

HIV Negatif İmmünyet bozulan Hastaların Bronkoalveolar Lavaj Örneklerinde *Pneumocystis jirovecii* ve Diğer Etkenler

Detection of *Pneumocystis jirovecii* and Other Agents in Bronchoalveolar Lavage Samples of HIV- Negative Immunocompromised Patients

Nazmiye Ülkü Tüzemen*¹, Ezgi Demirdöğen*², Burcu Dalyan Cilo***³, Oktay Alver*⁴, Esra Kazak****⁵, Vildan Özkocaman****⁶, Beyza Ener*⁷

* Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

** Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

*** Sağlık Bakanlığı Üniversitesi, Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Bursa, Türkiye

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

***** Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Bursa, Türkiye

Atıf/Cite as: Tüzemen NÜ, Demirdöğen E, Dalyan Cilo B, Alver O, Kazak E, Özkocaman V, Ener B. HIV negatif immünyet bozulan hastaların bronkoalveolar lavaj örneklerinde *Pneumocystis jirovecii* ve diğer etkenler. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(3):225-32.

ÖZ

Amaç: *Pneumocystis jirovecii*, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde önemli pnömoni etkenleri arasındadır. Çalışmamızda, pnömoni etiyolojisi açısından gönderilen bronkoalveolar lavaj örneklerinin *Pneumocystis pnömonisi* (PCP) açısından değerlendirilmesi ve altta yatan diğer etkenlerin tespiti amaçlanmıştır.

Yöntem: Gönderilen bronkoalveolar lavaj örneklerine, May Grünwald/Giemsa, modifiye toluidin mavisi, immünyet bozulan antikor boyama ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi uygulanarak bu yöntemlerin *Pneumocystis pnömonisi* tanısındaki yeri araştırıldı. Bakteri, mantar etkenleriyle *Mycobacterium tuberculosis* ve *Cytomegalovirus*'ün belirlenmesi için de uygun yöntemler kullanıldı.

Bulgular: Yaşları 18-90 (ortalama 53.02 yaş) arasında değişen 32'si kadın, 68'i erkek olmak üzere 100 hasta çalışmaya dâhil edildi. Hastaların 17'sine herhangi bir altta yatan hastalık saptanamamış olup, bu hastalara yalnızca pnömoni ön tanısı ile bronkoskopi yapıldı. Yalnızca bir hastada gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile *Pneumocystis pnömonisi* pozitifliği saptandı. Tüm hastalar değerlendirildiğinde %33'ünde bir enfeksiyon etkeni saptandığı görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak bu çalışmada, boyama yöntemleri ve gerçek zamanlı PCR ile PCP oranı düşük bulunmuştur. Daha fazla hastalarla yapılacak çalışmalarda daha yüksek oranlar elde edilebilir. Bununla beraber, bronkoalveolar lavaj örnekleri genel durumu bozuk hastalarda etiyolojiye ulaşma açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*, bronkoalveolar lavaj, *Pneumocystis pnömonisi*

ABSTRACT

Objective: *Pneumocystis jirovecii* is among the important causative agents of pneumonia especially in immunocompromised individuals. In our study, we aimed to evaluate the etiology of pneumonia using bronchoalveolar lavage samples in terms of *Pneumocystis pneumonia* (PCP) and to identify other underlying agents.

Method: We analyzed bronchoalveolar lavage samples by May Grünwald/Giemsa, modified toluidine blue, immunofluorescent antibody staining and real-time polymerase chain reaction method, and investigated their roles in the diagnosis of PCP. Appropriate methods were also used to identify bacteria, fungi, *Mycobacterium tuberculosis* and *Cytomegalovirus*.

Results: In this study, 100 patients (32 females and 68 males) aged between 18-90 (mean age 53.02) years were included in the study. In 17 patients any underlying disease was not detected, and bronchoscopy was performed only with a preliminary diagnosis of pneumonia, and in only one patient *pneumocystitis pneumonia*-positivity was detected by real-time polymerase chain reaction method. When all patients were evaluated, an infectious agent was found in 33% of them.

Conclusion: As a result, in this study PCP rate was found to be low with staining methods and real-time polymerase chain reaction. Higher rates can be obtained in studies with greater number of patients. However, bronchoalveolar lavage samples are important in identifying etiology in patients with poor general condition.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, bronchoalveolar lavage, *Pneumocystis pneumonia*

Alındığı tarih / Received:

18.08.2020 / 18.August.2020

Kabul tarihi / Accepted:

28.01.2021 / 28.October.2021

Yayın tarihi / Publication date:

07.09.2021 / 07.September.2021

ORCID Kayıtları

N. Ü. Tüzemen 0000-0003-3544-3509

E. Demirdöğen 0000-0002-7400-9089

B. Dalyan Cilo 0000-0002-6158-9360

O. Alver 0000-0002-5559-3590

E. Kazak 0000-0002-7380-2501

V. Özkocaman 0000-0003-0014-7398

B. Ener 0000-0002-4803-8206

✉ ulku_kocman@hotmail.com

GİRİŞ

Pneumocystis jirovecii, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde *Pneumocystis* pnömonisine (PCP) neden olan fırsatçı bir enfeksiyon hastalığı etkenidir⁽¹⁾. İlk tanımlandığında protozoon olarak kabul edilen bu tek hücreli ökaryotik mikroorganizmanın, yapılan çalışmalar sonucu mantar olduğu kanıtlanmıştır^(2,3). Öncelikle 1980'li yıllarda kazanılmış bağışıklık yetmezlik sendromu (AIDS) salgını sırasında tanımlanmıştır⁽⁴⁾. İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte hastalar veya kanser, otoimmün, bağ dokusu hastalığı bulunanlar ile kemik iliği/organ nakli olan hastalar başlıca risk grubunu oluşturur⁽⁵⁾. İnsanlar *P. jirovecii*'nin asemptomatik taşıyıcısı olabilirler. Yapılan çalışmalar, birçok kişinin mantarı erken yaşlarda aldığını ancak bulguların bağışıklık sisteminin baskılanmasıyla ortaya çıktığını göstermiştir^(6,7). Bağışıklığı baskılanmış hastalarda kişiden kişiye bulaş da olabilir. İlk kişiden kişiye bulaş onkoloji ve transplantasyon ünitesinde bildirilmiştir. Hastaların bir metre yakınındaki ortam havasında *P. jirovecii*'nin DNA'sı belirlenmiştir⁽⁴⁾. Günümüzde genel durumu bozuk, hastanede uzun süre kalan hasta sayılarının artmasına paralel olarak PCP olgularında da artışlar olmuştur. İngiltere'de yapılan bir çalışmada, laboratuvar tarafından doğrulanan PCP sayılarının 2000-2010 yılları arasında yılda %10 artış gösterdiği ve mortalite oranının da %29-62 arasında değiştiği bildirilmiştir⁽⁸⁾.

Pneumocystis jirovecii kültürde üretilmediği için tanı, solunum yolu örneklerinde moleküler yöntemlerle *P. jirovecii* DNA'sının saptanması ve çeşitli sitolojik (May Grünwald/Giemsa, toluidin mavisi, metanamin gümüş, kalkoflour beyazı, gram-weigert, papanicolaou) ve immünfloresan boyama (IFA) yöntemleri ile hazırlanmış preparatlarda *P. jirovecii* kist ve trofozoitlerinin mikroskopik olarak gösterilmesi ile konur⁽⁹⁻¹¹⁾.

Çalışmamızda, Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (SUAM) Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına pnömoni etiyolojisi açısından gönderilen bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerine, May Grünwald/Giemsa, modifiye toluidin

mavisi, indirekt immünfloresan antikor (IFA) boyama ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi uygulanarak bu yöntemlerin PCP tanısındaki yeri araştırıldı. Ayrıca BAL'ın değerli bir örnek olması nedeniyle diğer etkenlerin varlığına da bakıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışılan örnekler ve hastalar: Bursa Uludağ Üniversitesi, SUAM Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2016-Haziran 2017 arasında 100 HIV negatif immünkompromize hastaya ait BAL örneği *P. jirovecii* ve diğer etkenler (bakteri, mantar, mikobakteri ve sitomegalovirüs) açısından değerlendirildi. Hastaların hepsinde klinik (ateş, öksürük, dispne, dinleme bulgusu gibi) ve radyolojik (akciğer tomografisinde enfeksiyonla uyumlu lezyonlar) olarak pulmoner bulgular vardı ve örnekler PCP'yi desteklemek veya dışlamak açısından incelendi.

Retrospektif olarak hastaların yaş, cinsiyet gibi demografik özellikleri ile altta yatan hastalıkları hastane bilgi yönetim sisteminden alındı. Çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 2014-12/1 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

Bronkoalveolar lavaj: Bronkoalveolar lavaj pnömoni ön tanısı ile solunum yolu örneği elde etmek üzere, refrakter hipoksemisi olmayan, trombosit değeri 20.000/mm³ ve üzeri olan hastalara uygulamıştır. İşlem, Amerikan Torasik Birliği (ATS) klinik pratik kılavuzuna göre yapılmıştır. Toraks tomografisine göre seçilmiş bronkopulmoner segmente kama pozisyonunda yerleştirilmiş bronkoskop aracılığı ile 20 ml porsiyonlar halinde hazırlanmış oda havasındaki steril salinin (maksimum 100-200 ml) verilmesi ve her porsiyonda ayrı şırınga ile negatif basınç uygulanarak aspire edilmesi ile BAL örneği elde olunmuştur. Örnekler mikrobiyolojik inceleme için hızla laboratuvara ulaştırılmıştır⁽¹²⁾.

Örneklerin ön hazırlığı: Mukus içermeyen örnekler direkt olarak, mukus içeren örnekler ise iki kat %0.1 dithiothreitol eklendikten sonra 1.500 g devirde beş dakika santrifüj edildi ve üst kısımları atıldı. Çökeltiler

tuzlu fosfat tampon (PBS) solüsyonu ile sulandırıldıktan sonra 500 µl'si DNA izolasyonu için -20°C'ye kaldırıldı. Kalan örnek 1.500 g devirde beş dakika daha santrifüj edildi ve çökelti lamlara yayılıp havada kurutuldu. Daha sonra May Grünwald/Giemsa, modifiye toluidin mavisi, IFA boyama işlemleri ile boyandı.

Boyama işlemleri: May-Günwald/Giemsa boyama işleminde preparat metanol ile (2-3 dakika) saptandı. Fazlası dökülerek ve tamamen kuruduktan sonra dikey şale içinde bulunan May-Grünwald/Giemsa solüsyonunda beş dakika bekletildi. Daha sonra distile su ile preparat yıkandı. Ayrı bir dikey şale içerisindeki Giemsa solüsyonunda (distile su ile 1/20 seyreltilmiş) 15 dakika bekletildikten sonra musluk suyu ile yıkandı. Preparat oda sıcaklığında kuruduktan sonra immersiye objektifinde (x100) incelendi⁽¹³⁾.

Modifiye toluidin mavisi boyama yöntemi için preparatlar dikey şale içerisinde bulunan "sulfation reagent" (30 ml glacial asetik asit ve 10 ml sülfirik asit karıştırılarak hazırlandı) solüsyonu içine yerleştirildikten sonra 10 dakika bekletildi. Akar durumdaki musluk suyu altında yıkanan preparatlar dikey şaledeki Toluidine blue-O solüsyonu içerisinde üç dakika bekletildi. Ardından önce %95, sonra %100 etil alkolde 10'ar saniye tutuldu ve ksilen içine daldırılarak boyama tamamlandı. Preparat oda sıcaklığında kuruduktan sonra immersiye objektifinde (x100) incelendi⁽¹⁴⁾.

Immun floresan antikor boyama yöntemi için lama yayılan örnekler, kitin (MonoFluo TM *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit R, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Fransa) içinden çıkan enzimle ön işleme tutuldu. Daha sonra üzerine murin anti-*P. jirovecii* antikor ve daha sonra floresanla işaretli anti-fare antikor eklenerek boyama gerçekleştirildi⁽¹⁵⁾. Örnekler *P. jirovecii* kist ve trofozoit varlığı açısından floresan mikroskopta incelendi.

DNA izolasyonu: DNA izolasyonu amacıyla saklanan 500 µl BAL örnekleri -20°C'den oda sıcaklığına çıkarıldı. Örnekler üzerine 3 µl Zymolase (ZymoResearch, ABD) eklendi ve 37°C'de bir saat inkübe edildi. Sonrasında 3.000 g devirde 10 dakika santrifüj edildi

ve süpernatant kısım atıldıktan sonra "Purelink Genomik DNA" mini kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) kullanılarak izolasyon işlemlerine geçildi⁽¹⁶⁾. Çökelti üzerine 180 µl "Purelink Genomic Digestion Buffer" ve 20 µl proteinaz K eklenip örnekler vorteksleildi. Ardından 55°C'de 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra kit içerisinde bulunan 20 µl RNase A eklenildikten sonra iki dakika daha inkübe edildi. Maksimum hızda oda ısısında beş dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısmı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildikten sonra üzerine 200 µl "PureLinkR Genomic Binding Buffer" eklenip vorteksleildi. Üzerine 200 µl %100 etanol eklendi ve beş saniye daha vorteksleildi. Spin kolon yerleştirilmiş koleksiyon tüplerine hazırlanan tüm karışım boşaltıldı ve 10.000 g devirde bir dakika oda ısısında santrifüj edildi. Koleksiyon tüpleri yenileri ile değiştirildikten sonra 500 µl "Wash Buffer 1" eklenip 10.000 g devirde bir dakika oda ısısında santrifüj edildi. Koleksiyon tüpleri tekrar yenileri ile değiştirildikten sonra 500 µl "Wash Buffer 2" eklenip en yüksek devirde üç dakika oda ısısında santrifüj edildi. Spin kolonlar steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri üzerine yerleştirildi ve 100 µl "PureLinkR Genomic Elution Buffer" eklendikten sonra oda ısısında bir dakika inkübe edildi. En yüksek devirde bir dakika oda ısısında santrifüjlendikten sonra saflaştırılmış DNA içeren örnekler üç ayrı mikrosantrifüj tüpüne yaklaşık 33 µl olarak dağıtıldı. Tüpler real time PCR yöntemi uygulanana kadar -20°C'de korundu.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu: Gerçek zamanlı PCR yöntemi *P. jirovecii*'nin (Gen Bank erişim No. AF026546) 166 bp'lik *cdc2* gen bölgesi kullanılarak Arcenas ve ark.⁽¹⁷⁾ tanımladığı şekliyle uygulandı. Amplifikasyon için iki primer [(forward (5'-AGG TAG GAG AAG GTA AGA AA-3') reverse (5'-GCT GTG CTT GGA ACC C-3')) ve bir çift hibridizasyon probu [(5'-GAT CTT GAA AAT GGC ACA ATA GTA G-fluorescein-3') ve (5'-Red 640-TTA AAA AAA TCC GGC TAG AAG CAG AAG-phosphate-3')] seçildi. Tüm PCR reaksiyonları için "LightCycler "PCR cihazı (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) ve "LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes" kiti (Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science 68298 Mannheim Germany) kullanıldı. Her reaksiyon için son hacim 20

µl (15 µl master miks, 5 µl hasta DNA'sı) olacak şekilde ayarlandı. Master miks karışımı 9.0 µl PCR-grade su, 1.6 µl MgCl₂ solüsyonu, 1'er µl her bir primerler, 0.2'şer µl her bir prop ve 2 µl enzim karışımından oluşmaktaydı. Amplifikasyon, 95°C'de 10 dakika bekleme ardından 45 siklus (95°C'de 10 saniye, 55°C'de 15 saniye, 72°C'de 15 saniye) olarak yapıldı. Bazal seviyenin üzerinde bir floresan elde edildiği zaman sonuçlar pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak daha önceden pozitif olduğunu bildiğimiz bir DNA örneği, negatif kontrol olarak PCR-grade su kullanıldı.

Pneumocystis jirovecii dışında BAL örnekleri bakteri mikobakteri, mantar ve sitomegalovirus (CMV) varlığı açısından da değerlendirildi. Örneklerden bakteri ve mantar etkenlerini aramak için konvansiyonel ekim yapıldı⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Invazif aspergilloz tanısına destek olmak için kan ve BAL galaktomannan testi Platelia *Aspergillus* Antijen kiti (Bio Rad Lab; Marnes, Fransa) ile kitin önerileri doğrultusunda çalışıldı. Arda arda gelen iki kan örneğinin optik indeksinin ≥ 0.5 ; BAL örneklerinde ise optik indeksin ≥ 1 olması invaziv aspergilloz lehine değerlendirildi⁽²¹⁾. Mikobakteri belirlenmesi için asite dirençli boyama ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri ile BD BACTEC™ MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) ekim yapıldı⁽¹⁹⁾. BAL CMV belirlenmesinde gerçek zamanlı PCR testleri (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, ABD) kullanıldı ve değer (>500 IU/ml) olduğu zaman pozitif kabul edildi⁽²²⁾.

BULGULAR

Çalışmamıza Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Uygulama Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na pnömoni etiyolojisi amacıyla BAL örneği yollanan, yaşları 18-90 (ortalama 53.02 yaş) arasında değişen 32'si kadın, 68'i erkek olmak üzere 100 hasta dâhil edildi. Hastaların altta yatan hastalıkları Tablo 1'de özetlendi. Hastaların 17'sine herhangi bir altta yatan hastalık saptanamamış olup, bu hastalara yalnızca pnömoni ön tanısı ile bronkoskopi yapıldı. Diğer 83 hastada tabloda da görüldüğü gibi PCP açısından risk oluşturacak hastalıklar vardı.

Tablo 1. Hastaların altta yatan hastalıkları.

Altta Yatan Hastalık	Alt Tipi	Sayı
Hematolojik maligniteler (34)	AML	14
	ALL	7
	Lenfoma	7
	KLL	5
	MM	1
Solid tümörler (9)	AC Kanseri	5
	Diğerleri*	4
Organ nakilleri (9)	Böbrek Transplantasyonu	8
	Karaciğer Transplantasyonu	1
Kronik otoimmün veya inflamatuvar AC Hst (30)	İnterstisyel Akciğer Hastalığı	6
	Aktif veya Geçirilmiş Tüberküloz	5
	Astım	3
	Hipersensitivite Pnömonisi	3
	KOAH	2
	Kronik Eozinofilik Pnömoni	2
	Polimiyozit	2
	Wegener	2
	Sarkoidoz	1
	Nefrotik Sendrom	1
	Nörobeyhçet	1
	Parkinson	1
	Romotoid Artrit	1
Miks hastalık (1)	ALL ve AC Kanseri	1
Altta yatan hastalığı belirlenememiş olanlar (17)		17
TOPLAM		100

AML: Akut myeloid lösemi; ALL: Akut lenfoid lösemi; KLL: Kronik lenfoid lösemi; MM: Multiple myeloma; KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı;

*Üçü beyin tümörü, biri mide kanseri

Yalnızca bir hastada gerçek zamanlı PCR yöntemi ile PCP pozitifliği saptandı. Akut myeloid lösemisi (AML) olan hematolojik maligniteli bir hastaydı. Hasta klinik olarak semptomlarının azalması ve akciğer tomografi bulgularının düzelmesiyle trimetoprim sülfometakzazol (TMP-SXT) tedavisinden yarar gördü. Bu hastanın diğer bütün etiyolojiye yönelik tetkikleri (bakteri, mikobakteri, mantar üremesi ve BAL galaktomannan indeks değeri ile BAL CMV değeri) negatif kaldı. Ancak sitolojik ve immunflorasan boyama yöntemleriyle hiçbir hastada pozitiflik bulunamadı.

Tüm hastalar değerlendirildiğinde %33'ünde bir enfeksiyon etkeni saptandığı görüldü (Tablo 2). Tablo 2'de de görüldüğü gibi, en fazla etken hematolojik malignite grubunda belirlendi. Bakteriyal enfeksiyonu olan toplam 12 hastanın beşinde *Pseudomonas*

Tablo 2. Hastaların BAL örneklerinde saptanan *Pneumocystis jirovecii* dışı etkenlerin dağılımı.

Hastalık Grubu (n/etken pozitifliğinin yüzdesi)	Etkenler
Hematolojik malinite (34/38.2)	Bakteriyal enfeksiyon (5 hasta) İPA (4 hasta) CMV enfeksiyonu (3 hasta) PCP (1 hasta)
Solid tümörler (9/22.2)	İPA (1 hasta)
Organ nakilleri (9/22.2)	Tbc enfeksiyonu (1 hasta) Bakteriyal enfeksiyon (1 hasta)
Kronik otoimmün veya inflamatuvar AC Hst (30/30)	İPA (1 hasta) Bakteriyal enfeksiyon (4 hasta) İPA (3 hasta)
Altta yatan hastalığı belirlenememiş olanlar (17/ 23.5)	Tbc enfeksiyonu (1 hasta) CMV enfeksiyonu (1 hasta) Bakteriyal enfeksiyon (2 hasta)
Miks hastalığı olanlar (1)*	İPA (2 hasta) Tbc enfeksiyon (1 hasta) CMV enfeksiyonu (1 hasta) CMV enfeksiyon (1 hasta)
Toplam (100/33)	Toplam (33)

AML: Akut myeloid lösemi; ALL: Akut lenfoid lösemi; KLL: Kronik lenfoid lösemi; MM: Multiple myeloma; KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı;

*Üçü beyin tümörü, biri mide kanseri

aeruginosa, üçünde *Acinetobacter baumannii*, ikisinde *Escherichia coli*, birinde *Stenotrophomonas maltophilia* ve bir hastada da aynı anda *Enterobacter cloacae* ile *P. aeruginosa* üremesi olduğu görüldü. İnvazif pulmoner aspergilloz (İPA) tanısı 11 hastaya kondu. Bunlarda sekiz tanesi yalnızca BAL galaktomannan (GM) testi ile (optik indeks $\geq$ 1), bir tanesi *Aspergillus fumigatus* üremesi ile iki tanesi ise hem *Aspergillus* üremesi hem de GM pozitifliği ile belirlendi. Üç hastada *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi saptanırken, altı hastada tedaviye gereksinim duyulan BAL CMV DNA pozitifliği (>500 IU/ml) olduğu belirlendi⁽²²⁾.

TARTIŞMA

Pneumocystis pnömonisi, 1980'li yıllardan önce oldukça ender bir hastalıkken, dünya çapındaki HIV epidemisi nedeniyle bu hasta grubunda sıklıkla görülmeye başlamıştır. Ancak antiretroviral tedavideki gelişmeler ve yoğun olarak kullanılan profilaksi bu hasta grubunda PCP sıklığını düşürmüştür⁽²³⁾. Günümüzde genel durumu bozuk immüno kompromize hastaların artması ile PCP'nin önemi bu gruba

kaymıştır⁽²⁴⁾. Çalışmamızın esas hedefi, hastanede yatan HIV negatif hastalardan alınan BAL örneklerinde *P. jirovecii* aranmasıdır. Ancak BAL'ın değerli bir örnek olması nedeniyle diğer etkenlerin dağılımına da bakılmıştır.

Pneumocystis pnömonisi, HIV negatif genel durumu bozuk hastalarda mortalitesinin yüksek olması nedeniyle önemlidir. Yapılan çalışmalarda, HIV pozitif hastalarda mortalite %7-20'iken, HIV negatif genel durumu bozuk hastalarda mortalite %29-60 olarak bulunmuştur⁽²⁵⁾. Bu nedenle, üçüncü basamak hastanelerde solunum yolu örneklerinde, özellikle altın standart olan BAL örneklerinde *P. jirovecii*'nin aranması gerekir. Bronkoskopik örnek almada bir standardizasyon olmaması bu örneğin değerini düşürmekle beraber yine de BAL örneğinin PCR ile PCP açısından negatif kalması ampirik olarak başlanan spesifik tedavinin kesilmesini düşündürmektedir⁽²⁶⁻²⁷⁾. İlk olarak, 1990 yılında Wakefield et al⁽²⁸⁾ PCP tanısı için PCR tekniği geliştirilmiş olup, günümüzde gerçek zamanlı PCR en duyarlı yöntem olarak kabul edilmektedir⁽²⁹⁾.

Bu çalışmada, gerçek zamanlı PCR ile yapılan tarama- da yalnızca bir hastada (%1) pozitiflik saptanmıştır. Dünya ve ülkemizdeki diğer çalışmalar (%8-70) ile merkezimizde yapılan önceki çalışmaya (%21) göre çalışmamızda oldukça düşük bir oran elde edilmiştir^(3,6,7,30-32). Bu farkın birçok nedeni olabilir. Çalışmalarda, farklı PCR formatları ve farklı gen böl- geleri kullanılmaktadır. Örneğin, merkezimizde yapı- lan önceki çalışmada mitokondriyal ribozomal RNA'nın iki bölgesi nested PCR ile çoğaltılmıştır⁽⁷⁾. Bu çalışmada ise, *cdc 2* gen bölgesi daha duyarlı kabul edilen gerçek zamanlı PCR ile aranmıştır. Ayrıca çalış- maların birçoğunda ve bu çalışmada da internal kontrol bulunmamaktadır. Bu çalışmanın bir eksikliği- dir. Bununla beraber, daha özgül ve duyarlı kabul edilen gerçek zamanlı PCR kullanılması ve her ne kadar duyarlılığı düşük olsa da boyama yöntemleri- nin de negatif kalması çalıştığımız hasta grubunda *P. jirovecii* sıklığının belki de raslantısal olarak düşük olduğunu düşündürebilir. Çalışmamızda ayrıca, beta glukan testi de kullanılmamıştır. Bu testin PCP olgula- rında yüksek olduğu bilinmektedir⁽³³⁾. Ancak, çalışma grubumuz, genel durumu bozuk hastanede uzun süre yatan ve diğer mantar enfeksiyonları açısından yüksek riskli bir gruptur. Bu nedenle, panfungal bir test olan ve ülkemizde geri ödemesi bulunmayan beta glukanın tanıda çok yararlı olamayacağı düşü- nülmüştür.

Bronkoalveolar lavaj genel durumu bozuk hastalarda kolay yapılamadığı için değerli bir örnektir. Bu çalış- mada da bu nedenle diğer etkenler de incelenmiştir. Hastaların ortalama %33'ünde bir etkene ulaşmak önemlidir. Genel durumu bozuk bu hastalar sıklıkla çok sayıda antimikrobiklerle tedavi edilmektedirler. En azında belli bir kısmında etiyolojiye ulaşmak özgün tedavi için iyi bir şanstır. Böylece ilaçlarla ilişki- li yan etkiler azalacak ve maliyet de düşecektir.

Sonuç olarak, bu çalışmada boyama yöntemleri ve gerçek zamanlı PCR ile PCP oranı düşük bulunmuştur. Daha fazla hastalarla yapılacak çalışmalarda daha yüksek oranlar elde edilebilir. Bununla beraber, BAL örnekleri genel durumu bozuk hastalarda etiyolojiye ulaşma açısından önemlidir.

Etik kurul onayı: Çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 2014- 12/1 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal destek: Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından KUAP(T)-2014/37 [İmmün Yetmezlikli Hastaların Bronş Lavajı (BL) ve Bronkoalveolar Lavaj (BAL Örneklerinden Real-Time Polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), İmmunofloresans (IF) ve Direkt Mikroskopi Yöntemleriyle *Pneumocystis jirovecii* saptanması] numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Bursa Uludag University, Medical Faculty, Clinical Research Ethics Committee (2014- 12/1).

Conflict of Interest: No conflict of interest was dec- lared by the authors.

Funding: Uludag University Scientific Research Projects Unit [Project No. KUAP(T)-2014/37].

KAYNAKLAR

1. Miguel Montanes R, Elkrief L, Hajage D, et al. An outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2018;20(5): e12956. <https://doi.org/10.1111/tid.12956>
2. Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med*. 2004;350(24):2487-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032588>
3. Töz S, Gündüz C, Tetik A ve ark. *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi tanısında mikroskopi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması: Klinik bulgular ile yorumlanması. *Tuberk Toraks*. 2017;65(3):220-6. <https://doi.org/10.5578/tt.58625>
4. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):297-317. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-12>
5. Ding CH, Yusoff H, Muttaqillah NAS, et al. The crucial role of molecular testing to facilitate the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* during pregnancy. *Malays J Pathol*. 2018;40(1):69-72.
6. Tekinşen FF, Koç AN. Klinik örneklerde çeşitli yöntemlerle *Pneumocystis jirovecii* araştırılması.

- Mikrobiyol Bul. 2013;47(4):658-67.
https://doi.org/10.5578/mb.5884
7. Özmen A, Mistik R, Alver O, Coşkun F, Ursavaş A, Uzaslan E. Bronkoalveolar lavaj (BAL) ve bronşiyal lavaj yapılan hastalardaki *Pneumocystis jirovecii* kolonizasyonu ve tanıda kullanılan yöntemlerin karşılaştırması. Tuberk Toraks. 2013;61(4):303-11.
https://doi.org/10.5578/tt.2954
 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.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073099
 9. Tosun I, Buruk K, Dede R, Kaklıkaya N. İmmün yetmezliği olan hastaların solunum yolu örneklerinde PCR, IFA ve Giemsa boyama yöntemleriyle *Pneumocystis jirovecii*'nin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2013;47(1):195-7.
https://doi.org/10.5578/mb.4292
 10. Cushion MT. *Pneumocystis*. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press, 2015:2015-29.
 11. Ma L, Cissé OH, Kovacs JA. A molecular window into the biology and epidemiology of *Pneumocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2018;31(3):e00009-18.
https://doi.org/10.1128/CMR.00009-18
 12. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185(9):1004-14.
https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0320ST
 13. Korkmaz M, Ok ÜZ. May Grünwald boyama yöntemi. Korkmaz M, Ok ÜZ (Eds). Parazitolojide Laboratuvar (kitabında). Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:23, İzmir: META Basım, 2011;70.
 14. Gosey LL, Howard RM, Witebsky FG, 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.
https://doi.org/10.1128/JCM.22.5.803-807.1985
 15. BioRad. MONOFLUO *Pneumocystis jirovecii* IFA Test Kit 2020. [https://www.biorad.com] (Erişim tarihi: 23. Ekim.2020).
 16. Thermo Fisher Scientific. PureLink™ Genomic DNA Mini Kit 2020. [https://www.thermofisher.com] (Erişim tarihi: 23.10.2020)
 17. Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, et al. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;54(3):169-75.
https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.08.006
 18. Garcia LS. Respiratory Tract Cultures. In: Garcia LS (Ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook Washington DC: ASM Press, 2007:320-42.
 19. Garcia LS. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In: Garcia LS (Ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook Washington DC: ASM Press, 2007:1071-4.
 20. Garcia LS. Viruses and chlamydiae. In: Garcia LS (Ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook Washington DC: ASM Press, 2007:1631-73.
 21. Ullmann AJ, Aguado JM, Arıkan-Akdağlı S et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clin Microbiol Infect. 2018;24(Suppl 1):e1-38.
https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.002
 22. Boeckh M, Stevens-Ayers T, Travi G, et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in bronchoalveolar lavage fluid from hematopoietic stem cell transplant recipients with CMV pneumonia. J Infect Dis. 2017;215(10):1514-22.
https://doi.org/10.1093/infdis/jix048
 23. Pulvirenti J, Herrera P, Venkataraman P, Ahmed N. *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients in the HAART era. AIDS Patient Care STDS. 2003;17(6):261-5.
https://doi.org/10.1089/108729103322108139
 24. Tasaka S. Recent Advances in the diagnosis and management of *Pneumocystis pneumonia*. Tuberc Respir Dis. 2020;83(2):132-40.
https://doi.org/10.4046/trd.2020.0015
 25. Bateman M, Oladele R, Kolls JK. Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A review of current methods and novel approaches. Med Mycol. 2020;58(8):1015-28.
https://doi.org/10.1093/mmy/myaa024
 26. Huang L, Hecht FM, Stansell JD, Montanti R, Hadley WK, Hopewell PC. Suspected *Pneumocystis carinii* pneumonia with a negative induced sputum examination. Is early bronchoscopy useful? Am J Respir Crit Care Med. 1995;151(6):1866-71.
https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.6.7767533
 27. Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. Infection. 2009;37(3):261-5.
https://doi.org/10.1007/s15010-008-8027-x
 28. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. Lancet. 1990;336(8713):451-3.
https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92008-6

29. Durgut EG, Kustimur S, Aydin M, Kalkanci A, Al FD. Comparison of real-time PCR, indirect immunofluorescence antibody assay, and different staining techniques for the diagnosis of *Pneumocystis*. Ann Med Res. 2020;27(1):244-51. <https://doi.org/10.5455/annalsmedres.2019.10.625>
30. Lamas LM, Rodríguez MTP, Alvarez IA, Soage MEB, Lamas MPF, Fernández MA. Role of *Pneumocystis jirovecii* in patients with different pulmonary underlying condition using a nested-PCR. Rev Esp Quimioter. 2018;31(4):336-43.
31. Santos CR, Assis AM, Luz EA, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by nested PCR in HIV-negative patients with pulmonary disease. Rev Iberoam Micol. 2017;34(2):83-8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2015.12.002>
32. Mori H, Ohno Y, Ito F, et al. Polymerase chain reaction positivity of *Pneumocystis jirovecii* during primary lung cancer treatment. Jpn J Clin Oncol. 2010;40(7):658-62. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyq040>
33. Corpo O, Butler-Laporte G, Sheppard DC, Cheng MP, McDonald EG, Lee TC. Diagnostic accuracy of serum (1-3)- β -D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2020;26(9):1137-43. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.024>