



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**BRONKOALVEOLAR LAVAJ (BAL) VE BRONŞİAL LAVAJ (BL) YAPILAN
HASTALARDAKİ PNEUMOCYSTİS JİROVECİİ KOLONİZASYONU VE
TANIDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRMASI**

Dr. Ahmet ÖZMEN

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2011



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

BRONKOALVEOLAR LAVAJ (BAL) VE BRONŞİAL LAVAJ (BL) YAPILAN
HASTALARDAKİ PNEUMOCYSTİS JIROVECİİ KOLONİZASYONU VE
TANIDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRMASI

Dr. Ahmet ÖZMEN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Reşit MISTIK

BURSA-2011

İÇİNDEKİLER

Özet	ii
İngilizce Özet	iv
Giriş	1
Gereç ve Yöntem	13
Bulgular	22
Tartışma ve Sonuç	38
Kaynaklar	45
Ekler	53
Teşekkür	57
Özgeçmiş	58

ÖZET

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*)'nin neden olduğu Pneumocystis pnömonisi (PCP) bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda en sık ve ciddi olarak gözlenen fırsatçı enfeksiyonlardan biridir.

Solunumla ilgili şikayetleri, ateşi ve anormal göğüs radyografileri olan ve bağışıklığı baskılanmış herhangi bir hastada PCP düşünülmelidir.

PCP'nin kesin tanısı balgam, indüklenmiş balgam, bronkoalveolar lavaj (BAL), bronşial lavaj (BL), trakeal aspirasyon veya bronşial fırçalama ile elde edilen örnek, akciğer (AC) biyopsisi ve plevral sıvı örneklerinde mantarın morfolojik olarak gösterilmesiyle konur.

Çalışmamızda Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından klinik ya da poliklinik ortamında takip edilen ve tanı amaçlı bronkoskopi yapılan toplam 100 hastaya ait BAL ve BL örnekleri değerlendirildi.

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

BAL ve BL örneklerinde metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi O, Wright-Giemsa boyamaları ile etken saptanmadı. IFA testi ile 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'nün BAL olduğu ve 8'nin BL olduğu görüldü.

Olgu gruplarında bakılan yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, hipertansiyon (HT), diabetes mellitus (DM), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), serebrovasküler olay (SVO), konjestif kalp yetmezliği (KKY), son 3 ayda hastanede yatma öyküsü, antibiyotik kullanımı ve radyolojik bulguları açısından değerlendirildiğinde *P. jirovecii* pozitifliği ile aralarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Olgu grupları PCR ve IFA pozitifliklerine göre gruplara ayrılarak değerlendirme yapıldığında IFA veya PCR pozitif olgularda immüsupresyon açısından anlamlı farklılık saptandı ($p=0.003$). Pozitif olguların %28.6'sı immüsupresif saptanırken, PCR veya IFA negatif olguların %3.8'i immüsupresifti.

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 ile IFA ve PCR tanı testi sonuçlarının uyumlu oldukları saptandı ($p=0.581$).

Anahtar kelimeler: *Pneumocytis jirovecii*, bronkoalveolar lavaj, bronşial lavaj, immüsupresyon, IFA, nested PCR.

SUMMARY

The Pneumocystis Jirovecii Colonization in Bronchoalveolar Lavage (BAL) and Bronchial Washing and The Comparasion of Methods Which are Used in Diagnosis.

Pneumocystis pneumonia (PCP) which is caused by *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) is usually seen in the patients whose immune system is supressed. It is seriously seen an opportunist infection.

PCP has to be tough; many patient who has got breathing complaints, fever, abnormal chest radiographies and whose immunity is supressed.

PCP's certain diagnosis can be shown; by showing the fungus morphologically in the mucus, in the induced-sputum, in the bronchoalveolar lavage (BAL), in the bronchial washing, in the tracheal aspiration or in the sample which is done by the bronchial brush, in the lung biopsy and in the pleural effusion. PCP's certain diagnosis can be shown; by showing the fungus morphologically in the mucus, induced-sputum, bronchoalveolar lavage (BAL), bronchial washing, tracheal aspiration, bronchial brush, lung biopsy or in the pleural effusion.

In our study; totally 100 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.

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

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 BL and 8 of them were bronchial washing.

When the phenomenon groups were evaluated according to age, gender, smoking, hypertension (HT), diabetes mellitus (DM), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cerebrovascular accident (CVA), congestive cardiac failure (CCF), staying in the hospital in the last 3 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 differences ($p=0.003$). 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 $p=0.581$).

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

GİRİŞ

Pneumocystis ilk olarak 1909 yılında Chagas tarafından fark edilmiş ve *Trypanosome*'nin yeni bir formu olarak değerlendirilmiştir (1). Dr. Carinii'de 1910 yılında aynı değerlendirmeyi yapmıştır. Delanöes 1912'de *Pneumocystis*'i ayrı bir tür ve cins olarak tanımlamış ve Dr. Carinii'ye atfen *Pneumocystis carinii* olarak adlandırmıştır (2).

Önceleri küçük trofik formunun morfolojik özellikleri, kist formunun büyük olması, kist içinde sayıları sekize çıkan cisimciklerin oluşması ve kistin yırtılarak trofik formların açığa çıkmasına dayanılarak protozoon olarak sınıflandırılmıştır (2). Daha sonra 1988'de yapılan rRNA gen analizleri ve dihidrofolat redüktaz, timidilat sentetaz, tubulin ve aktinleri kodlayan genlerin genomik sekans analizleri ile elongasyon faktör 3'ün ve mantarlarda protein sentezi için gerekli olan ancak protozoonlarda bulunmayan bir faktörün varlığının gösterilmesi etkenin mantar olduğunu ortaya koymuştur (1).

***Pneumocystis* Taksonomisi**

Mantar taksonomisi içinde aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır (3, 4).

Topluluk (Kingdom): Fungi

Bölüm (Phylum): Ascomycota

Sınıf (Class): Pneumocystidomycetes

Takım (Order): Pneumocystidales

Aile (Family): Pneumocystidaceae

Cins (Genus): *Pneumocystis*

Frenkel 1976 yılında insanlar ve diğer memelilerdeki *Pneumocystis*'ler arasında fenotipik farklılıkların varlığına dayanarak mikroorganizmayı insanlarda ilk tanımlayan parazitolog olan Otto Jirovec'e atfen insan kaynaklı *Pneumocystis* için *Pneumocystis jirovecii* ismini önermiştir (5). Farklı memelilere ait *Pneumocystis*'lerin birbirlerinden farklı olduklarının

iyice anlaşılmasından sonra ilk defa 1999 yılında insan kaynaklı *Pneumocytis* için Frenkel tarafından önerilen *P. jirovecii* ismi verilmiştir (9).

Mikrobiyolojik Özellikleri

Pneumocytis'in uzun süreli, devamlı ve güvenilir bir kültür sistemiyle halen üretilmemiş olması nedeniyle mantarın yaşam siklusu, morfolojisi ve enfeksiyona hangi formunun neden olduğu tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir (4, 14).

Organizmaya ait olarak gözlenen üç gelişim basamağı trofik form (trofozoit), prekist (sporosit) ve kist olarak isimlendirilmektedir (1). Trofozoitler yaşam siklusunun aseksüel fazında ikiye bölünerek çoğalırlar. Seksüel fazda haploid trofik formların birleşmesinden sonra önce prekist, sonrasında içinde sekiz haploid intrakistik cisimciğin (veya spor) bulunduğu kist formu oluşur (1).

Pneumocytis'in yüzeyi glukoz/mannoz, N-asetilglükozamin ve galaktoz/n-asetilgalaktozaminden zengindir (1). Hücre duvarının esas yapısını β -1,3 glukan oluştururken lipid olarak kolesterol baskındır (1, 15).

En önemli *Pneumocytis* antijeni majör yüzey glikoproteinidir (MSG ya da gp A) (16). MSG türe özgü ve ortak epitoplar içerir, humoral ve hücrel bağışık yanıtların oluşmasına neden olur ve mantarın konak ile etkileşiminde merkezi rol oynar (1, 16). *Pneumocytis'in* memeli konağında bağışıklık yetmezliğinin olmadığı koşullarda kendisini antijenik varyasyonlarla gizlediği düşünülmektedir (13). Antijenik varyasyonlardan sorumlu tutulan gen MSG antijenlerini kodlayan MSG gen ailesidir (13).

Epidemiyoloji

Pneumocytis jirovecii'nin neden olduğu *Pneumocytis* pnömonisi (PCP) immünsuprese hastalarda en sık ve ciddi olarak gözlenen fırsatçı enfeksiyonlardan biridir (17, 18).

P. jirovecii'nin bulaşma yolu tam olarak anlaşılamadığı gibi çevresel kaynağı da tanımlanamamıştır (2). Latent enfeksiyonun reaktivasyonu savunulmakla birlikte; çevresel kaynaklardan bulaşın yanı sıra kişiden kişiye hava yolu ile bulaşın da olası yol olduğuna dair kanıtlar vardır (2, 18). Enfekte olmayan kişiler *Pneumocytis'in* asemptomatik taşıyıcısı da olabilirler (2). Güncel çalışmalar; *Pneumocytis'in* immünkompetan bireylerde veya aktif enfeksiyon veya klinik hastalık bulgusu olmayan HIV (+) hastalarda da düşük miktarda bulunabildiğini ortaya koymuştur (19, 20). 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 (21-25).

Primer enfeksiyonun çok yaygın ve erkenden geçirildiğine dair kanıtlar serokonversiyona dayalıdır (18). Yirmi aylık süt çocuklarında antikor pozitifliği oranı %85 olarak bulunmuştur (18).

HIV ile enfekte hastalarda PCP en önemli fırsatçı hastalıktır (26). Erişkinde PCP gelişimi için en önemli risk faktörü CD4 sayısının 200 hücre/ μ L'nin altına düşmesidir. HIV negatif hastalarda PCP gelişimi için en önemli risk faktörleri hücresel bağışıklıkla ilgili bozukluklar ve kortikosteroid kullanımındır (27).

Patogenez

Pneumocytis'in solunum yoluyla alındıktan sonra trofik formun alveollerde tip 1 epitelyal hücreye bağlanmasıyla enfeksiyonun başladığı düşünülmektedir (1, 12). *Pneumocytis'in* epitelyum hücrelerine bağlanmasında fibronektin, vibronektinin ve konak hücre üzerinde ki mannoz bağlayan reseptörler yardımcı olur (28).

Pneumocytis'e karşı savunmada ilk basamak alveolar makrofajlardır ve mantarın akciğerden temizlenmesinde başlıca rolü oynarlar (1, 28). Konak savunması bozuldukça *Pneumocytis* çoğalmaya ve alveoler boşlukları

doldurmaya başlar (1). Burada gözlenen esas histopatolojik bulgu köpüksü ve eozinofilik bir alveoler eksüdanın ortaya çıkmasıdır (1).

İçinde *Pneumocytis'in* yer aldığı granülom oluşumu akciğerde nadiren gözlenir (29). PCP olgularının %3-5' inin granülomatöz tipte seyrettiği ve esas olarak HIV enfekte hastalarda gözlendiği bildirilmektedir (29).

Klinik Belirtiler ve Bulgular

Duyarlı bir konakta PCP'nin ana semptomları dispne, ateş, balgamsız öksürüktür (1). AIDS hastalarında PCP semptomları haftalarca sürebilir ve genelde sinsi bir seyir gösterir (1,28).

Hastalığın akut seyrettiği hastalarda fizik muayenede takipne ve taşikardi bulunur (1, 27). Akciğerlerde dinlemeyle bir bulgu saptanmamakla birlikte, erişkin hastaların yaklaşık üçte birinde raller duyulabilir (1). PCP gelişen AIDS hastalarında ilk enfeksiyon sırasında mortalite oranı %10-20'dir (2). AIDS olmayan hastalarda tipik olarak ansızın bir solunum yetmezliği ortaya çıkar (2).

PCP'de gözlenen tipik radyolojik bulgular, hastalık ilerledikçe homojenliği artan ve diffüz hale gelen hilus çevresindeki iki taraflı interstisiyel infiltratlardır (2,27). Yüksek çözünürlüklü bilgisayar tomografisinde (HRCT) buzlu cam görünümü veya kistik lezyonlar gözlenebilir (2, 27). Teknesyum-99 ile işaretli *Pneumocytis* MSG'sine karşı oluşturulmuş monoklonal antikor, galyum-67 sitrat ve indiyum-111'in kullanıldığı nükleer tıp yöntemlerinde akciğerde yüksek tutulum izlenmektedir (1).

Tüm bunlara rağmen hastalığın semptom ve bulgularıyla, göğüs radyolojisi bulgularının hiçbir kombinasyonu PCP için tanı koydurucu değildir (28). PCP'ye diğer mikroorganizmaların neden olduğu pulmoner enfeksiyonların eşlik etmesi durumunda hastalığın kliniği daha karmaşık bir hale gelmektedir.

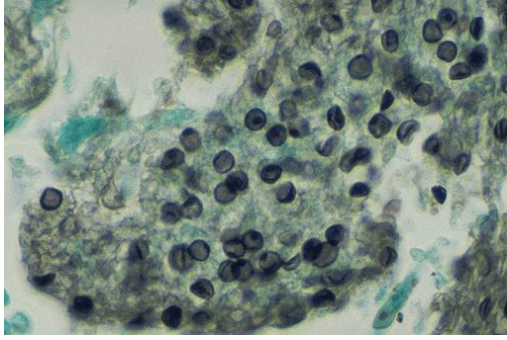
Tanı

Solunumla ilgili şikayetleri, ateşi ve anormal göğüs radyografileri olan ve immüsuprese herhangi bir hastada PCP düşünölmelidir (1).

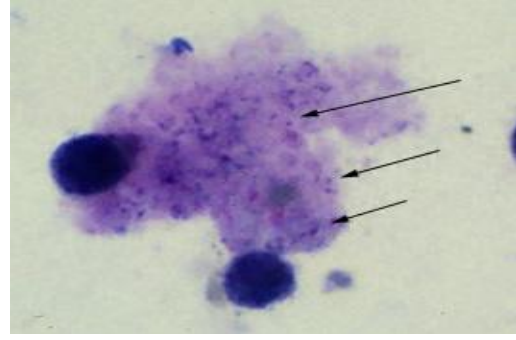
PCP'nin kesin tanısı balgam, indüklenmiş balgam, BAL, BL, trakeal aspirasyon veya bronşial fırçalama, AC biyopsisi ve plevral sıvı örneklerinde mantarın morfolojik olarak gösterilmesiyle konur.

Bu örneklerden *Pneumocytis'i* tanımlamak için çeşitli boyalar kullanılmaktadır. Metenamin gümüş (Gomori/Grocott) (Şekil-1a), toluidin mavisi O (Şekil-1b), kalkaflor beyazı veya cresyl echt violet gibi boyalar seçici olarak sadece kistlerin hücre duvarlarını boyarken, Wright-Giemsa, Diff-Quick, Gram-Weigert ve Papanicolaou gibi boyalar trofik formu ve intrakistik cisimcikleri boyar (1, 2, 28, 29). Giemsa ile trofozoidler ve intrakistik cisimler koyu mor, kist stoplazması eflatun-pembe boyanır (Şekil-1c). Kist çeperi boyanmamaktadır. Gram-Weigert ile *Pneumocytis jirovecii'nin* kistlerinin çeperi koyu kırmızı–bordo renge boyanır ancak iç yapıları boyanmaz (30-32).

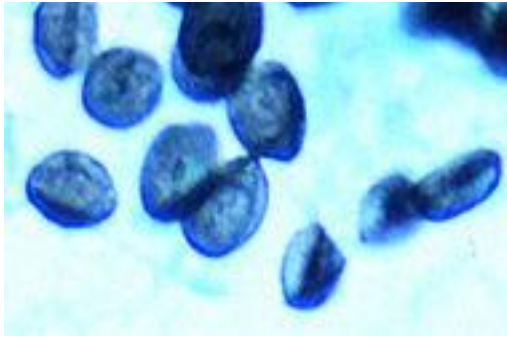
Monoklonal antikolar kullanılarak yapılan immünfloresans antikor (IFA) (Şekil-1d) testleriyle kist ve trofik formların duvar yapıları boyanır ve bu yöntem tanıda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Floresan mikroskopu ile boyalı örnekler incelendiğinde mikroorganizmalar tek tek veya kümeler oluşturmuş parlak elma yeşili cisimcikler olarak görülür. Trofozoidler, kistler ve kistlerin ekstrasellöler matriksi boyanır (33, 34).



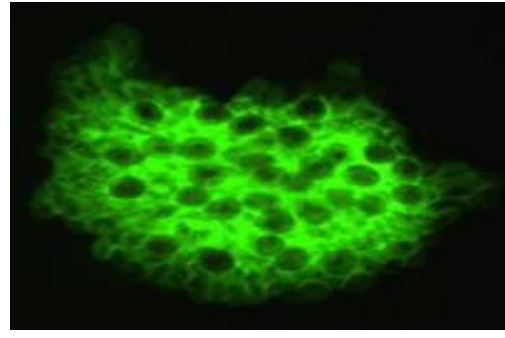
A



C



B



D

Şekil-1: *P. jirovecii* tanısında kullanılan boyama yöntemleri. **A:** Metenamin Gümüş (<http://dailyparasite.blogspot.com/2010/04/april-9-pneumocystis-jirovecii.html>). **B:** Toluidin Mavisi (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Pneumocystis.htm>) **C:** Wright-Giemsa (<http://pathology.class.kmu.edu.tw/ch05/Slide44.htm>) **D:** İmmünfloresans (IF) (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Pneumocystis.htm>)

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 (28). Serum örneklerinin PCR ile incelenmesi yararlı bulunmamıştır (2).

Akciğer parankim harabiyetini gösteren laktik dehidrogenaz (LDH) düzeyindeki artış PCP için özgül değildir; altta yatan akciğer enflamasyonunun ve hasarının bir göstergesidir; ancak başarılı bir tedavinin ardından bu artış normale döner (1, 35). Plazma S-adenozilmetionin seviyelerinde azalmanın da PCP tanısı için özgün bir test olabileceği bildirilmiştir (1, 2).

MSG antijeninin rekombinant olarak üretilmiş msgC parçasının serolojik testlerde kullanılarak PCP tanısında seroepidemiolojik çalışmalarda ve kronik akciğer hastalıklarında PCP'de *Pneumocystis jirovecii*'nin rolünün araştırılmasında faydalı olabileceği belirtilmiştir (16, 36).

Tedavi

PCP tedavisinde tercih edilecek ilk ilaç trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX)'dür (37). Hafif orta şiddetli PCP olgularında ayaktan oral TMP-SMX oldukça etkilidir (37).

Pneumocystis jirovecii'de sulfametoksazol veya dapsona karşı direnç gelişmesiyle ilişkili dihidropteroat sentetaz (DHPS) gen mutasyonları saptanmış olmakla birlikte, bunların klinik sonuca etkileri henüz tam açıklık kazanmamıştır (28, 37, 38).

PCP orta veya ciddi şekilde seyreden hastalara, en erken sürede (PCP tedavisinin ilk 72 saati içinde) kortikosteroidler verilmelidir (37). Önerilen prednizon dozu 1-5. günlerde günde iki kez 40 mg oral, 6-10. günlerde günde bir kez 40 mg ve 11-21. günlerde günde bir kez 20 mg şeklindedir (37).

Etkinliğinin sınırlı olması ve sıkça nökslerin gözlenmesi nedeniyle PCP tedavisinde pentamidinin aerosol şeklinde kullanılması önerilmemektedir. Tüm tedavi seçeneklerinde PCP için önerilen tedavi süresi 21 gündür (Tablo-1).

AIDS'li hastalarda TMP-SMX'e bağlı istenmeyen etkilerin oranları yüksektir. Sık gözlenen yan etkiler deri döküntüleri (Stevens-Johnson sendromu dahil) (%30-55), ateş (%30-40) ve lökopenidir (%30-40) (37).

Tablo-1: *Pneumocytis* pnömonisinin tedavisi.

İlk Seçilecek Tedavi	Alternatif Tedavi
<p>Akut PCP Tedavisi</p> <ul style="list-style-type: none">• TMP-SMX [15-20mg TMP ve 75-100mg SMX] kg/gün; IV olarak 3 veya 4 doza bölünerek• Aynı TMP-SMX dozu oral olarak günde 3 doza bölünerek• Dapson 100mg/gün oral+TMP 15mg/kg/gün oral 3 doza bölünerek veya• TMP-SMX forte 3x2 tablet	<p>Ciddi Seyirli PCP Tedavisi</p> <ul style="list-style-type: none">• Pentamidin , 4mg/kg/gün, IV, toksisite nedeniyle bazı uzmanlarca 3mg/kg/gün IV önerilir. <p>Hafif-Orta Seyirli PCP Tedavisi</p> <ul style="list-style-type: none">• Primakin 15-30mg/gün oral+ Klindamisin 600-900mg IV günde 3 veya 4 defa veya Klindamisin 300-450mg oral günde 3 veya 4 defa; veya• Atovaquone 750mg oral BID gıda ile; veya• Trimetrexate 45mg/m² veya 1.2mgkg/gün IV + leucovorin 20mg/m² veya 0.5mg/kg IV oral günde 4 defa (leucovorin Trimetrexate 'ın son dozundan sonra 3 gün devam edilmelidir); dapson SMX veya sulfadiazin eklenmesi etkinliği arttırabilir.

Profilaksi

HIV ile enfekte hastalar PCP gelişimi yönünden en fazla risk altında olanlardır. Bu hastaları HIV negatif olup başka nedenlerle bağışıklığı baskılanmış ve risk altında bulunan hastalar izler. Her iki grupta da profilaksi önerilmektedir (28).

HIV ile enfekte erişkinlerde (hamile kadınlar dahil) ve Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) tedavisi altındaki hastalarda CD4 sayısı 200 hücre/ μ L'nin altına düştüğünde veya bir orofarengeal kandidoz öyküsü varsa primer profilaksi uygulanmalıdır (2). Profilakside ilk tercih edilecek ilaç TMP-SMX'dir. Geçmişte PCP öyküsü olan HIV ile enfekte hastalarda bağışıklık sistemi antiretroviral tedavinin bir sonucu olarak düzelmedikçe ömür boyu TMP-SMX kullanılarak sekonder profilaksi uygulanmalıdır (37). HAART tedavisi altındaki hastalarda CD4 sayıları en az 3 ay süreyle 200 hücre/ μ L'nin üzerinde bulunduğu sürece PCP gelişim riski önemli oranda azaldığından primer ve sekonder profilaksi durdurulabilir (26, 37). Tablo-2'de PCP profilaksisinde kullanılan ilaçlar ve dozları görülmektedir.

HIV negatif hastalarda *Pneumocystis* profilaksisi

- PCP kurumsal insidansı %5 olan yerlerdeki solid organ ve allojenik kemik iliği transplantlı hastalara,
- Yüksek riskli solid organ ve kemik iliği transplantlı hastalara (PCP ve sık fırsatçı enfeksiyon öyküsü olanlar, CMV enfeksiyonlu ve CMV açısından yüksek risk altındakiler, akut allograft rejeksiyonu veya GVHD nedeniyle yoğun bağışıklık baskılanması süresince, anti-T hücre tedavisi alan hastalar),
- Lösemi ya da lenfoma nedeniyle olog kemik iliği transplantlı hastalara,

- Uzamış nütropenisi olan bireylere, iki-üç hafta süreyle günlük 20 mg prednizon kullanan hastalara verilmelidir (27).

Tablo-2: *Pnömosistis* pnömonisinin profilaksisi

İlaç	Doz
TMP-SMX	1 normal ya da forte tablet/gün 3 kez forte tablet/hafta
Dapson	2x50mg/gün po veya 1x100mg/gün po
Dapson + Primetamin+ Leucovorin	50mg/gün po 50mg/hafta po 25mg/hafta po
Dapson + Primetamin+ Leucovorin	200mg/hafta po 75mg/hafta po 25mg/hafta po
Pentamidin	300mg/ay aerosol
Atovaquone	1500mg/gün po

Aşılamayla PCP'den korunmaya yönelik çalışmalarda sürmektedir.

PCP'den korunmada son yaklaşım temasın önlenmesidir. Hastalığın kişiden kişiye bulaştığı yönündeki yaklaşım giderek önem kazanmaktadır. Ancak klavuzlarda PCP'li hastaların izolasyonu önerilmemektedir (1).

Çalışmanın Amacı

P. jirovecii PCP'nin nedenidir ve immünsuprese hastalarda sık ve ciddi bir fırsatçı enfeksiyon etkenidir (39,40). Yapılan serolojik çalışmalar etkene karşı çok sayıda çocukta yaşamın erken döneminde spesifik antikor oluştuğunu göstermiştir (41-43). Hastalığın ortaya çıkması çocukluk

döneminde alınmış olan etkenin immünsuprese bireylerde reaktivasyon göstermesi ile olduğunu düşündürmektedir. Bununla beraber yapılan insan ve hayvan çalışmaları etkenin enfeksiyondan sonra sıklıkla vücuttan elimine edildiği yönündedir (44,45). Sınırlı sayıda organizmanın ise latentliği sözkonusudur. *P. jirovecii* onkoloji hastalarında ya da solid organ nakli yapılanlarda kişiden kişiye aktarılabilir ve önemli bir hastalık olarak ortaya çıkabilmektedir (46, 47). Aynı zamanda PCP'li hastaların odalarındaki havayla teması olan ya da PCP'li hastalarla temastan sonra sağlıklı bireylerin üst hava yollarında PCP DNA'sı tesbit edilmiştir (48-52). *P. jirovecii* immünsuprese bireylerde PCP olmaksızın da tesbit edilmiş bu taşıyıcılık ya da kolonizasyon olarak yorumlanmıştır (53).

PCP'li hastalar, immünsuprese taşıyıcılar ya da geçiçi olarak immünkompetan kolonize kişiler enfeksiyonun kaynağını oluşturmaktadır (54).

P. jirovecii normalde sağlıklı insanlarda kolonize olabilen bir etken olabilmekle birlikte; özellikle primer hastalığı ya da uygulanan tedavi nedeniyle immünsuprese hastalarda ciddi seyirli bir pnömoni etkeni olarak ta ortaya çıkmaktadır. Hastalığın tanısında kullanılacak özgül klinik, laboratuvar ve radyolojik bulguların olmaması hastalığın tanısının konulup etkin tedavinin başlanmasını geciktirmesi açısından önemlidir. Bu durum bu hasta grubunda yer alan hastaların tanılarının konulmasının gecikmesinden kaynaklanacak mortalite ve morbitidenin önemli bir nedenidir.

Yapılan bu çalışma ile;

1-BAL ve BL yapılan hastalardaki kolonizasyon; klinik ve laboratuvar bulguları uyumlu ise pnömoni tanısının konulması,

2- BAL ve BL örneklerinde *P. jirovecii* saptanan hastaların demografik bilgileri, altta yatan hastalıkları, olası risk faktörleri göz önünde bulundurularak bu unsurların hastalıkla ilişkisi

3-Hastalık semptom ve bulgularını taşımaksızın BAL ve BL örneklerinde *P. jirovecii* tesbit edilen hastaların yukarıda bahsedilen hasta bilgileri dikkate alınarak kolonizasyon gelişiminde etkili olabilecek unsurların belirlenmesi hedeflenmektedir.

Yine bu çalışmada hastalardan alınan BAL ve BL rneklarine 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.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından 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 Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarında incelenmesi ile yapıldı. (Bronkoalveolar Lavaj(BAL) yapılan hastalarda *P. jirovecii* kolonizasyonu ve *P. jirovecii* Pnömonisinin Tanısı adı altında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'na müracaat edilmiş 26 Mayıs 2009 tarih ve 2009-9/7 nolu kararı ile usul ve esas yönünden uygun görülmüştür.)

BAL ve BL örnekleri Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından yapılan bronkoskopi işlemi esnasında temin edildi.

- Bronkoskopi yapılacak hastalara işlemden 12 saat öncesinde premedikasyon yapıldı. %2'lik lidokain ile lokal anesteziyi takiben transoral yol kullanılarak bronşlara girildi ve bronkoskopi esnasında BL ve BAL örnekleri alındı. BL Fiberoptik bronkoskop (FOB)'un aspirasyon kanalından hava yollarına serum fizyolojik (SF) püskürtüp, negatif basınçla bu sıvıyı aspirasyon tüpüne geri emerek elde edildi. Her bir yıkama 15-20 ml SF ile yapıldı. BAL FOB 4 ve 5. dallanmaya kadar subsegment bronşunu tam tıkayana kadar (wedgleme) ilerletildi. FOB kanalından 20 ml porsiyonlar halinde steril, oda veya vücut ısısında %0.9'luk NaCl bronş içine verildi. Tüm bronkoalveolar lavajlar sırasında ortalama 100 ml sıvı uygulandı. Daha sonra verilen bu sıvı manuel olarak aspire edildi.

- Alınan BAL ve BL örneklerine May Grunwald/Giemsa, toluidin mavisi, metenamin gümüş (MS), direkt floresans antikor(IFA) boyamaları ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi uygulandı.

Örneklerin Hazırlanması

Hastalardan alınan BAL ve BL örnekleri zaman kaybedilmeden laboratuara ulaştırıldı. Bekletilmeksizin işleme alındı. Alınan 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

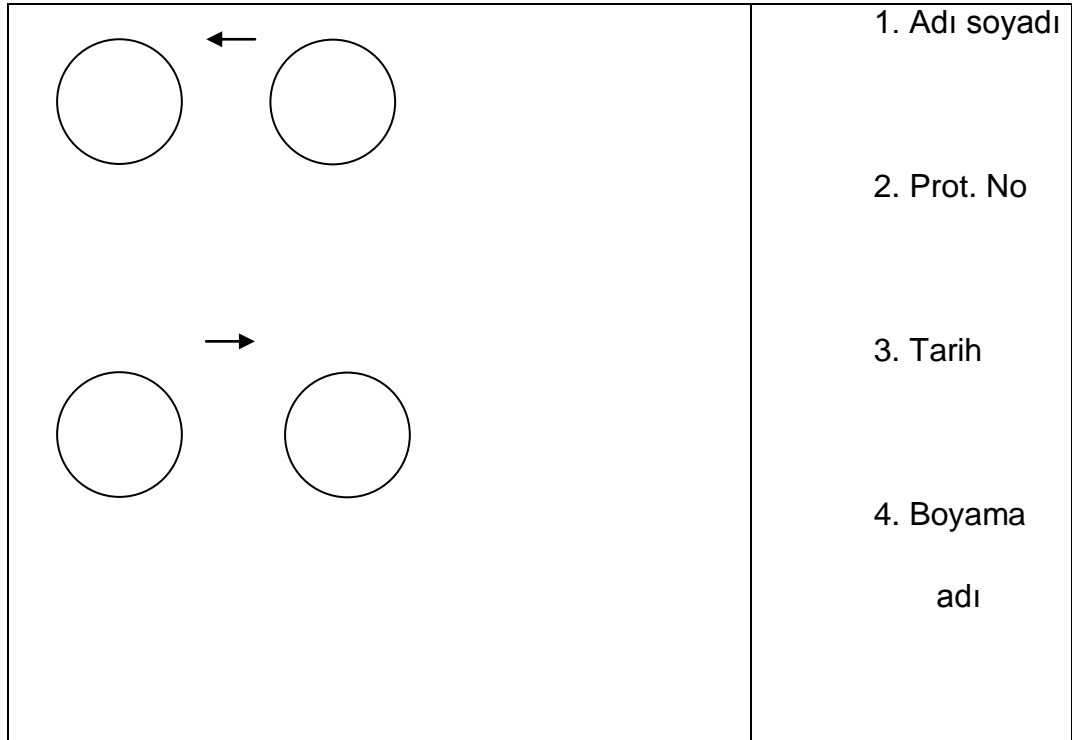
1ml 1 nolu Eppendorf tüpüne (Boyama Amaçlı)

1ml 2 nolu Eppendorf tüpüne (PCR İçin)

0.5ml 3 nolu Eppendorf tüpüne (MS için)

0.5ml 4 nolu Eppendorf tüpüne (IFA için) konuldu.

1 no'lu eppendorf tüpü daha sonra çalışılmak üzere -80°C derin dondurucuya kaldırıldı. İki nolu eppendorf tüpünün dip kısmından her bir lam için 20µl alarak lamın 1/3 dış kısmında 4 nokta azaltma yöntemi ile yayma preparatı hazırlandı (Şekil-2).



Şekil-2: Dört nokta azaltma yönteminin yapıldığı yayma preparat görüntüsü.

Modifiye toluidin mavisi boyama için 1 adet lam; May Grünwald-Giemsa boyama için 1 adet lam hazırlandı. Preparatları ısı bloğunda 50-55°C'de bekletildi. Preparatlar kurduğunda en kısa süre içinde boyama işlemine geçildi.

1- Modifiye Toluidin Mavisi Boyama

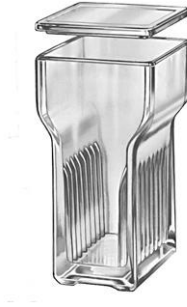
Modifiye Toluidin Mavisi boyamada kullanılan sarf malzemeleri:

(i) Sülfation reagent solüsyonunun hazırlanışı:

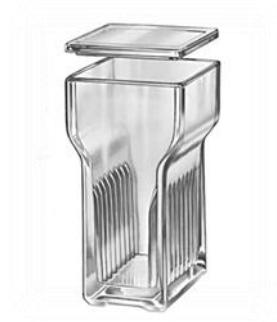
İçinde soğuk su bulunan (10°C'nin altında olmamalı) şale içerisine yerleştirilen falcon tüpü içerisine 30 ml glacial asetik asit konuldu. Daha sonra bu solüsyona cam pipet ile 10 ml sülfürik asit (%95-98) ilave edildi. Solüsyon cam baget ile hafifçe karıştırıldı. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 hafta muhafaza edilebilir.

(ii) Toluidin mavisi solüsyonunun hazırlanışı:

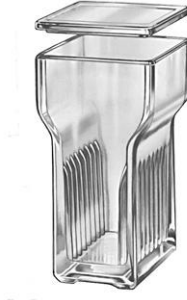
0.3 gr Toluidine blue, 60ml distile su, 2.0 ml Hidroklorik asit (%37) ve 140 ml Absolü (%100) etil alkol erlen içerisinde karıştırıldı. Oluşan karışım oda sıcaklığında 1 hafta muhafaza edilebilir.



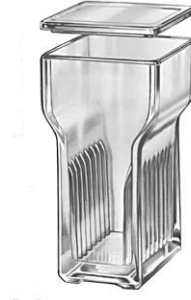
1 No'lu Jar
Sülfation reagent solüsyonunun



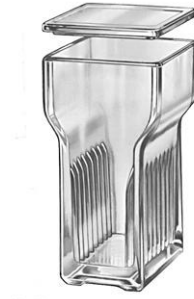
2 No'lu jar
Toluidin mavisı



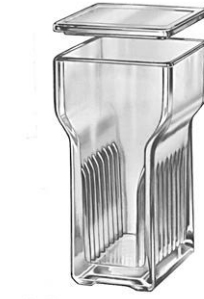
3 No'lu jar
Etil alkol (%95)



4 No'lu jar
Etil alkol(%100)



5 No'lu jar
Ksilen



6 No'lu jar
Ksilen

(iii) Modifiye Toluidin Mavisi Boyamasının Yapılışı

✓ Preparatlar sulfation reagent solüsyonu içine yerleştirildikten hemen sonra cam baget ile solüsyon karıştırıldı. Beş dakika sonra aynı işlem tekrar edildi. Toplam 10 dakika süre ile preparatlar sulfation reagent solüsyonu içinde bekletildi.

✓ Preparatlar içinde musluk suyu bulunan şale içine konuldu ve 5 dakika süre ile akar haldeki musluk suyu altında tutuldu. İşlem sonrası preparatta kalan fazla su pastör pipet yardımı ile alındı.

✓ Preparatlar 2 no'lu (toluidin mavisi solüsyonu) jar içinde 3 dakika bekletildi.

✓ Preparatlar 3 no'lu (%95 etil alkol) jar içerisine 10 saniye süre ile daldırılıp çıkarıldı.

✓ Preparatlar 4 no'lu (%100 etil alkol) jar içerisine 10 saniye süre ile daldırılıp çıkarıldı.

✓ Preparatlar sırası ile 5 ve 6 no'lu (Ksilen) jarlar içerisine 10 saniye süre ile daldırılıp çıkarıldı.

✓ Preparatın alt ve üst kısmı (boyalı örnek dışındaki alan) kağıt havlu ile kurulandı.

✓ Steril pastör pipet ile lamın üzerine az miktar "Entellan" konulup üzeri lamel ile kaplandı.

✓ Preparatlar 20x, 40x ve 100x objektiflerde incelendi.

2- May-Grünwald Giemsa Boyama

✓ Kurutulmuş olan preparat fiske edilmek için metanolde 2-3 dakika bekletildi, penset ile fazlası döküldü ve preparat kurumaya bırakıldı.

✓ May-Grünwald Giemsa solüsyonunda 5 dakika bekletildi.

✓ Distile su ile yıkandı.

✓ 1/20 Giemsa (dilüsyon distile su ile yapıldı) solüsyonunda 15 dakika bekletildi.

✓ Şiddetli akmayan musluk suyu altında preparat yıkandı.

✓ Preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve immersiyon objektifinde (x100) incelendi.

3-Metenamin Gümüş Boyama

Test **SILVER METHENAMINE P.A.S.M.04-043822/L** kiti ile üretici firma olan **Bio Optica Milano s.p.a.** talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

✓ Santrifüj sonrası pelletten 20 µl alarak preparat hazırlandı. Oda sıcaklığında kurutuldu (kapaklı kutu içinde).

✓ Metanolde fikse 2-3 dk bekletip penset ile fazlası döküldü ve tamamen kuruması için beklendi.

✓ Daha sonra kitin içindeki stant (cam petri ve aparatı-inkubasyon kutusu) üzerine düz bir şekilde yerleştirip preparat üzerine 5 damla reagent A eklendi.

✓ 30 dakika sonunda preparat distile su bulunan dik şale içerisine daldırıp çıkarmak suretiyle yıkandı.

✓ Reagent b,c ve d solusyonları 5'er damla kit içindeki plastik ependorf içine eklenip 2-3 saniye vortekslenerek karıştırıldı.

✓ Bütün karışım preparata eklendi ve 60°C'de 30-40 dakika kapalı inkubasyon kutusu içinde bekletildi. Bu aşamada süre 1 saate kadar uzayabildi. Preparatta kahverengi-siyah renk değişiminin gözlenmesi sürenin uygun olduğunun göstergesidir.

✓ Süre sonunda ısı kaybı olsun diye 5 dakika beklendi.

✓ Distile suda aynı şekilde yıkamadan sonra diğer reagentler prospektüs sırasıyla (reagent e ve f 1 dakika preparata uygulandı ve her bir uygulamadan sonra preparat distile su ile yıkandı) uygulandı.

✓ En sondaki alkol ve ksilende temizleme basamakları şale kullanılarak yapıldı.

Reagents

A - Periodic acid solution 1000 ml

B - Silver nitrate solution 1000 ml

C - Hexamethylentetramine solution 1000 ml

D - Sodium tetraborate solution 1000 ml

E - Gold chloride solution 1000 ml

F - Fixing solution 1000

4- İmmün Floresans Antikor Testi (Pneumocel Direct IF Test Ticari Kit)

- ✓ Santrifüj işlemi sonrası pelletin üstünden 0.5 ml alınarak ayrı bir eppendorf tüpüne konuldu, üzerine 0.3 ml PBS ilave edilerek resüspansiyon işlemi gerçekleştirildi.
- ✓ Resüspanse karışımın pelletinden 25 µl alarak lam üzerindeki 0.8 cm çaplı kuyucuğa konuldu.
- ✓ Kapaklı kutu içerisinde olacak şekilde oda sıcaklığında preparat kurutuldu.
- ✓ Aseton ile 5 dakika fiske edildi.
- ✓ Fikse edilmiş test preparatının ve kontrol slide'ının üzerini kaplayacak şekilde 25 µl monoklonal reagent **(RP2)** konuldu.
- ✓ Lamlar 37°C'de nemli ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. Lamların kurumamasına dikkat edildi.
- ✓ Lamlar PBS solüsyonu bulunan şale içinde kısa süreli (1-2 saniye) tutuldu.
- ✓ Örneğin üzerine 25 µl anti-mouse Ig FITC reagent **(RM)** konuldu.
- ✓ Lamlar 37°C'de nemli ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- ✓ Lamlar PBS solüsyonu bulunan şale içinde kısa süreli (1-2 saniye) tutuldu.
- ✓ Lam kuyucuğunun üzerine 1 damla **RMF** konuldu ve kabarcık oluşumunu önlemek için üzeri lamel ile kapatıldı.
- ✓ Preparat x40'da floresan mikroskopunda incelenip x100'de de konfirme edildi.

5- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Hastalardan alınan BAL ve BL örnekleri zaman kaybedilmeden laboratuara ulaştırıldı. Bekletilmeksizin işleme alındı. Alınan 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 *Pneumocytis* DNA ekstraksiyon işlemi için eppendorf

tüpünün sedimentinden bir eppendorf tüpüne alındı. Alınan materyaller daha sonra çalışılmak üzere -80°C derin dondurucuya kaldırıldı. Elde edilen örnekler çalışılacağı zaman dondurucudan çıkarıldı ve DNA izolasyon kiti (Dr Zeydanlı DNA İzolasyon Kiti) kullanılarak DNA izole edildi. Kullanılan primerler ile *P. jirovecii* DNA'sının mitokondrial 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'- GATGGCTGTTTCC AAGCCCA- 3')

pAZ102- L2 (5'-ATAAGGTAGATAGTCGAAAG-3')

Nested PCR ürünü **120bp**

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

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

İki aşamalı PCR Thermal Cyclers parametreleri:

94°C	5 dakika	} 40 siklus
94°C	30 saniye	
56°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	7 dakika	şeklinde gerçekleştirildi.

Bantları görüntülemek için PCR ürünleri ethidium bromid içeren %1.5'lük 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.

Çevredeki amplikonlardan dolayı kontaminasyondan kaçınmak için, ekstraksiyon, reagent preparasyonu ve amplifikasyon işlemleri farklı mikropipet setleri ve bariyerli uçların kullanıldığı ayrı odalarda gerçekleştirildi. PCR karışım hazırlama ve ekstraksiyon işlemleri laminar akımlı kabinde gerçekleştirildi.

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 kabul edildi. IFA ve PCR sonuçlarının uyumlulukları McNemar testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Olgu Grubu

Çalışmamızda Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından klinik ya da poliklinik ortamında takip edilen ve tanı amaçlı bronkoskopi yapılan toplam 100 hastaya ait BAL ve BL örnekleri değerlendirildi. Bronkoskopi yapılan 47 hastadan BAL, 53 hastadan BL örnekleri alındı. 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.

100 hastanın 21'de *P. jirovecii* pozitifliği 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.

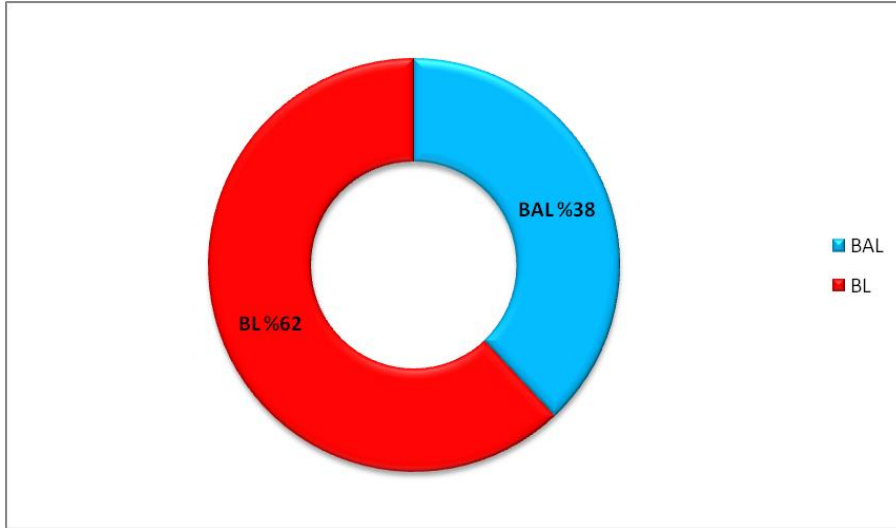
BAL ve BL örneklerinde metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi, Wright-Giemsa boyamaları ile etken saptanmadı. İmmün floresans antikor (IFA) testi ile 13 hastada *P. jirovecii*'nin kistleri saptandı. Nested PCR ile 16 hastada *P. jirovecii*'nin DNA'sı saptandı. Hem PCR hem IFA testi ile *P. jirovecii* saptanan toplam 8 hasta mevcuttu

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 ile 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 (Tablo-3) .

Tablo-3: PCR yönteminin IFA ile karşılaştırılması.

		IFA		Toplam
		+	-	
PCR	+	8	8	16
	-	5	79	84
Toplam		13	87	100

Pozitiflik saptanan hasta örneklerinin 8'i BAL ve 13'ü BL idi (Şekil-3).



Şekil-3: Pozitiflik saptanan hasta grubunun BAL/BL dağılımı.

Ek hastalığı olan 11 (%52.3) hasta mevcut olup; 6 (%28.5) hastada birden fazla hastalık mevcuttu. Ek hastalıklar incelendiğinde 2 hastada malignite (AC Ca ve primeri belli olmayan metastatik AC Ca), 8 hastada HT, 2 hastada DM, 4 hastada KOAH, 1 hastada SVO, 3 hastada KKY mevcuttu. Pozitiflik saptanan 6 hastada son 3 ay içinde immünsupresif tedavi alım öyküsü vardı (Tablo-4)

Tablo-4: Pozitiflik saptanan hastaların ek hastalık ve immüsupresif tedavi durumları.

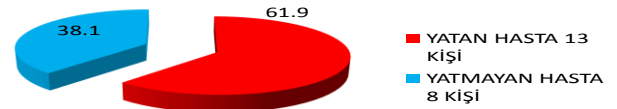
HASTA	YAŞ	CİNSİYET	SOLİD TM	İMMÜNSUPRESİF TEDAVİ	EK HASTALIK
1	57	E	YOK	METİL PREDNİZOLON 96 mg/gün 12 GÜN	YOK
2	56	E	YOK	FLANTADİN 3 mg PO 2 AY, DEĞİŞİK DOZLARDA 10 YILDIR KULLANIYOR	YOK
3	55	E	YOK	YOK	YOK
4	47	K	YOK	YOK	HT, KOAH
5	72	K	YOK	YOK	HT, KOAH, KKY
6	74	E	YOK	YOK	HT
7	57	E	PRİMERİ BELLİ OLMAYAN MET CA	ZOLANDRONİK ASİT 1X1 2 KÜR	YOK
8	31	E	YOK	YOK	YOK
9	57	K	YOK	PREDNİZOLON 60 mg/gün 7GÜN, PREDNİZOLON 20 mg/gün 3 GÜN, METİL PREDNİZOLON 500 mg/gün 2 GÜN, ENDOXAN 2X1 4 GÜN, 1X1 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	METİL PREDNİZOLON 64 mg/gün	YOK

Pozitiflik saptanan 21 hastanın 13'ünde son 3 ay içinde hastanede yatış öyküsü mevcuttu (Tablo-5).

Tablo-5: Pozitiflik saptanan hastaların hastanede yatış süreleri.

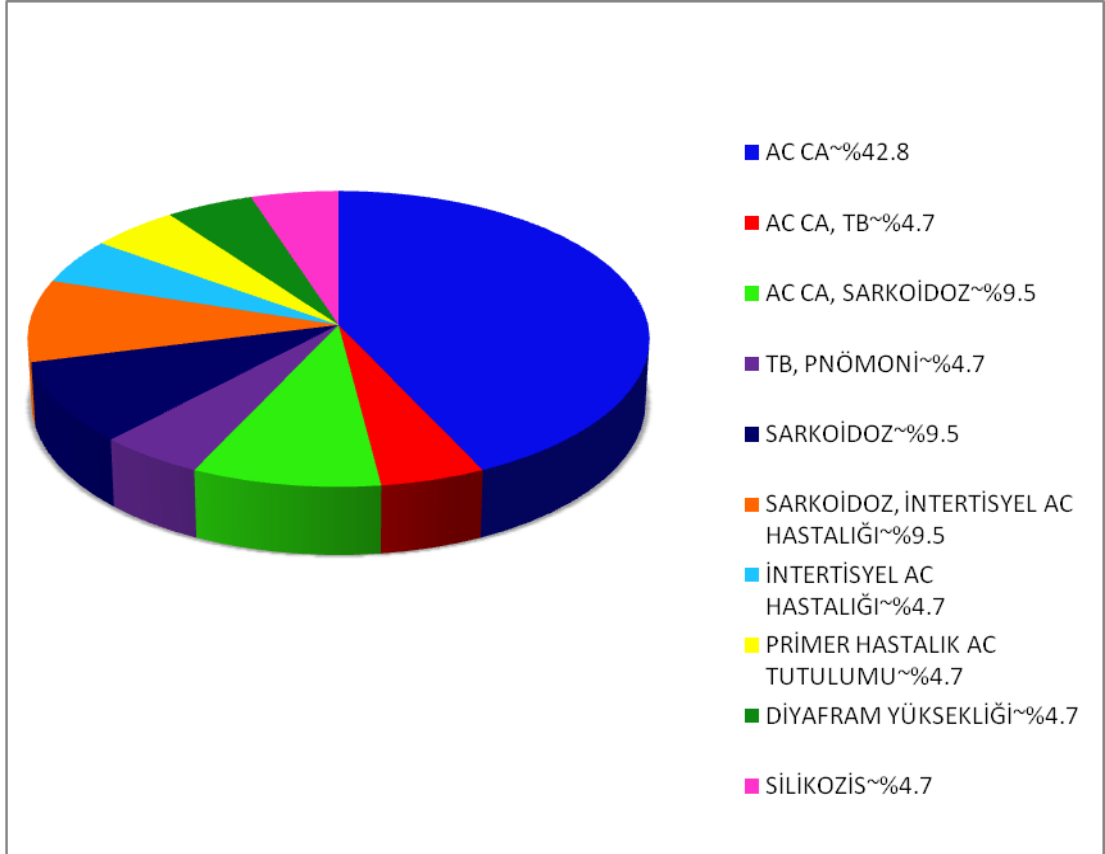
HASTA	YATIŞ SÜRESİ
1	14 GÜN
2	7 GÜN
3	5 GÜN
4	2 GÜN
5	21 GÜN
6	14 GÜN
7	4 GÜN
8	6 GÜN
9	2 GÜN
10	11 GÜN
11	18 GÜN
12	2 GÜN
13	14 GÜN



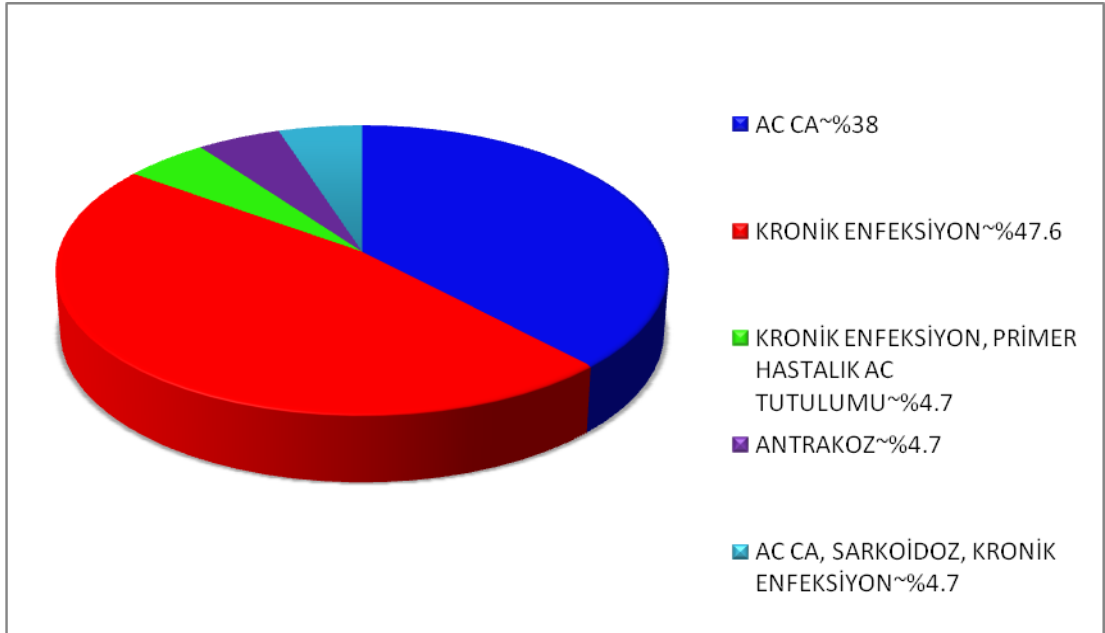
Pozitiflik saptanan hasta grubunda bronkoskopi; AC Ca, tuberküloz, sarkoidoz, kronik enfeksiyon, interstisyel akciğer hastalığı, primer hastalığın akciğer tutulumu, lenfoma, eozinofilik alveolit, pnömoni, diyafram yüksekliği, akciğer absesi, silikozis ve pnömokonyoz endikasyonları ile yapıldı. Bronkoskopi sonucunda ise AC Ca, tuberküloz, sarkoidoz, kronik enfeksiyon, primer hastalığın akciğer tutulumu, antrakoz, lenfoma, eozinofilik alveolit tanılarına ulaşıldı (Tablo-6). Bronkoskopi yapılan hastaların bronkoskopi endikasyonları ve bunların toplamdaki payları Şekil-4'de; bronkoskopi sonucu ve toplamdaki payları Şekil-5'de gösterilmiştir.

Tablo-6: Pozitiflik saptanan hastaların bronkoskopi endikasyonları ve bronkoskopi sonuçları.

HASTA	BRONKOSKOPI NEDENİ	BRONKOSKOPI SONUCU	HASTA	BRONKOSKOPI NEDENİ	BRONKOSKOPI SONUCU
1	AC CA, TB	KRONİK ENFEKSİYON	12	SİLİKOZİS	KRONİK ENFEKSİYON
2	AC CA	AC CA	13	PRİMER HASTALIĞIN AC TUTULUMU	PRİMER HASTALIĞIN AC TUTULUMU, KRONİK ENFEKSİYON
3	TB, PNÖMONİ	KRONİK ENFEKSİYON	14	AC CA	ANTRAKOZ
4	DİYAFRAM YÜKSEKLİĞİ	AC CA	15	AC CA	KRONİK ENFEKSİYON
5	SARKOİDOZ	KRONİK ENFEKSİYON	16	SARKOİDOZ, İNTERSTİSYEL AC HASTALIĞI	KRONİK ENFEKSİYON
6	ACCA, SARKOİDOZ	KRONİK ENFEKSİYON	17	SARKOİDOZ, İNTERSTİSYEL AC HASTALIĞI	KRONİK ENFEKSİYON
7	AC CA	AC CA	18	SARKOİDOZ	KRONİK ENFEKSİYON
8	AC CA, SARKOİDOZ	SARKOİDOZ, KRONİK ENFEKSİYON, AC CA	19	AC CA	AC CA
9	AC CA	AC CA	20	AC CA	AC CA
10	İNTERSTİSYEL AC HASTALIĞI	KRONİK ENFEKSİYON	21	AC CA	AC CA
11	AC CA	AC CA			



Şekil-4: Hastalarda bronkoskopi endikasyonları.



Şekil-5: Hastalarda bronkoskopi sonuçları.

Pozitiflik saptanan hasta grubundaki hastaların klinik bulguları incelendiğinde öksürük, balgam, dispne, hemoptizi, göğüs ağrısı, ateş yüksekliği ve gece terlemesi olduğu görüldü. Olgu grubundaki 2 hastada ise hiçbir klinik bulgu yoktu (Tablo-7).

Tablo-7:Pozitiflik saptanan hastalarda saptanan klinik bulgular.

KLİNİK BULGU	HASTA SAYISI	GÖRÜLME ORANI
ÖKSÜRÜK	2	%9.5
ÖKSÜRÜK, DİSPNE	2	%9.5
ÖKSÜRÜK, GÖĞÜS AĞRISI	1	%4.7
DİSPNE	4	%19
DİSPNE, GÖĞÜS AĞRISI	1	%4.7
GÖĞÜS AĞRISI	1	%4.7
ÖKSÜRÜK,BALGAM, DİSPNE	5	%23.8
ÖKSÜRÜK, BALGAM, DİSPNE, GÖĞÜS AĞRISI, HEMOPTİZİ	1	%4.7
ÖKSÜRÜK, BALGAM, ATEŞ	1	%4.7
ÖKSÜRÜK, DİSPNE, HEMOPTİZİ	1	%4.7

Pozitiflik saptanan hastaların klinik ve radyolojik bulguları Tablo-8’de görülmektedir.

Tablo-8: Pozitiflik saptanan hastalarda klinik ve radyolojik bulgular.

HASTA	ŞİKAYET	RADYOLOJİ
1	Yok	Her iki akciğer üst lob apikal segmentlerde lineer sekel fibrotic değişiklikleri düşündürür yoğunluk artımları ve traksiyon bronşektazileri izlenmektedir. Sol akciğer üst lobda sekel değişiklikler çevresinde yer yer tree in-budd görünümleri ve nodüler buzlu camlar izlenmektedir. Solda majör fissür superiora doğru yer değiştirmiştir. Görünümler öncelikle aktif Tbc.enfeksiyonu açısından anlamlı bulunmuştur. Sağ apeksde büyüğü 9x6 cm boyutlarında bül formasyonları izlenmektedir.
2	Dispne	Sağ akciğer üst lob bronşu çevresinde,üst lob bronşunu çepe çevre saran ve daraltan yaklaşık 2x1.5 cm boyutlarında yumuşak doku yoğunluğunda görünüm izlenmektedir.Bu düzeyde sağ akciğer üst lobda belirgin volüm kaybı ve üst lob anteriorda tanımlanan kitleye komşu alanda paramediastinal bölgede yaygın bronşektaziler ve sekel fibroatelektazik değişiklikler dikkati çekmiştir.
3	Öksürük, Balgam, Dispne	Her iki AC üst zonlarda tb sekeli fibrozis, sağ AC üst lob post segmentte 3 cm boytunda ince cidarlı düzensiz sınırlı kavite mevcuttur. Her ik AC de bronkovasküler intertisiyum kalınlaşmış olup bulgular interstisyel AC hastalığını temsil edebilir. Ancak KOAH ve senilite zemininde süre gelen parankim destrüksüyonu da ayırıcı tanıda düşünölmelidir.
4	Dispne	Sol hemidiyafragma elave görünömdedir.Ancak diyafragma intakttır. İntraabdominal yapılar sol hemitoraks alt kesiminde izlenmekle birlikte diyafragma hernisini düşöndürür görünüm saptanmamıştır.Görünömler diyafragma eventrasyonu ile uyumludur. Sol akciğer alt lobda lineer sekel atelektazi ile uyumlu yoğunluk artımları mevcuttur.Sağ akciğer üst lob anterior segmentde bir adet milimetrik boyutlu kalsifik granöloom mevcuttur.

5	Öksürük, Balgam, Dispne	Subkarinal bölgede özafagus sağ kesiminde yaklaşık 29x16 mm boyutta yumuşak doku dansitesi vardır. Ayrıca mediastinumda kısa aksı yaklaşık 1 cm'den küçük birkaç adet daha lenf nodu görülmektedir. Her iki hilusta izlenen milimetrik hipodens görünümler küçük lenf nodu lehine değerlendirilmiştir. Ayırıcı tanıda sarkoidoz, tb, castleman hastalığı daha az olasılıkla lenfoma gibi patolojiler bulunmaktadır. Her iki AC orta zonda laterallerde subplevral milimetrik dansiteler plevrada sekel kalınlaşma AC'de sekel fibrotik değişiklikler olabilir. Sol AC alt zonda minimal lineer dansite sekel fibrotik değişiklik lehine yorumlanmıştır.
6	Dispne	Sağda plevral efüzyon mediastinal lenfadenopatiler. Her iki hilusta lap? Ac'lerde nodüller ile buzlu cam formunda dansite artışları olup görünüm non-spesifiktir. (Sarkoidoz? Malignite?)
7	Göğüs ağrısı	Sol akciğer üst lob apiko-posterior segmentte sol hilusa uzanan 6*5cm boyutunda bir kitle izlenmiştir.
8	Dispne, Göğüs ağrısı	Sağ hiler 9x10 mm boyutlarında LAP AC de buzlu cam görünümü izlenmektedir. Sağ AC bazalinde minimal infiltratif görünüm mevcuttur.
9	Yok	Trakea bifurkasyon düzeyinde sağ ana bronş post yerleşimli sağ prevertebral alanda bir miktar uzanım gösteren 2x2 cm boyutunda yumuşak doku dansitesinde kitle lezyonu izlenmiştir. Sağ ana bronшта parsiyel üst lob bronşlarında belirgin daralmaya neden olan 2.5x2 cm boyutlarında komşu AC parankimi içerisinde düzensiz sınırlı uzanım gösteren kitle lezyonu mevcuttur. Görünüm santral sağ hiler yerleşimli kitle lezyonu ve eşlik eden lenf nodu lehine yorumlanmış. Her iki AC üst loblarda daha belirgin amfizematöz değişikliklere bağlı dansite azalması mevcut. Sağ paratrakeal retrokaval alanda en büyüğünün uzun aksı 12 mm olan lenf nodları mevcuttur.
10	Öksürük, Balgam, Ateş	Her iki AC aerasyon artışı mevcuttur. Sol AC üst lob post segment lokalizasyonundan başlayarak sol parakardiyal alan boyunca ve her iki AC alt lob düzeyinde peribronşial kalınlaşmanın eşlik ettiği iç yapılarında yer yer hava bronkogramı bulunduran yama tarzında konsolide parankimal değişikliklerin varlığı izlenmektedir.

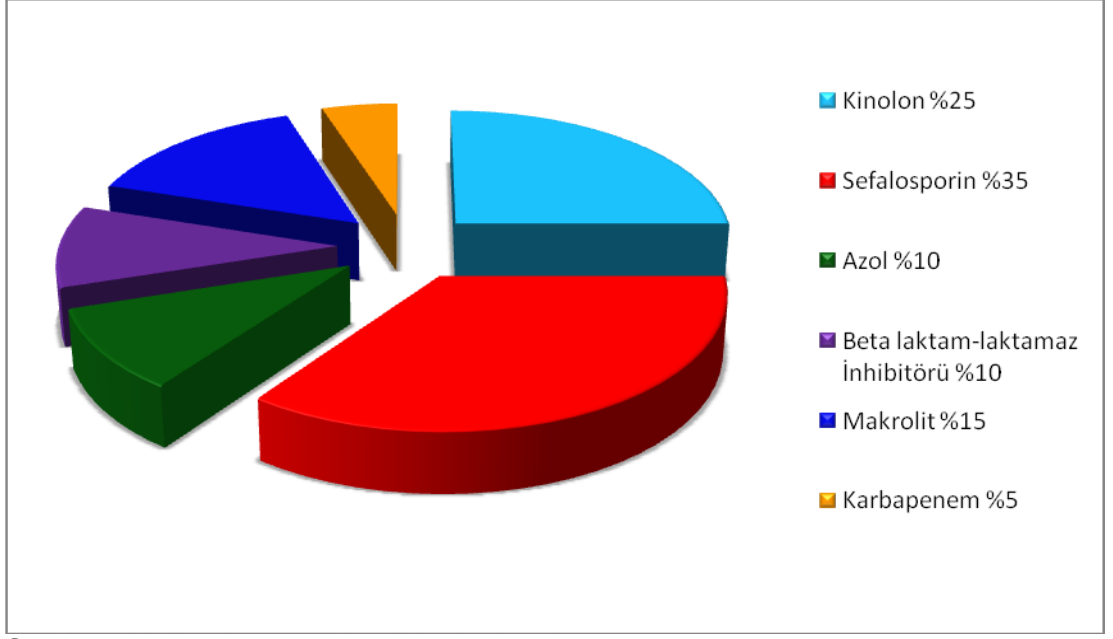
11	Öksürük, Göğüs ağrısı	Her iki AC üst lob amfizematöz alanlar ve subplevral bül formasyonları izlenmektedir. Sağ AC hiler infrahiler düzeyinde alt lob bronşu post. yaklaşık 20 mm çapa ulaşan sınırları net olarak seçilemeyen düzensiz konturlu yumuşak doku lezyonu izlenmektedir. Santral endobronşial kitle?
12	Öksürük, Balgam, Dispne	Her iki AC de yaygın milimetrik parankimal nodüller mevcuttur. Silikozis? Sağ AC üst lob apeksinde ve sol AC üst lob apikopost. segmentte minimal fibrotik değişiklikler izlenmektedir.
13	Öksürük,	Her iki akciğerde yaygın buzlu cam dansiteleri izlenmiştir. Sol akciğer alt lob antero-mediobazal segmentte korunmuş bir alan mevcuttur. Bulgular yaygın alveoler hemoraji(diffüz alveoler hasar?) açısından anlamlı olabilir. Her iki akciğerde paraseptal amfizem görünümleri izlenmiştir. Mediasten düzeyinden geçen kesitlerde mediastende prevasküler alanda, anterior karinal alanda kısa aksı 1cm'den küçük birkaç adet lenf nodu izlenmiştir.
14	Dispne	Sol akciğer üst lob bronşunda daralma mevcuttur ve periferde atelektazi görünümü izlenmiştir. Görünüm sekel bir değişikliğe bağlı olabilir. Sağ akciğer üst lob anterior segmentte periferik yerleşimli milimetrik boyutlu non-spesifik bir nodül izlenmiştir. Mediasten düzeyinden geçen kesitlerde mediastende pretrakeal alanda, aorta pulmoner pencerede,anterior karinal alanda ve en büyüğü subkarinal alanda 1,5cm ölçülen lenf nodları izlenmiştir.
15	Öksürük, Hemoptizi, Dispne	Sağ alt hiler bölgede malignite kuşkusu uyandıran nodüler formda kalınlaşmalar ile kostal plevral yüze ulaşan infiltrasyon dansiteleri izlenmektedir. Sağ apikalde 15mm alt lop superior segmentte 10 mm ölçülen iki adet sol AC alt lob superior ve bazal segmentlerde en büyüğü 15 mm ölçülen 4 adet nodül eşlik etmektedir. Sağ paratrakealde en büyüğünün kısa aksı 15 mm ölçülen birkaç adet lap görülmektedir.

17	Öksürük, Dispne	Her iki AC üst loblarda baskın olmak üzere her iki üst lobda ve alt lob superior segmentlerde interlobüler septalarda belirginleşme ve milimetrik interstisyel tipte nodüler yoğunluk artımları izlenmiştir. Mediastende retrokaval alan, orta pulmoner pencere ve subkarinal düzeyden büyüğü 28 mm , sağda belirgin perihiler büyüğü 20 mm LAP saptanmıştır.Eritema nodozum kliniği bulunan olguda interstisyel AC parankim bulguları ve mediastinal bilat. hiler LAP formasyonları sarkoidoz açısından anlamlıdır.
18	Öksürük, Balgam, Dispne	Mediasten düzeyinden geçen kesitlerde mediastende prevasküler alanda, pretrakeal alanda, subkarinal alanda, her iki hilusta solda daha belirgin olmak üzere ayrıca parankim penceresinde sol bronkopulmoner lokalizasyonda yer yer konglomere lenf nodu ile uyumlu olabilecek görünüm izlenmiştir. Mediastinal ve hiler lenf nodları olan olguda görünüm klinik bulgular ile desteklenirse sarkoidozun tutulumu açısından anlamlı olabilir.
19	Öksürük, Dispne	Sağ hilusta pulmoner arter düzeyinde kraniokaudal yaklaşık 3.5 cm devam eden hipodens lezyon mevcuttur
20	Öksürük	Sağ ana bronş açıktır. Sol ana bronş daralmıştır. Sol ana bronş orta alt zon lateral toraks iç duvarına komşu dansite artışı mevcuttur. Sol AC bazalinde plevral mayi izlenmektedir. Sağ AC apeksinde peribronşial perivasküler kalınlaşma ve interlobüler septalarda kalınlaşma ile paraseptal amfizamatöz görünümler dikkati çekmiştir. Ayrıca yer yer retiküler ve retikülonodüler görünümler saptanmıştır.
21	Öksürük, Balgam, Hemoptizi, Dispne, Göğüs ağrısı	Her iki AC amfizamatözdür. Sağ AC alt lob medial segmentte milimetrik boyutlarda parankimal nodül izlenmiştir. Sol AC alt lob atelektatik izlenmektedir. Santralde olası bir obstrüktif kitle açısından bronkoskopik inceleme uygun olacaktır.

Pozitiflik saptanan 10 hastada bronkoskopinin yapıldığı günden itibaren son 3 ay içinde takip edildikleri merkezler tarafından ampirik olarak başlanan antibiyotik kullanımı mevcuttu. Bu hastaların kullandığı antibiyotiklerin adları, kullanım süreleri ve dozları Tablo-9'da görülmektedir. Kullanılan antibiyotiklerin toplamdaki payları Şekil-6'de görülmektedir.

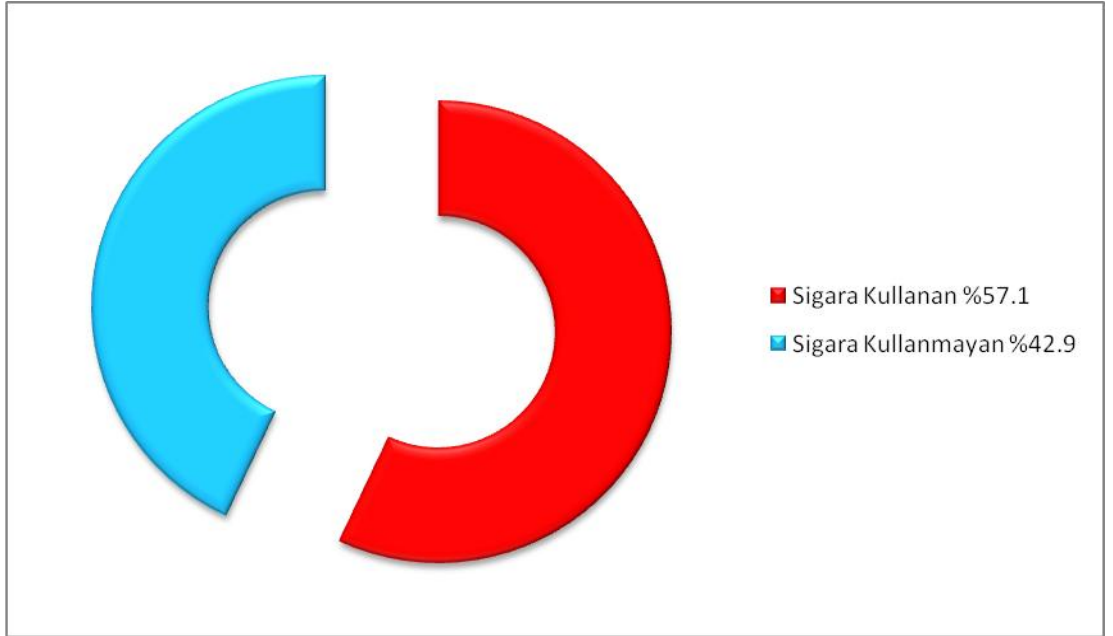
Tablo-9:Pozitiflik saptanan hastaların kullandığı antibiyotikler.

HA STA	KULLANDIĞI ANTİBİYOTİK VE KULLANIM SÜRESİ
1	Siprofloksasin 2X500mg po 5 gün, Seftriakson 2X1gr IM 4 gün
2	Sefepim 2x1 gr iv 7 gün, Flukonazol 2x100 mg po 4gün
3	Antibiyotik kullanımı mevcut ancak bilinmiyor.
4	Sefpodoksim 2x200mg po 7 gün 1, Ampisilin-Sulbaktam 2x750 mg po 7 gün, Azitromisin 1x250 mg po 7 gün
5	Sefamezin 4x1 IV 14 gün, Moksifloksasin 1x400 IV 14 gün
6	Levofloksasin 1x500 mg po 14 gün
7	Siprofloksasin 2X500 mg po 7 gün, Meropenem 2X1 gr IV 9 gün, Flukonazol 2X100 mg po 9 gün, Klaritromisin 2X500 mg po 5 gün, Seftriakson 2X1 gr IV 5 gün
8	Sefuroksim aksetil 2x500 mg 7 gün
9	Seftazidim 2x1 gr IV 2 gün, Klaritromisin 2x500 mg po 2 gün
10	Amoksisilin-Klavulanat 2X1 gr po 1 gün , Moksifloksasin 1x400 mg po 10 gün



Şekil-6: Kullanılan antibiyotiklerin dağılımı.

Pozitiflik saptanan hasta grubunda bulunan 12 hastada sigara kullanımı mevcuttu (Şekil-7).

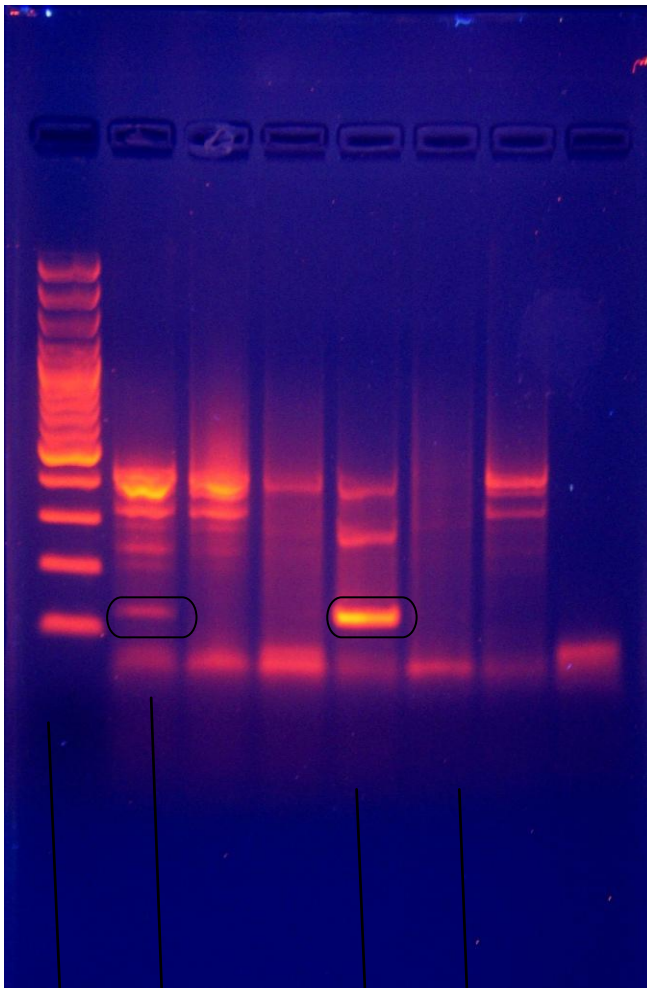


Şekil-7: Pozitiflik saptanan hasta grubunda sigara kullanım oranı

Boyama, IFA ve PCR Sonuçlar

Alınan BAL ve BL örneklerinde metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi, Wright-Giemsa boyamaları ile *P. jirovecii* saptanmadı. Nested PCR ile *P. jirovecii*'nin DNA'sı saptandı. Resim-8'te ekstrakte edilip sonrasında amplifiye edilmiş olan *P. jirovecii* DNA'sının jel elektroforezinde yürütülerek ultraviyole ışık altında çekilmiş fotoğrafı görülmektedir. İmmün floresans (IFA) testi ile *P. jirovecii*'nin kistleri saptandı (Şekil-9 A ve B).

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil-8: PCR sonrası ethidium bromid ile boyanan agaroz jel elektroforezinde

1.Kolon:Size marker

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

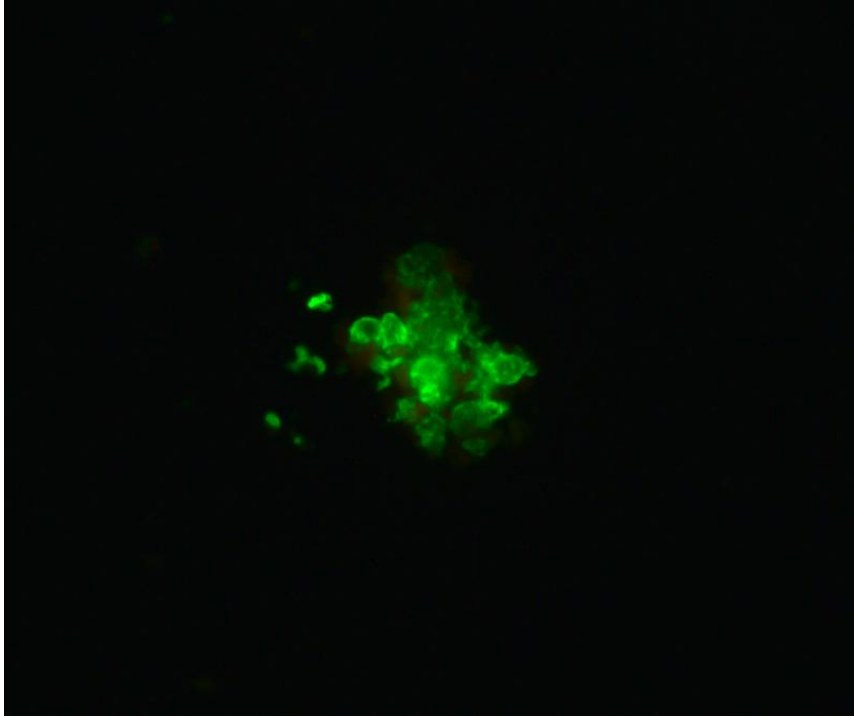
Size Marker

Pozitif Hasta Örneği

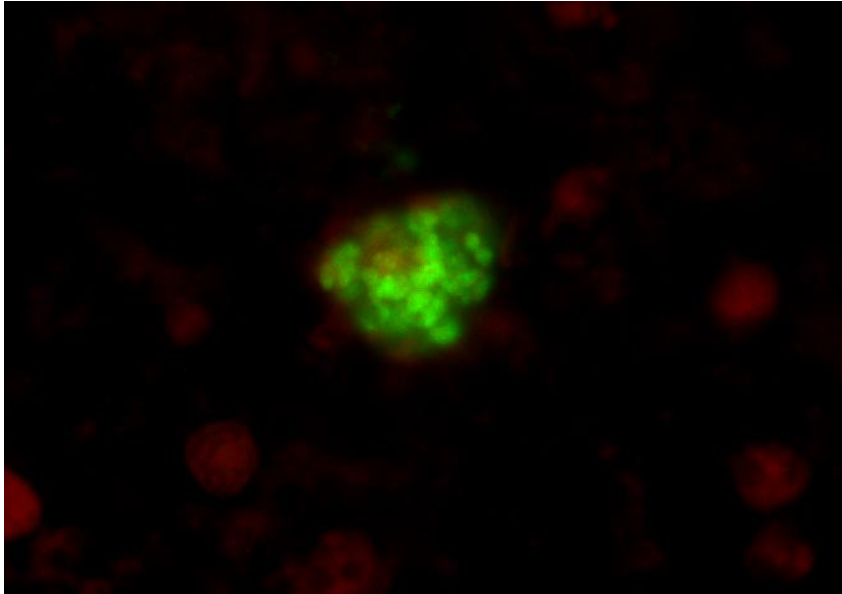
Pozitif Kontrol (120bp)

Negatif Kontrol

Şekil-8: *P. jirovecii* DNA'sının jel elektroforezinde ultraviyole ışık altında çekilmiş fotoğrafı görülmektedir.



A



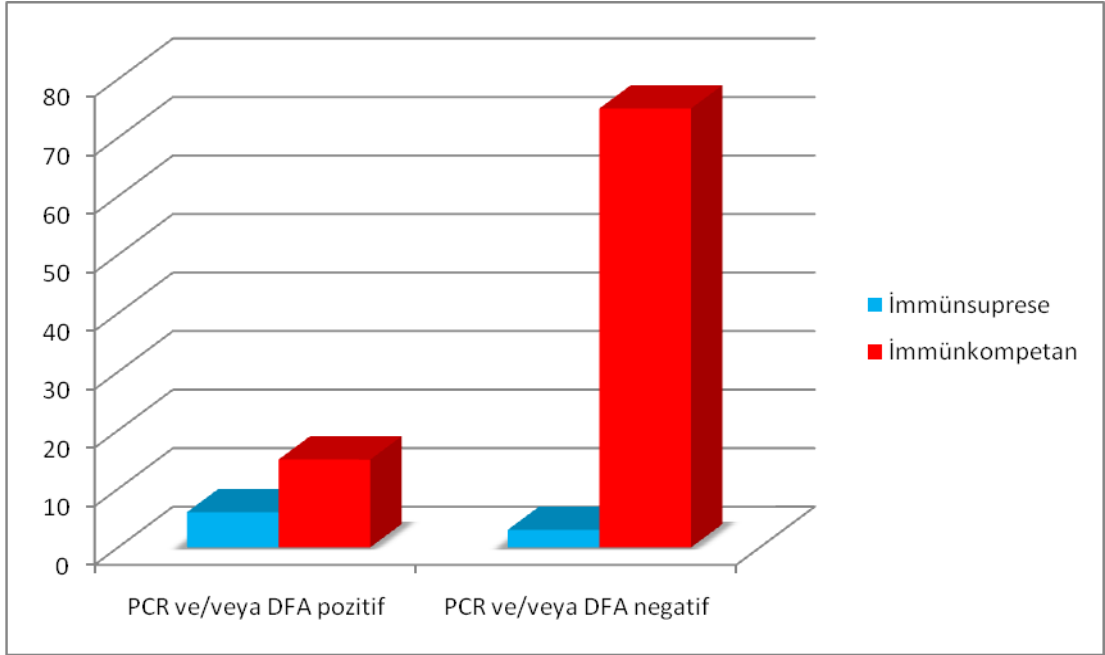
B

Şekil-9: A- Pozitif Kontrol IFA, B- Pozitif Hasta IFA görülmekte.

Olgu gruplarında bakılan yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, HT, DM , KOAH, SVO, KKY, son 3 ayda hastanede yatma öyküsü ve antibiyotik kullanımı, kullanılan antibiyotiklerin tekli ve çoklu kullanımı

değerlendirildiğinde *P. jirovecii* pozitifliği ile aralarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Olgu grupları PCR ve IFA pozitifliklerine göre gruplara ayrılarak değerlendirme yapıldığında IFA veya PCR pozitif olgularda immüsupresyon açısından anlamlı farklılık saptandı ($p=0.003$). Pozitif olguların %28.6'sı immüsuprese iken, PCR veya IFA negatif olguların %3.8'i immüsuprese idi (Şekil-10).



Şekil-10: PCR ve IFA pozitifliklerine göre immüsuprese ve immünkompetan hastalar.

Radyolojik olarak PCP düşünülen 23 hastanın 7 tanesinde IFA yada PCR ile pozitiflik saptandı. İstatistiksel farklılık saptanmadı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

P. jirovecii HIV (+) bireylerde, konnektif doku hastalığı ile hematolojik malignitesi olanlarda ve organ transplantasyonu yapılan hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyona neden olan fırsatçı bir patojendir (55). Özellikle HIV (+) hastalarda PCP insidansı antiretroviral tedavinin kullanıma girmesiyle belirgin olarak azalmıştır (56).

Yapılan serolojik çalışmalar çok sayıda çocukta etkene karşı yaşamın erken döneminde spesifik antikor oluştuğunu göstermiştir (57-59). Bununla beraber yapılan insan ve hayvan çalışmaları etkenin enfeksiyondan sonra vücuttan büyük ölçüde elimine edildiği ancak sınırlı sayıda organizmanın latent kaldığı şeklindedir (60, 61).

PCP latent enfeksiyonun reaktivasyonundan ya da kendiliğinden meydana gelebilir (62). 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 (63-65). PCR mikroskopi ya da immün floresana göre son derece duyarlı bir yöntemdir ve *P. jirovecii* trofozoitlerinin düzeyi çok düşük olsa bile PCR ile saptanmaktadır. Yinede immünkompetan olan pozitiflik saptanmayan bireylerde postmortem AC dokusundan çalışılan PCR örnekleri ile *P. jirovecii*'nin varlığı gösterilmiştir (66). Öte yandan kanıtlanmış *P. jirovecii* enfeksiyonu olmayan immünsuprese 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 (67). Yakın zamanda HIV (+) 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 (68). Aynı zamanda *P. jirovecii* 'nin yayılımında PCP (+) immünsuprese hastayla teması olan sağlık çalışanlarının da aracı olduğu kanıtlanmıştır (69). PCP'li hastalar, immünsuprese taşıyıcılar ya da immünkompetan olup geçiçi

olarak parazitemili kişiler *pneumocystis* enfeksiyonu için kaynak oluşturmaktadır (54). Herhangi bir kronik AC hastalığı olan immünkompetan bireylerde solunum sistemi örneklerinin immün floresan boyama ve PCR ile incelenmesiyle taşıyıcılık %10-40 olarak bulunmuştur (68,69).

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.

Laboratuvar koşullarında hayvandan hayvana geçiş hem immünsuprese hem immünkompetan konakçılarda maruziyetten bir günden daha kısa bir süre zarfında gösterilmiştir (70,71). Dumoulin ve ark. (71) *P. jirovecii* ile enfekte farelerle ve ayrıca *Pneumocystis* ile ilişkisiz enfeksiyonlu ciddi kombine immün yetmezliği olan farelerle temastan sonra immünkompetan farelerde *P. jirovecii*'nin geçici kolonizasyonunu göstermişlerdir.

Tipirneni ve ark. (72) hastane personeli arasında yaptıkları bir çalışmada göğüs hastalıkları, yoğun bakım HIV/AIDS hastalarının bakımının yapıldığı bölümlerde çalışan HIV ile enfekte veya PCP 'li hastalara klinik ve laboratuvar bakımı vermekte olan 126 personeli incelemişlerdir. Çalışanların 103'ü (%81.7) klinik grubu ve 23'ü (%18.3) klinik dışı grubu olarak ayrılmıştır. Klinik grupta; 27 tedaviden sorumlu doktor; 17 refakatçi (bakıcı), 19 tıp öğrencisi, 9 yardımcı hemşire, 10 hemşire, 10 yardımcı klinik personeli 11 klinik araştırma personeli mevcutmuş. Klinik dışı grupta 18 idare personeli ve 5 laboratuvar personeli mevcutmuş. Katılan personelde *P. jirovecii* major yüzey glikoprotein (MsgA, MsgB, MsgC1) düzeylerine bakılmıştır, (MsgC HIV enfekte hastalar arasında PCP olan ve olmayanları ayırt etmek için kullanılan temel antijenik belirteçtir). MsgA ya da MsgB düzeylerinde klinik ve klinik dışı grup arasında PCP'li hasta ile temas durumu olsun olmasın önemli farklılık saptanmamış ancak 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 ve bu kolonizasyon MsgC1 ELISA ile güçlü bir şekilde ortaya konabilir şeklinde bir sonuca varmışlardır.

Medrano ve ark. (73) son bir yıl içinde hastane çevresine maruz kalmamış ve herhangi bir nedenden immünsupresyonu, malignitesi ya da kronik AC hastalığı ya da şüphesi olmayan 50 kişinin katılımıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışmaya katılan 50 kişinin orofarengeal yıkama örneklerinden *P. jirovecii* PCR'ı yapılmıştır. Olguların %20'inde pozitifliklik saptanmış ve buradan yola çıkarak *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 yapılmaya endikasyonu alan hastalardan oluşmaktaydı. Hastalardaki mevcut klinik bulgular altta yatan akciğer hastalıklarına bağlı olduğu düşünülmüş olup; antibiyotik kullanımı olan hastalarda verilen tedavi non-spesifik 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 (72, 73).

Takahashi ve ark. (74) solunum sistemi bulguları ya da anormal göğüs radyoloji bulguları olan 81 hastanın BAL örneklerini incelemişlerdir BAL örnekleri 26 HIV (+), 45 immünsuprese ve 10 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 (+) olan olgularda %57.7, HIV (-) olan immünsuprese hastalarda %20 olarak tesbit edilmiştir. Boyama negatif olduğu halde PCR ile HIV(+) 7 hastada (%26.9); immünsuprese 4 hastada (%8.9) *P. jirovecii* tesbit ettiklerini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda HIV (+) hasta yoktu. Ancak steroid ve kemoterapotik kullanımı nedeniyle immünsuprese kabul edilen hastalar

mevcuttu. Olgular PCR ve IFA pozitifliklerine göre gruplara ayrılarak değerlendirme yapıldığında IFA veya PCR pozitif olgularda immünsupresyon açısından anlamlı farklılık saptandı ($p=0.003$). Pozitif olguların %28.6'sı immünsuprese saptanırken, PCR veya IFA negatif olguların %3.8'i immünsupreseydi. Buda kolonizasyon yada enfeksiyonun doğrudan immünsupresyon ve/veya immün yetmezlikle ilişkili olduğunu gösterebilir.

P. jirovecii'yi invitro koşullarda üretmek mümkün olmadığından; PCP tanısı solunum yolu örneklerinden Giemsa, metenamin gümüş (Gomori/Grocott), toluidin mavisi, immün floresans antikor (IFA) gibi yöntemler kullanılarak *P. jirovecii*'nin morfolojik özelliklerine göre konmaktadır. AIDS hastalarında tanı genellikle indüklenmiş balgam örneğiyle konulmaktadır (75). Aksine AIDS dışı nedenlerden immünsuprese olan hastalarda indüklenmiş balgamda nadiren *P. jirovecii* pozitif saptanmakta; tanıda BAL, BL ya da doku biyopsi örnekleri gerekmektedir. AIDS hastalarında indüklenmiş balgam ile tanı konulması yüksek organizma yükünden kaynaklanmaktadır (76).

Çalışmalar göstermektedir ki IFA geleneksel sitokimyasal boyamalara (Giemsa, metenamin gümüş, ve modifiye toluidin mavisi) göre daha üstündür (77, 78) ve bu yöntem PCP tanısında altın standart olarak kanıtlanmış bir yöntemdir. PCP'nin laboratuvar tanısında esas olarak BAL ile alınan örnekler kullanılmaktadır. Ancak IFA boyamada tanı duyarlılığı hasta örneğinin ne olduğuna ve alınma şekline göre değişmektedir. Bazı çalışmalar PCP tanısında BAL'ın indüklenmiş balgama göre önemli derecede duyarlı olduğunu göstermektedir (79). PCP tanısında *P. jirovecii* genlerinin kullanıldığı PCR yöntemi de duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Çalışmamızda indüklenmiş balgam örnekleri almadık. Alınan BAL ve BL örneklerinde ise 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 (-) olan olgu grubumuzda ki hastaların mantar yükünün düşük ve belki de geleneksel boyama yöntemlerinin duyarlılığının da düşük oluşu sayılabilir.

Hasta örneklerinde PCR ile IFA yöntemini karşılaştıran çalışmalar mevcuttur. Cartwright ve ark. (80) yaptıkları bir çalışmada indüklenmiş balgam ve BAL örneklerinde PCP tanısında prospektif olarak PCR ve IFA yöntemini karşılaştırmışlardır. Buna göre indüklenmiş balgam örneklerinde IFA duyarlılığı %78 (41 örnekte 32) ve özgüllüğü %100 (166 örneğin 166'sı); PCR duyarlılığı %100 (41 örnekte 41) ve özgüllüğü %98 (166 örnekte 162) olarak saptanmıştır. BAL örneklerinde IFA ile boyamanın duyarlılığı %100 (21 örnekte 21) ve özgüllüğü %100 (133 örnekte 133) ve PCR duyarlılığı %100 (21 örnekte 21) ve özgüllüğü %99 (133 örnekte 132) olarak bulunmuştur.

Caliendo ve ark.'nın (81) solunum yolu örneklerinde PCP tanısını koymada PCR'in performansını değerlendirmek için yaptıkları çalışmada 232 klinik örnek (120 indüklenmiş balgam ve 112 BAL) 168 hastadan elde edilmiş; hastalar HIV (+) olanlar, transplant alıcıları ve başka hastalıklardan immünsupresif tedavi alanlardan oluşuyormuş. Alınan örnekler PCR ve IFA ile değerlendirilmiş ve 17 BAL örneğinde *P. jirovecii* PCR ve IFA ile pozitif ve 2 örnekte PCR (+) IFA(-) bulunmuş. BAL örneklerinin PCR ve IFA ile duyarlılığı ve özgüllüğü kıyaslandığında sırasıyla %100 ve %98 bulunmuştur. Onsekiz indüklenmiş balgam örneği IFA ile, 27 örnek ise PCR ile pozitif bulunmuştur. Onsekiz örneğin bir tanesi PCR negatif (bu kişi yeni PCP tedavisi almış) saptanmıştır. On örnekte PCR pozitif ve IFA negatif bulunmuş (4 hastada sonradan alınan BAL örneklerinde ne PCR ne IFA ile pozitiflik saptanmış) ve indüklenmiş balgam örneklerinin IFA ve PCR ile duyarlılığı sırasıyla %82 ve %95 olarak hesaplanmıştır. İndüklenmiş balgam örneklerinde PCR'in özgüllüğünün %94 gibi yüksek bulunması; indüklenmiş balgam örneklerinde *P. jirovecii* tanısında PCR'in pek çok hastada BAL gereksinimini azaltarak tanı amaçlı tarama testi olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. 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'ın 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 standardize 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 ettirecek bir tanı yöntemi de yoktur. PCP ile yapılan çalışmalar HIV (+) hasta grubu üzerinde yoğunluk kazanmaktadır. Bu hastalarda immün yetmezliğin 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 immünsupresyonun 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' a göre üstünlüğü olan bir yöntemdir. Ayrıca real time PCR' da kantitatif sonuç elde edilmektedir ve belli cut off değerleri baz alınarak hastada PCP ya da kolonizasyon yönünde yorum yapmak mümkün olmaktadır.

Sonuç olarak Bursa bölgesinde yapılan bu çalışmada HIV (-) olgularda immünsuprese 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. İmmünsupresif

hastalarda *P. jirovecii* kolonizasyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur fakat bunun hastalık yada kolonizasyon hakkında yorum yapmak için yeterli olmadığı da görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Walzer PD, Smulian AG. *Pneumocystis species*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practatice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010. 3377-87.
2. Thomas CFJ, Limper AH. *Pneumocystis pneumoniae*. N Engl J Med 2004; 350: 2487-98.
3. Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: Nomenclature and typifications. J Eukaryot Microbiol 2006; 53: 2-11
4. http://www.doctorfungus.org/the_fungi/Pneumocystis.htm (erişim: 29 Aralık 2006)
5. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002; 8: 891-6.
6. Frenkel JK. *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. J Eukaryot Microbiol 1999; 46: 89-92.
7. Dei-Cas E, Chabe M, Moukhlis R, et al. *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. FEMS Microbiol Rev 2006; 30: 853-71.
8. Stringer JR. Antigenic variation in *Pneumocystis*. J Eukaryot Microbiol 2007; 54: 8-13
9. 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.
10. Kaneshiro ES. Sterol metabolism in the opportunistic pathogen *Pneumocystis*: advances and new insights. Lipids 2004; 39: 753-61.
11. Daly KR, Koch J, Levin L, Walzer PD. Emzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jirovecii*. Emerg Infect Dis 2004; 10: 848-54.
12. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, et al. *Pneumocystis jirovecii* in general population. Emerg Infect Dis 2005; 11: 245-50.

13. Peterson JC, Cushion MT. *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 393-8.
14. 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.
15. Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, et al. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2003; 187: 901-8.
16. Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, et al. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1008-11.
17. Vidal S, de la Horra C, Martin J, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 231-5.
18. Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, et al. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3409-10.
19. Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 408-13.
20. Calderon EJ, Rivero L, Respaldiza N, et al. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 17-9.
21. Morris A, Lundgren JD, Masur H, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1713-20
22. Rodriguez M, Fishman JA. Prevention of infection due to *Pneumocystis spp.* in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 770-82.
23. Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM, ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in *Pneumocystis* pneumonia (PCP). *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 655-64.
24. Totet A, Duwat H, Daste G, Berry A, Escamilla R, Nevez G. *Pneumocystis jirovecii* genotypes and granulomatous *Pneumocystosis*. *Med Mal Infect* 2006; 36: 229-31.

25. Barry SM, Johnson MA. *Pneumocystis pneumonia*. Clin Pulm Med 2004; 11: 135-42.
26. Hadley WK, NG VL. *Pneumocystis* In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH(eds). Manual of Clinical Microbiology, Washington, D.C: ASM Press, 1999: 1200-11.
27. Nassar A, Zapata M, Little JV, Siddiqui MT. Utility of Reflex Gomori Methenamine Silver Staining for *Pneumocystis jirovecii* on Bronchoalveolar Lavage Cytologic Specimens: A Review. Diagn Cytopathol 2006; 34: 719-23.
28. Caliendo AM, Hewit PL, Allegra JM, Keen A, Ruof KL, Ferraro MJ. Performance of a PCR Assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. J Clin Microbiol 1998; 36: 979-82.
29. Kim HK, Hughes WT. Comparison of methods for identification of *Pneumocystis carinii* in pulmonary aspirates. Am J Clin Pathol 1973; 60: 462-6.
30. Tiley SM, Marriott DJ, Harhness JL. An evaluation of four methods for the detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens. Pathology 1994; 26: 325-8.
31. Hadley WK, Valerie LNG. *Pneumocystis*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds). Manuel of Clinical Microbiology, Washington: ASM Press: 1999. 1200.
32. Walzer PD. *Pneumocystis carinii*. In: Mandell GL Bennet JE, Dolin R, (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone; 1995. 2475.
33. Quist J, Hill AR. Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, and bacterial pneumonia. Chest 1995; 108: 415-8.
34. Daly KR, Huang L, Morris A, et al. Antibody response to *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1231-7.
35. Benson CA, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Holmes KK. CDC, National Institutes of Healt, Infectious Diseases Society of America. Treating opportunistic infections among HIV-exposed and infected children: recommendations from CDC the National Institutes of Healt and the Infectious Diseases Society of America. MMWR Recomm Rep 2004; 53: 1-112

36. Cushion MT, Smulian AG. *Pneumocystis* 2006: summary of the research presented at the ninth international workshop on opportunistic protists. *J Eukaryot Microbiol* 2006; 53(Suppl1): 80-4
37. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 891–6.
38. Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrero V, Respaldiza-Salas N, de la Horra-Padilla C, et al. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist* 2002; 153: 303–10.
39. Meuwissen JHE Th, Tauber I, Leeuwenberg ADEM, Beckers PJA, Sieben M. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis* 1977; 136: 43–9.
40. 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.
41. Medrano FJ, Respaldiza N, Medrano A, Varela JM, Montes-Cano M, de La Hora C, et al. Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in southern Spain. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50(Suppl): 649–50.
42. Chen F, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1993; 61: 5406–9.
43. O'Donnell WJ, Pieciak 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.
44. Chaves JP, David S, Wauters JP, Van Melle G, Francioli P. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a renal transplant recipient. *AIDS* 1991; 5: 927–32.
45. Vrathalitis I, Aoun M, Daneau D, Meunier F. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with cancer. An increasing incidence. *Cancer* 1993; 71: 481–5.
46. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Munoz 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.


47. 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.
48. Durand-Joly I, Soula F, Chabe M, Dalle JH, Lafitte JJ, Senechal 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.
49. 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.
50. Olsson M, Lidman C, Latouche S, Björkman A, Roux P, Linder E, et al. Identification of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. J Clin Microbiol 1998; 36: 1737–40.
51. 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.
52. Dei-Cas E. *Pneumocystis* infections: the iceberg? Med Mycol. 2000; 38(Suppl 1): 23–32.
53. Hughes WT. *Pneumocystis carinii* pneumonia. N Engl J Med 1977; 297: 1381–3.
54. Weverling GJ, Mocroft A, Ledergerber B et al. Discontinuation of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. Lancet 1999; 353: 1293–8.
55. Meuwissen JHE Th, Tauber I, Leeuwenberg ADEM, Beckers PJA, Sieben M. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. J Infect Dis 1977; 136: 43–9.
56. 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.
57. 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.
58. Chen F, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. Infect Immun 1993; 61: 5406–9.

59. O'Donnell WJ, Pieciak 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.
60. Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J Infect Dis* 1996; 174: 141–56.
61. Esterly JA. *Pneumocystis carinii* in lungs of adults at autopsy. *Am Rev Respir Dis* 1968; 97: 935–7.
62. Vogel CL, Cohen MH, Powell RD, DeVita VT. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Ann Intern Med* 1968; 68: 97–108.
63. 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.
64. 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.
65. Nevez G, Guyot K, Totet A, Raccurt C, Dei-Cas E. Pulmonary colonisation with *Pneumocystis carinii* in an immunosuppressed HIV-negative patient: detection and typing of the fungus by PCR. *J Med Microbiol* 2001; 50: 198–200.
66. Huang L, Beard CB, Creasman J et al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis* 2000; 182: 1192–8.
67. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F 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.
68. 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.
69. 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.

70. Sepkowitz K, Schluger N, Godwin T, Armstrong D, Cerami A, Bucala R. DNA amplification in experimental pneumocystosis: characterization of serum *Pneumocystis carinii* DNA and potential *P. carinii* carrier states. *J Infect Dis* 1993; 168: 421–6.
71. Dumoulin A, Mazars E, Seguy N, Gargallo-Viola D, Vargas S, Cailliez JC, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 671–8.
72. Tipirneni R, Daly KR, Jarlsberg LG, Koch JV, Swartzman A, Roth BM, Walzer DP, and Huang L. Healthcare Worker Occupation and Immune Response to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging Infectious Diseases* www.cdc.gov/eid • 2009; 15: 1590-7
73. 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
74. Takahashi T, Goto M, Endo T, Nakamura T, Yusa N, Sato N and Iwamoto A. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Med Microbiol* 2002; 51: 611–4.
75. Kovacs JA, Ng VL, Masur H, et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1988; 318: 589-93.
76. Hadley, W.K & NG, V. *Pneumocystis*. In: Murray, PR, Baron, EJ, Pfaller, MA, Tenover, FC & YOLKEN, RH, ed. *Manual of clinical microbiology*. 6. ed. Washington: 1995; 738-48.
77. Baughman RP, Strohofer SS, Clinton BA, Nickol AD, Frame PT. The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Pneumocystis carinii*. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 1062-5.
78. Stratton N, Hryniewicki J, Aarnaes SL, Tan G, de la Maza LM, and Peterson EM. Comparison of monoclonal antibody and calcofluor white stains for the detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 645–7.
79. Elvin KM, Björkman A, Linder E, Heurlin N, Hjerpe A. *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. *BMJ* 1988; 297: 381–4.

80. Cartwright C.P, Nelson N.A, Gill V.J. Development and Evaluation of a Rapid and Simple Procedure for Detection of *Pneumocystis carinii* by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 1634-8.
81. Caliendo AM, Hewitt PL, Allega J, Keen A, Ruoff KL, and Ferraro MJ. Performance of a PCR Assay for Detection of *Pneumocystis carini* from Respiratory Specimens. J Clin Microbiol . 1998; 979–82.

EKLER

	UÜ-SK TIBBİ ARAŞTIRMALARA KATILIM İÇİN AYDINLATILMIŞ HASTA ONAM FORMU
---	--

ÇALIŞMANIN İÇERİK VE AMACI :

Bu çalışmada BAL yapılan hastalarda BAL örneklerinin ve alınan kan örneklerinin(yardımcı tanı yöntemi serum belirteci olarak beta-d-glukan kullanılacak) incelenerek

1- Pnömocystis Pnömonisi (PCP) tanısını ve *P. jirovecii* taşıyıcılığını saptamak

2- BAL örneklerinde *P. jirovecii* saptanan hastaların demografik bilgileri, altta yatan hastalıkları, olası risk faktörleri göz önünde bulundurularak bu unsurların hastalıkla ilişkisi

3-Hastalık semptom ve bulgularını taşımaksızın BAL örneklerinde *P. jirovecii* tesbit edilen hastaların yukarıda bahsedilen hasta bilgileri dikkate alınarak kolonizasyon gelişiminde etkili olabilecek unsurların belirlenmesi hedeflenmektedir.

İZLENECEK OLAN YÖNTEMLERİN AÇIKLANMASI:

A. DENEYSEL İŞLEMLER VE TEDAVİ

B. ÇALIŞMANIN TAHMİN EDİLEN SÜRESİ VE KATILMASI BEKLENEN GÖNÜLLÜ SAYISI

Çalışmanın süresi 1 yıl olup bu süre içinde 100 hastaya ulaşılması hedeflenmektedir.

BU ÇALIŞMANIN GETİREBİLECEĞİ OLUMLU NOKTALAR :

Bu çalışma ile hastalığın immün baskılı bireylerde gelişiminde kaynak kabul edilen toplumdaki asemptomatik kolonize bireylerin oranı tesbit edilip kolonizasyonda etkili risk faktörleri ve bu şahısların genel özelliklerinin tesbiti yapılabilir. Özellikle immün baskılı bireylerde hastalığın tanısında spesifik bir klinik ve laboratuvar yöntemi olmaması göz önünde tutulduğunda bu grup hastaların erken tanısının ve de zamanında uygun tedavisinin yapılması da mümkün olacaktır.

YUKARIDA AÇIKLANAN ÇALIŞMA ESNASINDA UYGULANACAK OLAN İŞLEM VE TEDAVİLERİN GÖNÜLLÜYE GETİREBİLECEĞİ EK RİSK VE RAHATSIZLIKLAR:

Çalışmada kullanılan materyal; alınma gerekçesi ne olursa olsun BAL yapılacak hastaların BAL örnekleridir. Çalışmada hasta materyali üzerinden çalışılacaktır ek bir ilaç yada invaziv bir işlem yapılmayacaktır. Hastanın ihtiyaç duyulan bilgileri de hastanın bizzat kendisinden sözel olarak yada dosyasından elde edilecektir. Bu işlemler esnasında hastaya gelebilecek herhangi bir risk ya da rahatsızlık öngörülmemektedir.

KATILMA VE ÇIKMA :

Hastanın çalışmaya katılımı gönüllük esasına göredir. Hasta istediği zaman çalışmadan çıkabilir. Bu durum hasta açısından hiçbir cezaya veya kişisel hak kaybına neden olmaz.

MASRAFLAR :

Yapılacak çalışma esnasında gerekli rutin tetkik yöntemleri için ücretlendirme hastanın kendisinden ya da bağlı olduğu sosyal güvenlik kurumundan talep edilecektir. Bunun haricinde *P.jirovecii* tanısı amaçlı yapılacak olan tetkikler Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu'ndan karşılanacak hastaya ek yük getirmeyecektir.

GİZLİLİK :

Hastanın yapılan çalışma süresi boyunca elde edilen tüm bilgileri gizli tutulacaktır. Sadece kanuni gereklilik hasıl olduğunda ilgili kurum yada kuruluşlar tarafından incelenebilir.

Ben,,
[gönüllünün adı,soyadı Kendi el yazısı ile] yukarıdaki metni okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. Çalışma hakkında soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları açıklandı. Bu çalışmayı istediğim zaman ve herhangi bir neden belirtmek zorunda kalmadan bırakabileceğimi ve bıraktığım zaman tedavimi üstlenenlerin herhangi bir ters tutumu ile karşılaşmayacağımı anladım.

Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:

İmzası :

Adresi:

(varsa Telefon No, Faks No):

Tarih (gün/ay/yıl) :/...../.....

Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin

Veli veya Vasisinin (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı :

İmzası :

Adresi:

(varsa Telefon No, Faks No):

Tarih (gün/ay/yıl) :/...../.....

Açıklamaları Yapan Araştıracının (Doktorun)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih (gün/ay/yıl) :/...../.....

Onay Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş
Görevlisinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih (gün/ay/yıl) :/...../.....

TEŞEKKÜR

Eđitimimde emeiği geçen Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. Safiye Helvacı baŐta olmak üzere tım Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve ęalıŐanlarına; tez danıŐmanım Prof. Dr. Reşit MıŐtık'a; Gögüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Esra Uzaslan nezdinde tım öğretim üyelerine ve ęalıŐanlarına; bilhassa yakın ilgi ve alakalarından dolayı Doę. Dr. Ahmet UrsavaŐ ve Yard. Doę. Dr. Funda CoŐkun'a; ęalıŐmamın başından sonuna kadar tım aŐamalarında katkısı olan yardımını, desteğini esirgemeyen Uzman Dr. Oktay Alver'e; ailem baŐta olmak üzere ihtisasım boyunca acı tatlı pek ęok Őeyi paylaŐtıđım klinik ve dış klinikte ęalıŐtıđım tım asistan arkadaşlarıma katkılarından ve de kattıklarından dolayı teŐekkürü borę bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

29.04.1978 tarihinde Eskişehir’de doğdum. İlköğrenimimi Turan İlkokulu’da orta ve lise öğrenimimi Süleyman Çakır Lisesi’de bitirdikten sonra 1996 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde tıp eğitimime başladım. 2005’de Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimime başladım.