

9-1-2018

แนวทางการวินิจฉัยโรคยอดอั๊กเสขจากเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซีในปัจจุบัน

ไพโรจน์ ชีร์นัยพงษ์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal>



Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

ชีร์นัยพงษ์, ไพโรจน์ (2018) "แนวทางการวินิจฉัยโรคยอดอั๊กเสขจากเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซีในปัจจุบัน," *Chulalongkorn Medical Journal*. Vol. 62: Iss. 5, Article 12.

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal/vol62/iss5/12>

This Review Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

แนวทางการวินิจฉัยโรคปอดอักเสบจากเชื้อ นิวโมซิสติสจิโรเวคซีในปัจจุบัน

ไพโรจน์ ธีรน้อยพงศ์*

Teeranaipong P. Update on diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Chula Med J 2018 Sep – Oct; 62(5): 879 - 90

Pneumocystis jirovecii pneumonia (PCP) is a common and life-threatening infection in immunocompromised patients. A timely diagnosis and early administration of proper treatment is essential to prevent acute respiratory failure which is associated with high mortality. Since symptoms and signs of PCP are mostly nonspecific, detection of *P. jirovecii* or pneumocystis DNA in respiratory specimen is necessary for definite diagnosis of PCP. Many adjunct tests are warranted. Microscopic examinations by different staining methods are fundamental, but highly helpful, for diagnosis of PCP. In many cases especially PCP in non-HIV group, the fungal load might be lower than microscopic detection threshold. Meanwhile, several serologic markers ((1-3)-beta-D-glucan (BDG), lactate dehydrogenase (LDH), S-adenosylmethionine, major surface glycoprotein (MSG) antibody test) have been proposed with diversely reported sensitivity and specificity. Imaging studies such as chest X-ray (CXR), thoracic ultrasonography, high-resolution computed tomography (HRCT) have been studied for both diagnosis and help evaluation of disease burden. High sensitivity and specificity of advanced quantitative PCR are also very helpful but still the standard protocol to distinguish between infection and colonization is not well-developed and become a challenge.

Recently, cultivation of *Pneumocystis* has been reported successful. This sheds light on further understanding of the biology and natural history of pneumocystosis and a better way to deal with.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, diagnosis.

Correspondence to: Teeranaipong P. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. May 31, 2018.

**ไพโรจน์ อีรณยพงศ์. แนวทางการวินิจฉัยโรคปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซี
ในปัจจุบัน. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2562 ก.ย. – ต.ค.; 62 (5):879 – 90**

โรคปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซี พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การวินิจฉัย และให้การรักษาย่างทันสมัยที่ สามารถช่วยลดภาวะแทรกซ้อน เช่นภาวะหายใจล้มเหลว ذبพลัน และลดอัตราการตายได้ เนื่องจากอาการและอาการแสดงของผู้ป่วยโรคปอดอักเสบจากเชื้อ นิวโมซิสติดิจิโรเวคซี ไม่เฉพาะเจาะจง การวินิจฉัยโรคปอดอักเสบดังกล่าว จำเป็นต้องอาศัยการตรวจ พบเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซี หรือการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อดังกล่าวในสิ่งส่งตรวจจากระบบทาง เเดินหายใจ ทางห้องปฏิบัติการ การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีย้อมสีต่าง ๆ สามารถให้ข้อมูล เพื่อการวินิจฉัยได้มาก แต่อาจไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในกรณีที่มีปริมาณเชื้อไม่มากพอ การตรวจ โดยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา เช่น การตรวจแอนติบอดีต่อ (1-3)-beta-D-glucan (BDG), lactate dehydrogenase (LDH), S-adenosylmethionine และ major surface glycoprotein (MSG) ของเชื้อ ดังกล่าว เป็นต้น การตรวจทางภาพรังสีปอด คลื่นเสียงความถี่สูง มีประโยชน์ในแง่ที่ให้ข้อมูลเพิ่มเติม เพื่อเป็นแนวทางในการวินิจฉัยและรักษา มีรายงานความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจเหล่านี้ แตกต่างกันในหลายการศึกษา และยังไม่มียูวิธีใดวิธีหนึ่งที่จำเพาะเจาะจงเพียงพอสำหรับการวินิจฉัย โรคปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซี จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลการตรวจจากหลายวิธีการร่วมกัน มีรายงานเกี่ยวกับความสำเร็จในการเพาะเชื้อชนิดนี้ในห้องทดลอง ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ต่อ การเข้าใจชีววิทยาและการดำเนินโรคปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซีต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: โรคปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซี, การวินิจฉัย.

โรคปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี (*Pneumocystis pneumonia*, PCP) ในมนุษย์ เกิดจากการติดเชื้อ *Pneumocystis jirovecii*^(1, 2) เดิมรู้จักในชื่อ *Pneumocystis f. sp. hominis* ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อรา⁽³⁾ ใน Phylum Ascomycota เนื่องจากมีลำดับเบสบนดีเอ็นเอ และส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งจัดเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) ชนิดหนึ่ง ในระยะแรกพบมากในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV infection) และจัดเป็นการเจ็บป่วยที่มีความสัมพันธ์กับโรคเอดส์ (AIDS-associated illness) นับตั้งแต่มีการใช้ยาต้านไวรัสดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพสูง (highly active antiretroviral therapy, HAART) เป็นต้นมา จำนวนผู้ป่วย PCP ในกลุ่มผู้ป่วย HIV มีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น การมียาต้านไวรัสที่ดี จำนวนผู้ป่วยที่เข้าถึงยาต้านไวรัสมีมากขึ้น การมีมาตรฐานแนวทางการรักษา (standard guidelines) ที่มีการปรับปรุงอยู่ตลอดเวลา ผู้ป่วยมีการใช้ยาอย่างเคร่งครัด (drug adherence) ที่ดีขึ้น ความสามารถวินิจฉัยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องได้รวดเร็ว รวมทั้งการให้การป้องกัน (chemoprophylaxis) และการรักษาที่เหมาะสมทันเวลาที่ในปัจจุบันพบผู้ป่วย PCP ในกลุ่ม non-HIV ได้แก่กลุ่มผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจาก hematological malignancies, solid cancer, transplantation (solid organ, stem cell, bone marrow), connective tissue diseases หรือ inflammatory disorders ที่ต้องใช้อยากดภูมิคุ้มกันเป็นระยะเวลานาน มีจำนวนมากขึ้น ซึ่งผู้ป่วย PCP กลุ่ม non-HIV นี้ มักจะมีลักษณะของอาการอาการแสดงทางคลินิก และการดำเนินโรค ที่แตกต่างไปจากผู้ป่วย PCP กลุ่ม HIV ในหลายลักษณะ เช่น rapid disease onset, worsen lung inflammation, more severe hypoxia and higher mortality rate^(4, 5) PCP ในกลุ่ม non-HIV นี้ สามารถให้การวินิจฉัยได้ยากกว่า และมีการพยากรณ์โรคต่ำกว่า PCP ในกลุ่ม HIV การให้การวินิจฉัยที่รวดเร็ว การเริ่มยาที่ถูกต้อง ในเวลาที่

เหมาะสม สามารถช่วยลดอัตราป่วย (morbidity) และอัตราตาย (mortality) ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้ บทความฉบับนี้มีเนื้อหาเกี่ยวกับแนวทางการวินิจฉัยที่มีในปัจจุบันเกี่ยวกับโรคดังกล่าวโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้แพทย์สามารถเลือกใช้ได้อย่างเหมาะสม เพื่อช่วยในการวินิจฉัยดำเนินไปอย่างรวดเร็ว เพื่อลดอัตราป่วยและอัตราตายของผู้ป่วยให้เหลือน้อยที่สุด และเพื่อประสิทธิผลในการรักษาที่ดีที่สุด

ประวัติทางคลินิก (Clinical history)

การวินิจฉัย PCP เริ่มต้นจากอาการและอาการแสดงที่ได้จากการซักประวัติ และตรวจร่างกาย ผู้ป่วยมักจะมาด้วยอาการไอ ไอแห้ง ๆ (non-productive cough) หายใจลำบาก (shortness of breath) จุกแน่นบริเวณหน้าอก (substernal tightness) มักจะมีประวัติของภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised status) ร่วมด้วย โดยมีการดำเนินโรคเป็นแบบเฉียบพลันหรือกึ่งเฉียบพลัน (acute-to-subacute) ตรวจร่างกายพบมีไข้ หายใจเร็ว (tachypnea) หัวใจเต้นเร็ว (tachycardia) ฟังเสียงปอดมักจะปกติ หรือมี mild crackles อาจตรวจพบเสียงหายใจเบากว่าปกติ ในกรณีมีภาวะแทรกซ้อน อาจพบภาวะการมีลมในช่องอก (pneumothorax) เนื่องจากอาการและอาการแสดงของผู้ป่วย PCP มีลักษณะไม่จำเพาะ การซักประวัติและตรวจร่างกายเพียงอย่างเดียวมักจะได้อัปเดตไม่เพียงพอสำหรับการวินิจฉัยแยกโรค จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจ imaging studies เช่น ภาพถ่ายรังสีทรวงอก และการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคที่จำเพาะจำเป็นต้องอาศัยการตรวจพบเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี หรือการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อดังกล่าวในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ (clinical respiratory specimens) เช่น induced sputum น้ำล้างปอด (bronchoalveolar lavage, BAL) และเนื้อเยื่อจากปอด เป็นต้น แม้ว่าในปัจจุบันมีการใช้ serologic markers เป็นการทดสอบเพื่อประกอบการวินิจฉัย (adjunct test) แต่ยังไม่มีการใช้ serologic

marker ชนิดใดที่จำเพาะต่อเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซึ่งมากพอที่จะใช้เพื่อการวินิจฉัยได้

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examinations)

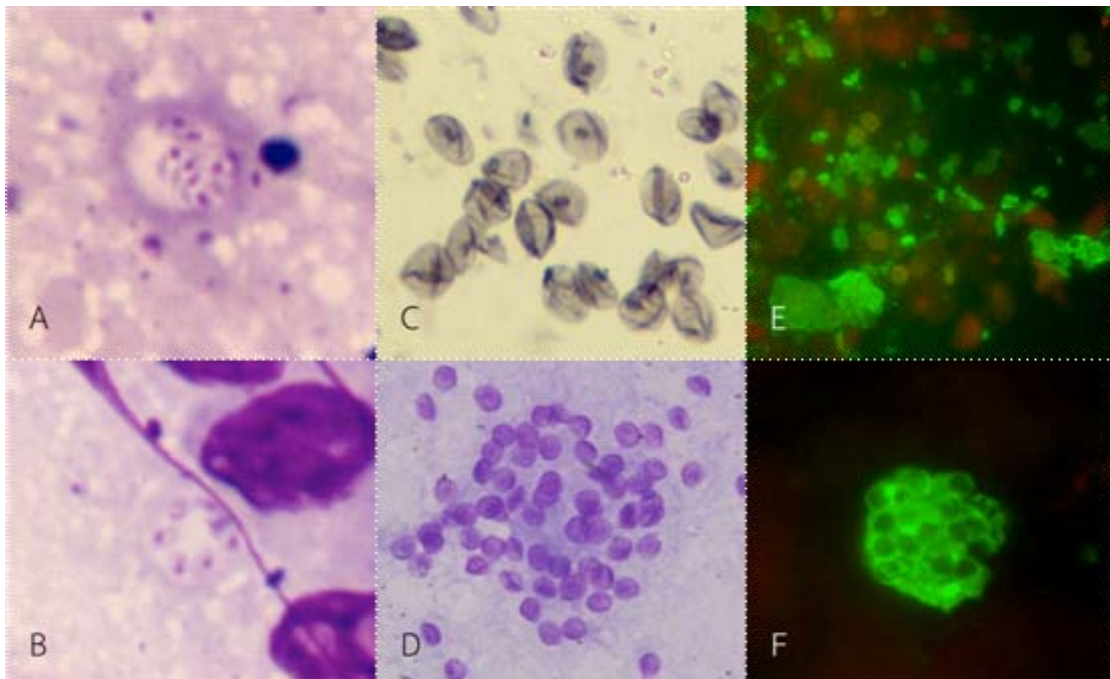
การตรวจหาเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวค ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ เป็นการตรวจเบื้องต้นที่จำเป็นต้องทำทันที เนื่องจากผลตรวจสามารถช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคได้ อีกทั้งยังเป็น non-invasive test และราคาไม่แพง ผู้ป่วย PCP มักไม่มีเสมหะ ดังนั้นการตรวจโดยการทำ induced sputum (โดยใช้ 3%, 4% or 5% hypertonic saline with standard nebulizer) หรือ bronchoscopy พร้อมกับ bronchoalveolar lavage หรือ transbronchial biopsy จึงให้ผลการตรวจที่ดีกว่า มีรายงานเปรียบเทียบความไวของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วย PCP ที่มีการติดเชื้อ HIV พบว่าความไวในการวินิจฉัยของ induced sputum แตกต่างกันระหว่างน้อยกว่าร้อยละ 50 ถึงมากกว่าร้อยละ 90 ส่วน BAL มี รายงานความไวสูงถึงร้อยละ 90 - 99, transbronchial biopsy ร้อยละ 95 - 100 และ open lung biopsy ร้อยละ 95 - 100 ^(6, 7) ส่วนในผู้ป่วย PCP ในกลุ่ม non-HIV นั้น เนื่องจาก inoculum size มักมีปริมาณน้อยกว่า staining tests จึงมักจะให้ผลลบ มีรายงานความไวเพียงร้อยละ 38 - 58 เท่านั้น^(8, 9) การวินิจฉัยผู้ป่วยในกลุ่มนี้ จึงจำเป็นต้องอาศัย adjunct tests อื่น ๆ รวมด้วย สำหรับการย้อมสี (รูปที่ 1) *P. jirovecii* สามารถย้อมติดสีได้หลายชนิด อาจใช้วิธี Giemsa ซึ่งไม่ทำให้ผนัง cyst ติดสี จึงพอเห็นลักษณะวงใส ๆ เส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 5 - 8 ไมครอน ภายในจะพบ intracystic bodies 8 ตัว ติดสีน้ำเงิน ส่วนวิธีการย้อมสีผนัง cyst ทำได้โดยใช้ toluidine blue-o ผนัง cyst จะติดสีน้ำเงิน ถ้าใช้ Grocott-Gromori's methenamine silver (GMS) ผนัง cyst จะติดสีดำ ในปัจจุบันยังมีการพัฒนาวิธีย้อมสีโดยอาศัย antibody ต่าง ๆ เช่น calcofluor white (nonspecific fluorescent stain) และ

โดยเฉพาะการย้อมด้วย fluorescent stain โดยใช้ specific monoclonal antibody (indirect fluorescence assay, IFA) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมทำมากที่สุด เนื่องจากความไวของ IFA ดีกว่าการตรวจหาเชื้อโดยวิธีย้อมสี และสามารถเพิ่มอัตราการตรวจพบได้มากขึ้น⁽¹⁰⁾ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถให้ข้อมูลได้มาก แต่ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง มีรายงานอัตราการตรวจพบประมาณร้อยละ 50 - 90^(6, 11) ซึ่งในผู้ป่วย PCP กลุ่ม non-HIV จะมีอัตราการตรวจพบเชื้อต่ำกว่ามาก เนื่องจากมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าผู้ป่วยกลุ่ม HIV ดังนั้นการตรวจเพื่อให้ได้ผลบวกที่ชัดเจน ขึ้นกับข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ทักษะของผู้ตรวจทางห้องปฏิบัติการ ปริมาณเชื้อในสิ่งส่งตรวจ ปริมาณเชื้อในปอด วิธีการตรวจ และคุณภาพของสิ่งส่งตรวจ การตรวจพบเชื้อจะทำได้ยากขึ้นถ้าผู้ป่วยรับประทานยาต้านไวรัส เช่น กรณีสผู้ที่ติดเชื้อ HIV หรือได้รับยาป้องกัน PCP (chemoprophylaxis) ซึ่งทำให้มีปริมาณการติดเชื้อในระดับต่ำ ⁽¹²⁾ บ่อยครั้งการวินิจฉัย PCP จึงมักต้องการข้อมูลเพิ่มเติมจาก serologic markers ต่าง ๆ การตรวจทางรังสีวินิจฉัยรวมถึงการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR)

ตัวบ่งชี้ในเลือด (Serologic markers)

(1-3)-beta-D-glucan (BDG)

BDG เป็น polysaccharide ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ fungal cell walls กระตุ้นให้เกิดปอดอักเสบ สามารถพบได้ในเลือดของผู้ป่วย PCP และ invasive fungal infections อื่น ๆ เช่น candidiasis, aspergillosis⁽¹³⁾ ยกเว้น cryptococcosis และ mucormycosis^(14, 15) BDG ไม่ใช่ pneumocystis-specific component การตรวจ serum BDG มีข้อดีในแง่ของการเป็น non-invasive test และมี diagnostic accuracy ที่ดีในการแยกแยะระหว่าง invasive กับ non-invasive fungal infections⁽¹⁶⁾ ในปี พ.ศ. 2555 มี meta-analysis จากการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลจากประชากรที่หลากหลาย พบว่าการตรวจ serum BDG



รูปที่ 1. การย้อมสี *Pneumocystis jirovecii* จาก bronchopulmonary lavage: (A, B) Giemsa stain, octonucleated cyst. (C) Gomori methenamine silver stain. (D) Toluidine blue stain. (E, F) Immunofluorescence stain, trophic and cystic stage. ขนาดของ cyst ประมาณ 7 – 8 ไมครอน (ภาพถ่ายโดย ศ.ดร.นพ.สมชาย จงวุฒิเวศย์)

มี pooled sensitivity ร้อยละ 96 และความจำเพาะร้อยละ 84⁽¹⁷⁾ ในปี พ.ศ. 2558 มีรายงานลักษณะเดียวกันโดย meta-analysis พบว่าการตรวจดังกล่าวมีความไวร้อยละ 92 และความจำเพาะร้อยละ 78 ในกลุ่ม PCP ที่มีการติดเชื้อ HIV ส่วนในกลุ่ม PCP ที่ไม่มีการติดเชื้อ HIV พบว่ามีความไวร้อยละ 85 และความจำเพาะร้อยละ 73⁽¹⁸⁾

ในปี พ.ศ. 2560 มีรายงานเปรียบเทียบระดับของ serum BDG ในผู้ป่วย PCP, candidiasis, aspergillosis, tuberculosis กับอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง พบว่าที่ cut-off BDG value มากกว่า 64.21 pg/ml สามารถช่วยแยกโรค PCP ออกจากผู้ป่วยวัณโรคปอดและผู้ที่สุขภาพดีได้โดยมีความไวร้อยละ 87, ความจำเพาะร้อยละ 70, positive predictive value (PPV) ร้อยละ 78, negative predictive value (NPV) ร้อยละ 78⁽¹⁴⁾ สำหรับการศึกษานี้ meta-analysis รายงานว่ามีความไวร้อยละ 95 และความจำเพาะร้อยละ 86⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาในปี พ.ศ. 2557 โดยศึกษาใน

กลุ่มผู้ป่วย HIV ที่มีภาวะ PCP โดยใช้ serum BDG ที่ cut-off value 300 pg/ml พบว่าให้ความไว, ความจำเพาะ, PPV, NPV เท่ากับร้อยละ 91, 92, 89, 93 ตามลำดับ โดยให้ผลดีกว่าการตรวจ BDG จาก bronchoalveolar lavage หรือ serum procalcitonin อีกด้วย⁽²⁰⁾ จากงานวิจัยหลายชิ้น แสดงให้เห็นว่า ยังมีปัญหาหลายประการในการใช้ระดับ serum BDG ในการวินิจฉัย PCP เช่น การไม่มี cut-off value ที่เป็นมาตรฐานที่ชัดเจน (โดยในหลายงานวิจัย พบว่า cut-off value สำหรับ PCP diagnosis สูงกว่า invasive aspergillosis or candidiasis) เทคนิคการตรวจหาระดับ serum BDG ยังมีความแตกต่างกันระหว่างห้องปฏิบัติการ การตรวจพบ positive BDG ไม่มีความจำเพาะมากพอที่จะใช้วินิจฉัย PCP ส่วนในประเด็นที่ว่าระดับ serum BDG มีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อในร่างกาย รวมทั้งการตอบสนองต่อการรักษาหรือไม่นั้น มีหลายการศึกษาที่ให้ผลไม่ตรงกัน^(21, 22) ดังนั้น จึงยังไม่ได้ข้อสรุปถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว

อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2561 มีรายงานเทคนิคใหม่ในการตรวจ BDG (turbidimetric BDG)⁽²³⁾ ทำการศึกษาในผู้ป่วย PCP ที่ตรวจวินิจฉัยโดยวิธี PCR (PCP with positive qPCR) จำนวน 73 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ที่สงสัยว่าจะติดเชื้อดังกล่าวแต่ผลการตรวจ PCR ให้ผลลบ (suspected PCP with negative qPCR) จำนวน 25 ราย โดยใช้ turbidimetric BDG assay และใช้ค่า cut-off value 11 pg/ml พบว่าการตรวจดังกล่าวให้ค่าความไวร้อยละ 86 - 91 และความจำเพาะร้อยละ 100 ระดับ BDG ไม่สัมพันธ์กับปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจพบในปัจจุบันระดับ serum BDG จึงถูกใช้เป็น adjunct test ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ในการช่วยวินิจฉัย PCP และน่าจะมีประโยชน์มากกว่าในแง่ของการช่วยแยกโรคจากการติดเชื้อ invasive fungal infection ได้⁽¹⁴⁾

Lactate dehydrogenase (LDH)

เป็นที่ทราบกันดีว่า LDH เป็นตัวบ่งชี้ไม่จำเพาะซึ่งสามารถตรวจพบและมีปริมาณสูงขึ้นได้ ทั้งในโรคติดเชื้อ และไม่ใช้โรคติดเชื้อหลายชนิด การเพิ่มขึ้นของ serum LDH มีความเกี่ยวข้องกับปอดอักเสบ และการบาดเจ็บที่ปอดมากกว่าที่จะเป็นตัวบ่งชี้ไม่จำเพาะสำหรับการติดเชื้อ *P. jirovecii*⁽²⁴⁾ นอกจากความไม่จำเพาะของการทดสอบแล้ว LDH ยังไม่มีมาตรฐานของ cut-off value ที่ชัดเจน มีรายงานการใช้ positive value ของ LDH ระหว่าง 200 - 598 U/L มีรายงานความไวระหว่างร้อยละ 80 - 100 และความจำเพาะของ LDH สำหรับการวินิจฉัย PCP แตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 6 - 85⁽²⁵⁾ ดังนั้น serum LDH เพียงอย่างเดียวจึงไม่ได้ถูกใช้ในการวินิจฉัย PCP มีรายงานที่น่าสนใจกล่าวถึงการตรวจ biomarkers หลายชนิด เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย PCP ที่มีการติดเชื้อ HIV กลุ่มที่เป็น survivors และ non-survivors ทั้งหมด 32 ราย โดยตรวจ serum biomarkers ในวันแรกที่รับไว้ในโรงพยาบาล พบว่า LDH ($P = 0.006$), hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH $P = 0.002$),

d-dimer ($P = 0.047$) และ ferritin ($P = 0.033$) มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย LDH, HBDH และ ferritin ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ acute respiratory distress syndrome (ARDS) อีกด้วย⁽²⁶⁾

S-adenosylmethionine (SAM, AdoMet)

SAM เป็น biochemical intermediate ที่พบได้ในกระบวนการทำงานของเซลล์ทั่วไป ทั้งนี้ *P. jirovecii* ไม่สามารถสังเคราะห์สารนี้ได้เอง เนื่องจากขาดเอนไซม์ S-adenosylmethionine synthase จำเป็นต้องใช้ exogenous SAM การตรวจพบระดับ SAM ในปริมาณที่ต่ำ จึงน่าจะมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *P. jirovecii* มีการศึกษาเปรียบเทียบระดับ SAM ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ PCP ในผู้ป่วย HIV กับผู้ป่วยกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ ผู้ติดเชื้อ HIV ที่ไม่ปรากฏอาการ (asymptomatic HIV infection) ปอดอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย วัณโรค ปอด cryptococcosis การติดเชื้ออื่น ๆ และผู้ที่มีสุขภาพดี พบว่าระดับ SAM ในผู้ป่วย PCP ต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีระดับ SAM เพิ่มขึ้นจนเข้าสู่ระดับปกติหลังจากได้รับการรักษาที่มีประสิทธิภาพ⁽²⁷⁾ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาสนับสนุน และรายงานระดับความไวและความจำเพาะสูงมากกว่าร้อยละ 90 สำหรับการตรวจชนิดนี้⁽²⁸⁾ อย่างไรก็ตาม ยังมีหลายการศึกษาให้ผลที่แตกต่างในทางตรงกันข้าม ไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของระดับ SAM กับภาวะ PCP และผลการรักษา^(21, 29) ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ความแตกต่างของวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากผลงานวิจัยยังไม่ชัดเจน ร่วมกับชุดตรวจที่มีราคาแพง การตรวจชนิดนี้ จึงยังไม่ถูกใช้จริงในทางคลินิก

Serum major surface glycoprotein (MSG) antibody level

MSG protein เป็น glycosylated protein ที่สร้างโดย *P. jirovecii* มีหลาย isoforms และมีความผันแปรในรูปแบบของแอนติเจน (antigenic variations)

เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่สำคัญ มี immunological assays ใหม่ ๆ ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้ recombinant MSG protein ตำแหน่งต่าง ๆ เช่น MSG-A (amino acid residues 15 - 119), MSG-B (amino acid residues 729 - 2282) และ MSG-C (amino acid residues 2015 - 3332)⁽³⁰⁾ มีรายงานการตรวจหา MSG-C โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในกลุ่มผู้ป่วย PCP ที่มีการติดเชื้อ HIV จำนวน 110 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยปอดอักเสบจากสาเหตุอื่น ๆ ในผู้ที่ติดเชื้อ HIV ได้ผลความไว, ความจำเพาะ, PPV ต่อ IgG เพียงร้อยละ 59.7, 61.3 และ 71.5 ตามลำดับ การตรวจ IgM ให้ผลความไวและความจำเพาะไม่แตกต่างกัน การตรวจระดับ IgG ที่เวลาหนึ่ง ไม่สามารถชี้แยกภาวะการติดเชื้อในปัจจุบันออกจากติดเชื้อในอดีตได้ การติดตามการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี 4 เท่า อาจช่วยแยกภาวะการติดเชื้อในปัจจุบันออกจากติดเชื้อในอดีต อย่างไรก็ตาม มีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีในเลือดต่อ MSG ที่ให้ผลบวกในผู้ที่มีสุขภาพดี ดังนั้นในปัจจุบันการตรวจพบแอนติบอดีในเลือดต่อ MSG จึงยังไม่ถูกใช้จริงในทางคลินิก เนื่องจากยังมีข้อโต้แย้งของผลการศึกษาความไวและความจำเพาะ ที่ต่ำมาก (ประมาณร้อยละ 60 - 70)⁽³¹⁾

การถ่ายภาพปอด (Chest imaging)

Chest X-ray (CXR)

ผู้ที่มีภาวะ PCP มักให้ผลการตรวจ CXR ที่มีลักษณะเป็น bilateral perihilar interstitial infiltrate หรือ patchy consolidation ร่วมกับ bilateral interstitial infiltrates⁽³²⁾

Thoracic ultrasound

Thoracic ultrasonography เป็นวิธี non-invasive ที่มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคติดเชื้อในปอดและภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี ในปีพ.ศ. 2551 มีรายงานการนำเสนอ BLUE protocol⁽³³⁾ เป็น step-by-

step approach ในผู้ป่วยที่มี acute dyspnea หรือ acute respiratory failure ส่วนในผู้ป่วย PCP มีรายงานการใช้ thoracic ultrasound ในการช่วยวินิจฉัย⁽³⁴⁾ โดยการตรวจพบ B-lines, subpleural consolidations และ cystic changes เป็นลักษณะที่ช่วยวินิจฉัย PCP ในขณะที่ lung consolidation ร่วมกับ air bronchograms และ pleural effusion เป็นลักษณะที่ทำให้คิดถึงการติดเชื้อชนิดอื่น การตรวจ thoracic ultrasound มีประโยชน์อย่างมากโดยเฉพาะในพื้นที่ ๆ มีทรัพยากรจำกัด เช่น ไม่มี CXR

High-resolution computed tomography (HRCT)

HRCT สามารถช่วยในการวินิจฉัย interstitial lung diseases หรือ diffuse parenchymal lung diseases ได้ดี สำหรับ PCP มีรายงานการตรวจพบลักษณะต่าง ๆ จาก HRCT หลายรูปแบบ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม HIV และ non-HIV โดยทั่วไปการตรวจ HRCT ที่พบในกลุ่ม PCP ที่ติดเชื้อ HIV ได้แก่ diffuse ground glass opacity (GGO) ส่วนในกลุ่ม PCP ที่ไม่มีการติดเชื้อ HIV มักพบได้หลายรูปแบบ เช่น consolidation, nodules, cysts, pneumothorax, reticulation และ septal thickening สำหรับ pleural effusion มักพบได้ไม่บ่อยในผู้ป่วย PCP โดยลักษณะของ GGO อาจพัฒนาต่อไปเป็น consolidation lesions ได้^(35 - 37) ในแง่ของการวินิจฉัย PCP มีรายงานการศึกษาในกลุ่มที่ไม่ได้ติดเชื้อ HIV ว่าการใช้ลักษณะที่ตรวจพบโดย HRCT (diffuse GGO และ mosaic pattern) ร่วมกับ serum marker (BDG) มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัย PCP ได้⁽³⁸⁾ ในเรื่องการประเมินภาวะความรุนแรงของโรคและอัตราการเสียชีวิต มีรายงานการศึกษาในผู้ป่วย PCP ที่ไม่มีการติดเชื้อ HIV 40 ราย พบว่า mean lung attenuation (MLA) และขอบเขตของ lung attenuation (extent of increased lung attenuation, EIA) ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับ PaO₂/FiO₂ ratio และ APACHE II score มีข้อสรุปของงานวิจัยชี้ให้เห็นว่า MLA มีความ

สัมพันธ์กับภาวะความรุนแรงของโรค แต่ไม่สัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิต⁽³⁹⁾

เทคนิคระดับโมเลกุล (Molecular techniques)

Polymerase chain reaction (PCR)

ข้อดีของการตรวจโดยวิธี PCR คือ มีความไวและความจำเพาะที่ดีกว่าการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการตรวจโดยวิธี IFA มาก มีการพัฒนาการตรวจโดยวิธี PCR โดยใช้ยีนหรือดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. jirovecii* ที่แตกต่างกันมาก เช่น 18S rRNA, 5S rRNA, mitochondrial large subunit rRNA (mtLSUrRNA), dihydrofolate reductase (DHFR), dihydropteroate synthase (DHPS), MSG, cdc2 และ heat shock protein 70 (HSP70) ทั้งนี้ mtLSUrRNA ให้ผลการศึกษาที่ดีที่สุด⁽⁴⁰⁾ มีการศึกษาทบทวน (systemic review) วิเคราะห์ 16 การศึกษา รายงานความไวร้อยละ 8.3 และความจำเพาะร้อยละ 91.0 ในการใช้ PCR เพื่อการวินิจฉัย PCP⁽⁴¹⁾ นอกจากนี้ conventional PCR แล้ว nested PCR สามารถเพิ่มความไวได้โดยความจำเพาะไม่ลดลง วิธีนี้ สามารถใช้ได้ทั้งในผู้ป่วย PCP ที่มีการติดเชื้อ HIV และไม่มีการติดเชื้อ HIV ด้วย อย่างไรก็ตามวิธี PCR ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญที่ทำให้ยังไม่สามารถใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่ การมีความไวที่สูง ทำให้ conventional/nested PCR มีปัญหาในการแยกแยะระหว่างภาวะการติดเชื้อจริง (true infection) และภาวะ colonization (ภาวะที่ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. jirovecii* โดยไม่มีอาการของโรค ซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 20 ของผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติ⁽⁴²⁾) จึงมีการใช้ real-time quantitative PCR และใช้ threshold value ของ fungal load ในการแยกแยะระหว่าง infection และ colonization เช่น มีการศึกษาหนึ่งสรุปว่า ถ้า qPCR ให้ผล > 56,000 copies/ml จะมีความจำเพาะร้อยละ 100 ถ้าน้อยกว่าต้องอาศัยข้อมูลทางคลินิกประกอบ (clinical clues) และการตรวจโดยวิธีอื่น ๆ ร่วมด้วย ส่วน optimal threshold สำหรับภาวะ colonization คือ fungal load < 10,100 copies/ml⁽⁴³⁾

ในขณะที่บางรายงาน เสนอ optimal threshold สำหรับภาวะ colonization ที่ 1,300 copies/ml⁽⁴⁴⁾ จะเห็นได้ว่าเป็นการยากที่จะกำหนด threshold value ของ fungal load ให้เป็นมาตรฐานสากล เนื่องจากยังไม่มีชุดตรวจที่เป็นมาตรฐาน และยังมีขั้นตอนหรือวิธี PCR ที่แตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ⁽⁴⁵⁾ PCR จึงยังไม่ได้ใช้เป็นการตรวจโดยทั่วไปสำหรับการวินิจฉัย PCP ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามประโยชน์ที่ชัดเจนอย่างหนึ่งคือ การมี negative predictive value ใกล้เคียงร้อยละ 100 จึงมีคำแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญให้ใช้ได้ในการแยกโรค PCP ได้⁽⁹⁾

Cultivation and propagation of *P. jirovecii*

เป็นเวลากว่า 1 ศตวรรษตั้งแต่ *Pneumocystis* spp. ถูกรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2452 โดย Professor Carlos Chaga ซึ่งเข้าใจผิดว่าเป็นระยะหนึ่งของ *Trypanosoma cruzi* ซึ่งเชื้อ *Pneumocystis* ได้รับการตรวจพบ และรายงานอย่างถูกต้องในปี พ.ศ. 2455 โดย Delanoé และคณะ ได้พบเชื้อดังกล่าวในปอดหนู และตั้งชื่อว่า *Pneumocystis carinii* โดยได้รับการจัดอนุกรมวิธาน (taxonomy) ที่ถูกต้องในปี พ.ศ. 2531 ในยุคที่มนุษย์รู้จักการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ จากนั้นในปี พ.ศ. 2542 *Pneumocystis* spp. ที่เป็นเชื้อก่อโรค PCP ในมนุษย์ จึงได้รับชื่อว่า *Pneumocystis jirovecii* มนุษย์ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ภายในห้องทดลองได้ อันเป็นอุปสรรคต่อการศึกษาชีววิทยาจุลชีพก่อโรค, สรีรวิทยา, กลไกระดับเซลล์ต่าง ๆ รวมถึงการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา, ความไวต่อยาและดื้อยา จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2557 มีรายงานความสำเร็จครั้งแรกในการเพาะเลี้ยง *P. jirovecii*⁽⁴⁶⁾ โดยทีมนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน โดยใช้ differentiated pseudostratified airway epithelial cell line (CuFi-8 cell) inoculated ใน bronchoalveolar fluid เพาะเลี้ยงใน three-dimensional air-liquid interface culture system ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก เชื้อ *P. jirovecii* ที่เพาะเลี้ยงได้นี้ สามารถกระตุ้นให้เกิด cytopathic effects ต่อ lung epithelial cells และแสดง

ให้เห็นถึง invasiveness ใน cell culture system เนื่องจากการค้นพบใหม่ที่ยังไม่แพร่หลายมากนัก เชื่อว่าวิธีการเพาะเลี้ยง *P. jirovecii* นี้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษา *P. jirovecii* ในเรื่องต่างๆ เช่น เซลล์ชีววิทยา, การศึกษาระดับโมเลกุล, ภูมิคุ้มกันวิทยา และเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Frenkel JK. *Pneumocystis pneumonia*, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46:89S-92S.
2. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002;8:891-6.
3. 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* 1988;334:519-22.
4. Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1098-107.
5. Tasaka S, Tokuda H, Sakai F, Fujii T, Tateda K, Johkoh T, et al. Comparison of clinical and radiological features of *pneumocystis pneumonia* between malignancy cases and acquired immunodeficiency syndrome cases: a multicenter study. *Intern Med* 2010;49: 273-81.
6. Silva RM, Bazzo ML, Borges AA. Induced sputum versus bronchoalveolar lavage in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii pneumonia* in human immunodeficiency virus-positive patients. *Braz J Infect Dis* 2007;11: 549-53.
7. Tia T, Putaporntip C, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S. A highly sensitive novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:598-603.
8. Fillatre P, Revest M, Belaz S, Robert-Gangneux F, Zahar JR, Roblot F, et al. *Pneumocystis* in non-HIV-infected immunocompromised patients. *Rev Med Interne* 2016;37:327-36.
9. Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, Bele N, Schlemmer B, Menotti J. Polymerase chain reaction for diagnosing *pneumocystis pneumonia* in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest* 2009;135:655-61.
10. Kaur R, Wadhwa A, Bhalla P, Dhakad MS. *Pneumocystis pneumonia* in HIV patients: a diagnostic challenge till date. *Med Mycol* 2015;53:587-92.
11. Thomas CF Jr, Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med* 2004;350:2487-98.
12. Tasaka S, Tokuda H. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii pneumonia* in HIV-infected adults. *Expert Opin Med Diagn* 2013;7:85-97.
13. Morris AM, Masur H. A serologic test to diagnose *pneumocystis pneumonia*: are we there yet? *Clin Infect Dis* 2011;53:203-4.
14. Son HJ, Sung H, Park SY, Kim T, Lee HJ, Kim SM, et al. Diagnostic performance of the (1-3)-beta-D-glucan assay in patients with

- Pneumocystis jirovecii* compared with those with candidiasis, aspergillosis, mucormycosis, and tuberculosis, and healthy volunteers. PLoS One 2017;12:e0188860.
15. Pini P, Bettua C, Orsi CF, Venturelli C, Forghieri F, Bigliardi S, et al. Evaluation of serum (1 → 3)-beta-D-glucan clinical performance: kinetic assessment, comparison with galactomannan and evaluation of confounding factors. Infection 2016;44:223-33.
 16. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2011;52:750-70.
 17. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for *pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol 2012;50:7-15.
 18. Li WJ, Guo YL, Liu TJ, Wang K, Kong JL. Diagnosis of *pneumocystis* pneumonia using serum (1-3)-beta-D-Glucan: a bivariate meta-analysis and systematic review. J Thorac Dis 2015;7:2214-25.
 19. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of beta-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect 2013;19:39-49.
 20. Salerno D, Mushatt D, Myers L, Zhuang Y, de la RN, Calderon EJ, et al. Serum and bal beta-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV positive patients. Respir Med 2014;108:1688-95.
 21. de Boer MG, Gelinck LB, van Zelst BD, van de Sande WW, Willems LN, van Dissel JT, et al. beta-D-glucan and S-adenosylmethionine serum levels for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-negative patients: a prospective study. J Infect 2011;62:93-100.
 22. Held J, Koch MS, Reischl U, Danner T, Serr A. Serum (1 → 3)-beta-D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. Clin Microbiol Infect 2011;17:595-602.
 23. Dichtl K, Seybold U, Wagener J. Evaluation of a turbidimetric beta-D-glucan test for the detection of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. J Clin Microbiol 2018;pii:JCM.0286-18.
 24. Quist J, Hill AR. Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, and bacterial pneumonia. Chest 1995;108:415-8.
 25. Deng C, Li Y, Li Y. Systemic review: the accuracy of lactic dehydrogenase in the diagnosis of *pneumocystis* pneumonia. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue 2018;30:322-6.
 26. Sun J, Su J, Xie Y, Yin MT, Huang Y, Xu L, et al. Plasma IL-6/IL-10 ratio and IL-8, LDH, and HBDH level predict the severity and the risk of death in AIDS patients with *Pneumocystis* pneumonia. J Immunol Res 2016;2016:1583951.
 27. Skelly M, Hoffman J, Fabbri M, Holzman RS, Clarkson AB Jr, Merali S. S-adenosyl-

- methionine concentrations in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet 2003;361:1267-8.
28. Skelly MJ, Holzman RS, Merali S. S-adenosyl-methionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. Clin Infect Dis 2008;46: 467-71.
 29. Esteves F, Cale SS, Badura R, de Boer MG, Maltez F, Calderon EJ, et al. Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers. Clin Microbiol Infect 2015;21:379-10.
 30. Daly KR, Fichtenbaum CJ, Tanaka R, Linke MJ, O'Bert R, Thullen TD, et al. Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jirovecii* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons. J Infect Dis 2002; 186:644-51.
 31. Djawe K, Huang L, Daly KR, Levin L, Koch J, Schwartzman A, et al. Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of P. jirovecii pneumonia in HIV+ patients. PLoS One 2010; 5:e14259.
 32. Lu JJ, Lee CH. *Pneumocystis* pneumonia. J Formos Med Assoc 2008;107:830-42.
 33. Lichtenstein DA, Meziere GA. Relevance of lung ultrasound in the diagnosis of acute respiratory failure: the BLUE protocol. Chest 2008;134: 117-25.
 34. Giordani MT, Tamarozzi F, Kaminstein D, Brunetti E, Heller T. Point-of-care lung ultrasound for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: notes from the field. Crit Ultrasound J 2018;10:8.
 35. Kuhlman JE. *Pneumocystic* infections: the radiologist's perspective. Radiology 1996; 198:623-35.
 36. Hartman TE, Primack SL, Muller NL, Staples CA. Diagnosis of thoracic complications in AIDS: accuracy of CT. AJR Am J Roentgenol 1994; 162:547-53.
 37. Lichtenberger JP 3rd, Sharma A, Zachary KC, Krishnam MS, Greene RE, Shepard JA, et al. What a differential a virus makes: a practical approach to thoracic imaging findings in the context of HIV infection—part 1, pulmonary findings. AJR Am J Roentgenol 2012;198: 1295-304.
 38. Kunihiro Y, Tanaka N, Matsumoto T, Yamamoto N, Matsunaga N. The usefulness of a diagnostic method combining high-resolution CT findings and serum markers for cytomegalovirus pneumonia and *pneumocystis* pneumonia in non-AIDS patients. Acta Radiol 2015;56:806-13.
 39. Chou CW, Chao HS, Lin FC, Tsai HC, Yuan WH, Chang SC. Clinical Usefulness of HRCT in Assessing the Severity of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: A Cross-sectional Study. Medicine (Baltimore) 2015;94:e768.
 40. Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;58: 385-92.
 41. Fan LC, Lu HW, Cheng KB, Li HP, Xu JF. Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage

- fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. PLoS One 2013;8:e73099.
42. Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Russmann H, Tybus K, Pfaff F, 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.
43. Issa N, Gabriel F, Baulier G, Mourissoux G, Accoceberry I, Guisset O, et al. Pneumocystosis and quantitative PCR. Med Mal Infect 2018;pii:S0399-077X(17)30606-6.
44. Matsumura Y, Ito Y, Iinuma Y, Yasuma K, Yamamoto M, Matsushima A, et al. Quantitative real-time PCR and the (1→3)-beta-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. Clin Microbiol Infect 2012; 18:591-7.
45. Roux A, Gonzalez F, Roux M, Mehrad M, Menotti J, Zahar JR, et al. Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. Med Mal Infect 2014;44:185-98.
46. Schildgen V, Mai S, Khalfaoui S, Lusebrink J, Pieper M, Tillmann RL, et al. *Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells. MBio 2014; 5:e01186-14.