

双重实时荧光 RT-PCR 法检测肠道病毒方法的建立及应用*

许联红¹, 岳玉林², 王永仿¹, 楚 鹰¹, 蒋立新¹

(1. 江苏大学附属武进医院检验科, 江苏常州 213002; 2. 江苏省南京市儿童医院检验科 210008)

[摘要] **目的** 建立检测肠道病毒(EV)和肠道病毒 71 型(EV71)的双重实时荧光 RT-PCR 法。**方法** 设计特异性引物和探针, 建立双重实时荧光 RT-PCR 反应体系, 绘制标准曲线, 对该方法的灵敏度、精密度等进行评价。收集 109 例临床手足口病患者粪便和咽拭子标本用该法进行检测, 并与 EV71 商品化试剂盒检测结果进行比较。**结果** 双重荧光 PCR 法建立的 EV 和 EV71 标准曲线相关系数(r)均为 0.998; 该法检测 EV 和 EV71 的灵敏度分别达到 0.5 TCID₅₀/mL 和 0.05 TCID₅₀/mL; 检测 EV 和 EV71 的批内精密度均小于 3%, 总精密度均小于或等于 4%; 对肠道病毒及其他人类非肠道病毒进行检测, 显示了良好的特异性。109 例临床样本用该法检测出 84 例 EV 病毒阳性样本, 其中 EV71 阳性 56 例, EV71 总阳性率为 51.4%; 与单重荧光 PCR 商品化试剂盒的检测结果完全一致($P=1.000$)。**结论** 建立的双重实时荧光 RT-PCR 法灵敏度高、稳定性好, 对手足口病的早期高通量快速诊断具有重要意义。

[关键词] 手足口病; 肠道病毒; 肠道病毒 71 型; 双重实时荧光 RT-PCR

[中图分类号] R512.5; Q93-33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)33-4688-03

Establishment and application of dual real-time fluorescent RT-PCR method for detection of Enterovirus*

Xu Lianhong¹, Yue Yulin², Chu Ying¹, Wang Yongfang¹, Jiang Lixin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Wujin Hospital of Jiangsu University, Changzhou, Jiangsu 213002, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Municipal Children's Hospital, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

[Abstract] **Objective** To develop a dual real-time fluorescent RT-PCR method for rapid detection of enterovirus(EV) and enterovirus type 71(EV71). **Methods** Specific primers and probes were designed and the dual real-time fluorescent RT-PCR reaction system was established. The quantitative standard curve was drawn; its sensitivity and precision were evaluated. Feces and throat swab specimens of 109 clinical patients with hand foot and mouth disease were collected and tested by using this method. Then the obtained results were compared with those detected by commercial EV71 PCR kit. **Results** The relative coefficient(r) of EV and EV71 standard curve established by the dual real-time fluorescent RT-PCR method were both 0.998. Its sensitivity reached 0.5 TCID₅₀/mL for detecting EV and 0.05 TCID₅₀/mL for detecting EV71. The within-run precision for detecting EV and EV71 was $<3\%$ and total precision $\leq 4\%$. The results showed good specificity for the detection of enterovirus and non-enterovirus. In 109 detected clinical samples, 84 cases of EV positive samples were detected, in which 56 cases were EV71 positive with the total positive rate of 51.4%, which was consistent with the result of simple fluorescent RT-PCR commercialization kit($P=1.000$). **Conclusion** The established dual real-time fluorescent RT-PCR method has high sensitivity and good stability, which has an important significance for early high throughput rapid diagnosis of hand foot and mouth disease.

[Key words] hand foot and mouth disease; enterovirus; enterovirus 71; dual real-time fluorescence RT-PCR method

手足口病(HFMD)是一种急性传染病,由多种肠道病毒引起,多发生于 5 岁以下儿童,主要通过密切接触或消化道传播,基本临床表现为手、足、口腔等部位出现疱疹,部分患者可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等多种与神经系统相关的疾病^[1]。个别重症患儿病情发展很快,最终可能导致死亡。引发 HFMD 的 20 多种肠道病毒中以 EV71 型最为常见。1969 年 Schmidt 等^[2]首次从加利福尼亚州患有中枢神经系统疾病的婴儿粪便标本中分离出肠道病毒 71 型,属于小 RNA 病毒科肠道病毒属。EV71 病毒主要通过粪-口传播,且隐性感染者居多,因此易出现暴发流行^[3-4]。该病已被我国定为乙类传染病。快速、简便、高敏感性的检测方法对该病的预防控制极其重要。传统的病毒分离培养、血清学方法等,步骤繁琐,灵敏度不高,容易出现漏检。本试验拟通过建立一种双重实时荧光 RT-PCR 方法,在完全闭管的条件下同步检测通用型肠道病毒(enterovirus, EV)和 EV71 病毒,为临床 HFMD 患者的早期诊

断提供一种有效、快速的检测手段。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 3 月至 2015 年 8 月南京市儿童医院住院 HFMD 患儿的 109 份治疗前标本(粪便标本 64 份和咽拭子 45 份)。HFMD 诊断标准参考中华人民共和国卫生部制定的 2010 年版《手足口病诊疗指南》。EV71/FY0805 和 EV71/BrCr 病毒株由南京大学公共卫生中心实验室提供。

1.2 仪器与试剂 病毒核酸提取试剂盒(江苏硕世公司),一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司),ABI7500 荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司),肠道病毒 71 型核酸检测试剂盒(中山大学达安基因公司)。

根据 EV71 的 VP1 区核酸序列和 EV 的 5'UTR 区核酸序列,用 Primer Express3.0 软件设计特异性引物与 TaqMan 探针,并对其进行 BLAST 序列比对,验证引物和探针的特异性。引物和探针序列见表 1,均由上海生物工程公司合成。

表 1 引物和探针序列

引物和探针	序列(5'-3')	位置
EV-F	TCAGGCCTGAATGCGGCTAAT	452~470
EV-R	ACAATATTGTCACCATAAGCAGCCA	592~577
EV 探针	FAM-AAACACGGACACCCAAGTAGTCGG-BHQ1	554~577
EV71-F	CAAATGCTAGTGATGAGAGTAT	2615~2635
EV71-R	GAGGGAGGTCTATCTCTCCAAC	2714~2736
EV71 探针	Texas Red-CRCAYAGYACAGCTGAGACCACTCTC-BHQ2	2662~2686

1.3 方法

1.3.1 病毒核酸的提取 粪便标本须加入适量生理盐水(0.5 g 粪便或 0.5 mL 液态粪便样本加 5 mL 生理盐水),然后将悬液 12 000 r/min 离心 10 min,取 200 μ L 上清液进行 RNA 抽提;咽拭子标本中加入 1 mL 生理盐水充分搅动 10 次,取 200 μ L 提取 RNA;病毒细胞培养物直接取 200 μ L 培养液用于抽提 RNA。取上述各种标本 200 μ L 于 1.5 mL 离心管中,加入 600 μ L 裂解液,震荡混匀,室温放置 5 min;加入 600 μ L 缓冲液震荡混匀,混合液转移至吸附柱中,12 000 r/min 离心 1 min,去掉废液,重复此操作直至转移完;加入 500 μ L 漂洗液,12 000 r/min 离心 1 min,去掉废液,重复漂洗 1 次;12 000 r/min 空柱离心 2 min;将吸附柱放入 1 个干净的 1.5 mL 离心管中,加入 50 μ L 洗脱液静置 5 min,12 000 r/min 离心 1 min 收获纯化的核酸溶液,-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3.2 双重荧光 RT-PCR 检测方法的建立 反应体系:2 \times PCR 缓冲液 12.5 μ L,5 U/ μ L Ex Taq 酶 0.5 μ L,5 U/ μ L 逆转录酶(M-MLV)0.5 μ L,20 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ L,10 μ mol/L 探针 0.5 μ L,总 RNA 5 μ L,DEPC 水补足至 25 μ L。扩增条件:50 $^{\circ}$ C 30 min;95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 35 s,共 45 个循环,在 55 $^{\circ}$ C 进行双重荧光信号检测。

1.3.3 双重荧光 RT-PCR 法的灵敏度检测 将 EV71/FY0805 病毒株培养液(病毒滴度为 5 \times 10⁵ TCID₅₀/mL)10 倍连续稀释(5~0.005 TCID₅₀/mL),提取病毒 RNA,按上述条件进行荧光定量 RT-PCR,每个稀释标本重复检测 10 次。

1.3.4 双重荧光 RT-PCR 法的精密度检测 每天分析 1 个批次,2 个浓度样本(5 \times 10² 和 0.5 TCID₅₀/mL),每个样本重复测定 3 次,连续检测 5 d。参照文献[5]计算批内精密度(CV 批内)和总精密度(CV 总)。

1.3.5 双重荧光 RT-PCR 法的特异度检测 应用双重荧光 RT-PCR 法分别检测 EV71 病毒株、柯萨奇病毒 A16、埃可病毒、轮状病毒和流感病毒。

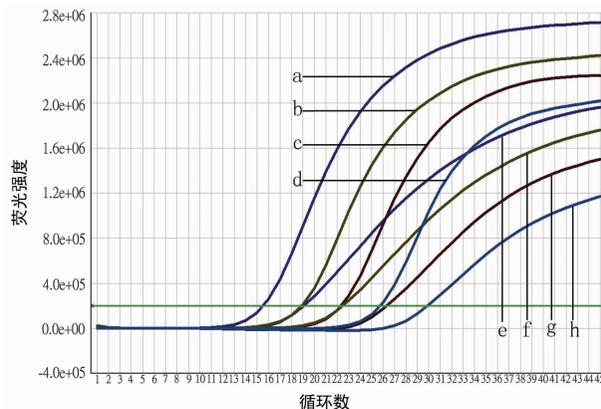
1.3.6 双重荧光 RT-PCR 法的临床应用 应用双重荧光 RT-PCR 法检测收集的 109 例 HFMD 患者粪便和咽拭子样品,并与肠道病毒 71 型核酸检测试剂盒检测结果进行比较。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计数资料用四格表资料的 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EV 和 EV71 标准曲线建立 将 EV71/FY0805 病毒株培养液以 10 倍连续稀释,提取病毒中的核酸(RNA)作为模板,按上述条件进行双重实时荧光 RT-PCR 反应,分别得到相应荧光信号的 EV 和 EV71 特异性扩增曲线,见图 1。然后建立相对定量标准曲线,其中横坐标为病毒滴度的 log 值,纵坐标为 RT-PCR 循环的 Ct 值,EV 和 EV71 标准曲线的相关系数

(r)均为 0.998,见图 2。



EV71 扩增曲线(a:5 \times 10⁴ TCID₅₀/mL,b:5 \times 10³ TCID₅₀/mL,c:5 \times 10² TCID₅₀/mL,d:50TCID₅₀/mL)。EV 扩增曲线(e:5 \times 10⁴ TCID₅₀/mL,f:5 \times 10³ TCID₅₀/mL,g:5 \times 10² TCID₅₀/mL,h:50TCID₅₀/mL)。

图 1 EV 和 EV71 双重荧光 PCR 扩增曲线图

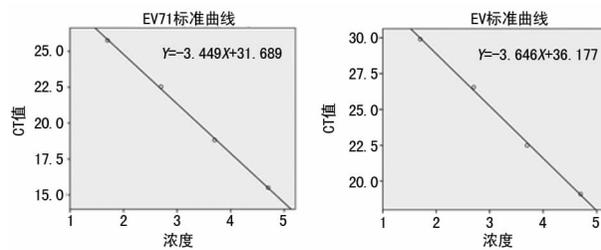


图 2 EV71 和 EV 标准曲线的建立

2.2 双重荧光 RT-PCR 法的灵敏度 当病毒滴度为 5 和 0.5 TCID₅₀/mL 时,10 次 EV 和 EV71 均能检出;当滴度为 0.05 TCID₅₀/mL 时,10 次中有 2 次 EV 未检出,EV71 全部检出;而当滴度为 0.005 TCID₅₀/mL 时,EV 均未检出,EV71 有 1 次未检出。因此该方法检测 EV 和 EV71 的灵敏度分别为 0.5 和 0.05 TCID₅₀/mL。

2.3 双重荧光 RT-PCR 法的精密度 病毒滴度为 5 \times 10² TCID₅₀/mL 时,EV71 和 EV 检测所获得的 Ct 值批内精密度(CV 批内)分别为 2.1% 和 2.4%,总精密度(CV 总)均为 3.9%;病毒滴度为 0.5 TCID₅₀/mL 时,EV71 和 EV 的批内精密度分别为 2.7% 和 2.6%,总精密度分别为 4.0% 和 3.5%,见表 2。

2.4 双重荧光 PCR 法的特异度 EV71/FY0805 和 EV71/BrCr 病毒株通用型 EV 和 EV71 检测结果均为阳性;柯萨奇病毒 A16 和埃可病毒 EV 检测阳性,EV71 结果阴性;而轮状病毒和流感病毒二者皆为阴性,见表 3。

表 2 双重荧光 RT-PCR 法的精密度检测(C_t 值)

项目	EV71						通用型 EV					
	5×10^2 TCID ₅₀ /mL			0.5 TCID ₅₀ /mL			5×10^2 TCID ₅₀ /mL			0.5 TCID ₅₀ /mL		
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3
第 1 天	23.55	23.62	23.42	32.73	31.92	31.63	26.50	26.83	26.12	36.50	35.55	35.23
第 2 天	24.65	23.15	24.31	32.80	31.85	32.74	28.55	27.10	28.01	38.12	36.33	37.91
第 3 天	22.32	22.60	21.75	31.58	30.07	32.44	25.52	26.60	25.05	35.85	34.73	36.88
第 4 天	22.80	23.52	22.56	31.29	30.77	32.87	26.82	27.65	26.36	35.46	34.54	36.76
第 5 天	24.49	24.37	23.89	33.25	34.62	34.46	27.95	27.77	26.58	38.27	38.10	36.74
总均值		23.40			32.33			26.89			36.46	
S _{批内}		0.483			0.872			0.656			0.948	
CV _{批内}		0.021			0.027			0.024			0.026	
S _总		0.915			1.292			1.053			1.282	
CV _总		0.039			0.040			0.039			0.035	

表 3 双重荧光 PCR 法的特异度检测

项目	EV71/ FY0805	EV71/ BrCr	柯萨奇 病毒 A16	埃可 病毒	轮状 病毒	流感 病毒
通用型 EV	+	+	+	+	-	-
EV71	+	+	-	-	-	-

+: 阳性; -: 阴性。

2.5 双重荧光 RT-PCR 法的临床应用 对 109 份临床 HFMD 患者样品(其中粪便标本 64 份,咽拭子标本 45 份)利用双重荧光 RT-PCR 和 EV71 单重荧光 PCR 商品化试剂盒进行检测。通用型 EV 病毒在粪便中检出阳性 52 例,咽拭子中检出 32 例,总阳性率为 77.1%(84/109)。粪便和咽拭子标本的 EV71 阳性率分别为 56.25%(36/64)和 44.4%(20/45)。双重荧光 RT-PCR 法和 EV71 荧光 PCR 试剂盒检测 EV71 总阳性率均为 51.4%(56/109),阳性和阴性符合率均为 100%,检测结果完全一致($P=1.000$),见表 4。

表 4 双重荧光 PCR 法和单重荧光 PCR 试剂盒检测 EV71 的结果比较

双重荧光 RT-PCR 法	EV71 荧光 PCR 检测试剂盒				合计
	粪便($n=64$)		咽拭子($n=45$)		
	EV71+	EV71-	EV71+	EV71-	
EV71+	36	0	20	0	56
EV71-	0	28	0	25	53
合计	36	28	20	25	109

+: 阳性; -: 阴性。

3 讨论

传统的检测 EV71 病原体的方法有病毒分离培养、血清学方法和 RT-PCR 等。病毒分离培养是手足口病感染的实验室诊断金标准,但对实验室条件和操作人员技术要求严格,培养周期长,各个实验室分离阳性率不同,病毒流行期间,不能同时处理大量样本^[6-7]。中和抗体检测费时、费力,无法满足快速、早期诊断的要求。酶联免疫吸附试验(ELISA)法可以检测相应病毒特异性 IgM 抗体,操作简便、特异、准确,适用于早期检测,但在检测低水平抗体时易出现假阴性,报道称其和 RT-PCR 方法联合检测有助于提高 HFMD 的早期诊断^[8-10]。病原微生物检

测已开始广泛使用分子生物学技术,普通的 RT-PCR 技术虽然克服了以上缺点,已经成为快速诊断的重要手段,但 PCR 后需进行凝胶电泳分析,且系统开放,容易受环境因素发生交叉污染,造成假阳性,对疾病的诊断造成误诊^[11-12]。

本研究建立的双重实时荧光 RT-PCR 检测方法,利用 TaqMan 技术,改善了单重荧光定量 RT-PCR 耗时长,成本高和多重高通量 RT-PCR 易发生污染、灵敏度和特异性较低的不足^[13]。该检测方法能在一个反应管中灵敏、特异地检测并区分 EV 和 EV71。EV71 属于 EV 的一个亚型,利用 RT-PCR 检测 EV71 时,理论上不仅仅特异性的 EV71 探针应该呈现阳性曲线,EV 的通用型 EV 探针也应该呈现阳性曲线,最后结果应该显示为双阳性曲线。若是在检测 EV71 时仅仅只有特异性 EV71 探针显示阳性而 EV 探针显示为阴性时,则该样本需重新进行检测。而对于 EV 阳性 EV71 阴性的标本提示患者是由其他肠道病毒引起,为明确病因需进一步进行其他肠道病毒检测。

本研究结果显示,双重荧光 PCR 法建立的 EV 和 EV71 标准曲线相关系数均为 0.998;检测 EV 和 EV71 的灵敏度高,分别达到 0.5 TCID₅₀/mL 和 0.05 TCID₅₀/mL;重复性好,批内精密度均小于 3%,总精密度均小于或等于 4%;特异性检测显示只有 EV71 样本呈现 EV 和 EV71 双阳性曲线,其他病毒标本均未出现特异性 EV71 阳性曲线,表明该法特异性强。临床样本检测结果显示,双重荧光 RT-PCR 法通用型 EV 阳性检出率为 77.1%,EV71 总阳性率为 51.4%,与 EV71 商品化试剂盒的检测结果完全一致($P=1.000$)。以上结果表明双重荧光 RT-PCR 法可以对 EV 和 EV71 进行稳定可靠的检测。

本研究建立的双重实时荧光 RT-PCR 法检测肠道病毒快捷,灵敏度高,稳定性好,污染小,省时省力,能够有效检测手足口病患者感染的病原体,也可进行大规模流行病学调查。

参考文献

- [1] Yang TT, Huang LM, Lu CY, et al. Clinical features and factors of unfavorable outcomes for non-polio enterovirus infection of the central nervous system in northern Taiwan, 1994-2003[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2005, 38(6): 417-424.
- [2] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An(下转第 4741 页)

一部分损伤或中毒事件的发生,降低病死率。

本院新生儿、婴儿及 5 岁以下儿童病死率呈逐年下降趋势。据统计本院 2000~2014 年 5 岁以下儿童死亡病例数占总死亡人数的 3.89%,而到 2010~2014 年下降为 3.08%。婴幼儿和新生儿死亡病例数占 5 岁以下儿童死亡病例数的 74.6%(705/945),而导致新生儿死亡的前几位原因主要为新生儿窒息、早产和低体重儿、新生儿肺炎、新生儿败血症、先天性心脏病等,这与国内报道基本相符^[22-23]。分析原因主要是由于近年来本市提倡优生优育政策,同时加强孕前检查及先天畸形筛查,开展先天性心脏病儿童筛查和免费治疗等工作,同时归因于本院近年来加大孕产医疗工作的投入,本院孕产医疗水平迅速提高,使 5 岁以下儿童病死率逐步降低。

从死亡年龄段分布来看,死亡高发年龄段为 60 岁及以上,有 4 281 人,占死亡人数的 49.38%。随着经济与社会的不断发展,我国步入了老龄化社会,且非传染性疾病为其主要死因。老年化问题逐渐成为社会的主要问题。医院需要积极加强对老年患者的防护措施,不断延长老年人的生命,提升老年人的生活质量,降低人口老龄化的进程及病死率。据统计老年人死亡人数的多少还与天气有关系,季节死亡分布中,死亡人数以冬季及春节最多。慢性阻塞性肺疾病是老年人呼吸道感染疾病最常见和最致命的一种,由于老年患者机体抵抗力降低,在气候骤变的寒冷季节里最易出现病情加重,甚至死亡,故在季节交替及气候变化时需加强对老年患者的防护、保健及关心。医院也应增加医疗资源的配置,加强救治工作,开展卫生宣传教育,倡导全民共同参与的健康生活方式。老年人也应增强自我保健意识,家庭应加强对老年人的关心和陪护,共同促进老年人身心健康,降低老年患者的病死率^[24-25]。

本院应该加强对心血管内外科、神经内外科、肿瘤内外科、呼吸科、老年科等科室的专科建设力度,形成合理的、有效的人才布局,提升专科技术力量,合理配置医疗资源。

参考文献

- [1] 徐群英,胡敏,朱建华,等.南昌市城区居民慢性非传染性疾病患病调查[J].中国公共卫生,2010,26(1):117-118.
- [2] 梁学柱.安庆市某院 2007~2013 年住院病人死亡病例分析[J].中国卫生统计,2015,32(3):496-497.
- [3] 王乐,唐月红,姜小明.新疆某医院 6 486 例住院死亡病例分析[J].中国卫生统计,2014,31(3):501-502.
- [4] 杨樱.2 768 例住院死亡病例的前 10 位死因分析[J].中国卫生统计,2013,30(1):150.
- [5] 韦秀碧,张红.某医院 2003~2013 年住院死亡病例死因分析[J].中国病案,2015,15(2):70-73.
- [6] 张俊辉,叶运莉,杨超,等.泸州市成年居民饮酒与慢性病患关系[J].中国公共卫生,2012,28(5):603-605.
- [7] 林红,孙巍,张莉梅.大连市居民 30 年心脏病死亡趋势分析[J].中华疾病控制杂志,2015,19(1):20-23.
- [8] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2014》概要[J].中国循环杂志,2015,30(7):617-622.
- [9] 刘静.我国心血管病流行趋势的新特点[J].中华心血管病杂志,2015,36(4):295-296.
- [10] 王薇,赵冬,刘静,等.中国 35~64 岁人群心血管病危险因素与发病危险预测模型的前瞻性研究[J].中华心血管病杂志,2003,31(12):902-908.
- [11] 骞美芳,刘芳娥.西安市某社区 319 例居民死亡情况调查分析[J].现代预防医学,2014,41(21):3912-3914,3925.
- [12] 张俊辉,叶运莉,杨超,等.泸州市成年居民饮酒状况与影响因素分析[J].现代预防医学,2012,39(15):3790-3792.
- [13] 李文霞,赵丽华,孔德宝.黄石市某院 2010~2012 年住院死亡病例死因分析[J].中国卫生统计,2014,31(3):552,封 3.
- [14] 吴婷,吴璧锋.某院 2003~2012 年 5 026 例住院病人死亡情况的统计分析[J].中国卫生统计,2015,32(4):648-649.
- [15] 黄晓亮,戴灵真,卢萍,等.广州市 2004~2008 年大气污染对城区居民每日死亡率影响的时间序列分析[J].中华流行病学杂志,2012,33(2):210-214.
- [16] 侯斌,戴灵真,王铮,等.西安市大气污染对城区居民每日死亡率影响的时间序列分析[J].环境与健康杂志,2011,33(2):210-214.
- [17] 马丽娟.2009~2013 年某院 3 372 例住院死亡病例分析[J].中国卫生统计,2015,32(2):333-334.
- [18] Wang X, Song ZF, Xie RM, et al. Analysis of death causes of in-patients with malignant tumors in Sichuan Cancer Hospital of China from 2002 to 2012 [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(7):4399-4402.
- [19] 陈万青,张思维,邹小农.中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J].中国肺癌杂志,2010,13(5):488-493.
- [20] Han Y, Yuan J, Luo Z, et al. Determinants of hopelessness and depression among Chinese hospitalized esophageal cancer patients and their family caregivers [J]. Psycho Oncol, 2013, 22(11):2529-2536.
- [21] 王莹,阮师漫,林少倩,等.济南市 2010~2012 年居民死因分析[J].现代预防医学,2014,41(12):2272-2275.
- [22] 仇红楠.通州市 5 岁以下儿童死因分析[J].中国妇幼保健,2010,22(8):1111-1112.
- [23] 曾建娟.2010~2013 年桂林市 5 岁以下儿童死亡分析[J].中国妇幼保健,2015,30(17):2812-2814.
- [24] 蔡波,沈洪兵,林玲,等.南通市人口老龄化与老年人死因分析和预测[J].中华疾病控制杂志,2013,17(5):388-391.
- [25] 李山山,刘晓剑,付应斌,等.2013 年深圳市居民死因分析[J].中华疾病控制杂志,2015,19(4):415-417.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-06-26)