

重庆地区 HIV 阴性免疫力低下患者肺孢子感染率研究分析

余 轩,姚云清,李佳俊,马秀英,颜成果
(重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨重庆地区人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)阴性免疫力低下患者肺孢子(pneumocystis carinii,PC)感染率,为临床上 HIV 阴性患者合并 PC 感染的早期诊断及治疗提供生物学依据。**方法:**取 71 例 HIV 阴性免疫力低下患者的痰液标本,分别运用六亚甲基四胺银染色法(gomori methenamine silver stain,GMS)和内转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)-巢式 PCR 法检测标本中肺孢子。**结果:**71 例患者痰液标本中,GMS 染色法检测出 PC 2 例,巢式 PCR 法检测出 PC 25 例,差异有统计学意义($\chi^2=21.04, P=0.000$);不同性别患者 PC 感染率无统计学差异($\chi^2=0.375, P=0.540$);不同年龄阶段患者 PC 感染率无统计学差异($\chi^2=0.777, P=0.678$)。肿瘤放化疗后患者、血液系统疾病患者、肾移植患者、肝移植患者、结缔组织疾病患者感染率分别为 33.33%、26.67%、40.00%、42.86%、39.13%,采用 Fisher 确切概率法对不同病例组感染率进行比较,各病例组间感染率差异无统计学意义($P=0.897$),但本组病例 PC 感染率显著高于同期国外报道,与 2009 年国内报道感染率相当。**结论:**重庆地区 HIV 阴性免疫力低下患者 PC 感染率较高,临床医师应增强对该类患者是否合并 PC 感染的警觉性。

【关键词】HIV 阴性;免疫力低下者;肺孢子感染率

【中图分类号】R563.1⁺9

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-10

作者介绍:余 轩,Email: lvxuan871221@hotmail.com,
研究方向:肺孢子肺炎流行病学及诊断与治疗。

通信作者:姚云清,Email: yunqingyao@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30471512);重庆市自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2009BB5407)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000332.html

2010,137(3):585-592.

[4] Pieringer H,Stuby U,Hargassner S,et al.Treatment with corticosteroids reduces arterial stiffness in patients with polymyalgia rheumatica as measured with pulse wave analysis[J].Ann Rheum Dis,2008,67(2):279.

[5] Wedzicha JA,Calverley PMA,Seemungal TA,et al.The prevent of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations by salmeterol/fluticasone propionate or tiotropium bromide[J].Am J Respir Crit Care Med,2008,177(1):19-26.

[6] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J].中华结核与呼吸杂志,2013,36(4):255-264.

[7] Bolton CE,Cockcroft J R.Lung function and cardiovascular risk:a stiff challenge?[J].Am J Hypertens,2010,23(6):584.

[8] Barr RG,Mesia-Vela S,Austin JH,et al.Impaired flow-mediated dilation is associated with low pulmonary function and emphysema in ex-smokers:the emphysema and cancer action project (EMCAP) study[J].Am J Respir Crit Care Med,2007,176(12):1200-1207.

[9] McAllister DA,MacLay JD,Mills NL,et al.Arterial stiffness is inde-

pendently associated with emphysema severity in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J].Am J Respir Crit Care Med,2007,176(12):1208-1214.

[10] Swierblewska E,Hering D,Kara T,et al.An independent relationship between muscle sympathetic nerve activity and pulse wave velocity in normal humans[J].J Hypertens,2010,28(5):979-984.

[11] Sabit R,Bolton CE,Edwards PH,et al.Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease[J].Am J Respir Crit Care Med,2007,175(12):1259-1265.

[12] Hull JH,Garrod R,Ho TB,et al.Increased augmentation index in patients with cystic fibrosis[J].Eur Respir J,2009,34(6):1322-1328.

[13] Kals J,Kampus P,Kals M,et al.Effects of stimulation of nitric oxide synthesis on large artery stiffness in patients with peripheral arterial disease[J].Atherosclerosis,2006,185(2):368-374.

[14] Yoshimura K,Maekura R,Hiraga T,et al.Effects of tiotropium on sympathetic activation during exercise in stable chronic obstructive pulmonary disease patients[J].Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2012(7):109-117.

(责任编辑:关蕴良)

Infection rate of pneumocystis in immunocompromised patients without HIV infection in Chongqing

She Xuan, Yao Yunqing, Li Jiajun, Ma Xiuying, Yan Chengguo

(Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the infection rate of pneumocystis carinii (PC) in human immunodeficiency virus (HIV) negative immunocompromised patients in Chongqing in order to provide biological references for its early diagnosis and treatment. **Methods:** Sputum specimens were collected from 71 HIV-negative immunocompromised patients in Chongqing and were detected by Gomori's methenamine silver stained (GMS) and internal transcribed spacer (ITS)-nested PCR, respectively. **Results:** PC was detected out in two cases out of 71 cases by GMS and PC was detected out in 25 cases by nested PCR, the difference between the two methods were significant ($\chi^2=21.04, P=0.000$). There was no significant difference in infection rate between difference genders ($\chi^2=0.375, P=0.540$) and different ages ($\chi^2=0.777, P=0.678$). The infection rates of patients with cancer, hematologic disorder, kidney transplantation, liver transplantation and connective tissue disease were 33.33%, 26.67%, 40.00%, 42.86% and 39.13% respectively. There was no significant difference in infection rates between the different case groups ($P=0.897$). The infection rate was significantly higher than that of abroad report and was the same as that of domestic report in 2009. **Conclusion:** The infection rate of PC of HIV-negative immunocompromised patients in Chongqing is high. Clinician should enhance the alertness of patients with PC.

【Key words】 human immunodeficiency virus-negative; immunocompromised patients; infection rate of pneumocystis jirovecii

肺孢子是一种重要的机会性感染病原体。1912年首次被发现并被命名为卡氏肺孢子(pneumocystis carinii, PC)^[1]。大量的研究显示不同哺乳动物源的肺孢子具有宿主特异性与基因型别差异^[2],在不同种宿主之间不能相互感染。2001年国际原生生物会议将人源肺孢子命名为“耶氏肺孢子(pneumocystis jirovecii, PJ)”,但为了避免医学文献称谓混乱问题,目前国际学界仍然称为PC,并将其所致的人类肺炎统称为卡氏肺孢子肺炎(pneumocystis carinii pneumonia, PCP)^[3]。在发达国家,人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者中有75%并发PCP,因此,研究者将PCP视为艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)患者的“标志病”^[4]。近年来国外已有报道称HIV阴性的免疫力低下患者如恶性肿瘤患者、长期应用皮质类固醇激素患者、器官移植患者PCP的发病率日益增高,有的发病率甚至可高达85%^[5-7],而且在HIV阴性感染者中,PCP一般发病更急,病情更重,病死率同HIV阳性感染者比显著增高。在中国大陆,鲜有关于HIV阴性免疫力低下患者PC感染率的研究。研究表明,PC的核rRNA基因包含18S、5.8S、26S rDNA,三者的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)分为ITS1和ITS2,前者位于18S和5.8S rRNA之间,后者位于5.8S和26S rRNA之间。其中18S、5.8S、26S rRNA序列较保守,进化速率缓慢,不同宿主的同源性较大,而ITS序列不保守,较其两侧的rRNA

基因功能区进化速度快、不同宿主基因同源性小变异大,是鉴别PC较好的分子标记。因此,本实验对重庆地区HIV阴性免疫力低下患者的痰液进行了PC-ITS基因检测,研究PC在该类患者中的感染情况。

1 材料与方法

1.1 标本来源

痰液标本取自2012年6月至2013年1月在重庆医科大学附属第一医院免疫力低下的71例住院患者(患者均来自重庆市辖区),HIV抗体均为阴性。患者免疫力低下的病因详见表1。

表1 不同病因免疫力低下患者构成比

Tab.1 Constituent ratio of immunocompromised patients with different etiologies

病因	病例数(n)	百分比(%)
结缔组织疾病	23	32.39
肿瘤放化疗	21	29.58
血液系统疾病	15	21.13
肝移植	7	9.86
肾移植	5	7.04
合计	71	100.00

1.2 主要试剂

DNA提取试剂盒购自上海生物工程有限公司。Taq酶、dNTP购自大连宝生物工程有限公司。引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

1.3 PC DNA 阳性对照物

前期预实验中 PCR 产物经测序证实含有 PC 相应基因的 DNA 样本,标本编号为 T26。

1.4 标本处理

收集患者清晨第一口痰液标本,约 3 ml,先加入等体积的无水乙醇 4℃放置 30 min,然后移于离心管中,14 000 r/min 离心 7 min,弃上清,沉淀中加入 2 ml 0.1%DTT 溶液,37℃水浴裂解 30 min 后 14 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用 PBS-EDTA 洗涤 2 次后,弃上清,取少量沉淀涂 2 张片待染色,剩余部分-80℃保存备用。

1.5 六亚甲基四胺银染色 (gomori methenamine silver stain, GMS) 检测 PC 包囊

涂片空气干燥后滴加甲醇固定,自然干燥后流水冲洗,再浸于 5%过碘酸钠溶液 5 min,流水冲洗,自然干燥,新鲜配置的 GMS 工作液滴于玻片上,酒精灯烘烤至淡褐色(约 25 s 左右),冷却后流水冲洗,油镜下观察。

1.6 标本总 DNA 提取

参照上海生工生物工程有限公司 UNIQ-10 柱式临床样品基因组抽提试剂盒说明从经处理后的痰标本中提取总 DNA,-20℃保存备用。

1.7 巢式 PCR 法检测 PC ITS 基因

以提取的总 DNA 为模版,进行 ITS-巢式 PCR 扩增。设计扩增 PC ITS1-5.8S rRNA-ITS2 基因引物,引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成:外引物 1724F:5'-AAGTTGATCAA-ATTTGCTC-3';ITS2R:5'-CTCGGACGAGGATCCTCGCC-3';内引物 ITS1F:5'-CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC-3' ITS2R1:5'-GTTTCAGCGGGTGATCCTGCCTG-3'。采用 20 μl 反应体系:10×PCR 缓冲液 2 μl,dNTP 混合液 1 μl,MgCl₂ 1.5 μl,20 μmol/L 引物各 2 μl,5.0 U Taq 酶 0.5 μl,模版 DNA 3 μl,灭菌蒸馏水 8 μl。第二步反应体系模版 DNA 为第一步 PCR 反应产物 2 μl,灭菌蒸馏水 9 μl,其余同第一步反应体系。第一步反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,47℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min,30 个循环后 72℃延伸 8 min。第二步反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,62℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,30 个循环后 72℃延伸 8 min。取 5 μl 第二步 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳并观察结果。每次 PCR 反应均设阳性对照(T26 号样本 DNA)和阴性对照(灭菌去离子水)。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对本实验中数据进行录入与分析。采用卡方检验比较 GMS 法与巢式 PCR 法对 PC 的检出率,不同性别患者 PC 的感染率,不同年龄阶段患者 PC 的感染率;采用四格表资料的 Fisher 确切概率法比较不同病因患者 PC 感染率。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 GMS 染色检测 PC 包囊结果

71 例痰液标本经 GMS 染色后油镜下观察到 PC 包囊 2

例,阳性率为 2.82%。油镜下可见到 PC 包囊壁被染成褐色或棕色,呈圆形或椭圆形,部分呈现括弧样(表 2、图 1)。

表 2 GMS 法和巢式 PCR 法检测 PC 的结果比较

Tab.2 Comparison of PC results by GMS and nested-PCR

GMS 染色法	巢式 PCR 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	2	0	2
阴性	23	46	69
合计	25	46	71

注:采用配对四格表资料的卡方检验,差异具有统计学意义($\chi^2=21.04$, $P=0.000$)

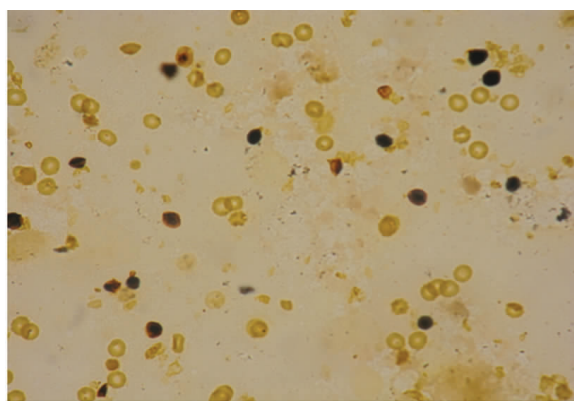


图 1 油镜下 PC 包囊 (GMS 染色, 1 000×)

Fig.1 PC numbers under oil immersion lens (GMS staining, 1 000×)

2.2 巢式 PCR 法检测 PC ITS 基因结果

71 例患者痰液标本中,经巢式 PCR 检测出 PC ITS 基因 DNA 25 例,总感染率为 35.21%(表 2、表 3、图 2),GMS 染色法和巢式 PCR 法检测 PC 的敏感性差异有统计学意义($\chi^2=21.04$, $P=0.000$),巢式 PCR 法检测 PC 敏感性明显高于 GMS 染色法。肿瘤放疗后患者、血液系统疾病患者、肾移植患者、肝移植患者、结缔组织疾病患者 PC 感染率分别为 33.33%(7/21)、26.67%(4/15)、40.00%(2/5)、42.86%(3/7)、39.13%(9/23),对其进行 Fisher 确切概率法比较,不同病例组患者 PC 感染率无统计学差异($P=0.897$)。

表 3 不同病因免疫力低下患者 PC 感染率

Tab.3 Infection rates of PC in immunocompromised patients with different etiologies

	阳性数 (n)	阳性率 (%)
结缔组织疾病	9	39.13
肿瘤放疗化疗	7	33.33
血液系统疾病	4	26.67
肝移植	3	42.86
肾移植	2	40.00
合计	25	35.21

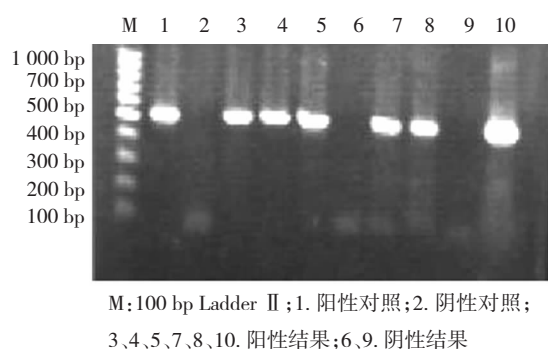


图2 非 HIV 感染患者 PC 巢式 PCR 扩增电泳图
Fig.2 Amplification electrophoresis of nested-PCR of non HIV patients

2.3 不同性别患者 PC 感染率

本组 HIV 阴性免疫力低下患者男性 42 例,女性 29 例。PC 总感染人数 25 人,总感染率为 35.21%(25/71)。男性患者 PC 感染率为 38.10%(16/42),女性患者感染率为 31.03%(9/29)。男女患者 PC 感染率差异无统计学意义($\chi^2=0.375$, $P=0.540$)(表 4)。

表 4 不同性别 HIV 阴性免疫力低下患者 PC 感染率

Tab.4 Infective rates of PC in male or female patients

性别	感染人数	非感染人数	合计	感染率%
男	16	26	42	38.10 ^a
女	9	20	29	31.03 ^a
合计	25	46	71	35.21

注:a,差异不具有统计学意义

2.4 不同年龄阶段患者 PC 感染率

本组患者年龄在 23~83 岁之间。50 岁(含 50 岁)以下患者 PC 感染率为 30.56%(11/36),50~60 岁(含 60 岁)患者 PC 感染率为 38.10%(8/21),60 岁以上(不含 60 岁)患者 PC 感染率为 42.86%(6/14)。不同年龄阶段患者 PC 感染率差异无统计学意义($\chi^2=0.777$, $P=0.678$)(表 5)。

表 5 不同年龄阶段 HIV 阴性免疫力低下患者 PC 感染率

Tab.5 Infective rates of PC in patients with different ages

年龄	感染人数	非感染人数	合计	感染率%
50岁以下	11	25	36	30.56 ^a
50~60岁	8	13	21	38.10 ^a
60岁以上	6	8	14	42.86 ^a
合计	25	46	71	35.21

注:a,差异没有统计学意义

3 讨论

PC 是一种重要的机会性感染病原体,可寄居于人和多种哺乳动物肺组织中,当宿主免疫功能正常

时处于隐性感染,当宿主免疫功能低下时便可导致致命性 PCP^[8]。自 1981 年发现 HIV 以来,PCP 常见于艾滋病患者,1987 年美国疾病控制中心统计资料表明 AIDS 并发 PCP 率高达 80%,且 60%的艾滋病以 PCP 为首发症状。在最近的研究报道中,马来亚大学医学中心对 2000 年至 2009 年期间来自中国、印度及马来亚的 59 例艾滋病患者进行了回顾性研究^[9],发现 PC 感染率高达 62.7%,Gutiérrez 等^[10]发现在青年 HIV 感染者中,PCP 的发病率为 40%,而在我国,Huang 等^[11]对广东地区 762 例 AIDS 住院患者中 1 428 例次的机会性感染情况进行分析,发现 PCP 的感染率为 4.27%(61/1 428)。

虽然 PCP 发生的主要群体是艾滋病患者,但是仍有 1/3 的 PCP 发生在 HIV 阴性而存在其他免疫抑制因素的情况下,比如血液系统恶性肿瘤、实体器官肿瘤、自身免疫性疾病以及器官移植等,且随着各种原因造成的免疫机能低下患者数的日益增长,PCP 在非 HIV 感染免疫力低下患者中发病率逐年增高,Hui 和 Kwok^[12]分析香港 1994 至 2003 年 PCP 的流行概况发现 PC 在 AIDS 患者的感染率为 33.3%(6/18),其余 66.7%(12/18)发生在非 HIV 感染的其他原因免疫机能受损患者。有资料显示^[5],在接受 ICU 治疗的 PCP 患者中,非 HIV 感染患者的比例已由 1993 年的 0 上升到 2006 年的 6.5%,且 HIV 阴性 PCP 患者的平均年龄显著高于 HIV 阳性 PCP 患者,且死亡率(48%)也显著高于 HIV 阳性 PCP 患者(17%),Firtzsche 等^[13]人检测患有自身免疫性疾病患者,PC 感染率为 28.5%,而年龄在 60 岁以上的自身免疫性疾病患者,PC 感染率显著提高。Sun 等^[14]人报道非艾滋病病毒感染者中 PC 感染率为 23.7%,而其中有免疫功能低下表现的患者中 PC 检出率高达 39.4%。而本实验中重庆地区 HIV 阴性免疫力低下患者 PC 感染率为 35.21%,高于同期国外报道,与 2009 年国内报道相当,这可能与地域病原体分布不同和种族差异等因素有关。

在本实验中,肿瘤放化疗后患者、血液系统疾病患者、肾移植患者、肝移植患者、结缔组织疾病患者感染率分别为 33.33%、26.67%、40.00%、42.86%、39.13%,不同病因组 PC 感染率并无统计学差异,但均明显高于同期国外报道,证实了 PCP 的流行具有地域差异性。同时,大量国外研究显示 HIV 阴性不同病因组 PCP 患者的病死率并无统计学差异^[15-17]。

传统的病原学染色法虽一直被认为是 PCP 诊

断的金标准,但病原学染色法大多仅能识别 PC 包裹,不能区分滋养体,对检测者的专业要求很高,因此敏感性很低,常常造成漏诊,本实验中采用 GMS 法检测 PCP 阳性率仅为 2.82%。近年来,分子生物学技术已作为辅助检测手段广泛应用于临床中,PCR 技术具有操作简便、诊断时间窗早、无创、敏感性高、特异性强的特点,可以应用于肺孢子菌诊断中以早期诊断 PCP。本实验采用巢式 PCR 来检测 HIV 阴性免疫力低下患者中 PC 的感染率,巢式 PCR 在普通 PCR 的基础上设计了 2 对引物,大大提高了 PCR 诊断的敏感性和特异性。本实验中巢式 PCR 阳性率为 35.21%,明显高于 GMS 染色法,由此可见,巢式 PCR 可以更快速、灵敏地检测出非 HIV 感染免疫力低下并合并 PCP 感染患者体内的 PC,为临床上非 HIV 感染免疫力低下患者合并 PC 感染的早期诊断及及时治疗提供了生物学依据。

本实验中采集的标本均来自重庆地区 HIV 阴性免疫力低下患者,不同性别、不同年龄段及不同病例组 PC 感染率差异无统计学意义。这些患者都伴有咳嗽、咳痰等不典型症状,但并没有典型影像学支持,且仅有 6 例患者胸片提示可能有肺间质性病变,患者缺乏典型症状和早期的影像学改变影响了临床诊断与及时治疗。而大量研究显示,HIV 阴性 PCP 患者的死亡率显著高于 HIV 阳性 PCP 患者^[12],且这类患者更易成为传播 PCP 的潜在危险。然而,目前国内对 HIV 阴性免疫力低下患者合并 PC 感染的相关临床研究较国外相比仍较少,大多数临床医师缺乏对该类患者是否合并有 PC 感染的重视度从而导致漏诊、误诊而耽误了及时治疗,造成 PCP 死亡率增高。因此,临床医师应该增强对 PCP 的警觉性,尤其是对于 HIV 阴性免疫力低下患者,当出现不明原因发热、干咳和呼吸困难时,应警惕是否合并 PCP 可能,并及早进行病原学检测或分子生物学检测,以便及时作出诊断与治疗,从而降低 PCP 死亡率。

参 考 文 献

- [1] Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(2): 297-317.
- [2] Cushion MT, Stringer JR. Stealth and opportunism: alternative lifestyles of species in the fungal genus *pneumocystis*[J]. Annu Rev Microbiol, 2010(64): 431-452.
- [3] Herrag M, Elfassy Fihry MT, Alaoui Yazidi A. *Pneumocystis jirovecii*: what does this mean?[J]. Rev Pneumol Clin, 2010, 66(6): 342-346.
- [4] Wang XL, Wang XL, Wei W, et al. Retrospective study of *pneumocystis pneumonia* over half a century in mainland China[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt5): 631-638.
- [5] 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.
- [6] Krajicek BJ, Limper AH, Thomas CF Jr. Advances in the biology, pathogenesis and identification of *pneumocystis pneumonia*[J]. Curr Opin Pulm Med, 2008, 14(3): 228-234.
- [7] Kovacs JA, Masur H. Evolving health effects of *Pneumocystis*: one hundred years of progress in diagnosis and treatment[J]. JAMA, 2009, 301(24): 2578-2585.
- [8] Huang L, Cattamanchi A, Davis JL, et al. HIV-associated *pneumocystis pneumonia*[J]. Proc Am Thorac Soc, 2011, 8(3): 294-300.
- [9] Jamaiah I, Rohela M, Tok EL, et al. *Pneumocystis carinii* (*jirovecii*) pneumonia (PCP): the most common opportunistic infection observed in HIV/AIDS cases at the University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2012, 43(4): 825-831.
- [10] Gutierrez S, Morilla R, Leon JA, et al. High prevalence of *pneumocystis jirovecii* colonization among young HIV-infected patients[J]. J Adolesc Health, 2011, 48(1): 103-105.
- [11] Huang LF, Tang XP, Gai WP, et al. An analysis of opportunistic infection in 762 inpatients with human immunodeficiency virus infection in Guangdong areas[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2010, 49(8): 653-656.
- [12] Hui M, Kwok WT. *Pneumocystis carinii* pneumonia in Hong Kong: a 10 year retrospective study[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt1): 85-88.
- [13] Fritzsche C, Riebold D, Munk-Hartig A, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among patients with autoimmune inflammatory diseases and corticosteroid therapy[J]. Scand J Rheumatol, 2012, 41(3): 208-213.
- [14] Sun L, Huang MJ, An YJ, et al. An epidemiologic study on *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV infected patients in China[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2009, 30(4): 348-351.
- [15] Khodadadi H, Mirhendi H, Mohebbi M, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in non-HIV-infected patients based on Nested-PCR detection in bronchoalveolar lavage samples[J]. Iran J Public Health, 2013, 42(3): 298-305.
- [16] Fritzsche C, Riebold D, Fuehrer A, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization among renal transplant recipients[J]. Nephrology (Carlton), 2013, 18(5): 382-387.
- [17] Azoulay E, Mokart D, Rabbat A, et al. Diagnostic bronchoscopy in hematology and oncology patients with acute respiratory failure: prospective multicenter data[J]. Crit Care Med, 2008, 36(1): 100-107.

(责任编辑:唐宗顺)