

İmmün Yetmezliği Olan Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde PCR, IFA ve Giemsa Boyama Yöntemleriyle *Pneumocystis jirovecii*'nin Araştırılması

Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in Respiratory Samples of Immunocompromised Patients with PCR, IFA and Giemsa Staining Methods

İlknur TOSUN, Kurtuluş BURUK, Ruşen DEDE, Neşe KAKLIKKAYA

Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
Karadeniz Technical University Farabi Hospital, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 20.08.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.09.2012

ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii is an important opportunistic agent leading to pneumonia in immunocompromised patients. In this study, the presence of *P.jirovecii* were investigated by using Giemsa stain, indirect fluorescent antibody (IFA) test and two different nested polymerase chain reaction (nPCR) assays in respiratory samples obtained from 50 immunocompromised patients presenting with respiratory symptoms. The target genes used for nested PCR were mitochondrial large subunit ribosomal RNA (MtLSUrRNA) and internal transcribed spacer (ITS) region. *P.jirovecii* was detected in 7 (14%) and 11 (22%) respiratory samples by IFA and PCR, respectively, although all samples were negative with Giemsa stain. As a result, IFA and PCR were found to be rapid and reliable tests for the diagnosis of *P.jirovecii* infections and they should better be used together for accurate diagnosis.

Key words: *Pneumocystis jirovecii*; PCR; immunofluorescence; immunocompromised patient; diagnosis.

Sayın Editör,

Pneumocystis jirovecii, özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde ciddi pnömoni etkeni olan atıpkı fungal bir fırsatçı patojendir. *Pneumocystis* pnömonisi (PCP) gelişimi açısından risk altında olan kişiler arasında, HIV pozitif bireyler, malignensili hastalar, immünosüpresif tedavi alan kişiler, transplant alıcıları ve bağışıklık sistemi yetersiz kişiler sayılabilir¹. Etkin tedavi ve profilaksiye rağmen AIDS dışında immün yetmezliği olan kişilerde bile mortalitenin %15-40 arasında olduğu bildirilmektedir². *P.jirovecii* kültürde

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. İlknur Tosun, Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 462 377 5000/7770, **E-posta (E-mail):** itosun@ktu.edu.tr

üretilemediği için PCP tanısı solunum yolu örneklerinde çeşitli sitolojik (Giemsa, toluidin mavisi vb.) ve immüno Floresan boyama yöntemleri ile hazırlanmış preparatlarda *P.jirovecii* kist ve trofozoitlerinin mikroskopik olarak gösterilmesi ile konulmaktadır. Son yıllarda ise klinik örneklerde moleküler yöntemlerle mikroorganizmanın daha duyarlı olarak saptandığı gösterilmiştir³.

Etik Kurul onayı ile (Protokol no: 2011/ 69) gerçekleştirilen bu çalışmaya, Mayıs 2011-Ağustos 2012 tarihleri arasında Anabilim Dalımız Hasta Hizmetleri laboratuvarına gelen, immün sistemi baskılanmış 50 hastanın solunum yolu örneği alınmıştır. Mukuslu örnekler 1M dithiothreitol (DTT) ile 1/1 oranında muamele edildikten sonra, diğerleri ise herhangi bir ön işlem yapılmadan santrifüj edilmiş ve oluşan çökelti 1 ml fosfatlı tampon (PBS) ile çözülmüştür. Örneklerden mikroskopik inceleme için ikişer preparat hazırlanmış; bunların biri Giemsa boyası ile, diğeri indirekt floresan antikor (IFA) yöntemi (Pneumo cell-Cel-labs, Avustralya) ile boyanarak incelenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi için klinik örneklerden DNA izolasyonu ticari kit ile (Qiagen DNeasy Tissue Minikit, Almanya) yapılmış; DNA örnekleri mtLSUrRNA (mitochondrial large subunit ribosomal RNA) ve ITS (internal transcribed spacer) bölgelerine özgül primerlerle, Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 cihazında, literatür verileri ışığında "nested PCR (nPCR)" yöntemi ile çoğaltılmıştır⁴. Örneklerin mikroskopik incelemesinde IFA yöntemiyle 7 (%14) hastada *P.jirovecii* pozitif bulunmuş; Giemsa ile boyanan örneklerin hepsi negatif sonuç vermiştir. İki farklı primer dizisi ile gerçekleştirilen nPCR yöntemiyle 11 (%22) örnekte pozitif sonuç elde edilmiş; bu 11 örneğin 2 (%18.2)'sinde sadece mtLSUrRNA'ya özgül dizilerle çoğalma gözlenmiştir. PCR ile pozitif bulunan dört hasta örneğinin IFA boyamasında *P.jirovecii* tespit edilememiştir.

P.jirovecii genellikle AIDS'li hastaların %80'inde saptanmakta ve olguların %60'ında başlangıç bulgusu olarak görülmektedir⁵. Bizim çalışmamızda, HIV pozitif olan üç hastada hem IFA hem de PCR ile *P.jirovecii* pozitif olarak saptanmış; Giemsa boyama ile hiçbir hastada pozitiflik bulunamamıştır. Klasik boyama yöntemlerinin maliyetinin ucuz, çalışma süresinin daha kısa olması gibi avantajları olmasına rağmen, duyarlılıklarının düşük, değerlendirmenin subjektif olması ve tecrübeli teknisyen gerektirmesi gibi dezavantajları vardır. Tuncer ve arkadaşları⁶ yaptıkları çalışmada, immün sistemi baskılanmış hastalara ait balgam örneklerinde Giemsa boyamanın duyarlılığının düşük olduğunu, tek başına PCR pozitifliğinin ise özellikle HIV pozitif bireylerde dikkatli yorumlanması gerektiğini vurgulamışlardır. Gupta ve arkadaşları⁷ ise, immün yetmezliği olan HIV negatif olgularda tek başına PCR pozitifliğinin enfeksiyonun tanısında yeterli olabileceğini öne sürmüşlerdir. Diğer bir çalışmada da, moleküler yöntemlerin mikroskopik yöntemlere göre duyarlılığının daha yüksek olduğu, ancak klinik bulgularla beraber yorumlanması gerektiği önerilmiştir⁸. Çalışmamızda IFA ve PCR yöntemiyle elde edilen sonuçların uyumlu olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak immün sistemi baskılanmış hastalarda PCP'nin erken tanı ve tedavisinin sağlanmasında Giemsa boyama yönteminin yetersiz olduğu, IFA ve/veya PCR'nin rutin olarak uygulanması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Rodriguez M, Fishman JA. Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 770-82.
2. Monnet X, Vidal-Petiot E, Osman D, et al. Critical care management and outcome of severe pneumocystis pneumonia in patients with and without HIV infection. Crit Care Med 2008; 12(1): 1-10.
3. Elvin K. Laboratory diagnosis and occurrence of *Pneumocystis carinii*. Scand J Infect Dis 1994; 94(Suppl): 1-34.
4. Lu JJ, Chen C, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. J Clin.Microbiol 1995; 33(10): 2785-8.
5. Wazir JF, Ansari NA. *Pneumocystis carinii* infection. Update and Review. Arch Pathol Lab Med 2004; 128(9): 1023-7.

6. Tuncer S, Ergüven S, Kocagöz S, Unal S. Comparison of cytochemical staining, immunofluorescence and PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* on sputum samples. Scand J Infect Dis 1998; 30(2): 125-8.
7. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, et al. Diagnostic significance of nested polymerase chain reaction for sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64(4): 381-8.
8. Jarboui MA, Sellami A, Sellami H, et al. Molecular diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients. Mycoses 53(3): 329-33.