

รายงานผู้ป่วย

นิวโมเนียจากเชื้อ *Pneumocystis carinii* : รายงาน
ผู้ป่วยรายแรกที่พบเชื้อระยะ cyst แบบต่างๆ

วิไล ศักดิ์ศิริสัมพันธ์*
ชาตรี จินตนาวงศ์*

Saksirisampant W, Chintanawonges C. *Pneumocystis carinii* pneumonia : The first case report of different cyst forms. Chula Med J 1987 Aug; 31 (8) : 635-644

Pneumocystis pneumonia developing in a patient who was definitely diagnosed to have acquired immune deficiency disease is described. The microscopic features of the organism showed different forms of cystic stages. These were the typical round shaped intracystic bodies (sporozoites) and the atypical water-droplet shape, spindle-shape, amoeboid-shape and banana-like. The extra-cellular or the liberated sporozoites could also be seen in these Giemsa stained slides.

Reprint requests : Saksirisampant W. Department of Parasitology, Faculty of Medicine,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publications. Jan 5, 1987.

Pneumocystis carinii เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ตัวหนึ่ง ก่อให้เกิดปอดอักเสบชนิด pneumocystis pneumonia หรือ interstitial plasma cell pneumonia⁽¹⁾ โดยเชื้อจะเจริญซ้ำเติมในปอดของผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องทั้งที่เป็นโดยกำเนิด (congenitally immunodeficient) และที่ป่วยด้วยอาการของโรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันของร่างกายเสียไปหลังกำเนิด (acquired immune deficiency syndromes) ตลอดจนจนผู้ป่วยที่รับการรักษาโรคด้วยยากดภูมิคุ้มกัน^(2,3,4)

เชื้อชนิดนี้รู้จักกันตั้งแต่ปี 1938 การกระจายของเชื้อพบได้ทุกแห่งทั่วโลก แต่ความรู้ด้านชีววิทยา วงชีพ และการติดต่อของโรคยังเป็นที่สงสัยอยู่ แม้แต่การจัดจำแนกชนิดของเชื้อตัวนี้ก็ยังไม่ลงตัว นักวิทยาศาสตร์บางกลุ่มยอมรับเป็นโปรโตซัว⁽⁵⁾ บางกลุ่มจัดเป็นยีสต์⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตามนักปรสิตวิทยามีความคุ้นเคยกับรูปร่างระยะซิส (cyst) ของเชื้อซิสที่มีขนาด 5-7 ไมครอน ภายในมี 1-8 sporozoites ระยะนี้ใช้เป็นระยะวินิจฉัยการติดเชื้อ คือ เมื่อย้อมสีชนิด Giemsa's จะพบผนังซิสหนา ภายในมี sporozoite หรือ intracystic body ลักษณะกลมติดสีม่วง ส่วน cytoplasm ติดสีฟ้า⁽⁷⁾

ปัจจุบันมีผู้ศึกษาเชื้อตัวนี้จากปอดหนูทดลองที่รับการฉีดสารกดภาวะภูมิคุ้มกัน จากวิธีนี้มีรายงานพบรูปร่างลักษณะของเชื้อหลายระยะและคาดคะเนวงชีพไว้หลายแนวทาง⁽⁸⁻¹³⁾ เช่น คณะของ Yoshida⁽⁹⁾ พบว่าภายในได้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อมี 3 ระยะ คือ trophozoite รูปทรงอะมีบอยด์ จะเจริญเป็น precyst รูปทรงกลมโต จากนั้นนิวเคลียสภายใน precyst จะแบ่งตัวได้ intracystic body โดยมีจำนวนมากที่สุด 8 ตัว จากนั้น intracystic body ภายในซิสแก่ จะเคลื่อนตัวเป็นอิสระออกจากผนังนิวเคลียสและเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากทรงกลม (spherical) เป็นทรงกล้วยหอม (banana-liked) เมื่อ intracystic body พร้อมทั้งจะแตกหรือทะเลจากซิสจะมี ฟิโลโปเดีย (filopodia) ยื่นออกจาก intracystic body นั้น ๆ เมื่อแตกมานอกซิสแล้วจะเจริญเป็น trophozoite ต่อไป ส่วนซิสที่เหลือจะว่างเปล่า

ภายในได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Takeuchi⁽¹⁰⁾ รายงานว่าเชื้อจากปอดหนูทดลอง พบ trophozoite 2 รูปทรงคือ กลมและอะมีบอยด์ ขนาด 2 และ 6 ไมครอน ตามลำดับ ส่วน precyst รูปทรงไข่ไก่ ขนาด 4-5 ไมครอน เมื่อเจริญเป็นซิสจะมี intracystic body ขนาด 1-2 ไมครอน

ซึ่งมีรูปทรงแบบต่าง ๆ 3 แบบ คือ

1. แบบกลม (round-shaped), มี 3 ชนิด คือ ชนิดผนังหุ้มชั้นเดียว, ชนิดหุ้ม 2 ชั้นไม่หนา และชนิดหุ้ม 2 ชั้น หนามาก
2. แบบอะมีบอยด์ (amoeboid-shaped)
3. แบบทรงกล้วยหอม (banana-liked)

ส่วนซิสว่างเปล่า (collapsed empty cyst) มีรูปทรงคล้ายถ้วย (cup-shaped) และบางอันหดตัวมากจนมีรูปทรงคล้ายเสี้ยวพระจันทร์ (crescent-shaped)

รายงานเชื้อตัวนี้จากผู้ป่วยมีอยู่มาก แต่ที่ตรวจพบระยะต่าง ๆ มากที่สุดนั้นเป็นรายงานของ Campbell และ Atlanta โดยพบว่ามียาระยะเหล่านี้คือ⁽¹²⁾

1. trophozoite รูปทรงกลมและทรงอะมีบอยด์
2. precyst
3. cyst ภายในมี intracystic body ทรงกลม
4. collapsed empty cyst

อย่างไรก็ตาม intracystic body รูปทรงแบบต่าง ๆ ที่พบได้ในหนูทดลองยังไม่เคยมีรายงานจากปอดผู้ป่วยไม่ว่าจะตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา หรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ดังนั้นรายงานผู้ป่วยรายนี้จึงเป็นรายแรกที่ตรวจพบ intracystic body รูปทรงแบบต่าง ๆ หลายแบบ รวมทั้งพบระยะ trophozoite และซิสว่างเปล่าจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

รายงานผู้ป่วย

ผู้ป่วยชาย ชาวอเมริกัน อายุ 30 ปี เข้ารับการรักษาในภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ รพ.จุฬาลงกรณ์ ระหว่างวันที่ 25 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่ 2 มีนาคม 2528 ผู้ป่วยรายนี้ได้รับการวินิจฉัยโดยสรุปว่า ป่วยด้วยอาการของโรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันบกพร่องหลังกำเนิด และเนื่องจากผู้ป่วยมีอาการของปอดอักเสบ ผลของเอ็กเรย์ปอด พบภาวะนิวโมเนียที่ตอนล่างทั้งสองข้างของปอด ดังนั้นจึงมีการตัดชิ้นเนื้อปอด (biopsy) และทำ impressive smear ส่งมาที่ภาควิชาปรสิตวิทยาเพื่อการวินิจฉัย

ผลการตรวจ

ชิ้นเนื้อปอดที่ทำ impressive smear แล้ว เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa's ภายในได้กล้องจุลทรรศน์ พบเชื้อ *Pneumocystis carinii* ในอัตราสูงมากคือ พบระยะซิส พบซิสว่างเปล่า และพบระยะนอกซิส หรือที่เรียก trophozoite

โดยเฉลี่ยประมาณ $\frac{1}{2}$ ซีส, $\frac{1}{10}$ ซีส และ 5-10 ตัวต่อฟิล์ม
ของกำลังขยาย 1,000 เท่า ตามลำดับ

ระยะซีสพบมีขนาด 5-6 ไมครอน ภายในมี intracystic body ตั้งแต่ 1-8 ตัว ขนาด 1-2 ไมครอน ติดสีน้ำเงินม่วง ในขณะที่ cytoplasm ติดสีฟ้า ผันซีสหนาไม่ติดสี แต่มีขอบเขตเห็นได้ชัดเจน ลักษณะที่น่าสนใจมากคือ รูปทรงของ intracystic body มีได้หลายแบบนอกเหนือจากรูปทรงกลมที่นักปราชญ์ศึกษาค้นเคยกัน กล่าวคือมีความแตกต่างกันชัดเจนถึง 5 แบบได้แก่

1. ทรงกลม (round-shaped, Fig. 1)
2. ทรงหยดน้ำ (water-droplet-shaped, Fig. 2)
3. ทรงกระสวย (spindle-shaped, Fig. 3)
4. ทรงกล้วยหอม (banana-like or slender-crescent shaped, Fig. 4)
5. ทรงอะมีบอยด์ (amoeboid or irregular-

shaped, Fig. 5)

intracystic body เหล่านี้ยังพบว่าอยู่ปนกันภายในซีสเดียวกันได้ เช่น ทรงกลมปนกับทรงหยดน้ำ และทรงอะมีบอยด์ (Fig. 6a) ทรงหยดน้ำ ปนกับทรงอะมีบอยด์ (Fig. 6b) ทรงหยดน้ำปนกับทรงกระสวยและทรงกล้วยหอม (Fig. 7)

สำหรับซีสที่ไม่มี intracystic body ที่พบ มีลักษณะเป็นรูปทรงคล้ายกล้วย ขนาดประมาณ 5-6 ไมครอน ติดสีฟ้า ผันซีสหนาไม่ติดสี แต่เห็นส่วนโค้งของผนังชัดเจน (Fig. 8) ลักษณะนี้มีผู้พบบ่อย⁽⁸⁻¹⁵⁾ ซึ่งเกิดจาก intracystic body แตกหลุดจากซีสแก่ ทำให้เกิดเป็นซีสว่างเปล่าที่หอดตัว

ส่วน trophozoite หรือระยะที่อยู่เป็นอิสระนอกซีสพบมีขนาด รูปทรงต่างๆ เหมือนกับ intracystic body แต่ผนังหนาพอควรไม่ติดสี (Fig. 9) ซึ่งคงเป็น intracystic body ที่เพิ่งแตกตัวออกจากซีสแก่

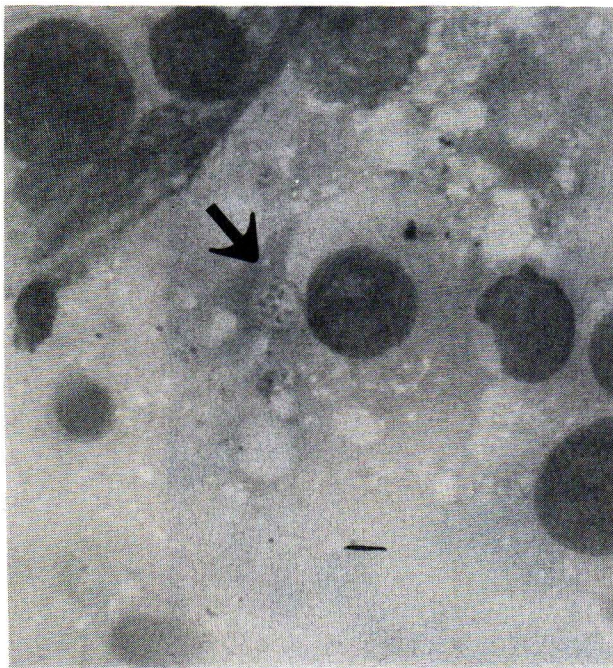


Fig. 1



Fig. 2

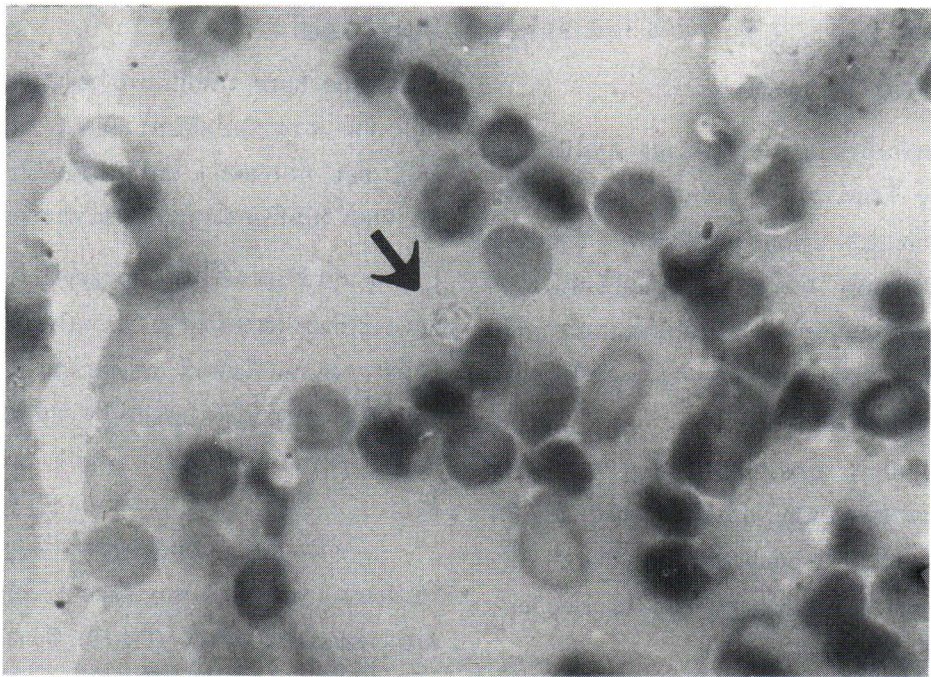


Fig. 3

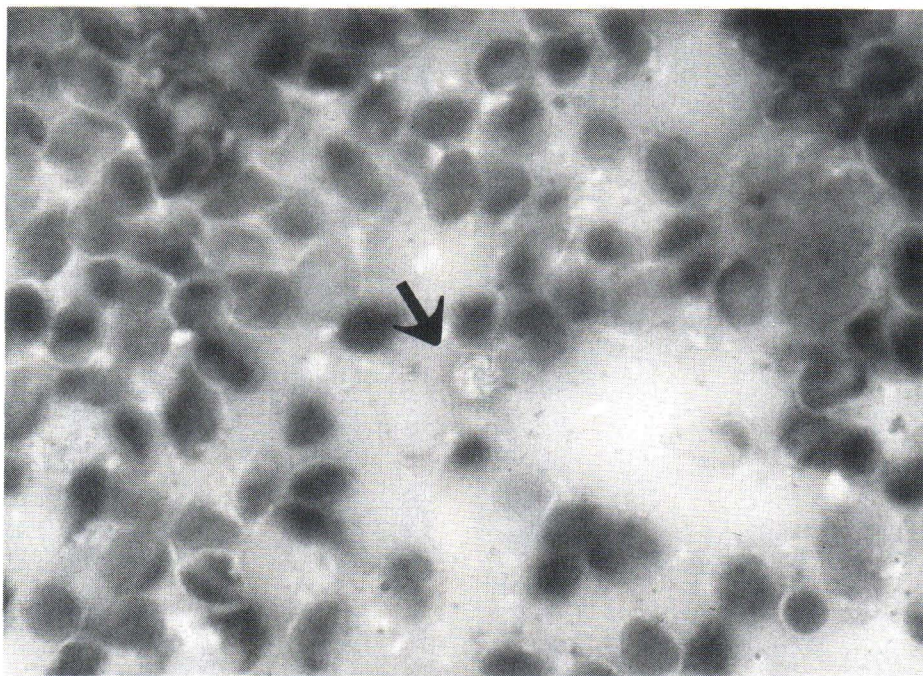


Fig. 4

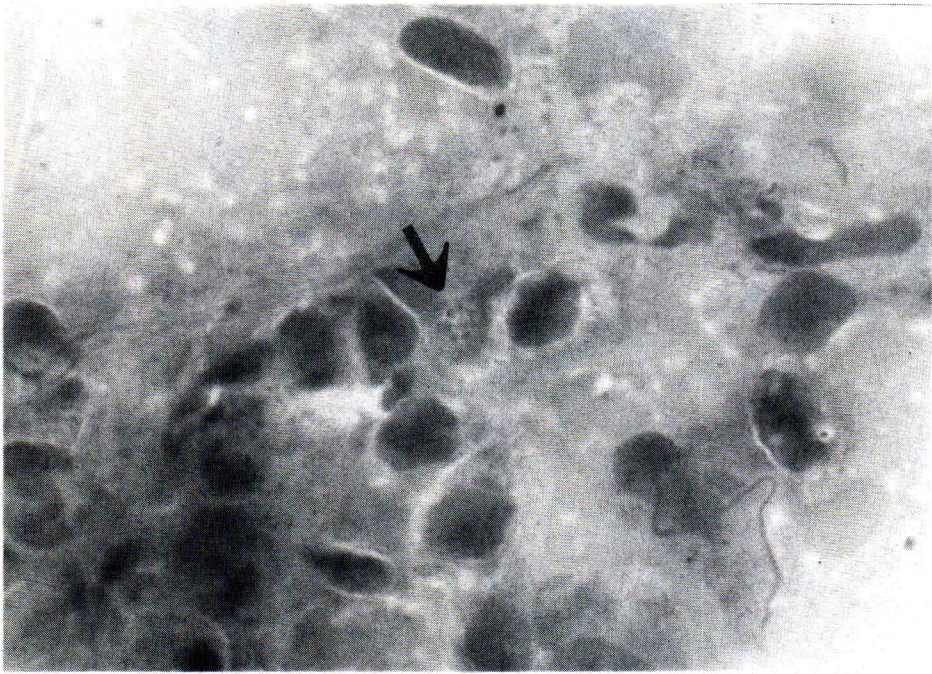


Fig. 5

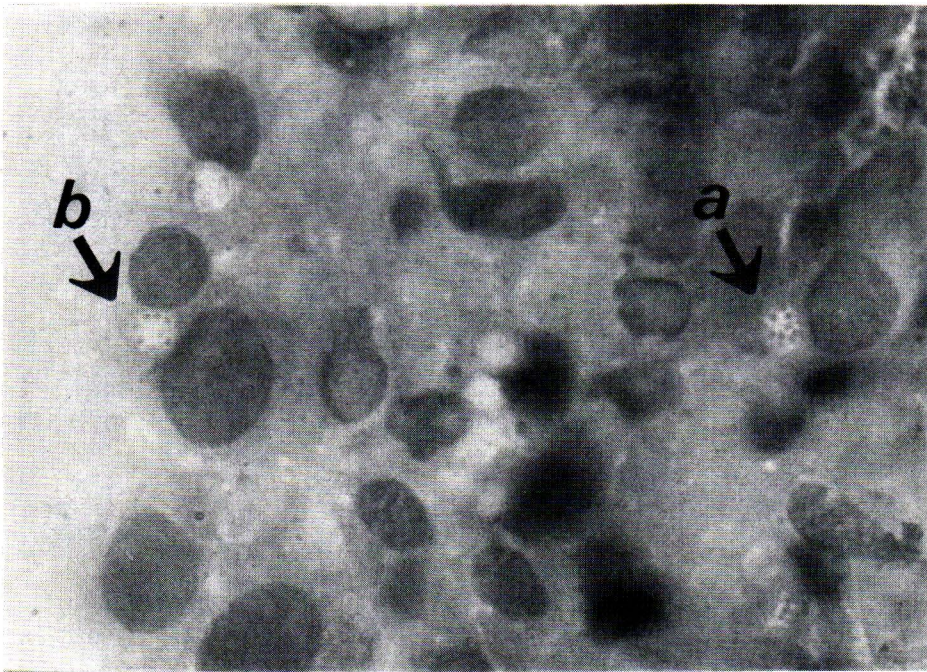


Fig. 6

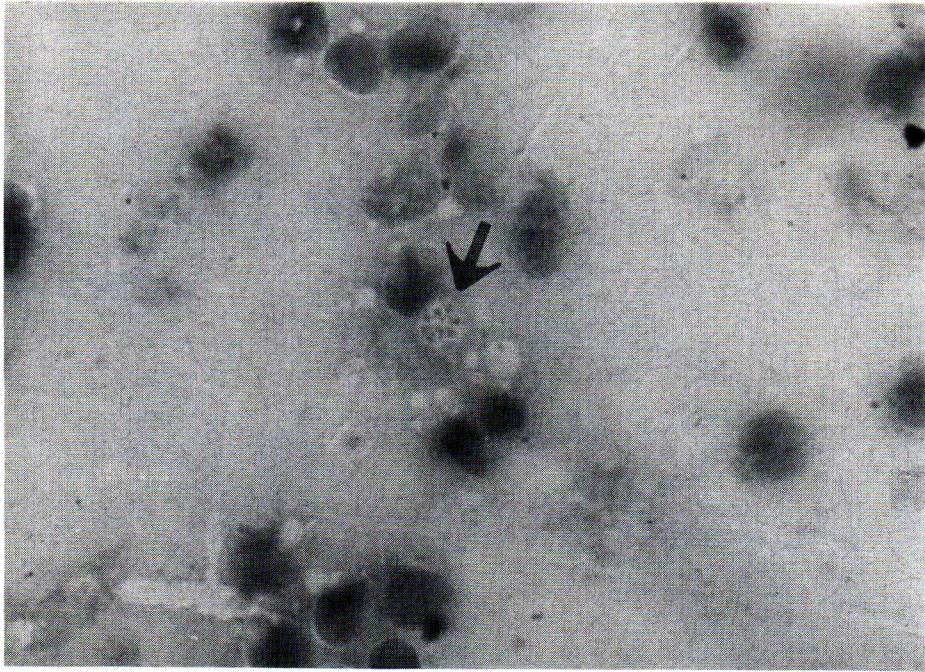


Fig. 7

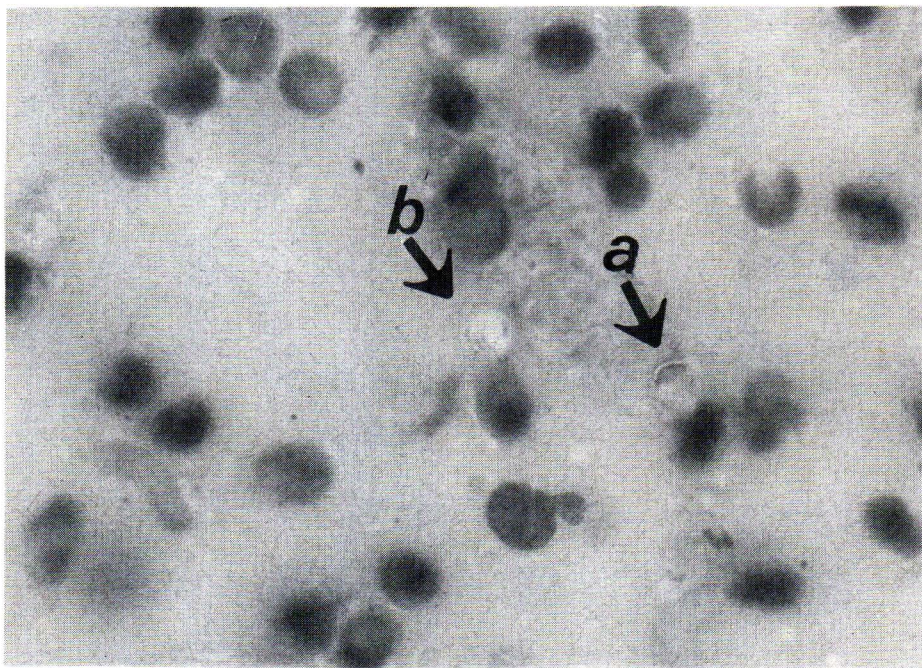


Fig. 8

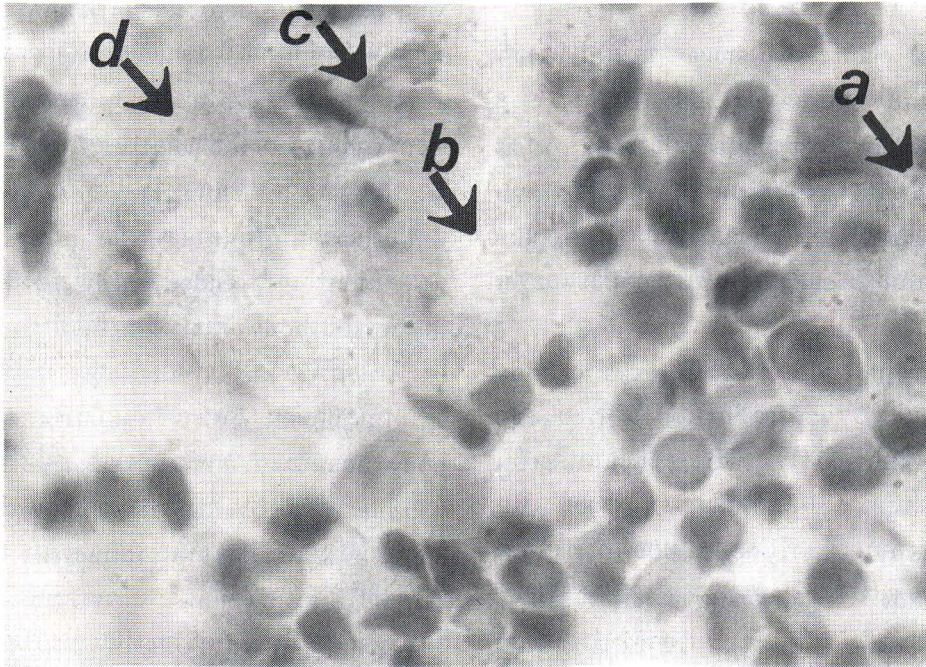


Fig. 9

Figure 1-9 *Pneumocystis carinii* stained by Giemsa'; $\times 1000$.

Figure 1-5 Mature cysts with different forms of intracystic bodies; round shaped (1), water-droplet shaped (2), spindle shaped (3), banana-like (4) and amoeboid shaped (5) respectively.

Figure 6 (a) Different shapes of sporozoites ; round, water-droplet and amoeboid ; reside in the same mature cyst.

(b) Different shaped of sporozoites ; water-droplet and amoeboid ; reside in the same mature cyst.

Figure 7 Different shapes of sporozoites ; water-droplet, spindle and banana ; reside in the same mature cyst.

Figure 8 (a) Collapsed-empty cyst

(b) Mature cyst with four banana-like sporozoites.

Figure 9 Extra-cellular stage or trophozoite with different shapes.

(a) water-droplet-shaped

(b) spindle-shaped

(c) banana-like

(d) round-shaped

วิจารณ์

จากสไลด์ impressive smear ของผู้ป่วยรายนี้ นอกจากพบซิสแท่งที่มี intracystic body ทรงกลม 1-8 อันอย่างทีคั่นแคยกัน ยังตรวจพบ intracystic body รูปทรงอื่น ๆ ซึ่งไม่เคยมีรายงานพบจากปอดผู้ป่วย เพียงแต่มีรายงานพบจากปอดหนูทดลอง^(6,9-11,13) ส่วนการพบระยะ trophozoite และซิสว่างเปล่า เคยมีรายงานพบจากผู้ป่วยและหนูทดลองมาแล้ว⁽⁸⁻¹⁷⁾

ระยะ trophozoite เป็น intracystic body ที่แตกหลุดจากซิสแท่ง⁽¹³⁾ จะด้วยวิธีการใดยังไม่ทราบแน่ชัด และจะคงรูปทรงเดิมขนาดเท่าใด หรือจะเปลี่ยนแปลงเป็นรูปทรงอื่นแบบใดไม่ปรากฏผลที่ชัดเจน แต่มีผู้รายงานพบระยะนี้เป็นรูปทรงกลม ทรงรีและอะมีบอยด์ทั้งที่ได้จากผู้ป่วยและสัตว์ทดลอง⁽⁸⁻¹⁷⁾ สำหรับผู้ป่วยรายนี้ตรวจไม่พบรูปทรงอะมีบอยด์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการบ่งชี้ว่าเป็นรูปทรงเช่นนี้ในกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา นั้นยากกว่ารายที่พบในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ส่วน trophozoite รูปทรงอื่น ๆ ในผู้ป่วยรายนี้ เช่นหยดน้ำ กระสวย กล้วยหอม (Fig. 9) แม้จะไม่เคยมีรายงานแต่ก็นับว่าสัมพันธ์กับรูปทรงของ intracystic body ที่พบในซิสแท่ง (Fig. 1-7) แต่อย่างไรก็ตาม Vavra และ⁽¹³⁾ Kucera ได้คาดคะเนไว้ว่าควรจะตรวจพบ trophozoite รูปทรงเช่นนี้ในปอดหนูทดลองของเขา ทั้ง ๆ ที่ปรากฏรูปทรงเหล่านี้กับ intracystic body ชัดเจน โดยวิจารณ์ว่าอาจเป็นผลของน้ำยาที่ใช้ในขั้นตอนการส่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้รูปทรงแปรเปลี่ยนเป็นอะมีบอยด์หมด หรือมีอะมีบอยด์นั้นเกิดจากรูปทรงเหล่านั้นเจริญเปลี่ยนไปเป็นอะมีบอยด์หมดแล้ว ส่วนซิสแท่งที่เหลือว่างเปล่าหลังจากที่ intracystic body แตกหลุดออกไป มักจะหดตัวเป็นรูปถ้วย หรือรูปทรงเสี้ยวพระจันทร์ ซึ่งพบตรงกับรายงานของผู้อื่น⁽⁸⁻¹⁵⁾

ส่วนการพบ intracystic body มีหลายรูปทรงในรายงานฉบับนี้อาจเป็นเพราะสาเหตุเหล่านี้ :

1. เป็นการเปลี่ยนแปลงตามระยะการเติบโตของเชื้อ (growth-development)
 2. เป็นผลจากความแตกต่างของสายพันธุ์ (strains) หรือชนิด (species) ของเชื้อ
 3. เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะโดยธรรมชาติ
- โดยสาเหตุใดสาเหตุหนึ่ง หรือทั้งหมด เกิดร่วมกับสภาพของผู้ป่วยรายนี้ที่ติดเชื้อในอัตราสูงอย่างเรื้อรัง (chronic

with heavy infection) และมีภาวะบกพร่องของภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cell-mediated immune responses) อย่างรุนแรง

การเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงของเชื่อนั้นยังไม่เคยมีผลการทดลองใดที่จะช่วยสรุปได้เพียงแต่มีผู้คาดคะเนหรือตั้งสมมุติฐานไว้หลายแนวทาง แต่คล้ายคลึงกัน^(5,9-13) ในทำนองเดียวกันผู้เขียนคาดว่า เมื่อ precyst เจริญเป็นซิสแท่งนั้น จะมีขบวนการ endodyogeny ของนิวเคลียสเกิดเป็น intracystic body ภายในซิส โดยมียูปร่างเป็นทรงกลมก่อน เมื่อภาวะแวดล้อมเหมาะสมเช่น โสสท์มีความบกพร่องในระบบภูมิคุ้มกัน ซิสบางซิสจะมีการแตกให้ intracystic body ออกมาภายนอกพร้อมที่จะเจริญต่อไปเป็นระยะ trophozoite ตามที่ตรวจพบระยะนอกซิสรูปทรงกลม (Fig. 9) ได้ ส่วนซิสอื่นที่ไม่แตกนั้น intracystic body ภายในจะเจริญต่อไปเป็นทรงหยดน้ำ แล้วเจริญเป็นทรงกระสวยต่อไปตามลำดับ และคาดว่าจะเปลี่ยนแปลงต่อไปได้อีกเป็นทรงกล้วยหอม ทั้งนี้พบว่าในซิสเดียวกันมีรูปทรงของ intracystic body หลายแบบอยู่ปนกัน อย่างไรก็ตาม intracystic body ไม่ว่าจะป็นรูปทรงใดก็คงจะแตกออกนอกซิส เพื่อเจริญต่อไปเป็น trophozoite เป็น precyst และเป็น mature cyst ต่อไปตามลำดับได้

ส่วน intracystic body รูปทรงอะมีบอยด์ในผู้ป่วยรายนี้ เคยมีรายงานพบจากปอดหนูทดลองอยู่เสมอ ผู้เขียนเชื่อตรงกับ Takeuchi⁽¹⁰⁾ ว่าอะมีบอยด์นี้เป็น intracystic body ของซิสบางซิสที่เจริญรุดหน้าไปเป็น trophozoite ก่อนที่จะแตกออกนอกซิส ซึ่งมักเกิดกับโอสท์ที่มีอัตราการติดเชื้อสูง และภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องมาก แต่คณะของ Yoshida⁽⁹⁾ อธิบายว่าเป็นทรงกลมที่ยื่น filopodia ออกมาหลายทิศทางสำหรับเคลื่อนที่ไปมาภายในหรือเพื่อที่จะแตกหรือทะลุออกนอกซิส

รูปทรงของ intracystic body จะมีการเปลี่ยนแปลงย้อนกลับไปมาได้หรือไม่ยังไม่มีการบอกแน่ชัดได้ Takeuchi เชื่อว่ารูปทรงกล้วยหอมในปอดหนูของเขาเป็น degenerative form แล้ว⁽¹⁰⁾ แต่มีรายงานบางฉบับชี้ว่าเป็น resistant stage⁽¹³⁾ อย่างไรก็ตามก็ดียังบอกไม่ได้เช่นเดียวกันว่าผู้ป่วยรายนี้จะติดเชื้อได้มากกว่า 1 สายพันธุ์หรือมากกว่า 1 ชนิดหรือไม่ ทั้งนี้มีรายงานว่าเชื้อในผู้ป่วยมักเป็น *P. jiroveci* ในขณะที่เชื้อที่มักเกิดกับปอดหนูเป็น *P. carinii*^(14,15) ปัญหาเช่นนี้อาจสรุปได้ ถ้ามีการใช้วิธีการทางน้ำเหลืองวิทยา และอาศัย monoclonal antibody แต่ทั้งนี้ความสำเร็จของการแยกเชื้อ

ไปเพาะเลี้ยงใน cell line ยังไม่ก้าวหน้านัก^(18,19) ซึ่งการศึกษาทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่เหมาะสม คงชี้แนวของวงชีพ รูปร่างลักษณะของเชื้อตลอดจนหาข้อสรุปของปัญหาต่างๆ ได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้รายงานขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์

ประพันธ์ ภาณุภาค แพทย์ผู้ส่งตรวจวินิจฉัยเชื้อ มาที่ภาค
วิชา ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสัย กรี-
วิเชียร หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา ที่กรุณาให้การสนับสนุน
ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วราณี สุขศรี ที่กรุณา
ชี้แนะและให้คำปรึกษา

ลำดับสุดท้ายขอขอบคุณเป็นพิเศษต่อคุณมาลี
เจริญกรและเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยห้องปฏิบัติการ routine
ของภาควิชาปรสิตวิทยา

อ้างอิง

1. Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, Rawson PG, Schultz MG. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic and clinical features. *Ann Intern Med* 1974 Jan; 80(1) : 83-93
2. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onozato I, Stouwe RA, Holzman RS. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia : initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 1981 Dec 10; 305(24) : 1431-1438
3. Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, Woods D. *Pneumocystis carinii* infection : evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics* 1978 Jan; 61(1) : 35-41
4. Fauci AS, Macher AM, Longo DL, Lane RC, Rock AH, Masur H, Gelmann EP. Acquired immunodeficiency syndrome : epidemiologic, clinical, immunologic and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* 1984 Jan; 100(1) : 92-106
5. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. Coccidia, Microsporidia and *Pneumocystis*. In Beaver PC, Jung RC, Cupp EW, eds. *Clinical Parasitology*. 9th ed. Philadelphia : Lea and Febiger, 1984. 149-173
6. Matsumoto Y, Yoshida Y. Sporogony in *Pneumocystis carinii* : Synapto nemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J Protozool* 1984; 31(3) : 420-428
7. Pintozzi RL, Blecka LJ, Nanos S. The morphologic identification of *Pneumocystis carinii*. *Acta Cytologica* 1979 Jan-Feb; 23(1) : 35-39
8. Hasleton PS, Curry A, Rankin EM. *Pneumocystis carinii* pneumonia : a light microscopic and ultrastructural study. *J Clin Pathol* 1981 Oct; 34(10) : 1138-1146
9. Yoshida Y, Shiota T, Yamada M, Matsumoto Y. Further light microscopic studies on morphology and development of *Pneumocystis carinii*. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig* 1981; A250 : 213-218
10. Takeuchi S. Electronmicroscopic observation of *Pneumocystis carinii*. *Jap J Parasit* 1980; 29(6) : 427-453
11. Hasleton PS, Curry A. *Pneumocystis carinii* : the continuing enigma. *Thorax* 1982 Jul; 37(7) : 481-485
12. Campbell WG. Ultrastructure of *Pneumocystis carinii* in human lung. *Arch Pathol* 1972 Apr; 93(4) : 312-324
13. Vavra J, Kucera K. *Pneumocystis carinii* Delanoi, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J Protozool* 1970; 17(3) : 463-483
14. Walzer PD, Rutledge ME. Comparison of rat, mouse and human *Pneumocystis carinii* by immunofluorescence. *J Infect Dis* 1980 Sep; 142(3) : 449
15. Frenkel JK. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man : morphology, physiology and immunology in relation to pathology. NCI monograph No 43, publication NO. (NIH) 76-930, U.S. Department of Health Education, and Welfare, U.S. Government Printing Office, Washington D.C. 1976. 13-27
16. Henshaw NG, Carson JL, Collier AM. Ultrastructural observations of *Pneumocystis carinii* attachment to rat lung. *J Infect Dis* 1985 Jan; 151(1) : 181-186
17. Yoshida Y, Matsumoto Y, Yamada M, Okabayashi K, Yoshikawa H, Nakazawa M. *Pneumocystis carinii* : electron microscopic investigation on the interaction of trophozoite and alveolar lining cell. *Zbl Bakt Hyg* 1984; A256 : 390-399

18. Pifer LA, Woods D, Hughes WT. Propagation of *Pneumocystis carinii* in Vero cell culture. *Infect Immun* 1978 Apr; 20(1) : 66-68
19. Cushion MT, Walzer PD. Growth and serial passage of *Pneumocystis carinii* in the A549 cell line. *Infect Immun* 1984 May; 44(2) : 245-251