

INFECÇÃO POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* Em Imunocompetentes com Patologia Pulmonar, em Portugal*

OLGA MATOS, MARINA CÉLIA COSTA, ISABEL CORREIA, PAULA MONTEIRO, JORGE ROLDÃO VIEIRA,
JORGE SOARES, MARINA BONNET, FRANCISCO ESTEVES, FRANCISCO ANTUNES

Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, Centro de Microbiologia e Parasitologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Serviço de Pneumologia. Clínica das Doenças Infecciosas. Hospital de Santa Maria. Serviço de Pneumologia. Hospital Garcia de Orta. Almada. Portugal.

RESUMO

Recentemente, o uso de técnicas de biologia molecular, com grande capacidade para detectar pequeno número de microrganismos, tem vindo a demonstrar que doentes seronegativos para o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), com patologia pulmonar, e que indivíduos saudáveis podem ser portadores assintomáticos de *Pneumocystis jiroveci*. Assim, o objectivo deste estudo foi avaliar a prevalência de portadores assintomáticos, de *P. jiroveci*, em doentes com patologia pulmonar e em indivíduos saudáveis, em Portugal.

Entre Março de 2001 e Fevereiro de 2004, foram analisadas 45 secreções pulmonares pertencentes a 45 adultos imunocompetentes, com diferentes patologias pulmonares, e 37 lavados orais de 37 adultos saudáveis. Todas as amostras foram estudadas pelas técnicas de imunofluorescência indirecta, com anticorpos monoclonais, e de PCR "nested".

Os resultados obtidos neste estudo indicam que: 1) *P. jiroveci* é detectado, com frequência (24,4%), em doentes imunocompetentes com patologia pulmonar; 2) esta população pode ter papel importante na transmissão e na circulação de *P. jiroveci*, na comunidade; 3) os indivíduos que estão sob a acção de corticosteróides têm maior probabilidade de apresentarem *P. jiroveci* no pulmão (18%) do que os que não estão sob o efeito deste imunossupressor (12%); 4) *P. jiroveci* parece ser pouco frequente na população adulta saudável, podendo tal relacionar-se com a existência de cargas parasitárias muito baixas, no pulmão destes indivíduos, difíceis de detectar, ou devido ao tipo de amostras que foram utilizadas.

O rastreio dos portadores assintomáticos, na população imunocompetente, com patologia pulmonar, e a notificação dos resultados aos seus clínicos, pode ser importante para o seguimento destes doentes e para a clarificação epidemiológica da colonização por *P. jiroveci*.

Palavras chave: Pneumocystis Jiroveci, Portadores Assintomáticos, Imunocompetentes, Corticoterapia

SUMMARY

PNEUMOCYSTIS JIROVECI INFECTION IN IMMUNOCOMPETENT PATIENTS WITH PULMONARY DISORDERS, IN PORTUGAL

The use of molecular tools with a great capacity to detect and differentiate strains of *Pneumocystis* has resulted: in the identification of low numbers of *P. jiroveci* organisms in clinically silent, colonized, immunocompromised patients and in immunocompetent persons. Considering this information, the aim of this study was to determine the prevalence of *P. jiroveci* carriers (subclinical infections) in Portuguese patients with pulmonary disorders and in healthy individuals.

A total of 45 pulmonary specimens were collected from 45 immunocompetent adults with pulmonary disorders, and 37 oral washings from 37 healthy adults, between March 2001 and February 2004. All samples were analysed by indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies and by amplification of the LSU mtrRNA by nested PCR. The results obtained in this study indicate that: 1) *P. jiroveci* is frequently detected (24,4%) in patients with pulmonary disorders in Portugal; 2) this population might play a role in circulation and transmission of *P. jiroveci* organisms in the community; 3) patients receiving corticosteroids are more likely to have detectable *P. jiroveci* in lungs (18%) than patients who are not receiving this immunosuppressor (12%); 4) *P. jiroveci* is infrequently detected in healthy adults. This may be due to very low numbers of latent organisms present in the lungs of healthy adults, difficulty in detecting few organisms, or due to the type of samples used.

Screening of these individuals and notification of the results to their physician might be important: for further follow-up and whether or not prophylaxis or treatment should be prescribed; and for the clarification of the epidemiology of *P. jiroveci* asymptomatic infections.

Key Words: Pneumocystis Jiroveci, colonization, imunocompetents, corticotherapy

INTRODUÇÃO

Pneumocystis jiroveci (designado, anteriormente, *P. carinii* f. sp. *hominis*) é causa comum de infecção respiratória em imunodeficientes, especialmente nos doentes com infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) / Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Especula-se que a pneumonia por *P. jiroveci* (PPc) resulta de uma infecção *de novo* ou da reactivação de uma infecção latente adquirida durante a infância.

Recentemente, o uso de técnicas moleculares, com grande capacidade de detectar ADN, de *Pneumocystis*, resultou na identificação de casos de colonização / infecção assintomática, com baixa carga parasitária, em imunocomprometidos e em imunocompetentes^{1,2}. Vários estudos demonstraram que doentes seronegativos para VIH, com vários graus de imunodeficiência, e indivíduos saudáveis podiam ser portadores assintomáticos de *P. jiroveci*. Doentes com patologia pulmonar (pneumonia bacteriana, fibrose ou doença pulmonar obstrutiva crónica) parecem ter risco acrescido de colonização do pulmão por este mi-

croorganismo²⁻⁴, sendo capazes de transmitir este parasita a hospedeiros susceptíveis. Os indivíduos colonizados, com *P. jiroveci*, são, possivelmente, em maior número do que os doentes com PPc. No entanto, o seu papel na epidemiologia da PPc está, ainda, por esclarecer.

Tendo em conta esta informação, o objectivo deste estudo foi avaliar a prevalência de portadores assintomáticos, de *P. jiroveci*, em indivíduos com patologia pulmonar e em indivíduos saudáveis, em Portugal.

MATERIAL E MÉTODOS**Amostras Clínicas**

Entre Março de 2001 e Fevereiro de 2004 foram colhidos 42 lavados broncoalveolares (LBA), uma expectoração e dois lavados orais, pertencentes a 45 indivíduos, imunocompetentes, com patologia pulmonar (28 do sexo masculino e 17 do sexo feminino) e 37 lavados orais, de 37 adultos saudáveis (15 do sexo masculino e 22 do sexo feminino), para pesquisa de *P. jiroveci*. A mediana das idades dos indivíduos com patologia pulmonar foi de 60

anos (mínima 27 – máxima 84 anos) e para os indivíduos saudáveis, a mediana das idades foi de 46 anos (mínima 21 - máxima 85 anos). Dos 45 imunocompetentes, com patologia pulmonar, seis estavam sob terapêutica imunossupressora com corticosteróides, cinco em aerossol e um por via oral, nos últimos seis meses antes da broncofibroscopia. Nenhum dos doentes com neoplasias, do pulmão ou de outros órgãos, estava sob medicação antineoplásica. Destes 45 indivíduos, 20 apresentavam doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e 25, outras patologias (sete tinham o diagnóstico de neoplasia de pulmão e quatro neoplasias de outros órgãos, com metástases no pulmão; cinco sofriam de pneumonia de etiologia desconhecida, um com derrame pleural e outro com diabetes; dois referiam hemoptises; dois tinham queixas de tosse; dois eram fumadores; um tinha derrame pleural de etiologia desconhecida; um apresentava atelectasias; e o último tinha artrite reumatóide associada a um nódulo no pulmão).

Nenhum dos voluntários saudáveis tinha contacto ocupacional com doentes seropositivos para VIH. Todos os indivíduos deram o seu consentimento informado, para participarem no estudo, antes da recolha dos produtos biológicos.

Processamento das Amostras

Lavado broncoalveolar (LBA) – O LBA foi obtido por via broncofibroscópica, sob anestesia local, habitualmente pela instilação fraccionada de 150-200 cc de soro fisiológico, através do canal operador, seguida da aspiração suave com seringa. O produto recolhido foi guardado a 4°C e, posteriormente, transportado para o laboratório, sendo filtrado por uma gaze para eliminação do muco. Da totalidade do líquido retiraram-se 2 ml de suspensão, a qual foi centrifugada a 1500 ´ g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, aproveitando-se 0,5 ml para ressuspender o sedimento, conservado a -70°C, para estudo ulterior, por PCR. De seguida, procedeu-se à preparação de esfregaços, em lâminas, para, após coloração, serem observados por IFI-AcM. O restante produto tratado foi conservado a -70°C, para estudo posterior, por PCR.

Lavados orais – os lavados orais consistiram na lavagem da cavidade bucal e gargarejo durante, aproximadamente, 1 minuto, com 10 ml de PBS esterilizado. O líquido recolhido foi filtrado por gaze, com a finalidade de eliminar quaisquer detritos alimentares e, de seguida, sofreu o mesmo tratamento que o LBA. Se apresentava muco, era sujeito, inicialmente, a liquefacção com 0,3% DTT. Os esfregaços foram observados por IFI-AcM e as restantes

secreções foram conservadas a -70°C, para estudo posterior, por PCR.

A identificação de *P. jiroveci*, nos produtos biológicos analisados, baseou-se na observação microscópica destes microrganismos, após aplicação de uma técnica de imunofluorescência indirecta (IFI), com anticorpos monoclonais (AcM), e da amplificação por PCR “nested”, de uma região do gene, que codifica o ARN da subunidade grande (LSU) do ribossoma mitocondrial, de *P. jirovecii* (“PC-mtrRNA-PCR”). Todas as amostras obtidas foram submetidas à técnica de PCR “nested”, sem conhecimento prévio da informação clínica e dos resultados da técnica parasitológica, utilizada.

Avaliação Parasitológica

IFI-AcM (BioRad Laboratoires, France) – esta técnica consiste na identificação de *P. jiroveci*, pelos seus antígenos de superfície, utilizando um AcM, específico. A técnica foi executada, com base nas instruções do fabricante. A amostra foi considerada positiva, quando exibia dois ou mais quistos, com parede espessa, redondos ou ovais, apresentando fluorescência verde amarelada, contrastando com um fundo vermelho acastanhado. Os microrganismos podem aparecer isolados e / ou em grupos.

Extracção e Amplificação de ADN

Extracção do ADN – o ADN genómico foi extraído dos espécimes pulmonares através do método mini-beadbeater / tiocianato de guanidina-sílica utilizado no nosso laboratório para parasitas, e descrito anteriormente⁵.

PC-mtrRNA-PC – as características do par de “primers” externo, pAZ 102-E e pAZ 102-H, usado na primeira fase de amplificações, por reacção em cadeia da polimerase (PCR), e do par de “primers” interno, pAZ 102-X e pAZ 102-Y, usado na segunda fase de amplificações e, ainda, as condições de amplificação são as descritas anteriormente^{1, 6, 7, 8}.

Todas as técnicas foram executadas duas vezes.

Crítérios de Classificação dos Casos Clínicos

Um caso de colonização / infecção subclínica / portador assintomático de *P. jiroveci* foi definido como um caso com baixa carga parasitária, identificada por técnicas parasitológicas ou pela detecção de ADN, de *P. jiroveci*, por PCR, nas secreções pulmonares, sem quadro clínico compatível com PPc⁹. Um quadro clínico compatível com PPc, foi definido pela presença de, pelo menos, duas das variáveis seguintes: sintomas, tais como tosse não produtiva, febre e dispneia; radiograma do tórax, sugestivo

de PPc; pressão parcial do oxigénio (PaO₂) no sangue periférico £65 mm Hg; resposta favorável à terapêutica anti-PPc.

O diagnóstico de PPc não foi suspeito em nenhum dos indivíduos estudados.

Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada por SPSS versão 12.0. Cada doente foi considerado como uma unidade. A associação entre a infecção por *P. jiroveci* e a exposição aos corticosteróides foi investigada através do teste de Qui-quadrado (χ^2). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Um total de 42 LBAs, uma expectoração e dois lavados orais, pertencentes a 45 adultos imunocompetentes com patologia pulmonar, e 37 lavados orais, de 37 adultos saudáveis foram analisados. *P. jiroveci* foi detectado nos LBAs de 11 (24,4%), dos 45 indivíduos estudados, com patologia pulmonar. Através da PCR detectou-se ADN de *Pneumocystis*, nos 11 indivíduos, dos quais quatro eram positivos, também, pela IFI-AcM. Nenhum destes 11 indivíduos apresentava sintomatologia compatível com PPc. Dois (18%) dos 11 indivíduos positivos para *P. jiroveci* e quatro (12%) dos 34 indivíduos com patologia pulmonar, negativos para *P. jiroveci*, estavam sob terapêutica com corticosteróides nos últimos seis meses, antes da broncofibroscopia. A análise da associação entre a infecção por *P. jiroveci* e a exposição aos corticosteróides não foi significativa ($P = 0.58$).

A pesquisa de *P. jiroveci* nos lavados orais dos indivíduos saudáveis que participaram no estudo, foi negativa, quer por IFI-AcM, quer por PCR.

Dos 11 portadores de *P. jirovecii*, quatro eram indivíduos com DPOC (dois com sarcoidose, sendo um deles, também, consumidor de álcool, o terceiro com asma crónica obstrutiva e o quarto com bronquiectasias, pneumonia, diabetes e história de consumo de tabaco e álcool) e sete tinham outras doenças (dois com neoplasia do pulmão, sendo um deles fumador; um com neoplasia do esófago e hábitos tabágicos e alcoólicos; um com hemoptises e hábitos tabágicos; um com artrite reumatóide associada a um nódulo no pulmão; e dois com pneumonia de etiologia desconhecida, apresentando um deles derrame pleural e o outro diabetes).

Os quatro indivíduos, simultaneamente, positivos para *Pneumocystis* pelas técnicas de IFI-AcM e de PCR apresentavam as seguintes patologias: um tinha neoplasia do esófago, com história de consumo de tabaco e álcool; outro

tinha diagnóstico de adenocarcinoma do pulmão; um terceiro sofria de diabetes e tinha pneumonia, de etiologia desconhecida, na altura da broncofibroscopia; e o quarto sofria de asma crónica obstrutiva. Nenhum destes indivíduos estava sob terapêutica com corticosteróides, ou com outros fármacos imunossuppressores, na altura do estudo, com excepção para o quarto doente, com asma, que fazia inalação de corticosteróides há, pelo menos, seis meses.

Dos sete indivíduos cujos LBAs foram positivos para *P. jiroveci*, apenas por PCR, somente um, com sarcoidose, fazia terapêutica imunossupressora com corticosteróides em aerossol há 30 dias.

O quadro I sumariza os resultados obtidos e a informação demográfica e clínica dos 11 portadores assintomáticos de *P. jiroveci*.

Quadro I - Características demográficas e clínicas dos 11 indivíduos, portadores assintomáticos, de *P. jiroveci*

Número da amostra	Sexo	Idade	Terapêutica imunossupressora	Patologia
EC 11/04	F	65	Corticoides	DPOC (sarcoidose)
EC 11/06	M	47	Não	Neoplasia do esófago + consumo de tabaco e álcool *
EC 11/09	F	75	Não	Adenocarcinoma do pulmão *
EC 11/10	M	48	Não	Fumador (hemoptises)
EC 11/14	M	84	Não	Neoplasia do pulmão + fumador
EC 11/15	M	SI	Não	Artrite reumatóide e nódulo no pulmão
EC 11/17	M	31	Não	Pneumonia e derrame pleural
EC 11/19	M	27	Não	DPOC (sarcoidose) + consumo de álcool
EC 11/21	F	SI	Não	Diabetes + pneumonia *
EC 11/23	F	45	Corticoides	DPOC (asma) *
EC 11/31	M	80	Não	Bronquiectasias + diabetes + consumo de tabaco e álcool

SI - Sem informação; DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crónica; * - Positivos por IFI-AcM e PCR;

DISCUSSÃO

Neste estudo de indivíduos adultos imunocompetentes, com (45) e sem (37) patologia pulmonar foi pesquisada a presença de *P. jiroveci*, por técnicas parasitológicas e de biologia molecular, aplicadas a LBAs, a lavados orais e a uma expectoração espontânea. Uma percentagem elevada (24,4%) de casos de infecção por *P. jiroveci* foi encontrada na população, imunocompetente, estudada. A técnica molecular detectou um maior número de amostras positivas (11) do que o método parasitológico utilizado (4). Estas amostras pertenciam a doentes, aparentemente, imunocompetentes, com diferentes patologias pulmonares e sem quadro clínico compatível com PPc. Assim, tratava-se de portadores assintomáticos de *P. jiroveci*, com baixa carga parasitária. Recentemente, verificámos que, através da técnica de PCR, era possível detectar doentes com PPc, com baixa carga parasitária, que de outro modo, com as técnicas convencionais, não teriam sido detectados¹.

Como noutros estudos¹⁰, foi encontrada uma percentagem elevada de casos de colonização / infecção assintomática por *P. jiroveci* na população de imunocompeten-

tes, com doença pulmonar prévia, que justificou a broncofibroscopia. Tal pode sugerir que a incidência da colonização (portadores assintomáticos) por este microrganismo, nestes indivíduos e, talvez, na população em geral, em Portugal, possa ser maior do que se presume, com implicações importantes em saúde pública. Estes indivíduos e, principalmente, aqueles com doença pulmonar obstrutiva crónica, produzem expectoração e, como tal, para além de poderem representar um reservatório deste microrganismo oportunista, podem ser, ainda, uma fonte de fácil transmissão de *P. jiroveci* a imunocomprometidos, susceptíveis de adquirirem a pneumocistose.

Em estudos recentes, foi encontrada correlação entre o uso de corticosteróides, em doentes com patologia pulmonar, e a detecção de *P. jiroveci*^{10,11}. No presente estudo, embora não se tenha podido corroborar essa associação, verificou-se que, no grupo dos indivíduos com patologia pulmonar, 18% dos positivos para *Pneumocystis*, se encontravam sob terapêutica com corticosteróides, contra 12% dos negativos. O facto da associação não ter sido significativa, pode estar relacionado com o tamanho limitado da amostra, no entanto, estas percentagens sugerem que os indivíduos que estão sob a acção de corticosteróides têm maior probabilidade de apresentarem *P. jiroveci* no pulmão do que os que não estão sob o efeito deste imunossupressor. De facto, está demonstrado que os corticosteróides induzem alterações dos fosfolípidos e das proteínas constituintes do surfactante pulmonar (alteração na razão fosfolípidos / proteínas), que reveste a superfície do alvéolo, facilitando a colonização por *P. jiroveci*¹²⁻¹⁴.

Com uma técnica tão sensível como a PCR “nested”, não foi detectado ADN de *P. jiroveci*, nas amostras biológicas, da população saudável. Este resultado pode ter duas interpretações: 1) Os lavados orais são produtos biológicos de obtenção fácil e não invasiva, as únicas amostras de obtenção fácil na população saudável. No entanto, estes produtos biológicos, pelo facto de serem recolhidos ao nível da cavidade oral, além de poderem albergar um número muito pequeno de quistos, quando infectados por *P. jiroveci*, são constituídos por uma mistura de secreções pulmonares com saliva. Por esta razão, contêm substâncias, potencialmente, inibidoras da amplificação do ADN específico (componentes das secreções das glândulas salivares), mais do que o LBA ou até do que a expectoração induzida¹⁵. Este problema torna-se mais importante no caso de indivíduos assintomáticos, com baixa carga parasitária. Assim, embora os lavados orais sejam produtos biológicos de obtenção fácil e não invasiva, óptimos para estudos de rastreio, na população em geral, são, por

outro lado, menos úteis do que os LBAs ou do que a expectoração induzida para a detecção de infecções com baixa carga parasitária, especialmente se é analisada uma única amostra. 2) A baixa frequência de casos de colonização / infecção assintomática por *P. jiroveci*, na população adulta saudável, pode indicar que a presença deste microrganismo no pulmão, de forma latente, não ocorre nesta população, ou que a colonização é, apenas, transitória e que estes parasitas estão presentes no pulmão, somente por um período limitado de tempo. Estes resultados, assim como os de outros autores^{16,17}, demonstram que a colonização/infecção assintomática por *P. jiroveci* dos pulmões de adultos saudáveis, parece ocorrer, essencialmente, em pessoas com contacto ocupacional com seropositivos para VIH, com PPc. Miller e colaboradores¹⁷ verificaram que a transmissão de *P. jiroveci*, provavelmente, por via aérea, pode desenrolar-se, pelo menos, de duas maneiras: 1) de imunocomprometidos infectados para outros imunocomprometidos susceptíveis e 2) de imunocomprometidos infectados para imunocompetentes com contacto estreito com os infectados.

O rastreio dos portadores assintomáticos, na população imunocompetente, com patologia pulmonar, e a notificação dos resultados aos seus clínicos, pode ser importante para o seguimento destes doentes e a determinação da importância ou não da prescrição da profilaxia ou do tratamento anti-*P. jiroveci*. O grau de importância e o tipo de intervenção a ter para com os portadores assintomáticos de *P. jiroveci* na comunidade, é um assunto que deve ser clarificado, com brevidade.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- MATOS O, LUNDGREN B, CALDEIRA L et al: Evaluation of two nested polymerase chain reactions for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 149-52.
- SING A, TREBESIU K, ROGGENKAMP, A et al: Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. J Clin Microbiol 2000; 38: 1461-7.
- TAKAHASHI T, GOTO M, ENDO T et al: *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. J Med Microbiol 2002; 51: 611-4.
- MATOS O, COSTA MC, CORREIA I et al: *Pneumocystis jirovecii* carriage in Portuguese immunocompetent patients: preliminary results. J Eukaryot Microbiol 2003; 50 Suppl:647-8.
- COSTA MC, GASPAR J, MANSINHO K, ESTEVES F, ANTUNES F, MATOS O: Detection of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms in patients with *Pneumocystis* pneumonia. Scand J Infect Dis 2005; 37:766-71.
- WAKEFIELD AE, PIXLEY FJ, BANERJI S et al: Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis*

carinii DNA of rat and human origin. Mol Biochem Parasitol 1990; 43: 69-76.

7. TAMBURRINI E, MENCARINI P, VISCONTI E et al: Comparison of two PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid. J Euk Microbiol 1996; 43: 20S.

8. MATOS O: Epidemiologia e diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Contribuição para a avaliação de técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico da pneumocistose. Teste de Doutorado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa 1999; 81-93.

9. MATOS O, COSTA MC, LUNDGREN B, CALDEIRA L, AGUIAR P, ANTUNES F: Effect of oral washes on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 573-5.

10. MASKELL NA, WAINE DJ, LINDLEY A et al: Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. Thorax 2003; 58: 594-7.

11. 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 Infectious Diseases 2002; 2: 28.

12. ESCAMILLA R, PREVOST MC, HERMANT C, CARATERO

A, CARIVEN C, KREMPF M: Surfactant analysis during *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. Chest. 1992;101:1558-62.

13. DETERDING RR, SHIMIZU H, FISHER JH, SHANNON JM. Regulation of surfactant protein D expression by glucocorticoids in vitro and in vivo. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994; 10:30-7.

14. GUO Z, KANESHIRO ES: Phospholipid composition of *Pneumocystis carinii carinii* and effects of methylprednisolone immunosuppression on rat lung lipids. Infect Immun. 1995; 63: 1286-90.

15. OCHERT AS, BOULTER AW, BIRNBAUM W, JOHNSON NW, TEO CG: Inhibitory effects of salivary fluids on PCR: potency and removal. PCR Methods and Applications 1994; 3: 365-8.

16. VARGAS SL, PONCE CA, GIGLIOTTI F et al: Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. J Clin Microbiol 2000; 38: 1536-8.

17. MILLER RF, AMBROSE HE, WAKEFIELD AE: *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. J Clin Microbiol 2001; 39: 3877-82.

