ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 56

1981

N° 4

© Masson, Paris, 1981.

Annales de Parasitologie (Paris)
1981, t. 56, n° 4 pp. 363-374.

MÉMOIRES ORIGINAUX

***PNEUMOCYSTIS CARINII* DELANOE ET DELANOE, 1912 EN MICROSCOPIE OPTIQUE**

Les différentes techniques d'identification

**P. MARTY, P. DELLAMONICA, Y. LE FICHOUX, E. BERNARD,
G. PAGLIARDINI et J. VILLEVIEILLE**

RÉSUMÉ. Le diagnostic de la Pneumonie à *Pneumocystis carinii* repose sur la mise en évidence directe du parasite à partir de prélèvements effectués par des moyens connus pour leur productivité.

Les techniques d'identification sont nombreuses mais n'objectivent pas les mêmes structures. Leur efficacité est évaluée en utilisant comme source de parasite des poumons de rats immunodéprimés.

Notre expérience confirme que la coloration au Bleu de Toluidine O est à pratiquer en première intention, éventuellement complétée par la technique Grocott.

***Pneumocystis carinii* Delanoe and Delanoe, 1912. The different methods of identification.**

SUMMARY. *Pneumocystis carinii* Pneumonia diagnosis relates on the direct detection of parasites from samples giving the best productivity.

The various methods of identification do not detect the same structures. Their efficacy is evaluated using parasites from immunodepressed rat lungs.

Our experience confirms that Toluidine Blue O stain may be first realized, eventually associated with Grocott's method.

Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Faculté de Médecine, 06034 Nice Cedex.

Accepté le 12 février 1981.

Introduction

Avant d'être rendu responsable de la « Pneumonie interstitielle à Plasmocytes » décrite par Ammich (1), *Pneumocystis carinii* a été observé à plusieurs reprises chez l'animal. Chez le rat, il semble s'agir d'un commensal fréquent des voies respiratoires ; par immunodépression chez cet animal, il est aisé d'obtenir une maladie expérimentale source facile de matériel pathologique.

Pneumocystis carinii est actuellement un des principaux agent de la pathologie infectieuse respiratoire du sujet immunodéprimé. On peut lui opposer un traitement spécifique ; il est donc important de pouvoir en faire la diagnose.

Les chances de mettre en évidence le parasite dépendent, d'une part de la qualité de prélèvement (*tableau I*) et d'autre part de l'utilisation de techniques de coloration adaptées. Ces dernières sont nombreuses, certaines colorent uniquement la paroi des kystes, d'autres le contenu de ces kystes ou les formes non kystiques à paroi mince.

Dans ce travail, nous proposons de comparer les résultats de ces différentes techniques. Le matériel biologique provient de rats immunodéprimés (22). Les matériels et méthodes sont précisés dans la thèse de l'un d'entre nous (22). Au préalable, il faut insister sur l'impérieuse nécessité, notamment pour l'imprégnation argentique, de toujours utiliser un « témoin *Pneumocystis* » et non pas un « témoin-levure » qui peut se révéler insuffisant (8).

1 - Techniques relevant uniquement la paroi des kystes :

1.1. TECHNIQUE UTILISANT L'IMPRÉGNATION ARGENTIQUE :

1.1.1. *La coloration de Grocott* (14).

Elle utilise la technique au Nitrate d'Argent-Méthénamine de Gomori et contre coloration au vert lumière.

Initialement décrite pour mettre en évidence des Champignons, cette technique colore la paroi des kystes en brun noir.

Les kystes se détachent sur un fond vert. Cette coloration est utilisable à la fois pour les coupes histologiques mais également pour les étalements et les appositions.

La morphologie des kystes est polymorphe (*fig. 1*). Certains prennent intensément l'argent, sont ronds ou ovalaires et présentent une petite zone noirâtre qui correspond pour Vavra (33) à l'épaississement de la couche moyenne de la paroi du kyste observée en microscopie électronique.

D'autres sont caractérisés par leur faible imprégnation et un aspect en cupule ou en croissant (kystes vides).

Cette coloration présente 2 inconvénients majeurs : la paroi des Champignons prend également l'argent (36) et la durée de la technique (environ 2 heures 30 minutes).

1.1.2. Les colorations dérivées de celle de Grocott

Ces dernières années sont apparues de nouvelles techniques utilisant l'imprégnation argentique. Leur but essentiel était de réduire le temps de coloration tout en conservant la morphologie observée dans la technique initiale.

1.1.2.1. La technique de Mahan et Sale (21) :

Nous utilisons cette technique à la fois sur les étalements, les coupes histologiques ou les appositions.

La morphologie des kystes est identique à celle observée avec la coloration de Grocott, mais l'imprégnation est beaucoup moins intense, ce qui rend la lecture plus délicate.

Sur le plan quantitatif, il nous a semblé observer moins de kystes en comparaison avec un même étalement coloré selon la technique initiale.

Le seul avantage est la rapidité de sa réalisation (environ 35 minutes).

1.1.2.2. Les autres techniques rapides :

La technique de Smith et Hughes (30) présente le désavantage de ne pas être utilisable pour les coupes histologiques.

La technique de Churukian et Schenk (7) est matériellement plus difficile à réaliser, elle est plus longue.

La technique de Pintozzi (26) est très proche de celle de Mahan et Sale.

1.2. TECHNIQUES UTILISANT DES RÉACTIFS DE SULFATATION

1.2.1. La technique de Chalvardjian et Grawe (6)

Elle fait appel à une réaction de sulfatation puis à une coloration au Bleu de Toluidine O.

Les kystes sont de couleur violet pourpre, se détachant sur un fond bleu.

Leur morphologie est identique à celle observée par la coloration de Grocott. On retrouve les formes rondes ou ovalaires et les formes en cupule ou en croissant (*fig. 2*).

Sur le plan quantitatif, un nombre identique de kystes est retrouvé pour un même prélèvement coloré par l'imprégnation argentique.

De plus, cette technique peu coûteuse, présente l'avantage d'être de réalisation rapide (20 minutes). Elle a le désavantage de colorer les champignons comme les techniques d'imprégnation argentique.

1.2.2. La technique de Bowling, Smith et Wescott (4)

C'est une réaction de sulfatation suivie d'une coloration au Violet de Crésyl.

Nous n'avons que peu d'expérience de cette technique. Sur les quelques lames que nous avons colorées, nous observons d'une part une mauvaise différenciation

entre les formes kystiques colorées en violet sur un fond jaune et certaines structures comme les levures qui prennent le colorant et d'autre part un mauvais contraste des formes classiquement retrouvées dans les colorations décrites plus haut.

Ces observations nous ont fait préférer la technique de Chalvardjian et Grawe.

1.3. LA COLORATION AU P. A. S.

Les mucopolysaccharides étant l'un des constituants de la paroi du kyste (16), il est logique que la coloration au P. A. S. permette l'observation de l'organisme.

La paroi est colorée en rouge plus ou moins foncé, mais le diagnostic différentiel avec les levures et les autres structures mucopolysaccharidiques est souvent très difficile.

De par son manque de spécificité, nous ne retiendrons pas cette coloration.

2 - Techniques relevant le contenu des kystes et les formes à paroi mince :

2.1. LA COLORATION DE MAY-GRUNWALD GIEMSA :

Les noyaux des grandes formes à paroi mince sont colorés en pourpre avec le cytoplasme bleuté, mais nous ne pouvons identifier avec exactitude les petites formes à cause de leur taille.

Au niveau des kystes, cette coloration met en évidence les 8 corps intra-kystiques de morphologie très différente selon le stade de maturation. La paroi du kyste non colorée est représentée par un halo clair plus ou moins facile à observer (*fig. 3*).

2.2. LA COLORATION DE WRIGHT

Rapportée par des auteurs américains (16, 18, 27, 28) elle montre les corps intra-kystiques colorée en bleu clair ou violet.

Les grandes formes à paroi mince sont faiblement colorées.

Des difficultés de diagnostic différentiel avec les plaquettes sanguines sont signalées pour les petites formes.

3 - Techniques relevant uniquement le contenu des kystes

3.1. LA COLORATION A L'HEMATOXYLINE-ERYTHROSINE

Elle est dérivée de la coloration à l'Hématoxyline Eosine-Safran qui ne met en évidence que les lésions histologiques de la Pneumonie à *Pneumocystis carinii*.

Récemment rapportée par Pintozzi et coll. (27), elle colore faiblement les corps intra-kystiques en rose ; la paroi est suspectée par un halo clair non coloré.

3.2. LA COLORATION DE PAPANICOLAOU :

Également rapportée par Pintozzi et coll. (27), pour *Pneumocystis carinii* cette technique colorerait les corps intra-kystiques en pourpre mais ne colorerait pas la paroi des kystes.

Nous avons essayé cette coloration mais nous n'avons obtenu aucun résultat.

4 - Techniques relevant à la fois la paroi et le contenu des kystes

4.1. LA COLORATION DE GRAM-WEIGERT

Utilisée par certains auteurs (3, 16, 18, 20, 23, 24, 27), elle présente l'intérêt de visualiser à la fois la paroi et le matériel intra-kystique.

D'après Hughes, les kystes en général Gram négatifs se détachent sur un fond cellulaire rouge (16).

Nous n'avons pas utilisé cette technique en raison de la difficulté d'obtention actuelle de l'huile d'Aniline (substance cancérigène).

Certains auteurs considèrent qu'elle n'est pas supérieure à la coloration de May-Grunwald-Giemsa pour observer le matériel intra-kystique (3).

4.2. LA COLORATION UTILISANT LE BLEU DE MÉTHYLÈNE DE LOEFFLER

Jusqu'à présent, la coloration au Bleu de Méthylène polychrome était connue pour identifier plus ou moins bien le contenu des kystes.

Avec la solution de Bleu de Méthylène de Loeffler que nous avons utilisée, nous mettons en évidence (*fig. 4*) :

- les corps intra-kystiques qui sont colorés en bleu ;
- le noyau d'un bleu plus foncé est parfois visualisé ;
- la paroi du kyste est colorée en rose pâle.

Nous visualisons également des formes qui pourraient correspondre à des kystes vides par analogie aux formes en croissant ou en cupule décrites avec les colorations de Grocott et de Chalvardjian.

4.3. LA COLORATION AU BLEU DE TOLUIDINE PH 11.1

Elle est utilisée par Bouton et coll. (3) qui n'en détaillent pas le protocole ; ils signalent que cette technique n'apporte rien de plus que le Gram-Weigert.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

FIG. 1. — Kystes — Coloration de Grocott.

FIG. 2. — Kystes — Coloration de Chalvardjian et Grawe.

FIG. 3. — Kyste — Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

FIG. 4. — Kyste — Coloration au Bleu de Méthylène en solution selon Loeffler.

FIG. 5. — Kyste — Zone surcolorée — Coloration de Chalvardjian et Grawe.

FIG. 6. — Kyste — Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

FIG. 7. — Kyste — Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

FIG. 8. — Kyste à 2 corps intra-kystiques — Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

FIG. 9. — Kyste à 4 corps intra-kystiques — Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

FIG. 10. — Kyste éclaté — Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

FIG. 11. — Formes à paroi mince — Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

Fig. 11

Le matériel intra-kystique est coloré en bleu foncé.

Cette technique aurait un intérêt pour l'orientation des préparations destinées à la microscopie électronique.

4.4. LE CONTRASTE DE PHASE

Utilisé par Bouton et coll. (3), nous n'en n'avons qu'une petite expérience, cette technique rapide (1 à 2 minutes) nécessite un bon réglage de l'appareil et un observateur entraîné.

Ce sont essentiellement les kystes mûrs avec les huit corps intra-kystiques qui sont intéressants à observer.

Commentaires

Les techniques les plus rentables pour le diagnostic de la Pneumocystose sont celles qui révèlent la paroi des kystes. En effet, sur des lames colorées au Giemsa, puis surcolorées par la coloration au Bleu de Toluidine O, on voit apparaître en plus de la paroi des kystes à huit noyaux repérés au Giemsa, les parois d'autres kystes. Du fait de leur non visualisation par la première coloration, il est vraisemblable qu'il s'agit de kystes vides. Cet artifice permet de conclure que les colorations mettant en évidence la paroi kystique sont beaucoup plus fructueuses sur le plan diagnostic. Parmi ces techniques notre préférence va au Bleu de Toluidine O du fait de sa facilité et de sa rapidité d'exécution. Cette coloration ne montre pas de différence significative du nombre des kystes par champ par rapport aux techniques d'imprégnation argentique. Ces dernières, dans leurs variantes rapides nécessitent à notre avis un matériel plus sophistiqué et la morphologie des kystes est beaucoup moins nette que celle apportée par la technique initiale de Grocott.

Les techniques révélant à la fois la paroi et le contenu des kystes nous paraissent intéressantes sur le plan morphologique mais semblent révéler beaucoup moins d'éléments que les techniques d'imprégnation argentique ou celles utilisant un réactif de sulfatation (même type de démonstration par lame surcolorée).

En ce qui concerne l'aspect de la paroi, il semble que les techniques d'imprégnation argentique et de sulfatation mettent en évidence la couche moyenne du fait de l'observation pratiquement constante pour les kystes mûrs, d'une zone surcolorée (*fig. 5*), pouvant correspondre à l'épaississement vu en microscopie électronique. Par contre, la coloration utilisant le Bleu de Méthylène de Loeffler, ne la met pas en évidence ce qui laisse supposer qu'il colore soit la membrane plasmique soit la couche externe.

Les techniques révélant le contenu des kystes et/ou les formes à paroi mince, revêtent à notre avis, essentiellement un intérêt descriptif. Surtout la coloration de Giemsa, permet une bonne observation des corps intra-kystiques qui apparaissent, en quelques occasions, constitués d'un noyau et d'une couronne de cytoplasme nettement individualisée (*fig. 6*). Les corps intra-kystiques peuvent présenter une vacuole (*fig. 7*).

Dans la plupart des cas, les kystes contiennent huit corps intra-kystiques mais nous avons pu observer des formes renfermant deux ou quatre « corps intra-kystiques » (fig. 8 et 9). Ces observations sont difficiles à accorder aux descriptions faites par Vavra-Kucera (34) et Vossen et coll. (35) en microscopie électronique sur la formation simultanée des corps intra-kystiques, mais iraient plus dans le sens de l'hypothèse de Bommer (2) qui pense à des divisions successives à partir d'une cellule primitive.

Nous pensons aussi avoir observé des kystes mûrs éclatés (fig. 10). La coloration de Giemsa visualise également les formes à paroi mince (fig. 11) que nous avons surtout observées au cours de nos tentatives de culture (22). La petite taille de ces éléments empêche à notre avis toute reconnaissance réellement objective au microscope optique ($\times 1000$).

En conclusion, pour un diagnostic de laboratoire rapide, nous nous rangeons à l'avis de Cameron et coll. (5). Les étalements de suspensions obtenues par broyage doux et centrifugation lente de fragments de tissu pulmonaire sont préférables aux appositions et aux coupes histologiques ; d'autre part la coloration au Bleu de Toluidine O est à pratiquer en première intention (25). Si elle est négative, dans un contexte clinique évocateur de l'affection, on pourrait envisager de compléter la recherche par la technique de Grocott.

Enfin, l'observation par Vossen et coll. (38), en microscopie électronique, de formes à paroi mince contenant des corps intra-kystiques (sous type C) nous fait également préconiser une coloration de Giemsa « de sécurité » (25).

TABLEAU I. — *Influence du type de prélèvement sur la mise en évidence du parasite chez l'homme*

d'après (9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 29, 32)

1. Expectoration	< 50 %
2. Aspirations gastrique et trachéale	< 50 %
3. Brossage bronchique distal	$\approx$ 60 %
4. Ponction biopsie transpariétale	$\approx$ 60 %
5. Fonction aspiration transpariétale	$\approx$ 60 %
6. Lavage bronchopulmonaire	> 80 %
7. Biopsie chirurgicale	$\approx$ 100 %
8. Biopsie transbronchique	$\approx$ 100 %

TABLEAU II. — *Différentes techniques d'identification*

Technique	Durée	Prélèvement	Stade identifié	Commentaires
Imprégnation argentique GOMORI- GROCOTT	2 heures et demie	Tous	Kyste mûr Kyste vide	Excellent contraste Champignons égale- ment colorés

TABLEAU II. — (*Suite*).

Technique	Durée	Prélèvement	Stade identifié	Commentaires
Imprégnation argentique SMITH-HUGHES	Environ 10 minutes	Tous sauf coupes histologiques	Kystes	Rapidité Champignons également colorés
Imprégnation argentique CHURUKIAN-SCHENK	Environ 1 heure	Meilleurs résultats avec étalements et appositions	Kystes	Rapidité Champignons également colorés
Imprégnation argentique MAHAN-SALE	Environ 35 minutes	Tous	Kystes	Moins bon contraste que GROCOTT Rapidité Champignons également colorés
Imprégnation argentique PINTOZZI	Environ 15 minutes	Tous	Kystes	Rapidité Champignons également colorés
Sulfatation Bleu de Toluidine O CHALVARDIAN GRAWE	Environ 20 minutes pour les étalements	Tous	Kyste mûr Kyste vide	Excellent contraste Rapidité Champignons également colorés
Sulfatation Violet de Crésyl BOWLING et Coll.	Environ 25 minutes	Tous	Kystes	Mauvais contraste Organismes mal différenciés des champignons
P. A. S.	Environ 50 minutes	Tous	Kystes	Distinction difficile des autres structures P. A. S. positives
MAY-GRUNWALD GIEMSA	Environ 25 minutes	Tous	Kyste mûr (contenu) Formes à paroi mince	Corps intra kystiques plus ou moins visualisés
WRIGHT	Aucune expérience	Tous	Kyste mûr (contenu) Formes à paroi mince	Diagnostic différentiel difficile avec les plaquettes sanguines
Hématoxyline Érythrosine	Environ 20 minutes	Tous	Kyste mûr (contenu)	Corps intra kystiques faiblement colorés
PAPANICOLAOU	Environ 20 minutes	Tous	Kyste mûr (contenu) pour PINTOZZI	Idem à Hématoxyline Érythrosine

TABLEAU II. — (Suite).

Technique	Durée	Prélèvement	Stade identifier	Commentaires
GRAM-WEIGERT	Environ 25 minutes (selon MOJON)	Tous	Kystes (paroi et contenu)	Différenciation soignée nécessaire
Bleu de Méthylène de LOEFFLER	Environ 20 minutes	Expérience seulement sur étalements	Kyste mûr (paroi, contenu) Kyste vide	Organismes moins nombreux et moins bonne visualisation des kystes que le GIEMSA et le Bleu de Toluidine 0
Bleu de Toluidine pH 11, 1	Aucune expérience		Contenu des kystes et paroi légèrement colorés (selon BOUTON et COLL)	
Contraste de Phase	1 à 2 minutes	Étalements	Kyste mûr (contenu et paroi légèrement colorée)	Bon réglage de l'appareil observateur entraîné

BIBLIOGRAPHIE

1. AMMICH O. : Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)*, 1938, 302, 539-554.
2. BOMMER W. : *Pneumocystis carinii* from human lungs under electron microscope. *Am. J. Dis. Child.*, 1962, 104, 657-661.
3. BOUTON C., KERNBAUM S., CHRISTOL D., TRIN DINH H., VEZINET F., GUTMAN L., SEMAN M., BASTIN R. : Diagnostic morphologique du *Pneumocystis carinii*. *Pathol. Biol.*, 1977, 25, 153-160.
4. BOWLING M.C., SMITH I.-M., WESCOTTS L. : A rapid staining procedure for *Pneumocystis carinii*. *Am. J. Med. Technol.*, 1973, 39, 267-268.
5. CAMERON R. B., WATTS J. C., KASTEN B. L. : *Pneumocystis carinii* pneumonia. An approach to rapid laboratory diagnosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1979, 72, 90-93.
6. CHALVARDJIAN A. M., GRAW E. L. A. : A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. *J. Clin. Pathol.*, 1963, 16, 383-384.
7. CHURUKIAN C. J., SCHENK E. A. : Rapid Grocott's Methenamine Silver Nitrate Method for Fungi and *Pneumocystis carinii*. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1977, 68, 427-428.
8. DEMICO W. A., STEIN A., URBANETTI J. S., FANBURG B. L. : False Negative Biopsy in *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Chest*, 1979, 75, 389-390.
9. DOMINY D. E., LUCAS R. N. : *Pneumocystis carinii* infection diagnosed by ante mortem lung biopsy. *Ann. Thorac. Surg.*, 1965, 1, 305.
10. DREW W. L., FINLEY T. N., MINTZ L., KLEIN H. Z. : Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia by Bronchopulmonary Lavage. *J.A.M.A.*, 1974, 230, 713-715.
11. FORTUNY I. E., TEMPERO K. F., AMSDEN T. W. : *Pneumocystis carinii* Pneumonia diagnosed from sputum and successfully treated with pentamidine isethionate. *Cancer*, 1970, 26, 911-913.

12. GEELHOED G. W., LEWIN B. J., ADKINS P. C., JOSEPH W. L. : The diagnosis and management of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Ann. Thorac. Surg.*, 1972, 14, 335.
13. GENTRY L. O., RUSKIN J., REMINGTON J. S. : *Pneumocystis carinii* Pneumonia, problems in diagnosis and therapy in 24 cases. *Calif. Med.*, 1972, 6, 116.
14. GROCOTT R. G. : A stain for Fungi in tissue sections and smears (using Gomori's Methenamine Silver Nitrate Technique). *Am. J. Clin. Pathol.*, 1955, 25, 975-979.
15. HODGKIN J. E., ANDERSON H. A., ROSENOW E. C. : Diagnosis of *Pneumocystis carinii* for transbronchial lung biopsy. *Chest*, 1973, 64, 551-554.
16. HUGHES W. T. : Current Status of Laboratory Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonitis. *C.R.C. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1975, 6, 145-170.
17. JOYNER L. R., SCHEINHORN D. J. : Transbronchial forceps lung biopsy through the fiberoptic bronchoscope. Diagnostic of diffuse pulmonary disease. *Chest*, 1975, 67, 532-535.
18. KIM H. K., HUGHES W. T. : Comparison of Methods for Identification of *Pneumocystis carinii* in Pulmonary aspirates. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1973, 60, 462-466.
19. LAU W. K., YOUNG L. S., REMINGTON J. S. : *Pneumocystis carinii* Pneumonia. Diagnosis by examination of Pulmonary secretions *J.A.M.A.*, 1976, 236, 2399-2402.
20. LE TAN VINH : Pneumocystose humaine. *Rev. Fr. Mal. Resp.*, 1975, 3, 509-524.
21. MAHAN C. T., SALE G. E. : Rapid Methenamine Silver Stain for Pneumocystis and Fungi. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1978, 102, 351-352.
22. MARTY P. : Techniques actuelles d'identification de *Pneumocystis carinii*, Delanoë et Delanoë, 1972. Tentatives de culture. Thèse médecine, Nice, 1979, 97 p.
23. MOJON M. : Introduction à l'étude de la Pneumonie à *Pneumocystis carinii*. Thèse médecine, Lyon, 1971, 157 p.
24. MOJON M. : Diagnostic biologique de la Pneumonie à *Pneumocystis carinii*. *Med. Mal. Inf.*, 1973, 3, 225-230.
25. OGINO K., YOSHIDA Y., TAKEUCHI S., IKAI T., YAMADA M. : Studies on *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis carinii* pneumonia. I. Evaluation of several binds of staining method in the identification of *Pneumocystis carinii*. *Jpn. J. Parasitol.*, 1977, 26, 116-128.
26. PINTOZZI R. L. : Modified Grocott's Methenamine Silver Nitrate Method for quick staining of *Pneumocystis carinii*. *J. Clin. Pathol.*, 1978, 31, 803-805.
27. PINTOZZI R. L., BLECKA L. J., NANOS S. : The morphologic identification of *Pneumocystis carinii*. *Acta Cytol.*, 1979, 23, 35-39.
28. RIFKIND D., FARIS T. D., HILL R. B. : *Pneumocystis carinii* Pneumonia. Studies on the diagnosis and treatment. *Ann. Intern. Med.*, 1966, 65, 943-956.
29. SCHEINHORN D. J., JOYNER L. R., WHITCOMB M. E. : Transbronchial forceps lung biopsy through the fiberoptic bronchoscope in *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Chest*, 1974, 66, 294.
30. SMITH J. W., HUGHES W. T. : A rapid staining technique for *Pneumocystis carinii*. *J. Clin. Pathol.*, 1972, 25, 269-271.
31. TOTH G., BALOGH E., BELAY M. : Tracheal smear in Pentamidine treated plasma cell Pneumonia. *Acta Paediatr. Acad. Sci. Hung.*, 1966, 25-30.
32. TRINH DINH H., BOUTON C., KERNBAUM S., CHRISTOL D., GUTMAN L., SEMAN M., BASTIN R. : Les Pneumonies à *Pneumocystis carinii*. Diagnostic et thérapeutique. *Nouv. Presse Med.*, 1976, 5, 2622-2625.
33. VAVRA J. : An interpretation of the fine structure of *Pneumocystis carinii*. *J. Protozool.*, 1968, 15, (suppl.), 12-13.
34. VAVRA J., KUCERA K. : *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J. Protozool.*, 1970, 17, 463-483.
35. VOSSEN ME E. M. H., BECKERS P. J. A., MEUWISSEN J. H. E. Th., STADHOUDERS A. M. : Developmental Biology of *Pneumocystis carinii*, an Alternative View on the Life Cycle of the Parasite. *Z. Parasitenkd.*, 1978, 55, 101-118.
36. YOUNG R. C., BENETT J. E., CHU E. W. : Organisms Mimicking *Pneumocystis carinii*. *Lancet*, 1976, II, 1082-1083.