidasyon	SXT/MEM/CLR	Eksitus	Olası PCP
90	72/K	Tiroid-özofagus kanseri	KT	Dispne	Normal	CES	Taburcu	Kolonizasyon
98	61/E	HIV/AIDS	-	Öksürük, ateş	İnfiltrasyon	SXT/LEV	Taburcu	PCP

KT: Kemoterapi, KS: Kortikosteroid, PCP: *P. jirovecii* pnömonisi, MEM: Meropenem, PTZ: Piperasilin tazobaktam, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, LEV: Levofloksasin, ETP: Ertapenem, CRO: Seftriakson, TGC: Tigesiklin, CLR: Klaritromisin, CES: Sefoperazon sulbaktam, TBC: Tüberküloz, KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, NHL: Non-Hodgkin lenfoma, HIV/AIDS: İnsan immün yetmezlik virüsü/kazanılmış immün yetmezlik sendromu, İAH: İnterstiyel akciğer hastalığı.

Tablo IV. Hastaların Klinik ve Demografik Özellikleri

	<i>P.jirovecii</i> pozitif n= 16 (%)	<i>P.jirovecii</i> negatif n= 80 (%)	p
Yaş ortalaması (yıl)	61 (40-82)	60 (18-90)	0.743
Cinsiyet, erkek	11 (69)	53 (66)	0.846
Hematolojik 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
İnterstisyel akciğer hastalığı	2 (12.5)	1 (1.25)	0.115
Diğer hastalıklar	-	3 (3.75)	-
İmmünsupresif tedavi	11 (68.75)	61 (76.25)	0.752
Sadece kemoterapi	6 (37.5)	38 (47.5)	0.647
Antireksiyon	-	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-sulfametoksazol tedavi veya profilaksi	4 (25.0)	18 (22.5)	0.913

* P< 0.05

Şekil 1. Serum KL-6 seviyesinin PCP ve kolonizasyon olarak tanımlanan örnekler arasındaki değerlendirilmesi; kesim noktası > 500 alındığında duyarlılık %62.5 (%95 CI; 24.7-91.0) ve özgüllük %75 (%95 GA: 35.0-96.1).

TARTIŞMA

Global verilere göre, yıllık yaklaşık 500.000 *P.jirovecii* olgusu görüldüğü tahmin edilmektedir. Her 100.000'de en fazla olgunun Nijerya (n= 48.2), Kenya (n= 43) ve Tanzania (n= 22)'da; en az olgunun Danimarka (n= 0.04), Bangladeş (n= 0.04) ve Macaristan (n= 0.1)'da görüldüğü bildirilmiştir¹⁷. Tüm *P.jirovecii* olgularının %77'si Afrika, %10'u Amerika Birleşik Devletleri, %7'si Avrupa, %6'sı ise Asya'dan bildirilmiştir¹⁷.

Ülkemizden *P.jirovecii*'nin araştırıldığı çalışmalarda, çeşitli hasta gruplarında %8-38 arasında *P.jirovecii* pozitifliği bildirilmiştir^{16,18-23}. Töz ve arkadaşları, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile PCP şüphesi olan 42 hastadan alınan BAL örneklerinin %38 (16/42)'inde; Özkoç ve arkadaşları, nested-PCR ile immün sistemi baskılanmış hastalardan alınan BAL örneklerinin %33.7 (31/92)'sinde; Tekinşen ve arkadaşları ise gerçek zamanlı PCR ile immünsupresif 100 hastanın %8'inde *P.jirovecii* pozitifliği bildirmişlerdir^{16,22,23}. Çalışmamızda, %75'inde immün sistemi baskılanmış olan 96 hastanın 16 (%16.7)'sında *P.jirovecii* pozitifliği tespit edilmiştir. Bu oran, ülkemizden bildirilen değerler arasındadır.

PCP tanısında *P.jirovecii* kist ve trofozoit formlarının solunum yolu örneklerinde mikroskopik olarak gösterilmesi standart tanı yöntemidir⁶. Solunum yolu örneklerinden indüklenmiş balgam örneği ile %50-90 oranında tanı konulabilirken; BAL örneğinde bu oran %90-98'dir^{1,24}. IFA mikroskopi yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü diğer boyama yöntemlerinden daha yüksektir^{25,26}. Ancak, HIV negatif immünsupresif hastalarda akciğer *P.jirovecii* yükünün düşük olması mikroskopik tanının duyarlılığını azaltmaktadır²⁷. Klinik örneklerden *P.jirovecii* tespitinde PCR yöntemlerinin kullanılması tanı duyarlılığını artırmıştır. Özellikle mtLSU rRNA nested-PCR kullanılması, mikroskopinin negatif olduğu düşük parazit yükü bulunan hastalarda tanının sağlanmasında etkilidir^{8,15}. Aderaye ve arkadaşları, TBO, IFA ve PCR yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada, 131 hastanın 56 (%42.7)'sında PCR, 39 (%29.4)'unda IFA ve 28 (%21.4)'inde TBO yöntemi ile pozitiflik tespit etmişlerdir²⁸. Aynı çalışmada, TBO boyama IFA ve PCR ile karşılaştırıldığında, balgam örneklerinde sırasıyla duyarlılık %71.4 ve %34.5; BAL örneklerinde ise duyarlılık %68 ve %41.5 olarak bildirilmiştir²⁸. Çalışmamızda, 96 hasta örneğinin 16 (%16.7)'sında PCR, beşinde (%5.2) IFA, üçünde (%3.1) TBO ve ikisinde (%2.1) Giemsa yöntemi ile *P.jirovecii* tespit edilmiştir. Hastaların balgam örneklerinde önemli oranda *P.jirovecii* saptanmış olması, hastanemizde ve bölgemizde daha fazla PCP olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda IFA yöntemi referans alındığında: Giemsa boyama yöntemi ile duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %40 ve %100; TBO yöntemi ile %60 ve %100; PCR ile %100 ve %87.9 olarak bulunmuştur. Nested-PCR yönteminin duyarlılığının yüksek olmasından dolayı PCR'nin pozitif, mikroskopinin negatif olduğu sonuçlar PCR yönteminin özgüllüğünü düşürmüştür. Bu tip sonuçlarda kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımı yapmak için PCR sonuçları klinik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir. Çalışmamızda, PCR ve IFA yönteminin pozitif olduğu beş hasta kesin PCP; PCR pozitif, mikroskopi negatif üç hasta olası PCP ve diğer sekiz hasta kolonize olarak değerlendirilmiştir. PCP tespit edilen beş hastadan HIV/AIDS tanısı olan üç hasta anti-PCP tedavisi almış olup, biri iyileşerek taburcu edilmiş, diğer

dört hasta ise hastanede yattıkları süreçte kaybedilmiştir. Olası PCP olarak tanımlanan üç hastadan biri anti-PCP tedavisi almış, ancak üç hasta da kaybedilmiştir. Bu sonuçlar, HIV negatif immünsupresif hastalarda PCP'nin önemli bir sıklığa sahip olduğunu ve mikroskopinin negatif olduğu durumlarda PCR sonuçlarının tedaviye karar vermede etkili olabileceğini göstermiştir.

HIV negatif immünkompetan bireylerde *P.jirovecii* kolonizasyonunu gösteren çalışmalar olmasına rağmen immün sistemi baskılayıcı tedavi alan (kortikosteroid ve/veya kemoterapötik ajanlar) hastalarda kolonizasyonun daha fazla saptandığı grlmştir^{4,29}. Immnsupresif hastalarda *P.jirovecii*'nin en fazla bildirildiği hastalıklar sırasıyla; hematolojik maligniteler, solid organ tümörleri, otoimmün hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları ve organ transplant alıcılarıdır³⁻⁵. Çalışmamızda, altta yatan hastalıklara göre *P.jirovecii* saptanma sıklığı, sadece HIV/AIDS hastalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p= 0.012$). Çalışmaya dahil edilen HIV/AIDS pozitif dört hastanın üçünde PCP saptanmıştır. Bu sonuç, HIV/AIDS pozitif hastalarda *P.jirovecii*'nin önemli bir etken olmaya devam ettiğini göstermektedir. Bunun nedeninin, HIV pozitif hastaların antiretroviral tedavi rejimine düzenli uymaması ya da uygulanan profilaksiye bağlı olarak *P.jirovecii* izolatlarının anti-PCP ilaçlara karşı direnç geliştirmiş olabileceği dşnlmştir. Diğer yandan, bu şekildeki profilaksi ve tedavi başarısızlığı, hastaların *P.jirovecii* pozitif kalmasına neden olabilecektir.

Son yıllara ait çalışmalarda HIV/AIDS pozitif hastalarda PCP'nin azalma eğiliminde olduğu gösterilmesine rağmen Dünya Sağlık rgt HIV/AIDS 2018 Srveyans Verileri'ne göre Avrupa Birliği lkelerinde, PCP (%21), AIDS'e bağlı en yaygın görülen enfeksiyon olarak bildirilmiştir^{4,5,30}.

KL-6, interstisyel akciğer hastalıklarında ve akut akciğer yaralanmalarında serumda artış gösteren bir indikatördür ve PCP'li hastalarda da serumda anlamlı olarak yüksek bildirilmiştir^{9,11,12}. 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 ise %78.8 olarak bildirilmiřtir¹². 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 olanlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıřtır¹¹. Çalışmamızda *P.jirovecii* tespit edilen hastalar arasında KL-6'nın PCP ve kolonizasyon ayırımındaki etkinliği değerlendirildiğinde, duyarlılık %62.5 ve özgüllük %75 bulunmuştur. Bazı alışmalarda, KL-6'nın PCP ve kolonizasyon ayırımında başarılı bulunmadığı grlmştir^{10,12}. Çalışmamızda ise PCR pozitif örneklerde kolonizasyon ve PCP ayırımında serum KL-6 seviyesinin rutin kullanımda yeterli olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı, ağırlıklı olarak balgam örnekleri ile çalışılmış olması ve PCP tanısı için mikroskopik boyama yöntemlerinde sitosantrifüj uygulamasının yapılmamış olmasıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmada bölgemizdeki *P.jirovecii* epidemiyolojisi hakkında önemli ve-riler elde edilmiştir. Balgam rneklerinden *P.jirovecii* tespitinde nested-PCR yöntemi duyarlı

ve başarılı bulunmuştur. KL-6 testi, PCR pozitif hastalarda kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımında yeterli bulunmamıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, yatan hastaların bağışıklık durumuna ve klinik özelliklerine göre PCP'nin ayırıcı tanı listesinde olması gerektiğini göstermiştir. Bu gruplarda daha güvenilir sonuçlara ulaşmak için daha fazla sayıda hastanın yer aldığı çalışmaların planlanması gerekmektedir. Ayrıca bölgemiz ve ülkemizdeki *P.jirovecii* enfeksiyonlarını anlayabilmek için genotiplendirme ve anti-PCP ilaçlarına karşı direnç ile ilişkili moleküler epidemiyolojik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından etik kurul onayı alınarak gerçekleştirildi (Tarih: 09.06.2016 ve Karar no: 2016/177).

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada istatistiksel analizin yapılmasına yardımcı olan Mersin Üniversitesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Didem Derici Yıldırım'a teşekkür ederim.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Calderon EJ, Varela JM, Durand-Joly I, Dei-Cas E. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, pp: 1-36. In: Saurez ML, Ortega SM (ed), Pneumonia: Symptoms, Diagnosis and Treatment. 2011, Nova Science Publishers Inc, NY, USA.
2. Kelley CF, Checkley W, Mannino DM, Franco-Paredes C, Del Rio C, Holguin F. Trends in hospitalizations for AIDS-associated *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in the United States (1986 to 2005). Chest 2009; 136(1): 190-7.
3. Liu Y, Su L, Jiang SJ, Qu H. Risk factors for mortality from *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in non-HIV patients: a meta-analysis. Oncotarget 2017; 8(35): 59729-39.
4. Bienvenu AL, Traore K, Plekhanova I, Bouchrik M, Bossard C, Picot S. *Pneumocystis* pneumonia suspected cases in 604 non-HIV and HIV patients. Int J Infect Dis 2016; 46: 11-7.
5. Pereira-Díaz E, Moreno-Verdejo F, de la Horra C, Guerrero JA, Calderón EJ, Medrano FJ. Changing trends in the epidemiology and risk factors of *Pneumocystis* pneumonia in Spain. Front Public Health 2019; 7: 275.
6. Sokulska M, Kicia M, Wesołowska M, Hendrich AB. *Pneumocystis jirovecii*-from a commensal to pathogen: Clinical and diagnostic review. Parasitol Res 2015; 114(10): 3577-85.
7. 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.
8. Fan LC, Lu HW, Cheng KB, Li HP, Xu JF. Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A bivariate meta-analysis and systematic review. PLoS One 2013; 8(9): e73099.
9. Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, Yamada W, Nishimura T, Takeuchi T, et al. Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. Chest 2007; 131(4): 1173-80.
10. Shimizu Y, Sunaga N, Dobashi K, Fueki M, Fueki N, Makino S, et al. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: A prospective study. BMC Infect Dis 2009; 9: 47.

11. Nakamura H, Tateyama M, Tasato D, Haranaga S, Yara S, Higa F, et al. Clinical utility of serum beta-D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Intern Med 2009; 48(4): 195-202.
12. Esteves F, Calé SS, Badura R, de Boer MG, Maltez F, Calderón EJ, et al. Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: Evaluation of four serologic biomarkers. Clin Microbiol Infect 2015; 21(4): 379.e1-10.
13. Gosey LL, Howard RM, Witebsky FG, Ognibene FP, Wu TC, Gill VJ, et al. Advantages of a modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Clin Microbiol 1985; 22(5): 803-7.
14. Tamburrini E, Mencarini P, Visconti E, Zolfo M, De Luca A, Siracusano A, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. J Clin Microbiol 1996; 34(6): 1586-8.
15. 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.
16. 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.
17. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. J Fungi (Basel) 2017; 3(4): 57.
18. Güneş I, Kalkanci A, Kuştımur S, Ergüven S, Özet G, Ekim N. Comparison of the methenamine silver staining, direct fluorescent antibody and nested-polymerase chain reaction methods in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Mikrobiyol Bul 2004; 38(1-2): 105-12.
19. Döşkaya M, Caner A, Değirmenci A, Wengenack NL, Yolasiğmaz 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(Pt 7): 937-44.
20. Özmen A, Mistik R, Alver O, Coşkun F, Ursavaş A, Uzaslan E. The *Pneumocystis jirovecii* colonization in bronchoalveolar lavage (BAL) and bronchial washing and the comparison of methods which are used in diagnosis. Tuberk Toraks 2013; 61(4): 303-11.
21. Tosun I, Buruk K, Dede R, Kaklıkaya N. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples of immunocompromised patients with PCR, IFA and Giemsa staining methods. Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 195-7.
22. Tekinşen FF, Koç AN. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens by different methods. Mikrobiyol Bul 2013; 47(4): 658-67.
23. Töz S, Gündüz C, Tetik A, Taşbakan M, Pullukçu H, Bacakoğlu F, et al. The comparison of microscopy and real time polymerase chain reaction methods for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: evaluation of clinical parameters. Tuberk Toraks 2017; 65(3): 220-6.
24. Lu JJ, Lee CH. *Pneumocystis* pneumonia. J Formos Med Assoc 2008; 107(11): 830-42.
25. Cruciani M, Marcati P, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. Eur Respir J 2002; 20(4): 982-9.
26. Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3333-5.
27. Monnet X, Vidal-Petiot E, Osman D, Hamzaoui O, Durrbach A, Goujard C, et al. Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis* pneumonia in patients with and without HIV infection. Crit Care 2008; 12(1): R28.
28. Aderaye G, Woldeamanuel Y, Asrat D, Lebbaad M, Beser J, Worku A, et al. 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 2008; 36(3): 237-43.
29. Qoraan I, Oz Y, Metintas M, Durmaz G. The investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in adult individuals of Turkish population. Biom Biostat Int J 2018; 7(4): 311-5.
30. World Health Organization (WHO). HIV/AIDS surveillance in Europe 2018. World Health Organization, 2018.