Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 23, No. 4, Winter 2024, Pages: 330-342

Original article

Molecular Detection of *Pneumocystis jirovecii* in the Bronchoalveolar Lavage Samples in Patients with Various Pulmonary Disorders

Chitsaz N[1], Meamar AR[1], Razmjou E[1], Shafaghi-Sisi S[1], Alipour M[1], Sadeghi M[1], Rampisheh Z[2], Ghasemi Z[3], Aliannejad R[4], Badirzadeh A*[1]

1. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Preventive Medicine and Public Health Research Center, Psychosocial Health Research Institute, Department of Community and Family Medicine, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Medical Mycology, Razi Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran 4. Division of pulmonary and critical care, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**** Corresponding author.*** Tel: +982188622653, Fax: +9821 88622653, E-mail: badirzadeh.ar@iums.ac.ir
badirzadeh@gmail.com

Article info

Article history:
Received: Feb 20, 2023
Accepted: Jun 27, 2023

Keywords:
Pneumocystis jirovecii
Pneumonia
Colonization
Nested PCR
Broncho-alveolar lavage (BAL)

ABSTRACT

Background: *Pneumocystis jirovecii (P. jirovecii)* causes Pneumocystis pneumonia (PCP) in people, especially the immunocompromised ones. It is also one of the serious causes of numerous lung problems in affected patients. Since documented data about *P. jirovecii* is not available in patients with pulmonary infections in Tehran, this study aimed to investigate the molecular epidemiology and parasitology of *Pneumocystis* to determine the frequency of the organism infection.

Methods: Bronchoalveolar lavage (BAL) samples were collected for 367 patients hospitalized in the lung department of Shariati Hospital in Tehran from July 2022 to July 2023. The samples were analyzed using Giemsa staining and molecular methods. After DNA extraction from samples, Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) was employed for the amplification of the 18SrRNA gene and identification of *P. jirovecii*. The PCR products of Nested PCR were sequenced for final confirmation.

Results: Out of 367 samples, only one sample (0.27%) and 28 samples (6.7%) were found to be positive through parasitology and NestedPCR analysis, respectively. *P. jirovecii* was detected in seven (25%) and 21 (75%) immunocompromised and immunocompetent patients, respectively. Fever, shortness of breath and dry cough were the most common clinical symptoms among patients with Pneumocystosis. Patients with pulmonary disorders are prone to colonization by pneumocystis, which increases the risk of pneumocystosis and makes them a reservoir for transmission to susceptible people.

Conclusion: It can be concluded that patients with distinct lung disease are prone to colonization by *Pneumocystis* and, importantly, are at risk of infection. Also, according to the current study, Nested PCR was a suitable method for detecting *P. jirovecii* organisms because it had a very high sensitivity and specificity.

How to cite this article: Chitsaz N, Meamar AR, Razmjou E, Shafaghi-Sisi S, Alipour M, Sadeghi M, Rampisheh Z, Ghasemi Z, Aliannejad R, Badirzadeh A. Molecular Detection of *Pneumocystis jirovecii* in the Bronchoalveolar Lavage Samples in Patients with Various Pulmonary Disorders. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;23(4):330-342.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

Extended Abstract

Background: Respiratory disorders impose a substantial global health burden, impacting millions of people across diverse demographic groups. Among the myriad pathogens capable of causing respiratory infections, *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) stands out as an opportunistic fungus, historically associated with severe pneumonia in immunocompromised individuals, particularly those afflicted by HIV/AIDS. However, recent epidemiological shifts have brought attention to the increasing prevalence of *P. jirovecii* infections in individuals with various pulmonary disorders unrelated to HIV/AIDS. Formerly known as *Pneumocystis carinii*, *P. jirovecii* is a causative agent of pneumocystis infections in immunocompromised patients with various chronic diseases. This peculiar organism, once considered a protozoan parasite, has been reclassified through DNA sequencing analysis of the 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene, placing it in the phylum Ascomycota of the fungal kingdom. This opportunistic fungal pathogen, has long been recognized as a leading cause of Pneumocystis pneumonia (PCP), predominantly impacting individuals with compromised immune systems, particularly those living with HIV/AIDS. However, recent studies have highlighted an emerging trend of *P. jirovecii* infections in non-HIV immunocompromised individuals with various pulmonary disorders. Newborns and children are usually known as reservoirs of infection and play an important role in the colonization of *P. jirovecii* and its transmission. Due to the lack of an optimum culture system for culturing and isolating *P. jirovecii* from various clinical samples, the laboratory identification of infection and PCP has directly depended on direct examinations using microscopic detection of fungus. One of these methods for diagnosis of the organism is using conventional staining protocols such as Grocott-Gomori methenamine silver, Calcofluor White, toluidine blue O, Giemsa, and also applying fluorescence immunocytochemical staining.

In Iran, there are limited studies in the field of presenting the frequency of *P. jirovsii* among patients with pulmonary infections. Therefore, in the current study we have determined P. jirovecii colonization and infection by direct and NestedPCR methods in a relatively large group of patients with a spectrum of pulmonary disorders from collected Bronchoalveolar lavage (BAL) samples in Shariati Hospital in Tehran. The overall objectives of the study were to determine the prevalence of *P. jirovecii* in patients with diverse pulmonary disorders and investigate potential associations between *P. jirovecii* presence and disease severity in patients with underlying pulmonary conditions.

Methods: The study involves the collection of BAL samples from patients diagnosed with various pulmonary disorders, including interstitial lung disease (ILD), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), rhinitis/asthma, and other respiratory conditions. BAL samples were collected from 367 patients hospitalized in the lung department of Shariati Hospital in Tehran from July 2022 to July 2023 which had distinct pulmonary signs and symptoms. All collected samples were analyzed using parasitological (Giemsa staining method) and molecular methods (Nested PCR). Molecular detection of *P. jirovecii* was performed using advanced techniques (Nested PCR), targeting specific genes associated with the pathogen. This approach offers enhanced sensitivity and specificity, overcoming the limitations of the conventional diagnostic methods. The Nested PCR using the 18SrRNA gene was applied to identify the *P. jirovecii*. DNA extraction was done by the phenol-chloroform method. 18S rRNA gene of *P. jirovecii* was amplified based on the method of Umera et al. Two sets of primers including
Pjf9: 5´-TTCGGGGCTTACTTTGGTC-3´, Pjr4: 5´GTAGTTAGTCTTCAATAAATCT-3´ as external primers and
Pjf8: 5´-AGGCCTACCATGGTTTCG-3´, Pjr8: 5´CTTCGGAGGACCGGGCCGT-3´ as

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

internal primers was used for first and second rounds PCR, respectively. The PCR-produced amplicons for the first and second rounds were 710 bp, and 332 bp, respectively. The second round of PCR products were analyzed using electrophoresis on agarose gels containing safe stain, and the bands were observed under the UV light of a transilluminator.

Result: Out of 367 samples, only one sample was found to be positive through parasitology analysis. In the molecular method, 28 samples were diagnosed as positive for pneumocystis. The results of this study are expected to provide valuable insights into the prevalence of *P. jirovecii* in patients with various pulmonary disorders. By employing molecular techniques, the research aims to overcome the limitations of traditional diagnostic methods, which may miss *P. jirovecii* infections in non-HIV immunocompromised individuals. Furthermore, the study seeks to unravel potential associations between the presence of *P. jirovecii* and disease severity in patients with underlying pulmonary conditions. This exploration may shed light on whether *P. jirovecii* plays a contributory role in exacerbating respiratory disorders or if its presence is incidental. Additionally, the research will delve into the impact of *P. jirovecii* co-infection on the clinical outcomes of patients with diverse pulmonary disorders. Understanding how the fungal pathogen interacts with underlying respiratory conditions is crucial for developing targeted therapeutic interventions. The significance of this research lies in its potential to redefine our understanding of *P. jirovecii* infections beyond traditional immunocompromised populations. By exploring the prevalence and clinical implications in patients with various pulmonary disorders, the study may influence diagnostic and therapeutic approaches, ultimately improving patient care. In this study, Nested PCR using the 18SrRNA gene enhanced the accuracy of detection, enabling the identification of cases that might be missed using conventional diagnostic methods.

Conclusion: In conclusion, this study demonstrates that patients with various pulmonary disorders are susceptible to Pneumocystis colonization and, importantly, are at risk of infection. The Nested PCR method proves to be a suitable tool for detecting *P. jirovecii* due to its high sensitivity and specificity. In addition, the current research represents a comprehensive exploration of the molecular detection of *P. jirovecii* in BAL samples from patients with various pulmonary disorders, contributing to our understanding of the prevalence, clinical significance, and potential therapeutic implications of *P. jirovecii* infections in non-HIV immunocompromised individuals. The anticipated results have the potential to inform clinical practice, guiding the development of targeted interventions tailored to the unique challenges posed by *P. jirovecii* in non-HIV immunocompromised individuals, thereby contributing to the evolving landscape of respiratory medicine. We suggest considering preventive strategies, potential interventions, and emphasizing the importance of early detection to minimize the impact of *P. jirovecii* infections in patients with pulmonary disorders. Also, tracking clinical progress, treatment responses, and long-term pulmonary function can offer insights into the impact of *P. jirovecii* infections on the overall health and well-being of patients.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره بیست و سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۲

مقاله اصیل

تشخیص مولکولی پنوموسیستیس جیرووسی در نمونه‌های لاواژ برونکوآلوئولار در بیماران مبتلا به اختلالات مختلف ریوی

نرگس چیت ساز[۱]، احمدرضا معمار[۱]، الهام رزمجو[۱]، سهیلا شفقی سیسی[۱]، مریم علی‌پور[۱]، مریم صادقی[۱]، زهرا رام پیشه[۲]، زینب قاسمی[۳]، رسول علیان‌نژاد[٤]، علیرضا بدیرزاده[۱]*

۱. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات طب پیشگیری و سلامت جمعیت، پژوهشکده پیشگیری از آسیب های اجتماعی، گروه پزشکی اجتماعی و خانواده، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳. گروه قارچ شناسی پزشکی، بیمارستان رازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

٤. بخش ریوی و مراقبت های ویژه، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۸۶۷۰۳۲۶۷ فاکس: ۰۲۱۸۸۶۲۲۶۵۳ پست الکترونیک: badirzadeh.ar@iums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: پنوموسیستیس جیرووسی (*Pneumocystis jirovecii*)، در افرادی که دچار ضعف سیستم ایمنی هستند باعث ذات الریه پنوموسیستوزی (PCP) شده و از عوامل جدی ایجاد مشکلات متعدد ریوی در بیماران مبتلا است. این مطالعه با هدف بررسی اپیدمیولوژی مولکولی پنوموسیستیس جیرووسی و تعیین فراوانی این ارگانیسم در بیماران ریوی مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی تهران انجام شد.

روش کار: در این مطالعه توصیفی مقطعی از مرداد ۱۳۹۹ تا مرداد ۱٤۰۰ تعداد ۳۶۷ نمونه لاواژ برونکو آلوئولار (BAL) بیماران ریوی بستری در بخش ریه بیمارستان شریعتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع‌آوری شد. رنگ‌آمیزی گیمسا برای بررسی وجود ارگانیسم و روش حساس Nested-PCR برای شناسایی مولکولی بر روی همه نمونه‌ها انجام شد. پس از استخراج DNA تکثیر قطعه ژن 18S ribosomal RNA (18SrRNA) مربوط به پنوموسیستیس جیرووسی انجام شد. محصولات نهایی Nested-PCR جهت تایید قطعی تعیین توالی شدند.

یافته‌ها: از ۳۶۷ نمونه‌ای که از لحاظ میکروسکوپی و مولکولی بررسی شدند، پنوموسیستیس جیرووسی با آزمایش میکروسکوپی در یک نمونه (۰/۲۷٪) و با روش Nested-PCR در ۲۸ نمونه (۷/۶٪) شناسایی شد. در هفت (۲۵٪) بیمار دچار نقص ایمنی و ۲۱ (۷۵٪) بیمار دارای ایمنی کامل پنوموسیستیس جیرووسی جداسازی شد. تب، تنگی نفس و سرفه خشک شایع‌ترین نشانه‌های بالینی در بین بیماران دارای پنوموسیستوزیس بودند. بیماران ریوی، مستعد کلونیزه شدن توسط پنوموسیستیس بوده که هم خطر ابتلا آن‌ها به پنوموسیستوزیس وجود دارد و هم آن‌ها را تبدیل به مخزنی جهت انتقال به افراد مستعد می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از روش مستقیم و مولکولی مطالعه حاظر نشان داد تعداد قابل توجهی از بیماران مبتلا به بیماری‌های ریوی توسط پنوموسیستیس جیرووسی کلونیزه شدند که ممکن است در این بیماران به پنوموسیستوزیس و احتمالا پنومونی تبدیل شود یا ممکن است ارگانیسم را به سایر بیماران مستعد منتقل کند. همچنین Nested-PCR می‌تواند روش مناسبی برای تشخیص پنوموسیستیس جیرووسی باشد زیرا از حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: پنوموسیستیس جیرووسی، پنومونی، کلونیزاسیون، Nested-PCR، لاواژ برونکو آلوئولار

دریافت: ۱٤۰۱/۱۲/۱ **پذیرش:** ۱٤۰۲/٤/۶

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دوره بیست و سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۲

مقدمه

پنوموسیستیس جیروووسی[1] یک ارگانیسم خارج سلولی فرصت‌طلب است که معمولا محل استقرار طبیعی آن در داخل آلوئول‌های ریه انسان است [۲،۱]. این ارگانیسم سابقا جزءِ تک‌یاخته‌های انگلی طبقه‌بندی می‌شد ولی امروزه بعد از انجام مطالعات مولکولی درگروه عفونت‌های قارچی قرار گرفته است [۳]. پنوموسیستیس یک ارگانیسم منواگزن بوده و برای بقا و تکثیر خود کاملا به میزبان وابسته است [٤]. بیشتر در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی، مبتلایان به ایدز، بیماری‌های مزمن و مصرف‌کنندگان داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی باعث ایجاد ذات الریه پنوموسیستوزی (PCP) می‌شود [۵].

چگونگی ورود ارگانیسم به درون آلوئول‌های ریوی و همچنین انتشار یافتن آن هنوز به طور واضح مشخص نیست ولی محققان معتقدند که پنوموسیستیس از طریق استنشاق وارد بدن میزبان خود می‌شود [۷-۶]. تروفوزوئیت‌های پنوموسیستیس در طول عفونت در ریه‌ها غالب هستند در حالی که کیست‌ها نقش اصلی در انتشار پنوموسیستیس را دارند [۱]. میزبان‌های دارای قابلیت ایمنی می‌توانند به عنوان مخزن ارگانیسم در جمعیت عمل کنند و باعث انتقال آن از یک فرد به فرد دیگر شوند تا زمانی که پاتوژن به میزبانی با ضعف سیستم ایمنی برسد. این پاتوژن فرصت طلب اگرچه در میزبان سالم عفونت بدون علامت یا خفیف ایجاد می‌کند، اما می‌تواند موجب پنومونی برق آسا در میزبان با ضعف سیستم ایمنی شود [۸]. بنابراین تشخیص سریع پنوموسیستوزیس بسیار مهم است زیرا با تشخیص و درمان سریع می‌توان از بروز علائم شدید و خطرناک جلوگیری کرد [۵]. از لحاظ علائم بالینی و سیر بیماری پنوموسیستوزیس شبیه به سندروم دیسترس تنفسی بالغین می‌باشد و در معاینه بیمار تاکی‌پنه، تاکی‌کاردی و سیانوز یافت می‌شود. در رادیوگرافی از قفسه سینه به طور کلاسیک ارتشاح های منتشره دو طرفه دیده می‌شود [۹].

از آنجاییکه پنوموسیستیس جیروووسی به آسانی قابل کشت در محیط‌های آزمایشگاهی نیست [۶] و همچنین روش‌های سرولوژیکی نیز کارایی لازم را ندارند، لذا تشخیص اختصاصی ملزم به مشاهده ارگانیسم در نمونه‌های مختلف ریوی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی است. اما متاسفانه روش‌های میکروسکوپی نیز همیشه جوابگو نبوده زیرا علاوه بر اینکه نیازمند مهارت و تجربه فردی است گاهی در مواردی که بار عفونت کم است منجر به تشخیص منفی کاذب می‌شود. بنابراین باید از روش‌هایی با حساسیت و اختصاصیت بالاتری استفاده شود [۱۱-۶] . روش‌های مهم و کاربردی مولکولی برای تشخیص پنوموسیستیس استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR به ویژه روش Nested-PCR است. Nested-PCR نسبت به PCR متداول دارای حساسیت بیشتری است بطوری‌که با این روش می‌توانند پنوموسیستیس جیروووسی را در افراد مختلف مانند افرادی‌که بصورت خفیف سیستم ایمنی تضعیف شده دارند و یا حتی در افراد سالم نیز ردیابی کنند [۲]. ارزیابی بیماری‌های ریوی نیازمند تشخیص افتراقی علل مختلف بیماری به خصوص در افراد دچار نقص ایمنی است و نیازمند تهیه مناسب‌ترین نمونه و بهترین روش آزمایش است. نمونه خلط و BAL بهترین نمونه‌ها جهت تشخیص پنوموسیستیس جیروووسی هستند.

[1] *Pneumocystis jirovecii*

این مقاله تحت شرایط Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License قابل بازنشر است.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

در ایران مطالعات محدودی در زمینه ارائه فراوانی پنوموسیستیس جیرووسی در جامعه بیماران ریوی وجود دارد. لذا هدف از این مطالعه شناسایی پنوموسیستیس جیرووسی با روش Nested-PCR در بیماران با مشکلات ریوی در بیمارستان شریعتی تهران طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ بود.

روش کار

جمع‌آوری و پردازش نمونه

حدود ۵-۲ میلی‌لیتر نمونه BAL از ۳۶۷ بیمار بستری در بخش ریه بیمارستان شریعتی تهران در مرداد ۱۳۹۹ تا مرداد ۱۴۰۰توسط پزشک متخصص ریه گرفته شد. نمونه‌ها به لوله‌های فالکون انتقال یافتند و توسط باکس‌های مخصوص انتقال نمونه‌های عفونی و با رعایت اصول ایمنی به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل شدند. در آزمایشگاه تا قبل از شروع آزمایشات نمونه‌ها در فریز (۲۰-) نگهداری شدند.

بررسی میکروسکوپی

ابتدا با استفاده از سانتریفیوژ (5 min at 3000 rpm) رسوب نمونه‌های BAL گرفته شد. از رسوب نمونه‌ها گسترش تهیه و بعد از تثبیت با متانول رنگ‌آمیزی گیمسا انجام شد. اسمیرهای رنگ شده با استفاده از بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مورد بررسی دقیق قرارگرفتند.

بررسی مولکولی

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر رسوب نمونه BAL درون میکروتیوپ ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه درون دستگاه بلوک حرارتی تحت دمای ۹۹ درجه سانتیگراد قرار داده شد. این رسوب وارد پروسه استخراج DNA شد. برای استخراج DNA از روش دستی فنل-کلروفرم استفاده شد. مخلوط مساوی از فنل و کلروفرم (۱:۱) سبب رسوب پروتئین‌ها می‌شود، ولی DNAو RNA در محلول رویی باقی می‌مانند.

در این مطالعه بررسی مولکولی برای شناسایی پنوموسیستیس جیرووسی با روش Nested-PCR و با استفاده از روش خدادی و همکاران انجام شد [۱۲] که ژن 18S ribosomal RNA یا 18SrRNA مورد تکثیر قرار گرفت. تمامی مراحل امپلیفای کردن (تکثیر DNA) با استفاده از مسترمیکس قرمز[1] شرکت آمپلیکون[2] انجام شد. حجم کلی واکنش PCR در مورد تمامی نمونه‌ها ۲۵ میکرولیتر بود. در PCR1 (مرحله اول) پرایمرهای اکسترنال Pjf9 (5`-TTCGGGGCTTACTTTGGGTC-3`) و Pjr49 (5`- GTAGTTAGTCTTCAATAAATCT-3`) بکار برده شدند که یک قطعه ۷۱۰ جفت بازی را تکثیر کردند. در PCR2 (مرحله دوم) پرایمرهای اینترنال Pjf8 (5`-AGTCGCCTACCATG-3`) و Pjr8 (5`-CTTCGGAGGACCGGGCCGT-3`) بکار برده شدند که در نهایت یک قطعه ۳۳۲ جفت بازی را تکثیر کردند [۱۲].

واکنش PCR1 حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X، ۱میکرولیتر پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت،۲ میکرولیتر DNA و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه بود (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر). پس از افزودن موارد ذکر شده ابتدا به آرامی آن‌ها را مخلوط کرده و درون دستگاه ترموسایکلر که برنامه زمانی و دمایی آن از قبل تنظیم شده بود قرار داده شد. پس از اتمام واکنش، محصول رقیق شده PCR1 (۱:۵۰) به عنوان DNA الگو برای انجام واکنش PCR2 با کمک پرایمرهای داخلی مورد استفاده قرار گرفت. جهت جلوگیری از هرگونه آلودگی کلیه مراحل آماده‌سازی، استخراج و PCR در زیر هود و در اتاق‌های مخصوص انجام گرفت. قابل ذکر است که در میکروتیوپ کنترل مثبت، نمونه مثبت و در میکروتیوپ کنترل منفی به جای نمونه آب دیونیزه اضافه شد. بررسی نتایج بدست آمده از PCR با استفاده از روش ژل الکتروفوز (ژل آگاروز ۱/۵

[1] 2X Taq Master mix
[2] Ampliqon

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

درصد) انجام گرفت و باندها تحت نور UV و با استفاده از دستگاه ژل داکت با رنگ DNA Safe Stain تولید شرکت دنا ژن تجهیز مشاهده شدند و ۳ نمونه از موارد مثبت انتخاب و برای تعیین توالی ارسال شدند. برای این منظور ژل‌های بریده شده حاوی باند مورد نظر به همراه ۱۵ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی به منظور تعیین توالی قطعه 18SrRNA پنوموسیستیس جیروووسی به شرکت پیشگام، ارسال شدند.

آنالیز آماری

ارتباط بین متغیرهای کیفی (سن، جنس، بیماری‌های زمینه‌ای و عفونت های قارچی) با آزمون کای دو با سطح معنی‌داری $\alpha<0/05$ تعیین شد. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS-20 استفاده شد. نتایج توالی ژن‌ها با برنامه‌های Chromas، Sequencher و BioEdit آنالیز و با ژن‌های ثبت شده در بانک ژنی مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۳۶۷ بیمار مورد بررسی ۲۱۹ نفر (۵۹/۷٪) مرد و ۱۴۸ نفر (۴۰/۳٪) زن بودند (جدول ۱). میانگین سن افراد مورد مطالعه ۴۹/۶۴ سال بود، که کمترین آنها زیر یکسال و بیشترین آن‌ها ۹۱ سال بودند. همچنین در نتایج بدست آمده از Nested-PCR از ۳۶۷ نمونه ۳۳۹ نمونه از نظر پنوموسیستیس جیروووسی منفی و ۲۸ نمونه مثبت تشخیص داده شدند (شکل ۱). از ۳۳۹ نمونه منفی ۲۰۳ نفر مرد و ۱۳۶ نفر زن. از ۲۸ نمونه مثبت ۱۶ نفر مرد و ۱۲ نفر زن بودند (جدول ۲). از لحاظ آماری ارتباطی بین جنس و سن با ابتلا به پنوموسیستیس در این مطالعه دیده نشد. اکثر بیماران مورد بررسی دارای یک بیماری زمینه‌ای مانند سرطان خون، بیماری حاد یا مزمن ریوی، بیماری عفونی یا بیماری خودایمن بودند. نتایج بدست آمده از روش Nested-PCR در این مطالعه نشان می‌دهد که بیشترین موارد مثبت متعلق به گروه بیمارانی است که دارای بیماری زمینه‌ای پنومونی بودند، بطوریکه از ۲۸ نمونه مثبت بدست آمده ۱۶ مورد آن بیماران مبتلا به پنومونی ریوی بودند (جدول ۳). اگرچه از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین نوع بیماری و نتایج PCR مشاهده نشد ولی از نظر بالینی، بیش از نیمی از موارد مثبت مبتلا به پنومونی بوده‌اند و این احتمال وجود دارد که پنومونی می‌تواند در کلونیزاسیون پنوموسیستیس تاثیرگذار باشد و منجر به شدت عفونت در این افراد شود. بیماران مورد مطالعه از لحاظ سایر ارگانیسم‌ها مانند قارچ‌های بیماریزا نیز بررسی شدند، بیشترین قارچ مشاهده شده در افراد PCR مثبت و منفی کاندیدا بود، اما از لحاظ آماری ارتباطی بین نوع قارچ و ابتلا به پنوموسیستیس جیروووسی در این بیماران مشاهده نشد. در بررسی گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا بصورت میکروسکوپی یک نمونه مثبت تشخیص داده شد (شکل ۲) که مربوط به یک پسر۶ ساله مبتلا به بیماری پنومونی بود.

نتایج بررسی در پایگاه داده NCBI و BLAST و همچنین بررسی با نرم‌افزارهای Sequencher و BioEdit نشان داد که تمام ۳ نمونه‌ای که با ژن 18SrRNA تعیین توالی شدند، پنوموسیستیس جیروووسی بودند. هر ۳ نمونه حدوداً بین ۹۹-۹۵ درصد با ژن‌های رفرانس موجود در بانک ژن همولوژی و تشابه داشتند. بیشترین تشابه را با استرین‌های RU7، Y3/15، Y2/11، Y1/8 و E/16 داشتند که از انسان و از کشور آمریکا جدا شده‌اند.

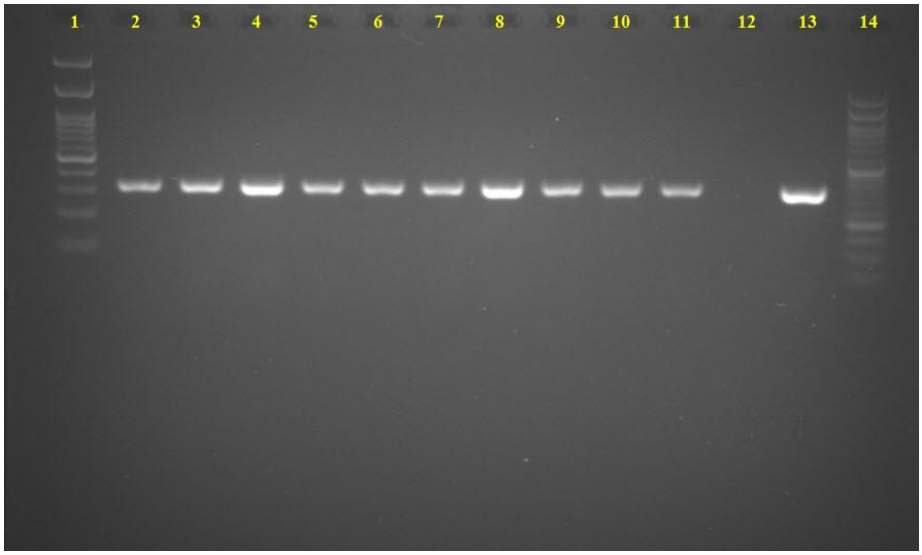
جدول ۱. توزیع فراوانی جمعیت مورد مطالعه

گروه بیماران	تعداد (درصد)	دامنه سن	میانگین سن	انحراف معیار
مرد	۲۱۹ (۵۹/۷)	۰-۹۱	۴۹/۸۴	۲۱/۴

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

زن	۱۴۸ (۴۰/۳)	۰-۸۶	۴۹/۳۴	۱۹/۳۶
کل	۳۶۷ (۱۰۰)	۰-۹۱	۴۹/۶۴	۲۰/۶۱



شکل ۱. نتایج Nested-PCR با ژن 18SrRNA پنوموسیستیس جیرووسی. چاهک ۱: مارکر 100 bp؛ چاهک ۲ تا ۱۱: تعدادی از نمونه های مثبت؛ چاهک ۱۲: کنترل منفی (C^-)؛ چاهک ۱۳: کنترل مثبت (C^+)؛ چاهک ۱۴: مارکر 50 bp

جدول ۲. توزیع فراوانی گروه‌های سنی به تفکیک جنس در کل بیماران و بیماران PCR مثبت مراجعه کننده به بخش ریه بیمارستان شریعتی تهران

گروه سنی (سال)	کل بیماران		بیماران PCR مثبت	
	زن	مرد	زن	مرد
<۱	۱	۲	۰	۲
۱-۱۵	۸	۱۶	۰	۰
۱۶-۳۰	۱۰	۲۵	۰	۱
۳۱-۴۵	۴۳	۴۰	۶	۴
۴۶-۶۰	۴۱	۵۴	۲	۴
۶۱-۷۵	۳۵	۶۰	۲	۴
>۷۶	۱۲	۲۰	۲	۱

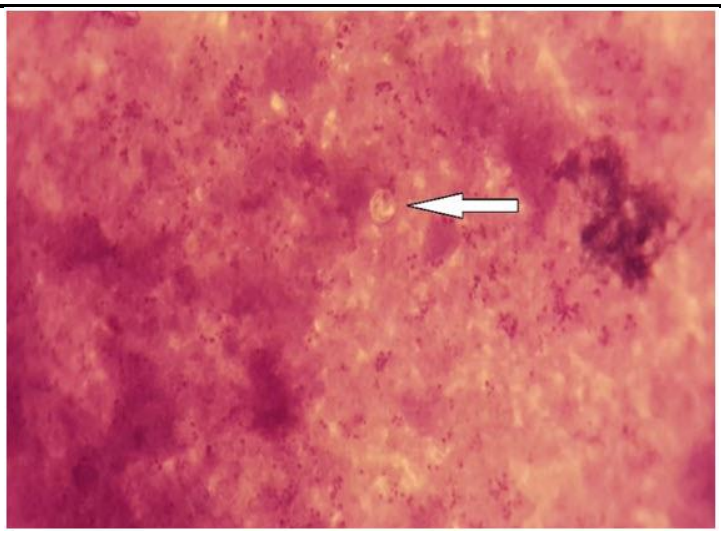
جدول ۳. توزیع فراوانی بیماری‌های زمینه ای

بیماری	PCR		تعداد کل
	موارد مثبت	موارد منفی	
بیماری انسدادی مزمن ریه	۶	۴۱	۴۷
برونشیت	۰	۴	۴
پنومونی	۱۶	۹۷	۱۱۳
برونشکتازی	۱	۱۰	۱۱
کانسر	۱	۷۰	۷۱
اتوایمن	۱	۲۸	۲۹
پیوند اعضا	۰	۳	۳
بیماری کلیوی	۰	۱۲	۱۲

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

جراحی	۰	۳	۳
بیماری‌های عفونی	۰	۰	۱٤
سایر بیماری‌ها	۰	۱۸	۱۸
موارد ثبت نشده	۳	۳۹	٤۲



شکل ۲. نمونه مثبت کیست پنوموسیستیس جیروسی در نمونه لاواژ ریه بیمار مثبت با رنگ‌آمیزی گیمسا با بزرگنمایی ۱۰۰

بحث

پنوموسیستیس جیروسی یک ارگانیسم خارج سلولی فرصت‌طلب است که دارای انتشار جهانی بوده و در تمام نقاط جهان وجود دارد. انتقال آن از طریق تنفسی است. کلونیزاسیون آن ممکن است در افرادی که هیچگونه علائم بالینی ندارند دیده شود. ولی معمولا در مواقع ضعف سیستم ایمنی باعث ایجاد پنومونی پنوموسیستوزیس در افراد می‌شود. در مطالعه حاضر از ۳۶۷ نمونه‌ای که از لحاظ پارازیتولوژی و مولکولی بررسی شدند، پنوموسیستیس جیروسی با آزمایش میکروسکوپی در ۱ نمونه (۰/۲۷٪) و با روش Nested-PCR در ۲۸ نمونه (۷/۶٪) شناسایی شد. در سال ۲۰۲۱ امیلی فریل و همکاران بر روی کلونیزاسیون پنوموسیستیس در بیماران مبتلا به بیماری مزمن انسدادی ریه (COPD) در ۵۸ بیمار مطالعه‌ای انجام دادند و شیوع کلونیزاسیون در حالت حاد و پایدار بیماری را بررسی کردند. نتایج بدست‌آمده از این مطالعه نشان داد که بیماران مبتلا به COPD مستعد کلونیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی هستند [۱۳].

در پژوهشی، ماسکل[1] برای بررسی میزان کلونیزاسیون پنوموسیستیس جیروسی، با استفاده از رنگ‌آمیزی متنامین‌سیلور و روش PCR ساده، مطالعه‌ای بر روی ۹۳ نمونه BAL گرفته شده تحت برونوسکوپی از بیماران ریوی انجام داد. ۱۷ نفر (۱۸٪) مثبت تشخیص داده شدند. در این مطالعه مشخص شد از ۱۸ نفری که در هنگام برونکوسکوپی کورتیکواستروئید دریافت کرده بودند ۸ نفر (٤٤٪) از نظر پنوموسیستیس مثبت بودند و این نشان می‌دهد که مصرف داروهای سرکوب کننده می‌تواند فرد را مستعد کلونیزاسیون پنوموسیستیس کند [۱٤]. روزیانی و همکاران مطالعه‌ای مشابه مطالعه حاضر انجام دادند، آنها نیز نمونه‌های BAL بیماران را با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا و PCR بررسی کردند. از ۶۰ بیمار، ۳ بیمار (۵٪) در رنگ‌آمیزی گیمسا و ۱٤ (۲۳٪) بیمار در PCR از نظر پنوموسیستیس مثبت تشخیص داده شدند. آنها نیز شاهد عدم حساسیت کافی رنگ‌آمیزی بوده و عنوان داشتند که روش PCR از حساسیت بالاتری برخوردار است و قدرت

[1] Maskell

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

تشخیص را تا ٤ برابر افزایش می‌دهد [۱۵]. فلوری[1] و همکاران با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا و متنامین‌سیلور و همچنین PCR ساده و Real-time PCR ۱۵۰ نمونه BAL گرفته شده از بیماران ایدزی (۱۹ نفر) و غیر ایدزی (۱۳۱ نفر) را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی حساسیت هر دو رنگ‌آمیزی برای نمونه‌های ایدزی ۶۰ درصد و برای نمونه‌های غیرایدزی ۱۰۰ درصد تعیین شد. حساسیت روش PCR ساده به ترتیب ۱۰۰ و ۸۷ درصد و حساسیت Real-time PCR به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۸٤/۹ درصد تعیین شد و اظهار شد که روش Real-time PCR به دلیل کمی بودن، روش مناسبی برای تمیزدادن بیماران کلونیزه بدون علامت است [۱۶]. از آنجا که رنگ‌آمیزی گیمسا نسبت به دیگر رنگ‌آمیزی‌ها مدت زمان بسیار کمتری نیاز دارد و همه فرم‌های ارگانیسم با این رنگ‌آمیزی رنگ می‌گیرند و همچنین از لحاظ هزینه مقرون به صرفه است، لذا در بسیاری از آزمایشگاه‌ها جهت تشخیص پنوموسیستیس جیرووسی بکار می‌رود. اما از معایب این رنگ‌آمیزی این است که سلول‌ها و بافت‌های میزبان نیز رنگ گرفته در نتیجه، در بررسی میکروسکوپی باید وقت بیشتری را صرف مشاهده گسترش کرد تا بتوان ارگانیسم را از بافت میزبان تفکیک داد. همینطور تهیه نمونه مناسب، رنگ‌آمیزی مطلوب، دقت و حوصله کافی جهت جستجوی ارگانیسم ضروری است. از ۳۶۷ نمونه‌ای که برای آنها اسمیر تهیه و رنگ آمیزی انجام شد در بررسی میکروسکوپی تنها یک نمونه از نظر پنوموسیستیس جیرووسی مثبت تشخیص داده شد. به عبارتی می‌توان اینطور بیان کرد که روش رنگ‌آمیزی اگرچه برای شناسایی مزایا و جذابیت‌های خاص خود را دارد، اما به دلیل تفاوت‌های موجود در میزان مهارت تکنسین و تبحر در شناسایی این ارگانیسم تشخیص از طریق اسمیر از حساسیت پایینی برخوردار است و بسیاری از موارد مثبت بویژه در بار کم عفونت ممکن است با این روش تشخیص داده نشود.

اساس تست‌های مولکولی یا PCR بر کپی‌برداری از توالی DNA یا RNA نمونه مورد نظر است، که بر این اساس می‌توان ارگانیسم مورد نظر را تشخیص داد. PCR برای تشخیص بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های عفونی کاربرد دارد [۱۷] و به دو دسته عمده تقسیم می‌شود: نوع کیفی که نوع ارگانیسم را مشخص می‌کند و نوع کمی که مقدار ارگانیسم را بیان می‌کند [۱۸]. این نکته نیز قابل ذکر است که برای انجام PCR می‌توان از نمونه‌هایی مانند بافت و مایعات بدن کمک گرفت. حتماً لازم نیست نمونه تازه باشد از نمونه‌های بایگانی شده نیز می‌توان استفاده کرد و حتی بعد از مصرف آنتی‌بیوتیک نیز آزمایش قابل انجام است [۲۰-۱۹].

PCR روشی حساس و اختصاصی بوده و پتانسیل لازم جهت تشخیص پنوموسیستیس در نمونه‌های مختلف مانند آسپیراسیون نازوفارنکس، شستشوی دهانی و خلط را دارد [۲۱]. همچنین دارای ارزش اخباری منفی بالایی است که نشان دهنده ارزش نتیجه آزمایش در رد عفونت پنوموسیستیس است [۲۲]. در روش‌های مولکولی جهت بررسی پنوموسیستیس از ژن‌هایی مانند mtLSU[2] می‌توان استفاده کرد. این ژن به تعداد چندین کپی در پنوموسیستیس وجود دارد و مشخص شده است که از حساسیت بالایی برای شناسایی برخوردار است. دقیق‌ترین روش برای تشخیص پنوموسیستیس در نمونه‌های خلط القا شده یا BAL روش Nested-PCR است اما در این روش امکان تشخیص PCP بالینی از کلونیزاسیون تحت بالینی وجود ندارد و جهت حل این مشکل باید از یک PCR کمی استفاده شود. qPCR امکان تعیین کمیت DNA پنوموسیستیس را فراهم می‌کند و دارای توانایی تمایز

[1] Flori

[2] Mitochondria LargeSubunit

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

بین کلونیزاسیون و عفونت فعال بر اساس میزان بار عفونت است [۲۳،۲٤]. روش PCR مخصوصا برای بیماران مبتلا به نقص ایمنی غیر از HIV مفید است زیرا این بیماران اغلب با بار کم ارگانیسم مراجعه می‌کنند و ممکن است با استفاده از روش‌های میکروسکوپی تشخیص داده نشود [۲۵]. به منظور افزایش حساسیت و ویژگی تست برای انجام آزمایشات مولکولی در این مطالعه از روش Nested-PCR استفاده شد. در این روش مقادیر جزئی از DNA ارگانیسم در نمونه با دقت و صحت بالایی ردیابی می‌شود. این روش دارای دو مرحله PCR1 و PCR2 است، دو مرحله‌ای بودن این روش عامل موثر در افزایش حساسیت آن محسوب می‌شود و به دلیل آنکه پرایمرهای PCR2 به طور مشخص برای تکثیر قطعه‌ای از درون PCR1 طراحی شده است احتمال تکثیر قطعات غیراختصاصی به میزان بالایی کاهش می‌یابد و نتایج حاصل به طور معمول قابل قبول است. از ۳۶۷ نمونه BAL ۲۸ نمونه در روش Nested–PCR از نظر پنوموسیستیس جیرووسی مثبت شدند. نتایج حاصل از Nested-PCR و مقایسه آن با نتایج به دست آمده از روش رنگ‌آمیزی بیانگر این حقیقت است که این روش مولکولی دقیق‌تر بوده و موارد مثبت بیشتری توسط آن شناسایی می‌شوند و احتمال نادیده گرفته شدن موارد عفونی به میزان بالایی کاهش می‌یابد.

یکی از محدویت‌های مهم استفاده از Nested-PCR که یک روش مولکولی حساس با اختصاصیت بالا است و می‌توان برای تشخیص ارگانیسم در آزمایشگاه‌ها استفاده کرد ولی نیازمند تجهیزات و دستگاه‌هایی با هزینه بالا و نیروهای آموزش دیده و متخصص است. لذا توصیه می‌شود که در آزمایشگاه‌های مرجع این روش مولکولی برای تشخیص پنوموسیستیس راه‌اندازی شود.

نتیجه‌گیری

امروزه متعاقب مصرف داروهای سرکوبگر ایمنی بروز این پاتوژن فرصت‌طلب نیز در حال افزایش است. تشخیص زود هنگام و درمان به موقع پنومونی پنوموسیستیس برای بقاءِ بیماران دارای نقص سیستم ایمنی از اهمیت بالایی برخوردار است اما متاسفانه تشخیص ارگانیسم در بیماران صرفاً با تکیه بر علائم بالینی بسیار دشوار بوده و همچنین به دلیل فقدان روش کشت آزمایشگاهی، اختصاصی نبودن روش‌های سرولوژیکی و وجود واکنش‌های متقاطع تشخیص این پاتوژن با استفاده از روش‌های نامبرده مقدور نیست. روش رنگ‌آمیزی و مشاهده ارگانیسم زیر میکروسکوپ نیز اگرچه استاندارد طلایی در تشخیص است ولی حساسیت آن پایین بوده و در مواردی که بار عفونت پایین است امکان تشخیص منفی کاذب وجود دارد. اما روش Nested-PCR دارای کارایی بالا در شناسایی ژنوم این میکروارگانیسم حتی در بار پایین عفونت است و روشی قطعی در تشخیص محسوب می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم نرگس چیت ساز با کد طرح شماره ۲۱۷۲۲ و کد اخلاق IR.IUMS.FMD.REC.1400.536 از دانشگاه علوم‌پزشکی ایران استخراج شده است.

تضاد منافع

در این تحقیق هیچگونه تضاد منافعی برای نویسندگان وجود ندارد.

References

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

1- Meenakshi K, Gowtham, RR, USha, K. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: a Revisit to the old Malady. J Clin Diagn Res. 2019; 13(11):1-8.
2- Hammarström H, Grankvist A, Broman I, Kondori N, Wennerås C, Gisslen M, et al. Serum-based diagnosis of Pneumocystis pneumonia by detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA and 1, 3-β-D-glucan in HIV-infected patients: a retrospective case control study. BMC Infect Dis. 2019; 19(1):1-10.
3- Mohebali M, Mirbakhsh M, Keshavarz H. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in spiratory specimens of rats by calcofluor white staining. Iran J Public Health. 2002.31(3-4):108-110.
4- Dellière S, Gits-Muselli M, Bretagne S, Alanio A. Outbreak-causing fungi: *Pneumocystis jirovecii*. Mycopathologia. 2020; 185(5):783-800.
5- Nevez G, Guillaud-Saumur T, Cros P, Papon N, Vallet S, Quinio D, et al., Pneumocystis primary infection in infancy: additional french data and review of the literature. Med Mycol. 2020; 58(2):163-171.
6- Fauchier T, Hasseine L, Gari-Toussaint M, Casanova V, Marty PM, Pomares C. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-positive and HIV-negative patients. J Clin Microbiol. 2016; 54(6):1487-1495.
7- Vera C, Rueda ZV. Transmission and colonization of *Pneumocystis jirovecii*. J Fungi. 2021; 7(11):979-995.
8- Lagrou K, Chen S, Masur H, Viscoli C, Decker CF, Pagano L, et al. *Pneumocystis jirovecii* disease: basis for the revised EORTC/MSGERC invasive fungal disease definitions in individuals without human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 2021; 72(Supplement_2):114-120.
9- Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(1):39-49.
10- Pennington K, Wilson J, Limper AH, Escalante P. Positive *Pneumocystis jirovecii* sputum PCR results with negative bronchoscopic PCR results in suspected Pneumocystis pneumonia. Can Respir J. 2018; 2018:1-5.
11- 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.
12- Khodadadi H, Mirhendi H, Mohebali M, Kordbacheh P, Zarrinfar H, Makimura K. *Pneumocystis jirovecii* colonization in non-HIV-infected patients based on nested-PCR detection in bronchoalveolar lavage samples. Iran J Public Health. 2013; 42(3):298-305.
13- Gantois N, Lesaffre A, Durand-Joly I, Bautin N, Le Rouzic O, Nseir S, et al. Factors associated with Pneumocystis colonization and circulating genotypes in chronic obstructive pulmonary disease patients with acute exacerbation or at stable state and their homes. Med Mycol. 2022; 60(1): myab070.
14- Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JC, Wakefield AE, Miller RF, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. Thorax. 2003; 58(7):594-597.
15- Rozaliyani A, Sjam R, Tugiran M, Adawiyah R, Dwiatmo C, Haryanto B, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by nested PCR in lung cancer patients in a tertiary hospital in Jakarta: A preliminary study. Int J Infect Dis. 2020; 101:386-387.
16- Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol. 2004; 53(7):603-607.
17- Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Trop Med Int Health. 2008; 13(9):1159-1171.
18. Morley AA. Digital PCR: A brief history. Biomol Detect Quantif. 2014; 1(1):1-2.
19. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med. 1990; 322(3):178-183.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]

20- Baumforth KR, Nelson PN, Digby JE, O'Neil JD, Murray PG. Demystified the polymerase chain reaction. Mol Pathol. 1999; 52(1):1-1.
21- Bateman M, Oladele R, Kolls JK. Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A review of current methods and novel approaches. Med Mycol. 2020; 58(8):1015-1028.
22- McTaggart LR, Wengenack NL, Richardson SE. Validation of the MycAssay Pneumocystis kit for detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage specimens by comparison to a laboratory standard of direct immunofluorescence microscopy, real-time PCR, or conventional PCR. J Clin Microbiol. 2012; 50(6):1856-1859.
23- Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jiroveci*: evaluation of 9 assays. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 58(4):385-392.
24- Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(10):1531-1537.
25- Maillet M, Maubon D, Brion JP, François P, Molina L, Stahl JP, et al. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33(3):331-336.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/jarums.23.4.330]