

مقاله اصلی

شناسایی مولکولی نوموسیستیس جیروسی در بین بیماران دیابتی مبتلا به اختلال تنفسی در بیمارستان امام رضا (ع) مشهد ۹۳-۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲۵

خلاصه

مقدمه

هدف از این مطالعه بررسی از نظر آلودگی به *Pneumocystis jirovecii* در بین ۱۶ بیمار مبتلا به دیابت بود که به دلیل اختلال مزمن تنفسی در بیمارستان امام رضا مشهد بستری شده بودند.

روش کار

این مطالعه توصیفی مقطعی از بهمن ماه ۱۳۹۱ تا بهمن ماه ۱۳۹۲ در بیمارستان امام رضا (ع) مشهد انجام شد. نمونه مایع شستشوی برونش ۱۶ بیمار دیابتی دارای اختلال مزمن تنفسی توسط متخصصان بیماریهای ریه نمونه گیری شده و به بخش انگل شناسی و قارچ شناسی ارسال شد. دی ان ای نمونه ها پس از سانتریفیوژ و نگهداری در یخچال استخراج و سپس به روش ملکولی Nested-PCR شناسائی گردید.

نتایج

از ۱۶ بیمار دیابتی بستری از نظر اختلالات تنفسی ریوی، ۹ نفر مرد (۵۶/۳٪) و ۷ نفر زن (۴۳/۸٪) بودند. بر روی تمام نمونه های مطالعه آزمایش مولکولی صورت پذیرفت که ۳ نمونه (۱۸/۸٪) از مجموع ۱۶ نمونه در آزمایش PCR مثبت شدند. در بین ۳ بیمار مبتلا، ۲ بیمار مرد و ۱ بیمار زن بودند.

نتیجه گیری

بالا بودن قند خون منجر به کاهش قدرت سیستم ایمنی همینطور اختلال در سیستم ایمنی می شود، بنابراین باید این بیماران نیز در زمان ابتلا به اختلال تنفسی از نظر نوموسیستوزیس بررسی شوند.

کلمات کلیدی: پی سی ار، دیابت، نوموسیستیس جیروویسی، نوموسیستوزیس

پی نوشت: این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد شماره آ-۵۲۳ دانشکده پزشکی و طرح تحقیقاتی کد ۹۱۰۷۵۹ مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد می باشد و نویسندگان معترفند که هیچگونه گرایش منفاع و یا تضاد علاقه با هیچ موسسه و نظیر آن ندارند.

^۱ عبدالمجید فتی

^۲ محمود پریان*

^۳ فریبا رضائی طلب

^۴ محمد جواد نجف زاده

^۵ علی ناصری

^۶ لیدا جراحی

^۷ بهزاد مواجی

۱-استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲-۷، کارشناس ارشد انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳-دانشیار بیماری های ریه، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴-۵، استادیار انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۶-استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

*مشهد- بیمارستان امام رضا، بخش انگل

شناسی و قارچ شناسی، مشهد، ایران

تلفن: ۰۵۱-۳۸۰۲۲۲۱۴-۹۸+

email: Pariannm1@mums.ac.ir

مقدمه

نوموسیستیس جیروویسی عامل بیماری نوموسیستوزیس^۱ است که قبلاً بطور اختصار PCP گفته می شد یکی از عوامل قارچی ذات الریه بینابینی سلولی^۲ می باشد. همراه با شیوع و گسترش بیماری ایدز در جهان موارد ابتلا به بیماری نوموسیستوزیس بیشتر شد. این بیماری که قبلاً فقط در یتیم خانه ها و اماکن دور از نور خورشید و هوای سالم مشاهده می شد به یک عفونت شایع در بین مبتلا به ایدز تبدیل شد (۱-۶). علاوه بر مبتلایان به ایدز گروه های دیگری که احتمال بیشتری برای ابتلا به بیماری نوموسیستوزیس دارند عبارتند از: افراد مبتلا به اختلالات ایمنی و دارای بیماری های زمینه ای بجز ایدز، مبتلایان به انواع بدخیمی، دیابت، مبتلایان به نقص های ایمنی مادرزادی، گیرندگان عضو پیوندی و استفاده کنندگان از داروهای سرکوب کننده ایمنی (۷-۱۱). در ایران چند مطالعه بر مبتلایان به ایدز و سایر بیماری های زمینه ای و نقص ایمنی انجام شده است که نتایج این مطالعات نشان می دهد بیماری در میان افراد سالم نیز دیده می شود. افراد مبتلا به دیابت کنترل نشده با مشکلات زیادی روبرو هستند از جمله استعداد ابتلا به عفونت های میکروبی و قارچی (۱۲، ۱۳). هدف از این مطالعه که در بخش ریه و آزمایشگاه قارچ شناسی بیمارستان امام رضا، مشهد انجام شد بررسی از نظر آلودگی به قارچ *Pneumocystis Jirovecii* در بین بیماران ریوی با زمینه دیابت بود.

روش کار

در این مطالعه مقطعی که طی مدت یک سال (بهمن ۱۳۹۱ تا بهمن ۱۳۹۲) در بخش برونوسکوپي مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی امام رضا (ع) انجام گردید، نمونه مایع شستشوی برونش (BAL)^۳ کل ۱۶ بیمار دیابتی دارای اختلال مزمن تنفسی توسط متخصصین بیماریهای ریه نمونه گیری شده و به بخش انگل شناسی و قارچ شناسی ارجاع داده شد. تجزیه و تحلیل آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و استفاده از آزمون های آماری ضریب دقیق فیشر و تی انجام شد. این نمونه ها بر اساس درخواست پزشک معالج و در ادامه روند استاندارد تشخیص و درمان بیماران بوده و هیچ روش تشخیصی و نمونه گیری اضافه ای به بیمار تحمیل نشد، با این وجود هنگام دریافت شرح حال و تکمیل پرسشنامه، رضایت آگاهانه بیماران دریافت شد. پس از تکمیل اطلاعات، نمونه ها با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی از رسوب انتهایی جدا شد. در این مرحله رسوب در یک میکروتیوپ استریل ریخته و تا زمان انجام آزمایش PCR در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت استخراج DNA نمونه ای جمع آوری شده از کیت تجاری Primeprep™ Genet Bio (ساخت کره جنوبی) استفاده شد که بر اساس دستورالعمل کیت مذکور DNA نمونه ها استخراج شدند. برای انجام روش مولکولی از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی برای نوموسیستیس جیروویسی استفاده شده که هر دو مربوط به زیر واحد میتوکندریایی بزرگ RNA ریوزومی mtLSU rRNA شامل پرایمرهای خارجی pAZ102-H و pAZ102-E پرایمرهای داخلی pAZ102-X و pAZ102-Y پرایمرهای استفاده شد. پرایمرهای pAZ102-E و pAZ102-H قطعات ۳۴۶ جفت بازی و پرایمرهای pAZ102-X و pAZ102-Y قطعات ۲۶۰ جفت بازی را تکثیر می کنند (۱۴).

برای انجام آزمایش PCR در مرحله اول: دو میکرولیتر از DNA استخراج شده به محلول محتوی: ۲/۵ میکرولیتر بافر X10، ۲/۵ میکرولیتر از MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs، ۱ میکرولیتر از پرایمرها، و ۱ میکرولیتر از Taq polymerase اضافه شد. برنامه انجام PCR به صورت زیر با دستگاه ترموسایکلر ABI (ساخت امریکا) انجام گردید:

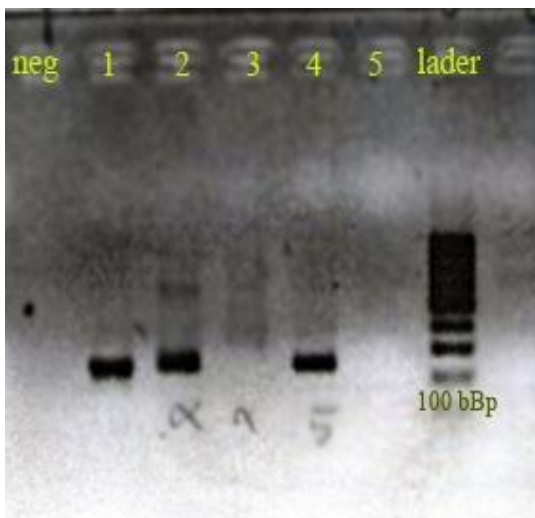
مرحله اول برای تهیه قطعه ژنی ۳۴۶ بازی، ابتدا نمونه های آماده شده ۵ دقیقه در ۹۴°C نگهداری شدند (Initial Denaturation). سپس ۱۵ سیکل متوالی شامل: ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد (Denaturation)، ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد (Annealing) و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد (Extension)

^۱ Pneumocystis Jirovecii Pneumonia^۲ Interstitial Cell Pneumonia^۳ Broncho Alveolar Lavage

جدول ۱- فراوانی بیماران دیابتی مبتلا به اختلال تنفسی بر

حسب علائم بیماری در بیمارستان امام رضا (ع) مشهد ۹۲-۱۳۹۱

درصد	جمع	فراوانی موارد مثبت		س
		مرد	زن	
۷۵	۱۲	۷	۵	تب
۹۳/۸	۱۵	۸	۷	سرفه
۱۰۰	۱۶	۹	۹	خس خس
۳۱/۲۵	۵	۳	۲	خلط کف آلود
۵۶/۲۵	۹	۶	۳	درد قفسه سینه



شکل ۱- نتیجه آزمایش PCR مرحله دوم (Nested) خون در بیماران دیابتی با اختلال تنفسی در بیمارستان امام رضا (ع) مشهد

چنانچه در جدول ۱ ملاحظه می شود از نظر ابتلا به علائم بالینی با توجه به سوالات پرسشنامه ۱۲ نفر مبتلا به تب (۷۵٪)، ۱۵ نفر مبتلا به سرفه های مداوم (۹۳/۸٪) و ۱۶ نفر از خس خس سینه (۱۰۰٪) شکایت داشتند.

بر روی تمام نمونه های مطالعه آزمایش مولکولی طبق روش های ذکر شده، مطالعه صورت پذیرفت که ۳ (۱۸/۸٪) نمونه از مجموع ۱۶ نمونه مورد آزمایش در آزمایش PCR مثبت ارزیابی شدند (شکل ۱).

نتایج آزمایش PCR برای شانزده بیمار بر اساس میانگین قند خون هریک و به تفکیک جنس نیز مورد بررسی قرار گرفت. (جدول شماره ۲)

برای راند داخلی PCR (Nested PCR) و تهیه قطعه ژنی ۲۶۰ بازی، ترموسایکلر همانند مرحله اول، برنامه ریزی شد با این تفاوت که دمای Annealing در این مرحله ۵۹ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد.

محصول واکنش PCR داخلی در ژل آگاروز محتوی رنگ سایر گرین با استفاده از دستگاه الکتروفورز RUN شد و نتیجه با استفاده از دستگاه لومیناتور مورد تصویر برداری قرار گرفت (۱۵).

اندازه گیری قند خون تمام بیماران در زمان گرفتن نمونه BAL به روش رنگ سنجی (GOD-PAP) انجام شد (۱۶).

نتایج

در طول این مطالعه بیش از ۷۰ بیمار مبتلا به اختلالات تنفسی و دارای بیماری های زمینه ای کاهنده ایمنی که اندیکاسیون انجام برونکوسکوپی را داشتند در بخش های اورژانس داخلی و ریه مرکز آموزشی پژوهشی درمانی امام رضا (ع) بررسی شدند. برای هر فرد وارد شده به مطالعه پرسشنامه ای شامل اطلاعات شخصی و بالینی سوابق بیماری های زمینه ای و نتایج آزمایشگاهی در پرسشنامه ثبت می شد. از این میان شانزده بیمار دیابتی مبتلا به اختلال تنفسی معیار های ورود به این مطالعه را دارا بودند. تعداد ۱۶ نمونه مایع شستشوی برونش (BAL) که توسط متخصصین بیماریهای ریه تحت شرایط استاندارد گرفته شده و به آزمایشگاه فارچ شناسی بیمارستان امام رضا ارسال شده بود، مورد آزمایش مستقیم و مولکولی قرار گرفت. پس از طی مراحل آزمایشات و جمع آوری اطلاعات پرسشنامه و تجزیه و تحلیل آماری نتایج به شرح زیر حاصل شد:

از شانزده بیمار وارد شده به مطالعه ۹ نفر مرد (۵۶/۳٪) و ۷ نفر زن (۴۳/۸٪) بودند. علائم بالینی این بیماران در جدول شماره ۱ به تفکیک جنس مشخص گردیده است.

موارد پس از کنترل صحیح بیماری دیابت برگشت پذیر است (۱۳).

بالا بودن قند خون منجر به کاهش قدرت سیستم ایمنی، افزایش چسبندگی سطحی سلول ها و همینطور اختلال در سیستم همورال و البته سرکوب گیرنده های سطحی سلولهای سیستم ایمنی می شود. با توجه به گزارشات اپیدمیولوژیک شیوع دیابت در جوامع معادل ۱۰٪ است که آماری بسیار بیشتر از آمار ایدز در جامعه است بنابراین اختلال تنفسی در این بیماران مهم و قابل بررسی است. بیماری دیابت زمینه ساز ابتلاء به انواع متعددی از عفونت های قارچی است که از آن جمله موکور مایکوزیس و کاندیدیازیس را می توان نام برد. در یک مطالعه ۷۵٪ از بیماران دیابت داشته اند (۱۸). در مطالعه دیگر تمام بیماران مبتلا به کراتیت قارچی کاندیدائی مبتلا به دیابت بوده اند (۱۹). حتی دیابتی هائی که دچار زخم پای دیابتیک می شوند، ممکن است زخم هایشان ناشی از عفونت قارچی باشد یا اینکه قارچ ها بر زخم پای دیابتی سوار شوند (۲۰). با این حال گزارش های اندکی از ابتلاء به نوموسیستوزیس در زمینه بیماری دیابت در دست است. در مطالعه سانو^۴ در سال ۲۰۰۷ گزارشی از یک مورد ابتلا به نوموسیستیس جیروسی در یک بیمار ۷۶ ساله مبتلا به دیابت تیپ ۲ گزارش شده که پس از درمان با تریمتوپریم/سولفومتوکسازول درمان شده است (۱۶). در مطالعه اخیر در میان ۱۶ بیمار دیابتی دارای اختلال تنفسی فقط سه نفر (۱۸/۸٪) از نظر ابتلا به نوموسیستوزیس با آزمایش مولکولی مثبت شناخته شدند که نمی توان نتیجه گیری قاطعی در این مورد ارائه نمود. با این حال درصد آلودگی به قارچ مذکور به نسبت جمعیت مطالعه شده و نیز مطالعاتی که در سایر جمعیت ها انجام شده است چشمگیر است.

هرچند تمام بیماران در این مطالعه مورد معاینه برونکوسکوپی قرار گرفته و مایع حاصل از شست و شوی برنش (BAL) آن ها به روش مستقیم و ملکولی آزمایش شده است، لیکن در مطالعات دیگر از خلط و حتی آب دهان بیماران توانسته اند نوموسیستیس را جدا نمایند.

جدول ۲- میزان میانگین قند خون در بیماران دیابتی با اختلال تنفسی بر حسب نتیجه آزمایش PCR در بیمارستان امام رضا (ع)

مشهد ۹۲-۱۳۹۱

نتیجه PCR	جنس	میزان قند خون Mg/dl			مجموع
		۱۵۰-۱۰۰	۲۰۰-۱۵۱	۳۰۰-۲۵۱	
مثبت	مرد	-	۲	-	۲
	زن	-	۱	-	۱
	مرد	۱	۲	۱	۷
منفی	زن	۲	۳	-	۶
	مجموع	۳	۸	۱	۱۶

چنانچه در جدول شماره ۲ ملاحظه می شود هر سه بیماری که آزمایش PCR آن ها از نظر نوموسیستیس مثبت شده است دارای میانگین قند خون ۱۵۰-۲۰۰ mg/dl بوده اند.

بحث

اولین موارد بیماری نوموسیستوزیس (PCP) در اواخر جنگ جهانی دوم از یک یتیم خانه در اروپا گزارش شده است (۳). بیشترین موارد بیماری در میان افراد مبتلا به ایدز دیده شد و بررسی گردیده است اما گروه دیگری از جامعه که احتمال بیشتری برای ابتلا به بیماری نوموسیستوزیس دارند مبتلایان به اختلالات ایمنی بجز ایدز می باشند (۳، ۱۷).

هر چند دیابت را نمی توان به عنوان یک بیماری نقص ایمنی به حساب آورد، لیکن اختلالاتی که در بیماران دیابتی ایجاد می شود می تواند سطح ایمنی را به شکل محسوسی کاهش دهد. اینکه بیماران دیابتی بیشتر دچار عفونت های باکتریال و ویرال می شوند دلیل روشنی بر این مطلب است. دلایل علمی که بتواند این موضوع را تایید نماید قابل توجه اند. یکی از اختلالاتی که در رابطه با کاهش سطح ایمنی در این گونه بیماران اتفاق می افتد کم شدن فعالیت سلول های مسئول در دفاع از بدن می باشد. عملیات سلول های دفاعی شامل سلول های پلی مورفونوکلوثر و مونوسیت ها و ماکروفاژها نظیر مهاجم^۱، بیگانه خواری^۲، کشتن توسط سلول های کشنده^۳ به طور بارزی کاهش می یابد. این

^۱ Chemotaxis & infiltration

^۲ Phagocytosis

^۳ Natural Killers

^۴ Sanno

از نگاه دیگر باید توجه داشت در عین حال که دستگاه برونکوسکوپ پس از هر بار استفاده شستشو و ضد عفونی می شود شواهدی در دست است که احتمالاً مواد ضد عفونی کننده فقط روی باکتری ها و ویروس ها تاثیر دارند و ممکن است همیشه روی قارچ ها تاثیر نداشته باشند و همین مورد می تواند زنگ خطری باشد برای انتقال آلودگی از طریق دستگاه برونکوسکوپ.

شیوع نوموسیستوزیس در بین گروههای مختلف در ایران بین ۱۱/۷ تا ۱۲/۷ بر حسب مطالعات مختلف متغیر بوده است که به نظر می رسد نوع جمعیت انتخابی و شرایط اقلیمی منطقه و سایر عواملی که متاسفانه دقیقاً مورد کنکاش قرار نگرفته اند در آن مطالعات موثر بوده است (۲۱-۲۴).

بیماران بخصوص افراد سالخورده و دارای نقص ایمنی و مبتلا به نوموسیستیس جیروسی ممکن است به علت بیماری های دیگر، در بخش های ویژه بیمارستانی حضور پیدا کنند، در نتیجه این افراد می توانند عامل انتقال عفونت نوموسیستیس جیروسی به دیگر افراد دچار اختلال سیستم ایمنی شوند.

در ایران همانند بسیاری از کشورهای در حال توسعه به دلیل کمبود منابع در بیمارستان ها و بخش های دولتی از روش های قدیمی تر برای تشخیص عوامل عفونی استفاده می شود از جمله در تشخیص نوموسیستوزیس که از رنگ آمیزی گیمسا برای تشخیص استفاده می شود که تماماً به توان علمی و عملی تکنسین آزمایشگاه وابسته است و از حساسیت پایینی برخوردار است. حال آنکه استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز به دلیل حساسیت و اختصاصیت بالا در تشخیص نوموسیستیس جیروسی در اکثر مقالات مورد ارزیابی قرار گرفته است (۲۲، ۲۵-۲۷).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج آزمایشات مولکولی در میان جمعیت مورد بررسی بیماری نوموسیستوزیس در منطقه ما وجود دارد و عدم وجود گزارشات پیش از طرح به علت استفاده از روش های روتین و با حساسیت کم بوده است. پس استفاده از روش مولکولی شرایط را برای تشخیص موارد بیشتری از بیماران هموار می سازد. دیگر اینکه بیماری نوموسیستوزیس در بیماران دارای نقص یا اختلال ایمنی نیز بروز می کند. بنابراین باید این بیماران نیز در زمان ابتلا به اختلال تنفسی از نظر نوموسیستوزیس بررسی شوند.

بررسی از نظر نوموسیستوزیس بر مبتلایان به نقص های ایمنی به صورت روتین مطمئناً منجر به کشف بیشتر موارد بیماری و البته تشخیص و درمان سریعتر این بیماران خواهد شد. با توجه به عدم گزارش مورد مثبت نوموسیستیس پیش از اجرای این طرح در مشهد، نتایج این مطالعه می تواند پایه ای برای تحقیقات بعدی در این زمینه باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد شماره آ-۵۲۳ دانشکده پزشکی و طرح تحقیقاتی کد ۹۱۰۷۵۹ مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد می باشد. نویسندگان مقاله به دلیل حمایت های مالی طرح مذکور توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، همچنین از همکاری ارزنده سرکار خانم دکتر تاج زاده تشکر و قدردانی می نمایند. نویسندگان معترفند که هیچگونه گرایش منافع و یا تضاد علاقه با هیچ موسسه و نظیر آن ندارند.

References:

1. Masur H, Brooks JT, Benson CA, Holmes KK, Pau AK, Kaplan JE. Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents: Updated Guidelines From the Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, and HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2014;58(9):1308-1311.
2. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *New England J Med* 1981;305(24):1431-1438.
3. Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis* 2004;10(10):1713-1720.
4. Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Diseases* 2002;34(8):1098-1107.
5. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):891-896.
6. Thomas CF, Jr., Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. *New England J Med* 2004;350(24):2487-2498.
7. Baumann S, Reinwald M, Haghi D, Hofmann WK, Buchheidt D. Coinfection of *Pneumocystis jirovecii* and invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompromised patient: a diagnostic challenge. *Onkologie* 2013;36(10):582-584.
8. Morrow BM, Samuel CM, Zampoli M, Whitelaw A, Zar HJ. *Pneumocystis pneumonia* in South African children diagnosed by molecular methods. *BMC Res Notes* 2014;7:26.
9. Sulieman S, Metjian T, Zaoutis T, Fisher B. *Pneumocystis Pneumonia: Epidemiology and Options for Prophylaxis in Non-HIV Immunocompromised Pediatric Patients*. *Curr Fungal Infect Rep* 2014;8(1):45-55.
10. Vakil A, Okhotin H, Upadhyay H, Sherani K, Cervellione K, Fein A. *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia (PJP) in a Renal Transplant Patient: Diagnostic and Management Difficulties. *Chest* 2013;144(4_MeetingAbstracts):192A.
11. Walzer PD, LaBine M, Redington TJ, Cushion MT. Predisposing factors in *Pneumocystis carinii* pneumonia: effects of tetracycline, protein malnutrition, and corticosteroids on hosts. *Infect Immun* 1984;46(3):747-753.
12. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26(3-4):259-265.
13. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998;41(10):1241-1248.
14. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Moxon ER, Miller RF, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990;336(8713):451-453.
15. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Kumar L, Samantaray JC, Agarwal SK, 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):381-388.
16. Sanno K, Hatanaka N, Yamagishi T, Kamemura H, Hirano Y, Kodaka N, et al. *Pneumocystis pneumonia* in a patient with type 2 diabetes mellitus. *Intern Med* 2007;46(14):1131-1133.
17. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and Clinical Significance of *Pneumocystis* Colonization. *J Infect Dis* 2008;197(1):10-17.
18. Fata A, Noori M, Another Look at the cases of Mucormycosis at Emamreza Hospital. *Med J Mashhad Univ MedSc* 2006;49(2):173-178.
19. Fata S, Derakhshan A, Bolurian A, KHakshor H, Sedaghat M.R, Najafzadeh MJ, et al. Mycotic Keratitis : A study on etiologic agents, predisposing factors and treatment in Mashhad. 1th Iranian Congress on Medical Mycology sari-Iran -May: 2011.
20. Fata S, Saeed Modaghegh MH, Faizi R, Najafzadeh MJ, Afzalaghae M, Ghasemi M, et al. Mycotic infections in diabetic foot ulcers in Emam Reza hospital, Mashhad, 2006-2008. *Jundishapur J Microbiol* 2011;4(1).
21. Khodadadi H, Mirhendi H, Mohebbali M, Kordbacheh P, Zarrinfar H, Makimura K. *Pneumocystis jirovecii* Colonization in Non-HIV-Infected Patients Based on Nested-PCR Detection in Bronchoalveolar Lavage Samples. *Iranian J Public Health* 2013;42(3):298-305.
22. Sheikholeslami MF, Sadraei j, Farnia P, Forozandeh M, Emadi Kochak H, Tabarsi P, et al. Colonization of *Pneumocystis jirovecii* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) patients and the rate of *Pneumocystis pneumonia* in Iranian non-HIV+ immunocompromised patients. *Iran J Microbiol* 2013;5(4):411-417.
23. Sheikholeslami MF, Sadraei J, Farnia P, Forozandeh Moghadam M, Emadi Kochak H. Typing of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Iranian immunosuppressed patients based on the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of the rRNA gene. *Med Mycol* 2013 Nov;51(8):843-850.
24. Sheikholeslami MF, Sadraei J, Farnia P, Forozandeh Moghadam M, Emadi Kochak H. Rate of *Pneumocystis pneumonia* in Iranian HIV+ Patients with Pulmonary Infiltrates. *Jundishapur J Microbiol* 2013;6(3):295-300.

25. Tekinsen FF, Koc AN. [Investigation of Pneumocystis jirovecii in clinical specimens by different methods]. Mikrobiyoloji bulteni 2013;47(4):658-667.
26. Summah H, Zhu YG, Falagas ME, Vouloumanou EK, Qu JM. Use of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of Pneumocystis pneumonia in immunocompromised patients: a meta-analysis. Chinese Med J 2013;126(10):1965-1973.
27. 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.
28. Fata A, Mirsadraee M, Rezaeetalab F, Berenji F, Mycotic infection in Broncho alveolar Lavage Samples.