

嘉兴市外环境禽流感病毒污染状况及职业暴露人群 H5N6、H7N9 和 H9N2 抗体水平调查

亓云鹏, 顾伟玲, 富小飞, 谢亮, 何培彦, 查亦薇, 周晚玲

嘉兴市疾病预防控制中心, 浙江 嘉兴 314050

摘要: **目的** 了解嘉兴市外环境禽流感病毒分布情况及涉禽职业暴露人群禽流感病毒感染现状, 为科学有效防控人感染禽流感疫情提供科学依据。 **方法** 实时荧光定量 PCR 检测 2013 年 3 月-2016 年 4 月采集的嘉兴市 3 115 份外环境标本的 A 型流感病毒核酸, 并对 A 型流感病毒核酸阳性的标本进一步进行 H5、H7、H9 亚型检测。采用马血细胞凝集抑制试验检测 2015 年 4 月和 2016 年 4 月采集的嘉兴市 140 名涉禽职业暴露人群血清中的 H5N6、H7N9 和 H9N2 血凝素抗体。 **结果** 外环境标本中 A 型流感病毒核酸阳性率为 18.11%, H5、H9、H7 亚型阳性率分别为 0.64%、3.21%、5.07%; 同时, 外环境标本中检出不同亚型混合污染标本 74 份, 且 H9/H7 混合污染的阳性率达到 1.86%。A 型流感病毒及 H7 亚型阳性率在冬春季出现高峰, 且在城乡活禽市场的阳性率明显高于其他场所; 宰杀或摆放禽肉案板表面和清洗禽类的污水标本中 A 型流感病毒及 H7 亚型的阳性率明显高于其他标本类型。140 份人群血清标本共检出 H9N2 抗体阳性标本 5 份, 阳性率为 3.57%, 未检出 H5N6、H7N9 抗体阳性标本。 **结论** 2013-2016 年嘉兴市外环境中存在 H5、H9、H7 亚型污染, 且涉禽职业暴露人群中少量的 H9N2 禽流感病毒无症状感染者, 提示禽类接触、活禽交易市场暴露有感染禽流感病毒风险, 因此应做好重点人群的健康教育及重点区域的禽流感病毒监测, 防止人感染禽流感疫情的发生。

关键词: 禽流感病毒; 外环境; 禽类暴露人群; 抗体

中图分类号: R511.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2018)04-0417-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.04.009

Contamination status of avian influenza virus in external environment and the levels of H5N6, H7N9 and H9N2 antibodies in poultry-exposed population in Jiaxing City

QI Yun-peng, GU Wei-ling, FU Xiao-fei, XIE Liang, HE Pei-yan, ZHA Yi-wei, ZHOU Wan-ling
Jiaxing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jiaxing, Zhejiang 314050, China

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of avian influenza virus in external environment in Jiaxing City and its infection status in poultry-exposed population so as to provide a scientific basis for effectively preventing and controlling human infection with avian influenza. **Methods** Real-time RT-PCR assay was used to detect the nucleic acid of influenza A virus from 3,115 external environmental samples collected in Jiaxing City from March, 2013 to April, 2016, and then multiple RT-PCR assay and specific H5, H7 and H9 primers were employed to analyze the subtypes of the positive samples. Haemagglutination inhibition (HI) test was used to detect antibodies against H5N6, H7N9 and H9N2 viruses in sera collected from 140 poultry-exposed workers in Jiaxing City in April, 2015 and April, 2016. **Results** The overall positive rate of avian influenza A virus was 18.11%. The positive rates of subtypes H5, H9 and H7 were 0.64%, 3.21% and 5.07% respectively. In addition, 74 specimens with mixed-subtype contamination were detected in the 3,115 external environmental samples, and the positive rate of mixed subtype H9/H7 reached 1.86%. The circulation of influenza A virus and subtype H7 was active during winter and spring in the external environment; moreover, the positive rate of avian influenza virus in urban and rural live poultry markets was significantly higher than those of other places. The positive rates of influenza A virus and subtype H7 in the samples from cutting boards and poultry cleaning wastewater were significantly higher than those of other sample types. Among the 140 serum samples detected, only 5 (3.57%) were H9N2 virus positive, and no samples with positive H5N6 and H7N9 viruses were found. **Conclusions** Contamination of avian influenza viruses of H5, H9 and H7 subtypes did exist in external environment in Jiaxing City in 2013-2016, and a few patients with asymptomatic infection caused by H9N2 avian influenza virus were proved to exist in the poultry-exposed population. The results suggest that there is a possibility of becoming infected with avian influenza virus if people have a history of poultry contact and exposure to live poultry markets; and hence, it is necessary to strengthen health education among the key population and intensify surveillance of avian influenza virus in the key districts so as to prevent and control human infection with avian influenza virus.

Key words: avian influenza virus; external environment; poultry-exposed population; antibody

基金项目: 嘉兴市科技计划项目 (2014AY21036-4)

作者简介: 亓云鹏 (1986-), 男, 硕士研究生, 医师, 主要从事急性传染病防控工作。

2013 年 2 月开始,我国上海、江苏等地报告多例人感染 H7N9 禽流感确诊病例,引发了社会极大关注^[1]。嘉兴市地处杭嘉湖平原腹地,紧邻苏沪,区域内水系纵横,鸟类活动频繁,禽类养殖场所和交易场所分布广泛,上述因素均对辖区人感染 H7N9 禽流感防控工作造成巨大压力。嘉兴市自 2013 年 4 月报告了首例人感染 H7N9 禽流感确诊病例以来,截至 2016 年 4 月累计报告确诊病例 17 例,死亡 13 例,报告数与死亡数均居浙江省前列。流行病学调查发现,多数病例发病前多有活禽市场或病死禽类暴露史,同时有研究表明禽类从业人员为感染禽流感病毒的高危职业人群^[2-3]。因此,本研究旨在分析 2013-2016 年间嘉兴地区外环境中禽流感病毒污染状况及禽类从业人员感染现状,为人感染禽流感疫情防控提供技术参考。

1 对象与方法

1.1 标本来源及采集 2015 年 4 月和 2016 年 4 月,分别采集全市范围内禽类从业人员空腹静脉血标本共 140 份,离心取血清,-20℃ 以下保存备检;从业人员类型包括活禽市场从业人员、家禽规模养殖场工作人员、家禽散养户人员、家禽屠宰加工厂从业人员。2013 年 3 月-2016 年 4 月,使用病毒采样管(MT0301,友康恒业生物科技)采集外环境标本 3 115 份,标本类型包括笼具表面擦拭标本、宰杀或摆放禽肉案板表面的擦拭标本、禽类粪便标本、清洗禽类的污水标本、禽类饮水标本等,标本来源涵盖城乡活禽市场、家禽规模养殖场、家禽散养户集中的地区、家禽屠宰加工厂、野生候鸟栖息地等场所。

1.2 检测方法 采用马红细胞血凝抑制试验检测禽类从业人员血清 H7N9、H9N2 和 H5N6 血凝素抗体(试剂由中国疾病预防控制中心流感实验室提供),结果判定以人血清对 H5N6 抗原(Sichuan/26221/2014)、H7N9 抗原(Anhui/1/2013)、H9N2 抗原(HN/11197/2013)的抑制效价≥1:80 可判定为阳性,20≤抑制效价<80 为有滴度但不足以判定为阳性。外环境标本采用实时荧光定量 PCR(real time-polymerase

chain reaction,rRT-PCR)进行流感病毒 A 型核酸检测,A 型流感病毒核酸阳性的标本进一步进行 H5、H7、H9 亚型检测。

1.3 统计分析 采用 SPSS 22.0 和 Excel 2013 进行统计分析,率的比较采用χ² 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外环境标本监测

2.1.1 基本概况 2013 年 3 月-2016 年 4 月,共采集外环境标本 3 115 份,检出流感病毒 A 型阳性 564 份,阳性率为 18.11%;其中 H5 阳性 20 份,H9 阳性 100 份,H7 阳性 158 份,H5/H9 混合阳性 4 份,H5/H7 混合阳性 9 份,H9/H7 混合阳性 58 份,H5/H9/H7 混合阳性 3 份,未分型阳性 212 份。

2.1.2 不同时间禽流感病毒检出情况 2013-2016 年嘉兴市外环境标本 A 型禽流感病毒阳性检出率分别为 8.92%(47/527)、11.48%(132/1 150)、27.72%(278/1 003)、24.60%(107/435);其中,H7 亚型(含混合污染标本)阳性检出率分别为 1.71%(9/527)、3.22%(37/1 150)、12.86%(129/1 003)、12.18%(53/435),外环境标本中其他亚型检出情况见表 1。从季节分布来分析,夏秋季节外环境标本中 A 型禽流感病毒阳性检出率明显低于冬春季节(χ²=60.73,P<0.01),H7 亚型阳性检出率亦出现明显季节差异(χ²=33.23,P<0.01);不同月份 A 型禽流感病毒及 H7 亚型检出情况见图 1。

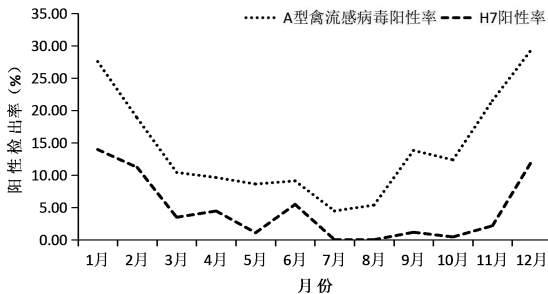


图 1 不同月份嘉兴市外环境标本禽流感病毒核酸检出情况

表 1 2013-2016 年嘉兴市外环境标本禽流感病毒核酸检出情况(n,%)

年份	标本 数量	A 型 阳性	亚型分型							
			H5	H9	H7	H5/H9	H5/H7	H9/H7	H5/H9/H7	A 型未分型
2013	527	47(8. 92)	2(0. 38)	23(4. 36)	7(1. 33)	0(0. 00)	0(0. 00)	2(0. 38)	0(0. 00)	13(2. 47)
2014	1 150	132(11. 48)	8(0. 70)	7(0. 61)	31(2. 70)	0(0. 00)	0(0. 00)	6(0. 52)	0(0. 00)	80(6. 96)
2015	1 003	278(27. 72)	4(0. 40)	40(3. 99)	98(9. 77)	2(0. 20)	8(0. 80)	22(2. 19)	1(0. 10)	103(10. 30)
2016 *	435	107(24. 60)	6(1. 38)	30(6. 90)	22(5. 06)	2(0. 46)	1(0. 23)	28(6. 44)	2(0. 46)	16(3. 68)
合计	3 115	564(18. 11)	20(0. 64)	100(3. 21)	158(5. 07)	4(0. 13)	9(0. 29)	58(1. 86)	3(0. 10)	212(6. 81)

注: * 2016 年数据统计到 4 月底。

2.1.3 不同场所禽流感病毒检出情况 城乡活禽市场、家禽规模养殖场、家禽散养户外环境标本中 A 型禽

流感病毒阳性检出率分别为 28.64% (513/1 791)、6.01% (20/333)、3.26% (31/951), 家禽屠宰加工厂、野生候鸟栖息地外环境中未检出 A 型禽流感病毒阳性标本, 其中城乡活禽市场 A 型禽流感病毒阳性检出率明显高于家禽规模养殖场($\chi^2=76.55, P<0.01$) 和家禽

散养户($\chi^2=251.66, P<0.01$); 其中, 仅城乡活禽市场和家禽散养户外环境中检出 H7 亚型阳性标本, 且城乡活禽市场 H7 阳性检出率明显高于家禽散养户($\chi^2=128.59, P<0.01$); 各场所外环境标本中其他亚型检出情况见表 2。

表 2 嘉兴市不同场所外环境标本禽流感病毒核酸检出情况(n, %)

场所	标本数量	A 型阳性	亚型分型							
			H5	H9	H7	H5/H9	H5/H7	H9/H7	H5/H9/H7	A 型未分型
城乡活禽市场	1 791	513(28.64)	19(1.06)	85(4.75)	156(8.71)	4(0.22)	9(0.50)	58(3.24)	3(0.18)	179(9.99)
家禽规模养殖场	333	20(6.01)	0(0.00)	3(0.90)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	17(5.11)
家禽散养户	951	31(3.26)	1(0.11)	12(1.26)	2(0.21)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	16(1.68)
家禽屠宰加工厂	13	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
野生候鸟栖息地	27	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
合计	3 115	564(18.11)	20(0.64)	100(3.21)	158(5.07)	4(0.13)	9(0.29)	58(1.86)	3(0.10)	212(6.81)

2.1.4 不同类型标本禽流感病毒检出情况 宰杀或摆放禽肉案板表面和清洗禽类的污水标本中 A 型禽流感病毒阳性检出率较高, 分别达到 35.13% (124/353) 和 30.50% (86/282), 不同类型标本 A 型禽流感病毒阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=131.348, P=0.017$); H7 亚型阳性检出率较高的标本类型为清洗禽类的污

水、宰杀或摆放禽肉案板表面及其他(污血为主), 分别达到 9.93% (28/282)、8.22% (29/353)、7.53% (14/186), 不同类型标本 H7 亚型阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=30.59, P<0.01$); 各类型标本中其他亚型检出情况见表 3。

表 3 嘉兴市不同类型外环境标本禽流感病毒核酸检出情况(n, %)

标本类型	标本数量	A 型阳性	亚型分型							
			H5	H9	H7	H5/H9	H5/H7	H9/H7	H5/H9/H7	A 型未分型
笼具表面	649	105(16.18)	2(0.31)	21(3.24)	35(5.39)	0(0.00)	1(0.15)	14(2.16)	0(0.00)	32(4.93)
宰杀禽案板表面	353	124(35.13)	5(1.42)	22(6.23)	29(8.22)	3(0.85)	4(1.13)	7(1.98)	1(0.28)	53(15.01)
粪便	1 281	155(12.10)	4(0.31)	32(2.50)	42(3.28)	1(0.08)	1(0.08)	24(1.87)	0(0.00)	51(3.98)
清洗禽类污水	282	86(30.50)	4(1.42)	8(2.84)	28(9.93)	0(0.00)	2(0.71)	3(1.06)	1(0.35)	40(14.18)
禽类饮水	364	62(17.03)	2(0.55)	13(3.57)	10(2.75)	0(0.00)	0(0.00)	9(2.47)	0(0.00)	28(7.69)
其他*	186	32(17.20)	3(1.61)	4(2.15)	14(7.53)	0(0.00)	1(0.54)	1(0.54)	1(0.54)	8(4.30)
合计	3 115	564(18.11)	20(0.64)	100(3.21)	158(5.07)	4(0.13)	9(0.29)	58(1.86)	3(0.10)	212(6.81)

注: * 其他类型标本主要以污血为主。

2.2 职业暴露人群血清学调查

2.2.1 人群基本特征 2015~2016 年, 全市共采集城乡活禽市场、家禽规模养殖场、家禽屠宰加工厂、家禽散养户 4 种场所职业暴露人群血清标本共 140 份, 其中男性 94 份, 女性 46 份; 年龄分布为 19~79 岁, 中位年龄为 49 岁; 职业分布以商业服务为主(62.14%), 主要是活禽交易市场禽类售卖、宰杀及加工人员。140 名职业暴露人员接触禽类以鸡(82.86%) 为主, 其他接触

禽类有鸭、鹅、鸽等; 所有调查对象近 1 年内均未接种过流感疫苗。

2.2.2 血清学检测结果 140 份血清标本共检出 H9N2 抗体阳性标本 5 份(2 份 1:160、3 份 1:80), 阳性率为 3.57%, 未检出 H5N6、H7N9 抗体阳性。另有 41 份检出抗体, 但不足以判定为阳性, 分别为 18 份 H7N9 抗体, 21 份 H9N2 抗体, 2 份 H5N6 抗体。不同职业暴露人群血清学调查情况见表 4。

表 4 嘉兴市禽类职业暴露人群血清抗体检测结果

基本信息	类别	标本数	近 1 月内接触病(死)禽	H5N6		H7N9		H9N2	
				20≤HI<80	HI≥80	20≤HI<80	HI≥80	20≤HI<80	HI≥80
性别	男	94	12	0	0	10	0	14	4
	女	46	6	2	0	8	0	7	1
职业	商业服务	87	0	2	0	18	0	19	5
	农民	12	0	0	0	0	0	0	0
	工人	41	18	0	0	0	0	2	0
暴露场所	城乡活禽市场	90	0	2	0	18	0	19	5
	家禽规模养殖场	26	18	0	0	0	0	1	0
	家禽屠宰加工厂	15	0	0	0	0	0	1	0
	家禽散养户	9	0	0	0	0	0	0	0
暴露方式	喂养、清扫禽舍	44	11	0	0	0	0	2	0
	捕捉、捕杀、运输	6	6	0	0	0	0	0	0
	加工、销售	90	1	2	0	18	0	19	5
	合计	140	18	2	0	18	0	21	5

3 讨论

本次研究结果显示,嘉兴市多种类型外环境中广泛存在禽流感病毒,但职业暴露人群中禽流感病毒隐性感染率却非常低,提示禽流感病毒感染人类能力有限,这与龙术国、王喜云等^[4-5]的研究结果一致。140 份职业暴露人群血清标本中共检出 5 份(3.57%) H9N2 病毒抗体阳性标本,未检出 H5N6、H7N9 病毒抗体阳性标本,但 41 份标本(29.29%)有滴度但不足以判定为阳性,提示职业暴露人群中存在禽流感病毒无症状感染者,传染源可能来自病禽和受病毒污染的工作环境,其感染原因可能与人群职业防护意识薄弱和普遍未接种流感疫苗有关^[6]。

本次血清学调查中 H9N2 病毒血清抗体阳性率与前期一些研究存在一定差异^[7],造成结果差异较大的原因可能有:1)检测试验所用抗原来源不同;2)血凝抑制效价判定标准不一。调查中未检出 H5N6、H7N9 病毒抗体阳性,主要可能是因为:1)H9 亚型病毒相对于 H5、H7 亚型拥有广泛的宿主谱^[8-9],能在多种不同宿主中感染存在,因此更有利于在人外环境中储存进而感染人类;2)人感染 H9N2 禽流感病毒后主要表现为普通的流感样症状,重症病例很少出现,因此重视程度不如 H7N9 亚型及 H5N6 亚型。

外环境标本检测结果显示,嘉兴市外环境 A 型流感病毒阳性标本中以 H7 亚型、H9 亚型阳性居多,且冬春季阳性率明显高于夏秋季,这与人感染 H7N9 禽流感病例发病高峰相一致^[10],提示低温条件对环境中禽流感病毒流行极为重要。因此,开展相关健康教育工作时应提示公众冬春季尽量减少与禽类的接触,并采取个人防护措施减少感染病毒的风险。

监测结果显示城乡活禽市场 A 型流感病毒和 H7 亚型阳性率分别为 28.64% 和 8.71%,明显高于其他类型场所,这与城乡活禽市场特殊的环境密切相关。采样过程中发现市场中存在当日活禽存笼过夜、不同来源活禽混合存放、活禽交易区清洗消毒不到位等现象,这可能是造成活禽市场外环境中禽流感病毒阳性率较高的原因。此外,宰杀禽案板表面与清洗禽类污水标本阳性率较高,与刘琳琳、陈金堃等^[11-12]研究结果一致,表明宰杀环节中所用工具和清洗用水更容易被病毒污染。目前,已有多项研究表明活禽市场暴露是人感染 H7N9 禽流感的高危因素,因此加强城乡活禽市场管理及提高职业暴露人员的个人防护意识是防止或减少散发病例出现的关键^[13]。值得注意的是,在本次外环境标本检测过程中发现了 74 份混合污染标本,甚至

有 3 份 H5/H9/H7 混合阳性标本,此种现象有可能会增大不同病毒基因的重配机会进而产生新的病毒亚型^[14],应当引起广泛关注。

综上,嘉兴市外环境中一直存在禽流感病毒,人群感染和暴露的来源亦持续存在,在当前居民生产、生活方式难以短时间改变的情况下,发生人感染禽流感疫情的风险长期存在。所以,进一步加强全市范围内禽类从业人员血清学和外环境监测,将会为人感染禽流感疫情防控提供重要科学依据。此外,本研究未对外环境中检出的阳性标本进行进一步的核酸序列测定和分析,无法确定病毒源头,因此还需要进一步的测序以完善本研究。

参考文献

- [1] 韩明锋,冉献贵,赵凤德,等. 国内 102 例人感染 H7N9 禽流感特点初步分析[J]. 传染病信息,2013,26(1):68-70,81.
- [2] 曾健君,方巧云,刘燕,等. 惠州市 2013-2015 年外环境禽流感病毒监测分析[J]. 中国热带医学,2016,16(7):692-694.
- [3] 陈宗道,陆剑云,肖新才,等. 广州地区 2006-2012 年人感染 H5/H7/H9 亚型禽流感病毒风险监测[J]. 中华流行病学杂志,2013,34(9):900-905.
- [4] 龙术国,张金艳,熊新平,等. 2014-2015 年株洲市禽类职业暴露人群及外环境禽流感病毒监测分析[J]. 实用预防医学,2016,23(7):854-856.
- [5] 王喜云,梅玉发,崔龙,等. 十堰市禽流感环境监测与职业暴露人群抗体水平调查[J]. 浙江预防医学,2016,28(1):55-57.
- [6] 陈星红,李文杰,黄义活,等. 阳江市活禽市场环境状况及从业人员对人感染 H7N9 禽流感的认知和行为调查[J]. 实用预防医学,2015,22(3):319-321.
- [7] Lu CY, Lu JH, Chen WQ, et al. Potential infections of H5N1 and H9N2 avian influenza do exist in Guangdong populations of China[J]. Chinese Med J, 2008, 121(20):2050-2053.
- [8] 柳洋,鲁恩洁,王玉林,等. 广州市禽类从业人群禽流感病毒感染特征分析[J]. 中华流行病学杂志,2009,30(11):1111-1113.
- [9] 杨婧,田怀玉. 禽流感 H9N2 亚型的进化促使新型 H7N9 病毒的产生[J]. 中华预防医学杂志,2015,49(8):707-709.
- [10] 徐继承,黄水平,肖伟伟,等. 中国大陆地区 438 例人感染 H7N9 禽流感空间聚集性分析[J]. 中华流行病学杂志,2014,35(11):1270-1274.
- [11] 刘琳琳,叶国军,江永忠,等. 2013-2014 年湖北省外环境中禽流感病毒污染情况分析[J]. 微生物与感染,2016,11(3):159-164.
- [12] 陈金堃,董恒进,傅利军,等. 浙江省绍兴市人感染 H7N9 禽流感流行病学特征和外环境监测结果[J]. 疾病监测,2015,30(2):122-125.
- [13] 秦彦珍,梅树江,谢旭,等. 深圳市 25 例人感染 H7N9 禽流感确诊病例流行病学分析[J]. 实用预防医学,2015,22(8):952-955.
- [14] 朱迪国,宋建德,黄保续,等. 当前全球禽流感流行概况及特点分析[J]. 中国动物检疫,2015,34(1):41-47.

收稿日期:2017-03-09