

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.01.019

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221121.1153.004.html\(2022-11-21\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221121.1153.004.html(2022-11-21))

宏基因组二代测序在非 HIV 感染型肺孢子菌肺炎中的应用研究*

陈佳怡¹, 梁 晓¹, 夏铨冬¹, 杨 芸¹, 袁 兵², 耿嘉蔚^{1△}

(云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院;1. 感染性疾病及肝病科;2. 呼吸与危重症医学科, 昆明 650032)

[摘要] **目的** 分析宏基因组二代测序(mNGS)在非人类免疫缺陷病毒(HIV)感染型肺孢子菌肺炎(PJP)病原学诊断中的价值和特点。**方法** 选取2019年4月至2021年1月在该院收治的18例非HIV感染型PJP患者,收集mNGS结果及临床资料,采用SPSS25.0进行统计分析,两组间比较采用Mann-Whitney U检验,测序数据与部分临床指标进行Spearman相关分析。**结果** 18例PJP患者送检16例支气管肺泡灌洗液(BALF)和2例血标本mNGS中均检出Pj序列,17例标本Pj序列相对丰度在85%以上,Pj序列数在所有微生物种间排名1~14;未发现Pj序列数与发病时间、氧合指数、CD4⁺T淋巴细胞计数相关($r_s = -0.131, -0.129, -0.040, P > 0.05$),与是否经验性抗Pj治疗($P = 0.158$)及是否发生院内死亡($P = 0.426$)不相关。所有BALF中均检出细菌序列并报告了可疑致病菌,血标本中未检出细菌序列;14例检出病毒序列,最常见为人类β疱疹病毒5型(9例)。所用患者接受磺胺甲噁唑/甲氧苄啶或联用棘白菌素类药物抗Pj治疗,治疗后影像学改善明显,3例发生院内死亡。**结论** 在非HIV感染型PJP病例中mNGS有良好的检测能力,条件允许时尽量选择下呼吸道标本送检以获得更全面的病原学信息。

[关键词] 肺孢子菌肺炎;耶氏肺孢子菌;宏基因组二代测序**[中图法分类号]** R563.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)01-0091-06

Application of metagenomics next-generation sequencing in non-HIV infected pneumocystis jirovecii pneumonia*

CHEN Jiayi¹, LIANG Xiao¹, XIA Andong¹, YANG Yun¹, YUAN Bin², GENG Jiawei^{1△}

(1. Department of Infectious Diseases and Hepatic Diseases; 2. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Yunnan Provincial First People's Hospital/Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the value and characteristics of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) technology in the pathogenic diagnosis of non-HIV-infected pneumocystis jirovecii pneumonia (PJP). **Methods** Eighteen cases of non-HIV infected PJP treated in this hospital from April 2019 to January 2021 were selected. The mNGS results and clinical data were collected and statistically analyzed by SPSS 25.0. The Mann-Whitney U test was used to compare the data between the two groups. The sequencing data and some clinical indicators conducted the Spearman correlation analysis. **Results** The Pj sequence was detected in 16 cases of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and 2 cases of blood samples submitted from 18 cases of PJP. The relative abundance of Pj sequence in 17 samples was above 85%, the number of Pj sequences ranked 1-14 among all microbial species; no correlation was found between the Pj sequence number and the onset time, oxygenation index or CD4⁺T lymphocyte count ($r_s = -0.131, -0.129, -0.040, P > 0.05$) and the Pj sequence number had no correlation with the anti-Pj empiric treatment ($P = 0.158$) and whether the hospital death occurrence ($P = 0.426$). The bacterial sequences were detected in all BALFs and the suspected pathogenic bacteria were reported. No bacterial sequence was detected in blood samples. The viral sequences were detected in 14 cases, the most common was human beta herpesvirus type 5 (9 cases). All patients received the anti-Pj treatment of sulfamethoxazole/trimethoprim or its combination medication with echinocandin. The imaging improvement was obvious after treatment. Three cases died in hospital. **Conclusion** mNGS has

* 基金项目:昆明市科技计划项目(2020-1-H-020);云南(昆明)张文宏专家工作站(YSZJGZZ-2020051)。 作者简介:陈佳怡(1995-),住院医师,硕士,主要从事临床感染及病原微生物研究。 △ 通信作者, E-mail: geng_jia_wei@126.com。

good detection capability in non-HIV infected PJP cases. When the conditions permit, the specimens of lower respiratory tract should be selected for examination to obtain more comprehensive etiological information.

[Key words] pneumocystis jirovecii pneumonia; pneumocystis jirovecii; metagenomics next-generation sequencing

肺孢子菌肺炎(PJP)是由耶氏肺孢子菌(Pj)感染引起的疾病,常见于艾滋病患者和其他免疫功能低下宿主。近年来随着免疫抑制药物的使用,非 HIV 感染者的 PJP 越来越引发关注。既往经验来看,非 HIV 感染 PJP 患者往往比 HIV 感染者发病更急、疾病进展更快、重症化概率和死亡率更高^[1-2],因此早期诊断尤为重要。在现有临床 Pj 检测手段中,特殊染色镜检的病原检出率低,免疫组织化学和 PCR 等^[3]在多数临床机构中应用有限。近年来,随着基因测序技术的发展,宏基因组二代测序(mNGS)在病原学诊断中有越来越多的实践,多用于特殊、罕见感染的鉴定和新发病原体的解析。本研究报道 mNGS 辅助诊断非 HIV 感染型 PJP 患者情况,结合既往研究阐述 mNGS 在非 HIV 感染型 PJP 病原学诊断中的价值和特点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析 2019 年 4 月至 2021 年 1 月在本院住院并通过 mNGS 结合临床资料诊断 PJP 的 18 例患者。入组标准:>18 岁;具有免疫受损疾病基础^[4](3 个月内有血液系统或实体恶性肿瘤化疗史,自身免疫性疾病、器官移植等病史及接受糖皮质激素或其他免疫抑制药物治疗>30 d 的用药史,其他免疫功能低下状态);肺炎伴呼吸困难、低氧血症或呼吸衰竭表现;胸部 CT 提示弥漫型或斑片状融合型磨玻璃影(GGO)、小叶间隔增厚网格影等间质性病变征象;伴或不伴 G 试验、乳酸脱氢酶(LDH)等血清学检测结果支持;外周血或呼吸道标本 mNGS 检出 Pj 序列;排除 HIV 感染。本研究通过本院伦理委员会批准(KHLL2022-KY013)。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集

从住院电子病历系统中收集入选病例的一般资料,包括性别、年龄、入院时间等,以及发病时间、临床表现、实验室检查、影像学检查、合并症、传统呼吸道标本病原检测结果(涂片+培养等)、二代测序结果、治疗及转归等临床资料。抗 Pj 治疗 2 周以上进行疗效判断,好转表现为临床症状及生化指标改善,肺 CT 病灶较前吸收好转;记录患者院内死亡情况。

1.2.2 mNGS 检测

按照采样标准流程采集支气管肺泡灌洗液(BALF) 5 mL 或血标本 3 mL 放置 4 °C 冷藏,并于 24 h 内专人低温运送至第三方测序中心(华大基因科技有限公司)。测序平台使用 BGISEQ-500 进行测序。数据分析:测序数据下机后去除低质量和长度<35 bp 的数据。通过 BWA(<http://bio-bwa.sourceforge.net/>)比对,将人源基因组序列数据去除,再去掉低复杂度序列数后与专用微生物大数据库(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>)比对,按照细菌、真菌、病毒、分枝杆菌和寄生虫等进行分类和排列。

1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 统计软件进行分析。计数资料以例数或率表示。计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两两比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;测序参数与临床数据进行 Spearman 秩相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本信息

18 例患者中男 15 例,女 3 例,中位年龄 46 岁。所有患者均有肿瘤、肾病或自身免疫性疾病背景,见表 1。其中 16 例患者使用激素+免疫抑制剂治疗基础疾病,使用时间 10.5(4.0,24.0)个月,另外 2 例为正在接受化疗的恶性肿瘤患者。

表 1 18 例患者入院时的一般情况及实验室检查

序号	性别	年龄(岁)	基础疾病	肺炎发病时间(d) [#]	1,3-β-D 葡聚糖(pg/mL)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞计数(个/μL)	氧合指数(校正)	痰涂片+痰培养	测序采样前使用抗生素/抗 Pj 药物
1	女	27	成人 Still 病	15	249.4	230	220	阴性	是/否
2	男	78	系统性红斑狼疮	20	569.8	624	302	痰培养:嗜麦芽窄食单胞菌	是/否
3	女	54	肺恶性肿瘤	15	328.9	102	281	阴性	是/否
4	男	62	多肌炎	30	178.9	443	312	阴性	是/否
5*	男	39	IgA 肾病	20	163.4	58	186	阴性	是/是
6	女	59	肾病综合征	30	未测	229	232	阴性	是/是
7	男	36	肾病综合征	60	680.0	536	271	痰涂片:真菌菌丝	是/是
8	男	21	肾病综合征	16	148.2	422	338	阴性	是/是

续表 1 18 例患者入院时的一般情况及实验室检查

序号	性别	年龄 (岁)	基础疾病	肺炎发病时间 (d) [#]	1,3-β-D 葡聚糖 (pg/mL)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞计数 (个/ μ L)	氧合指数 (校正)	痰涂片+痰培养	测序采样前使用抗生素/抗 Pj 药物
9	男	45	重症肌无力	4	276.0	213	253	阴性	是/否
10	男	33	肾病综合征	16	378.5	145	208	阴性	是/否
11	男	47	肾病综合征	16	197.5	111	198	痰涂片:真菌孢子及菌丝	是/否
12	男	49	类风湿关节炎	15	418.7	357	286	阴性	是/否
13	男	51	膜性肾病	13	未测	179	200	痰涂片:真菌孢子	是/否
14 [*]	男	66	非霍奇金淋巴瘤	15	未测	669	296	阴性	是/否
15 [*]	男	38	天疱疮	10	871.5	159	218	阴性	是/否
16	男	42	皮炎	30	600.0	150	247	阴性	是/否
17	男	26	自身免疫性溶血	14	228.4	40	291	阴性	是/否
18	男	54	红斑脱屑性皮炎	56	122.5	485	360	阴性	是/否

[#]:首次出现发热、咳嗽等症状至 mNGS 标本采集时间; ^{*}:院内死亡病例。

2.2 临床资料

患者以急性、亚急性起病,从起病至 mNGS 标本采集的中位时间为 16 d,最短 4 d。起病症状以发热(77.8%)、咳嗽(100.0%)、干咳(50.0%)、气促(77.8%)为主。所有患者入院时均有不同程度的低氧血症,氧合指数(校正大气压后)262(215,297),LDH 水平 473.0(303.5,581.3)U/L。15 例患者的血清 1,3-β-D 葡聚糖 276.0(178.9,569.8)pg/mL,15 例患者的诱导痰细胞中性粒细胞比例明显升高达 73.08%~97.02%,提示肺炎损伤重。所有患者入院 72 h 内均进行了细胞免疫功能评估并记录 CD4⁺ T 淋巴细胞计数,其中 8 例 <200 个/ μ L。18 例患者均采集呼吸道标本送院内涂片及培养,2 号病例痰培养敏感嗜麦芽窄食单胞菌,7、11、13 号病例痰涂片查见真菌孢子和(或)菌丝,但因实验室条件有限未进一步鉴定,其余均为阴性。影像学上病例均呈现双肺弥漫性或斑片融合型磨玻璃征,部分可见小叶间隔增厚、网格影、铺路石征等。

2.3 mNGS 结果

测序标本在入院后 7~10 d 采集,测序结果均于第三方测序中心收到标本约 48 h 后回报,标本检出 Pj 菌种严格比对的序列数为 14~10 579 个,除 1 例外其余标本的 Pj 序列相对丰度在 85% 以上(图 1),Pj 序列数在所有检出微生物种间排名 1~14 名(图 2)。不同个体之间的 Pj 序列数差异较大,与 PJP 的发病时间、氧合指数、CD4⁺ T 淋巴细胞计数无明显相关性($r_s = -0.131, -0.129, -0.040, P > 0.05$),见表 2。Pj 序列数在采样前是否经验性抗 Pj 治疗($P = 0.158$)及是否发生院内死亡($P = 0.426$)的组间比较中也无明显差异。其他微生物检出情况:14 例患者标本检出病毒序列,其中,9 例检出人类 β 疱疹病毒 5 型(CMV)序列,6 例检出人类 γ 疱疹病毒 4 型(EBV)序列,2 例检出了单纯疱疹病毒(HSV1)序列,1 例血标本检出了细环病毒属序列。所有 BALF 标本都检出大量细菌序列并报告了可疑致病菌,其中 2 号病例检出军团菌属,3 号病例检出李斯特菌、铜绿假单胞菌;2 例血标本并未检出细菌序列。

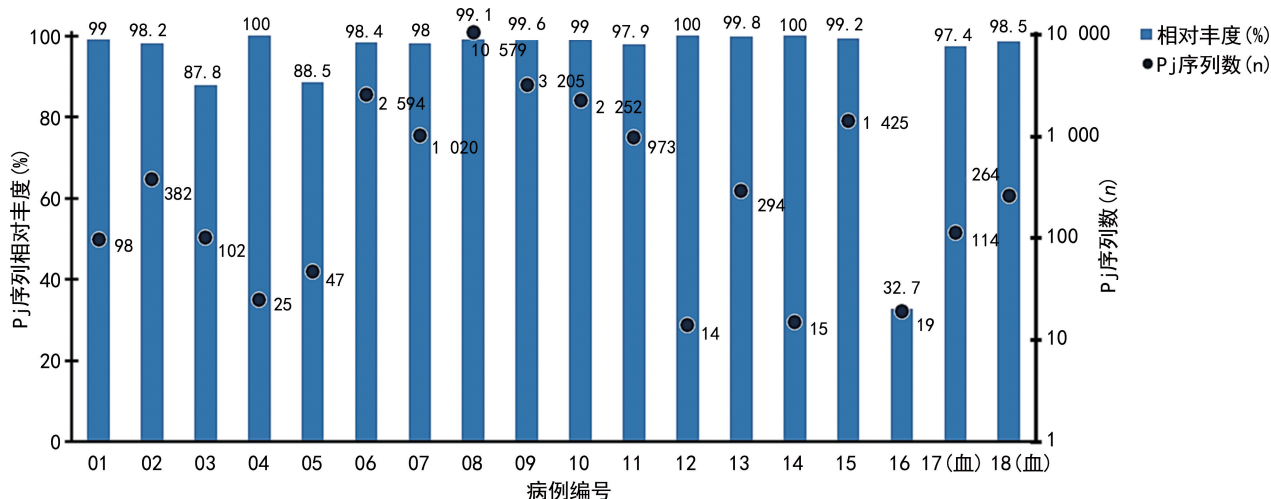


图 1 18 例标本 Pj 序列数及相对丰度

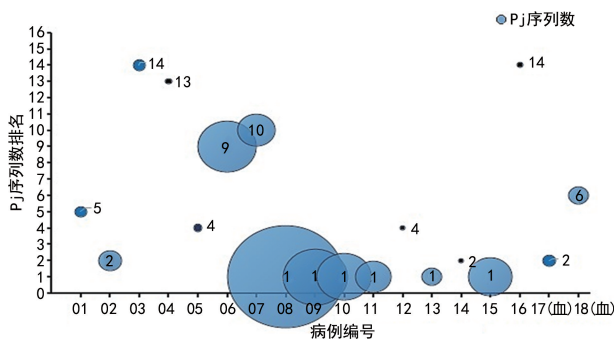


图 2 18 例标本 Pj 序列数在微生物序列中的种间排名

2.4 治疗反应及预后

所有患者在采样前均接受抗菌药物治疗,其中 4

例患者经验性使用磺胺甲噁唑/甲氧苄啶或棘白菌素类抗 Pj 治疗,其余患者在 mNGS 结果回报后加用上述药物抗 Pj 治疗,部分患者胸部 CT 特征见图 3。最终 3 例患者因脓毒症多器官衰竭而发生院内死亡,其余患者均好转出院随访。

表 2 Pj 序列数与部分临床指标的相关性分析

Pj 序列数	CD4 ⁺ T 淋巴细胞计数	氧合指数 (校正)	发病时间
Spearman 相关性(<i>r_s</i>)	-0.040	-0.129	-0.131
Sig. (双尾)	0.874	0.610	0.603

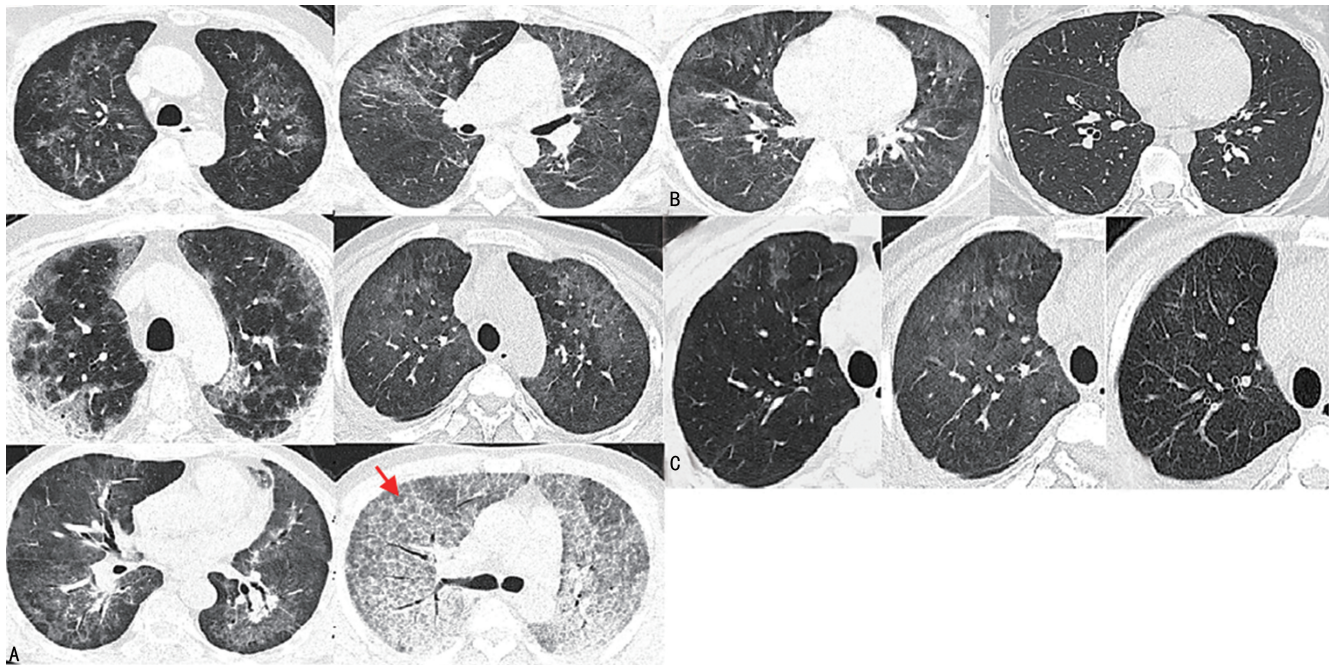


图 3 部分 PJP 患者的胸部 CT 特征
A:2 号、4 号、12 号、15 号、16 号、18 号病例 PJP 特征表现主要为双肺弥漫性磨玻璃影,可见网格影和铺路石征(箭头)等;B:20 号病例抗 Pj 治疗后病灶吸收;C:8 号病例从起病局部磨玻璃影(2020-01-23)进展为双肺弥漫性病变(2020-02-22),最后抗 Pj 治疗好转(2020-03-06)。

图 3 部分 PJP 患者的胸部 CT 特征

3 讨论

PJP 是免疫抑制宿主常见的严重机会性感染疾病,在国内外的报道中,PJP 的发病率在侵袭性真菌感染疾病中排名前 4^[5-6]。早期诊断对 PJP 患者的预后具有重要意义^[7],然而既往临床实践中直接获得 PJP 病原学证据较为困难,新兴的 mNGS 技术具有高灵敏度、覆盖广、无偏倚的特点,给感染病诊断带来更多的病原信息,且抗菌药物使用对 mNGS 的影响小于传统培养^[8],因此临床上得以实践应用。

本研究中主要检测 PJP 患者的下呼吸道标本,尽管 Pj 也可以在人类 I 型肺泡上皮细胞表面定植生长^[9],但免疫正常和免疫抑制人群中的呼吸道病原谱仍有明显差异。WU 等^[10]分析了多中心 329 例重症肺炎 BALF 标本的 mNGS,Pj 序列均在免疫受损的肺炎病例中检出,而免疫功能正常的 264 例病例中并

未检出,既往大样本呼吸道标本 mNGS 研究中 Pj 序列检出率也并不高^[8],提示免疫受损人群的 Pj 阳性结果有较大意义。此外,有研究观察到非 HIV 型 PJP BALF 中的 Pj 载量明显低于 HIV 型 PJP^[11],因此虽然部分标本仅检出少量 Pj 序列,本研究仍然将此作为支持诊断的重要依据。

除呼吸道标本外,血液 mNGS 在 PJP 诊断中也有良好的敏感性,且一般不受呼吸道定植菌的干扰。在顾鹏等^[12]研究中,外周血 mNGS 对肾脏病合并 PJP 的诊断灵敏度和特异度达到了 94.59% 和 100%。另一项研究分析了 14 例肾移植术后的 PJP 患者,92.8% 的患者均通过外周血或呼吸道标本 mNGS 发现 Pj 序列,且与 PCR 验证结果一致^[13],值得注意的是,在该研究中呼吸道标本匹配到的 Pj 序列数(488~29751)明显高于血标本(6~260),并且在 2 例患者的 4

份同源同期标本中得到验证,提示呼吸道标本可能有更高的检测效能。

此外,非 HIV 型 PJP 患者常为免疫机能受损的重症患者,往往非单一病原体感染。在本研究中,BALF 测序都报告了可疑致病菌序列,部分检测出非典型细菌病原体,如军团菌属、李斯特菌等,给治疗用药提供了参考。而 2 例血标本测序虽然没有报告细菌序列,但患者的临床资料均有细菌性肺炎的表现,如咳黄痰、中性粒细胞升高及影像学实变征等,入院后给予经验性抗菌药物治疗。既往 PJP 研究中血 mNGS 的细菌检出率也仅有 21.6%^[12],在另一项重症肺炎(SCAP)的诊断研究中,以血培养为金标准,外周血 mNGS 的敏感性和一致率均不如呼吸道标本^[14],提示呼吸道标本对非 HIV 型 PJP 的诊疗更有优势。

目前对于判断 mNGS 检出序列为致病菌尚无定量标准,有研究提出 Pj 序列的相对丰度 >85% 或序列数排名前 15 名可能提供较满意的诊断阈值^[15]。在本研究中,17 例标本中 Pj 序列相对丰度 >85%,包括 2 例血标本。也有研究观察到血标本中 Pj 序列相对丰度差异较大分布离散^[12],由于均为小样本观察性研究,还需要更多前瞻性研究来进一步验证。此外,测序结果不能单一解读,共识建议^[16]若 mNGS 结果符合患者的临床表现和其他实验室检查,可以根据结果指导临床决策。

本组病例的诱导痰细胞分类发现中性粒细胞明显升高,且入院时均有不同程度的低氧血症或呼吸衰竭,提示患者肺炎症损伤重。有研究对比了 HIV 型 PJP 患者的 BALF 细胞分类,在非 HIV 患者中观察到更高的中性粒细胞计数,间接提示非 HIV 型 PJP 有更严重的肺损伤^[11]。影像学上,PJP 典型的 CT 特征为双肺散在斑片样或弥漫性磨玻璃影、小叶间隔增厚,但不具有特异性。血清 G 试验可以辅助诊断 PJP,但需要和其他真菌如念珠菌属、镰刀菌属、曲霉菌属等感染相鉴别。有研究认为下呼吸道标本 PCR 结合 G 试验可以有效地区分 PJP 定植和感染^[17-18],但 G 试验最佳诊断阈值各不相同,需要进一步验证。此外,mNGS 指导抗菌药物调整后的治疗反应也可以作为依据。本研究不足之处在于缺乏特殊染色等验证试验,还有部分患者随访不足,未能观察到疾病的远期变化,未来需要前瞻性研究设计来改进。

综上所述,在非 HIV 感染型 PJP 的诊断中,BALF 和血标本 mNGS 均有较好的灵敏度。非 HIV 型 PJP 往往呈现重症化和混合感染的趋势,条件允许时仍建议优选下呼吸道标本如 BALF 送检,以获得更全面的病原学信息。此外,Pj 序列的相对丰度对致病

菌的判定可能有提示作用,Pj 序列数与临床指标及预后无明显相关,但需要前瞻性更大样本研究来验证。mNGS 的结果需要综合其他临床资料综合判断。

参考文献

- [1] THOMAS C F, LIMPER A H. Pneumocystis pneumonia[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2004,35(24):2487-2498.
- [2] ROUX A, CANET E, VALADE S, et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with or without AIDS, France [J]. Emerg Infect Dis, 2014,20(9):1490-1497.
- [3] 王瑜琼,黄琳娜,詹庆元. 肺孢子菌肺炎诊断方法的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志,2020,43(10):878-880.
- [4] GHEMBAZA A, VAUTIER M, CACOUB P, et al. Risk factors and prevention of pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with autoimmune and inflammatory diseases [J]. Chest, 2020,158(6):2323-2332.
- [5] BITAR D, LORTHOLARY O, LE STRAT Y, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, france, 2001 - 2010 [J]. Emerg Infect Dis, 2014,20(7):1149-1155.
- [6] 刘又宁,余丹阳,孙铁英,等. 中国 1998 年至 2007 年临床确诊的肺真菌病患者的多中心回顾性调查[J]. 中华结核和呼吸杂志,2011,34(2):60-90.
- [7] SOKULSKA M, KICIA M, WESOŁOWSKA M, et al. Pneumocystis jirovecii: from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review [J]. Parasitol Res, 2015,114(10):3577-3585.
- [8] MIAO Q, MA Y, WANG Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice [J]. Clin Infect Dis, 2018, 67 (Suppl 2):S231-S240.
- [9] HUANG L, MORRIS A, LIMPER A H, et al. An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PJP) [J]. Proc Am Thorac Soc, 2006,3(8):655-664.
- [10] WU X, LI Y, ZHANG M, et al. Etiology of severe community-acquired pneumonia in adults based on metagenomic next-generation sequen-

cing:a prospective multicenter study[J]. *Infect Dis Ther*,2020,9(4):1003-1015.

- [11] MONNET X, VIDAL-PETIOT E, OSMAN D, et al. Critical care management and outcome of severe pneumocystis pneumonia in patients with and without HIV infection[J]. *Crit Care*, 2008,12(1):R28.
- [12] 顾鹏,许书添,姜雪,等. 外周血宏基因组二代测序对肺孢子菌肺炎的诊断价值[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*,2020,29(1):8-13.
- [13] ZHANG F, CHEN J, HUANG H, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis and treatment guidance of pneumocystis jirovecii pneumonia in renal transplant recipients[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,2021,40(9):1933-1942.
- [14] LANGELIER C, FUNG M, CALDERA S, et al. Detection of pneumonia pathogens from plasma cell-free DNA[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020,201(4):491-495.
- [15] ZHANG Y, AI J W, CUI P, et al. A cluster of

cases of pneumocystis pneumonia identified by shotgun metagenomics approach[J]. *J Infect*, 2019,78(2):158-169.

- [16] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[J]. *中华传染病杂志*,2020,38(11):681-689.
- [17] DESOUBEAUX G, CHESNAY A, MERCIER V, et al. Combination of β -(1,3)-D-glucan testing in serum and qPCR in nasopharyngeal aspirate for facilitated diagnosis of pneumocystis jirovecii pneumonia[J]. *Mycoses*,2019,62(11):1015-1022.
- [18] DAMIANI C, LE GAL S, DA COSTA C, et al. Combined quantification of pulmonary Pneumocystis jirovecii DNA and serum (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan for differential diagnosis of pneumocystis pneumonia and Pneumocystis colonization [J]. *J Clin Microbiol*,2013,51(10):3380-3388.

(收稿日期:2022-03-15 修回日期:2022-09-08)

(上接第 90 页)

- [6] VANNESTE P, CYRIL P. Otitis media with effusion in children: pathophysiology, diagnosis, and treatment. A review [J]. *J Otol*, 2019, 14(2):33-39.
- [7] KANIA R, VIRONNEAU P, DANG H, et al. Bacterial biofilm in adenoids of children with chronic otitis media [J]. *Acta Otolaryngol*, 2019,139(4):345-350.
- [8] 董萍,姜立波. 腺样体肥大伴分泌性中耳炎患儿的免疫功能分析[J]. *中国妇幼保健研究*,2019,30(7):836-839.
- [9] 赫莉,耿江桥,左路杰,等. 学龄前儿童腺样体肥大合并分泌性中耳炎的相关因素分析[J]. *中华耳科学杂志*,2020,18(5):852-856.
- [10] 余巧,盛宏申,郭晓静,等. 分泌性中耳炎患者外周血 Th1Th2 细胞及 T 淋巴细胞亚群水平的表达及临床意义[J]. *现代生物医学进展*,2019,19(6):1103-1107.

- [11] 朱艳双,欧阳治国. 65 例分泌性中耳炎合并腺样体肥大患儿外周血 T 淋巴细胞亚群检测及其临床意义[J]. *中国妇幼保健*,2020,35(18):3409-3412.
- [12] GAN R, DANIEL M, RIDLEY M, et al. Quality of questionnaires for the assessment of otitis media with effusion in children[J]. *Clin Otolaryngol*,2018,43(2):572-583.
- [13] NOAH T K, KNOOP K A, MCDONALD K G, et al. IL-13-induced intestinal secretory epithelial cell antigen passages are required for IgE-mediated food-induced anaphylaxis [J]. *J Allergy Clin Immunol*,2019,144(4):1058-1073.
- [14] 崔喜财,赵恒威,张鲁壮,等. 急性分泌性中耳炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群与中耳积液炎症因子的相关性[J]. *川北医学院学报*,2021,36(1):68-71.

(收稿日期:2022-05-10 修回日期:2022-10-10)