

• 临床探讨 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 21. 028

苏州市人感染 H7N9 禽流感聚集性疫情调查分析^{*}

董泽丰,夏 瑜,王 笛,沈 强,雅雪蓉[△]

(苏州市疾病预防控制中心,江苏苏州 215004)

摘要:**目的** 调查分析苏州市两起家庭聚集性人感染 H7N9 禽流感疫情流行病学及病原学特征,为该地区人感染 H7N9 病毒疫情防控提供科学依据。**方法** 采集聚集性疫情中 H7N9 病例及其密切接触者咽拭子标本,同时收集流行病学及临床资料,应用实时荧光-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测流感病毒及 H7N9 亚型的特异性基因,对 H7N9 阳性标本进行病毒分离并测序,比对分析 H7N9 病毒血凝素基因变异状况。**结果** 第一起聚集性疫情中 2 例 H7N9 病例被成功救治。而第二起聚集性疫情中的 1 例 H7N9 死亡,另 1 例存活。两起疫情中的其他密切接触者无发病报告。H7N9 病毒的受体结合位点没有发生变异。引起这两起人感染 H7N9 禽流感聚集性疫情的病毒血凝素切割位点的氨基酸序列为 PEIPKGR↓GLF。耐药位点 E120G、R153K、H276Y 及 R294K 未发生改变。**结论** H7N9 病毒在有血缘关系的近亲属之间可能更容易传播,对于 H7N9 患者应加强院感防控,防止密切接触者感染。目前,H7N9 病毒仅具有有限的人传人能力,尚不能在人际间持续传播,第二起聚集性疫情中的 H7N9 病毒血凝素基因序列高度同源且仍对奥司他韦等神经氨酸酶抑制剂敏感。

关键词:H7N9 病毒; 血凝素基因; 变异; 实时荧光-聚合酶链反应; 耐药

中图法分类号:R18

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)21-3254-03

2013 年 3 月中国华东地区首次发现人感染新型重组 H7N9 禽流感病毒病例^[1]。自此之后人感染 H7N9 禽流感疫情在每年冬春季都会出现季节性流行,报告病例的病死率超过 30%^[2]。截至 2018 年 2 月,中国大陆累计报告 1 566 例病例,其中 613 例死亡,报告病死率为 39. 14%(613/1 566),远远超过感染季节性流感病毒病例的病死率,但是低于人感染 H5N1 亚型禽流感病毒病例接近 60%的病死率^[3-4]。2016—2017 年的疫情流行季中,实验室确诊病例数及地理分布范围明显超过以往流行季,引起了广泛的社会关注^[5-6]。苏州市疾控中心于 2013 年 4 月确诊了本地首例人感染 H7N9 病例,自此,人感染 H7N9 禽流感疫情防控成为本市重要的公共卫生工作之一。研究表明直接接触活禽或暴露于被病毒污染的活禽市场环境是主要的感染途径^[2,7],一些散发的聚集性疫情也偶有报道^[8-11]。苏州市也发生了两起人感染 H7N9 禽流感病毒家庭聚集性疫情。为实现精准防控,防止疫情蔓延,本研究调查了两起疫情的流行病学和病原学特征。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 H7N9 病例及其密切接触者咽拭子标本,同时收集患者流行病学数据及主要临床症状等信息。密切接触者是指 H7N9 病例发病后,所有在无保护条件下接触患者或暴露于可能被病毒污染环境的人。所有密切接触者隔离观察至少 10 d,24 h 内完成检测,A(H7N9)病毒阳性标本立即-80℃保

存备用。

1.2 方法

1.2.1 核酸提取 吸取 200 μL 原始咽拭子标本,参照 Roche 公司的高纯度病毒核酸试剂盒说明书提取病毒核酸。

1.2.2 病毒检测 参照上海之江公司 A/B 和 H7N9 病毒实时荧光-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒说明书,取 5 μL 样品核酸提取液、DEPC-H₂O、阳性对照分别加入 20 μL 配好的反应液中,离心混匀后放入 ABI7500 PCR 扩增仪检测,总反应体系为 25 μL。扩增条件为 45℃×10 min;95℃×15 min;再按 95℃×15 s,60℃×60 s;循环 40 次,单点荧光检测在 60℃。

1.2.3 病毒分离 吸取 200 μL 抗菌处理后的咽拭子标本接种于 9~11 d 日龄的 SPF 级鸡胚尿囊腔,35℃培养 72 h 后收获尿囊液。病毒分离培养及序列测定在国家流感中心 P3 实验室完成。

1.2.4 序列分析 DNASTar7.0 软件进行同源矩阵分析,MEGA6.0 软件构建血凝素(HA)基因序列 N-J 进化树,bootstrap 重复值为 1 000。HA 基因参考序列下载自 GISAID 网站。

2 结果

2.1 病例信息 第一起疫情:2 例患者均 35 岁,为在苏州务工的李姓双胞胎兄弟,李 1 职业为货车司机,李 2 职业为某公司食堂厨师。兄弟 2 人于 2016 年 1 月 18—26 日一直陪护在病房照顾因肺部疾患入院治

^{*} 基金项目:江苏省苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2017051)。

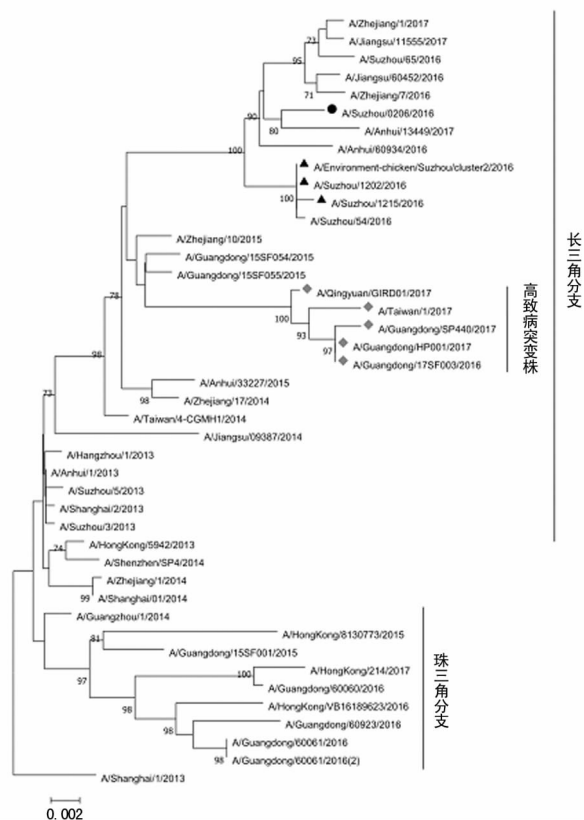
[△] 通信作者,E-mail:yuyehua77@foxmail.com。

疗的父亲。患者李 1 于 1 月 30 日发病,自诉发病前无活禽接触和食用史。李 2 因相似症状于 2 月 4 日在苏州某医院住院,因病情加重,2 月 6 日,兄弟 2 人一起转入苏州市第五人民医院 ICU 隔离治疗。2 人咽拭子标本经苏州市疾控中心检测,均为 H7N9 禽流感病毒核酸阳性。2 人首次使用达菲等抗病毒治疗(奥司他韦,每次 75 mg,1 日 2 次)的时间分别为 2 月 3、4 日。由于治疗及时,经过 3 周左右的规范抗病毒治疗,2 例 H7N9 病例相继康复出院。此外,5 名密切接触者实施医学观察期间均无急重症呼吸道感染症状,密切接触者咽拭子标本及 14 份外环境标本(含禽类粪便、肛拭子)H7N9 核酸检测结果均为阴性。

第二起疫情:首发病例韩 1 是一名 66 岁的退休男性,有高血压病史,无直接活禽接触史,但是发病前 10 d 内经常到有贩卖活禽的菜市场买菜。2016 年 11 月 26 日出现呼吸道感染症状,2 d 后因不明原因肺炎住院治疗,12 月 2 日韩 1 的咽拭子标本经苏州市疾控中心检测为 H7N9 禽流感病毒核酸阳性,确诊后随即采用达菲等抗病毒治疗(奥司他韦,每次 75 mg,1 日 2 次)。12 月 12 日,病例死亡。二代病例韩 2 是韩 1 的女儿,39 岁,无基础疾病,自诉无活禽接触史或暴露于活禽市场环境,但是,她于 11 月 28 日至 12 月 2 日在医院照顾其父亲韩 1,并在无保护条件下接触韩 1 痰液等分泌物。12 月 6 日,韩 2 出现流感样症状,随即被收治住院进行抗病毒治疗。12 月 15 日被确诊感染 H7N9 禽流感病毒,经过 3 周规范治疗于 12 月 31 日康复出院。外环境标本 H7N9 禽流感病毒核酸阳性率为 30%(12/40)。

2.2 序列分析 HA 基因进化树见图 1,H7N9 病毒仍在不断进化,不同流行季测得的病毒处在不同的进化分支上。序列比对表明苏州两起聚集性疫情中测得的 H7N9 基因序列均为长三角分支,与广东和台湾等地发现的高致病性突变株不同,HA 链接肽位置未有核苷酸插入。第二起疫情测得的病例及外环境 H7N9 病毒 HA 序列高度同源,HA 序列一致性大于 99.99%,与候选疫苗株 A/Anhui/01/2013 的 HA 基因序列一致性为 98.00%。

2.3 氨基酸序列分析 HA 蛋白受体结合位点关键氨基酸序列没有发生改变,与候选疫苗株 A/Anhui/01/2013(H7N9)相比,受体结合位点关键氨基酸仍为 160A、186V、226L 及 228G。仍然保留了 SA- α 2,3-Gal 和 SA- α 2,6-Gal 的双受体结合能力。HA 切割位点氨基酸序列为 PEIPKGR↓GLF,仅有一个碱性氨基酸 R,未发现有多余碱性氨基酸插入,不同于高致病突变株 A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9),提示苏州流行的 H7N9 病毒对禽类仍为低致病性的。未发现 NA 蛋白耐药位点(E120G、R153K、H276Y 和 R294K)发生变异。



注:黑色圆点和三角分别代表从第一起和第二起疫情分离的病毒,菱形标的高致病突变株

图 1 苏州聚集性疫情中 H7N9 病毒 HA 基因 Neighbor-Joining 进化树

3 讨 论

自 2013 年首次发现以来,H7N9 病毒已经引起了五波流行^[5],报告病例的病死率高^[12],苏州每年冬春季都有若干散发病例报告,远超季节性流感病毒(H1N1、H3N2 和 B 型)感染病例的病死率。准确快速地确定感染源头对于防控传染病疫情扩散非常重要,但是由于 H7N9 聚集性疫情中二代病例除了无保护条件下密切接触首发病例分泌物,病例还往往和首发病例有相同的活禽接触史或暴露于共同的活禽市场环境,很难确定二代病例的感染源头。从调查结果来看,苏州这两起 H7N9 聚集性疫情所涉及的病例没有共同的活禽或活禽市场接触史,但二代病例与首发病例均有密切接触史,从第二起疫情两例病例分离并测序的 HA 基因高度同源,这些证据都说明这两起聚集性疫情由人传人引起的可能性较大,因此必须高度关注可能的由于人传人引起的 H7N9 聚集性疫情,防止疫情蔓延。

从发病到首次使用奥司他韦等抗病毒药物治疗的时间间隔可能影响病例结局^[13-14]。世界卫生组织推荐感染 H7N9 禽流感病毒疑似病例应尽早使用奥司他韦抗病毒治疗,其可有效减少疾病严重程度和死亡病例。而苏州两起聚集性疫情中涉及的 4 例 H7N9 病例结局不同(3 例存活,1 例死亡),可能与首次使用

奥司他韦等抗病毒治疗的时间不同有关。3 例存活病例首次使用奥司他韦等抗病毒治疗的时间距发病均在 72 h 内,而死亡病例首次使用奥司他韦等抗病毒药物治疗距发病时间已经超过 1 周。此外,第二次疫情中死亡病例患有高血压可能也与病情加重有关。

禽流感病毒受体结合位点关键氨基酸发生突变(T160A、G186V、G226L 及 G228S)可使病毒能够有效结合人类受体^[15-18]。序列分析表明同一起疫情中测得的 H7N9 病毒 HA 序列处在同一进化分支上,与候选疫苗株 A/Anhui/1/2013 相比,两起疫情中 H7N9 病毒受体结合位点关键氨基酸未发生改变,仍具有双受体结合能力。与广东和中国台湾等地发现的高致病性 H7N9 突变株不同^[19-20],HA 切割位点未发现有多碱性氨基酸(RKR)插入。NA 蛋白未发生 H276Y 及 R294K 突变,提示早期使用奥司他韦等神经氨酸酶抑制剂类药物治疗 H7N9 病毒感染仍然有效。

综上所述,目前 H7N9 禽流感病毒不具备人间持续传播的能力,H7N9 患者临床症状、流行病学特征及药物敏感性也未发生明显改变。但是,密切监测分析 H7N9 病毒可能发生适应人类的突变仍然十分必要。

参考文献

- GAO R, CAO B, HU Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1888-1897.
- LI Q, ZHOU L, ZHOU M, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China[J]. *New Engl J Med*, 2014, 370(6):520-532.
- YEE K S, CARPENTER T E, CARDONA C J. Epidemiology of H5N1 avian influenza[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32(4):325-340.
- UYEKI T M. Global epidemiology of human infections with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses[J]. *Respirology*, 2008, 13(Suppl 1):S2-S9.
- WANG X, JIANG H, WU P, et al. Epidemiology of avian influenza A H7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013-17: an epidemiological study of laboratory-confirmed case series[J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(8):822-832.
- IULIANO A D, JANG Y, JONES J, et al. Increase in human infections with avian influenza a(h7n9) virus during the fifth epidemic-China, October 2016-February 2017[J]. *Mmw Morbid Mortal W*, 2017, 66(9):254.
- GONG Z, LV H, DING H, et al. Epidemiology of the avian influenza A (H7N9) outbreak in Zhejiang Province, China[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14(1):244.
- XIE J, WENG Y, OU J, et al. Epidemiological, clinical, and virologic features of two family clusters of avian influenza A (H7N9) virus infections in Southeast China[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):1512.
- DING H, CHEN Y, YU Z, et al. A family cluster of three confirmed cases infected with avian influenza A (H7N9) virus in Zhejiang Province of China[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14(1):698.
- HU J, ZHU Y, ZHAO B, et al. Limited human-to-human transmission of avian influenza A (H7N9) virus, Shanghai, China, March to April 2013[J]. *Euro Surveill*, 2014, 19(25):781-786.
- ZHANG Z H, MENG L S, KONG D H, et al. A Suspected person-to-person transmission of avian influenza a (h7n9) case in ward[J]. *Chin Med J*, 2017, 130(10):1255.
- ZHOU L, REN R, YANG L, et al. Sudden increase in human infection with avian influenza A (H7N9) virus in China, September-December 2016[J]. *Western Pac Surveill Response J Wpsar*, 2017, 8(1):6-14.
- GAO H N, LU H Z, CAO B, et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(24):2277-2285.
- BRACHMAN P S. Control of communicable diseases manual, 17th Edition[J]. *Am J Epidemiol*, 2001, 154(8):783-784.
- GU M, LI Q, GAO R, et al. The T160A hemagglutinin substitution affects not only receptor binding property but also transmissibility of H5N1 clade 2.3.4 avian influenza virus in guinea pigs[J]. *Veterin Res*, 2017, 48(1):7.
- DORTMANS J C F M, DEKKERS J, WICKRAMASINGHE I N A, et al. Adaptation of novel H7N9 influenza A virus to human receptors[J]. *Scient Rep*, 2013, 3(10):3058-3058.
- STEVENS J, WILSON I A. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus[J]. *Science*, 2006, 312(5772):404.
- PASTERNAK J. Experimental adaptation of an influenza H5HA strain confers respiratory droplet transmission to reassortant H5H/H1N1 virus strain in ferrets[J]. *Einstein*, 2012, 10(3):391.
- KE C, CKP M, ZHU W, et al. Human infection with highly pathogenic avian influenza A(H7N9) virus, China[J]. *Emerg Infect dis*, 2017, 23(8):1332-1340.
- YANG J R, LIU M T. 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.