



Infeksi Jamur Oportunistik *Pneumocystis jirovecii*

Conny Riana Tjampakasari

Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

ABSTRAK

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) sebelumnya dikenal sebagai *Pneumocystis carinii f. sp. Hominis*, yang diketahui sebagai penyebab infeksi oportunistik saluran pernapasan bawah pada individu dengan sistem kekebalan tubuh lemah, terutama penderita infeksi HIV. PjP terdistribusi di seluruh dunia dan dapat menyerang berbagai usia. *P. jirovecii* mempunyai beberapa faktor virulensi antara lain *major surface glycoprotein* (MSG), DHPS (dihidropteroat sintase), dan mtLSU (*mitochondrial large subunit*). Diagnosis PjP mengandalkan pemeriksaan mikroskopis dari berbagai spesimen saluran pernapasan. Metode lain adalah diagnosis molekuler untuk deteksi dan karakterisasi DNA. Pengobatan lini pertama dengan kombinasi trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX). Beberapa negara termasuk Indonesia telah melaporkan beberapa genotip resisten terhadap beberapa antibiotik. Penyebab resistensi antibiotik dapat disebabkan oleh pemakaian jangka panjang atau kesalahan deteksi karena seringkali gejalanya tidak khas.

Kata kunci: Diagnostik, faktor virulensi, *P. jirovecii*

ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) previously known as *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* are known to be the cause of opportunistic lower respiratory tract infections in individuals with decreased immunity, especially HIV infection. PjP is distributed throughout the world and can attack various ages. *P. jirovecii* has several virulence factors including major surface glycoprotein (MSG), DHPS (dihydropteroate synthase), and mtLSU (mitochondrial large subunit). Diagnosis of PjP relied on microscopic examination of various respiratory specimens. Another method is molecular diagnosis for detecting and characterizing DNA. The first-line treatment use trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX). Some countries including Indonesia have reported resistance to some antibiotics. It can be caused by long-term use or diagnostic error because of atypical symptoms. **Conny Riana Tjampakasari . Infection of Opportunistic Fungi *Pneumocystis jirovecii***

Keywords: Diagnostic, *P. jirovecii*, virulence factor

SEJARAH

Pneumocystis carinii pneumonia (PCP) merupakan infeksi paru yang disebabkan oleh jamur *Pneumocystis carinii*, kini dikenal dengan nama *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), sebagai penghormatan untuk ahli parasitologi berkebangsaan Cechnya, Otto Jirovec. Pada tahun 1909 mikroorganisme ini pertama kali ditemukan oleh Chagas kemudian pada tahun 1911 Carini dan Maciel menduga mikroorganisme yang ditemukan pada paru marmot ini sebagai salah satu tahap dalam siklus hidup *Trypanosoma cruzi*. Selanjutnya pada tahun 1942, Meer dan Brug menyatakan untuk pertama kalinya bahwa mikroorganisme tersebut merupakan salah satu jenis parasit patogen pada manusia. Kerjasama Vanek dengan Otto Jirovec pada tahun 1952, menggambarkan siklus paru dan patologi penyakit ini yang kemudian dikenal sebagai *parasitic pneumonia* atau pneumonia

sel plasma interstitial (*interstitial plasma cell pneumonia*) dan infeksiya kini disebut sebagai *Pneumocystis jirovecii pneumonia* (PjP).^{1,2} Pada tahun 1988, Edman dan Stringer mengemukakan perbedaan genetik *Pneumocystis* manusia dan tikus; urutan 18S rRNA *Pneumocystis* manusia dan *Pneumocystis* tikus berbeda 5%. Beberapa fragmen gen telah dianalisis dan diketahui bahwa urutan gen berbeda untuk setiap spesies pejamu.^{3,4}

Taksonomi

Berdasarkan penelitian biologi molekuler, morfologi dan biokimia, *P. jirovecii* yang sebelumnya dikenal sebagai *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* dimasukkan ke dalam golongan fungus (jamur) yang berhubungan erat dengan askomikota. Nomenklatur terbaru *Pneumocystis jirovecii*, yaitu:⁵⁻⁷

- *Kingdom* : Fungi
- *Sub kingdom* : Dikarya

- *Phylum* : Ascomycota
- *Subphylum* : Taphrinomycotina
- *Class* : Pneumocystidomycetes
- *Order* : Pneumocystidales
- *Family* : Pneumocystidaceae
- *Genus* : *Pneumocystis*
- *Species* : *P. jirovecii*

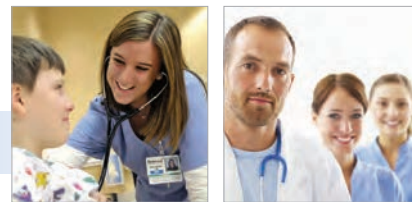
EPIDEMIOLOGI

Habitat *Pneumocystis* ditemukan secara luas di alam. Jamur ini dapat menginfeksi berbagai hewan; yang paling berpotensi sebagai reservoir adalah hewan pengerat. Sebelum epidemi AIDS pada awal 1980-an PjP jarang terjadi, biasanya diderita oleh pasien malnutrisi protein atau penderita *acute lymphocytic leukemia* (ALL) atau yang mendapat terapi kortikosteroid. Kini infeksi oportunistik ini sering dikaitkan dengan infeksi HIV.^{8,9}

HIV terkait PjP

Pada tahun 1980-an, di Amerika Serikat PjP

Alamat Korespondensi email: connyrianat@yahoo.com



merupakan penyakit yang menggambarkan AIDS pada dua pertiga dewasa dan remaja, dan 75% orang terinfeksi HIV diprediksi akan mengalami PJP selama masa hidupnya.¹⁰ Profilaksis PJP pada 1989 dan kombinasi ART (anti-retro viral) pada 1996 menurunkan PJP sebesar 3,4% per tahun dari 1992 hingga 1995 kemudian 21,5% per tahun selama 1996-1998. Insidensi di Eropa Barat dan Amerika Serikat menurun 2-3 kasus/100 orang per tahun.¹¹ Kasus baru terjadi pada individu yang tidak mengetahui statusnya sebagai HIV positif, atau tidak menerima pengobatan infeksi HIV.¹²

PJP di Negara Berkembang

Asia. Jumlah kasus PJP di Thailand meningkat setiap tahun dari tahun 1992 hingga 2000 dan mencapai puncaknya pada tahun 2000 sejumlah 6255 kasus.¹³ PJP telah didiagnosis pada 47% dari 291 pada penderita HIV/AIDS di Kamboja dan Vietnam dengan pewarnaan basil tahan asam negatif.⁹ Selama periode tahun 1985-2000, Hongkong melaporkan bahwa PJP menjadi infeksi oportunistik paling sering terkait HIV/AIDS.⁹ Di Indonesia, data terbaru menunjukkan prevalensi PJP sebesar 20%¹⁴

Afrika. PJP jarang tercatat karena tidak terdiagnosis atau tidak tersedianya pemeriksaan untuk PJP.¹⁵

Amerika Latin. *Pneumocystosis* telah didiagnosis pada 19,9% dari 168 pasien HIV/AIDS yang merupakan imigran ke Houston, Texas, dari Amerika Tengah, selama 1994-1998.¹⁶

Brazil. PJP merupakan infeksi oportunistik kedua tersering setiap tahunnya pada surveilans sejak tahun 1993 hingga 2002.¹⁶ Di Rio de Janeiro, 24-29% pasien AIDS telah didiagnosis PJP.¹⁶

PJP pada Orang HIV Negatif

Insidensi dan prevalensi PJP pada orang dengan HIV negatif telah dilaporkan selama studi 12 tahun (non-AIDS) pada Rumah Sakit di California. Angka kematian pasien penyakit vaskular-kolagen dan PJP sekitar 45,7%.¹⁷

Epidemiologi Molekuler

Dalam sebuah penelitian kohort di Eropa, lebih dari 5.000 pasien AIDS di Eropa Selatan memiliki *relative risk* lebih rendah dibandingkan dengan Eropa Utara.^{18,19} Dalam

sebuah penelitian di 5 kota di AS, pola genotip mtLSU dan genotip DHPS bervariasi berdasarkan tempat diagnosis pasien tetapi tidak berdasarkan tempat lahir.^{18,19} Selama periode tahun 1989 dan 1996 di Denmark, Helweg, dan Laren (2004) dilakukan studi molekuler terhadap genotip *internal transcribed spacer* (ITS) 1 dan 2. Berdasarkan jenis hibridisasi dan urutan subklon tertentu 130 pasien HIV diperoleh gambaran genotip ITS yang sangat kompleks.¹⁹ Di Indonesia telah diketahui terdapat 3 genotip gen DHPS dan 7 varian gen mtLSU yang bersirkulasi di Jakarta.¹⁴

ETIOLOGI

Morfologi

Vavra dan Kucera (1970) membagi siklus hidup *Pneumocystis jirovecii* menjadi 3 stadia:

1. Stadium trofozoit
Pada stadium ini dapat terlihat bentuk pleomorfik dan uniseluler, berukuran 1-5 μ , dan memperbanyak diri secara mitosis. Pada pewarnaan Giemsa, inti berwarna ungu gelap dan sitoplasma berwarna biru terang.²⁰
2. Stadium prakista
Merupakan bentuk intermediet antara trofozoit dan kista. Berbentuk oval dengan ukuran 3-5 μ dan ber dinding lebih tebal

(40-120 μ) daripada stadium trofozoit dengan jumlah inti 1-8.²¹

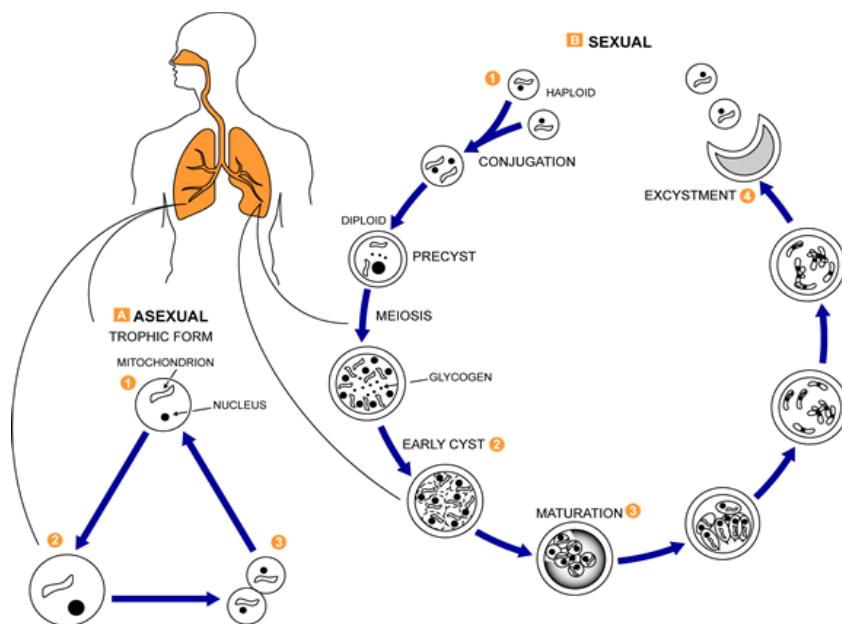
3. Stadium kista

Merupakan bentuk diagnostik pneumosis, juga diduga sebagai bentuk infeksi pada manusia. Dengan mikroskop fase kontras, kista mudah dilihat, berbentuk bulat dengan diameter 3,5-12 μ , mengandung 8 sporozoit dan trofozoit yang sedang berkembang. Sporozoit tersebut dapat berbentuk buah pir, bulan sabit, atau kadang-kadang terlihat kista ber dinding tipis dengan suatu massa di tengah yang homogen atau bervakuol.^{20,21}

Siklus Hidup

Siklus hidup lengkap mikroorganisme ini belum sepenuhnya dimengerti karena belum berhasil diisolasi *in vitro* dan sangat sulit mengobservasi siklus hidupnya hanya dari klinis. Secara umum siklus hidup berbagai spesies *Pneumocystis* seperti pada gambar 1.²²

Jamur ini ditemukan pada paru mamalia tanpa menyebabkan infeksi yang nyata sampai sistem imun hospes melemah, menyebabkan pneumonia yang fatal.²²



Gambar 1. Siklus hidup *P. jirovecii*

A. Fase aseksual: bentuk trofozoit (1) bereplikasi secara mitosis (2) ke (3).

B. Fase seksual: bentuk trofozoit haploid berkonyugasi (1) menghasilkan zigot diploid (2). Zigot membelah diri secara meiosis dilanjutkan secara mitosis menghasilkan 8 nukleus haploid (3). Kista stadium lanjut mengandung 8 sporozoit berisi spora yang akan keluar setelah terjadi eksistasi (4). Stadium trofozoit, kemungkinan mikroorganisme berkembang melalui *binary fusion*.²²



Gen-gen *P. jirovecii*

Genom *P. jirovecii* kurang berperan untuk virulensinya, pada umumnya genom lebih banyak digunakan untuk sintesis protein. Panjang keseluruhan genom adalah 8,1 mega bp, dengan kandungan G-C 28,4 %. *Coding* gen (exon) 68,9 % dengan rata-rata panjang tiap satu ekson 211 bp.^{23,24}

Internal Transcribed Spacer (ITS)

Teknik molekuler menggunakan variabel daerah genom telah digunakan untuk *typing P. jirovecii* dan untuk mempelajari epidemiologi PjP dengan menghubungkan genotip dengan karakteristik klinis.²⁵ Beberapa peneliti memperkirakan korelasi genetik antara *internal transcribed spacer* (ITS) genotip dan virulensi.^{25,26} Variasi tinggi beberapa tipe gen ITS seperti Eg, Ne, Kf, Bi, dan Ai menunjukkan kegunaan lokus genetik pada studi epidemiologi dan pada deteksi keragaman genetik.²⁵ Derajat polimorfisme yang tinggi diperkirakan karena gen-gen tersebut berkembang cepat. *Typing* ITS juga menunjukkan hubungan antara genotip ITS dan tingkat keparahan PjP.^{25,26}

Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Keragaman genetik *P. jirovecii* menunjukkan polimorfisme spesifik yang dapat menentukan profil epidemiologi, termasuk distribusi geografik, resistensi obat, virulensi, dan transmisi.²⁷ Diperkirakan SNP terletak pada *coding region* yang dapat berdampak pada *level* fenotip, perubahan fungsi gen, atau struktur protein yang dikode.²⁸ SNP yang terletak pada *non-coding region* dapat mempengaruhi fungsi gen dengan mengubah *splicing* dan stabilitas DNA atau bahkan jumlah dan ketersediaan protein.^{27,28}

Dihydropteroate Synthase (DHPS)

Dihidropteroat sintase (DHPS) merupakan target enzimatis atau target gen untuk sulfonamid yang merupakan obat profilaksis utama atau pengobatan *Pneumocystis pneumonia*.²⁹ Kombinasi trimetoprim-sulfametoksazol banyak digunakan untuk lini pertama profilaksis dan pengobatan pneumonia *P. jirovecii*.³⁰ Gen DHPS merupakan gen yang berpotensi mengalami mutasi berakibat resistensi terhadap trimetoprim-sulfametoksazol.³⁰

Mitochondrial Large Subunit (mtLSU) rRNA

Keragaman genetik *pneumocystis* pada

manusia pertama kali diobservasi pada *mitochondrial large subunit* (mtLSU) rRNA berdasarkan polimorfisme 3 nukleotida.³¹ Perbedaan sekuen tersebut kemudian diidentifikasi berdasarkan posisi nukleotida. Sejak saat itu *mtLSU* rRNA dijadikan studi berbagai variasi genomik dan taksonomi yang berhubungan dengan jamur ini.³² Gen mtLSU rRNA merupakan gen yang paling sering digunakan untuk target diagnosis dan kuantifikasi *P. jirovecii*.³³ Gen ini dapat digunakan untuk penelitian epidemiologi, determinasi, dan struktur genetik populasi karena memiliki derajat tinggi untuk konservasi genetik dan berguna untuk mendeteksi perbedaan intraspesifik pada populasi.³¹⁻³³

PATOGENESIS DAN PATOLOGI

P. jirovecii tersebar di mana-mana sehingga hampir semua individu pernah terpapar mikroorganisme ini. Transmisi mikroorganisme ini diduga dari orang ke orang, melalui *respiratory droplet infection* dan kontak langsung dengan kista sebagai bentuk infeksi pada manusia.³⁴ Singer, *et al*, (1975)³⁵ melaporkan bahwa transmisi dapat melalui *in utero* dari ibu ke bayi yang dikandungnya, dengan trofozoit sebagai bentuk infeksi. Masa inkubasi ekstrinsik diperkirakan 20-30 hari dengan durasi serangan selama 1-4 minggu.³⁶

Mikroorganisme ini merupakan patogen ekstraseluler. Paru merupakan tempat primer infeksi dan biasanya melibatkan dua bagian, paru kiri ataupun kanan. *P. jirovecii* terdapat di dalam kapiler alveolus, septum intralveolus interstitial, dan sel epitel.³⁷ Dalam kondisi tertentu *Pneumocystis* dapat menyebar ke berbagai lokasi ekstrapulmoner, yaitu di hati, limpa, kelenjar getah bening, dan sumsum tulang.³⁷

KLINIS

Gejala klinis PjP meliputi triad klasik, yaitu demam tidak terlalu tinggi, *dyspnoe* terutama saat beraktivitas, dan batuk non-produktif, frekuensi pernapasan meningkat sampai 90-120/menit, hingga sianosis.^{36,37}

Progresivitas gejala biasanya perlahan, dapat berminggu-minggu bahkan berbulan-bulan. Makin lama sesak napas akan bertambah hebat, Pada imunodefisiensi, persentase kematian dapat mencapai 100%.³⁶ Jika diagnosis lebih dini dan terapi adekuat, persentase kematian

dapat 10%,³⁷ namun sebagian besar kasus PjP bahkan baru terdiagnosis pada otopsi setelah pasien meninggal dunia.³⁸

Meskipun efek profilaksis dan imunomodulasi terapi antiretroviral secara aktif tinggi (HAART), PjP tetap merupakan infeksi oportunistik penting pada pasien terinfeksi HIV dan merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas individu dengan fungsi kekebalan tubuh menurun.³⁵ Faktor terkait peningkatan mortalitas pasien PjP antara lain usia lanjut, serum albumin lebih rendah, penggunaan ventilasi mekanik, pneumotoraks, gradien oksigen alveolar-arterial yang lebih besar, dan hemoglobin rendah.³⁶ Jumlah sel CD4+ lebih rendah dikaitkan dengan kematian yang lebih besar.³⁷ Faktor risiko terkuat PjP adalah jumlah sel CD4+ < 200 sel/L dan demam persisten.³⁷

Pada penderita anak-anak malnutrisi, *onset* perlahan, dijumpai kegagalan tumbuh kembang, yang akhirnya diikuti takipnoe dan sianosis. Sedangkan pada penderita immunosupresif, baik anak maupun dewasa, *onset* penyakit berjalan cepat.³⁷

Diagnosis

Secara umum diagnosis PjP dapat dilakukan melalui 2 cara, metode noninvasif dan invasif. Pemeriksaan noninvasif dapat dengan radiologi dada, sedangkan secara invasif dengan induksi sputum, bronkoskopi, biopsi torakoskopik, mikroskopik, dan deteksi molekuler.³⁶

Pada pemeriksaan radiografi dada, terlihat gambaran khas infiltrat bilateral simetris, mulai dari hilus ke perifer, dapat meliputi seluruh lapangan paru.³⁶ Namun, gambaran ini tidak spesifik *P. jirovecii* karena tidak berbeda dari infeksi jamur lain, seperti *Mycobacterium*, dan infeksi bakteri lain.^{36,37}

Diagnostik molekuler yang sangat sensitif seperti PCR telah dipelajari secara ekstensif untuk deteksi DNA spesifik *P. jirovecii* dari sampel klinis pasien dengan indeks kecurigaan klinis PjP tinggi.^{38,39}

TATALAKSANA

Pengobatan

Obat pilihan utama adalah kombinasi trimetoprim 20 mg/kg BB/ hari + sulfametoksazol 100 mg/kgBB/ hari per oral, dibagi 4 dosis dengan interval pemberian



tiap 6 jam selama 12 -14 hari. Obat alternatif lain namun lebih toksik adalah pentamidin isethionat 4 mg/kgBB/ hari diberikan 1x/hari secara IM atau IV selama 12-14 hari.¹⁸

Profilaksis

Profilaksis umumnya diberikan pada pasien imunodefisiensi/imunokompromi. Penderita HIV/AIDS dengan jumlah CD4 <300, dianjurkan mengonsumsi kemoprofilaksis PJP.³⁶ Kemoprofilaksis biasanya berupa kombinasi trimetropim + sulfametaksazol, 150 mg dan 750 mg/m²/hari dibagi 2 dosis dengan interval pemberian tiap 12 jam.^{36,37}

PROGNOSIS

Prognosis kurang baik karena onset cepat pada pasien imunodefisiensi/imunokompromais.³⁶ Bila PJP ditemukan pada pasien imunodefisiensi, kematian dapat mencapai 100%; persentase kematian dapat diturunkan hingga 10% bila infeksi dapat didiagnosis lebih dini dan terapi adekuat.³⁶ Namun, sebagian besar kasus PJP bahkan baru terdiagnosis pada pemeriksaan otopsi setelah pasien meninggal dunia.³⁷

Meskipun efek profilaksis dan imunomodulasi terapi anti-retroviral aktif tinggi, PJP tetap

sebagai infeksi oportunistik yang penting pada pasien terinfeksi HIV dan merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada individu dengan fungsi kekebalan tubuh menurun.¹⁸ Faktor terkait peningkatan mortalitas pasien PJP antara lain usia lanjut, serum albumin rendah, penggunaan ventilasi mekanik, pneumotoraks, gradien alveolar-arterial oksigen lebih besar, dan hemoglobin rendah.³⁶ Sel limfosit T CD⁴ lebih rendah dikaitkan dengan kematian lebih besar.^{36,37} Saat ini di Indonesia faktor risiko terkuat untuk PJP adalah jumlah sel sel limfosit T CD⁴⁺ 200-349 sel/ μ L.¹⁴

DAFTAR PUSTAKA

1. James RS, Charles BB, Robert FM, Ann EW. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(9):891-6
2. Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM. *Fundamental medical mycology.* New Jersey: Wiley-Blackwell; 2012. p.535-47
3. Heelan JS, Ingensol FW. *Essentials of human parasitology.* United States of America: Delmar; 2002 .p. 130-1
4. Brown HW, Neva FA. *Basic clinical parasitology.* United States of America: Appleton Century Crofts; 1983 .p. 76-7
5. Elias JA, Michael RM, Michael AP. *Clinical mycology, 2nd ed.* USA: Churchill Livingstone; 2009. p.385
6. Patrick RM, Ken S, Rosenthal, Michael A, Pfaller. *Medical microbiology, 7th ed,* Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. p.73
7. Krajcicek BJ, Limper AH, Thomas CF Jr. Advances in the biology, pathogenesis and identification of *Pneumocystis pneumonia.* *Curr Opin Pulm Med.* 2008;14:228.
8. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jiroveci* in general population. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2):245-250.
9. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis.* 2008;197:10-7
10. Esteves, Gaspar J, Marques J, Leite T, Antunes F, Mansinho K, et al. Identification of relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: Relationship with clinical data. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:878-84.
11. Walzer DP, Cushion TM. *Pneumocystis pneumonia.* USA: Marcel Dekker; 2005. p. 678-90
12. Helweg J, Larsen. *Pneumocystis jiroveci.* *Dan Med Bull.* 2004;51;251-73
13. Tia T, Putapotntip C, Kosuwin, R, Kongpolprom, N, Kawkitinaronk K, Jongwitiwes S. A highly sensitivity novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(6):598-603.
14. Tjampakasari CR. Karakterisasi molekuler gen resistensi DHPS (Dihidropteroat sinteas) dan polimorfisme gen mtLSU (*mitochondrial Large Sub Unit*) *Pneumocystis jirovecii* pada ODHA terduga pneumonia di Jakarta. Disertasi Program Ilmu Biomedik, Jakarta: FKUI; 2018.
15. Mogoye KB, Plessis DD, Poonsamy B, Freen J. Characterization of *Pneumocystis jirovecii* DHPS genotypes using a simple, inexpensive restriction fragment length polymorphism analysis. *South Africa J Infect Dis.* 2015;2:30-9
16. Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragozi 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. Doi: 10.1128/JCM.02381-13
17. Mühlethaler K, Bögli-Stuber K, Wasmer S, von Garnier C, Dumont P, Rauch A, et al. Quantitative PCR to diagnose pneumocystis pneumonia in immunocompromised non HIV patients. *Europ Resp J.* 2002;29(4):971-8
18. Calderon, Richard A, Cihlar, Ronald R. *Fungal pathogenesis: Principles and clinical application.* New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002
19. Molecular Epidemiology of *Pneumocystis carinii jiroveci.* *Emerg Infect Dis* [Internet] 2015. Available from: <http://www.cdc.gov/incidod/eid/vol2no2/beard.html>
20. Kwon Chung KJ, Bennet JE. *Medical mycology.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p.369-76
21. Mahon CR, Lechman DC. *Textbook of diagnostic microbiology.* 5th ed. USA: Saunders Elsevier; 2015.p. 776-85
22. Larone DH. *Medically important fungi a guide to identification, 2nd ed.* Washington DC:ASM; 1993.p.174-85
23. Laura HG, Bruce SK, Stuart ML. *Clinical microbiology reviews.* Vol 9. USA: American Society for Microbiology Virulence Factors of Medically Important Fungi; 1996.p.469-88
24. Siripattanapibong S, Worapong J, Mungthin M, Leelayoova M. Genotyping study of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus positif patient in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2104-10
25. Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the internal transcribed spacers regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J Infect Dis.* 1996;174(1):141-56
26. Esteves, Montes-Cano C, de la Horra, Costa1, Caldero'n, Antunes, Matos. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Europ Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;14:356-62
27. Tyagi AK, Mirdha BR, Lutha 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;49:167-71
28. Francisco J, Montes-Cano, Marco C, Manuel. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis.* 2005;2:11
29. Valerio A, Tronconi E, Mazza F, Fantoni G, Atzori C. 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



30. Jarboui MA, Mseddi F, Sellami A, Makni F, Ayadi A. Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* strains based on sequence variation of different DNA region. *Med Mycol.* 2013;51: 561–7
31. 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. *Inf Gen Evol.* 2013;14:68–72
32. Munoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobon A, Cano E, Gonzalez A. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. *Diag. Microbiol Infect Dis.* 2012;72:204-13
33. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Samantaray JC, Kabra SK, et al. Genotyping and phylogenetic analysis of *Pneumocystis jirovecii* isolates from India. *Inf Gen Evol.* 2010;10:712–9
34. Pfaller MA, Anaissie E. *Pneumocystis*. In: *Clinical Mycology*, 2nd ed. USA: Churchill Livingstone; 2009.p.385-98
35. Emilie C, Fanny L, Marie EB, Marc L, Louis JC, Oliver L. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Infect Dis Clin N Am.* 2010;24:107-33
36. Jawetz, Melnick, Adelberg’s. *Medical microbiology*, 27th ed. California: Mc Graw-Hill Co; 2016 .p.671-81
37. Murray P, Pfaller M, Rosenthal K. *Medical microbiology*, 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016 .p.73-97
38. Glick BR, Pasternak J. *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. Washington DC: ASM Press; 2003.p. 201-19
39. Netto GJ, Saad RD, Dysert PA. Diagnostic molecular pathology: Current techniques and clinical application, part 1. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 2003;16(4):379-83