

一起无防护禽肉加工引起人感染H7N9禽流感病毒的流行病学调查

马钰 张周斌 曹蓝 陆剑云 李魁彪 苏文哲 李铁钢 杨智聪 王鸣

510440 广州市疾病预防控制中心

马钰、张周斌同为第一作者

通信作者:张周斌, Email:1057945321@qq.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.06.020

【摘要】 目的 分析1例人感染高致病性H7N9禽流感病例的感染模式及病原变异情况,为禽流感防控提供依据。方法 采用流行病学方法调查病例可疑暴露史及感染途径,追踪调查病例病情进展;使用核酸检测、病毒分离、基因测序及进化分析等技术对采集的相关标本展开病原学分析。结果 病例无活禽接触史,发病前一周在狭小通风不畅厨房内不带手套加工烹饪光鸡;病例下呼吸道提取物、病家剩余冷冻光鸡表面涂抹标本、活禽来源市场环境标本均检出高度同源的H7N9禽流感病毒,且均在HA基因的裂解位点出现多个碱性氨基酸(PEVPKRKRTAR/GL)插入的突变。结论 无防护禽肉操作是“禽-人”传播模式下的重要感染方式之一,现行的活禽限售区防控措施效果有限,应尽快推进规模化标准养殖,实现活禽全城限售、集中屠宰、冰鲜上市。

【关键词】 H7N9禽流感; 流行病学; 同源性分析

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2016056);广州市科技计划(21707010451)

A case of human infection with highly pathogenic avian influenza A (H7N9) virus through poultry processing without protection measure Ma Yu, Zhang Zhoubin, Cao Lan, Lu Jianyun, Li

Kuibiao, Su Wenzhe, Li Tiegang, Yang Zhicong, Wang Ming

Guangzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China

Ma Yu and Zhang Zhoubin are the first authors who contributed equally to the article.

Corresponding author: Zhang Zhoubin, Email: 1057945321@qq.com.

【Abstract】 Objective To investigate the infection pattern and etiological characteristics of a case of human infection with highly pathogenic avian influenza A (H7N9) virus and provide evidence for the prevention and control of human infection with highly pathogenic avian influenza virus. **Methods** Epidemiological investigation was conducted to explore the case's exposure history, infection route and disease progression. Samples collected from the patient, environments and poultry were tested by using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Virus isolation, genome sequencing and phylogenetic analysis were conducted for positive samples. **Results** The case had no live poultry contact history, but had a history of pulled chicken processing without taking protection measure in an unventilated kitchen before the onset. Samples collected from the patient's lower respiratory tract, the remaining frozen chicken meat and the live poultry market were all influenza A (H7N9) virus positive. The isolated viruses from these positive samples were highly homogenous. An insertion which lead to the addition of multiple basic amino acid residues (PEVPKRKRTAR/GL) was found at the HA cleavage site, suggesting that this virus might be highly pathogenic. **Conclusions** Live poultry processing without protection measure is an important infection mode of "poultry to human" transmission of avian influenza viruses. Due to the limitation of protection measures in live poultry markets in Guangzhou, it is necessary to promote the standardized large scale poultry farming, the complete restriction of live poultry sales and centralized poultry slaughtering as well as ice fresh sale.

【Key words】 Influenza A (H7N9); Epidemiology; Phylogenetic analysis

Fund programs: Medical Science and Technology Research of Guangdong Province (A2016056); Science and Technology Program of Guangzhou (21707010451)

我国自 2013 年报告人感染 H7N9 禽流感病例以来,已经历 5 波流行疫情^[1],全国 27 个省(直辖市和自治区)累计报告病例 1 557 例^[2]。最近的第 5 波疫情呈现病例数增加迅速,疫情波及地从东南沿海向西北蔓延的趋势。此外,禽源病毒不断进化,逐步出现高致病性突变,人间感染风险增高,给公共卫生防控带来新的挑战。2017 年 2 月 28 日,广州市 CDC 从 1 例重症肺炎病例排查送检的下呼吸道标本中检出 H7N9 禽流感病毒核酸阳性。该病例是广州市自 2014 年 5 月设立活禽限售区域以来,首次于限售区内发现的人感染 H7N9 禽流感病例。经流行病学调查及分子生物学检测确定,感染来源为在非限制区购买的光鸡(活鸡现场宰杀褪毛后称为光鸡),无防护禽肉操作等密切接触可能是该病例的感染原因。本文对该病例进行流行病学特征、分子生物学特征分析,旨在探讨人感染禽流感发生与传播方式,为禽流感防控决策提供依据。

对象与方法

1. 调查对象:2017 年 2 月广州市 CDC 在 1 例重症肺炎标本中检测到 H7N9 禽流感病毒核酸。本项调查以该病例临床就诊资料、流行病学调查资料、密切接触者以及病例可能暴露外环境、可疑禽类采样检测情况作为研究对象。

2. 调查方法:根据《人感染 H7N9 禽流感疫情防控方案(第 3 版)》和《人感染 H7N9 禽流感诊疗方案(2017 年第 1 版)》^[3-4],对该例人感染 H7N9 禽流感病例及 11 名密切接触者开展流行病学调查,主要包括病例基本情况、发病就诊经过、临床表现、实验室检查、诊断和转归情况、病例家庭及家居环境情况、暴露史、密切接触者追踪观察情况等。重点溯源病例可能暴露的涉禽肉菜市场,分析其与病例发病的关系。采集病例、密切接触者呼吸道标本,可能暴露的涉禽肉菜市场外环境涂抹标本、病家外环境涂抹标本、病家剩余冷冻光鸡涂抹标本等,当天 4℃ 保存,并按生物安全规范专车送检。所有标本在生物安全柜中预处理后,使用 TIANGEN“病毒检测用 RNA 提取试剂盒(离心柱型)”对标本进行核酸提取,使用达安“A 型流感病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)”、硕世“流感病毒 H7 亚型核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)”、硕世“流感病毒 N9 亚型核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)”进行流感病毒通用 A 型核酸检测以及亚型鉴定,阳性标本使用 SPF 级鸡胚培养,阳性分离毒株经鉴定后进行 HA 基因测序(引物序列为 HA-F:

5' -TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC AAA AGC AGG GG-3' ;HA-R:5' -CAG GAA ACA GCT ATG ACC AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT-3')。引入全国 2013—2017 年流行季各区域代表毒株序列,采用最大似然法用 Mega 5.0 软件构建基因进化树,进行同源性分析。

结 果

1. 病例发现与报告:病例为男性,66 岁,退休人员,居住于广州市活禽交易限制区。病例于 2 月 16 日出现咽痛、咳嗽、乏力,20—25 日先后前往居住地卫生服务中心门诊就诊。因病情加重,出现高热(39.3℃)和左肺明显湿啰音,25 日病例前往广州市某三甲医院(A 医院)就诊,以“发热查因”收入内科,经胸片及 CT 检查,诊断为“重症肺炎”,27 日院方会诊结果为人感染 H7N9 禽流感待排。院方遂采集病例下呼吸道标本送广州市 CDC 检测。28 日检测结果显示 H7N9 禽流感病毒核酸阳性。依据病例临床表现、流行病学调查及实验室检查,判定为人感染 H7N9 禽流感本地病例。3 月 1 日广州市 CDC 对该病例在国家传染病报告信息管理系统和人感染 H7N9 禽流感信息管理系统进行了网络报告。

2. 临床治疗及转归:病例在居住地卫生服务中心门诊接受一般输液治疗,症状未缓解。25 日入住广州市某三甲医院(A 医院)内科接受抗感染等对症支持治疗,27 日开始接受磷酸奥司他韦抗病毒治疗,并于当日转诊隔离至广州市禽流感定点收治医院(B 医院)内科 ICU 负压病房,接受气管插管术辅助呼吸,及连续 7 d 磷酸奥司他韦(2 次/d,150 mg/次)和帕拉米韦(1 次/d,600 mg/次)联合抗病毒治疗。3 月 7 日该病例下呼吸道标本复查结果为阴性,解除隔离。后病例病情逐步好转,于 3 月 20 日拔出气管插管,改换高流量氧疗机辅助呼吸和对症治疗。经专家会诊后,于 4 月 3 日痊愈出院(图 1)。

3. 流行病学调查:

(1)禽类暴露史:病例为退休人员,与妻子同住于广州市某区(A 区,2014 年起该区被纳入活禽交易限售管理)。发病前一个月,无外出旅游史,无亲友拜访史,无发热病例接触史。平日,病例妻子独自去市场买菜,病例负责在家中食材进行切割烹饪。2 月 14 日,妻子前往广州市 B 区某市场(活禽交易非限制区)购买活鸡 2 只,在档口现场宰杀成光鸡后带回家。据病例妻子述,当天病例独自一人在厨房内对光鸡进行斩断切割,期间未戴手套,未开窗及排气

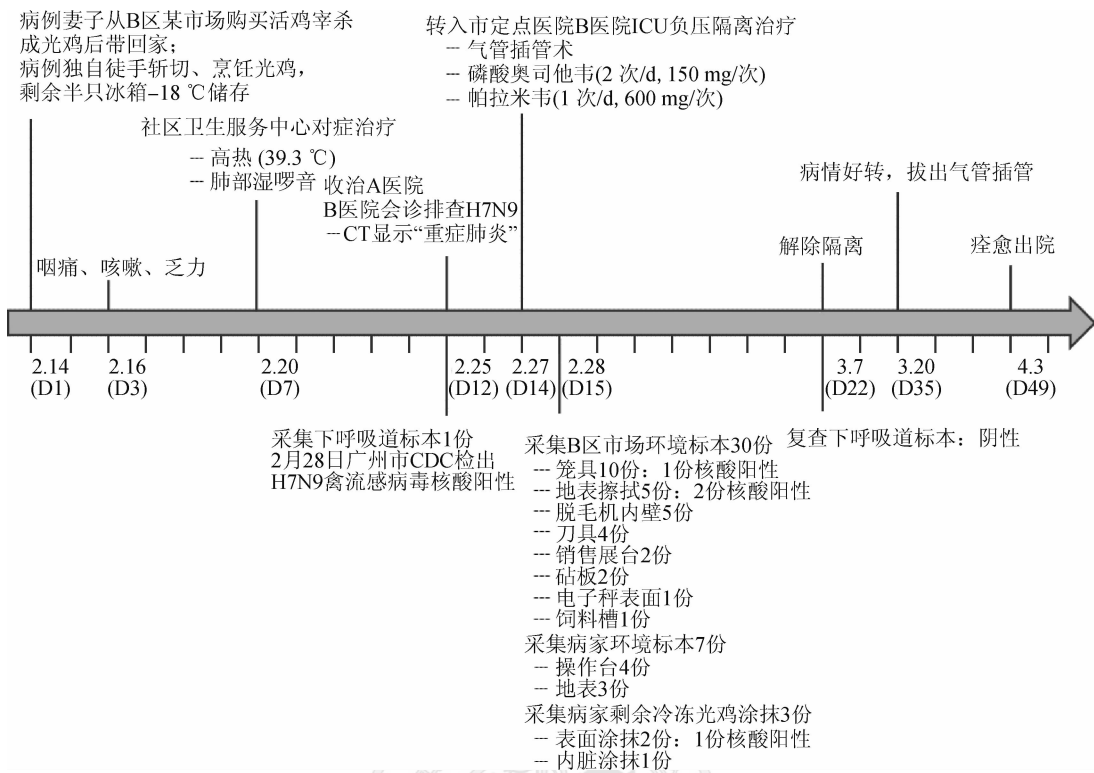


图1 广州市1例人感染H7N9禽流感病例发病时间轴

扇进行通风,处理完毕后洗手1次,未使用洗手液。病例将大部分鸡块高压锅闷煮后与妻子一同食用。剩余半只光鸡由病例放入冰箱-18℃储存。

(2)密切接触者:共11人,包括病例妻子在内的亲属4人、居住地卫生服务中心4人、接诊医院医护人员3人。经过7d的医学观察,均未出现不适症状。

(3)外环境调查及采样: B区市场为非限售区内的活禽批发市场,内有活禽档口17个,光鲜档口15个。活禽档口主要售卖鸡、鸭、鹅,活禽类日销售量1万~1.5万羽,光鲜类档口日销售量2 000~3 000只,禽类从业人员60余人。病家所在小区卫生条件良好,楼高9层,天台未发现候鸟停留痕迹。病家面积约40 m²,为一厅一房一厨一卫结构,厨房狭小,面积仅3~4 m²,设有操作台、洗手池、烹饪台以及冰箱等,有窗并安装简易排气扇,通风采光一般。2月28日,调查人员现场采集B区市场外环境标本30份(图1)。

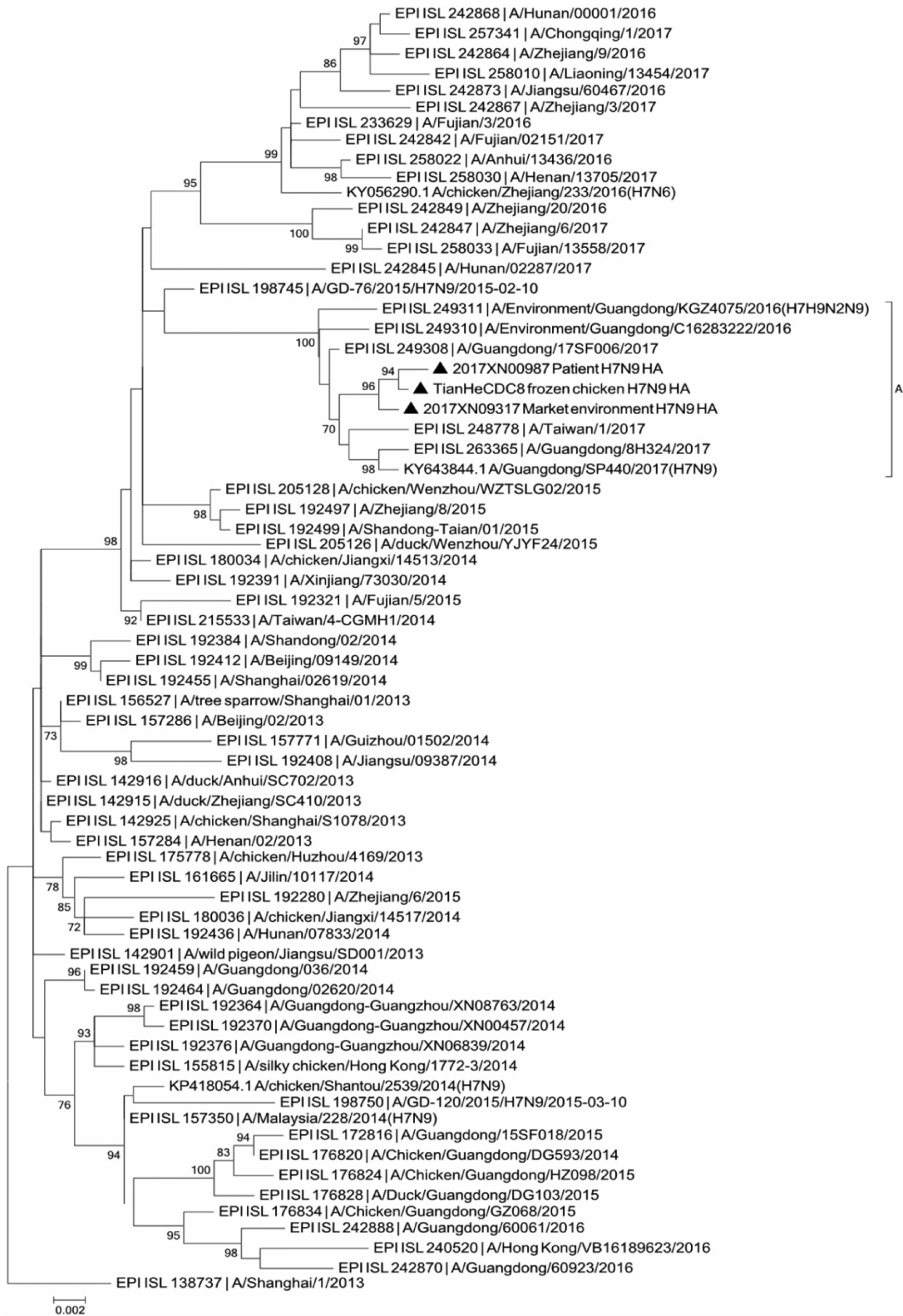
4. 实验室检测:2月27日,广州市CDC对病例下呼吸道标本进行检测,结果显示H7N9禽流感病毒核酸阳性。2月28日,B区市场及病家外环境标本,以及病家冰箱存放的剩余冷冻光鸡涂抹标本进行核酸检测,发现1份病家剩余冷冻光鸡涂抹标本(鸡肉表面涂抹标本)及3份B区市场外环境标本(地表擦拭标本2份、笼具标本1份)检出H7N9禽流感病毒核酸阳性。

对核酸阳性标本开展病毒分离,分别从病例下呼吸道标本、病家剩余冷冻光鸡涂抹标本、B区市场外环境阳性标本(笼具)中各分离得到1株阳性病毒株。经对HA基因测序、比对及构建基因进化树后发现,3株阳性病毒株HA基因均高度同源,且与广东省近期发现的3株高致病性人感染H7N9禽流感病毒株[A/Guangdong/17SF006/2017(17SF006/17), A/Guangdong/8H324/2017, A/Guangdong/SP440/2017(H7N9)]以及1株中国台湾地区病例毒株(A/Taiwan/1/2017)高度同源,同属甲型H7N9病毒W2-C簇(图2)。进一步经氨基酸序列比对分析发现,广州病例相关的3株病毒均在HA基因的G186V裂解位点发现多个碱性氨基酸插入(PEV PKR KRT AR/GL)。

讨论

本案病例是人间禽流感流行以来发现的首例通过无防护禽肉操作引起人感染H7N9禽流感病毒的病例,同时也是广州市首次在病例中分离到人感染高致病性禽流感病毒。对病例感染模式的调查分析,可为今后人禽流感疫情防控工作带来新的启发和思考。

中国CDC相关病例调查显示,直接或间接接触活禽(与禽体或者相关部位、部分或涉禽物品距离<1 m)以及仅前往活禽市场但无禽类接触均是人感染



注:进化树采用最大似然法计算得出,▲分别代表本疫情中病例(2017XN00987 Patient H7N9 HA)、病家冰冻鸡(TianHeCDC8 frozen chicken H7N9 HA)、市场外环境(2017XN09317 Market environment H7N9 HA)分离得到的病毒基因序列,A簇中包含近期发现的高致病性人感染H7N9禽流感病例序列[EPI ISL 248778 | A/Taiwan/1/2017, EPI ISL 263365 | A/Guangdong/8H324/2017, KY643844.1 A/Guangdong/SP440/2017 (H7N9)、KY643844.1 A/Guangdong/SP440/2017 (H7N9)]及高致病性H7N9禽流感病毒外环境序列[EPI ISL 249311 | A/Environment/Guangdong/KGZ4075/2016 (H7H9N2N9)、EPI ISL 249310 | A/Environment/Guangdong/C1628322/2016]

图2 广州市1例人感染高致病性H7N9禽流感病例HA基因同源性分析

H7N9 禽流感病毒的危险因素^[5-9]。但在既往病例中,尚未发现无活禽接触史、活禽交易市场暴露史而仅是通过密切接触光鸡而感染的病例。在本案中,H7N9 禽流感病毒通过污染活禽交易市场-现场宰杀过程中污染光鸡-受污染的光鸡通过密切接触感染病例这3个环节形成了完整的传播链,且3个环节均检测出高度同源的H7N9 禽流感病毒,明确了密切接触受污染的光鸡是引发人感染H7N9 禽流感病毒的一个重要途径。在处理光鸡过程中,由于厨房空间狭小,室内通风差,且病例未采取任何有效的个人防护措施(如戴口罩、围裙、手套等),推测徒手斩切等禽肉加工过程产生的气溶胶吸附于呼吸道导致病例感染发病。因此,在日常防控中,应提醒市民在高发季节时,除避免接触活禽,在处理光鸡时应当做好个人防护措施,减少感染风险。

针对于禽流感疫情的防控,各地纷纷出台了设置活禽交易限售区、定期休市等一系列措施。但由于中国人传统“吃鲜”的习惯,人为划分活禽交易限制区^[10-11]并不能完全阻隔人们跨地域购买活禽、光鸡的行为;即使在活禽交易限售区,也存在市场外宰杀活禽市场内销售的情况。张海冰等^[12]的调查显示,活禽交易市场环境样本阳性率及与其相对应的市场活禽样本阳性率分别达到了54.91%及42.77%;彭聪等^[13]研究显示,休市虽然可以迅速减少市场污染,但复市后,病毒阳性率会迅速升高,特别是环境阳性率上升速度明显高于活禽阳性率,说明禽流感病毒在活禽和市场交叉污染的情况普遍存在。而这些因素均造成设置限售区、定期休市等防控措施的效果欠佳。提示我们应当大力推进禽类标准化、规模化的封闭管理养殖,避免散养、放养等开放式养殖,从源头上消除禽流感病毒的传播。

本次调查显示,H7N9 禽流感病毒在冰箱-18℃冷冻2周后,仍具有活性,提示光鸡一旦受到病毒污染,难以清除。广州市CDC于2016年对1449份样本的检测结果显示,光鸡交易档口H7标本阳性率为5.42%,而采取集中屠宰、冷链配送的冰鲜鸡交易档口H7标本阳性率为0。说明在活禽交易市场现场宰杀以光鸡为代表的生鲜禽肉被污染带病毒的概率依然很高,传播禽流感的风险依然存在。推进禽类集中屠宰、冷链配送、冰鲜上市对于阻断运输途中禽流感病毒的传播具有重要意义。

该病例仅通过一次暴露于受污染光鸡就发病,分离培养出的H7N9 禽流感病毒亦与广东省2017年报告的3例高致病性H7N9 禽流感死亡病例高度同

源^[14],均出现HA基因G186V位点的多碱基切割位点突变。提示这一高致病性突变可能对人群易感,人群感染风险增加。自2013年出现以来,H7N9 禽流感病毒一直表现为低致病性,但疫情进入第5波以来,多例病例已检出H7N9 禽流感病毒高致病性突变^[15-17],同期,禽间H7N9 疫情和死亡报道也不断增加^[18],今后H7N9 禽流感病毒是否会更加容易突破种属屏障感染人类,或出现更多高致病性突变,需要进一步关注并应当加强对禽类及涉禽环境的监测,提早发现,早期预警,提早部署防控措施。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Su S, Gu M, Liu D, et al. Epidemiology, evolution, and pathogenesis of H7N9 influenza viruses in five epidemic waves since 2013 in China [J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25 (9) : 713-728. DOI: 10.1016/j.tim.2017.06.008.
- [2] WHO. Human infection with avian influenza A (H7N9) virus - China [EB/OL]. (2017-08-09) [2017-11-05]. <http://www.who.int/csr/don/13-september-2017-ah7n9-china/en/>.
- [3] 国家卫生计生委办公厅. 人感染H7N9 禽流感疫情防控方案(第3版)[J]. *全科医学临床与教育*, 2014, 12(2) : 123-125. DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2014.02.002. Office of the National Health Planning Commission. Prevention and control program of human infection with H7N9 avian influenza [J]. *Clin Educ Gen Pract*, 2014, 12(2) : 123-125. DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2014.02.002.
- [4] 国家卫生和计划生育委员会. 人感染H7N9 禽流感诊疗方案(2017年第1版)[J]. *中国病毒病杂志*, 2017, 7(1) : 1-4. DOI: 10.16505/j.2095-0136.2017.01.001. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic China. Diagnosis and treatment program for human infection with the H7N9 avian influenza virus (1st edition, 2017) [J]. *Chin J Viral Dis*, 2017, 7(1) : 1-4. DOI: 10.16505/j.2095-0136.2017.01.001.
- [5] 谢立,丁华,孙昼,等. 2013年杭州市人感染H7N9 禽流感病例分布特征及暴露来源分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(9) : 944-945. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.09.021. Xie L, Ding H, Sun Z, et al. Distributive characteristics and sources of exposure of human infections with avian influenza a (H7N9) virus in Hangzhou, Zhejiang province [J]. *Chin J Epidemiol*, 2013, 34(9) : 944-945. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.09.021.
- [6] 邵斌,宋玉芳,吴方敏,等. 浙江省长兴县一例人感染H7N9 禽流感病例溯源调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(6) : 659-660. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.06.031. Shao B, Song YF, Wu FM, et al. Investigation on the source of infection regarding an avian influenza (H7N9) in Changxing, Zhejiang province [J]. *Chin J Epidemiol*, 2013, 34(6) : 659-660.

- DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.06.031.
- [7] 任瑞琦,周蕾,向妮娟,等. 中国内地人感染H7N9禽流感疫情流行病学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(12): 1362-1365. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.12.01.
Ren RQ, Zhou L, Xiang NJ, et al. Epidemiological characteristics of human avian influenza a (H7N9) virus infection in China [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35 (12) : 1362-1365. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.12.01.
- [8] Liu B, Havers F, Chen EF, et al. Risk factors for influenza a (H7N9) disease—China, 2013[J]. Clin Infect Dis, 2014, 59(6) : 787-794. DOI: 10.1093/cid/ciu423.
- [9] 孔东锋,谢旭,梅树江,等. 深圳市2013年和2014年首例人感染H7N9禽流感病例的流行病学调查情况[J]. 医学动物防制, 2015, 31(2):213-215. DOI:10.7629/yxdwzf201502029.
Kong DF, Xie X, Mei SJ, et al. Epidemiological survey of the first case of human infection with avian influenza a (H7N9) virus in Shenzhen in 2013 and 2014[J]. J Med Pest Contr, 2015, 31(2):213-215. DOI:10.7629/yxdwzf201502029.
- [10] 谢朝军,苏文哲,李魁彪,等. 禽类生鲜上市减少市场环境禽流感病毒污染的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(3) : 353-357. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.03.012.
Xie CJ, Su WZ, Li KB, et al. Effect of supply of fresh poultry products on reducing environment contamination of avian influenza virus in markets [J]. Chin J Epidemiol, 2016, 37(3) : 353-357. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.03.012.
- [11] Yuan J, Lau EHY, Li KB, et al. Effect of live poultry market closure on avian influenza a (H7N9) virus activity in Guangzhou, China, 2014 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(10) : 1784-1793. DOI:10.3201/eid2110.150623.
- [12] 张海冰,杨穗娟,彭南秀,等. 广州市活禽批发市场禽流感病毒污染状况调查[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(3) : 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2017.03.001.
Zhang HB, Yang SJ, Peng NX, et al. Epidemiological survey on avian influenza in live poultry wholesale markets of Guangzhou City [J]. Chin Anim Health Inspect, 2017, 34(3) : 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2017.03.001.
- [13] 彭聪,彭南秀,段晓冬,等. 广州市活禽交易市场休市效果评估队列研究[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(8) : 3-7, 12. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2016.08.002.
Peng C, Peng NX, Duan XD, et al. The cohort study on effect of monthly closing day in live poultry markets in Guangzhou City [J]. Chin Anim Health Inspect, 2016, 33(8) : 3-7, 12. DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2016.08.002.
- [14] Ke CW, Mok CKP, Zhu WF, et al. Human infection with highly pathogenic avian influenza a (H7N9) virus, China [J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(8):1332-1340. DOI:10.3201/eid2308.170600.
- [15] 中国疾病预防控制中心. 我国从人感染病例中发现H7N9病毒变异株 [EB/OL]. (2017-02-19) [2017-02-19]. http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/zl/rgrgzbxqlgg/rgrqlgyp/201702/t20170219_138185.html.
China Center for Disease Control and Prevention. H7N9 virus variant found in human infection cases in China [EB/OL]. (2017-02-19) [2017-02-19]. http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/zl/rgrgzbxqlgg/rgrqlgyp/201702/t20170219_138185.html.
- [16] Zhang FC, Bi YH, Wang J, et al. Human infections with recently-emerging highly pathogenic H7N9 avian influenza virus in China [J]. J Infect, 2017, 75(1):71-75. DOI:10.1016/j.jinf.2017.04.001.
- [17] Yang JR, Liu MT. Human infection caused by an avian influenza a (H7N9) virus with a polybasic cleavage site in Taiwan, 2017 [J]. J Formos Med Assoc, 2017, 116(3) : 210-212. DOI: 10.1016/j.jfma.2017.02.011.
- [18] World Organisation for Animal Health and Food and Agriculture Organization. Influenza a cleavage sites [EB/OL]. (2016-12-06) [2017-11-05]. http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza_A_Cleavage_Sites.pdf.

(收稿日期:2017-10-14)

(本文编辑:王岚)

本刊2017年第6期作者单位名称的更正

本刊2017年第6期“现场流行病学”栏目中“新疆、西藏地区居民肥胖类型与10年冠心病发病风险关系的研究”(第721-726页)和“新疆、西藏地区35岁及以上人群身体脂肪率、内脏脂肪指数与心脏代谢性危险因素聚集的关系”(第727-731页)两篇文章的作者单位“中国医学科学院阜外医院 国家心血管病中心社区防治部”改为“北京协和医学院 中国医学科学院阜外医院 国家心血管病中心社区防治部”。谨此更正。

本刊编辑部