

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2015.07.008

· 论 著 ·

人感染 H7N9 禽流感 26 例临床特征与病毒基因分析研究

龙云铸¹, 李丹¹, 唐雨新², 谭英征¹, 周青¹, 谭琴¹, 赵韵华¹

(1 株洲市中心医院, 湖南 株洲 412000; 2 株洲市疾病预防控制中心, 湖南 株洲 412000)

[摘要] **目的** 探讨人感染 H7N9 禽流感病毒患者的流行病学和临床特征, 以及病毒分子生物学特征。**方法** 收集湖南省 2013、2014 年确诊的 26 例人感染 H7N9 禽流感病毒患者的资料, 对人和禽分离的 H7N9 病毒进行鉴定和测序分析。**结果** 26 例患者中, 发热和咳嗽是最常见的起病症状, 所有患者均存在肺炎; 20 例 (76.92%) 出现急性呼吸窘迫综合征 (ARDS), 25 例 (96.15%) 初诊时白细胞下降或正常, 发病至开始进行抗病毒治疗的平均时间为 10 d。10 例死亡, 病死率达 38.46%。患者分离的 H7N9 病毒株测序分析表明, 发生了 H7 基因 Gln226Leu 和 Gly186Val 替换, PB2 基因 Asp701Asn 突变。**结论** 急性呼吸系统损害是人感染 H7N9 禽流感的主要临床表现, 活禽暴露是人感染 H7N9 禽流感的重要危险因素, H7N9 禽流感病毒基因发生了部分位点的适应性突变, 更容易从禽类向人跨种传播引起人类严重疾病, 需加强病原学监测。

[关键词] H7N9; 禽流感; 临床特征; 禽流感病毒; 基因突变; 早期识别

[中图分类号] R511.7 R183.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)07-0464-04

Clinical features of 26 patients with H7N9 avian influenza and characteristics of viral gene

LONG Yun-zhu¹, LI Dan¹, TANG Yu-xin², TAN Ying-zheng¹, ZHOU Qing¹, TAN Qin¹, ZHAO Yun-hua¹ (1 Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou 412000, China; 2 Center for Disease Control and Prevention of Zhuzhou, Zhuzhou 412000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the clinical, epidemiological, and viral molecular biology features of 26 patients infected with H7N9 avian influenza A virus. **Methods** Clinical and epidemiological data of 26 patients with confirmed avian influenza A (H7N9) infection in 2013 and 2014 were collected, virus isolated from human and poultry were identified and typed through sequencing. **Results** Of 26 patients, fever and cough were the most common symptoms, all patients had pneumonia; 20 patients (76.92%) developed acute respiratory distress syndrome (ARDS); 25 patients (96.15%) had leucopenia or normal leukocytes at the initial diagnosis; treatment with antiviral drugs was initiated in 25 patients at a median of 10 days after the onset of illness; 10 patients (38.46%) died. Gene sequencing indicated Gln226Leu and Gly186Val substitutions in human virus H7 gene and the PB2 Asp701Asn mutation. **Conclusion** Acute respiratory system damage is the main clinical manifestation of avian influenza (H7N9) virus infection in humans, live poultry exposure is an important risk factor for H7N9 infection in humans, adaptive mutation occurred at partial site of avian virus gene, which can be more easily be spread from birds to human and cause serious diseases, it is necessary to strengthen the pathogen monitoring.

[Key words] H7N9; avian influenza; clinical feature; avian influenza virus; gene mutation; early recognition

[Chin Infect Control, 2015, 14(7): 464-467]

2013 年 3 月我国首次发现人感染 H7N9 禽流感 病例, 其主要临床特点是急性肺炎、呼吸衰竭、急性

[收稿日期] 2014-12-12

[作者简介] 龙云铸 (1973-), 男 (汉族), 湖南省邵阳市人, 主任医师, 主要从事传染病诊治研究。

[通信作者] 李丹 E-mail: 2863454482@qq.com

呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 甚至死亡, 引发全球广泛关注^[1]。2013 年湖南省共报告 4 例确诊人感染 H7N9 禽流感病例, 2014 年湖南省共报告 22 例确诊人感染 H7N9 禽流感病例。其中邵阳 6 例, 死亡 2 例; 娄底 5 例, 死亡 2 例; 永州 6 例, 死亡 2 例; 岳阳 3 例, 死亡 3 例; 长沙 2 例; 衡阳 2 例; 郴州 2 例; 输入病例共 2 例 (江西和上海), 1 例死亡。现将 26 例病例的临床诊治情况报告如下, 并比较 H7N9 禽流感病毒人分离株和来源于农贸市场中鸡分离株的流行病学关联。

1 资料与方法

1.1 病例及相关方法 对 26 例确诊人感染 H7N9 禽流感病例进行综合分析, 资料主要来源于门诊及住院病历记录。按照《人感染 H7N9 禽流感疫情防控方案》进行病例个案调查、密切接触者确认、调查和医学观察。所有呼吸道分泌物的研究程序按照相关文献进行^[2]。即使用 Taqman 荧光定量实时逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR), 按照标准热循环条件检测 M、H7 和 N9 基因。采集 10 只鸡、10 只鸽及 10 只鸭的泄殖腔拭子, 按照病毒运输要求储运。所收集的样本接种到鸡胚, 红细胞吸附检测病毒^[3]。利用 RT-PCR 测序确定亚型株 (使用 H7 和 N9 特异的引物)。对 1 例患者和 1 只鸡的分离物进行 RNA 提取、互补 DNA 合成和 PCR 测序^[3], 纯化的 PCR 扩增产物由美国赛佩基因公司测序。相关的基因序列在 GenBank 中注册 (人分离株: KC885955 - 62, 鸡分离株: KC8899666 - 73)。

1.2 诊断标准 根据国家卫生和计划生育委员会 (卫计委) 发布的《人感染 N7N9 禽流感诊疗方案》中的诊断标准进行诊断。

1.3 统计分析方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 其中计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料用率表示。

2 结果

2.1 临床特点

2.1.1 流行病学及患者就诊情况 26 例人感染 H7N9 禽流感病例中, 22 例 (84.62%) 发病前 7 日内有家禽或农贸市场接触史, 其中 3 例 (11.54%) 发病前曾去过的农贸市场活禽摊点外环境, 15 例

(57.69%) 患者发病后首次就医选择在个体诊所和社区医疗机构, 9 例 (34.62%) 患者首次就医选择当地二级医院, 2 例 (7.69%) 患者首次就诊在三级医院。

2.1.2 临床症状及发病时间 发热和咳嗽是最早、最常见的症状, 体温波动在 38~40℃ 之间, 可伴有疲劳、肌肉酸痛、气促、咯血痰, 肺部病变加重可进展为 ARDS、感染性休克及多脏器功能衰竭。所有患者均住院治疗, 26 例患者均表现为肺炎, 20 例 (76.92%) 出现 ARDS, 22 例 (84.62%) 入住重症监护室 (ICU), 出现休克 7 例, 并发急性肾损害 4 例。发病至首次就诊的时间平均为 1 d, 发病至首次住院的时间平均为 5 d, 发病至确诊的时间平均为 6.18 d。

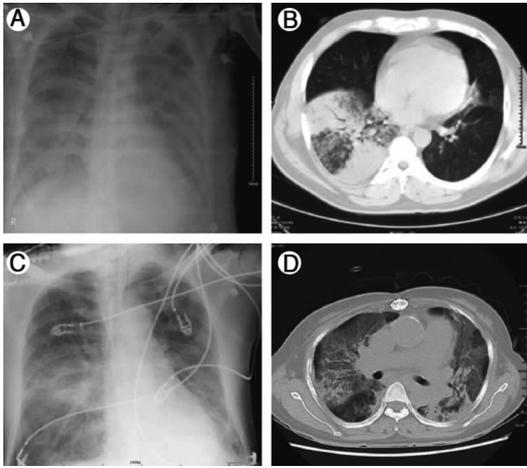
2.1.3 实验室检查 血常规检查: 淋巴细胞减少者 23 例 (88.46%), 血小板减少者 19 例 (73.08%), 25 例 (96.15%) 患者的白细胞 (WBC) 计数正常或降低, 其中 16 例 (61.54%) 降低至 $< 4 \times 10^9/L$; 大部分患者可见丙氨酸氨基转移酶、肌酸激酶及 C 反应蛋白水平升高。见表 1。

表 1 26 例 H7N9 禽流感确诊病例的临床特征与实验室检查结果

Table 1 Clinical features and laboratory results of 26 patients with H7N9 avian influenza

临床特征	例数 (%)
流行病学	
发病 7 d 内有家禽或农贸市场接触史	22 (84.62)
临床表现	
发热	26 (100.00)
疲劳	15 (57.69)
肌肉酸痛	21 (80.77)
咳嗽	26 (100.00)
气促	20 (76.92)
咯血	7 (26.92)
腹泻或呕吐	3 (11.54)
实验室检查	
血常规 (初次就诊时)	
WBC $< 4 \times 10^9/L$	16 (61.54)
WBC $> 10 \times 10^9/L$	1 (3.85)
淋巴细胞减少	23 (88.46)
血小板减少	19 (73.08)
C 反应蛋白升高	19 (73.08)
肌酐升高	4 (15.38)
丙氨酸氨基转移酶升高	18 (69.23)
肌酸激酶升高	14 (53.85)

2.1.4 影像学改变 26 例患者入院时均接受了胸部影像学检查, 双肺毛玻璃不透明影和实变是最常见的 X 线表现, 26 例均符合肺炎的表现。见图 1。



A:A 患者(55 岁,死亡)胸片,摄于发病后的第 13 天,显示双肺浸润和肺实变;B:A 患者 CT 片,摄于发病后的第 8 天,显示右肺中叶实变;C:B 患者(49 岁,死亡)胸片,摄于发病后的第 7 天,显示双肺间质浸润;D:B 患者 CT 片,摄于发病后的第 8 天,显示右肺中叶实变。

图 1 H7N9 禽流感患者影像学改变

Figure 1 Image changes of patients with H7N9 avian influenza

2.1.5 临床治疗与转归 26 例患者入院前均未开始进行抗病毒治疗。25 例患者(96.15%)接受了奥司他韦抗病毒治疗,其中 10 例(38.46%)患者在入院后 24 h 内开始抗病毒治疗,15 例(57.69%)患者在入院 24 h 后才开始抗病毒治疗。症状发作至开始抗病毒治疗时间间隔中位数为 10 d(范围 1~23 d),仅 3 例(11.54%)患者于症状出现后 48 h 内接受了抗病毒治疗。经过积极治疗,治愈 16 例,10 例患者(38.46%)救治无效死亡,从发病至死亡的中位时间为 21 d(7~30 d)。见表 2。

表 2 26 例人感染 H7N9 禽流感病例治疗与临床转归
Table 2 Treatment and clinical prognosis of 26 patients with H7N9 avian influenza

项目	例数(%)
临床治疗与转归	
治愈出院	16(61.54)
死亡	10(38.46)
死亡原因	
呼吸衰竭	7(70.00)
休克	2(20.00)
继发性细菌真菌混合感染	1(10.00)

2.2 病毒分子生物学特征

2.2.1 RT-PCR 检测结果 所有患者咽拭子或痰标本 RT-PCR 检测均 H7N9 阳性,多重 PCR

检测未发现病毒混合感染。3 只(30.00%)鸽子、4 只(40.00%)鸡检测 H7N9 阳性,10 只鸭中均未检测出 H7N9。

2.2.2 同源性分析 1 例死亡患者和鸡体内分离的病毒序列几乎完全相同,其中 H 基因同源性为 99.40%(1 683 个碱基中 1 673 个碱基相同),N 基因为 99.71%(1 398 个碱基中 1 394 个碱基相同)。
2.2.3 基因位点突变 H7 受体结合区,人分离病毒株发生了 Gln226Leu 替换,人和鸡病毒分离株均出现了 Gly186Val 替换。人和鸡的病毒分离株中 H7 裂解位点均未发现多碱性氨基酸。未发生人 H5N1 病毒 PB2 基因上常见的 Glu627Lys 突变,发生了 Asp701Asn 突变。人和鸡病毒分离株 N9 基因的茎区出现了 5 个氨基酸的缺失(69~73 位)。所有 H7N9 病毒株 NS1 基因的 C 末端均出现了提前的终止密码子,导致 PDZ 基序的缺失。M2 基因发生 Ser31Asn 突变,该突变伴随着对金刚烷胺类药物的耐药性,未发现神经氨酸酶的耐药性突变。

3 讨论

人感染 H7N9 禽流感是一种新发传染病,由 H7N9 亚型禽流感病毒引起的急性呼吸道感染性疾病^[4]。本研究显示,H7N9 禽流感发热和咳嗽是最常见和最早出现的症状,通常表现为高热,体温大多持续在 39℃ 以上和下呼吸道感染症状(尤其是呼吸困难),病情发展迅速,短期内出现急性肺炎和 ARDS,可快速出现呼吸衰竭、休克、意识障碍及急性肾损伤等甚至死亡。临床、影像学及实验室检查结果无特异性,加上病毒学诊断的滞后,导致奥司他韦用药滞后(平均为症状出现后 10 d)。

本研究显示,人感染 H7N9 病毒后病死率较高,26 例患者均住院治疗,其中 22 例(84.62%)入住 ICU,其中 10 例患者死亡,病死率为 38.46%。

本研究中人感染 H7N9 病毒发病至首次就诊的时间平均为 1 d,发病至首次住院的时间平均为 5 d,发病至确诊的时间平均为 6.18 d,疾病进展迅速,病死率高。究其原因,H7N9 禽流感作为一种新发传染病,因禽类可以无症状携带该病毒,致病具有悄然性。各级医务工作者对该病缺少足够的认识和了解,对于抗流感药物奥司他韦的使用比较谨慎,而奥司他韦在发病后 24 h 内使用最有效。2009 年甲型 H1N1 流感在我国流行,临床实践表明,奥司他韦抗流感病毒治疗具有良好的有效性和安全

性^[5-6]。奥司他韦不属于基本药物,社区医疗机构并未配备该药,建议社区医疗机构应储备一定量的抗病毒药物奥司他韦。

在流行季节,对于发热咳嗽的患者,如若 WBC 正常或下降,有流行病学史,应考虑为 H7N9 禽流感疑似患者,需及早采取病原学检测,尽快给予奥司他韦抗病毒治疗。部分患者虽无明确流行病学史,因 H7N9 病毒亦可通过接触病毒污染的环境传播至人^[7],也应及早采取病原学检测和抗病毒治疗。争取第一时间救治患者,增加患者的生存率,改善患者预后,亦有助于疫情的防控。

基于病毒 M、H7 及 N9 基因的 RT-PCR 快速检测及细胞系病毒学培养的诊断显示,H7N9 禽流感病毒主要感染下呼吸道,对患者痰液及下呼吸道分泌物的检测较咽拭子检测更有效。H7N9 流感病毒感染对下呼吸道的偏好性提示病毒在下呼吸道的复制效率可能更高,而下呼吸道存在唾液酸 α -2, 3 型和 α -2, 6 型受体^[7]。研究^[8]显示,H7N9 禽流感病毒受体结合位点的氨基酸发生突变,如 G186 及 Q226 突变,可能增强了禽流感病毒与人上呼吸道上皮细胞唾液酸 α -2, 6 型受体的结合力,使病毒能直接从禽类传播到人类,并在短时间内造成较大范围的传播。本研究患者体内分离的病毒株出现了 H7 基因 Gln226Leu 和 Gly186Val 替换, PB2 基因 Asp701Asn 突变,不仅增加了病毒与人类呼吸道上皮细胞唾液酸 α -2, 6 型受体的亲和力,还保留了对禽类上皮细胞唾液酸 α -2, 3 型受体的结合力。由于病毒对两种受体均具有亲和力,致使病毒能继续有效地在禽类间传播,并通过人禽接触感染人的下呼吸道黏膜^[9-11]。提示遗传适应性突变是在病毒从感染禽跨种传播到感染人以后才发生的,病毒在人体内进一步的适应可能导致较轻症的感染和更有效的人与人传播。

综上所述,H7N9 禽流感病毒基因出现适应性突变,更容易从禽类向人跨种传播,引起人类严重疾病,包括快速进展的肺炎和 ARDS 病死率高。人感染 H7N9 禽流感作为一种新发传染病,各级医院的医务人员应掌握该病的临床与流行病学特征,做到

对 H7N9 禽流感患者的早检测,早治疗,改善患者预后,提升疫情防控。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] Li IW, Chan KH, To KW, et al. Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses[J]. J Clin Virol, 2009, 46(4): 325-330.
- [3] Chen H, Smith GJ, Li KS, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(8): 2845-2850.
- [4] Gao HN, Lu HZ, 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.
- [5] 龙云铸,李丹,傅京力,等.国产奥司他韦治疗甲型 H1N1 流感患者的疗效与安全性研究[J].中国感染控制杂志,2010,9(4):241-244,240.
- [6] 蒋明彦,刘国平,曾建平,等.重症及危重症甲型 H1N1 流感患者发病机制探讨[J].中国感染控制杂志,2011,10(5):326-330.
- [7] Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice[J]. Nature,2013,501(746987):556-559.
- [8] Xiong X, Martin SR, Haire LF, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans [J]. Nature, 2013, 499(7459):496-499.
- [9] Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses[J]. Lancet, 2013, 381(9881): 1926-1932.
- [10] Van Ranst M, Lemey P. Genesis of avian-origin H7N9 influenza A viruses[J]. Lancet, 2013,381(9881): 1883-1885.
- [11] Chen Y, Liang WF, Yang S. et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome[J]. Lancet,381(98881):1916-1925.

(本文编辑:陈玉华)