

Pneumocystis jirovecii İzolatlarının Dihidropteroat Sentaz (DHPS) Gen Mutasyonları ve Mitokondriyal Büyük Alt Birim (mtLSU) rRNA Genotip Varyasyonlarının Belirlenmesi

Dihidropteroate Synthase (DHPS) Gene Mutations and Mitochondrial Large Subunit (mtLSU) rRNA Genotype Variations in *Pneumocystis jirovecii* Strains

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

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

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

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

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

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş olup (Proje no: 2017-1-TP3-2262), Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora tezi olarak hazırlanan çalışmanın bir bölümünü oluşturmaktadır.

** Bu çalışma, TMC 2020 Çevrim İçi Mikrobiyoloji Sempozyumu (25-27 Aralık 2020, Türkiye)'nda poster olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Gülbudak H, Öztürk C, Kuyugöz S, Tezcan Ülger S. *Pneumocystis jirovecii* izolatlarının dihidropteroat sentaz (DHPS) gen mutasyonları ve mitokondriyal büyük alt birim (mtLSU) rRNA genotip varyasyonlarının belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2021;55(1):41-52.

ÖZ

Pneumocystis jirovecii, HIV/AIDS ve immün sistemi baskılanmış hastalarda *Pneumocystis* pnömonisine (PCP) neden olan atipik bir fungusdur. PCP profilaksi ve tedavisinde sülfam ve sülfon grubu içeren ilaçlar yaygın olarak kullanılır. Özellikle trimetoprim sulfametoksazol (TMP-SMX)'un, uzun süreli kullanılması *P.jirovecii* dihidropteroat sentaz (DHPS) geninde ilaç direnci ile ilişkili belirli nokta mutasyonlara neden olmaktadır. Ayrıca, DHPS ve mitokondriyal büyük alt birim [mitochondrial large subunit (mtLSU)] rRNA genotip karakterizasyonu *P.jirovecii* epidemiyolojisi hakkında önemli veri sağlamaktadır. Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Hastanesinde, immün sistemi baskılanmış hastalardan izole edilen *P.jirovecii* izolatlarının DHPS ve mtLSU rRNA gen bölgesi polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmaya, Ağustos 2016-Şubat 2018 tarihleri arasında 96 hasta örneğinden mtLSU-rRNA nested PCR ile pozitif bulunan 16 *P.jirovecii* örneği dahil edilmiştir. *P.jirovecii* mtLSU rRNA genotipleri dizi analizi yapılarak 85. ve 248. nükleotit pozisyonundaki polimorfizmlere göre belirlenmiştir. DHPS bölgesi, 165. ve 171. nükleotit pozisyonları mutasyon analizi için nested PCR ve RFLP yöntemi uygulanmıştır. DHPS mutasyon analizinde 16 *P.jirovecii* örneğinin 12 (%75)'sinde vahşi tip (W165/W171), 4 (%25)'ünde ise mutant tip (M165/W171) tespit edilmiştir. Mutant tiplerin ikisi PCP ve HIV/AIDS tanısı ve profilaksi öyküsü olan; diğer ikisi kolonizasyon tespit edilen hasta örnekleridir. Çalışmadaki 16 hastanın 3 (%19)'ünde profilaksi öyküsü

İletişim (Correspondence): Dr. Harun Gülbudak, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 33343 Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324 241 0000/22393, **E-posta (E-mail):** harungulbudak@gmail.com

kaydedilmiş ve bu 3 hastanın ikisinde mutant tip saptanmıştır. mtLSU-rRNA analizine göre 16 *P.jirovecii* izolatından 3 farklı genotip elde edilmiştir. Bölgemizde en sık genotip 2 %43.75 (n= 7), ikinci sıklıkta genotip 1 %37.5 (n= 6) ve en az genotip 3 %18.75 (n= 3) tespit edilmiştir. Bölgemizde genotip 4 görülmemiştir. DHPS ve mtLSU-rRNA multilokus olarak değerlendirildiğinde beş farklı genotip gözlenmiştir. Sonuç olarak, bu bulgular bölgemizdeki *P.jirovecii* epidemiyolojisi hakkında önemli veriler sağlamış ve potansiyel ilaç dirençli suşların immünsupresif hastalarda bulaş riski taşıdığını göstermiştir. Bölgemizde ve ülkemizde *P.jirovecii* epidemiyolojisini daha iyi tanımlayabilmek için daha fazla *P.jirovecii* izolatını içeren çok merkezli çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: *Pneumocystis jirovecii*; dihidropteroat sentaz (DHPS) mutasyonu; mtLSU rRNA analizi; genotiplendirme.

ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii is an atypical fungus that causes *Pneumocystis pneumonia* (PCP) in HIV/AIDS and immunocompromised patients. Antibiotics containing sulfa and sulfone groups are widely used in PCP prophylaxis and treatment. Especially, long-term use of trimethoprim sulfamethoxazole (TMP-SMX) is known to cause certain point mutations associated with drug resistance in the *P.jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) gene. In addition, DHPS and mitochondrial large subunit (mtLSU) rRNA genotype characterization provides important data on the epidemiology of *P.jirovecii*. In this study, it was aimed to investigate the DHPS and mtLSU rRNA gene polymorphisms of *P.jirovecii* strains isolated from immunocompromised patients in Mersin University Hospital. In this study, 16 *P.jirovecii* positive samples, which isolated from 96 patients samples, between August 2016 and February 2018, were included. *P.jirovecii* mtLSU rRNA genotypes were determined by sequence analysis according to polymorphisms at the 85th and 248th nucleotide positions. Nested PCR and RFLP method was applied for mutation analysis of DHPS locus, 165th and 171st nucleotide positions. In the DHPS mutation analysis, 12/16 (75%) wild type (W165/W171) and 4/16 (25%) mutant type (M165/W171) were detected. Two mutant types belonged to HIV/AIDS positive patients with PCP and had a history of prophylaxis; the other 2 mutant types belonged to patients with colonization. In the study, a history of prophylaxis in 3 (19%) of the 16 patients were recorded, and mutant type was detected in these 2 of 3 patients. According to mtLSU-rRNA analysis, 3 different genotypes were obtained from 16 *P.jirovecii* isolates. In our region, genotype 2 (43.75%; n= 7) was the most common genotype, genotype 1 (37.5%; n= 6) was the second common and genotype 3 (18.75%; n= 3) was the least one. Genotype 4 was not detected in our region. When DHPS and mtLSU-rRNA were evaluated as multilocus, five different genotypes were observed. As a result, these findings provided important data on *P.jirovecii* epidemiology in our region and potential drug-resistant strains showed a risk of transmission in immunosuppressive patients. Multicenter studies involving more *P.jirovecii* isolates are needed to better define the epidemiology of *P.jirovecii* in our region and in our country.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*; dihydropteroate synthase (DHPS) mutation; mtLSU rRNA analysis; genotyping.

GİRİŞ

Pneumocystis jirovecii, önceki adıyla *Pneumocystis carinii*, immün sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı enfeksiyona neden olan atipik bir fungustur¹. *P.jirovecii* enfeksiyonu kistlerin solunum yoluyla alınması sonucu bulaşmakta ve genellikle asemptomatik seyretmektedir. Ancak immünsupresif hastalarda ve özellikle AIDS'lilerde ciddi pnömoniye neden olmaktadır^{1,2}. *Pneumocystis* pnömonisi (PCP), önceki yıllarda insan immün yetmezlik virüsü/kazanılmış immün yetmezlik sendromu (HIV/AIDS) ilişkili bir hastalık olarak bilinirken, günümüzde profilaksi ve antiretroviral tedavi ile birlikte AIDS ilişkili PCP insidansı büyük oranda azalmış; kemoterapi, kortikosteroid ve antirejeksiyon gibi immün sistemi baskılayıcı tedavi alan hasta sayısının artmasıyla, HIV negatif hastalarda daha yaygın hale gelmiştir².

PCP'den korunma ve tedavide, sülfä ve sülfon grubu içeren ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX), PCP profilaksi ve tedavisinde kullanılan primer ilaçtır^{3,4}. Sülfametoksazol, para-aminobenzoik asidin (PABA) yapısal analogu olup PABA, folat sentez yolunun temel bileşeni olan dihidropteroat sentaz (DHPS) enziminin doğal substratıdır^{4,5}. *P.jirovecii*'de, DHPS enzimini kodlayan folik asit sentez (fas) genindeki iki sinonim olmayan nokta mutasyon, sülfä türevi ilaçlara önceden maruz kalma ile ilişkilidir^{4,6-8}. DHPS bölgesi 165 (A→G) ve 171 (C→T) nükleotit pozisyonlarında meydana gelen bu mutasyonlar, enzimin aktif bölgesindeki proteinde, 55 (Thr→Ala) ve 57 (Pro→Ser) amino asit dizilerinde, yapısal değişime neden olmaktadır^{4,5,9}. Sülfä türevi ilaçların bağlanma bölgesinde meydana gelen değişiklikler ilacın afinitesini ve inhibitör etkisini azaltarak, tedavi ve profilakside başarısızlığa neden olur^{4,6,8}. *P.jirovecii* kültür yöntemleri ile üretilmediği için, ilaç direnci çalışmaları DHPS lokus mutasyon analizine dayanmaktadır⁴.

P.jirovecii genotipleri ve DHPS mutant suşların dağılımı coğrafik bölgelere ve şehirlere göre farklılık göstermektedir¹⁰. *P.jirovecii* genotip karakterizasyonu için DHPS lokus polimorfizmi dışında mitokondriyal büyük alt birim (mitochondrial large subunit, mtLSU) rRNA, "internal transcribed spacer (ITS)" 1 ve 2, sitokrom b ve süperoksit dismutaz gibi farklı lokusların hedeflendiği moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır¹⁰⁻¹². Bu yöntemler arasında mtLSU rRNA ve ITS lokusları en sık kullanılan gen bölgeleridir. MtLSU rRNA tiplendirme için bildirilen polimorfizm miktarı ITS'den daha azdır, ancak gözlenen varyasyonlar, epidemiyolojik soruların ele alınmasında yararlıdır. Bu yöntem, amplifikasyon ve sekans analizine dayanır, genotipler 85. ve 248. nükleotit pozisyonlarındaki polimorfizmlere göre belirlenmektedir^{10,11}.

Moleküler tiplendirme çalışmaları *P.jirovecii*'nin insandan insana bulaş sonucu yayılabileceğini gösterir¹³. Bu yüzden, DHPS bölge mutasyon analizi yapılması ve mtLSU rRNA genotiplerinin belirlenmesi, *P.jirovecii* potansiyel ilaç direnci ve epidemiyolojisi hakkında veri sağlar. Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Hastanesinde, immün sistemi baskılanmış hastalardan izole edilen *P.jirovecii* suşlarının DHPS bölge mutasyonları ve mtLSU rRNA gen bölgesi polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

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

Hastalar ve Örnekler

Bu çalışmaya, Ağustos 2016-Şubat 2018 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Hastanesinde, %75'i immün sistemi baskılayıcı tedavi alan 96 hasta örneğinden (88 balgam, 6 trakeal aspirat ve 2 bronkoalveolar lavaj) "mtLSU-rRNA nested" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucu pozitif olan 16 *P.jirovecii* DNA örneği dahil edildi¹⁴. Çalışmaya dahil edilen hastaların 11 (%69)'i erkek, 5 (%31)'i kadın ve yaş ortalaması 61 ± 12 (yaş aralığı; 40-82) idi. Hastaların altta yatan hastalıklara göre dağılımı ise; altısı kanser, üçü hemato-

lojik malignite, üçü HIV/AIDS, ikisi kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) ve ikisi interstisyel akciğer hastalığı şeklindeydi. On altı hastanın on biri (%68.75) immünsupresif tedavi alan (biri HIV pozitif non-Hodgkin lenfoma), üçü (%18.75) immünkompetan ve diğer ikisi (%12.5) yalnızca HIV/AIDS'ti. *P.jirovecii* tespit edilen hastalarda PCP, olası PCP ve kolonizasyon gibi enfeksiyonun klinik olarak sınıflandırılması daha önce araştırmacılar tarafından kullanılan kriterlere dayanarak; mikroskopi, PCR, klinik ve radyolojik bulgulara göre yapıldı^{15,16}. Buna göre, *P.jirovecii* saptanan hastaların beşi kesin PCP (HIV/AIDS, n= 3; akciğer kanseri, n= 1; interstisyel akciğer hastalığı, n= 1); üçü olası PCP (multipl myelom, n= 1; interstisyel akciğer hastalığı, n= 1; kolanjiosellüler karsinom, n= 1) ve sekizi kolonizasyon olarak tanımlandı¹⁴.

***P.jirovecii* mtLSU-rRNA PCR ve Genotip Analizi**

Mukoid yapıda olan solunum yolu örnekleri, %0.3'lük 1,4-dithiothreitol (DTT) ile muamele edilerek homojenize hale getirildi. Örneklerin DNA izolasyonu "QIAamp DNA blood mini kit" (Qiagen, Almanya) ile kan ve vücut sıvılarından DNA izolasyon protokolü uygulanarak yapıldı.

P.jirovecii mtLSU rRNA gen bölgesini hedefleyen nested PCR yönteminde birinci tur PCR için pAZ102-E ve pAZ102-H; ikinci tur PCR için pAZ102-X ve pAZ102-Y primerleri kullanıldı¹⁷. Her bir örneğin PCR amplifikasyonu 50 µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Birinci tur için PCR reaksiyon karışımı; 5 µl 10XPCR tampon, 2 µmol/µl MgCl₂, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, 0.25 pmol/µl her bir primer, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve 8 µl kalıp DNA'sı içermektedir. İkinci tur PCR bileşenleri benzer şekilde hazırlandı ve birinci tur PCR ürününden 3 µl örnek, kalıp DNA olarak kullanıldı. Örneklerin amplifikasyon koşulları birinci tur için; 94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, arkasından 40 döngü 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1.5 dakika uzama basamakları ve arkasından 72°C'de 5 dakika son uzama basamağı şeklinde uygulandı. İkinci tur amplifikasyon için primer bağlanma sıcaklığı 50°C olacak şekilde aynı termal döngü koşulları kullanıldı. Birinci ve ikinci tur PCR ürünlerinden sırasıyla 346 ve 263 baz çifti (bp) uzunluğunda bant elde edilen örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

İkinci tur PCR amplifikasyon ürünlerine "Bigdye terminator v3.1 cycle sequencing" (Applied Biosystems, ABD) kit kullanılarak dizi analizi gerçekleştirildi. Dizi analizi verileri ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) kromatogram şeklinde toplandı. Dizi analizi sonuçları Chromas programı (Versiyon 2.6.6 Technelysium Pty Ltd, Avustralya) ile değerlendirildi. Elde edilen diziler ve referans *Pneumocystis* dizisi (Genbank accession number M58605.1)¹⁸, çoklu gen hizalama programı olan Clustal X (Versiyon 2.1, İrlanda) ile karşılaştırıldı ve genotip analizi 85. ve 248. nükleotit pozisyonundaki polimorfizmlere göre yapıldı.

Genotip analiz değerlendirmesi *Pneumocystis* mtLSU-rRNA genotipleri daha önce tanımlanmış polimorfizmlere göre yapıldı; genotip 1: 85C/248C, genotip 2: 85A/248C, genotip 3: 85T/248C ve genotip 4: 85C/248T şeklindedir¹⁰.

DHPS Gen Bölgesi PCR ve Mutasyon Analizi

Çalışmada, DHPS bölge mutasyon analizi için ilk olarak DHPS gen bölgesini hedefleyen nested PCR yöntemi uygulandı. Birinci tur PCR için F1 (5'-CCT GGT ATT AAA CCA GTT TTG CC-3') ve B45 (5'-CAA TTT AAT AAA TTT CTT TCC AAA TAG CAT C-3'); ikinci tur PCR için AHUM (5'-GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AAT C-3') ve BN (5'-GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC-3') primerleri kullanıldı^{9,10}. Her bir rneğin PCR amplifikasyonu 50 µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Birinci tur PCR için reaksiyon karışımı; 5 µl 10X PCR tamponu, 2 µmol/µl MgCl₂, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, 0.25 pmol/µl her bir primer, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve 6 µl rnek DNA'sı içermektedir. İkinci tur PCR bileşenleri benzer şekilde hazırlandı ve birinci tur amplifikasyon ürününden 3 µl örnek, kalıp DNA olarak kullanıldı.

Termal döngü profili, ilk tur için 40 döngü, ikinci tur için 35 döngü olarak uygulandı. Örneklerin amplifikasyon koşulları birinci tur için; 94°C'de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonu, ardından 40 döngü; 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 53°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1.5 dakika uzama basamakları ve arkasından 72°C'de 5 dakika son uzama basamağı şeklinde uygulandı. İkinci tur amplifikasyon için primer bağlanma sıcaklığı 55°C olacak şekilde aynı termal döngü programı kullanıldı.

Amplifikasyon rnleri, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 120 voltta 40 dakika elektroforez uygulandıktan sonra ultraviyole altında görüntülendi. Birinci ve ikinci tur PCR ürünlerinden beklenen bantlar sırasıyla, 895 ve 371 bp uzunluđundadır⁹.

DHPS gen bölgesi mutasyon analizi için, ikinci tur PCR rnlerine, Accl (Thermo scientific, ABD) ve HaeIII (Thermo scientific, ABD) restriksiyon enzimleri kullanılarak "restriction fragment length polymorphism (RFLP)" yöntemi uygulandı. RFLP reaksiyonu, her bir örnek için Accl ve HaeIII enzimi ile iki ayrı 21 µl hacimli (9 µl PCR ürünü, 2 µl 10Xbuffer, 9 µl steril distile su ve 1 µl restriksiyon enzimi [10U/µl stok]) reaksiyon karışımı hazırlandı, rnekler 37°C'de 16 saat inkübe edildikten sonra 80°C'de 20 dakika termal inaktivasyon uygulandı. RFLP reaksiyonu ile kesim işlemi yapılan ürünler, etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde 120 voltta 50 dakika elektroforeze tabi tutulduktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülendi. Çalışmada restriksiyon analizi  defa tekrar edilerek doğrulandı.

Mutasyon analiz değerlendirmesi DHPS gen bölgesindeki 165. (Kodon 55) ve 171. (Kodon 57) nükleotit pozisyonlarındaki olası mutasyonlar elektroforez görüntülerinden elde edilen restriksiyon profillerine göre yapıldı. Mutasyonların restriksiyon enzim aktivitesini inhibe etmeleri nedeniyle, Accl enzimi ile reaksiyona giren örnek kodon 55 mutasyonu olmayan vahşi tip (W165) ise, 229 ve 142 bp uzunluğunda iki bant oluştururken; mutasyon (M165) varlığında 371 bp uzunluğunda kesilmemiş tek DNA parçası olarak kalmaktadır. HaeIII enzimi ile reaksiyona giren örnek kodon 57 mutasyonu olmayan vahşi tip (W171) ise 221, 131 ve 19 bp uzunluğunda  bant oluşturur, ancak en küçük parçanın elektroforezde grntlememesi nedeniyle iki bant görülmektedir. Mutasyon (M171) varlığında ise 352 ve 19 bp uzunluğunda iki bant izlenmektedir⁹.

BULGULAR

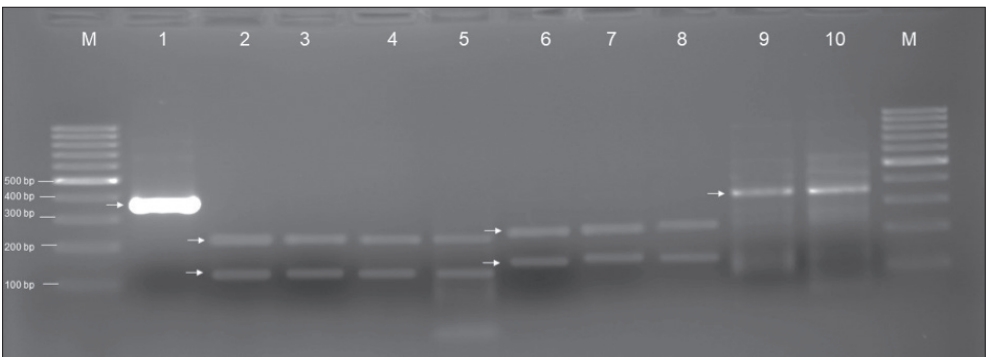
Çalışmaya dahil edilen 16 *P.jirovecii* pozitif hasta örneğinin tamamından mtLSU-rRNA genotipleri ve DHPS gen bölgesi mutasyon analizi sonuçları elde edilmiştir.

Genotip analizi, mtLSU-rRNA bölgesi 85. ve 248. nükleotit pozisyonlarındaki polimorfizme göre yapılmıştır. On altı *P.jirovecii* izolatından üç farklı genotip elde edilmiştir. Genotip dağılımına göre bölgemizde en yaygın görülen genotip; (%43.75, n= 7) genotip 2 (85A/248C) olurken, ikinci sıklıkta (%37.5, n= 6) genotip 1 (85C/248C) ve üçüncü sıklıkta (%18.75, n= 3) genotip 3 (85T/248C) tespit edilmiştir (Tablo I). Bölgemizde genotip 4 (85T/248T) görülmemiştir.

DHPS gen bölgesi 165. (kodon 55) ve 171. (kodon 57) nükleotit pozisyonlarına göre 16 *P.jirovecii* örneğinin 12 (%75)'sinde mutasyon bulunmayan vahşi tip (W165/W171), 4 (%25)'ünde ise mutant tip (M165/W171) tespit edilmiştir (Şekil 1, Tablo II). Mutant tip tespit edilen hastaların ikisinin PCP'si olan HIV/AIDS hastası ve profilaksi öyküsü olan hastalar olduğu saptanmıştır. Mutant tip bulunan diğer iki hastanın ise *P.jirovecii* kolonizasyonu tanımlanan, biri lenfoma tanılı kemoterapi tedavisi almış ve diğeri akciğer kanseri tanısı konmuş hastalar olduğu tespit edilmiştir. Çalışmadaki 16 hastanın 3 (%19)'ünde profilaksi öyküsü olduğu görülmüş ve bu 3 hastanın ikisinde mutant tip saptanmıştır.

Tablo I. *P.jirovecii* mtLSU-rRNA Genotip Analizi

MtLSU-rRNA Genotipleri	Nükleotit pozisyonları	Hasta sayısı n= 16 (%)
1	85/C; 248/C	6 (37.5)
2	85/A; 248/C	7 (43.75)
3	85/T; 248/C	3 (18.75)
4	85/C; 248/T	-



Şekil 1. *P.jirovecii* DHPS gen bölgesi PCR RFLP agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kolon M: Moleküler ağırlık belirteci (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific); Kolon 1: DHPS nested PCR ikinci tur amplifikasyon ürünü (371 bp); Kolon 2-5: HaeIII ile wild tip örneğin enzimatik kesim reaksiyon ürünü (221 bp, 131 bp). Kolon 6-8: Accl ile wild tip örneğin enzimatik kesim reaksiyon ürünü (229 bp, 142 bp). Kolon 9-10: Accl ile mutant tip örneğin enzimatik kesim reaksiyon sonucu (371 bp).

Tablo II. *P.jirovecii* DHPS Mutasyon Analizi

DHPS genotipler	Nükleotit (Aminoasit)		Hasta sayısı n= 16 (%)
	165 (55)	171 (57)	
1 Vahşi tip (W165/W171)	A (Thr)	C (Pro)	12 (75)
2 Mutant tip (M165/W171) ^a	G (Ala)	C (Pro)	4 (25)
3 Mutant tip (W165/M171) ^b	A (Thr)	T (Ser)	0
4 İkili mutant tip (M165/M171) ^c	G (Ala)	T (Ser)	0

DHPS: Dihidropteroatesentaz.
a: Mutant tip; 165. nükleotit pozisyonunda (55. aminoasit pozisyonu) mutasyon.
b: Mutant tip; 171. nükleotit pozisyonunda (57. aminoasit pozisyonu) mutasyon.
c: İkili mutant tip; 165. ve 171. nükleotit pozisyonunda mutasyon olan mutant tip.

DHPS ve mtLSU-rRNA lokusları birlikte multilokus olarak değerlendirildiğinde iki bölgenin olası 16 genotip kombinasyonundan beşi gözlenmiştir. Multilokus genotipler (mtLSU/DHPS); G2/G1 6 (%37.5), G1/G1 3 (%18.75), G1/G2 3 (%18.75), G3/G1 3 (%18.75) ve G2/G2 1 (%6.25) olarak gözlenmiştir. En yaygın multilokus genotip, her bir lokustaki en yaygın genotip kombinasyonlarından elde edilmiştir (Tablo III).

TARTIŞMA

Mikroorganizmaların epidemiyolojik bulaş yollarının tespit edilmesi hastalığa karşı kontrol önlemleri geliştirmek açısından önemlidir. Moleküler genotiplendirme çalışmaları, *P.jirovecii* genotiplerinin coğrafik bölgelere ve şehirlere göre farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur¹⁰. Ayrıca, hastalardan izole edilen genotiplerin hastaların doğduğu şehirle ilişkili olmadığı, hastanın yaşadığı şehir ya da tanının bulunduğu yer ile ilişkili olduğu bildirilmiştir¹⁰. Translasyon sırasında mitokondriyal ribozoma peptidil transferaz aktivitesi sağlayarak temel metabolik mekanizmalarda rol oynayan, mtLSU rRNA geni, farklı coğrafik bölgelerden *P.jirovecii* izolatlarının genetik karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır¹¹. Bu çalışmada, mtLSU-rRNA bölgesi 85. ve 248. nükleotit pozisyonlarındaki polimorfizme göre 16 *P.jirovecii* izolatından üç farklı genotip elde edilmiştir. Bölgemizde genotip 2 (n= 7; %43.75) en yaygın görülen genotip olurken, ikinci sıklıkta genotip 1 (n= 6; %37.5) ve en az genotip 3 (n= 3; %18.75) tespit edilmiştir. Ülkemizden daha önce bildirilen mtLSU-rRNA genotiplendirme çalışmasına rastlanmamıştır. Farklı coğrafyalardaki çalışmalarda İtalya, Polonya ve Küba'dan bu çalışmadaki genotip dağılımına benzer şekilde genotip 2 en sık, genotip 1 ikinci sıklıkta ve genotip 3 üçüncü sıklıkta bildirilmiştir^{12,19,20}. Hindistan'da genotip 2 en sık ve İran'da ise ikinci sıklıkta tespit edilmiştir^{21,22}. ABD, İspanya, Portekiz ve Kore'de genotip 1 en sık görülen *P.jirovecii* genotipidir^{10,11,23,24}. Genotip dağılımındaki bu farklı epidemiyolojik bulgular, *P.jirovecii*'deki genetik varyasyonların coğrafik bir bileşene sahip olduğunu ve *P.jirovecii* suşlarının insanlar arasındaki sirkülasyonunu etkileyebileceğini göstermektedir.

TMP-SMX, PCP profilaksi ve tedavisinde ilk seçenek ilaçtır³. Ancak, sülf grubu ilaçların yaygın olarak kullanılması tedavi ve profilaksiste başarısızlığa neden olan mutasyonlara yol

Tablo III. *P.jirovecii* mtLSU-rRNA ve DHPS Multilokus Genotipleri

Hasta no	Örnek tarihi	Klinikler	MtLSU rRNA tip	DHPS tip	Profilaksi	Multilokus mtLSU/DHPS
2	21.02.2017	Nefroloji servisi	85C/248C	M165/W171	-	G1/G2
6	11.01.2018	Göğüs Hastalıkları servisi	85C/248C	M165/W171	-	G1/G2
8	31.03.2017	Enfeksiyon servisi	85C/248C	M165/W171	Var	G1/G2
20	06.02.2017	Hematoloji servisi	85C/248C	W165/W171	-	G1/G1
28	24.11.2016	Hematoloji servisi	85C/248C	W165/W171	-	G1/G1
32	02.12.2016	Göğüs Hastalıkları servisi	85C/248C	W165/W171	-	G1/G1
56	27.04.2017	Göğüs Hastalıkları servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
62	09.03.2017	Onkoloji servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
68	11.01.2018	Onkoloji servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
73	04.04.2017	Enfeksiyon YBÜ	85A/248C	W165/W171	Var	G2/G1
86	04.05.2017	Göğüs Hastalıkları servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
90	07.02.2017	Onkoloji servisi	85A/248C	W165/W171	-	G2/G1
98	28.02.2018	Enfeksiyon servisi	85A/248C	M165/W171	Var	G2/G2
60	06.02.2017	Göğüs Hastalıkları servisi	85T/248C	W165/W171	-	G3/G1
70	20.03.2017	Göğüs Hastalıkları servisi	85T/248C	W165/W171	-	G3/G1
85	22.04.2017	Göğüs Hastalıkları servisi	85T/248C	W165/W171	-	G3/G1

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

amaktadr^{4,6-8}. *P.jirovecii* kültür yöntemleri ile üretilemediği için, ilaç direnci alışmaları DHPS bölge mutasyon analizine dayanmaktadır. Dünya genelinde %0-81 arasında değişen *P.jirovecii* DHPS mutasyon oranı bildirilmiřtir⁴. Çalışmamızda, *P.jirovecii* tespit edilen 16 hastanın 12 (%75)'sinde vahşi tip (W165/W171), 4 (%25)'nde mutant tip (M165/W171) tespit edilmiştir. On alt hastanın 3 (%19)'ünde profilaksi öyküsü vardır ve bu  hastanın ikisinde mutant tip saptanmıştır. Mutant tip tespit edilen hastaların ikisi PCP tanısı olan HIV pozitif ve profilaksi öyküsü olan hastalardır. Mutant tip bulunan diğer iki hasta ise *P.jirovecii* kolonizasyonu tanımlanan, biri lenfoma tanl kemoterapi tedavisi almış ve diğer i akciğer kanseri tanısı konmuş hastalardır. Ülkemizden DHPS mutasyonu araştırılan sadece bir çalışma bildirilmiştir. zko ve arkadaşları İzmir'de yaptıkları alıřmada²⁵ DHPS amplifikasyonu elde edilen 28 *P.jirovecii* rneğinin tamamını vahşi tip olarak tespit etmişler ve mutasyon bildirmemişlerdir.

Gelişmiş ülkelerde yapılmış çalışmalarda daha yüksek mutasyon oranı bildirilmiştir. ABD'de HIV pozitif PCP'li hastalardan izole edilen *P.jirovecii* rnekleri ile yapılan çalışmalarda %81'e ulaşan mutasyon oranı bildirilmiştir^{6-8,10}. Avrupa lkelerinde; Fransa'dan %3-33, İspanya'dan %22-28, İtalya'dan %0-9, İsviçre'den %7.5, Portekiz'den %7, Almanya'dan %1.2 ve İsvi'ten 0 oranında mutasyon bildirilmiştir^{5,9,11,19,26-29}. Gelişmekte olan ülkelerde ise, Güney Afrika'dan %56, şili'den %48, İran'dan %14.7, in'den %12, Tayland'dan %11.7 ve Hindistan'dan %4.1 oranında DHPS mutasyonu bildirilmiřtir³⁰⁻³⁵.

Yapılan çalışmalarda, profilaksi ve HIV pozitif hasta sayısı arttıkça mutasyon oranlarının da artış gösterdiği grlmřtr⁶⁻⁸. Ancak bazı çalışmalarda, daha önce profilaksi ilaç kullanmamış hastalarda da mutant tiplerin tespit edildiği bildirilmiştir^{7,27,30}. Son yıllarda Ponce ve arkadaşları şili'de yaptıkları alıřmada³⁰, daha önce slfa türevi profilaksi ilaç kullanmamış 56 hastanın 27 (%48)'sinde mutant suş tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ülkemizde HIV/AIDS ve organ transplant alcları dışındaki, immünsupresif hastalarda sulfonamid profilaksisi rutin olarak uygulanmamaktadır^{25,36}. Çalışmamızda, profilaksi öyküsü olan 3 HIV/AIDS pozitif hastanın ikisinde mutant tip saptanmıştır ve toplam 4 mutant suşun ikisinin HIV/AIDS pozitif hastalarda profilaksi sonucu meydana geldiği görülmüştür. Mutant tip saptanan diğer iki hasta ise *P.jirovecii* kolonizasyonu tanımlanan, biri lenfoma tanl kemoterapi tedavisi almış ve diğer i akciğer kanseri tanısı konmuş hastalardır. Mutant suş ile meydana gelen enfeksiyonlarda en önemli risk etmeni profilaksi sresinin artması saylrken, mutant suşların coğrafik dağılımına bağlı olarak, bireylerin yaşadığı şehir ve ülke gibi coğrafik etkenler ya da başvurulan hastane ortam, mutant suşların alınmasndaki önemli risk faktörleri arasndadır^{6,7,10,27,30}.

Bazı alışmalar, PCP'nin latent enfeksiyonun reaktivasyonu yerine nozokomiyal bulaş sonucu gelişen, yeni kazanılan bir enfeksiyon olduğunu göstermiştir. Çeşitli moleküler yöntemlerle belirlenen aynı genotiplerle kümelenme veya salgın suşları, *P.jirovecii*'nin insandan insana bulaş sonucu yaylabileceğini gstermiştir^{13,24,37}. Bu alışmada DHPS ve mtLSU-rRNA genetik lokusları multilokus olarak değerlendirildiğinde beş genotip gözlenmiştir. Multilokus genotiplerde (mtLSU/DHPS); G2/G1'de 6, G1/G1'de 3, G1/G2'de 3, G3/G1'de 3, G2/G2'de 1 suş küme oluşturmuştur. Bu bulgulara göre, çalışma süresi boyunca, hasta-

nemizde beş farklı *P.jirovecii* genotipinin dağılım gösterdiği ve bunlardan ikisinin (G1/G2, G2/G2) potansiyel ilaç direncine sahip DHPS mutant tiplerden oluştuğu ortaya konmuştur.

Spor tuzakları ile yapılan çalışmalar *Pneumocystis*'in çevresel kaynaklardan yayılabileceğini göstermiştir ancak memeli konaklar dışında rezervuar tanımlanmamıştır³⁸. Bu yüzden, *P.jirovecii* toplumda rezervuar olarak bulunabilir ve immün sistemi baskılanmış bir konağa ulaşıncaya kadar kişiden kişiye bulaşarak subklinik kolonizasyona neden olarak yayılabilir^{13,39}. PCP'li hastalar enfeksiyon sırasında etkeni solunum yoluyla havaya yayar⁴⁰. Bir hava örnekleme çalışmasında, PCP'li hastaların bulunduğu servislerden ve bitişik koridorlardan alınan hava örnekleri analiz edildiğinde PCP'li hastaların 8 m'ye kadar uzağında *P.jirovecii* tespit edilmiş, ayrıca servise bitişik koridorlarda da *Pneumocystis* pozitifliğinin devam ettiği görülmüştür⁴⁰. Başka bir çalışmada, *Pneumocystis* enfeksiyonu olmayan hastaların bulunduğu yoğun bakım ünitelerinden ve hastanedeki boş odalardan alınan hava örneklerinde de *Pneumocystis* saptanmıştır⁴¹. PCP'li hastaların havaya *Pneumocystis*'i yayması sonucu, bu hastalar ile ilgilenen doktor, hemşire ve hasta yakınlarının *P.jirovecii* ile kolonize olduğu gösterilmiştir³⁷. Bu çalışmada, elde edilen verilere göre hastanemizde beş farklı *P.jirovecii* genotipi immünsupresif hastalarda bulaş riski oluşturmaktadır ve bunlardan ikisi potansiyel ilaç direncine sahiptir.

Sonuç olarak, çalışmada *P.jirovecii* tespit edilen 16 hastanın 4 (%25)'ünde potansiyel ilaç direncini gösteren DHPS mutant tipi (M165/W171) tespit edilmiştir. mtLSU rRNA genotip analizinde üç farklı genotip elde edilmiş ve bölgemizde G2 ve G1 en yaygın görülen genotip olarak belirlenmiştir. Bu bulgular bölgemizdeki *P.jirovecii* epidemiyolojisi hakkında önemli veriler sağlamış ve potansiyel ilaç dirençli suşların immünsupresif hastalarda bulaş riski taşıdığını göstermiştir. Bölgemizde ve ülkemizde *P.jirovecii* epidemiyolojisini daha iyi tanımlayabilmek için daha fazla *P.jirovecii* izolatını içeren çok merkezli çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Calderon EJ, Varela JM, Durand-Joly I, Dei-Cas E. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, pp: 1-36. In: Saurez ML, Ortega SM (ed), Pneumonia: Symptoms, diagnosis and treatment. 2011, Nova Science Publishers Inc: NY, USA.
2. Liu Y, Su L, Jiang SJ, Qu H. Risk factors for mortality from *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in non-HIV patients: A meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8(35): 59729-39.
3. Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, Ampel NM, Bennett JE, Catanzaro A, et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(1): 96-128.

4. Matos O, Esteves F. Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite* 2010; 17(3): 219-32.
5. Beser J, Dini L, Botero-Kleiven S, Krabbe M, Lindh J, Hagblom P. Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from Swedish patients. *Med Mycol* 2012; 50(3): 320-3.
6. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, et al. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis* 2000; 182(2): 551-7.
7. Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, et al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis* 2000; 182(4): 1192-8.
8. Crothers K, Beard CB, Turner J, Groner G, Fox M, Morris A, et al. Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis pneumonia* containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS* 2005; 19(8): 801-5.
9. Le Gal S, Damiani C, Perrot M, Rouillé A, Virmaux M, Quinio D, et al. Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74(2): 119-24.
10. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2000; 6(3): 265-72.
11. Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderón EJ, Antunes F, et al. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(4): 356-62.
12. Sokulska M, Kicia M, Wesolowska M, Piesiak P, Kowal A, Lobo ML, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in colonized patients with various pulmonary diseases. *Med Mycol* 2018; 56(7): 809-15.
13. Yiannakis EP, Boswell TC. Systematic review of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: evidence that *P.jirovecii* is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. *J Hosp Infect* 2016; 93(1): 1-8.
14. Gülbudak H, Öztürk C, Kuyugöz S, Tezcan Ülger S. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* infection and colonization in immunocompromised patients with pneumonia. *Mikrobiyol Bul* 2020; 54(4): 583-95.
15. Maillot M, Maubon D, Brion JP, François P, Molina L, Stahl JP, et al. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33(3): 331-6.
16. Özkoç S, Bayram Delibaş S. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in iatrogenically immunosuppressed and immunocompetent patients. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(2): 221-30.
17. Tamburrini E, Mencarini P, Visconti E, Zolfo M, De Luca A, Siracusano A, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6): 1586-8.
18. Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45(1): 183-4.
19. Dimonte S, Berrilli F, D'Orazi C, D'Alfonso R, Placco F, Bordi E, et al. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infect Genet Evol* 2013; 14: 68-72.
20. Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragozí MT, Toraño G, Diaz R, Vega D, et al. Prevalence and genotype distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol* 2014; 52(1): 45-51.
21. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Samantaray JC, Kumar L, et al. Genotypic variation of *Pneumocystis jirovecii* isolates in India based on sequence diversity at mitochondrial large subunit rRNA. *Int J Med Microbiol* 2011; 301(3): 267-72.
22. Fata A, Abdollahi B, Rezaeetalab F, Attaran D, Najjari M, Najafzadeh MJ. Molecular diagnosis and genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage samples obtained from patients with pulmonary disorder. *Curr Med Mycol* 2019; 5(3): 13-8.

23. Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis* 2004; 39(1): 123-8.
24. Kim T, Lee SO, Hong HL, Lee JY, Kim SH, Choi SH, et al. Clinical characteristics of hospital-onset *Pneumocystis pneumonia* and genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in a single tertiary centre in Korea. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 102.
25. Ozkoc S, Erguden C, Bayram Delibas S. Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains isolated from Aegean region of Turkey. *Parasitol Res* 2018; 117(10): 3103-8.
26. Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, et al. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. *Clin Infect Dis* 2010; 51(4): e28-33.
27. Friaza V, Morilla R, Respaldiza N, de la Horra C, Calderón EJ. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among colonized individuals and *Pneumocystis pneumonia* patients from Spain. *Postgrad Med* 2010; 122(6): 24-8.
28. Valerio A, Tronconi E, Mazza F, Fantoni G, Atzori C, Tartarone F, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45(5): 521-8.
29. Suárez I, Roderus L, van Gumpel E, Jung N, Lehmann C, Fätkenheuer G, et al. Low prevalence of DHFR and DHPS mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from a German cohort. *Infection* 2017; 45(3): 341-7.
30. Dini L, du Plessis M, Freaun J, Fernandez V. High prevalence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from patients with *Pneumocystis pneumonia* in South Africa. *J Clin Microbiol* 2010; 48(6): 2016-21.
31. Ponce CA, Chabé M, George C, Cárdenas A, Durán L, Guerrero J, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations in patients with a first episode of *Pneumocystis pneumonia* in Santiago, Chile, and clinical response to trimethoprim-sulfamethoxazole therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(2): e01290-16.
32. Sheikholeslami MF, Sadraei J, Farnia P, Forozandeh Moghadam M, Emadikochak H. Dihydropteroate synthase gene mutation rates in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from Iranian HIV-positive and non-HIV-positive patients. *Med Mycol* 2015; 53(4): 361-8.
33. Deng X, Zhuo L, Lan Y, Dai Z, Chen WS, Cai W, et al. Mutational analysis of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase genes in HIV-infected patients in China. *J Clin Microbiol* 2014; 52(11): 4017-9.
34. Siripattanapipong S, Leelayoova S, Mungthin M, Worapong J, Tan-Ariya P. Study of DHPS and DHFR genes of *Pneumocystis jirovecii* in Thai HIV-infected patients. *Med Mycol* 2008; 46(4): 389-92.
35. Tyagi AK, Mirdha BR, Luthra K, Guleria R, Mohan A, Singh UB, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) genotypes in non-HIV-immunocompromised patients: a tertiary care reference health centre study. *Med Mycol* 2011; 49(2): 167-71.
36. Boğa C, Bolaman Z, Çağırğan S, Karadoğan İ, Özcan MA, Özkalemkaş F, et al. Recommendations for risk categorization and prophylaxis of invasive fungal diseases in hematological malignancies: a critical review of evidence and expert opinion (TEO-4). *Turk J Haematol* 2015; 32(2): 100-17.
37. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Muñoz 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(4): 1536-8.
38. Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol* 1996; 34(7): 1754-9.
39. Qoraan I, Oz Y, Metintas M, Durmaz G. The investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in adult individuals of Turkish population. *Biom Biostat Int J* 2018; 7(4): 311-5.
40. Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet JC, Nevez G, Garin YJ, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Clin Infect Dis* 2010; 51(3): 259-65.
41. 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(10): 2511-3.