

· 现场调查 ·

一例孕妇感染禽流感病毒(H5N1)死亡的调查

李群 蓝雨 徐翠玲 柳燕 吴同生 温乐英 向妮娟 张烨 吴家兵 董捷
熊传龙 徐晓玲 胡万富 李中杰 胡岱霖 周蕾 马明英 刘志涛 刘旭祥
刘丽萍 王俊 胡守奎 何军 王勇 李贤相 吴福清 舒跃龙 王茂武
王子军 杨维中 王宇 余宏杰

【摘要】 目的 探讨 2005 年 11 月安徽省铜陵市人民医院报告的一例不明原因肺炎孕妇死亡的病因。方法 访谈病例发病前后的相关知情人,查阅临床病志,对病例和病死禽的密切接触者进行医学观察。采集病例的气管吸取物,应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和实时荧光定量 PCR 法,检测 A/H5N1 亚型特异的核酸片段,接种 SPF 鸡胚进行病毒分离。结果 病例发病前 4 天有明确的病死禽直接暴露史,病例和病死禽的 122 名密切接触者经 10 天医学观察均健康。病毒性肺炎伴血白细胞和淋巴细胞计数的显著下降,迅速进展的呼吸衰竭和多器官衰竭是其主要临床特征。病例的气管吸取物 A/H5N1 的 HA 和 NA 基因阳性,分离到的 A/Anhui/1/2005(H5N1)的 8 个基因节段均为禽源的,血凝素抗原的受体链接肽仍为多个碱性氨基酸。结论 该病例为首次报告感染禽流感病毒(H5N1)发病、死亡的孕妇。孕妇妊娠期间的免疫耐受状态可能是导致其感染,引起相应临床表现和进程的重要原因。

【关键词】 禽流感;妊娠;H5N1

Study on a fatal pregnant woman died from by avian influenza(H5N1) LI Qun*, LAN Yu, XU Cui-ling, LIU Yan, WU Tong-sheng, WEN Le-ying, XIANG Ni-juan, ZHANG Ye, WU Jia-bing, Dong Jie, XIONG Chuan-long, XU Xiao-ling, HU Wan-fu, LI Zhong-jie, HU Dai-lin, ZHOU Lei, MA Ming-ying, LIU Zhi-tao, LIU Xu-xiang, LIU Li-ping, WANG Jun, HU Shou-kui, HE Jun, WANG Yong, LI Xian-xiang, WU Fu-qing, SHU Yue-long, WANG Mao-wu, WANG Zi-jun, YANG Wei-zhong, WANG Yu, YU Hong-jie. *Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hefei 230061, China

Corresponding author: YU Hong-jie, Email: cfetpyhj@vip.sina.com Office for Disease Control and Emergency Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective To ascertain the causation of a pregnant woman with undefined pneumonia reported from the People's Hospital of Tongling city in Anhui province on November 2005. **Methods** Epidemiological and clinical information of the case was collected from the keypersons close to the case and referring to the medical record. A medical observation was carried out on the close contacts of the case and sick or dead poultry. Tracheal aspirates being collected were tested by both RT-PCR and real-time PCR to detect viral nucleic acids of A/H5N1, and were inoculated into special pathogen free(SPF) embryonated hens' eggs. **Results** The pregnant woman was found to have been contacted with the sick/dead poultry directly on the 4th day before onset of illness. All the 122 close contacts were healthy after a 10-day medical observation. The major clinical features of the case were viral pneumonia with rapidly developed leukopenia and lymphopenia. The progress to acute respiratory distress syndrome and multiple organ dysfunction syndromes was found at clinical presentation. HA and NA gene of A/H5N1 virus were positive. The 8 gene fragments of A/Anhui/1/2005(H5N1) isolated from the tracheal aspirates had not carried genes from a human virus through reassortment, and the receptor-binding site of the hemagglutinin was polybasic cleavage site. **Conclusion** This was the first documented case of H5N1 infection in pregnant woman. The immunotolerant state of pregnancy might have predisposed to the fatal outcome of the patient.

【Key words】 Avian influenza; Pregnancy; H5N1

作者单位:230061 合肥,安徽省疾病预防控制中心(李群、柳燕、吴家兵、胡万富、胡岱霖、马明英、刘旭祥、刘丽萍、王俊、胡守奎、何军);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(蓝雨、徐翠玲、温乐英、张烨、董捷、舒跃龙);安徽省铜陵市人民医院(吴同生);中国疾病预防控制中心(向妮娟、李中杰、周蕾、刘志涛、王茂武、王子军、杨维中、王宇、余宏杰);中国现场流行病学培训项目(熊传龙);安徽省立医院(徐晓玲);铜陵市疾病预防控制中心(王勇);安庆市疾病预防控制中心(李贤相);安庆市枞阳县疾病预防控制中心(吴福清)

通讯作者:余宏杰,100050 北京,中国疾病预防控制中心疾病控制与应急处理办公室,Email:cfetpyhj@vip.sina.com

蓝雨(工作单位:西北农林科技大学动物科技学院)、徐翠玲、柳燕与李群同为第一作者

2003 年底以来,亚洲多个国家和地区暴发高致病性禽流感(highly pathogenic avian influenza)H5N1 疫情,引起了国际社会的高度关注。继 2005 年 10 月我国发现了首例人感染禽流感病毒(H5N1)确诊病例之后^[1],欧洲国家土耳其也发生了人禽流感疫情^[2]。截止 2006 年 2 月 6 日,全球新发人禽流感(H5N1)病例数已上升至 165 例,死亡 88 例^[3]。1997 年香港最初报道的 12 例病例中,有 6 例是儿童^[4]。而后报道的人禽流感病例,多为既往健康、没有严重基础疾病的成年人和儿童。现有研究结果提示,宿主因素可能对人禽流感(H5N1)病例的预后有较大影响^[5]。本文首次报告一例孕妇因感染禽流感病毒(H5N1)而死亡的病例,现将调查结果报道如下。

对象与方法

1. 流行病学调查:2004 年 7 月,中国疾病预防控制中心(疾控中心)在我国各级各类医疗机构建立了针对禽流感的不明原因肺炎病例监测系统^[6]。2005 年 11 月 9 日,安徽省铜陵市人民医院通过该监测系统网络直报了一例不明原因肺炎病例。中国疾控中心、安徽省疾控中心和当地疾控中心的工作人员立即赶赴现场开展流行病学调查,访问了病例的父母、亲属和邻居等相关知情人,多方求证病家动物的发病情况、病例暴露于病死禽的时间先后顺序和具体暴露方式。反复详细询问了病例曾经就诊的 2 个村卫生室、2 个乡镇卫生院和铜陵市人民医院的经治医务人员,查阅其住院病志,以获得病例的发病经过、临床症状、体征、实验室检查和病程进展等信息。

为控制疫情、排除进一步人与人之间的传播,对所有暴露于病例的家庭成员、亲属、邻居和医务人员,暴露于病死禽及其污染环境的村民、参与家禽捕杀处理和环境消毒人员,在他们与病例最后一次接触或最后一次暴露于病死禽或环境后,均进行了为期 10 天的医学观察。

2. 标本采集:于 11 月 8 日的 3 个不同时点,采集了病例的 3 份气管吸取物标本,每份在床旁分装成 2 管,1 管保留在安徽省疾控中心,另外 1 管送到中国疾控中心病毒病预防控制所国家流感中心进行检测。标本的采集、保存和运送参见《中国流感/人禽流感监测实施方案》^[7]。

3. 病毒学检测:中国疾控中心和安徽省疾控中

心分别对采集的标本进行了病毒学检测,其中快速抗原检测和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测在生物安全二级实验室进行,病毒分离在生物安全三级实验室进行。

安徽省疾控中心分别采用 3 种方法对气管吸取物进行检测:①使用商品化的快诊试剂盒 QuickVue[®](Quidel,美国)进行流感快速抗原检测;②根据 WHO 推荐的引物序列和操作规程应用常规 RT-PCR 检测 H5 亚型特异的 HA 基因的核酸片段^[8];③使用 GB/T 19438.1-2004(深圳匹基公司)的商用试剂盒,根据厂家提供的操作规程应用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)法检测 H5 亚型特异的核酸片段。

中国疾控中心进行了以下病毒学分析和检测:①根据 WHO 推荐的引物序列和操作规程^[8],应用常规 RT-PCR 检测患者气管吸取物中 A 型流感病毒 M 基因, H1、H3 和 H5N1 亚型的 HA、NA 基因以及 B 型流感病毒 NS 基因的核酸片段;②采用美国疾控中心提供的探针和引物^[9],应用 real-time PCR 法检测气管吸取物中的 H5 亚型特异的核酸片段;③采用 Qiagen RNAeasy 试剂盒,根据厂家提供的操作规程提取病毒 RNA;④根据《中国流感/人禽流感监测实施方案》的操作指南^[7],将气管吸取物接种 SPF 鸡胚进行病毒分离;⑤采用 DNASTAR 软件,将分离到的病毒 A/Anhui/1/2005(H5N1)的 HA 基因序列与 GenBank 公布的数据进行比较分析。

结 果

1. 病例的临床表现:该病例为一既往健康的 24 岁女性,安徽省安庆市枞阳县人,发病时妊娠 4 个月,为首次怀孕。2005 年 11 月 2 日,患者出现发热、寒战、咳嗽等不适症状。3 天后到本村卫生室就诊,主诉高热(39℃)、干咳、肌肉酸痛。初次就诊血常规检查结果显示,白细胞计数 $4.3 \times 10^9/L$ (正常值范围: $4 \times 10^9/L \sim 10 \times 10^9/L$),淋巴细胞计数 $0.6 \times 10^9/L$ (正常值范围: $1.2 \times 10^9/L \sim 3.2 \times 10^9/L$),村医予以青霉素治疗未见好转。11 月 7 日,患者症状加重,出现呼吸困难、紫绀等症状,转入铜陵市人民医院治疗。入院时神志尚清、呼吸急促、发绀。查体所见:体温 38.8℃,脉搏 118 次/min,呼吸频率 37 次/min,血压 104/60 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa),SpO₂ 69%。咽部充血、听诊双肺呼吸音减轻。未发现出血倾向。血常规结果显示,白细

胞计数 $4.05 \times 10^9/L$, 淋巴细胞计数 $0.608 \times 10^9/L$ 。动脉血气分析显示, pH 值 7.436, PaO₂ 6.21 kPa, PaCO₂ 4.24 kPa; 实际碳酸氢(AB) 20.7 mmol/L, 标准碳酸氢盐(SB) 22 mmol/L, 碱过剩(BE) -2.6 mmol/L。HIV 抗体检测阴性。血液生化检测显示合并肝功能损伤(表 1)。

X 线胸片显示, 双肺下叶弥漫性浸润, 以右肺为重, 无胸水、心包渗出液和腹膜渗出物。CT 胸片显示, 两下肺实变, 支气管充气征阳性。医院诊断为不明原因重症肺炎、病毒性肺炎待查、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。给予抗感染(头孢他啶、阿奇霉素)、气管插管通气(7 日晚 9 点开始)、激素等治疗, 病情仍无好转。8 日复查胸片显示, 双肺大片高密度影。治疗上加强呼吸支持、加大糖皮质激素用量, 但病情继续恶化, 发展为弥漫性血管内凝血(DIC)、多器官衰竭, 10 日凌晨 1 时死亡。

2. 发病时间序列和暴露史: 10 月 7 日, 病例因怀孕不适, 由打工地江苏省常熟市返回到枞阳县父母家中。其父母家住宅为一栋两层楼房, 在楼外建有独立的鸡舍和鸭棚。住宅后 5 m 处有一约 10 亩面积的水塘, 附近村民喂养的鸭放养在水塘中, 居民也常在塘中洗衣、洗菜。家中共有 6 口人(包括病例), 饲养 12 只鸡、10 只鸭。病例母亲负责日常喂养和清扫, 病例没有参与。9 月份, 其家中的所有鸡都注射了农业部动物检疫所某公司生产的 H5 亚型、N28 株禽流感疫苗, 鸭未注射。据病例父母反映, 自 9 月 18 日起, 家中出现鸡鸭病死现象。10 月 11 日, 又陆续有鸡、鸭不进食, 由父亲宰杀、其母加工烹饪后食用。29 日, 家中又有 3 只鸡病死, 由父亲宰杀, 其母剁成块后烹调 1.5 小时后食用。该病例参与了拔毛, 并食用了少量病死鸡肉。截至 11 月 9 日, 家中仅剩 4 只鸡和 4 只鸭。病例的暴露、发病、就诊和结局的时间序列见图 1。

3. 病毒学检测: 安徽省疾控中心对 3 份气管吸取物标本进行快诊试剂检测均为阳性。安徽省疾控中心和中国疾控中心应用 RT-PCR 和 real-time

表1 病例的血常规和血液生化检查结果

| 检测内容 | 11 月 | | | | 参考值范围 |
|---|------|-------|-------|-------|--------------|
| | 5 日 | 7 日 | 8 日 | 9 日 | |
| 白细胞计数($\times 10^9/L$) | 4.3 | 4.05 | 3.5 | 18.6 | 4~10 |
| 嗜中性粒细胞比例(%) | 82 | 79 | 87.4 | 65.3 | 50~70 |
| 淋巴细胞比例(%) | 16 | 15 | 12.3 | 33.7 | 20~40 |
| 淋巴细胞计数($\times 10^9/L$) | 0.6 | 0.608 | 0.4 | 6.26 | 1.2~3.2 |
| 血小板计数($\times 10^9/L$) | 127 | 76 | 74 | 162 | 60~300 |
| 丙氨酸转氨酶(U/L) | ND | 24 | ND | ND | 0~40 |
| 天门冬氨酸氨基转移酶(U/L) | ND | 58 | ND | ND | 0~40 |
| 肌酐($\mu\text{mol/L}$) | ND | 48.6 | ND | ND | 30~135 |
| 动脉血气分析 | | | | | |
| pH 值 | ND | 7.436 | 7.41 | 7.086 | 7.35~7.45 |
| CO ₂ 分压(kPa) | ND | 31.88 | 39.77 | 82.03 | 35.11~45.11 |
| O ₂ 分压(kPa) | ND | 46.69 | 40.30 | 22.63 | 80.23~100.23 |
| 标准碳酸盐(mmol/L) | ND | 22.0 | 24.2 | 18.1 | 22~27 |
| FiO ₂ (吸气 O ₂ 浓度) | ND | 0.4 | 1.0 | 1.0 | |

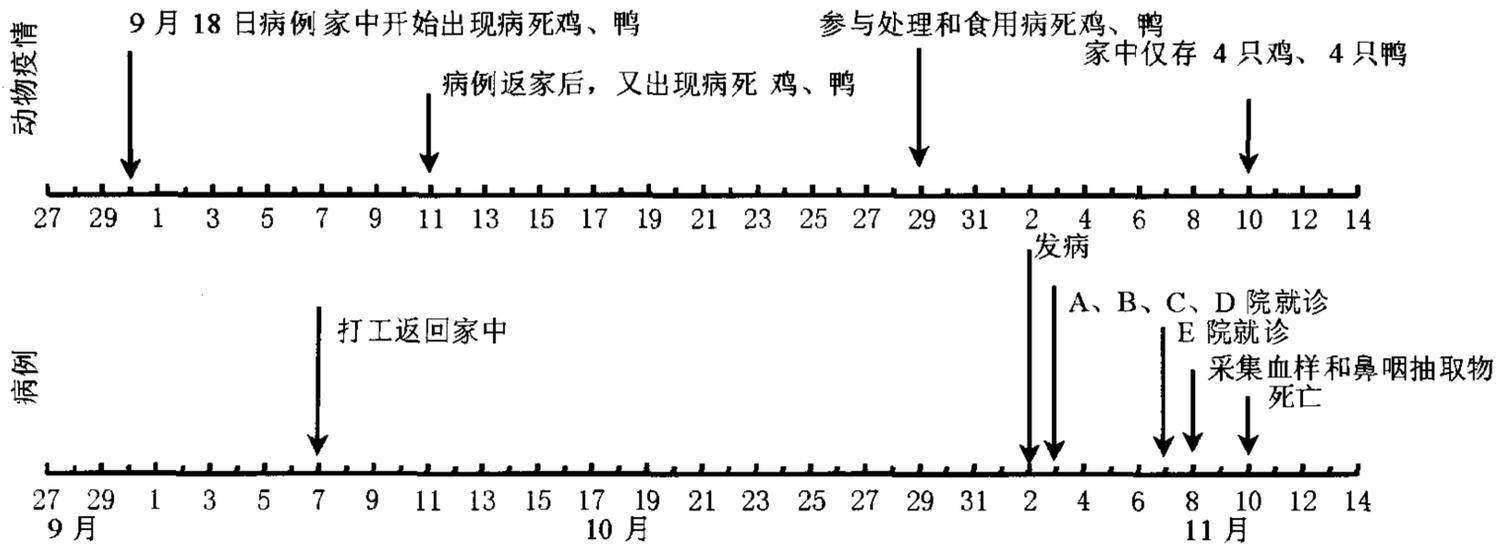
注:ND 表示“未做”

PCR 法检测标本中的 A 型流感病毒 M 基因、H5N1 亚型特异的 HA、NA 基因均阳性。中国疾控中心在气管吸取物中分离到了禽流感病毒 A/Anhui/1/2005 (H5N1), 全基因序列测定结果显示, 所有 8 个基因节段均为禽源的。血凝素抗原的受体链接肽与其他禽流感病毒相似, 仍为多个碱性氨基酸(LRERRRKRG)。基因序列测定结果还显示病毒对金刚烷胺类药物以及神经氨酸酶抑制剂药物仍然是敏感, 没有产生抗药。病毒的 HA 基因序列与 A/duck/Fujian/1734/2005(H5N1) (GeneBank accession number:DQ095629) 高度同源, 同属 Clade 2, 与越南、泰国分离到的禽流感病毒(Clade 1)有显著差异(图 2)。

4. 暴露人员的医学观察结果: 患者病后的密切接触者包括父母、丈夫、亲属和朋友等 14 人, 参与救治的医护人员 33 人、司机 1 人; 参与家禽捕杀 46 人, 病例所在村中有病死禽暴露史的 28 人, 共计 122 名密切接触者。在他们与病例最后一次接触或最后一次暴露于病死禽或环境后, 进行了为期 10 天的医学观察, 没有出现发热等异常症状。

讨 论

本文首次报告了孕妇因感染禽流感病毒(H5N1)而发病、死亡。孕妇在妊娠期间, 正处于免疫耐受状态, 这种易感体质和免疫状态, 一旦暴露于 H5N1 禽流感病毒, 很容易感染、发病。病例发病前 7 天内有明确的病死禽直接暴露史, 她最有可能是



注:A为YT村卫生室,B为HB镇卫生院,C为XH村卫生室,D为CY镇医院,E为铜陵市人民医院

图1 安徽省安庆市枞阳县一例人禽流感病例暴露和疾病进程时间序列图

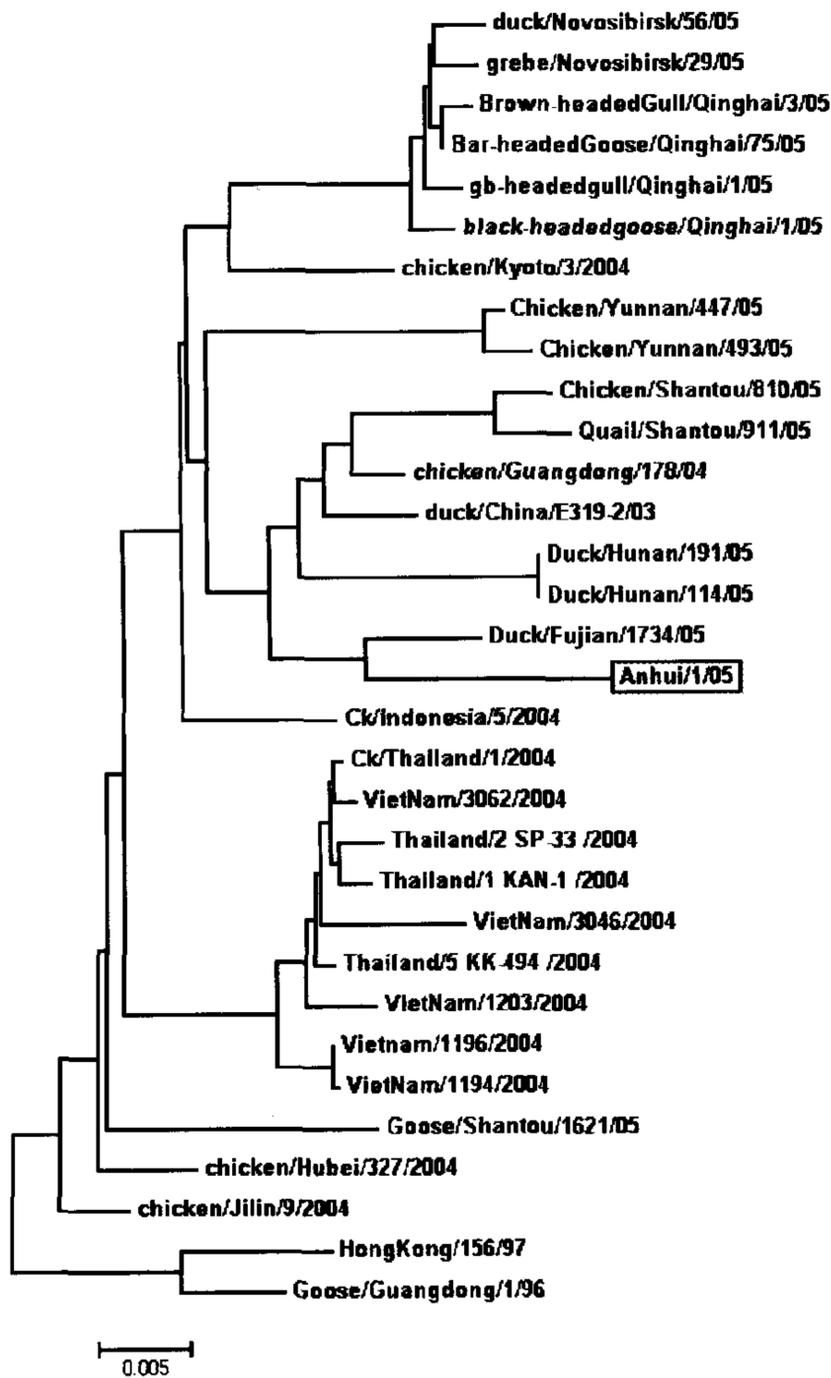


图2 HA1 基因系统树分析(自病例分离到的 H5N1 病毒与其他人或禽源的 H5N1 病毒的基因相关性)

在处理病死禽的过程中暴露而被病毒感染。长期以来,怀孕被认为是感染流感病毒发病、死亡的重要危险因素。1918 年和 1957 年两次流感大流行期间,患流感孕妇的病死率高达 45%^[10,11]。最近,一项研究重建了引起 1918 年流感大流行的毒株,该研究结

果提示 1918 年流感大流行的毒株可能来源于禽流感病毒,变异后而适应在人体内进行复制^[12]。因此,可以推测另外一种禽流感病毒——A(H5N1)也可以在孕妇感染时产生类似的临床过程和结局。

与已发表的文献一致^[4],病例在禽流感病毒 H5N1 感染后的病程早期,下呼吸道明显受累而导致双肺重症肺炎和相应的临床表现。过度的炎性细胞因子反应可导致禽流感病毒感染后迅速进展、恶化的临床病程,包括在患者血清中可以检测到较高水平的 IP-10 和 TNF- α 。体外试验已经证实,禽流感病毒 H5N1 能够诱导人的巨噬细胞^[13]、肺泡和气管上皮细胞产生这种炎性细胞因子反应^[14]。本病例病情进展迅速,发病后第 5 天即发展为呼吸衰竭,需要进行气管插管机械通气治疗,同时伴有显著的白细胞和淋巴细胞计数下降,这种临床表现和进程与文献报告的其他病例相似^[4]。同时病例正处于妊娠期间,可能加速了病情迅速进展到多器官损伤、衰竭的过程。尽管病例与其他非孕妇病例的临床表现和严重程度相似,但快速抗原检测、RT-PCR 和鸡胚接种进行病毒分离培养都很容易得到阳性结果,提示该病例体内的病毒载量很高,正是这种高剂量的病毒感染导致了孕妇的死亡。但是孕妇感染禽流感病毒 H5N1 后的致病性和病理学等方面还有待于深入研究。

虽然禽流感病毒 H5N1 的感染引起了该孕妇病例的死亡,但胎儿是否感染了 H5N1 也需要进一步病理学和免疫组化方面的研究。一项小鼠动物模型试验报道,禽流感病毒 H5N1 能够通过胎盘屏障,并能够在小鼠的神经系统持续检测到病毒 RNA^[15,16]。怀孕期间母体感染流感病毒与子女患有精神性疾病

(例如精神分裂)的关系,目前仍在争论之中^[17]。到目前为止,感染禽流感病毒 H5N1 的孕妇病例仍然稀少,因此,禽流感病毒 H5N1 能否垂直传播还很难得出结论。

自 2004 年初广西壮族自治区首次报告动物高致病性禽流感疫情以来,到目前为止,我国共公布了 82 起确诊的动物禽流感疫情。与禽类发病、死亡和被扑杀的巨大量相比,我国人感染禽流感病毒(H5N1)病例还很少,获取的流行病学资料还很有限。我国农村传统的后院散养家禽的家庭养殖模式短期内难以改变,在高致病性动物禽流感 H5N1 在亚洲呈地方性流行的形势下,家禽感染禽流感病毒 H5N1 导致发病、死亡,甚至暴发的可能性依然存在。而生活在这种环境下,暴露于感染后的家禽及其污染环境的人群,依然会出现发病、死亡。

本次孕妇病例的调查结果提示,宿主因素在人感染禽流感病毒 H5N1 的发病和预后中扮演重要角色。而且无论是感染季节性流感病毒还是禽流感病毒 H5N1,免疫耐受状态可能是引起相应临床表现和进程的重要原因。因此,虽然在妊娠的任何阶段都推荐孕妇接种季节性流感疫苗作为预防流感的重要手段^[18],但是远离家禽、不接触病死禽、早期发现动物禽流感、迅速采取有效的感染控制措施应该是预防孕妇以及一般人群感染禽流感病毒 H5N1 更为重要的策略。

(安徽省铜陵市卫生局、疾病预防控制中心,铜陵市人民医院,安庆市卫生局、疾病预防控制中心,枞阳县卫生局、疾病预防控制中心在本次调查中给予了大力支持和协助,一并致谢)

参 考 文 献

- 1 Yu HJ, Shu YL, Hu XX. The first confirmed human case of avian influenza A(H5N1) in Mainland China. *Lancet*, 2006, 367: 384.
- 2 WHO. Avian influenza-situation in Turkey. http://www.who.int/csr/don/2006_01_05/en/index.html (accessed 2006.1.5).
- 3 WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_2_6/en/index.html (accessed Feb 7, 2006).
- 4 Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, et al. and members of the H5N1 study group. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza H5N1 virus. *Lancet*, 1998, 351: 467-471.
- 5 Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al. Avian Influenza A(H5N1) Infection in Humans. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1374-1385.
- 6 中国卫生部. 全国不明原因肺炎病例监测方案. http://www.moh.gov.cn/public/open.aspx?n_id=8373 (2004.8.4)
- 7 中国疾病预防控制中心. 全国流感人禽流感监测实施方案. <http://www.chinacdc.net.cn/n272442/272530/n294276/index.html> (2005.8.19).
- 8 WHO. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/index.html (2005.11.21).
- 9 Spackman JS. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 3256-3260.
- 10 Harris JW. Influenza occurring in pregnant women: a statistical study of thirteen hundred and fifty cases. *JAMA*, 1919, 72: 978-980.
- 11 Freeman DW, Barno A. Deaths from Asian influenza associated with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1959, 78: 1172-1175.
- 12 Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 2005, 310: 77-80.
- 13 Cheung CY, Poon LLM, Lau AS, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human diseases? *Lancet*, 2002, 360: 1831-1837.
- 14 Chan MCW, Cheung CY, Chui WH, et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respiratory Research*, 2005, 6: 135. article URL: <http://respiratory-research.com/content/6/1/135> (2005.11.20).
- 15 Aronsson F, Lannebo C, Paucar M, et al. Persistence of viral RNA in the brain of offspring to mice infected with influenza A/WSN/33 virus during pregnancy. *J Neurovirol*, 2002, 8: 353-357.
- 16 Kobets NV, Deeva AV, Mirchink EP, et al. The possible immunological mechanisms of pathology in mice with congenitally acquired influenza infection. *Russ J Immunol*, 1997, 2: 1211-1128.
- 17 Ebert T, Kotler M. Prenatal exposure to influenza and the risk of subsequent development of schizophrenia. [review] *IMAJ*, 2005, 7: 35-38.
- 18 Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee Practices (ACIP). *MMWR*, 2004, 53: 1-40.

(收稿日期:2006-02-10)

(本文编辑:尹廉)