

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.21.010  
文章编号: 1005-8982 (2018) 21-0053-05

新进展研究·论著

## 肠道病毒 71 与肺炎支原体二重感染对手足口病患儿免疫功能的影响\*

李文莲, 李文菊, 陈寿珊, 张翔

(贵州省遵义市第一人民医院 儿童重症医学科, 贵州 遵义 563000)

**摘要:** **目的** 探讨肠道病毒 71 (EV71) 与肺炎支原体 (MP) 二重感染对手足口病患儿细胞免疫和体液免疫的影响。**方法** 选取该院 PICU 重症手足口病患儿 120 例为研究对象, 根据是否感染 EV71 和 MP, 将研究对象分为甲组 31 例、乙组 34 例、丙组 28 例、丁组 27 例, 选取同期 30 例健康患儿为对照组, 比较各组血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值、白介素 6 (IL-6)、白介素 10 (IL-10)、IgA、IgG、IgM 的不同表达水平, 比较 4 组手足口病重症危重型发病率。**结果** ① 4 组手足口病与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值、IgA、IgG、IgM 低于对照组, CD8<sup>+</sup>、IL-6、IL-10 高于对照组; ② 4 组手足口病比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值、IgA、IgG、IgM 水平, 丁组至甲组依次降低, CD8<sup>+</sup>、IL-6、IL-10, 丁组至甲组依次升高; ③ 各组手足口病重症危重型发病率差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 甲组至丁组重症危重型发病率依次降低。**结论** EV71 病毒与肺炎支原体二重感染致手足口病患儿细胞免疫及体液免疫均降低。

**关键词:** EV71 病毒; 肺炎支原体; 手足口病; 细胞免疫; 体液免疫

**中图分类号:** R725.1

**文献标识码:** A

## Effect of double infection of EV71 virus and mycoplasma pneumoniae on immunity of children with hand foot mouth disease\*

Wen-lian Li, Wen-ju Li, Shou-shan Chen, Xiang Zhang

(Department of Pediatric Critical Care Medicine, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi, Guizhou 563000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of EV71 virus and mycoplasma pneumoniae infection on cell immunity and humoral immunity in children with hand foot and mouth disease. **Method** Totally 120 cases with severe hand foot and mouth disease (HFMD) in PICU in our hospital were involved. The subjects were divided into group 1 ( $n = 31$ ), group 2 ( $n = 34$ ), group 3 ( $n = 28$ ) and group 4 ( $n = 27$ ). Thirty healthy children were enrolled in control group. Levels of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio, IL-6, IL-10, IgA, IgG and IgM were determined. **Result** Compared with control group, all 4 groups experienced decreased levels of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, IgA, IgG and IgM and increased levels of CD8<sup>+</sup>, IL-6 and IL-10 ( $P < 0.05$ ). Among 4 groups, The difference was statistically significant by *t* test ( $P < 0.05$ ). The blood concentration of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio, IgA, IgG and IgM was highest in group 4 and lowest in group 1, while levels of CD8<sup>+</sup>, IL-6 and IL-10 were highest in group 1 and lowest in group 4. Incidence of severe HFMD was statistically different among 4 groups with group 1 as the highest

收稿日期: 2017-09-01

\* 基金项目: 贵州省遵义市联合基金项目 (No: 遵社科合社字 (2015) 10 号)

and group 4 as the lowest ( $P = 0.000$ ). **Conclusion** Cell immunity and humoral immunity of children with HFMD are compromised significantly by the double infection of EV71 and *Mycoplasma pneumoniae*.

**Keyword:** enterovirus71; mycoplasma pneumoniae; hand foot mouth disease; cellular immunity; humoral immunity

手足口病 (hand foot mouth disease, HFMD) 是由多种肠道病毒引起的儿童传染性疾病, 5 岁以下儿童发病多见。特别是肠道病毒 71 (enterovirus 71, EV71) 与肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 二重感染者易发展为重症危重型, 短时间内迅速进展为肺水肿、肺出血以及循环衰竭等导致死亡或致残, 但二重感染致病情加重机制不明, 本研究旨在从细胞免疫及体液免疫方面探寻二重感染致病情加重发生、发展规律。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2015 年 11 月 -2017 年 2 月该院 PICU 收诊的 120 例重症手足口病患儿为研究对象, 诊断标准参照《手足口病诊疗指南 (2010 版)》<sup>[1]</sup>。经医学伦理委员会及患儿家属同意。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组** 入院当日取咽拭纸用逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法检测 EV71 病毒核酸, 被动凝集定量检测法检测血肺炎支原体抗体 (*mycoplasma pneumoniae* antibody, MP-IgM), 据 EV71 和 MP 是否为阳性或阴性将研究对象分为甲组 [EV71 (+)、MP-IgM (+)] 31 例。男性 17 例, 女性 14 例; 平均 (3.2 ± 0.5) 岁。乙组 [EV71 (+)、MP-IgM (-)] 34 例。男 16 例, 女 18 例; 平均 (3.1 ± 0.6) 岁。丙组 [EV71 (-)、MP-IgM (+)] 28 例。男性 13 例, 女性 15 例; 平均 (3.2 ± 0.8) 岁。丁组 [EV71 (-)、MP-IgM (-)] 27 例。男性 15 例, 女性 12 例; 平均 (3.5 ± 0.4) 岁。选取同期健康儿童 30 例为对照组。各组间年龄、性别差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具可比性。

**1.2.2 T 淋巴细胞检测** 入院当日抽取静脉血 2 ml, 加入 EDTA 抗凝管, 混匀, 使血液抗凝, 取 Tru Count Tube 试管, 吸取 Mutli TEST CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 试剂 20 μl 加入试管。在试管中加入 EDTA 抗凝全血 50 μl, 拧上盖子轻轻颠倒混匀, 室温避光放置 15 min, 使试剂中的荧光标记抗体与各淋巴细胞亚群的表面抗原特异

地结合。再加入 450 μl 溶血素溶解红细胞, 轻轻混匀, 避光放置 15 min。采用流式细胞仪 (BD 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司) 检测分析。

**1.2.3 白细胞介素 6 (interleukin6, IL-6)、白细胞介素 10 (interleukin6, IL-10) 表达水平检测** 入院当日抽取静脉血 3 ml, 不抗凝, 血块回缩后 3 500 r/min 离心 15 min, (LD4-2 型低温离心机, 北京医用离心机厂), 留取血清, 置入 -70℃ 冰箱冷冻保存备用。采用天津原子能公司提供试剂盒由专人严格按照试剂盒操作说明书检测血清 IL-6、IL-10 水平。操作流程: 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外, 余孔分别加标准溶液或待测样品, 轻轻混匀, 酶标板加盖, 37℃ 反应 120 min; 弃去液体, 甩干; 每孔加检测溶液 100 μl, 37℃ 反应 60 min, 洗板 5 次甩干; 依序每孔加底物溶液 90 μl, 37℃ 避光显色 30 min; 依序每孔加终止溶液终止反应, 用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度值, 绘制标准曲线。据血清样品值在标准曲线上查出 IL-6、IL-10 浓度。

**1.2.4 血清 IgG、IgA、IgM 表达水平检测** 入院当日抽取静脉血 3 ml, 不抗凝, 血块回缩后 3 500 r/min 离心 15 min, (LD4-2 型低温离心机, 北京医用离心机厂), 留取血清, 置入 -70℃ 冰箱冷冻保存备用。

采用天津原子能公司提供试剂盒由专人严格按照试剂盒说明书操作检测血清 IgG、IgA、IgM。操作流程: 取标本血清 0.1 ml, 加 1 ml 生理盐水进行稀释。分别取 2 个抗体液 1 ml, 检测 IgG 分别加入 10 μl 的稀释血清和标准血清 (检测 IgA 分别加入 40 μl 的稀释血清和标准血清、检测 IgM 分别加入 80 μl 的稀释血清和标准血清), 混匀, 37℃ 下水浴, 30 min 后用波长 340 nm 比浊, 读取吸光度, 据标准品分别计算 IgG、IgA、IgM 浓度。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较采用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, 计数资料以率 (%) 表示, 比较做  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 T 淋巴细胞表达水平

4 组手足口病分别与对照组比较, 经单因素方差分析, 各组间血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 采用 Dunnett 方法进行两两比较, 血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值低于对照组, 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); CD8<sup>+</sup> 高于对照组, 组间差异有统计学意义; 4 组手足口病两两比较, 经  $t$  检验, 血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值、丁组至甲组依次降低, CD8<sup>+</sup> 丁组至甲组依次升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 血清细胞因子及体液免疫球蛋白比较

4 组手足口病分别与对照组比较, 经单因素方差分析, 各组间 IL-6、IL-10、IgG、IgM、IgA 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 采用 Dunnett 方法进行两两比较, IgA、IgG、IgM 低于对照组, IL-6、IL-10 高于对照组, 组间差异有统计学意义; 4 组手足口病两两比较, 采用  $t$  检验, IgA、IgG、IgM 丁组至甲组依次降低, IL-6、IL-10, 丁组至甲组依次升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 各组手足口病重症危重型发病率比较

4 组手足口病重症危重型发病率, 甲组 54.8% (17/31), 乙组 35.3% (12/34), 丙组 33.3% (9/28), 丁组 7.41% (2/27), 经  $\chi^2$  检验, 比较各组手足口病重症危重型发病率, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 14.695$ ,  $P = 0.002$ ); 进一步  $\chi^2$  检验的两两比较, 甲组、乙组、丙组和丁组, 重症危重型发病率依次降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

表 1 4 组 T 淋巴细胞表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
甲组 ( $n=31$ )	37.4 ± 3.1	18.2 ± 1.1	23.1 ± 1.3	0.78 ± 0.8
乙组 ( $n=34$ )	40.1 ± 4.8 <sup>1)</sup>	20.1 ± 1.0 <sup>1)</sup>	21.9 ± 2.2 <sup>1)</sup>	0.95 ± 0.7 <sup>1)</sup>
丙组 ( $n=28$ )	42.1 ± 3.7 <sup>2)</sup>	22.6 ± 0.8 <sup>2)</sup>	20.2 ± 0.9 <sup>2)</sup>	1.12 ± 0.9 <sup>2)</sup>
丁组 ( $n=27$ )	48.2 ± 4.1 <sup>3)</sup>	24.8 ± 1.4 <sup>3)</sup>	19.5 ± 1.8 <sup>3)</sup>	1.27 ± 0.7 <sup>3)</sup>
对照组 ( $n=30$ )	56.3 ± 5.2	27.9 ± 2.1	18.1 ± 2.9	1.51 ± 0.7
$F$ 值	132.371	43.429	18.078	118.238
$P$ 值	0.001	0.002	0.001	0.001

注: 1) 与甲组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与乙组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与丙组比较,  $P < 0.05$

表 2 4 组血清细胞因子及体液免疫球蛋白比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6	IL-10	IgG	IgM	IgA
甲组 ( $n=31$ )	68.2 ± 5.2	38.7 ± 3.2	3.4 ± 0.6	0.44 ± 0.05	0.29 ± 0.08
乙组 ( $n=34$ )	64.3 ± 3.8 <sup>1)</sup>	34.2 ± 3.0 <sup>1)</sup>	4.0 ± 0.8 <sup>1)</sup>	0.66 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.39 ± 0.05 <sup>1)</sup>
丙组 ( $n=28$ )	60.1 ± 4.7 <sup>2)</sup>	24.8 ± 4.9 <sup>2)</sup>	4.8 ± 0.9 <sup>2)</sup>	0.88 ± 0.2 <sup>2)</sup>	0.42 ± 0.1 <sup>2)</sup>
丁组 ( $n=27$ )	48.3 ± 2.7 <sup>3)</sup>	18.9 ± 3.1 <sup>3)</sup>	5.4 ± 0.9 <sup>3)</sup>	0.92 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.49 ± 0.1 <sup>3)</sup>
对照组 ( $n=30$ )	36.8 ± 6.3	14.2 ± 7.2	6.9 ± 1.4	6.9 ± 1.4	0.6 ± 0.11
$F$ 值	355.752	235.658	185.529	134.245	126.040
$P$ 值	0.001	0.000	0.001	0.003	0.0002

注: 1) 与甲组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与乙组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与丙组比较,  $P < 0.05$

## 3 讨论

手足口病常累及呼吸、循环及神经系统, 并发肺水肿、肺出血等严重并发症而危及生命。特别是 EV71 与 MP 二重感染者更易出现。文献<sup>[2]</sup> 研究指出, 在免疫应答过程中, 末梢血淋巴细胞分化发育成为功能不同的亚群, 当亚群的数量和功能发生异常时, 导致机体免疫紊乱, 尤其是 T 淋巴细胞及 T 淋巴细胞亚群 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 的数量和相对比值的变化在免疫系统中占主导地位。CD3<sup>+</sup> 主要表达在 T 细胞表面, 是 T 细胞

成熟的重要表面标志。CD3<sup>+</sup>T 细胞可分成 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞两大类, CD4<sup>+</sup>T 细胞主要是 T 辅助细胞, CD8<sup>+</sup>T 细胞主要是细胞毒 T 细胞, 活化后能有效清除病毒, 是细胞免疫反应的主要执行者, CD4<sup>+</sup> 与 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞两者相互诱导、相互制约形成 T 细胞网络, 以调节机体的免疫功能和维持免疫自稳。当 T 细胞网络失衡时, 造成抑制性 T 细胞 (Ts) 功能和分化异常造成机体免疫功能紊乱。研究<sup>[3]</sup> 报道, 重症手足口病患儿 T 淋巴细胞数量减少, 导致 T 淋巴细胞的免疫功

能降低,不能有效抵御病毒感染,且 EV71 通过凋亡 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞而抑制细胞免疫,使 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 水平及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值下降,CD8<sup>+</sup> 上升,引起某些特殊细胞因子如(IL-6, IL-10 等)的释放,造成组织损伤及 EV71 清除率降低而致疾病加重。本研究中,各手足口病组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值低于对照组,支持重症手足口病患儿存在细胞免疫抑制。文献<sup>[4]</sup>报道,在病毒入侵机体时,首先参与应答的是 NK 细胞,可直接杀伤受病毒感染的靶细胞,是机体防御病毒感染的第一道防线。手足口病患儿 T 细胞数量及功能下调导致有免疫介导作用的细胞因子减少,免疫细胞对 EV71 病毒的杀伤作用减弱。本研究中手足口病患儿 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 水平及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值减少,甲组表现更为明显,说明在手足口病患儿体内存在 T 淋巴细胞网络失调,免疫抑制,且免疫抑制越重,病情越重。

体液免疫中 IgG 能够促进单核巨噬细胞的吞噬作用,中和细菌毒素和与病毒抗原结合,使病毒失去感染宿主细胞的能力而有效地抗感染。IgA 有免疫调理、增强吞噬细胞的吞噬功能,清除病原体的作用, EV71 病毒感染导致手足口病患儿 IgA 减少,体液免疫功能降低。IgM 可结合补体,是高效能的抗生物抗体。文献<sup>[5]</sup>报道,手足口病患儿 Th 细胞免疫抑制能够导致体液免疫功能下降, B 细胞表达的 IgG、IgA 及 IgM 等免疫球蛋白水平下降,引起细胞免疫及体液免疫降低。对病毒的清除能力下降,导致手足口病患儿病情进展,本研究中 4 组手足口病 IgG、IgM、IgA 均低于对照组与文献相符。

IL-6 参与免疫和炎症调节、细胞增殖分化及导致炎症反应的作用,过量表达能够导致组织器官炎症损伤、组织坏死、功能衰竭; IL-10 是对 T 细胞有免疫调节作用的抑炎因子,能够反馈性抑制 Th2 细胞的表达,调节 Th 细胞免疫平衡及过度抑制。文献<sup>[6]</sup>报道在手足口病患儿体内 IL-6 及 IL-10 过度表达,提示患者体内存在 Th2 细胞的过度表达、漂移现象及细胞免疫异常,本研究发现手足口病 IL-6、IL-10 升高支持以上观点。

MP 的致病机制主要有直接侵袭、抗原抗体免疫复合物反应、细胞因子介导的组织损伤、MP 的细胞毒素作用、MP 代谢产物致病等。MP 进入抗原提呈细胞内诱导 T 细胞分化为 Th1、Th2 细胞,合成分泌 IL-6、IL-10 等细胞因子,导致保护性抗炎反应。但过度激活和释放会导致免疫损伤。有研究<sup>[7]</sup>报道, MP

感染患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞减少, CD8<sup>+</sup>T 细胞升高, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值倒置,病情越重倒置越明显,病情恢复越慢;另有文献<sup>[8]</sup>报道, MP 感染时对 B 细胞的损害作用较 T 细胞大,血清中 IgG 水平下降更明显,提示 MP 感染具有免疫抑制作用。CD8<sup>+</sup> 细胞大多数是 Ts 细胞, Ts 细胞对非已抗原诱发的免疫应答具有抑制作用,且 Ts 细胞功能变化是导致多种免疫异常的重要机制。本研究中 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 降低,可能是 Ts 细胞功能低下,机体发生过强的免疫应答,导致免疫损伤,使患者病情加重。文献<sup>[9-10]</sup>报道, MP 可借助特有的黏附结构紧密牢固地吸附于宿主细胞表面,逃避黏膜纤毛的清除作用及吞噬细胞的吞噬,且 MP 与宿主细胞膜本身有相似的抗原成分,可以逃避宿主免疫监视,得以长期存在于宿主体内。EV71 有一种口袋因子,通常定位在病毒保护壳口袋内,存在于 EV71 表面壳蛋白五聚体周围的“峡谷”区,比较稳定,不易被吞噬细胞吞噬,当 EV71 与人体细胞结合时,这一口袋因子会被挤出口袋,导致病毒颗粒失稳,随后分解并将其遗传物质释放到感染细胞中进行复制,从而对人体疯狂进攻,最终发展成肺水肿、肺出血等危及生命。

综上所述, EV71 及 MP 感染均可致细胞免疫及体液免疫抑制,且两者在致病方式、病原体稳定性方面均有共同之处,故两者混合感染则进一步加重免疫紊乱,使手足口病患儿病情进一步加重发展为重症危重型,甚至并发肺水肿,肺出血等而危及生命。本研究中甲组重症危重型发病率高达 54.8%。丁组重症危重型发病率仅 7.41%,甲组、乙组、丙组与丁组比较差异有统计学意义,说明 EV71 与 MP 二重感染率越高,患儿免疫紊乱越明显,病情越重,但本研究病例数少,有待今后进一步研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] 中华人民共和国卫生部 [M]. 手足口病诊疗指南 (2010 年版). 2012-04-16, 引用时间: 2010-04-20 <http://guide.me.dliv.e.cn/guide/2052>.
- [2] 赖茂,倪明. EV71 感染手足口病患儿细胞免疫及体液免疫功能变化研究 [J]. 中国当代医药, 2016, 23(17): 8-10.
- [3] YU P, GAO Z, ZONG Y, et al. Distribution of enterovirus 71 RNA in inflammatory cells infiltrating different tissues in fatal cases of hand, foot, and mouth disease [J]. Arch Virol, 2015, 160(1): 81-90.
- [4] 王倩倩. EV71 感染致手足口病对机体免疫功能影响的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 32(15): 1728-1729.
- [5] 陈梦娇,杨晓蕾,刘龙丁,等. 肠道病毒 71 型与乙型肝炎病毒联合疫苗免疫原性的初步评价 [J]. 中国生物制品学杂志, 2015,

- 28(14): 329-333.
- [6] SABANATHAN S, TAN LE V, THWAITES L, et al. Enterovirus 71 related severe hand, foot and mouth disease outbreaks in South East Asia: current situation and ongoing challenges[J]. *Epidemiol Community Health*, 2014, 8(68): 500-502.
- [7] 谭斌, 王建华, 周明军, 等. 铜仁地区肠道病毒 EV71 基因分型与体液免疫水平关系的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 12(9): 1250-1252.
- [8] 彭宏君, 侯学伶, 李祥, 等. 肠道病毒 71 型体外感染人树突状细胞后启动免疫应答反应的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2014, 2(8): 114-116.
- [9] KUROWSKA E, MAJKUTEWICZ I. The interleukin. 10 in the central nervous system[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2015, 27(69): 886-891.
- [10] ZHAO Y Y, JIN H, ZHANG X F, et al. Case fatality of hand, foot and mouth disease associated with EV71: a systematic review and meta-analysis[J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(14): 3094-3102.

(王荣兵 编辑)