

KORELASI NILAI CLUSTER OF DIFFERENTIATION 4 (CD4) DENGAN KUANTIFIKASI DEOXYRYBONUCLEAD (DNA) PNEUMOCYSTIC JIROVECI PADA PENDERITA HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) DENGAN PNEUMONIA

Dional Setiawan¹, Fauzar², Raveinal³, Akmal M. Hanif⁴

¹Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Penyakit Dalam, FK Universitas Andalas /RS M Djamil, Padang

²Divisi Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi, Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK Universitas Andalas / RS M Djamil, Padang

³Divisi Alergi-Imunologi, Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK Universitas Andalas /RS M Djamil, Padang

⁴Divisi Kardiologi, Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK Universitas Andalas /RS M Djamil, Padang

ABSTRAK

Latar belakang: Human immunodeficiency virus (HIV) adalah virus yang menyebabkan berkurangnya CD4, ditandai dengan sistem kekebalan yang berkurang sehingga memudahkan infeksi oportunistik, salah satunya adalah infeksi Pneumocystic jiroveci. Meningkatnya insiden kolonisasi dan infeksi pneumocystic jiroveci seiring dengan penurunan CD4, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk melihat korelasi nilai CD4 dengan kuantifikasi DNA P. Jiroveci pada pasien HIV dengan pneumonia.

Metode: Penelitian observasional dengan metode potong lintang dilakukan pada 30 kasus baru pasien HIV dengan pneumonia yang belum mendapat terapi profilaksis PCP (Pneumocystic jiroveci pneumonia) pada pasien Instalasi Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang pada bulan Februari sampai Mei 2018. Pasien dengan tes HIV positif cepat diikuti oleh pengukuran kadar CD4 dengan menggunakan flow cytometry. Pemeriksaan kuantifikasi DNA P.jiroveci menggunakan alat quantitative realtime PCR/qRT-PCR

Hasil: Penelitian ini memperoleh nilai CD4 rata-rata rendah pada pasien HIV dengan pneumonia, 21,37 sel/mm³. Sedangkan rerata kuantifikasi DNA P.jiroveci

Address for corespondance :

Internal Medicine Department, Dr M Djamil Hospital, Padang, West Sumatra. Indonesia

Email : dionalsetiawan@gmail.com.

Phone: +62-751-37771

How to cite this article :

Korelasi Nilai Cluster of Differentiation 4 (CD4) Dengan Kuantifikasi Deoxyrybonuclead (DNA) Pneumocystic Jiroveci Pada Penderita Human Immunodeficiency Virus (HIV) Dengan Pneumonia

pada pasien HIV dengan pneumonia, 6238,77 kopi/ml, dengan lebih banyak kejadian kolonisasi *P.jiroveci*.

Kesimpulan: Terdapat korelasi negatif dengan adanya korelasi kuat antara nilai CD4 dan kuantifikasi DNA *P.jiroveci* pada pasien HIV dengan pneumonia. Disarankan bahwa pada pasien HIV dengan pneumonia dengan nilai CD4 rendah perlu diwaspadai adanya risiko infeksi PCP.

Kata Kunci: HIV, CD4, kuantifikasi DNA *P.Jiroveci*

Abstract

Background: Human immunodeficiency virus (HIV) is a virus that causes CD4 loss, characterized by a reduced immune system to facilitate opportunistic infections, one of them is *Pneumocystic jiroveci* infection. The increasing incidence of colonization and *P.jiroveci* infection along with the decline in CD4, so it is necessary to conduct a study to see the correlation of CD4 values with DNA quantification of *P.jiroveci* in HIV patients with pneumonia.

Method: Observational research with cross sectional method was performed on 30 new cases of HIV patients with pneumonia who had not received PCP prophylaxis therapy in patient Installation of Internal Medicine of Dr. M. Djamil Padang in February to May 2018. Patients with rapid HIV positive test were followed by CD4 measurement by using flow cytometry. Examination of DNA quantification of *P.jiroveci* using quantitative realtime PCR/qRT-PCR tool.

Results: This study obtained a low mean CD4 value in HIV patients with pneumonia (21,37 sel/mm³). While the mean of *P.jiroveci* DNA quantification in HIV patients with pneumonia was 6238,77 copies/ml, with more incidence of *P.jiroveci* colonization.

Conclusion: There was a negative correlation with a strong correlation between CD4 values and *Jiroveci* pneumocystic DNA quantification in HIV patients with pneumonia. It is recommended that HIV patients with pneumonia and low CD4 values need to be considered of the risk of PCP infection.

Keywords: HIV, CD4, quantification of *P.Jiroveci* DNA

PENDAHULUAN

Human immunodeficiency virus (HIV) adalah virus penyebab *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) dimana penyakit ini ditandai dengan keadaan berkurangnya sistem imunitas penderita. Infeksi HIV hingga kini masih merupakan masalah kesehatan global, termasuk di Indonesia. *United Nations Programme on HIV and Acquired Immunodeficiency Syndrome* (UNAIDS) tahun 2012 mencatat bahwa terdapat 34 juta orang terinfeksi HIV dengan 8 juta penderita AIDS di dunia. Kementerian Kesehatan Indonesia melaporkan bahwa sampai Desember 2016 terdapat 86.740 orang menderita AIDS dan 41.250 orang kasus baru HIV dengan prevalensi tertinggi pada daerah Papua. Sumatra Barat menempati peringkat 10 dengan 1.344 penderita AIDS. Target utama dari infeksi HIV adalah sel *cluster of differentiation-4* (CD4). Sel ini berkurang jumlahnya baik akibat efek langsung dari virus ataupun reaksi imun dari tubuh. Rata-rata penurunan CD4 adalah sekitar 70-100 sel/mm³/tahun. Jumlah CD4

adalah cara untuk menilai status imunitas orang dengan HIV. Penurunan sistem imunitas secara progresif mengakibatkan munculnya infeksi oportunistik (IO). Penelitian Kurnia (2014) di Banda Aceh menunjukkan penurunan CD4 diikuti dengan peningkatan munculnya manifestasi IO. Infeksi oportunistik muncul dengan bentuk infeksi baru atau reaktivasi infeksi laten yang dalam kondisi normal dapat dikontrol oleh sistem imun. Salah satu infeksi oportunistik pada penderita HIV adalah infeksi *Pneumocystis jirovecii* pneumonia.¹⁻⁵

Pneumonia akibat *Pneumocystis* merupakan infeksi paru yang disebabkan oleh jamur *Pneumocystis carinii*, sekarang dikenal dengan nama *Pneumocystis jirovecii*, sebagai tanda penghormatan kepada ahli parasitologi berkebangsaan Cechnya, Otto Jirovec. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) merupakan koinfeksi yang bisa ditemukan pada penderita HIV dan jarang terjadi pada penderita HIV dengan CD4 lebih dari 200 sel/mm³. Penurunan

CD4 seiring dengan peningkatan kejadian kolonisasi *Pneumocystic*.

Bila PCP ditemukan pada penderita dengan imunodefisiensi, presentase kematian dapat mencapai 100%, dengan kematian terjadi dalam 3-4 minggu setelah awitan penyakit. Namun bila infeksi dapat didiagnosis sedini mungkin dan diberikan terapi yang adekuat, presentase kematian dapat diturunkan hingga 15% pada kasus terinfeksi HIV. Sampai saat ini *Pneumocystic* belum dapat dibiakkan dalam medium *in vitro*, sehingga diagnosis pasti PCP masih bergantung pada penemuan mikroorganisme tersebut dalam sediaan histopatologi atau sitologi dengan pewarnaan konvensional maupun *direct fluorescence antibody* (DFA).⁶⁻¹¹

Perkembangan biologi molekular menggunakan metode reaksi rantai polimerase/*polymerase chain reaction* (PCR) memungkinkan deteksi asam nukleat *Pneumocystic Jiroveci* dalam berbagai spesimen klinis yang lebih mudah diperoleh misalnya dari sputum. Teknik PCR berhasil mendeteksi *P.Jiroveci* pada individu

yang sediaan pewarnaan negatif. Pengembangan *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) memungkinkan pemeriksaan kuantifikasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) *Pneumocystic Jiroveci*. Kemampuan qRT-PCR dalam memberikan hasil sensitivitas tinggi memungkinkannya digunakan sebagai pemeriksaan penyaring dalam upaya mendeteksi *P. Jiroveci* pada populasi yang diduga memiliki prevalensi tinggi. Penggunaan qRT-PCR untuk deteksi *P.Jiroveci* banyak diteliti saat ini. Akan tetapi memerlukan tingkat keterampilan teknis dan biaya penyediaan alat yang tinggi.¹²⁻¹⁷

Melihat meningkatnya kejadian kolonisasi maupun infeksi *P. Jiroveci* seiring dengan turunnya CD4, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk melihat korelasi nilai CD4 dengan kuantifikasi DNA *Pneumocystic jiroveci* yang diperiksa menggunakan qRT-PCR pada penderita HIV dengan pneumonia. Penelitian ini diharapkan sebagai sumbangan data informasi mengenai kuantifikasi DNA *Pneumocystic jiroveci* pada penderita HIV dengan pneumonia baik berupa kolonisasi

atau infeksi. Dan diharapkan nilai CD4 bisa memprediksi risiko infeksi *Pneumocystic jiroveci* pada penderita HIV dengan pneumonia.

METODE

Penelitian ini merupakan studi observational dengan metode potong lintang yang dilakukan di bangsal RS Dr. M. Djamil Padang pada bulan November 2017 sampai April 2018 sebanyak 30 sampel. Kriteria inklusi penelitian ini adalah pasien terinfeksi HIV kasus baru, berusia 13-60 tahun, hasil identifikasi DNA *Pneumocystic jiroveci* positif, bersedia ikut dalam penelitian dan menandatangani lembar persetujuan. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah pasien dalam terapi profilaksis PCP dan pasien dalam terapi imunosupresan. Pasien dengan *rapid test* HIV positif dilanjutkan pemeriksaan CD4 dengan menggunakan *flow cytometry*. Kuantifikasi DNA *P.Jiroveci* adalah jumlah untai DNA *P.Jiroveci* dengan menggunakan *quantitative real-time* PCR, dengan menggunakan nilai *cut-off* $1,5 \times 10^4$ *copies/ml* untuk membedakan kolonisasi dengan infeksi.

HASIL

Pada penelitian ini dari 30 subjek menunjukkan bahwa penderita berjenis kelamin laki-laki sebanyak 27 orang (90%) dan 3 (10%) perempuan. Rerata umur subjek penelitian adalah 35,1 tahun (SD=6,89), umur termuda 23 tahun dan tertua 55 tahun. Kelompok umur terbanyak adalah 30-39 tahun. Distribusi berdasarkan pembagian kelompok umur adalah sebagai berikut, umur 20-29 tahun sebanyak 6 orang (20%), umur 30-39 tahun sebanyak 18 orang (60%), umur 40-49 tahun sebanyak 5 orang (16,7%) dan umur 50-59 tahun sebanyak 1 orang (3,3%). Faktor risiko subjek penelitian adalah heteroseksual sebanyak 10 orang (33,3%), homoseksual sebanyak 7 orang (23,3%), biseksual sebanyak 3 orang (10%), penggunaan jarum suntik tidak ada dan faktor risiko yang disangkal sebanyak 10 orang (33,3%). Sebagian besar subjek penelitian berpendidikan SMA 14 orang (46,7%), diikuti akademi/perguruan tinggi (PT) 13 orang (43,3%), SMP 2 orang (6,7%) dan SD 1 orang (3,3%).

Tabel 1. Karakteristik Sampel Penelitian

Karakteristik	n (%)	Rerata (SD)
JenisKelamin		
- Laki-laki	27 (90)	
- Perempuan	3 (10)	
Umur (tahun)		35,1 (6,89)
- 20–29	6 (20)	
- 30–39	18 (60)	
- 40–49	5 (16,7)	
- 50–59	1 (3,3)	
Faktor Risiko		
- Heteroseksual	10 (33,3)	
- Homoseksual	7 (23,3)	
- Biseksual	3 (10)	
- Jarum suntik	0 (0)	
- Disangkal	10 (33,3)	
Pendidikan		
- SD	1 (3,3)	
- SMP	2 (6,7)	
- SMA	14 (46,7)	
- Akademi/PT	13 (43,3)	

Hasil penelitian menunjukkan rerata nilai CD4 adalah 21,37 sel/mm³ (SD=12,05), dengan nilai terendah 5 sel/mm³ dan nilai tertinggi 51 sel/mm³. Rerata kuantifikasi DNA *P.Jiroveci* adalah 6238,77 *copies/ml* (SD=5585,918) dengan nilai terendah 182 *copies/ml* dan tertinggi 19607 (1,96x10⁴) *copies/ml*.

Distribusi kuantifikasi DNA *P.Jiroveci* pada penderita HIV dengan pneumonia berdasarkan nilai *cutt-off* dikelompokkan menjadi kolonisasi (<1,5x10⁴ *copies/ml*) dan infeksi (≥1,5x10⁴ *copies/ml*). Pada

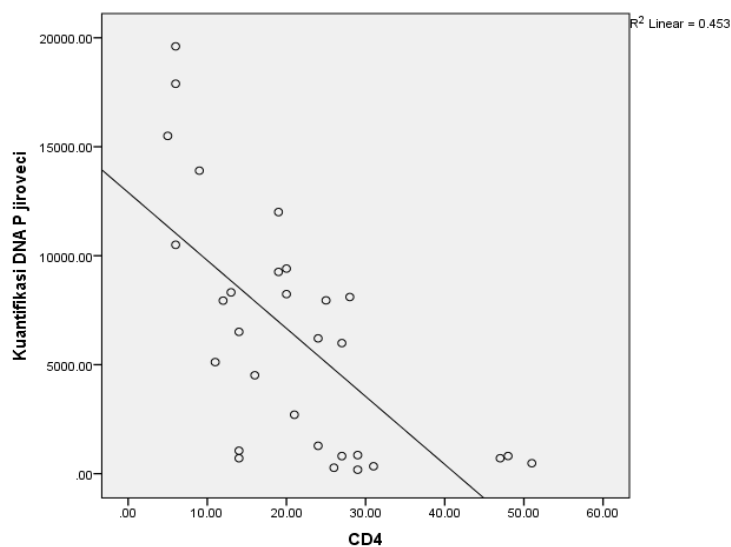
penelitian ini dari 30 pasien didapatkan kolonisasi sebanyak 27 orang (90%) dengan rerata 4969,15 *copies/ml* (SD=4211,396) dengan kuantifikasi terendah 182 *copies/ml* dan tertinggi 13.902 *copies/ml*. Sedangkan infeksi sebanyak 3 orang (10%) dengan rerata 17,665,33 *copies/ml* (SD=2063,774) dengan kuantifikasi terendah 15498 *copies/ml* dan tertinggi 19.607 *copies/ml*.

Distribusi CD4 berdasarkan kolonisasi dan infeksi *P.Jiroveci* pada penderita HIV dengan

pneumonia bervariasi antara 5,67-23,11 sel/mm³. Pada kolonisasi *P.Jiroveci* didapatkan rerata nilai CD4 sebanyak 23,11 sel/mm³, sedangkan pada infeksi *P.Jiroveci* didapatkan nilai CD4 semakin rendah dengan rerata 5,67 sel/mm³.

Hasil analisis menunjukkan adanya korelasi yang bermakna nilai

CD4 dengan kuantifikasi DNA *P.Jiroveci* pada penderita HIV dengan pneumonia ($p < 0,001$), dengan arah korelasi negatif dan kekuatan korelasi kuat ($r = -0,673$), dengan $r^2 = 0,453$.



Gambar 1. Grafik Korelasi antara Nilai CD4 dengan Kuantifikasi DNA P Jiroveci.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini didapatkan penderita berjenis kelamin laki-laki lebih banyak dibanding perempuan yaitu 27 orang (90%) dan 3 orang (10%) perempuan. Hasil ini didukung dari penelitian Aghnia dkk (2015) mendapatkan penyandang AIDS di RSUP Dr. M. Djamil Padang dengan infeksi oportunistik lebih banyak pada laki-laki dibanding perempuan dengan rasio 3:1.⁵

Demikian juga dari penelitian Sharma dkk (2010) pasien HIV di Nepal pada 150 orang penderita HIV. Dari penelitian tersebut didapatkan yang terbanyak adalah laki-laki 100 orang, sedangkan perempuan 50 orang.¹⁸

Pada penelitian ini rerata umur pada subjek penelitian adalah 35,1 tahun dengan kelompok umur terbanyak adalah antara umur 30-39 tahun sebanyak 18 orang (60%). Hasil yang

sama didapatkan pada penelitian Riebold dkk 2014 di Kamerun pada 126 pasien HIV didapatkan umur antara 30-44 tahun sebanyak 29 orang (53,7%).⁹ Namun, secara global penderita HIV berada pada rentang usia 30-44 tahun. Umumnya penderita HIV dijumpai paling sering pada usia produktif, kemungkinan disebabkan pengaruh aktifitas seksual yang masih tinggi pada usia tersebut.¹

Faktor risiko penularan HIV pada subjek penelitian yang paling banyak adalah seks bebas atau heteroseksual atau seks dengan lawan jenis yaitu 10 orang (33,3%), diikuti homoseksual atau seks sesama jenis sebanyak 7 orang (23,3%), biseksual atau seks dengan sesama jenis dan lawan jenis sebanyak 3 orang (10%), pemakaian jarum suntik tidak ada dan faktor risiko yang disangkal atau tidak diketahui sebanyak 10 orang (33,3%). Hasil tersebut didukung dari penelitian Sarvepalli dkk (2017) mengungkapkan bahwa penularan HIV di India terbanyak heteroseksual 166 orang (83%) diikuti transfusi darah 13 orang (6,5%) dan homoseksual 4 orang (2%).¹⁹

Sebagian besar subjek penelitian berpendidikan SMA sebanyak 14 orang

(46,7%), diikuti akademi/perguruan tinggi (PT) 13 orang (43,3%), SMP sebanyak 2 orang (6,7%) dan SD sebanyak 1 orang (3,3%). Data ini didukung dari penelitian Ilovi C dkk (2011) pada 152 pasien HIV di Afrika Timur paling banyak memiliki pendidikan sekolah menengah dan perguruan tinggi sebanyak 81 orang (53,3%) disusul pendidikan dasar kebawah 71 orang (46,7%).²⁰

Pada subjek penelitian didapatkan rerata nilai CD4 adalah 21,37 sel/mm³. Pada semua penderita didapatkan nilai dibawah normal (<500 sel/mm³). Pemaparan nilai CD4 juga diungkapkan pada penelitian Sarvepalli dkk (2017) di India, dimana didapatkan pasien HIV dengan infeksi paru sebanyak 100 orang (50%), terbanyak pneumonia bakterial 74 orang (74%) dengan rata-rata nilai CD4 70,2 sel/mm³, sedangkan PCP 6 orang (6% dari penderita HIV dengan pneumonia, 1,5% dari seluruh penderita HIV) dengan rata-rata nilai CD4 35,8 sel/mm³.¹⁹ Penelitian Kumar dkk (2016) dari 5 pasien HIV yang menderita PCP didapatkan 1 orang (20%) pada kelompok CD4 200-350 sel/mm³ dan 4 orang (80%) pada kelompok CD4<200 sel/mm³.²¹

Pada subjek penelitian didapatkan rerata kuantifikasi DNA *P. Jiroveci* adalah 6238,77 *copies/ml* atau $6,2 \times 10^3$ *copies/ml*. Penelitian Alanio dkk (2011) pada pasien *immunocompromised* dengan pneumonia di Paris, diambil 9 spesimen BAL (*Bronchoalveolar Lavage*) pasien HIV. Didapatkan kuantifikasi *P. Jiroveci* dengan rentang 134 *copies/ml* sampai $1,57 \times 10^6$ *copies/ml*, dengan rerata kuantifikasi 874.103,78 *copies/ml*.¹⁵ Pada penelitian Louis dkk (2015) dari spesimen BAL pada pasien HIV di Inggris, didapatkan rerata kuantifikasi *P.jiroveci* pada HIV dengan kolonisasi $3,4 \times 10^2$ *copies/ml*, sedangkan infeksi $2,5 \times 10^7$ *copies/ml*.¹⁷

Penelitian Damiani dkk (2013) dilakukan pada 41 pasien yang dirawat di Perancis dengan mengambil spesimen BAL. Pada pasien HIV dengan infeksi *P. Jiroveci* didapatkan rerata kuantifikasi $4,2 \times 10^5$ *copies/ml* dengan rentang $3,3 \times 10^4$ - $1,5 \times 10^7$ *copies/ml*, sedangkan kolonisasi *P. Jiroveci* $4,4 \times 10^2$ *copies/ml* dengan rentang $1,6 \times 10^2$ - $3,7 \times 10^3$ *copies/ml*.²²

Hasil analisis menunjukkan adanya korelasi yang bermakna nilai CD4 dengan kuantifikasi DNA *P.Jiroveci* pada penderita HIV dengan

pneumonia ($p < 0,001$), dengan arah korelasi negatif dan kekuatan korelasi kuat ($r = -0,673$), dengan $r^2 = 0,453$ artinya CD4 mempengaruhi kuantifikasi DNA *P.Jiroveci* sebesar 45,3%. Namun tidak ada penelitian lain yang meneliti korelasi nilai CD4 dengan kuantifikasi DNA *P.Jiroveci* pada penderita HIV untuk dijadikan pembandingan penelitian ini.

KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini didapatkan rerata nilai CD4 yang rendah pada penderita HIV dengan pneumonia, yakni sebesar 21,37 sel/mm³. Sedangkan rerata kuantifikasi DNA *Pneumocystic Jiroveci* pada penderita HIV dengan pneumonia sebesar 6238,77 *copies/ml*, dengan kejadian kolonisasi *Pneumocystic Jiroveci* lebih banyak. Disimpulkan bahwa terdapat korelasi negatif dengan adanya korelasi kuat antara nilai CD4 dengan kuantifikasi DNA *Pneumocystic Jiroveci* pada penderita HIV dengan pneumonia. Sehingga disarankan pada penderita HIV dengan pneumonia dengan nilai CD4 yang rendah perlu diwaspadai adanya risiko infeksi PCP.

DAFTAR PUSTAKA

1. Maartens G, Celum C, and Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *www.thelancet.com* Published online, 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1).
2. Kementerian Kesehatan RI. Statistik Kasus HIV AIDS Indonesia. In: Profil Kesehatan Indonesia; 2016.
3. Catalfamo M, Di Mascio M, Hu Z, Srinivasula S, Thaker V, Adelsberger J, et al. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(50):19851-6.
4. Pedoman Nasional Tatalaksana Klinis Infeksi HIV dan Terapi Antiretroviral pada orang Dewasa dan Remaja. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2015.
5. Aghnia JP, Eryati D, dan Efrida. Pola Infeksi Oportunistik yang Menyebabkan Kematian pada Penyandang AIDS di RS Dr. M. Djamil Padang Tahun 2010-2012. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2015; 4(1):1-6
6. Kurnia. Profil kadar CD4 terhadap infeksi oportunistik pada penderita HIV-AIDS di RSUD Dr Zainal Abidin Banda Aceh. *JKS* 2014;2:76-80
7. Bennett NJ. Pneumocystic jiroveci Pneumonia Overview of Pneumocystic jiroveci Pneumonia. Updated: Oct 19, 2016. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/225976overview>.
8. Napoli A.M, Maughan B, Murray R, Maloy K, and Milzman D. Use Of The Relationship Between Absolute Lymphocyte Count And Cd4 Count To Improve Earlier Consideration Of Pneumocystis Pneumonia In Hiv-Positive Emergency Department Patients With Pneumonia. *The Journal of Emergency Medicine*. 2013;44(1):28–35.
9. Riebold D, Enoh DO, Kinge TN, Akam W, Bumah MK, Russow K. Pneumocystis jirovecii colonisation in HIV-positive and HIV-negative subjects in

- Cameroon. *Tropical Medicine and International Health*. 2014; 19(6):643–55.
10. Morris A and Norris K. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and Its Role in Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;297–317.
 11. 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 carinii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 2004;53:603-7.
 12. Rozaliyani A, Antariksa B, Dianati K.S, Wahyuningsih R. Pemeriksaan *Real-time* PCR dalam Diagnosis *Pneumonia Pneumocystic*. *J Respir Indo*. 2011;31(3):1-6.
 13. Gangneux FR, Belaz S, Revest M, Tattevin P, Jouneau S, Decaux O et al. Diagnosis of *Pneumocystic jirovecii* Pneumonia in Immunocompromised Patients by Real-Time PCR: a 4-Year Prospective Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(9):3370-6.
 14. Prickartz A, Lüsebrink J, Khalfaoui S, Schildgen O, Schildgen V, Windisch W, et al. Low Titer *Pneumocystic jirovecii* Infections: More than Just Colonization?. *J. Fungi* 2016;2 (16).
 15. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystic jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1531–7.
 16. 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 HIVnegative patients. *J Clin Microbiol* 2016;54:1487–95.
 17. Louis M, Guitard J, Jodar M, Ancelle T, Magne D, Lascols O,

- et al. Impact of HIV infection status on interpretation of quantitative PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3870–5.
18. Sharma S, Dhungana GP, Pokhrel BM and Rijal BP. Opportunistic infections in relation to cd4 level among HIV seropositive patients from central Nepal. *Nepal Med Coll J* 2010;12(1):1-4
 19. Sarvepalli AK, Dharana PK. Spectrum of opportunistic infections with correlation to CD4 counts in newly diagnosed HIV seropositive cases. *Int J Adv Med.* 2017;4(1):252-8
 20. Ilovi C. S, Lule G. N, Obel A. O And Irimu H. M. Correlation Of Who Clinical Staging With Cd4 Counts In Adult HIV/AIDS Patients At Kenyatta National Hospital, Nairobi. *East African Medical Journal* February 2011; 88(2);234-9
 21. Kumar R. Comparison between CD4 count, haematological manifestations and respiratory tract infections in HIV seropositive individuals. *International Journal of Contemporary Medical Research* 2016;3(5):1245-8.
 22. Damiani C, Le Gal S, Costa C.D, Virmaux M, Nevez G, Toteta A. Combined Quantification of Pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and Serum (1-3)- β -D-Glucan for Differential Diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia and *Pneumocystis* Colonization. *Journal of Clinical Microbiology* October 2013;51(10):3380–8.