Srinagarind Med J 1994; 9(4) 142-147

การวินิจฉัยภาวะปอดอักเสบจาก *Pneumocystis carinii* ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV โดยห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา

ลักขณา หิมะคุณ*, วท.ม.
จงรักษ์ ศรีภา**, สส.บ.
วารินทร์ ทองศรี
จุมพล มิตรชัย, พ.บ.

* ภาควิชาวิทยาศาสตร์พื้นฐาน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี
** To whom it may correspond.
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

The Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Patients with HIV Postitive in Cytology Laboratory

Lakana Himakun, M.Sc.
Chongrak Sripa, B.P.H.
Warin Thongsri
Jumphol Mitchai, M.D.

Abstract

The aim of this study is to investigate the feasibility of the conventional Papanicolaou stain in diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection in comparison with the special stain, Grocott modified Gomori's methenamine silver (GMS). Bronchial washing/ bronchoalveolar lavage specimens from 28 HIV-positive patients, admitted to Srinagarind Hospital, Khon Kaen University during the period from January 1992 to September 1993, were first screened for *Pneumocystis carinii* in Papanicolaou-stained slides. The main diagnostic criteria included the presence of foamy masses and the apparent outline of the parasite cyst wall. After this, the slides were destained, then restained with silver stain by the GMS method which stained the cyst wall. *Pneumocystis carinii* was detected by the GMS method in 12 out of the 28 cases, while 10 cases were positive using the Papanicolaou technique. The sensitivity, specificity and accuracy of the Papanicolaou stain in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* in bronchial washing/ bronchoalveolar lavage were 83.3%, 100%, and 92.5%, respectively, when compared with the GMS method. There was no significant difference in the frequency of detection between both methods. Therefore, the Papanicolaou technique, which is used routinely in the cytology laboratory, can be used for the simple and rapid initial diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in bronchial washing/bronchoalveolar lavage specimens.

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาภาวะการอักเสบจากการติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* โดยศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางเซลล์วิทยาที่พบในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจชนิด Bronchial washing / Bronchoalveolar larvage จากผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เกิดภาวะปอดอักเสบและเข้ารับการรักษาตัว ณ. โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างเดือน มกราคม 2535 ถึงเดือนกันยายน2536 จำนวน 28 คน โดยวิธี Papanicolaou staining ที่ใช้อยู่เป็นประจำในห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาทั่วไป เปรียบเทียบกับวิธี Grocott modified Gomori's methenamine silver (GMS) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis carinii* ทางพยาธิวิทยา ผลการศึกษาพบว่าสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* โดยการย้อมพิเศษด้วยวิธี GMS จำนวน 12 คน และ โดยวิธี Papanicolaou จำนวน 10 คน การตรวจด้วยวิธี Papanicolaou มี sensitivity ร้อยละ 83.3, specificity ร้อยละ 100 และ accuracy ร้อยละ 92.6 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน GMS ดังนั้นในผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีภาวะปอดอักเสบจากเชื้อ *Pneumocystis carinii* ควรได้รับการตรวจ Bronchial washing/ bronchoalveolar lavage ด้วยวิธี Papanicolaou ก่อนเพราะง่ายกว่า ราคาถูก ใช้เวลาน้อยกว่า และ ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธี GMS ($p>.05$).

บทนำ

Pneumocystis carinii เป็นเชื้อโปรโตซัวชนิดฉกฉวยโอกาส (opportunistic infection) ซึ่งในคนปกติจะไม่ค่อยพบว่าทำให้เกิดโรคได้แต่ในคนที่มีภาวะบกพร่องทางภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเอดส์ที่เกิดจากการติดเชื้อ HIV จะพบว่าเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดภาวะปอดอักเสบ จากรายงานต่างๆ พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV มีภาวะแทรกซ้อนจากปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Pneumocystis carinii* สูงถึง 60% และกว่า 40% ของผู้ป่วยเหล่านี้เสียชีวิตจากการติดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ (1) ดังนั้นการวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis carinii* ให้ได้รวดเร็ว แม่นยำ จะเป็นประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยเป็นอย่างมาก Mallal et al. (2) และ Brenner et al. (3) พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ทั้งที่แสดงและยังไม่แสดงอาการถ้าได้รับการรักษาการติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* ก่อนจะมีความรุนแรงของโรคปอดอักเสบน้อยกว่าหรือยืดระยะเวลาการแสดงอาการออกไป

การวินิจฉัยภาวะปอดอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น จากภาพถ่ายรังสี เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อนี้โดยตรงดูจะเป็นวิธีที่ถูกต้องกว่า การผ่าตัดปอด (open lung biopsy) ได้ถูกนำมาใช้ แต่ก็เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองและเสี่ยงต่ออันตรายสูงโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในปัจจุบันมีการนำเอากล้องส่องหลอดลม (Fiberoptic bronchoscope) มาใช้ซึ่งสามารถทำได้ทั้ง Transbronchial biopsy, bronchial brushing, bronchial washing และ bronchoalveolar lavage ซึ่งตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเหล่านี้สามารถนำมาตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis carinii* ได้ทั้งในทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) และ เซลล์วิทยา โดยการย้อมสี H&E และ Papanicolaou stain ตามลำดับ และการย้อมพิเศษอื่นๆ เช่น Grocott modified Gomori's methenamine silver (GMS) method หรือ การย้อมทาง immunocytochemistry (4-10) ในจำนวนสิ่งส่งตรวจเหล่านี้การตรวจทางเซลล์วิทยาของ Bronchial washing และ Bronchoalveolar lavage จะง่ายกว่าและให้ผลการวินิจฉัยที่ถูกต้อง แม่นยำ และมีเปอร์เซนต์การตรวจพบมากกว่า เพราะสิ่งส่งตรวจนี้ได้มาจากน้ำล้างถุงลมซึ่งเป็นที่อยู่ของเชื้อ *Pneumocystis carinii* (11) และการทำ bilateral bronchoalveolar lavages จะยิ่งทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการตรวจมากขึ้น (12)

ในสถานการณ์ปัจจุบันที่ประเทศไทยกำลังมีการระบาดของเชื้อ HIV อยู่ในระดับที่สูงประเทศหนึ่งในโลก และภาวะแทรกซ้อนของโรคปอดอักเสบจากการติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* ก็พบได้บ่อยในงานเวชปฏิบัติประจำวัน การวินิจฉัยอย่างถูกต้องและรวดเร็วจะเป็นผลดีในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ก็เพื่อที่จะดูความผิดปกติหรือการเปลี่ยนแปลงทางเซลล์วิทยาของสิ่งส่งตรวจ bronchial washing/ bronchoalveolar lavage เพื่อใช้ช่วยในการวินิจฉัยและแยกภาวะปอดอักเสบจากการติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* ออกจากภาวะปอดอักเสบจากสาเหตุอื่นๆ ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ที่เข้ารับการรักษาตัว ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาทางเซลล์วิทยาในสถาบันนี้มาก่อน และ นอกจากนี้ยังต้องการเปรียบเทียบสัมฤทธิผลของการย้อม Papanicolaou stain ซึ่งใช้เป็นสีย้อมทางเซลล์วิทยาในงานประจำวันทางเซลล์วิทยา และ สีย้อมพิเศษ GMS ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการย้อม *Pneumocystis carinii* ด้วย

วิธีการ

ผู้ป่วย

การศึกษาครั้งนี้ทำในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ HIV และเข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างเดือนมกราคม 2535 ถึง เดือน กันยายน 2536 จำนวน 28 คน เป็นชาย 25 คน และ หญิง 3 คน ผู้ป่วยเหล่านี้มีอายุระหว่าง 20-63 ปี (Figure 1)

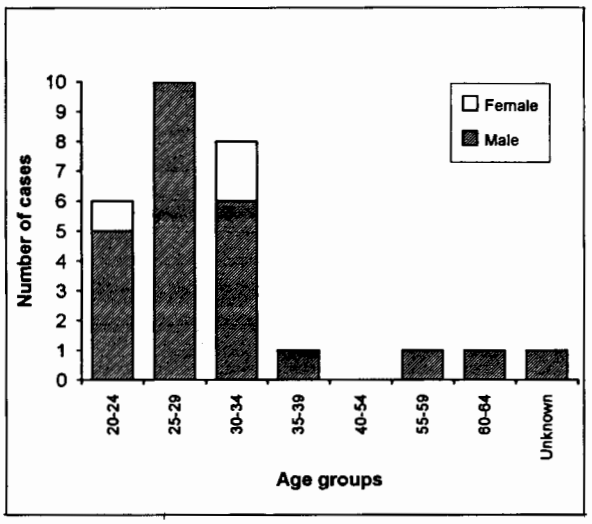

Figure 1 Age and sex distribution in 28 patients with HIV infection.

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

Bronchial washing/bronchoalveolar lavage จากผู้ป่วยนำมาปั่นที่ 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาสเมียร์บนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วยไข่ขาว จำนวน 4 แผ่น/ราย แล้วรีบแช่ในน้ำยาอัลกอฮอล์ 95% เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ก่อนนำไปย้อมสี Papanicolaou stain ตามวิธีมาตรฐาน จากนั้นนำสไลด์ที่ย้อมแล้วมาตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาเพื่อหาเชื้อ *Pneumocystis carinii* และลงผล เสร็จแล้วนำสไลด์นี้ไปล้างสีออก (destaining) และย้อมสีใหม่ด้วยวิธี Grocott modified Gomori's methenamine silver (GMS) (13) แล้วนำมาตรวจหาเชื้อ *Pneumocystis carinii* อีกครั้ง

เกณฑ์การวินิจฉัย

การวินิจฉัย *Pneumocystis carinii* จากสไลด์ที่ย้อมสี Papanicolaou stain ทำตามหลักเกณฑ์ของ Greaves & Strigle (5) และ Chandra et al. (6) คือ ดู Foamy masses ซึ่งเป็น alveolar exudate casts ลักษณะเหมือนฟองน้ำ มีการเรียงตัวแบบสามมิติเมื่อโฟกัสขึ้นลง และส่วนใหญ่จะมองเห็น cyst wall เป็นเงารางๆ ก้อน foamy masses นี้มีขนาดแตกต่างกันออกไปแต่ก็ประมาณใกล้เคียงกับขนาดของถุงลมคน (ประมาณ 200 ไมโครมิเตอร์) ส่วนสไลด์ที่ย้อมด้วยวิธี GMS จะเห็น cyst wall ติดสีดำเป็นรูปวงกลมหรือรูปวงรี ขนาดประมาณ 6-8 ไมโครมิเตอร์ กระจุกอยู่ในบริเวณที่เป็น foamy masses เมื่อเทียบกับสไลด์ที่ย้อม Papanicolaou stain ส่วน Sporozoite จะไม่ติดสี GMS

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการวินิจฉัยด้วยวิธี Papanicolaou stain และ GMS นำมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหา sensitivity, specificity, accuracy, false-positive and false-negative rates, positive and negative predictive values ตามวิธีของ Griner et al. (14) การเปรียบเทียบความแตกต่างของการย้อมของทั้งสองวิธีคำนวณโดยวิธี Chi-square test ที่นัยสำคัญ $p<.05$

สรุปผล

จากการศึกษาสไลด์ bronchial washing/bronchoalveolar lavage ที่ย้อมด้วย Papanicoplaou stain จำนวน 112 แผ่น จากผู้ป่วย 28 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ HIV พบ foamy masses และลักษณะอื่นๆ (Figure 2) ที่เข้าได้กับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ จำนวน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 35.7 ของผู้ป่วยทั้งหมดที่ทำการศึกษา และเมื่อนำสไลด์เหล่านี้มาล้างสีออกแล้วย้อมด้วยวิธี GMS พบว่ามี *Pneumocystis* cysts ซึ่งย้อมติดสีดำของ cyst wall (Figure 3) จำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.9 จากการทดสอบทางสถิติพบว่าการตรวจย้อมทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในการตรวจเชื้อ *Pneumocystis carinii* (Table 1)

Table 1 Results of cytologic staining for *Pneumocystis carinii* by the GMS and Papanicolaou methods.

Method	*Pneumocystis carinii*		Total
	Positive (%)	Negative (%)	
GMS	12 (42.9)	16 (57.1)	28
Papanicolaou	10 (35.7)	18 (64.3)	28

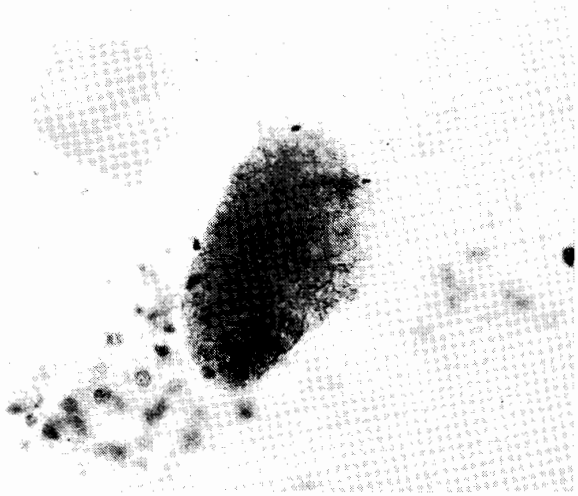

Figure 2 Cytologic smear of bronchial washing/ bronchoalveolar lavage showing foamy, honeycombed mass (Papanicolaou stain, original magnification X400).

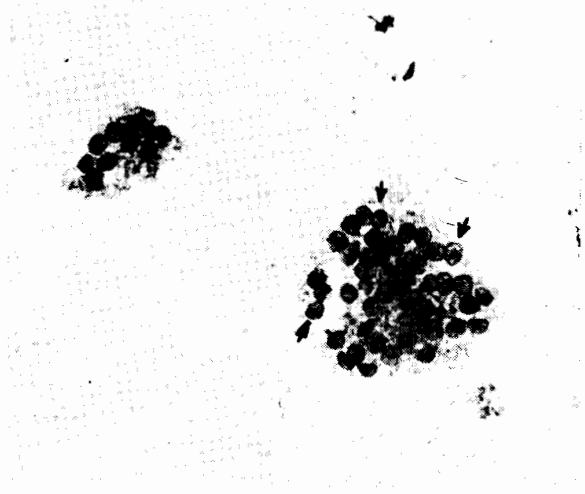

Figure 3 Groups of *Pneumocystis carinii* cysts observed within foamy mass showing silver staining of the cyst wall (arrows) (Gomori's methenamine silver, original magnification X 400).

Table 2 Sensitivity of Papanicolaou stain in the detection of *Pneumocystis carinii* in reference to the standard GMS method.

	GMS method		Total
	Positive	Negative	
Papanicolaou-positive	10	-	10
Papanicolaou-negative	2	16	18
Total	12	16	28

Sensitivity	= 83.3 %
Specificity	= 100 %
Positive predictive value	= 100 %
Negative predictive value	= 88.9 %
Accuracy	= 92.9 %

Table 2 แสดงการเปรียบเทียบสัมฤทธิผลของการวินิจฉัยเชื้อ *Pneumocystis carinii* ของวิธี Papanicolaou โดยใช้ GMS method เป็นมาตรฐาน พบว่า การย้อมด้วยวิธี Papanicolaou มีความไวในการตรวจ (sensitivity) 83.3%, ความจำเพาะ (specificity) 100 % นอกจากนี้ยังไม่พบ false positive จากการศึกษาครั้งนี้เลย ผู้ป่วยจำนวน 2 รายที่ negative ใน Papanicolaou stain แต่ positive ใน GMS method พบว่าทั้งสองรายนี้มีจำนวนเชื้อ *Pneumocystis carinii* ในปริมาณที่น้อยและไม่เห็น foamy masses ที่ชัดเจน

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะปอดอักเสบจากการติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* ในผู้ป่วยโรคเอดส์สามารถทำได้จากการตรวจ bronchial washing/ bronchoalveolar lavage ตามวิธีการทางเซลล์วิทยาโดยการย้อม Papanicolaou stain และ ให้ผลไม่แตกต่างจากการย้อมพิเศษด้วยวิธี GMS ซึ่งยอมรับกันว่าเป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิดนี้ การศึกษาครั้งนี้ยังยืนยันผลการศึกษาในทำนองเดียวกันของต่างประเทศ (5,7,9,15) อย่างไรก็ตามการที่จะตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิดนี้ให้ถูกต้องที่สุดด้วยวิธี Papanicolaou นั้นก็ต้องขึ้นกับปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น ชนิดของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า bronchoalveolar lavage เป็นตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลการตรวจ (yeild) สูงกว่าแบบอื่นเพราะสามารถได้เซลล์และ foamy masses ขนาดต่างๆ ในถุงลม ซึ่งเป็น diagnostic criteria ของการย้อมวิธีนี้ (5,9,15) การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเป็น bronchial washing และ bronchoalveolar lavage ในตัวอย่างเดียวกันซึ่งก็ให้ผลเป็นที่น่าพอใจและไม่

มีผล false-positive เลย ข้อควรระวังในการเตรียมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจชนิดนี้ก็ คือ ควรรีบปั่นเซลล์และทำสเมียร์ให้เร็วที่สุด หรือแช่ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ขั้นต้นก่อน เพื่อป้องกันการเกิดย่อยสลายตัวเอง อันจะทำให้อ่านผลไม่ได้ นอกจากนี้ประสบการณ์ในการวินิจฉัยรวมทั้งความละเอียดรอบคอบก็มีส่วนทำให้การวินิจฉัยได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น จากรายงานของต่างประเทศในระยะหลังๆ พบว่าการตรวจวินิจฉัยภาวะปอดอักเสบจาก *Pneumocystis carinii* โดยวิธี Papanicolaou มี sensitivity สูงตั้งแต่ 86-100% (5,7,9,15) การศึกษาในครั้งนี้มี sensitivity 83.3% ซึ่งก็นับว่าสูงพอสมควร ถ้ามีจำนวนตัวอย่างมากกว่านี้ก็อาจจะเพิ่มความไวในการตรวจได้

ผู้ป่วยสองรายที่ให้ผล negative ใน Papanicolaou stain แต่ให้ผล positive ใน GMS พบว่าในสองรายนี้มีปริมาณเชื้อ *Pneumocystis carinii* น้อยและการฟอร์ม foamy masses ไม่ชัดเจน Naryshkin et al. (16) พบว่าในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่มีเชื้อจำนวนน้อยมักจะให้ผล negative ด้วยวิธี Papanicolaou stain ปริมาณของเซลล์ใน bronchoalveolar lavage ก็เป็นตัวแปรหนึ่งที่มีผลต่อการตรวจ ถ้ามีน้อยเกินไป เช่น น้อยกว่า 150,000 เซลล์/สเมียร์ อาจทำให้ผลการการวินิจฉัยไม่แน่นอนได้ (8) นอกจากนี้จำนวนแผ่นของสเมียร์ที่ตรวจต่อตัวอย่างควรไม่น้อยกว่า 4 แผ่น Schumann & Swensen (7) แนะนำให้ตรวจสเมียร์ถึง 6 แผ่นเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์เพียงพอต่อการวินิจฉัย

ถึงแม้ว่าการตรวจทางเซลล์วิทยาโดยวิธี Papanicolaou stain และ GMS ไม่แตกต่างกันทางสถิติแต่ Papanicolaou stain ก็มีข้อดีมากกว่าการย้อม GMS ในหลายประการคือ 1) Papanicolaou Stain ใช้เวลาย้อมน้อยกว่าและไม่จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญในการย้อมเท่ากับการย้อม GMS, 2) สามารถตรวจและวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาได้เลยในสไลด์แผ่นเดียวกัน เช่น เซลล์มะเร็ง, 3) การย้อม GMS เป็นวิธีการย้อมสีเชื้อราโดยตรง ดังนั้นบางครั้งเชื้อราที่ในรูป Yeast form ซึ่งมีลักษณะคล้าย *Pneumocystis carinii* อาจทำให้การแปลผลผิดพลาดได้ (17) และ 4) สไลด์ที่ย้อมPapanicolaou stain ยังสามารถนำไปตรวจด้วยจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์เพื่อหาเชื้อ *Pneumocystis carinii* ได้โดยตรงซึ่งมีการรายงานที่ใช้วิธีการนี้แล้ว (18,19) ในขณะนี้คณะผู้วิจัยกำลังอยู่ระหว่างการศึกษา ถ้าหากมีความเป็นไปได้และมี specifity สูงเราอาจจะศึกษาสไลด์โดยดูย้อนหลังได้ในรายที่สงสัยหรือในรายที่เป็น bronchoalveolar lavage จากผู้ป่วยโรคเอดส์ซึ่งมีเคยผู้รายงานว่าสไลด์ Pap ที่เก็บนานกว่า 4 ปี ยังสามารถนำไปตรวจดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ได้โดยไม่มีการสูญเสียคุณสมบัติในการเรืองแสง (18)

สรุปผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การตรวจวินิจฉัย bronchial washing/ bronchoalveolar lavage โดยวิธีทางเซลล์วิทยาจาก Papanicolaou stain สามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคปอดอักเสบจาก *Pneumocystis carinii* ได้ และผลการตรวจไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการย้อมพิเศษ GMS คณะผู้วิจัยจึงขอแนะนำวิธี Papanicolaou stain ซึ่งเป็นการตรวจทางเซลล์วิทยาประจำวันเป็นวิธี initial diagnosis สำหรับเชื้อนี้ก่อน แล้วจึงย้อมตรวจสอบ (confirm) โดยการย้อมพิเศษอื่นๆ (6) หรือ ตรวจทาง Immunocytochemistry (10) อย่างไรก็ตามการตรวจทางเซลล์วิทยาอย่างรัดกุมในจำนวนสเมียร์ที่เพียงพอโดยนักเซลล์วิทยาหรือพยาธิแพทย์ที่มีประสบการณ์เพียงอย่างเดียวก็อาจจะเพียงพอสำหรับการวินิจฉัย Pneumocystis pneumonia (7)

เอกสารอ้างอิง

1. Center for disease Control. Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) update: United States. **Morbid. Mortal.Weekly Rep.** 1983; 32: 309-11.
2. Mallal SA, Martinez OP, French MAH, James IR, Dawkins RL. Severity and outcome of*Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) in patients of known and unknown HIV status. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** 1994; 7: 148-53.
3. Brenner N, Ognibene FP, Lack EE, and Simmons JT, Suffredini AF, Lane HC, et al. Prognostic factors and life expectancy with acquired immunodeficiency syndrome and *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Am.Rev. Respir.Dis.** 1987; 136 : 1199-206.
4. Orenstein M, Webber CA, and Heurich AE. Cytologic diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by bronchoalveolar lavage in acquired immune deficiency syndrome. **Acta Cytol.** 1985; 20: 727-31.
5. Greaves TS, and Strigle SM. The recognition of *Pneumocystis carinii* in routine Papanicolaou-stained smears. **Acta Cytol.** 1985; 29: 714-20.

6. Chandra P, Delaney MD and Tuazon CU. Role of special stains in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection from bronchial washing specimens in patients with the acquired immune deficiency syndrome. **Acta Cytol.** 1988; 32:105-07.
7. Schumann GB and Swensen JJ. Comparison of Papanicolaou's stain with the Gomori methenamine silver (GMS) stain for the cytodiagnosis of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. **Am.J. Clin.Pathol.** 1991; 95 : 583-6.
8. Paradis IL, Ross C, Dekker A and Dauber J. A comparison of modified methenamine silver and toluidine blue stains for the detection of on bronchoalveolar lavage specimens from immunosuppressed patients. **Acta Cytol.** 1990; 34: 511-16.
9. Stanley MW, Henry MJ and Iber C. Foamy alveolar casts: diagnostic specificity for *Pneumocystis carinii* pneumonia in bronchoalveolar lavage fluid cytology. **Diagn. Cytopathol.** 1988; 4: 113-5.
10. Homer KS, Wiley EL, Smith AL, McCollough L, Clark D, Nightinggale SD, et al. Monoclonal antibody to *Pneumocystis carinii*. Comparison with silver stain in bronchial lavage specimens. **Am.J.Clin.Pathol.** 1992; 97: 619-24.
11. Reynolds HY. Broncheoalveolar lavage. **Am.Rev.Respir.Dis.** 1988; 135:250-63.
12. Meduri GU, Stover DE, Greeno RA, Nash Tand Zaman MB. Bilateral bronchoalveolar lavage in the diagnosis of opportunistic pulmonary infections. **Chest** 1991; 100 : 1272-6.
13. Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **Am.J.Clin.Pathol.** 1955; 25: 975-79.
14. Griner PF, Mayewski RJ, Muschlin AI and Grenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. **Ann.Intern. Med.** 1981; 94: 553- 600.
15. Dugan JM, Avitabile AM, Rossman MD, Ernst CS and Atkinson BF. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by cytologic evaluation of Papanicolaou-stained bronchial specimens. **Diagn.Cytopathol.** 1988; 4: 106-12.
16. Naryshkin S, Daniels J, Freno E and Cunningham L. Cytology of treated and minimal *Pneumocystis carinii* pneumonia and a pitfall of the Grocott methenamine silver stain. **Diagn.Cytopathol.** 1991; 7: 41-7.
17. Mahan CT, Sale GE. Rapid methenamine silver stain for *Pneumocystis* and fungi. **Arch. Pathol.L ab.Med.** 1978; 102: 351-2.
18. Wehle K, Blanke M, Koenig G and Pfitzer P. The cytological diagnosis of *Pneumocystis carinii* by fluorescence microscopy of Papanicolaou stained bronchoalveolar lavage specimens. **Cytopathology** 1991; 2: 113-20.
19. Pfitzer P, Wehle K, Blanke M and Burrig KF. Fluo rescence microscopy of Papanicolaou-stained bronchoalveolar lavage specimens in the diagnosis of *Pneumocystis carinii*. **Acta Cytol.** 1989; 33: 557-9.