

Dôkaz DNA *Pneumocystis jirovecii* versus mikroskopický dôkaz pri vyšetreniach pneumocystózy u pacientov zo Slovenska v rokoch 2001 – 2019

Vojtech Boldiš¹, František Ondriska^{1,2}, Michaela Čerňancová², Ľubor Kováč³, Jakub Steinhübel¹, Marcela Bastlová¹

¹Medirex Group, a. s., úsek parazitológie, Bratislava

²Trnavská univerzita, Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, Trnava

³Medirex Group, a. s., úsek virológie, sérológie a molekulovej biológie infekčných ochorení, Bratislava

Pneumocystis jirovecii patril v minulosti do ríše Protozoa, ale aktuálne je už taxonomicky zaradený do ríše Fungi. *Pneumocystis* bývajú obvykle detegované v pľúcach zdravých ľudí, ale pri imunosuprimovaných jedincoch ide o oportúnny patogén zodpovedný za pneumocystovú pneumóniu, respektíve pneumocystózu. Cieľom práce bolo zistiť a vyhodnotiť spoľahlivosť metód laboratórnej diagnostiky pneumocystózy aj výskyt tohto ochorenia u pacientov zo Slovenska počas 19 rokov. Diagnostika spočíva v mikroskopickom dôkaze mikroorganizmu v bronchoalveolárnej laváži a v spúte za použitia farbenia podľa Giemsa a Grama a Weigerta. Z metód molekulárnej biológie sme aplikovali klasickú a real-time PCR. Z celého súboru pacientov sme *pneumocystis* detegovali u 190 osôb (5,7 %). Onkologickí pacienti predstavovali najrizikovejšiu skupinu z hľadiska infekcie *pneumocystami*, čo sme potvrdili ich najvyšším podielom (57,9 %) z jedincov s pneumocystózou. Na základe binárneho klasifikačného testu sme vyhodnotili 33,7 % citlivosť a 100 % špecifickosť mikroskopického dôkazu v porovnaní s PCR. Molekulárne metódy sú v detekcii *Pneumocystis jirovecii* citlivejšie v porovnaní s mikroskopickým dôkazom a v súčasnosti predstavujú spoľahlivý detekčný systém v diagnostike pneumocystózy.

Kľúčové slová: *Pneumocystis jirovecii*, pneumocystóza, mikroskopický dôkaz, polymerázová reťazová reakcia (PCR)

The DNA evidence of *Pneumocystis jirovecii* versus microscopic evidence in Slovak patients examined for pneumocystosis during the years 2001 – 2019

In the past, *Pneumocystis jirovecii* belonged to the Protozoa group, but is currently taxonomically included in the kingdom Fungi. *P. jirovecii* is an opportunistic pathogen, responsible for pneumocystis pneumonia with frequent complications of immunocompromised patients. Delayed initiation of appropriate therapy increases the risk of death in immunocompromised patient. The aim of this work was to determine and evaluate the reliability of methods of laboratory diagnosis of pneumocystosis as well as the occurrence of this disease in patients from Slovakia during 19 years. The diagnosis is based on microscopic examination (Giemsa- and Gram-Weigert-staining) and detection of parasite DNA by classical or real-time PCR in bronchoalveolar lavage and sputum. We detected pneumocystis in 190 persons (5.7 %) from the whole group of patients. Cancer patients represented the riskiest group in terms of pneumocystosis, which was confirmed by the highest percentage (57.9 %) of individuals infected with *P. jirovecii*. We used a binary classification test for statistical evaluation and confirmed 33.7 % sensitivity and 100 % specificity of microscopy compared to PCR. Molecular methods are more sensitive in the detection of *Pneumocystis jirovecii* compared to microscopic evidence and currently represent a reliable detection system in the diagnosis of pneumocystosis.

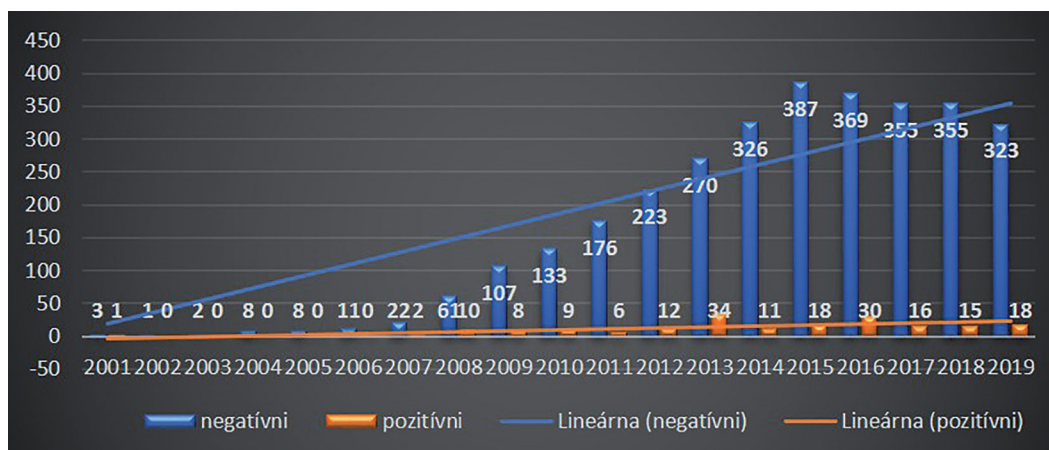
Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, pneumocystosis, microscopic evidence, polymerase chain reaction (PCR)

NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 64 – 68

Úvod

Pneumocystis jirovecii je oportúnny mikroorganizmus, ktorý bol v minulosti označovaný ako *Pneumocystis carinii*. Táto atypická huba spôsobuje u ľudí závažnú infekciu nazývanú pneumocystovú pneumóniu⁽¹⁾. Najčastejšie postihuje ľudí s oslabeným imunitným systémom a v niektorých prípadoch môže vážne ohroziť život. Medzi rizikových pacientov patria osoby s rôznymi chorobnými stavmi, ako sú nádorové ochorenia, HIV infekcia, transplantácie orgánov či užívanie imunosupresívnej terapie a liekov. Pacienti s pneu-

mocystózou klinicky vykazujú symptómy horúčky, kašľa, dýchavičnosti a v závažných prípadoch môže dôjsť k zlyhaniu dýchacích orgánov až smrti. Primárne sa *Pneumocystis* prenáša z človeka na človeka vzdušnou cestou, boli však opísané aj ďalšie spôsoby prenosu. Takisto sa môže šíriť prostredníctvom asymptomatických nosičov, teda ľudí s normálnym imunitným systémom, ktorí sú kolonizovaní. Napriek statusu najbežnejšej a najvážnejšej oportúnnej respiračnej infekcie u pacientov s AIDS v súčasnosti incidencia ochorenia v populácii klesá v dôsledku zavedenia profylaxie a účinnej

Graf 1. Požiadavky na vyšetrenie *P. jirovecii*.

antiretrovirskej terapie⁽²⁾. Čoraz častejšie sa však pneumocystóza vyskytuje u HIV negatívnych pacientov liečených protinádorovými chemoterapeutikami a imunosupresívnou liečbou⁽³⁾.

Používaným štandardom v laboratórnej diagnostike pneumocystózy u pacientov so zníženou imunitou je detekcia *P. jirovecii* v bronchoalveolárnej laváži (BAL) a vo vzorkách indukovaného spúta prostredníctvom mikroskopického dôkazu⁽⁴⁾. Ide o mikroskopický dôkaz cýst alebo trofických foriem parazita v pľúcnom materiáli s použitím viacerých farbiacich techník⁽⁵⁾. Postupne však boli vyvinuté vysokocitlivé molekulárne metódy (PCR) detekcie *P. jirovecii* a konvenčné metódy diagnostiky sa stali menej spoľahlivými⁽⁶⁾. Ako minimálne invazívny spôsob diagnostiky pneumocystózy predstavujú sérologické metódy.

Vďaka vysokej účinnosti a dostupnosti perorálnych a parenterálnych foriem je liekom voľby trimetoprim-sulfametoxazol pri liečbe miernej až závažnej pneumocystózy u pacientov infikovaných HIV, ale aj u pacientov, ktorí nie sú infikovaní HIV⁽⁷⁾.

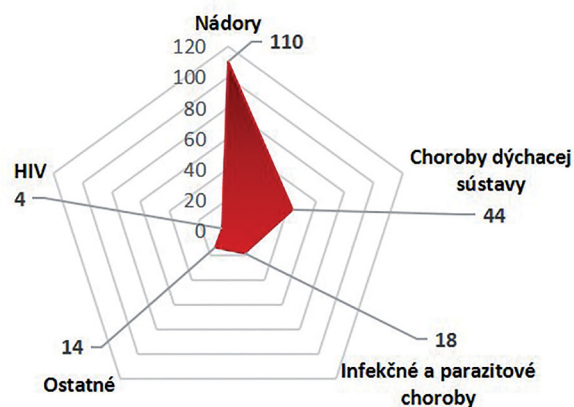
Materiál a metódy

Počas 19-ročného obdobia sme v rámci štúdie vyšetrili 3 330 pacientov pochádzajúcich z celého Slovenska pre podozrenie na infekciu spôsobenú *P. jirovecii*. Prevažne išlo o bronchoalveolárne laváže a spúta.

Pri mikroskopickom dôkaze sme použili farbenie podľa Giemsa na detekciu trofozoitov a Gramovo a Weigertovo farbenie na determinovanie cýst^(8,9). Na izoláciu DNA zo vzoriek sme použili komerčne dostupný DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Nemecko). Z metód molekulárnej biológie sme aplikovali klasickú polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) s použitím primerov pAZ102-E a pAZ102-H, ktoré amplifikujú časť génu veľkej podjednotky mitochondriálnej rRNA⁽¹⁰⁾. Pre real-time PCR sme použili komerčnú súpravu LightMix® Kit *Pneumocystis jirovecii*, kde ako cieľový fragment sa na amplifikáciu využila 244 bp sekvencia multikópiového MSG génu z *P. jirovecii*.

Výsledky boli analyzované štatistickým softvérom OpenEpi, verzia 3.03 (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) a na vyhodnotenie štatistických rozdielov bol použitý chí-kvadrátový test, kde hodnota $P < 0,05$ sa považovala

Graf 2. Pozitívni pacienti s pneumocystózou vzhľadom na ich diagnózu či ochorenie.



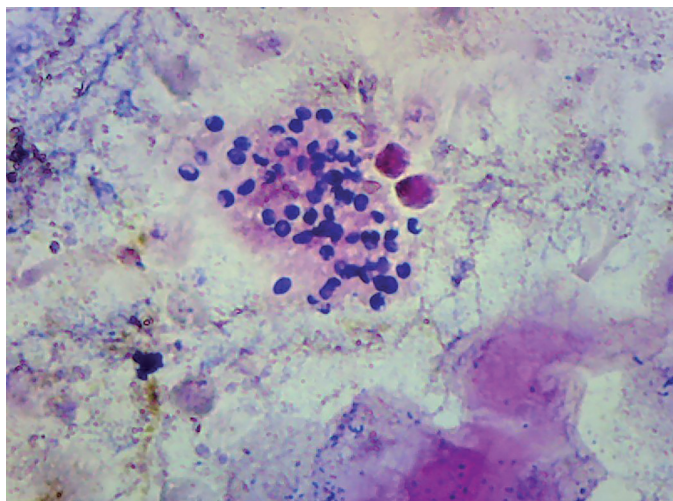
za významnú⁽¹¹⁾. Výpovedné hodnoty použitých testov sme vypočítali pomocou štatistického programu MedCalc (http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php).

Výsledky

Počas 19 rokov počet vyšetrení a detekcia *P. jirovecii* stúpa, čo je na grafe 1 vyznačené trendovými lineárnymi spojnicami. Najvyšší nárast vzoriek pozorujeme v rokoch 2008 až 2015, kde sa počet pacientov počas 8 rokov znásobil 6x ($387 : 61 = 6,35$). V nasledujúcich rokoch od roku 2016 je množstvo vyšetovaných pacientov relatívne stabilné v rozmedzí od 323 do 369.

Metódami PCR sme pneumocysty zachytili u 5,7 % (190/3 330) vyšetovaných pacientov, pričom mikroskopicky sme potvrdili mikroorganizmy u 1,9 % (64/3 330) prípadov. U 163 pacientov sme infekť dokázali v BAL, u 25 v spúte. Prítomnosť *P. jirovecii* sa potvrdila hlavne u imunokompromitovaných osôb s onkologickým ochorením 57,9 % (110/190), ale aj u pacientov s chorobami dýchacej sústavy 23,2 % (44/190), s infekčnými a parazitárnymi chorobami 9,4 % (18/190), s inými ochoreniami 7,4 % (14/190) a s HIV 2,1 % (4/190). Najcitlivejšími skupinami pacientov z hľadiska infekcie pneumocystami sú onkologickí jedinci a pacienti s chorobami dýchacej sústavy (graf 2).

Obrázok 1. Cysty *P. jirovecii* po farbení podľa Grama a Weigerta.



Obrázok 3. Rtg. nález v pľúcach pacienta s pneumocystózou (fotografia MUDr. M. Franeková).

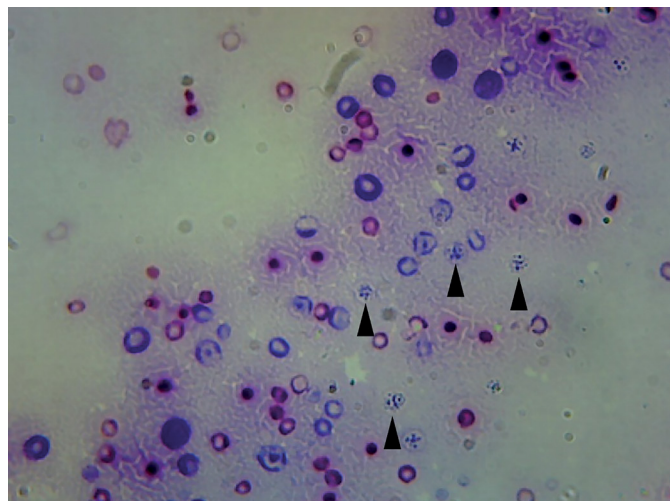


Z celého súboru sme v rokoch 2001 – 2012 vyšetrili 803 pacientov pomocou klasickej PCR, kde sa nám podarilo detegovať DNA *P. jirovecii* u 48 (6 %) pacientov a u 12 (1,5 %) z nich sme pneumocysty potvrdili aj mikroskopickým dôkazom. V rokoch 2013 – 2019 sme s využitím real-time PCR z 2 527 osôb detegovali DNA *P. jirovecii* u 142 (5,6 %) a u 52 (2,1 %) z nich sme pneumocysty potvrdili aj mikroskopicky. Na **obrázku 1** sú znázornené niektoré naše pozitívne preparáty cýst po farbení podľa Grama a Weigerta. Morfológia pneumocýst je nepravidelná, majú tvar „defektnej lopty“ a sú s veľkosťou od 4 do 8 μm . V cyste postupným delením vzniká 8 jednojadrových teliesok, tzv. intracystické telieska (**obrázok 2**).

S cieľom priblíženia klinickej manifestácie infekcie spôsobenej *P. jirovecii* u onkologického pacienta, kde sme v našom laboratóriu potvrdili etiologický agens, prikkladáme rtg. snímku s komplikovanou pneumocystovou infekciou s výrazným škvrnitým zatienením oboch pľúcnych krídiel (**obrázok 3**).

Štatisticky významné rozdiely pre pacientov s pneumocystózou sme potvrdili vzhľadom na vekovú skupinu, odobratý biologický materiál a stanovenú diagnózu. Najvyšší podiel

Obrázok 2. Intracystické telieska (zárodky trofozoitov) *P. jirovecii* po farbení podľa Giemsa.



infikovaných sme detegovali u dospelých jedincov vo veku od 21 do 40 rokov (9,7 %), ďalej nasledovali deti 0 – 10 rokov (6 %), starí ľudia nad 61 rokov (5,2 %), pacienti medzi 41. a 60. rokom života (4,8 %) a najmenej u 10- až 20-ročných osôb (1,6 %). Tieto rozdiely boli štatisticky významné ($p = 0,009$). Väčší podiel infikovaných pneumocystami tvorila skupina, v ktorej bol indikovaný odber spúta (9,8 %) ako v porovnaní s odberom BAL (5,4 %; $p = 0,029$). Signifikantné rozdiely v počtoch pacientov s pneumocystózou sme pozorovali aj v súvislosti s predikovanou diagnózou ($p = 0,02$). Najvyššie percento (12,5 %) pacientov s pneumocystózou tvorila skupina s diagnózou infekčných a parazitárnych chorôb. Druhú, najviac zastúpenú skupinu (5,8 %) infikovaných tvorili pacienti s diagnózou chorôb dýchacej sústavy, za ktorou nasledovali diagnózy ako ostatné (5,7 %), onkologické choroby (5,1 %), choroby krvi a krvotvorných orgánov s účasťou imunitných mechanizmov (3,7 %) a choroby obehovej sústavy (3,1 %). Žiadnu signifikantnú súvislosť sme nezistili medzi prítomnosťou pneumocystovej infekcie a pohlavím ($p > 0,05$).

Štatistické ukazovatele spoľahlivosti mikroskopického dôkazu *P. jirovecii* sme vyjadrili vzhľadom na PCR, ktorú sme považovali za zlatý štandard. Po prepočtoch nám vyšla 33,7 % citlivosť, 100 % špecifickosť, 100 % pozitívna predpovedaná hodnota a 96,1 % negatívna predpovedaná hodnota mikroskopie v porovnaní s PCR počas celého 19-ročného obdobia vyšetrovania.

Diskusia

Na Slovensku boli publikované iba 2 práce, ktoré dokumentovali výskyt či diagnostické možnosti laboratórnej diagnostiky *Pneumocystis jirovecii*^(12,13). Táto práca podáva komplexný prehľad o prítomnosti *P. jirovecii* u vyšetrovaných pacientov s pľúcnymi komplikáciami na Slovensku za obdobie 19 rokov a poskytuje možnosti laboratórnej diagnostiky v podmienkach rutinného laboratória.

Z celého súboru vyšetrovaných sme pneumocysty detegovali hlavne u osôb s onkologickým ochorením (najmä lymfatická leukémia). Sing et al.⁽¹⁴⁾ diagnostikovali pneumocysty najviac u jedincov s HIV (6 %), potom nasledovali onkologickí (1,8 %) a transplantovaní (1,5 %) pacienti. V našom súbore vyšetrovaných nebol taký veľký počet HIV osôb

(1,1 %; 36/3 330), aký mali Sing et al. (26,7 %; 89/334), preto sme mali oveľa nižšie percento HIV pacientov infikovaných pneumocystami. Ale najviac pozitívnych pacientov na *P. jirovecii* tvorili imunosuprimovaní (60 %), podobne ako v práci Singa et al. (94,3 %). Fillatre et al.⁽¹⁵⁾ sa takisto vo svojej štúdii zaoberali 293 prípadmi pneumocystózy. Z celkového súboru pacientov bolo 154 (52,6 %) prípadov HIV negatívnych. Ako najčastejšie poruchy rozvoja pneumocystózy identifikovali hematologické malignity (32,5 %), ďalej to boli solídne nádory (18,2 %), zápalové ochorenia (14,9 %), transplantácie solídnych orgánov (12,3 %) a vaskulitída (9,7 %). Štúdia Liu et al.⁽³⁾ potvrdila, že najbežnejšou príčinou PJP sú hematologické malignity (29,1 %) podobne ako v štúdii Fillatre et al.⁽¹⁵⁾. Nám približne rovnaké výsledky dokumentovali aj Kim et al.⁽⁴⁾, kde malígne ochorenia dosahovali až 68,7 %, a Gazonnes et al.⁽¹⁶⁾, ktorí detegovali PJP u pacientov s nádorovými ochoreniami (60 %). Abastabar et al.⁽¹⁷⁾ podobne ako my zistili, že prevalencia *P. jirovecii* sa líši podľa veku pacientov. V ich štúdii bol však častejší výskyt PJP u pacientov vo vekovom rozmedzí 71 – 80 rokov (> 80 %), respektíve vo veku 81 – 90 rokov (100 %). Nezistili žiadny významný rozdiel medzi mužmi a ženami, pokiaľ ide o prevalenciu tohto ochorenia, podobne ako v našej práci.

Vo väčšine prác vyšla podstatne vyššia citlivosť PCR v porovnaní so štandardnými cytologickými farbiacimi technikami pri vyšetrení BAL, indukovaného aj neindukovaného spúta⁽¹⁸⁻²²⁾. Wakefield et al.⁽²³⁾ uvádzajú 90 % citlivosť PCR v porovnaní s 35 % citlivosťou klasického mikroskopického farbenia. Lipschik et al.⁽²⁴⁾ uvádzajú 93 % citlivosť a Chouaid et al.⁽²²⁾ dokonca až 100 % citlivosť a špecifickosť PCR v BAL a indukovanom spúte. Podobne ako vo väčšine prác sme zistili podstatne nižšiu citlivosť mikroskopie v porovnaní s PCR metódou. Mikroskopicky sme mali 66,3 % vzoriek falošne negatívnych a touto metódou sme zachytili v masívnej väčšine cystické štádiá a v jednom prípade intracystické telieska pneumocýst.

Vzhľadom na zvyšujúci sa počet imunosuprimovaných jedincov je diagnostika *P. jirovecii* nevyhnutná. Potvrdili sme to aj v našej štúdii, kde počet vyšetrení a detekcia tohto oportúnneho patogénu počas rokov stúpa a v 190 prípadoch sa nám podarilo odhaliť kauzálny agens zodpovedný za vážne pľúcne komplikácie u imunokompromitovaných pacientov.

Podakovanie

Práca bola podporená projektom KEGA 013TTU-4/2019.

LITERATÚRA

- Center for Diseases Control and Prevention. 2020. Pneumocystis pneumonia. [online]. Georgia (Atlanta): U.S. Department of Health & Human Services.
- Truong, J., Ashurst, Jv. 2020. *Pneumocystis (Carinii) jirovecii* Pneumonia. In StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Liu, Y., Su, L., Jiang, S. J., Qu, H. 2017. Risk factors for mortality from *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in non-HIV patients: A meta-analysis. In *Oncotarget*, roč. 8, č. 35, s. 59729-59739.
- Kim, T.-O., Lee, J.-K., Kwon, Y.-S., Kim, Y.-I., Lim, S.-Ch., Kim, M.-S., Kho, B. G., Park, Ch.-K., Oh, I.-J., Kim, Y.-Ch., Park, H. Y., Shin, H.-J. 2021. Clinical characteristic and prognosis of patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia without a compromised illness. In *PLOS ONE*, roč. 16, č. 2, s. 1-12.
- Salzer, H. J. F., Chafer, G., Hoenigl, M., Gunther, G., Hoffmann, C., Kalsdorf, B., Alanio, A., Lange, C. 2018. Clinical, diagnostic, and treatment disparities between HIV-infected and non-HIV infected immunocompromised patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. In *Respiration*, roč. 96, č. 1, s. 1-14.
- Bateman, M., Oladele, R., Kolls, J. K. 2020. Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A review of current methods and novel approaches. In *Medical Mycology*, roč. 58, č. 8, s. 1015-1028.
- Tasaka, S. 2020. Recent advances in the diagnosis and management of *Pneumocystis* pneumonia. In *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, roč. 83, č. 2, s. 132-140.
- Giemsa, G. 1904. Eine vereinfachung und vervollkommnung meiner methylenazur methylenblau-eosin-färbemethode zur erzielung der romanowsky-nachtschen chromatin-färbung. In *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten der Tiere, I. Abteilung, originale*, roč. 37, s. 308-311.
- Garcia, L. S., Bruckner, D. A. 1997. *Diagnostic Medical Parasitology*. 3. vyd. Washington, D.C.: ASM Press, 1997, 937s. ISBN: 1-55581-116-7.
- Tamburrini, E., Mencarini, P., Luca, A. D., Antinori, A., Visconti, E., Ammassari, A., Ortona, L., Ortona, E., Siracusano, A., Vicari, E. 1993. Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. In *Journal of Clinical Microbiology*, roč. 31, č. 10, s. 2788-2789.
- Markechová, D., Tirpáková, A., Stehlíková, B. 2011. *Základy štatistiky pre pedagógov*. Nitra : FPV UKF v Nitre, 405s.
- Albrecht, P., Horka, G. 1953. *Pneumocystis* pneumonia in western Slovakia. In *Lekársky Obzor*, č. 2, s. 766-73.

- Boldiš, V., Ondriska, F., Kováč, L., Nohýnková, E., Špitalská, E. 2013. Evidence of *Pneumocystis jirovecii* in human clinical samples in south-western Slovakia over a 10-year period (2001-2010). In *Biologia*, roč. 68, č. 4, s. 662-666.
- Sing, A., Terebesius, K., Roggenkamp, A., Rüßmann, H., Tybus, K., Pfaff, F., Bogner, J. R., Emminger, Ch., Heesemann, J. 2000. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. In *Journal of Clinical Microbiology*, roč. 38, č. 4, s. 1461-1467.
- Fillatre, P., Decaux, O., Jouneau, S., Revest, M., Gacouin, A., Robert-Gagneux, F., Fresnel, A., Guiguen, C., Le Tulzo, Y., Jégo, P., Tattevin, P. 2014. Incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among groups at risk in HIV-negative patients. In *The American Journal of Medicine*, roč. 127, č. 12, s. 1242.e11-1242.e17.
- Gazonnes, S., Bergeron, A., Menotti, J., Desseaux, K., Molina, J. M., De Castro, N. 2020. *Pneumocystis jirovecii* and quantitative PCR: pneumonia or colonization? In *Revue des Maladies Respiratoires*, roč. 37, č. 4, s. 299-307.
- Abastabar, M., Mosayebi, E., Shokohi, T., Hedayati, M. T., Jarabi Amiri, M. R., Seifi, Z., Hadghani, I., Aliyali, M., Saber, S., Sheikholeslami, M. F. 2019. A multi-centered study of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with respiratory disorders: Is there a colonization trend in the elderly? In *Current Medical Mycology*, roč. 5, č. 3, s. 19-25.
- Galan, F., Oliver, J. L., Roux, P., Poirot, J. L., Berezziat, G. 1991. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by polymerase chain reaction compared to direct microscopy and immunofluorescence. In *The Journal of protozoology*, roč. 38, č. 6, s. 199S-200S.
- Kitada, K., Oka, S., Kohjin, T., Kimura, S., Nakamura, Y., Shimada, K. 1993. *Pneumocystis carinii* pneumonia monitored by *P. carinii* shedding in sputum by the polymerase chain reaction. In *Internal Medicine*, roč. 32, č. 5, s. 370-373.
- Leigh, T. R., Gazzard, B. G., Rowbottom, A., Collins, J. V. 1993. Quantitative and qualitative comparison of DNA amplification by PCR with immunofluorescence staining for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. In *Journal of Clinical Pathology*, roč. 46, č. 2, s. 140-144.
- Olsson, M., Elvin, K., Lofdahl, S., Linder, E. 1993. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. In *Journal of Clinical Microbiology*, roč. 31, č. 2, s. 221-226.

22. Chouaid, C., Roux, P., Lavard, I., Poirot, J. L., Housset, B. 1995. Use of the polymerase chain reaction technique on induced-sputum samples for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. A clinical and cost-analysis study. In *American Journal of Clinical Pathology*, roč. 104, č. 1, s. 72-75.
23. Wakefield, A. E., Pixley, F. J., Banerji, S., Sinclair, K., Miller, R. F., Moxon, E. R., Hopkin, J.M. 1990. Amplification of mitochondrial ribosomal RNA

sequences from *Pneumocystis carinii* of rat and human origin. In *Molecular and Biochemical Parasitology*, roč. 43, č., s. 69-76.

24. Lipschik, G. Y., Andrawis, V. A., Ognibene, F. P., Kovacs, J. A., Gill, V. J., Nelson, N. A., Lundgren, J. D., Nielsen, J. O. 1992. Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. In *THE LANCET*, roč. 340, č. 8813, s. 203-206.

RNDr. Vojtech Boldiš, PhD.

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava

e-mail: vojtech.boldis@medirex.sk