استخراج پنوموسیستیس ژایرووسی با روش PCR در نمونه های لاواژ ریوی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری

محمد رضا سروی[۱]، ، حسین نوروزی[۲]، الهام رزمجو[۳]، احمد رضا معمار[۳]، فروزان محمدی[۴]، سید امیر یزدان پرست[۵]، مهربان فلاحتی[۶]*

۱ .M.Sc قارچ شناسی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
۲ .Ph.D قارچ شناسی، استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگده پیرا پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
۳ .Ph.D انگل شناسی، استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
۴ . پاتولوژیست، استاد مرکز آموزشی، پژوهشی، درمانی سل بیماری های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری
۵ . Ph.Dقارچ شناسی، دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگده پیرا پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
۶ . Ph.D قارچ شناسی، دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران (نویسنده مسئول)

* **نشانی برای مکاتبه:** گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تلفن:۰۲۱ - ۸۸۰۵۸۶۵۳ ، mehrabanfalahati@yahoo.com

دریافت مقاله: آبان هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: دی هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: *پنوموسیستیس ژایرووسی (Pneumocystis jiroveci) که قبلا P. carinii f. sp. hominis نامیده می شد، قارچ فرصت طلبی است که در بیمارانی که سیستم ایمنی ضعیف شده دارند، همانند مبتلایان به ایدز و بدخیمی ها، بیماری پنوموسیستوزیس را ایجاد می کند. این قارچ باعث مشکلات ریوی شده و گاهی می تواند خطرناک بوده و حتی موجب مرگ بیمار شود. بیماریهای مزمن ریوی همچون سل و پنومونی های باکتریایی از عوامل خطر ابتلا به این عفونت محسوب می شوند. تشخیص این بیماری بوسیله رنگ آمیزی نمونه های ریوی همانند لاواژ ریوی و یا خلط القاء شده و مشاهده این قارچ در این گسترش ها انجام می پذیرد. این روش ها چندان قابل اعتماد نبوده و نتایج بدست آمده بسته به روش رنگ آمیزی مورد استفاده و تجربه افراد در زمینه شناسایی میکروسکوپی این قارچ متغیر هستند. در این مطالعه میزان اسخراج این قارچ در بیماران دارای علائم ریوی با روش PCR و رنگ آمیزی گیمسا گزارش شده است.*

روش کار: *۶۰ نمونه لاواژ ریوی از بیماران بالغ (۴۶ مرد و ۱۴ زن) دارای علائم ریوی که مشکوک به بیماری های ریوی بودند، از بیمارستان مسیح دانشوری گرفته شد. به منظور تشخیص پنوموسیستیس روش رنگ آمیزی گیمسا و تست Nested-PCR با استفاده از ژن ITS-rDNA بر روی نمونه ها انجام گرفت.*

یافته ها: *از ۶۰ نمونه مورد بررسی، ۳ نمونه (۵٪) در روش Nested-PCR از نظر پنوموسیستیس ژایرووسی مثبت شدند، در حالیکه هیچکدام از نمونه ها در رنگ آمیزی گیمسا مثبت نبودند.*

نتیجه گیری: *این بررسی نشان می دهد که تکنیک nested-PCR با استفاده از ژن ITS روش کارآمد و ارزشمندی برای شناسایی DNA پنوموسیستیس ژایرووسی در نمونه های ریوی است.*

واژگان کلیدی: ***پنوموسیستیس ژایرووسی، لاواژ ریوی (BAL)، Nested-PCR، ITS-ribosomal DNA***

مقدمه

پنوموسیستیس ژایرووسی که قبلا P. carinii f. sp. hominis نامیده می شد، قارچ فرصت طلبی است که وجود شرایط زمینه ای و عوامل مستعد کننده برای ایجاد بیماری و عفونت زایی آن امری لازم بوده و بیماری زایی آن در افرادی که از سیستم ایمنی طبیعی برخوردار هستند، بسیار نادر است (۱). مهمترین عامل مستعد کننده ابتلا به عفونت ناشی از این قارچ، ضعف سیستم ایمنی سلولی است که به علل مختلفی می تواند عارض شود. بیماری ایدز مهمترین عامل در این مورد بوده و در کنار آن شرایطی از قبیل استفاده از کورتیکواستروئیدهای خوراکی به مدت طولانی، نقص سیستم ایمنی اولیه مانند Severe Combine Immune Deficiency (SCID)، سوء تغذیه پروتئینی در کودکان، ابتلا به بیماریهای ناتوان کننده مانند بدخیمی ها، شیمی درمانی و اشعه درمانی در بیماران سرطانی و نیز بیماریهای ریوی مزمن همانند سل و پنومونی های باکتریایی از دیگر شرایطی هستند که در ابتلا وکسب عفونت دخیل هستند (۲،۳). تشخیص این بیماری بوسیله رنگ آمیزی نمونه های ریوی همانند لاواژ ریوی و یا خلط القاء شده و مشاهده این قارچ در این گسترش ها انجام می پذیرد (۴، ۵). این روش ها چندان قابل اعتماد نبوده و نتایج بدست آمده بسته به روش رنگ آمیزی مورد استفاده و تجربه افراد در زمینه شناسایی میکروسکوپی این قارچ متغیر هستند. امروزه روش های مولکولی متعددی برای شناسایی این ارگانیسم و تشخیص بیماری ناشی از آن در دست است که می توانند جایگزین مناسبی برای روش های رنگ آمیزی باشند(۹-۶).

مطالعاتی که در ایران بر روی این قارچ انجام گرفته، عموما" شامل تحقیقاتی می شود که بر روی نمونه های ریوی بدست آمده از حیوانات آزمایشگاهی و جهت شناسایی هیستولوژیکی پنموسیستیس کرینی (P. carinii) انجام شده اند(۱۳-۱۰). مطالعات مولکولی انجام گرفته بر روی این قارچ نیز در ایران محدود به مطالعات انجام گرفته بر روی حیوانات آزمایشگاهی می شود (۱۴).

در این مطالعه با جمع آوری نمونه BAL از بیمارانی که دارای علائم ریوی و مشکوک به بیماری های ریوی بوده و جهت تشخیص بیماری خود ملزم به برونکوسکوپی و گرفتن نمونه BAL شده بودند، اقدام به بررسی میزان فراوانی این قارچ در این دسته از بیماران کردیم. برای رسیدن به این هدف، یکی از حساس ترین روش های PCR ارائه شده در تشخیص این ارگانیسم یعنی روش Nested-PCR با استفاده از ژن Internal transcribed spacer ribosomal- DNA (ITS-rDNA) بکار گرفته شد. همچنین در کنار آن از روش رنگ آمیزی گیمسا برای ارزیابی کیفیت نمونه ها و نیز مقایسه با روش PCR استفاده شد.

روش کار

این مطالعه توصیفی - مقطعی در سال ۱۳۸۹ بر روی ۶۰ بیمار بزرگ سال شامل ۴۶ مرد و ۱۴ زن با علائم ریوی مراجعه کننده به بیمارستان مسیح دانشوری انجام گرفت. این بیماران دارای علائم ریوی مختلفی بوده و برای انجام آزمایشات تشخیصی روتین خود، ملزم به انجام برونکوسکوپی و گرفتن نمونه لاواژ ریوی شده بودند.

برای نمونه گیری با انجام هماهنگی های لازم، ۱ الی ۳ میلی لیتر از نمونه های لاواژ ریوی بیماران که قبلا گرفته شده بود، با رعایت نکات ایمنی در لوله های درپیچ دار استریل جداسازی شد. نمونه گیری به صورت دو سویه کور انجام پذیرفت و تا پایان آزمایشات هیچگونه اطلاعاتی در مورد نمونه ها وجود نداشت. بعد از اتمام آزمایشات به منظور جمع آوری اطلاعات کامل تر به پرونده این بیماران مراجعه و فرم جمع آوری اطلاعات در مورد هر یک از نمونه ها تهیه و اطلاعات لازم در آن ثبت و تکمیل گردید. این نمونه ها به آزمایشگاه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل شده و تا روز انجام آزمایشات در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

۱ الی ۱/۵ میلی لیتر از نمونه ها به لوله های ۲ میلی لیتری انتقال و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شده و ابتدا حدود ۵۰ میکرولیتر از رسوب حاصله به منظور تهیه اسمیر برای رنگ آمیزی گیمسا استفاده شد. گسترش های تهیه شده پس از خشک شدن و شماره گذاری، با استفاده از متانول فیکس شده و سپس رنگ آمیزی گیمسا بر اساس پروتکل آن بر روی نمونه ها انجام شد. جهت رنگ آمیزی از رنگ گیمسای تجاری آماده مصرف (Merck, Germany) استفاده شد. تمامی این لام ها توسط دو فرد مجرب در زمینه شناسایی میکروسکوپی پنوموسیستیس مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA بر اساس کیت QIAmp DNA mini kit (Qiagen) و بر اساس پروسه کیت انجام گرفت. نمونه های استخراج شده در دو لوله تقسیم شده و به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

از روش Nested-PCR با استفاده از ژن ITS-rDNA جهت شناسایی پنوموسیستیس ژایرووسی استفاده شد. این روش یکی از حساس ترین و کارآمدترین روشهای ارائه شده در بین روشهای مختلف PCR برای شناسایی این ارگانیسم است و به دلیل شناسایی مقادیر بسیار جزئی از ژنوم وموسیستیس ژایرووسی در نمونه های ریوی، به همراه روش Nested-PCR با استفاده از ژن MtLSU (Mitochondria Large Subunit)، برای تشخیص عفونت در مراحل اولیه آن پیشنهاد شده اند(۶). در این روش از دو پرایمر خارجی 1724F و ITS2R در مرحله اول PCR و دو پرایمر داخلی ITS1F و ITS2R1 در مرحله دوم استفاده شد که قطعه ای به طول ۵۵۰ جفت بازی از ژن ITS پنوموسیستیس ژایرووسی را تکثیر می دهند(۷).

1724-F (Outer-Forward): (5`-AAGTTGATCAAATTTGGTC-3`)
ITS2-R (Outer-Reverse): (5`-CTCGGACGAGGATCCTCGCC-3`)
ITS1-F (Inner-Forward): (5`-CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC-3`)
ITS2-R1 (Inner-Reverse): (5`-GTTCAGCGGGTGATCCTGCCTG-3`)

به علت اینکه فقط یک کپی از ژنهای rRNA هسته ای در پنوموسیستیس وجود دارد، انجام PCR بصورت Nested نسبت به روشهای PCR تک مرحله ای ارزش تشخیصی بالاتری دارد(۸).

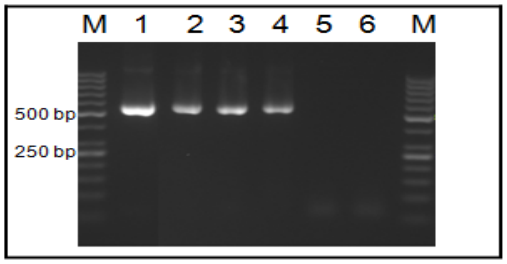
از DNA استخراج شده از یک نمونه BAL یک بیمار که بیماری پنوموسیستوزیس وی با روش های هیستولوژیک اثبات شده بود، به عنوان DNA استاندارد، جهت set up کار و نیز به عنوان کنترل مثبت در تست های PCR استفاده شد.

برای انجام PCR از پروتکل ارائه شده توسط Lu و همکاران با کمی تغییر استفاده شد(۷). برای دستیابی به وضوح بیشتر باندها، دمای annealing در مرحله دوم PCR از ۵۵ درجه به ۵۸ درجه افزایش یافت. تمامی مراحل آمپلیفای کردن با استفاده از مسترمیکس (Lot. No.5200100-9125 Ampliqon) انجام شد. حجم کلی محلول PCR، در مورد تمامی نمونه ها ۲۵ میکرولیتر تعیین شد که حاوی پریمیکس (۱۲/۵میکرولیتر)، پرایمر کاری (۳/۷۵ میکرولیتر) حاوی ۰/۳ میکرومولار از هر کدام از پرایمرها، DNA الگو (۳ میکرولیتر) و آب مقطر دو بار تقطیر استریل (۵/۷۵ میکرولیتر) بود. در میکروتیوب کنترل مثبت به جای DNA الگو، DNA استاندارد (۰/۵ میکرولیتر) و در میکروتیوب کنترل منفی بجای DNA الگو، آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. برنامه PCR اول شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در $95^{\circ}C$، سپس ۳۵ سیکل آمپلیفیکاسیون همراه با دناتوراسیون به مدت ۱ دقیقه در $94^{\circ}C$، annealing به مدت ۱ دقیقه در $47^{\circ}C$، extension به مدت ۲ دقیقه در $72^{\circ}C$ و extention نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در $72^{\circ}C$ بود.

تمامی مراحل تکثیر بوسیله دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Mastercycler Gradiant, Germany) انجام شد. بعد از اتمام مرحله اول PCR، مرحله دوم Nested-PCR با استفاده از ۱ میکرولیتر از محصول بدست آمده از PCR مرحله اول در همان حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی مرحله دوم شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در $94^{\circ}C$، سپس ۳۵ سیکل آمپلیفیکاسیون همراه با دناتوراسیون به مدت ۱ دقیقه در $94^{\circ}C$، annealing به مدت ۱ دقیقه در $58^{\circ}C$، xtension به مدت ۲ دقیقه در $72^{\circ}C$ و extention نهایی به مدت ۷ دقیقه در $72^{\circ}C$ بود. سپس نتایج PCR با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ ٪ مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

تمامی گسترش ها از نظر پنوموسیستیس ژایرووسی با رنگ آمیزی گیمسا منفی بودند.نتایج Nested-PCR با استفاده از ژن ITS-rDNA: از مجموع ۶۰ نمونه لاواژ ریوی، ۳ نمونه (۵٪) از نظر پنوموسیستیس ژایرووسی مثبت شدند(تصویر ۱). نمونه اول مربوط به مردی ۳۱ ساله بود که به دلیل داشتن تیموکارسینوما (Thymocarsinoma) و متعاقبا انجام تیموکتومی (Thymectomy) تحت شیمی درمانی و رادیو تراپی طولانی بوده و چند ماه بعد به خاطر تنگی نفس شدید، درد قفسه سینه در هنگام تنفس، سرفه، خلط خونی و کاهش وزن بی دلیل مراجعه نموده بود. نمونه دوم مربوط به مردی ۶۶ ساله با سابقه تعویض دریچه میترال و مصرف سیگار به مدت طولانی بود که به دلیل درد سینه و خلط صبحگاهی حدود یک سال تحت درمان با پنی سیلین قرار گرفته بود و نمونه سوم به زنی ۳۸ ساله مربوط می شد که به علت کاهش وزن ناگهانی و شدید همراه با تنگی نفس و سرفه شبانه با سابقه مصرف سفازولین به مدت چند ماه مراجعه نموده بود.



تصویر ۱: تصویر الکتروفورز محصولات Nested-PCR : ستون M: مارکر مولکولی (DNA ladder)، ستون ۱: کنترل مثبت (PC)، ستون های ۲، ۳، و ۴: نمونه های مثبت بیماران، ستون های ۵ و ۶: کنترل منفی (NC)

بحث

پنوموسیستیس ژایرووسی قارچ فرصت طلبی است که وجود شرایط زمینه ای و عوامل مستعد کننده برای ایجاد بیماری و عفونت زایی آن امری لازم است و بیماری زایی آن در افرادی که از سیستم ایمنی طبیعی برخوردار هستند، بسیار نادر است(۱). اینگونه به نظر می رسد که کلونیزاسیون و بیماری زایی پنوموسیستیس در انسان کاملا وابسته به وضعیت سیستم ایمنی و کارآمدی آن است.

علت منفی بودن نمونه های رنگ آمیزی شده و عدم مشاهده پنوموسیستیس می تواند به این دلیل باشد که کلونیزاسیون پنوموسیستیس ژایرووسی به صورتی که در روش های رنگ آمیزی قابل مشاهده باشد، معمولا" در افرادی مشاهده می شود که ایمنی آنها بشدت تضعیف شده و اجازه کلونیزاسیون آزادانه را به این ارگانیسم داده باشد. در حالیکه در این مطالعه جمعیت مورد بررسی شامل بیمارانی بود که عموما" از حال عمومی نه چندان وخیمی برخوردار بوده و اکثر آنها به صورت سرپایی جهت انجام برونکوسکوپی و اخذ نمونه لاواژ ریوی مراجعه کرده بودند. در مطالعاتی که جمعیت مشابهی را برای بررسی وجود پنوموسیستیس ژایرووسی در نمونه های ریوی انتخاب نموده اند نیز نتایج مشابهی در رنگ آمیزی بدست آمده است. به عنوان مثال، در مطالعه Helweg-Larsen در سال ۲۰۰۲، از ۳۶۷ نمونه ریوی بدست آمده از بیماران دارای علائم ریوی، ۱۶ نمونه با روش های مختلف PCR از نظر این قارچ مثبت شدند. در حالیکه این ارگانیسم در هیچکدام از این ۱۶ نمونه بصورت میکروسکوپی مشاهده نشد(۱۵). همچنین در مطالعه Maskell در سال ۲۰۰۳، از ۹۳ نمونه BAL بدست آمده از بیماران ریوی، ۱۷ نمونه با روش Nested-PCR با استفاده از ژن MtLSU از نظر پنوموسیستیس مثبت شدند. در حالیکه فقط یک نمونه از ۱۷ نمونه در مشاهده میکروسکوپی مثبت شد(۱).

در مطالعه گذشته نگری که توسط Roblot و همکارانش در سال ۲۰۰۲ انجام گرفته است، شرایط زمینه ای مساعد کننده ابتلا به پنوموسیستیس و کلونیزاسیون قارچ را در طی ۵ سال در بیماران مورد بررسی و بازنگری قرار داده است. در این مطالعه از ۱۰۳ بیمار، ۶۰ نفر دارای بدخیمی های خونی، ۲۷ نفر دارای بیماری های التهابی و ۱۸ نفر دارای تومور بودند. ۷۱ بیمار از داروهای سایتوتوکسیک و ۵۱ بیمار کورتیکواستروئید های خوراکی به صورت طولانی مدت مصرف کرده بودند. به نظر می رسد مصرف داروهای کورتیکواستروئید با دوز بالا و داروهای ساپرس کننده سیستم ایمنی که در اعمال پیوندی استفاده می شوند، مهمترین عامل ابتلا به این بیماری باشند(۱۶).

در مطالعات مختلفی که برای شناسایی این ارگانیسم از روش PCR استفاده شده، مشخص شده که روشNested-PCR با استفاده از ژن ITS-rDNA، روش بسیار حساسی در این زمینه بوده و غالبا نتایج بهتری و دقیق تری نسبت به روش های PCR تک مرحله ای و روش های رنگ آمیزی بدست می دهد. نتایج این مطالعه نشان دهنده ارزش و کارآمدی بالای این روش برای بررسی فراوانی این ارگانیسم در نمونه های ریوی است.

نتیجه گیری

این بررسی نشان می دهد که تکنیک Nested-PCR با استفاده از ژن ITS-rDNA روش کارآمد و ارزشمندی برای شناسایی DNA پنوموسیستیس ژایرووسی در نمونه های ریوی است و می تواند جایگزینی مناسب برای روش های رنگ آمیزی باشد. مطالعات بیشتر در این زمینه در مبتلایان به ایدز و بدخیمی ها ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم بخش انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران که در اجرای این پروژه متحمل زحمات بسیاری شده اند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید. همچنین از مسئولین و پرسنل آزمایشگاه تحقیقات تخصصی سل و بیماریهای ریوی مسیح دانشوری که در انجام این مطالعه همکاری صمیمانه ای انجام دادند، قدردانی به عمل می آید. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ایران (کد پروژه ۷۶۹) انجام گرفته است.

REFERENCES

1. Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JC, Wakefield AE, Miller RF, Davies RJ. Asymptomatic carriage of Pneumocystis jiroveci in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. Thorax. 2003; 58(7): 594-7.

2. Russian DA, Levine SJ. Pneumocystis carinii pneumonia in patients without HIV infection. Am J Med Sci. 2001; 321(1):56-65.

3. 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):747-53.

4. Luna LG. Staining methods for Pneumocystis carinii. Histo-Logic. 1988; 18:2-4.

5. Khan MA, Farrag N, Butcher P**.** Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia: immunofluorescence staining, simple PCR or nPCR. J Infect. 1999; 39**:**77-80.

6. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Kumar L, Samantaray JC, Agarwal SK, Kabra SK, Luthra K. Diagnostic significance of nested polymerase chain reaction for sensitive detection of Pneumocystis jirovecii in respiratory clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64(4): 381-88.

7- Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Comparison of six different PCR methods for detection of Pneumocystis carinii. J Clin Microbiol. 1997; 33:2785-88.

8. Shah JS, Pieciak W, Liu J, Buharin A, Lane DJ. Diversity of host species and strains of Pneumocystis carinii is based on rRNA sequences. Clin Diagn Lab Immunol. 1996; 3(1): 119-27.

9. Robberts FJL, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of Pneumocystis jirovecii: evaluation of 9 assays. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 58: 385-92

10. Mohebali M, Mir-Bakhsh M, Keshavarz H. Rapid detection of Pneumocystis Carinii in respiratory specimens of rats by Calcofluor white staining. Iranian J Publ Health. 2002; 31 (3-4):108-10.

11. Mahmoodzadeh A, Hajia MD, Rezaimanesh MR, Morovati H. Diagnosis of Pneumocystosis pneumonia with two staining methods using various specimens collected from animal model. J Microbiol. 2008; 5(2).

12. Mahmoodzadeh A, Hajia M, Rezaiemanesh MR, Morovati H. A scoring system for Pneumocystis pneumonia based on clinical symptoms and laboratory findings in rat model. Iranian J Path. 2007; 2(4):165-70.

13. Ahie M, Rahimifard N, Kahnamouie AA. Introduction of several innovative histochemical staining methods for easy and rapid diagnosis of Pneumocystis carinii. Pejouhandeh. 2000; 5(17):65-70.

14. Mahmoodzadeh A, Hajia M, Rezaiemanesh MR. Comparison of Gomori's Methenamine Silver Method with PCR Technique on Oral Swab, Bronchoalveolar Lavage and lung Ho-mogenate Specimens in Detection of Pneumocystis. Iranian J Parasitol. 2008; 3(2) : 21-5.

15. Helweg-Larsen J, Jensen JS, Dohn B, Benfield TL, Lundgren B. Detection of Pneumocystis DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia – a case–control study. BMC Infect Dis. 2002; 25: 2-28.

16. Roblot F, Godet C, Le Moal G, Garo B, Faouzi Souala M, Dary M, etal. Analysis of underlying diseases and prognosis factors associated with Pneumocystis carinii pneumonia in immunocompromised HIV-negative patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21(7): 523-31.