

# Pemeriksaan *Real-time* PCR dalam Diagnosis Pneumonia *Pneumocystis*

Anna Rozaliyani,<sup>\*\*\*</sup> Budhi Antariksa,<sup>\*</sup> Dianiati K.S.,<sup>\*</sup> Retno Wahyuningsih<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Departemen Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi FKUI

<sup>\*\*</sup> Departemen Parasitologi FKUI

---

## Real-Time PCR Assay in the Diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia

### ABSTRACT

*Pneumocystis* pneumonia (PCP) is an important opportunistic infection in HIV-infected patients and other immune system disorders. Diagnosis of PCP remains a challenge because the clinical symptoms, routine laboratory and radiological examinations are not typical. The proven diagnosis must be performed by finding *P. jiroveci* in histopathologic preparations with conventional or immunocytochemical stained that require special clinical specimens, high laboratory skills and time consumed. The development of molecular biology using polymerase chain reaction method (PCR) allows diagnosis of PCP from more easily obtained specimens, but can not distinguish the circumstances of commensal with pathogens. Development of real time PCR allows the quantitative examination to distinguish that circumstances in less time.

**Key words :** *P. jiroveci*, diagnosis, real-time PCR

### Pendahuluan

Pneumonia *Pneumocystis* (*Pneumocystis pneumonia*, PCP) adalah peradangan paru oleh *Pneumocystis jiroveci* yang sebelumnya dikenal sebagai *Pneumocystis carinii*. Penyakit itu merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian pada pasien dengan gangguan sistem imun diantaranya pasien terinfeksi HIV, penyakit keganasan, penerima transplantasi organ atau terapi immunosupresi.<sup>1-3</sup> Pada saat epidemi AIDS tahun 1980an, insidens PCP di Amerika Serikat meningkat mencapai 20.000 kasus pertahun pada pasien dengan hitung sel CD4<sup>+</sup> (*cluster of differentiation*) leukosit kurang dari 200 sel/mm<sup>3</sup>.<sup>1,2,4</sup> Penelitian di Amerika Serikat dan Eropa menunjukkan bahwa 80% pasien terinfeksi HIV tanpa terapi profilaksis akan menderita PCP.<sup>5</sup> Pemberian *highly active antiretroviral therapy* (HAART) menurunkan insidens PCP 3,4% setiap tahunnya, tetapi penyakit tersebut masih menjadi infeksi oportunistik penting pada pasien AIDS serta pasien dengan gangguan sistem imun lain.<sup>1,2,5-8</sup> Beberapa penelitian terkini melaporkan kolonisasi asimtomatik *P. jiroveci* pada pasien penyakit paru kronik, bahkan pada orang dewasa sehat/tanpa gejala penyakit apapun.<sup>9-11</sup>

Sampai saat ini *Pneumocystis* belum dapat dibiak dalam medium *in vitro*, sehingga diagnosis pasti PCP masih bergantung pada penemuan mikroorganisme tersebut dalam sediaan histopatologi dengan pewarnaan konvensional maupun immunositokimia. Teknik tersebut membutuhkan spesimen klinis khusus, keterampilan laboratorium tinggi serta waktu pemeriksaan lama.<sup>12,13</sup> Perkembangan biologi molekular menggunakan metode reaksi rantai polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) memungkinkan deteksi *P. jiroveci* dalam berbagai spesimen klinis yang lebih mudah diperoleh misalnya dari induksi sputum atau bilasan kumur. Sensitivitas dan spesifisitasnya tinggi meskipun memiliki beberapa kekurangan, diantaranya tidak dapat membedakan *P. jiroveci* sebagai koloni komensal atau patogen di saluran napas.<sup>13-15</sup> Pengembangan PCR waktu nyata (*real-time* PCR) memungkinkan pemeriksaan secara kuantitatif untuk membedakan hal tersebut dalam waktu lebih singkat.<sup>15,16</sup>

### Masalah diagnostik PCP

Sejak pertama kali ditemukan Chagas (1909), *Pneumocystis* dianggap sebagai protozoa, sampai

analisis DNA pada tahun 1988 membuktikan bahwa *Pneumocystis* merupakan golongan jamur tanpa komponen ergosterol pada dinding selnya. Perkembangan sistem binomial berdasarkan analisis DNA pada tahun 1999 selanjutnya mengelompokkan *P. carinii* menjadi *P. carinii f. sp. hominis (P. jiroveci)* yang hanya ditemukan pada manusia dan *P. carinii f. sp. carinii (P. carinii)* yang ditemukan pada hewan mamalia.<sup>3,4</sup>

Patogenesis PCP masih belum dipahami sepenuhnya meskipun banyak penelitian dilakukan. Beberapa penelitian menemukan antibodi spesifik terhadap *P. jiroveci* pada awal usia kanak-kanak yang mengindikasikan paparan berulang terhadap organisme ini. Selanjutnya *P. jiroveci* menetap sebagai saprofit di paru atau menyebabkan infeksi subklinis ringan. Berdasarkan data tersebut timbulnya PCP diduga berasal dari reaktivasi infeksi laten semasa kanak-kanak.<sup>dikutip dari 11</sup>

Kemungkinan cara lain adalah penyebaran *P. jiroveci* antarmanusia melalui udara. Hal itu berdasarkan penelitian wabah PCP pada kelompok pasien transplantasi organ solid dan onkologi, ditemukannya DNA *P. jiroveci* pada saluran pernapasan atas petugas kesehatan yang berkontak erat dengan pasien PCP, serta dalam udara di lingkungan ruang perawatan pasien PCP.<sup>11,17-19</sup> Berbagai situasi tersebut menunjukkan kemungkinan kolonisasi *P. jiroveci* atau kondisi *carrier* (pasien terinfeksi yang tidak menunjukkan gejala klinis). Pasien PCP maupun *carrier* dianggap berperan penting sebagai sumber infeksi. Penelitian terkini menunjukkan bahwa anak-anak atau masyarakat umum yang sehat dapat berperan sebagai sumber infeksi berdasarkan penemuan DNA *P. jiroveci* pada orang-orang tersebut.<sup>11,20</sup>

Diagnosis PCP masih menjadi tantangan karena gejala klinis, pemeriksaan laboratorium rutin dan radiologi tidak khas. Gejala klinis PCP dapat berupa demam, batuk kering (non-produktif), sesak napas, atau rasa berat di dada. Gejala tambahan atau prodromal mungkin dapat timbul dalam jangka waktu beberapa bulan sebelum gejala klinis lain muncul.

Pemeriksaan fisis juga tidak khas; dapat ditemukan demam, takikardi atau takipnea.<sup>1,8</sup>

Hasil pemeriksaan laboratorium rutin juga tidak khas; total hitung leukosit dapat sedikit meningkat, serum laktat dehidrogenase (LDH) dapat meningkat tetapi hal itu lebih menggambarkan proses inflamasi paru dibandingkan petanda khusus PCP. Analisis gas darah dapat memperlihatkan hasil hipoksemia, hipokarbia, dan peningkatan *alveolar-arterial oxygen gradient* (AaDO<sub>2</sub>). Hasil normal dapat ditemukan pada 20% pasien dengan gejala sangat ringan, tetapi hal itu tidak boleh menyebabkan kelalaian untuk mengevaluasi pasien dengan gejala klinis mirip PCP, meskipun tidak khas dan hitung sel CD4<sup>+</sup> kurang dari 200 sel/mm<sup>3</sup>.<sup>1,8,21</sup>

Diagnosis pasti ditegakkan dengan menemukan kista atau trofozoit *Pneumocystis* dalam sediaan klinis pasien misalnya bilasan bronkus, biopsi dan sputum induksi. Pewarnaan konvensional yang paling sering digunakan adalah *gomori methenamine silver* (GMS) untuk mendeteksi dinding kista, serta giemsa dengan modifikasi untuk mendeteksi semua stadium *Pneumocystis*.<sup>1,12,21,22</sup> Sensitivitas pewarnaan tersebut dalam mendeteksi *Pneumocystis* dari sediaan bilasan bronkus mencapai 70-92%, bila dikombinasikan dengan pemeriksaan sediaan biopsi transbronkial sensitivitasnya dapat mencapai 100%.<sup>12</sup> Induksi sputum merupakan prosedur pemeriksaan yang lebih sederhana serta non-invasif dibandingkan bilasan bronkus atau biopsi transbronkial, tetapi sensitivitasnya menggunakan pewarnaan konvensional hanya 35 - 78%. Pengembangan teknik pewarnaan imunositokimia dilaporkan meningkatkan sensitivitas pemeriksaan induksi sputum hingga 97%.<sup>5,12,17</sup>

Pemeriksaan PCR dilaporkan dapat meningkatkan sensitivitas deteksi *Pneumocystis* hingga 86 - 100% dari sediaan induksi sputum. Beberapa penelitian menggunakan PCR telah berhasil mendeteksi *P. jiroveci* pada individu yang sediaan pewarnaannya negatif. Sebagian pasien tersebut memperlihatkan gejala klinis, sebagian lagi tidak, sehingga memungkinkan dugaan

kolonisasi asimtomatik.<sup>13,14</sup> Pemeriksaan *P. jiroveci* secara kuantitatif menggunakan *real-time* PCR memungkinkan dibedakannya kolonisasi komensial dengan patogen secara cepat dan akurat.<sup>15,16</sup> Untuk memahami prinsip pemeriksaan *real-time* PCR, diperlukan pengetahuan tentang dasar PCR konvensional.

### PCR konvensional

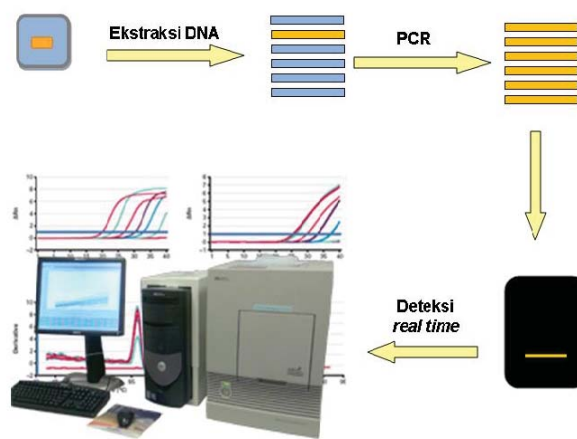
Penemuan PCR adalah salah satu penemuan biologi molekuler terpenting yang membuka wawasan baru dalam berbagai bidang penelitian. Prinsipnya mirip dengan proses replikasi DNA secara alamiah pada pembelahan sel. Proses itu melipatgandakan molekul DNA secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu.<sup>23</sup> Banyaknya siklus yang dilakukan tergantung pada jumlah produk PCR yang diinginkan. Hasil akhir berupa pita DNA berukuran tertentu sesuai dengan perbedaan ukuran basa yang terlihat dalam gel agarose. Pembacaan hasil akhir PCR itu cukup memakan waktu dan tidak bersifat kuantitatif.<sup>24,25</sup>

Para ahli telah menggunakan PCR secara luas dalam prosedur diagnostik berbagai penyakit termasuk penyakit infeksi, misalnya untuk mengidentifikasi galur mikroorganisme, mendeteksi kepekaan kuman terhadap antibiotika, petanda virus, pemetaan epidemiologi, dan lain-lain.<sup>26,27</sup> Pemeriksaan ini memiliki banyak keunggulan misalnya sensitivitas dan spesifisitas tinggi, *reproducibility* yang baik, kemampuan mendeteksi mikroorganisme penyebab infeksi yang tidak dapat dideteksi oleh pemeriksaan konvensional lain, serta memberikan hasil dalam waktu cukup singkat. Kekurangan pemeriksaan PCR diantaranya kemungkinan memberikan hasil positif semu (*false positive*) atau negatif semu (*false negative*), pada beberapa penyakit infeksi sulit dibedakan antara infeksi laten dengan aktif atau organisme komensial dengan patogen, prosedur pemeriksaan sangat kompleks, serta dibutuhkan peralatan mahal.<sup>23,25,26</sup>

### Pemeriksaan *real-time* PCR

Higuchi dkk. berhasil mengembangkan

penggunaan *real-time* PCR menggunakan etidium bromida (EtBr), suatu zat fluoresens pada proses PCR konvensional, yang direaksikan di bawah pencahayaan ultraviolet sehingga menyebabkan EtBr berfluoresens dan proses pelipatgandaan DNA dapat divisualisasikan secara langsung melalui kamera video. Hal itu dapat mengatasi kekurangan prosedur konvensional dalam hal penentuan pelipatgandaan DNA secara kuantitatif. Pada *real-time* PCR, produk DNA hasil pelipatgandaan dideteksi melalui pemantauan intensitas fluoresens selama proses reaksi berjalan dalam waktu sesungguhnya (*real-time*). Beberapa keunggulan pemeriksaan *real-time* PCR dibandingkan PCR konvensional, diantaranya prosedur pemeriksaan lebih mudah dan singkat sehingga dapat menghemat biaya peralatan dan bahan laboratorium yang diperlukan, kemungkinan kontaminasi selama proses analisis di dalam gel agarose dapat dicegah, serta tingkat ketepatan hasil yang sangat tinggi karena langsung diproyeksikan secara kuantitatif saat proses reaksi masih berlangsung.<sup>24,27,28</sup>



Gambar 1. Skema pemeriksaan *real time* PCR memungkinkan deteksi pelipatgandaan DNA pada fase awal reaksi Dimodifikasi dari (24)

### Peran pemeriksaan PCR untuk mendiagnosis PCP

Penggunaan PCR dalam mendiagnosis PCP pertama kali dilaporkan oleh Wakefield dkk.<sup>13</sup> Metode dalam reaksi itu dikembangkan berdasarkan

sikvens gen *P. carinii* pada tikus yang ternyata dapat melakukan pelipatgandaan daerah spesifik pada gen *P. jiroveci*. Metode tersebut meliputi gen target yang menyandi *mitochondrial large subunit ribosomal rRNA* (mt LSU rRNA), *internal transcribed spacer* (Pc-ITS-PCR), 18S rRNA, 5S rRNA, *thymidylate synthase* (TS), *dihydrofolate reductase* (DHFR), serta *dihydropteroate synthetase* (DHPS).<sup>29</sup>

Caliendo dkk<sup>14</sup> dalam penelitiannya membandingkan pemeriksaan PCR dengan *direct fluorescence antibody* (DFA) terhadap 120 spesimen induksi sputum dan 112 spesimen bilasan bronkus yang diperoleh dari pasien imunokompromis (tidak hanya pasien terinfeksi HIV). Sensitivitas pemeriksaan bilasan bronkus menggunakan PCR dilaporkan mencapai 100% dan spesifisitasnya 98%. Pemeriksaan induksi sputum dengan PCR menunjukkan sensitivitas 94% dan spesifisitas 90%, sedangkan dengan DFA sensitivitasnya hanya 82%. Kemampuan PCR memberikan hasil sensitivitas sangat tinggi memungkinkannya digunakan sebagai pemeriksaan penyaring dalam upaya mendeteksi PCP pada populasi yang diduga atau terbukti memiliki prevalensi tinggi. Perlu dipertimbangkan bahwa hasil tersebut mungkin memberikan hasil positif semu, sehingga perlu tetap dikonfirmasi dengan pemeriksaan DFA. Tabel 1 memperlihatkan keunggulan dan kekurangan pemeriksaan PCR dalam diagnosis PCP dibandingkan DFA serta beberapa teknik pemeriksaan konvensional.<sup>5,36</sup>

Tabel 1. Keunggulan dan kekurangan PCR dibandingkan DFA atau teknik konvensional dalam mendiagnosis PCP

Keunggulan	Kekurangan
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi</li> <li>• <i>Reproducibility</i> yang baik</li> <li>• Memungkinkan pemeriksaan terhadap sediaan klinis yang tidak invasif</li> <li>• Memungkinkan dugaan kolonisasi dan perlunya memberikan terapi profilaksis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Belum ada standarisasi</li> <li>• Berpotensi memberikan hasil positif semu dan negatif semu</li> <li>• Sulit membedakan infeksi laten dengan infeksi aktif</li> <li>• Biaya mahal dan prosedur teknis lebih rumit</li> </ul>

Dikutip dari (5,25)

Larsen dkk.<sup>15</sup> mengembangkan teknik *real-time* PCR dalam mendiagnosis PCP. Pemeriksaan itu dapat digunakan pada berbagai

spesimen klinis, termasuk yang berasal dari spesimen non-invasif bilasan kumur. Pasien PCP mengandung mikroorganisme berjumlah lebih banyak dibandingkan pasien infeksi subklinis atau kolonisasi. Hal ini terlihat dari konsentrasi DNA *P. jiroveci* yang diekstraksi lebih banyak pada spesimen klinis yang berasal dari pasien PCP. Teknik ini memberikan hasil dalam waktu singkat yaitu kurang dari tiga jam, memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi, dan ternyata dapat membedakan keadaan kolonisasi atau infeksi subklinis dengan keadaan sakit. Kemampuan membedakan berbagai kondisi tersebut diperoleh dengan cara melakukan penghitungan dan penerapan nilai *cut-off*.<sup>15,16</sup>

### Peran *real-time* PCR untuk diagnosis PCP

Flori dkk.<sup>16</sup> membandingkan pemeriksaan *real-time* PCR dengan PCR konvensional serta teknik pewarnaan dalam diagnosis PCP. Nilai sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan *real-time* PCR adalah 100% dan 84,9%, sementara itu PCR konvensional adalah 100% dan 87%, sedangkan teknik pewarnaan adalah 60% dan 100%. Hasil positif semu menggunakan teknik biologi molekular cukup sering terjadi dibandingkan diagnosis PCP secara klinis. Beberapa penelitian melaporkan bahwa hasil positif semu menggunakan teknik pemeriksaan PCR konvensional berkisar antara 2-21% pada pasien-pasien tanpa gejala yang diduga berada dalam kondisi *carrier*. Hasil negatif semu lebih sering ditemukan pada pemeriksaan menggunakan teknik pewarnaan konvensional. Hasil ini perlu mendapat perhatian, terutama pada pasien yang diduga secara klinis mengalami PCP, ternyata pasien kemudian dilaporkan memperlihatkan perburukan klinis dalam waktu singkat, dan angka kematian mencapai 35,4%.<sup>15,16</sup>

Untuk mengatasi masalah hasil positif atau negatif semu, beberapa peneliti mencoba menentukan nilai *cut off* yang dapat membedakan kondisi *carrier* dengan penyakit PCP berkisar antara 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> untai DNA perkapiler. Flori dkk.<sup>18</sup> menyatakan bahwa sediaan bilasan bronkus yang mengandung

jumlah DNA perkapiler kurang dari  $10^3$  menunjukkan kondisi pasien dengan status *carrier* kronik dan perlu dilakukan pemantauan untuk memastikan apakah pasien tersebut berada dalam tahap awal PCP aktif. Penggunaan *real-time* PCR telah memberikan pencerahan dalam pengembangan studi epidemiologi diantaranya dalam hal peningkatan kecepatan reaksi yang diperlukan dan keluasan ruang lingkup. Pemeriksaan itu memungkinkan pengukuran beberapa asam nukleat target sekaligus dalam satu reaksi, membedakan genotipe multipel *Pneumocystis*, metode alternatif dalam hal deteksi mikroorganisme, serta memungkinkan uji saring dalam jumlah besar sekaligus dalam waktu singkat. Perlu dipertimbangkan beberapa keterbatasan diantaranya standarisasi protokol pemeriksaan yang memerlukan tingkat keterampilan teknis tinggi, dukungan fasilitas memadai, serta biaya penyediaan alat yang tinggi.<sup>15,16,26-28</sup>

## KESIMPULAN

Pneumonia *Pneumocystis* masih menjadi penyebab kesakitan dan kematian penting pada pasien dengan gangguan sistem imun. Diagnosis pasti dilakukan dengan menemukan *P. jiroveci* dalam sediaan klinis pasien dengan teknik histopatologi yang membutuhkan spesimen klinis sangat khusus, keterampilan laboratorium tinggi, serta waktu pemeriksaan lama. Pengembangan *real-time* PCR memungkinkan pemeriksaan secara kuantitatif untuk membedakan keadaan komensal atau infeksi subklinis dengan patogen dalam waktu singkat tetapi memerlukan tingkat keterampilan teknis tinggi, dukungan fasilitas memadai, serta biaya penyediaan alat yang tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Thomas CF, Limper A. Pneumocystis pneumonia. N Engl J Med 2004;350:2487-98.
2. Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis. 2004, 10(10):1713-20
3. Stringer JR, Charles BB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002;8:91-6.
4. Miller R, Huang L. *Pneumocystis jiroveci* infection. Thorax 2004;59:731-3.
5. Turner D, Schwarz Y, Yust I. Induced sputum for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV patients: new data, new issues. Eur Respir J 2003;21:204-8.
6. Rodriguez M, Fishman JA. Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2004;17:770-82.
7. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, et al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2000;30: S5-14.
8. Lee SA. A review of *Pneumocystis* pneumonia. J Pharm Pract 2006;19:5-9.
9. Maskel NA, Waine DJ, Lindley A. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. Thorax 2003;58:594-7.
10. Morris A, Scirba FC, Lebedeva IP. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170:408-13.
11. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jiroveci* in general population. Emerg Infect Dis 2005;11:245-9.
12. Leibovitz E, Pollack H, Moore T, Papellas J, Gallo L, Krasinski K, et al. Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. J

- Clin Microbiol 1995;33:3004-7.
13. Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Rüssmann 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.
  14. Fischer S, Gill VJ, Kovacs J, Miele P, Keary J, Silcott V, et al. The use of oral washes to diagnose *Pneumocystis carinii* pneumonia: a blinded prospective study using Polymerase Chain Reaction-based detection system. J Infect Dis 2001;184:1485-8.
  15. Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P, et al. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Clin Microbiol 2002;40:490-4.
  16. Flori P, Belleste B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 2004;53:603-7.
  17. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Muñoz MP, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. J Clin Microbiol 2000;38:1536-8.
  18. 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.
  19. Olsson M, Lidman C, Latouche S, Björkman A, Roux P, Linder E, et al. Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. J Clin Microbiol 1998;36:1737-40.
  20. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal health children. Clin Infect Dis 2001;32:855-61.
  21. Decker CF, Masur H. Pneumocystosis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. Clinical mycology. New York; Oxford University Press: 2003 p.407-19
  22. Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in Respiratory Specimens by Four Staining Methods. J Clin Microbiol 2004;7:3333-5.
  23. Powledge TM. The polymerase chain reaction. Adv Physiol Educ 2004;28:44-50.
  24. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Asp Med 2006;27:95-125.
  25. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious disease. Can Med Assoc J 2000;163:301-9.
  26. Pitt TL, Saunders NA. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium J. Clin. Pathol. 2000;53:71-75.
  27. Mackya IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect 2004;10:190-212.
  28. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ 2005;29:151-9.
  29. Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* Pneumonia. Emerg Infect Dis 2004;10:1729-35.
  30. Caliendo AM, Hewitt PL, Allega JM, Keen A, Ruoff KL, Ferraro MJ. Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. J Clin Microbiol 1998;36:979-82.