

Pneumocystis carinii 폐렴의 기관지 폐포세정액: 세포학적 및 전자현미경적 소견*

계명대학교 의과대학 병리학교실

권건영·윤철희·김상표·박관규·장은숙

= Abstract =

Bronchoalveolar Lavage of *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Cytological and Ultrastructural Features

Kun Young Kwon, M.D., Cheol Hee Yun, M.D., Sang Pyo Kim, M.D.,
Kwan Kyu Park, M.D., and Eun Sook Chang, M.D.

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine

The cytological and ultrastructural findings of *Pneumocystis carinii*(PC) obtained from rats by bronchoalveolar lavage(BAL) are described. All developmental forms of the PC organisms were obtained in the lavage fluid.

Papanicolaou stain revealed conglomeration of PC as a foamy cast. The cystic walls of PC were well identified on Gomori's methenamine silver stain. Trophozoites and intracystic bodies were stained by Giemsa and Diff-Quik techniques. Some PC organisms were seen within the alveolar macrophages.

Ultrastructurally, the cysts were almost circular in shape, and were nearly devoid of surface tubular extensions. The wall of the cyst was composed of an unit membrane, an intermediate electron lucent layer and an external electron dense layer. The cysts frequently contained intracystic bodies, so called sporozoites. Occasionally empty or collapsed cysts with no intracystic bodies, and precysts were found. Trophozoites were variable in size and shape with abundant tubular extensions along the single electron dense pellicle.

* 이 논문은 1994년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

BAL is a useful method for concentrating the various morphologic forms of PC organisms, and is a rapid diagnostic method for PC pneumonia.

Key words: *Pneumocystis carinii*, Cytology, Ultrastructure, Bronchoalveolar lavage

서 론

Pneumocystis carinii(PC) 폐렴은 면역저하상태나 후천성 면역결핍증후군을 가진 환자에서 가장 흔한 폐 합병증으로 알려져 있다¹⁻⁵⁾ 그러나 PC 폐렴은 치료가 가능한 질환으로도 알려져, 임상적으로 의심되는 환자에서는 적절한 치료를 위해 신속, 정확한 진단이 요구되고 있다⁶⁻⁸⁾.

PC는 배양 배지에서 자라지 못하며, 건강인 혈청에서도 이 균체에 대한 항체가 가끔 검출되므로, PC 폐렴의 정확한 진단을 위해서는 객담 또는 조직 검사에서 PC를 광학현미경 또는 전자현미경으로 검색하는 것이 필요하다^{5,9,10)} 객담검사를 실시할 경우 PC에 대한 진단적 민감도가 25~50%인데 비하여 기관지폐포세정 검사를 실시할 경우 85~95%에 이르며, 경기관지생검과 비교할 경우 PC에 대한 특이도는 거의 100%에 달하는 것으로 보고되어 있고 신속히 진단할 수 있는 장점이 있어, 최근 기관지폐포세정 검사가 PC 폐렴환자의 진단법으로 널리 이용되고 있다^{7,8,11)}

저자들은 실험적으로 흰쥐에 PC 폐렴을 야기시킨 후 기관지폐포세정 검사를 실시하여 세포학적 소견을 알아보고, 이를 조직학적 소견과 비교하며, 동시에 전자현미경적 관찰을 실시하였다.

재료 및 방법

체중 200~300g 되는 Sprague-Dawley 종 흰쥐 30마리를 사용하여 dexamethasone 2 mg을 마시는 물 1리터에 혼합하여 투여하고 저단백식(8

%)을 제공하였다. Dexamethasone 과 저단백식을 경구로 투여하기 시작한지 6주가 경과한 후 체중이 현저히 감소하고, 전신상태가 불량한 흰쥐부터 차례로 기관지폐포세정 검사를 실시한 후 Diff-Quik 염색을 하여 PC가 다수 나오는 흰쥐를 실험재료로 선택하였다. PC 폐렴의 실험적 모델을 만드는 동안 다른 세균 및 진균류에 의한 혼합감염을 방지하기 위해 tetracycline 0.75 g 과 Nystatin 200,000 단위를 물 1리터에 각각 혼합하여 같이 투여하였다. 기관지폐포세정 검사를 실시한 군에서는 채취한 기관지폐포세정액을 재료로 cytospin 을 실시하여 얻은 슬라이드에 hematoxylin-eosin(H&E), Papanicolaou, periodic acid-Schiff(PAS), Gomori's methenamine silver(GMS), Giemsa 및 Diff-Quik 염색을 실시하였다. 조직학적 관찰을 위해 PC 폐렴을 일으킨 흰쥐 중 5마리를 선택하여 폐장조직을 적출한 후 10% 중성 포르말린에 고정하고 계열에탄올로 탈수한 후 파라핀 침투과정과 파라핀 포매를 실시한 후 4 μ m의 박절편을 만들어 H&E와 GMS 염색을 실시하였다. 투과전자현미경적 관찰을 위해서는 원심분리하여 얻은 기관지폐포세정액 침전물에 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1M 인완충액, pH 7.4)으로 0~4 $^{\circ}$ C에서 2시간 전고정하고 0.1M 인완충액으로 세척한 후 다시 원침하여 1% OsO₄ 용액으로 2시간 후 고정을 실시하고 같은 방법으로 세척한 후 계열에탄올로 탈수를, propylene oxide로 치환한 다음, Luft 방법¹²⁾에 의해 epon 혼합물로 포매를 하였다. 1mm 세절을 한 후 toluidine blue로 단 염색을 하여 관찰 부위를 결정한 다음 Sorvall MT 5000형 초박절기를 사용하여 40~60nm의 초박절편을 얻어 grid에 부착한 다음 uranyl

acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하고 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 세포학적 소견

Papanicolaou 염색에서 약간 호염기성을 띠는 무정형 물질이 포말상덩어리(foamy cast)로 보였는데, 고배율 관찰시 다수의 희미한 포낭구조

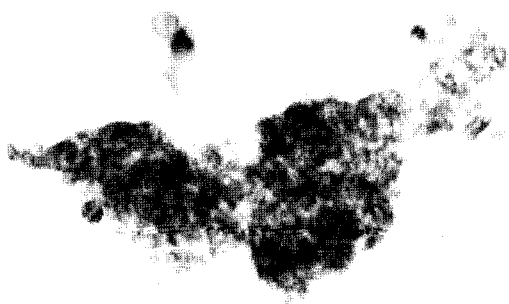


Fig. 1. Bronchoalveolar lavage of *Pneumocystis carinii* infected lung in rats. PC cysts and trophozoites appear as amorphous foamy and granular casts (Papanicolaou, $\times 400$).

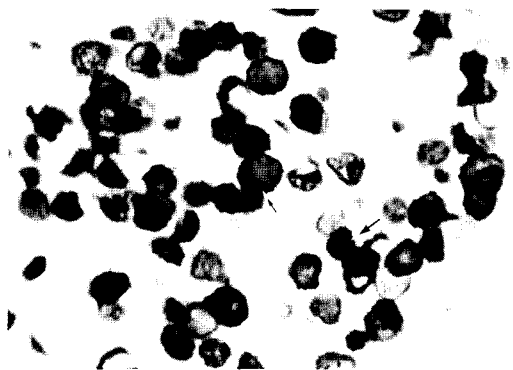


Fig. 2. PC cysts with round or crescentic forms and eccentric capsular dots (arrows) (GMS, $\times 1000$).

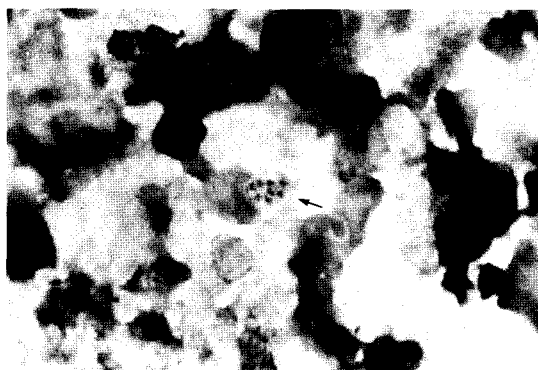


Fig. 3. A PC cyst with eight intracystic bodies (arrow). The cystic wall appears only as a pale outline delimiting the intracystic bodies (Diff-Quik, $\times 1000$).

를 보였고, 그 내부에 작은 검은 점들이 관찰되었다 (Fig. 1). GMS 염색에서 PC 포낭은 대체로 둥근모양을 보이며 때로는 찌부러져 반월상 또는 바나나형태와 같은 다양한 모양이었으며 몇개 또는 다수가 집단을 이루고 있고 가끔 피막점(capsular dot)이 포낭의 변연부에서 관찰되었다 (Fig. 2). 그리고 포낭내에는 포낭내체 (intracystic bodies)가 암청색을 띠는 작은 점의 형태를 취하면서 6~8개가 존재하였고 이들은 영양형과 함께 Giemsa 또는 Diff-Quik 염색에서 용이하게 관찰되었다 (Fig. 3).

2. 조직학적 소견

폐포강내에는 기관지폐포세정 검사소견과 유사하게 망상형 또는 포말형태의 삼출액이 차 있으며, Giemsa 및 GMS 염색에서 PC의 영양형과 포낭의 구조물이 관찰되었다. PC는 흔히 폐포벽에 부착하는 경향이 있었고, 폐 간질에는 림프구와 형질세포의 침윤과 함께 국소적인 섬유상 비후가 관찰되었다 (Fig. 4).

3. 전자현미경적 소견

생활주기에 따른 PC의 다양한 형태가 관찰되었는데, 이들은 주로 영양형과 포낭의 구조를

보였고, 가끔 중간형인 전포낭(precyst)이 관찰되었다(Fig. 5). 때때로 폐포대식세포내에는 PC 영양형 또는 포낭의 구조가 발견되었다. 포낭은 대체로 둥근모양을 가지면서 외표면은 평활하며 관상연장(tubular extension)은 풍부하지

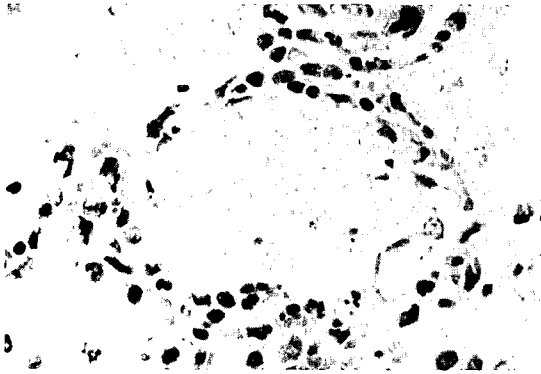


Fig. 4. PC infected lung tissue showing interstitial inflammatory infiltrates as well as foamy reticular exudate in alveolar lumina (H-E, $\times 400$).

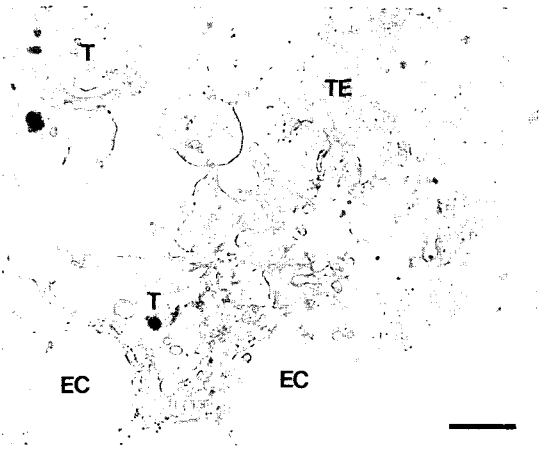


Fig. 5. Ultrastructure of PC in the bronchoalveolar lavage. PC organisms are composed of many trophozoites and some empty cysts. The trophozoites show variable size and shape, and abundant tubular extensions (TE). T: trophozoite, EC: empty cyst (uranyl acetate and lead citrate, Bar = $2 \mu\text{m}$).

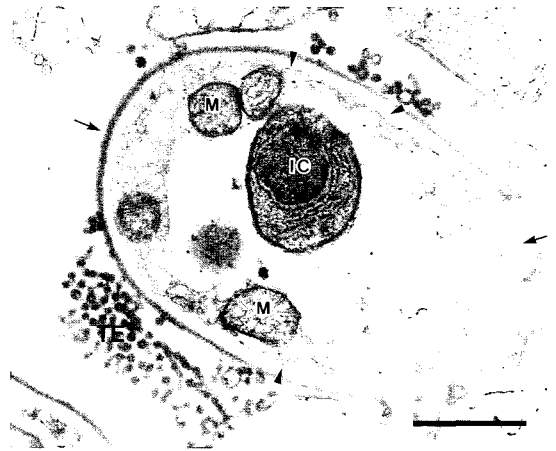


Fig. 6. A mature cyst of PC with one intracystic body (sporozoite) (IC), some mitochondria (M) and surface tubular extensions (TE). The wall is made up of an inner unit membrane (arrow heads), an intermediate electron lucent layer and an external electron dense layer (arrows) (uranyl acetate and lead citrate, Bar = $1 \mu\text{m}$).

않았다. 포낭벽은 안쪽으로 부터 한층의 단위막이 세포질을 둘러싸고 있으며 중간에 전자밀도가 낮은 층으로 구성되어 있고 전자밀도가 높은 한층이 외표면을 이루고 있었다. 포낭의 세포질은 성숙과정에 따라 상이한 형태를 보였다. 전포낭은 영양형의 세포질과 유사하였고, 성숙한 포낭은 세포질내에 포낭내체를 가지고 있었는데 그 형태는 영양형의 초기구조와 비슷하였다(Fig. 6).

어떤 포낭은 그 벽의 틈을 통하여 포낭내체가 밖으로 배출되는 것을 볼 수 있었고, 때때로 포낭의 내용물이 모두 빠져나간 채, 반월모양을 취하거나 빈 포낭(empty cyst)도 관찰할 수 있었다. 영양형은 매우 다양한 형태를 가지면서 외표면에는 풍부한 관상연장을 가지고 이웃 영양형과 밀접하게 위치하였다. 영양형은 전자밀도가 높은 한층의 막으로 둘러싸이며 세포질내에는 무정형의 과립상 물질로 차있고 세포소기관은 뚜렷하게 관찰되지 않았다(Fig. 7).

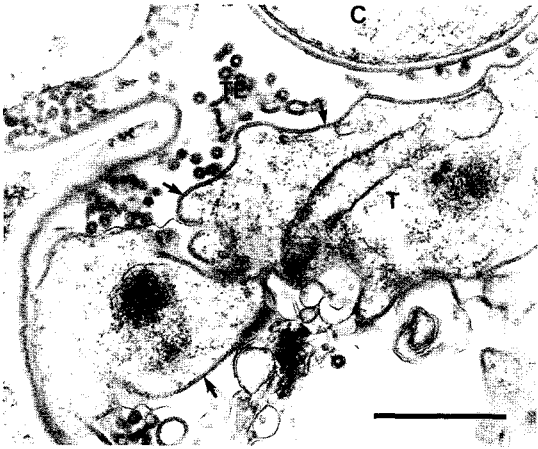


Fig. 7. High magnification of trophozoite. The cytoplasm contains amorphous granular material and few organelle. Abundant tubular extensions (TE) appear along the single electron dense pellicle (arrows). T: trophozoite, C: cyst (uranyl acetate and lead citrate, Bar = 1 μ m).

고찰

면역저하상태나 후천성 면역결핍증후군을 가진 환자에서 갑작스럽게 호흡부전이 초래될 경우 폐병변의 정확한 진단을 위해 조직검사가 필수적이거나, 환자의 상태를 고려하여 가능한 부담을 적게 주면서 진단할 수 있는 방법으로 여러가지 세포학적 진단법이 이용되고 있다^{5,8,11,13}).

PC 폐렴에 대한 세포학적 진단법에는 시료채취 방법에 따라 객담¹⁴⁻¹⁷), 세침흡인^{18,19}), 기관지 세척 또는 찰과물⁸) 및 기관지폐포세정법 등을 들 수 있는데, 최근 기관지폐포세정법에 대한 관심이 증가하여 PC 폐렴환자에서 진단 목적으로 널리 이용되고 있다^{8,11}).

PC는 폐장에 편재하는 병원체로서 폐포상피 세포에 부착하는 경향이 강하여 객담검사에서는 종종 그 균체를 찾기가 어렵다. PC표면

에는 관상연장 구조가 있으며, 이는 피막연장 (capsular extension)으로도 불리는데, 영양형에서 가장 잘 발달되어 있으며, 관상연장에 의해 PC가 서로 엉겨 덩어리를 만들거나 폐포상피 세포에 PC가 부착하는 것을 보다 용이하게 한다⁸).

PC를 기관지 폐포세정액에서 검출하기 위해 다양한 염색방법을 사용하고 있다^{8, 20, 21}) (Table 1). H&E, Papanicolaou, toluidine blue, Giemsa, PAS, modified Wright (Diff-Quik), modified toluidine blue 염색 등을 사용하며, 어느 한 가지 염색만으로는 PC체의 모든 형태를 동시에 관찰하기는 어려워 몇 가지 염색법을 같이 실시함으로써 PC의 포낭, 포낭내체 및 영양형을 모두 볼 수 있다. 그리고 요즈음 단클론 항체

Table 1. Staining methodology for the demonstration of *Pneumocystis carinii*

Histochemical stains:	
Cyst-wall (capsular)	
GMS	
Gram-Weigert	
Grocott's	
PAS	
Toluidine blue	
Intracystic bodies and trophozoites	
Cresyl violet	
Diff-Quik	
Giemsa	
MGG	
PAS	
Wright-Giemsa	
Immunochemical stains ³²⁾	
Immunofluorescence ^{33,34)}	
Monoclonal antibodies ^{35,36)}	
Molecular biologic stains	
Hybridization probes ³⁷⁾	
Polymerase chain reaction ³⁸⁾	

GMS: Gomori's methenamine silver, PAS: periodic acid-Schiff, MGG: May Grünwald Giemsa

를 이용한 면역조직 화학적 검사나 분자생물학적 기법을 이용함으로써 적은 양의 기관지폐포세정액에서도 PC를 찾아낼 수 있다.

기관지폐포세정액에서 PC를 얻는 방법으로는 과거에 millipore 여과막을 이용하여 왔는데, 최근에는 cytospin 과정을 거쳐 PC를 슬라이드 위에 모을 수 있는 방법을 많이 사용한다. 1차 cytospin 슬라이드에서는 각종 염증세포와 호흡기계 상피세포 및 폐포대식구와 세포잔해물 등이 PC체와 혼합되어 관찰되며, 2차 cytospin을 실시하여 슬라이드에 도달할 경우에는 보다 많은 수의 PC를 모을 수 있는 이점이 있다.

H&E 또는 Papanicolaou 염색에서 포말형태의 덩어리를 관찰할 때 폐포상 삼출물과 감별이 어려울 때가 있다. 이 때는 GMS 염색이나 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적 검사를 같이 함으로써 쉽게 PC를 찾을 수 있으며, Diff-Quik 염색을 하여 PC의 영양형 또는 포낭내체를 찾음으로써 빠른 시간내에 진단을 할 수 있다²²⁾.

PC를 세포학적으로 진단하는데 있어서 전자현미경적 관찰은 매우 유용하다. 전자현미경적 관찰을 통하여 Papanicolaou 염색으로 포말형태의 덩어리를 보이는 곳에서 포낭, 전포낭, 영양형 및 관상연장 구조를 정확히 관찰함으로써 폐포상 삼출물과 감별을 할 수 있고 PC를 확진할 수 있다. 최근에는 back-scattered 주사전자현미경적 기법을 적용하여, 저배율에서도 PC 존재를 쉽게 찾을 수 있어 연구용으로 이용하고 있다²³⁾. 전자현미경적 관찰을 통해서, 변성이 일어난 곳에서도 특징적인 포낭벽 또는 관상연장 등의 구조를 발견함으로써 PC의 진단이 가능하며²⁴⁾, Cytomegalovirus 또는 다른 바이러스와의 혼합감염일 경우 이들의 검출도 가능해진다⁸⁾.

PC의 포낭은 4~6 μm 의 직경을 가지면서 대체로 구형을 가지고, 때로는 찌부러져 반월상을 보이기도 한다. 포낭은 H&E 또는 Papanicolaou

염색에서는 명확하게 보이지 않으므로 발견하기 어려우나 GMS 염색을 할 경우 몇 개 또는 다수가 집단적으로 관찰되며 포낭벽이 진하게 염색된다. 포낭 변연부에는 피막점이 관찰되는데 보통 한개 또는 쌍으로 존재하고 GMS 염색에 잘 반응하여 포낭내체와 구별이 된다. 전자현미경상에서 피막점은 피막의 한 부분이 원반형으로 비후된 형태로 관찰된다²⁵⁾. 포낭의 외표면은 당단백으로 둘러싸여 있고 PAS와 GMS 염색에 잘 반응하며, 분자생물학적 연구에서 그 구성 성분이 진균류와 동일하여 PC가 진균류의 일종으로 분류되는 것을 뒷받침하고 있다²⁶⁻²⁸⁾.

포낭내체는 sporozoite로도 불리며 직경이 1~2 μm 으로, May-Grünwald-Giemsa (MGG) 염색이나, Giemsa²⁹⁾, Wright-Giemsa³⁰⁾, 또는 Diff-Quik²²⁾ 염색으로 관찰할 수 있다. 한개의 포낭은 포낭내체를 2, 4, 6 또는 8개를 포함하고, 각 포낭내체는 성숙초기에는 크기가 작으나 점차 커져서 영양형으로 성숙된다⁸⁾. Giemsa-Weigert 염색을 할 경우 피막점과 포낭내체 모두가 염색되므로 이 염색으로는 피막점과 포낭내체를 감별하기 곤란하다⁸⁾. 영양형은 세포학적 도말에서는 일반적으로 조직병변에서 관찰되는 것에 비해 그 형태가 매우 다양하며, 세포질은 Giemsa 또는 MGG 염색에서 옅은 청색을 나타내고 가끔 붉은 점이 변연부쪽에서 관찰된다. Diff-Quik 또는 Wright-Giemsa 염색에서 잘 관찰되나 때로는 인공물과 감별을 해야 될 경우도 있다⁸⁾. 영양형의 외표면에는 포낭에 비해 무수한 관상연장을 가짐으로써, 넓은 흡수면적을 갖게 되어, 영양형이 영양획득을 하는 것이 용이해지고, 폐포상피세포에 부착되는 것을 보다 용이하게 한다⁹⁾. Vavre 및 Kucera³¹⁾는 관상연장이 PC세포질의 일부라고 보고하였고, PC 내부에 수축소기관이 없는 것으로 미루어 PC가 이동할 때 관상연장이 역할을 하여 아메바상 운동을 가능케 할 것으로 보고 있다⁹⁾.

결 론

PC 폐렴의 세포학적 소견과 PC의 초미형태학적 소견을 알아보기 위하여, Sprague-Dawley 종 흰쥐에 dexamethasone 과 저단백 식이를 경구로 투여하여 6주가 경과한 후 실험적 PC 폐렴을 만든 후 기관지폐포세정 검사를 실시하여 세포학적 및 전자현미경적 관찰을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

PC의 생활기에 해당하는 각각의 형태학적 소견을 기관지폐포세정 검사를 통해 모두 관찰할 수 있었다. Papanicolaou 및 H&E 염색에서는 PC가 포말상 덩어리로 보였다. PC 포낭은 GMS 염색에서 잘 관찰되었으며, 영양형과 포낭내체는 Giemsa, Diff-Quik 및 PAS 염색에서 찾을 수 있었다. PC의 일부는 폐포대식세포 세포질내에서도 관찰되었다. 전자현미경적으로 포낭은 대부분 둥근 모양을 가지며, 외표면은 대체로 평활하고 관상연장은 간혹 관찰되었다. 포낭벽의 구성은 한 층의 단위막으로 세포질을 둘러싸며 그 바깥으로 전자밀도가 낮은 한 층으로, 가장 바깥쪽에는 전자밀도가 높은 한 층으로 이루어져 있었다. 포낭은 흔히 6~8개의 포낭내체를 가지며 때때로 전포낭의 구조도 관찰되었다. PC의 영양형은 그 모양과 직경이 매우 다양하며 외표면에 풍부한 관상연장이 존재하고 전자밀도가 높은 한 층의 피막을 구성하고 있었다.

이상의 결과를 통하여 기관지폐포세정 검사는 PC를 직접 관찰함으로써 PC 폐렴을 진단하는 매우 유용한 방법이며, Papanicolaou 염색과 함께 GMS 염색 및 Diff-Quik 염색을 하여 광학현미경적으로도 신속한 진단이 가능한 것으로 생각되고, 전자현미경적 관찰을 하면 PC의 생활기에 있어서 각 형태학적 특징을 더욱 자세히 관찰할 수 있어 PC 폐렴에 대한 진단과 함께 PC 생활주기에 따른 형태학적 특성과 폐포상피

세포와의 관계를 연구하는데 많은 도움을 줄 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Rifkind D, Faris TD, Hill RB: *Pneumocystis carinii* pneumonia: Studies on the diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 65:943-956, 1966
2. Dutz W: *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Pathol Annu* 5:309-341, 1970
3. Dutz W: *Pneumocystis carinii* infection and interstitial plasma cell pneumonia: What does history teach? *Semin Diagn Pathol* 6:195-202, 1989
4. Gal AA, Koss MN, Strigle S, Angritt CP: *Pneumocystis carinii* infection in the acquired immune deficiency syndrome. *Semin Diagn Pathol* 6:287-299, 1989
5. Soulez B, Dei-Cas E, Palluault F, Camus D: Morphological evaluation of *Pneumocystis carinii* after extraction from infected lung. *J Parasitol* 77:449-453, 1991
6. Murray JF, Garay SM, Hopewell PC, Mills J, Snider GL, Stover DE: Pulmonary complications of the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 135:504-509, 1987
7. Martin WJ, Smith TF, Brutinel WM, Cockerill FR, Douglas WW: Role of bronchoalveolar lavage in the assessment of opportunistic pulmonary infections: Utility and complications. *Mayo Clin Proc* 62:549-557, 1987
8. Bedrossian CWM, Mason MR, Gupta PK: Rapid cytologic diagnosis of *Pneumocystis carinii*: A comparison of effective techniques. *Semin Diagn Pathol* 6:245-261, 1989
9. Hasleton PS, Curry A, Rankin EM: *Pneumocystis carinii* pneumonia: A light microscopical and ultrastructural study. *J Clin Pathol* 34:1138-1146, 1981
10. Itatani C, Marshall GJ: Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. *J Parasitol* 74:700-712, 1988
11. Rotaëche JG, Costabel U: Bronchoalveolar Lavage in Diagnostic Cytology. In *Compendium on Diagnostic Cytology*. Edited by Wied GL, et al. Chicago, Tutorial of Cytology, 1992, pp 251-265

12. Luft JH: Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophysic Biochem Cytol* 9:409-417, 1961
13. Selvaggi SM, Gerber M: Pulmonary cytology in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Diagn Cytopathol* 2: 187-193, 1986
14. Pitchenik AE, Ganjei P, Torres A, Evans DA, Rubin E, Baier H: Sputum examination for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 133:226-229, 1986
15. Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, et al: The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 133:515-518, 1986
16. del Rio C, Guamer J, Honig EG, Slade B: Sputum examination in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 112:1229-1232, 1988
17. Zaman MK, Wooten OJ, Suprahmanya B, Ankobiah W, Finch PJ, Kamholz SL: Rapid noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* from induced liquefied sputum. *Ann Intern Med* 109:7-10, 1988
18. Kim HK, Hughes WT: Comparison of methods for identification of *Pneumocystis carinii* in pulmonary aspirates. *Am J Clin Pathol* 60:462-466, 1973
19. Chandary S, Hughes WT, Feldman S, et al: Percutaneous transthoracic needle aspiration of the lung: Diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Dis Child* 131:902-905, 1977
20. Gosey LL, Howard RM, Witebsky FG, et al: Advantages of a modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 22:803-807, 1985
21. Seitz HM: Technik des mikrobiologischen Nachweises von *Pneumocystis carinii*. In *Die Pneumocystis carinii* pneumonie. Edited by M Dietrich, Berlin, Springer, 1989, pp 147-150
22. deBlois GG: Use of the Diff-Quik stain on transbronchial biopsy imprints as a rapid diagnostic procedure for identification of *Pneumocystis carinii*. *Am J Clin Pathol* 85:385, 1986
23. Schraufnagel DE, Becker RP, Balaan M, Schmid A, Claypool W: Scanning electron microscopy with backscattered electron imaging to identify *Pneumocystis carinii*. *N Engl J Med* 317:1541, 1987
24. Bedrossian CWM: Ultrastructure of *Pneumocystis carinii*: A review of internal and surface characteristics. *Semin Diagn Pathol* 6:212-237, 1989
25. Watts JC, Chandler FW: *Pneumocystis carinii* pneumonitis: The nature and diagnostic significance of methenamine silver-positive "intracystic" bodies. *Am J Surg Pathol* 9:744-751, 1985
26. Shimono LH, Hartman B: A simple and reliable rapid methenamine silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi. *Arch Pathol Lab Med* 110:855-856, 1986
27. Lundgren B, Kovacs JA, Nelson NN, Stock F, Martinez A, Gill VJ: *Pneumocystis carinii* and specific fungi have a common epitope, identified by a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 30:391-395, 1992
28. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML: Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 334:519-522, 1988
29. Dutz W, Burke B: Cytologic diagnosis of *Pneumocystis carinii*. *Natl Cancer Inst Monogr* 43:157-161, 1976
30. Domino J, Waskal HW: Wright's stain in rapid diagnosis of *Pneumocystis carinii*. *Am J Clin Pathol* 81:511-514, 1984
31. Vavre J, Kucera K: *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J Protozool* 17:463-483, 1970
32. Gori S, Paladini A, Paoletti P, Del Bono L, Scasso A: Laboratory diagnosis of *Pneumocystis carinii*: comparison of cytological, immunofluorescent and immunocytochemical staining. *Pathologica* 84:225-233, 1992
33. Wehle K, Blanke M, Koenig G, Pfitzer P: The cytological diagnosis of *Pneumocystis carinii* by fluorescence microscopy of Papanicolaou stained bronchoalveolar lavage specimens. *Cytopathology* 2:113-120, 1991
34. Mattia AR, Waldron MA, Sierra LS: Use of the UV ParaLens adapter as an alternative to conventional fluorescence microscopy for detection of *Pneumocystis carinii* in direct immunofluorescent monoclonal antibody-stained pulmonary specimens.

J Clin Microbiol 31:720-721, 1993

35. Amagai T, Matsumoto Y, Sakai Y, Roux P, Girard PM: A common antigenic epitope expressed on human *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 38:169S-171S, 1991
36. Elvin K, Linder E: Application and staining patterns of commercial anti-*Pneumocystis carinii* monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 31:2222-2224, 1993
37. Tanabe K, Fuchimoto M, Egawa K, Nakamura Y: Use of *Pneumocystis carinii* genomic DNA clones for DNA hybridization analysis of infected human lungs. *J Infect Dis* 157:593-596, 1988
38. Kitada K, Oka S, Kohjin T, Kimura S, Nakamura Y, Shimada K: *Pneumocystis carinii* pneumonia monitored by *P. carinii* shedding in sputum by the polymerase chain reaction. *Intern Med* 32:370-373, 1993