



Outbreak, Surveillance and Investigation Reports

Field Epidemiology Training Program, Bureau of Epidemiology

Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand

Tel: +6625901734-5, Fax: +6625918581, Email: osireditor@osirjournal.net, <http://www.osirjournal.net>

2012 年宁夏 H5N1 亚型高致病性禽流感疫情暴发调查

刘华雷^{1,2,*§}, 王晓亮^{3,§}, Magalhães RJS^{4,§}, 周小燕⁵, Castellan D⁶, Chanachai K⁷, 王静静¹, 赵云玲¹, 郑东霞¹, 黄保续¹, 王志亮¹

1 中国动物卫生与流行病学中心, 青岛

2 区域兽医现场流行病学培训项目, 曼谷

3 宁夏动物疾病预防控制中心, 银川

4 澳大利亚昆士兰大学公共健康学系, 昆士兰

5 联合国粮食及农业组织跨界动物疫病应急中心中国办公室, 北京

6 联合国粮食及农业组织亚太区域办公室跨界动物疫病应急中心, 曼谷

7 泰国疫病控制和兽医局, 曼谷

* 通讯作者, 电子邮件地址: hualeiliuwy@163.com

§ 这些作者对本文有相同贡献

Translated version of "Liu HL, Wang XL, Magalhães RJS, Zhou XY, Castellan D, Chanachai K, et al. Investigation of highly pathogenic avian influenza (H5N1) outbreaks among poultry in Ningxia, China, 2012. OSIR. 2014 Jun; 7(2):11-6. <<http://www.osirjournal.net/issue.php?id=54>>".

The article is translated by Dr. Liu Hualei and reviewed by Dr. Huai Yang.

摘要

2012 年 4 月, 宁夏报告蛋鸡发生疑似 H5N1 高致病性禽流感疫情. 为了描述这次疫情的流行病学特征、分析导致疫情发生的风险因素, 在最后一批病例发生 4 周后我们对发生疫情的宁夏固原市头营镇所有的 87 个蛋鸡养殖场采用问卷调查和采样检测相结合的方式开展了回顾性调查. 从报告发生疑似疫情的 45 户养殖场分别采集发病鸡的病料样品采用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 进行检测, 通过病毒分离进行确诊. 采用多元回顾分析对疫情发生的风险因素进行研究, 通过半方差图分析来证实发病场的聚集性分布. 结果 45 户养殖场 H5N1 病毒 RT-PCR 呈阳性, 其中的 4 个养殖场病毒分离呈阳性. 对废弃物不进行无害化处理(调整后的比值比 OR = 2.7, 95% 置信区间 = 1.20-8.30) 和在疫情发生前一个月内有外来人员来访(调整后的比值比 = 5.5, 95% 置信区间 = 1.97-15.64) 两个风险因素与高致病性禽流感疫情发生有关. 调查表明 H5N1 疫情在头营镇分布广泛, 为预防 H5N1 感染的发生, 应加强生物安全管理措施, 包括限制外来人员来访和强化废弃物无害化处理.

关键词: 高致病性禽流感, H5N1, 暴发调查, 蛋鸡

前言

近年来 H5N1 亚型高致病性禽流感 (HPAI) 禽间病例在包括中国在内的全球很多国家呈地方流行. 中国于 2004 年 1 月 27 日首次报告发生 H5N1 高致病性禽流感疫情, 随后在 2004 年全年共发生 49 起疫情, 扑杀家禽 902 万羽.^{1,2}

自 2009 年以来导致中国大多数高致病性禽流感疫情的 H5N1 病毒主要包括三种, 即: clades 7、2.3.4 和 2.3.2 三种.³ 自 2004 年以来中国政府为了防控 HPAI 采用了强制免疫与扑杀相结合的策略.⁴ 目前中国使用的 H5N1 疫苗主

要包括 Re-4, Re-5 和 Re-6, 分别对应于 clades 7, 2.3.4 和 2.3.2。⁵

中国在使用大面积免疫后 H5N1 疫情暴发的次数显著下降. 但在部分活禽市场仍可检测到 H5N1 病毒的存在, 同时在部分地区还存在散发. 由于普遍免疫带来的选择压力导致中国 H5N1 高致病性禽流感病毒突变的频率大大增加, 抗原漂移和抗原转变时有发生。^{6,7}

宁夏于 2006 年首次报告发生 H5N1 亚型高致病性禽流感疫情, 导致这次疫情的 H5N1 病毒属于 clade 7. 自此以后,

为了防控 H5N1 疫情暴发, 当地政府普遍采用了 Re-4 疫苗。2012 年 4 月 13 日, 宁夏固原市原州区头营镇的几个养殖户向当地兽医部门报告发生疑似 HPAI 疫情。农业部在 4 月 18 日确认了本次 HPAI 疫情。通过对导致此次疫情发生的 H5N1 亚型禽流感病毒的血凝素基因 (HA) 进行遗传进化分析, 结果证实分离的 H5N1 病毒属于 clade 7.2, 与 Re-4 疫苗株 HA 基因的同源性仅为 94.1%。⁸ 为了了解这次疫情的流行病学分布, 分析导致疫情发生和扩散可能的风险因素, 我们开展了一次回顾性暴发调查。

方法

暴发调查

在 2012 年宁夏固原市原州区头营镇最后一一起 HPAI 疫情报告四周后与当地兽医机构联合开展了一次暴发调查。对参与暴发调查的省级和当地兽医进行了调查前培训, 采用调查问卷对该镇所有的养禽场进行了现场调查, 对疑似发生 HPAI 疫情的每个养禽场各采集 5 只病鸡的组织病料和棉拭子样品, 采用 RT-PCR 和病毒分离进行实验室检测。分离到的 H5N1 病毒通过血凝和血凝抑制进行鉴定。

病例定义

疑似病例: 头营镇蛋鸡养禽场在 2012 年 3 月份以来, 出现急性死亡、产蛋下降、扭颈劈叉等神经症状、头部水肿、脚鳞出血、鸡冠出血或发绀等临床症状之一或全部, 同时 H5N1 病毒 RT-PCR 检测呈阳性。

确诊病例: H5N1 亚型禽流感病毒分离呈阳性的疑似病例。

头营镇所有的养禽场地理位置信息通过采用手持的 GPS 设备(UniStrong, 北京)进行测定, 采用 ArcGIS 10 (ESRI)进行分析。

风险因素分析

采用横断面研究方法对调查涉及的风险因素进行分析, 所有头营镇确定的疑似病例和确诊病例作为病例, 其余未感染的养禽场则作为非病例。所有的风险因素均采用卡方或 Fisher 精确检验。

对生物学有意义的一阶交互作用项也进行了检验。对可能的因素之间的相关性采用皮尔逊相关系数 (Pearson's correlation coefficient) 进行评估。然后对所有 p 值小于 0.2 的所有因素采用多变量 Bernoulli 线性回归模型进行分析。分析采用统计软件 Stata version 11 (Stata 公司, College Station, Texas) 进行。

空间分析

采用多变量模型中分析的变量在多变量分析模型中残差的半方差图来定量评价空间分布的依赖程度。⁹ 半方差图是通过检验各观察点的变异与分布位置的关系, 以图形的形式描述不同位置的变量分布差异。采用 R 软件 (version 2.10.0) geoR 程序包来构建残差的半方差图。

结果

描述流行病学

头营镇所有的养禽场均为蛋鸡养殖场。在所有的 87 户养殖场中, 45 户为疑似感染场 (51.7%)。对其中的 4 户疑似感染场进行了病毒分离, 结果均分离出 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒。通过对病毒 HA 基因的遗传进化分析表明此次疫情分离株属于 clade 7.2。⁸ 45 个感染场和 42 个非感染场地理分布见图 1。

指示病例最早在 2012 年 3 月 28 日开始表现临床症状, 随后感染发病养禽场数量迅速增加, 到 4 月 9 号新增疑似感染场达到顶峰, 随后新增发病场数量逐渐减少, 最后一一起病例发生在 2012 年 5 月 9 日。本次疫情的流行曲线见图 2。

指示病例感染场中除了最早感染的批次为用 H5 亚型禽流感疫苗免疫之外, 其余两个批次均先后采用 H5 亚型禽流感疫苗 Re-4 和 Re-5 二联苗免疫过。在发病场中最常见的临床症状是精神萎靡不振, 采食下降, 产蛋下降和出现急性死亡 (详见表 1)。所有发病场中死亡率平均为 17% (标准差 SD 为 3.0%)。指示病例中未免疫的禽群死亡率最高, 达到 83.3%。

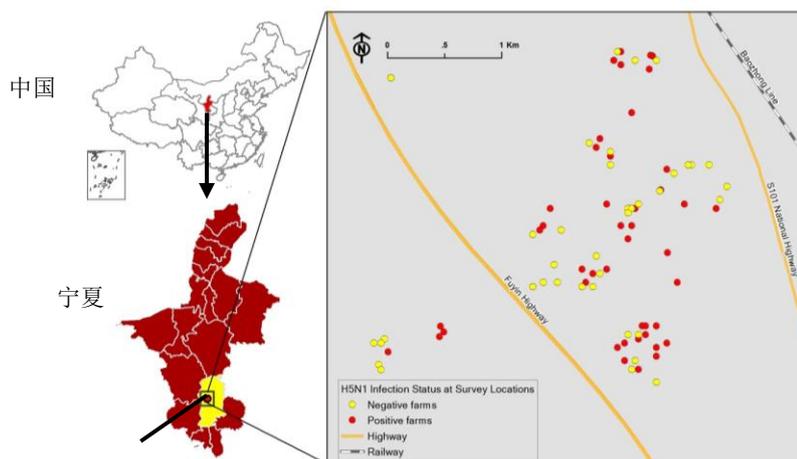


图 1. 2012 年宁夏 H5N1 疫情地理分布

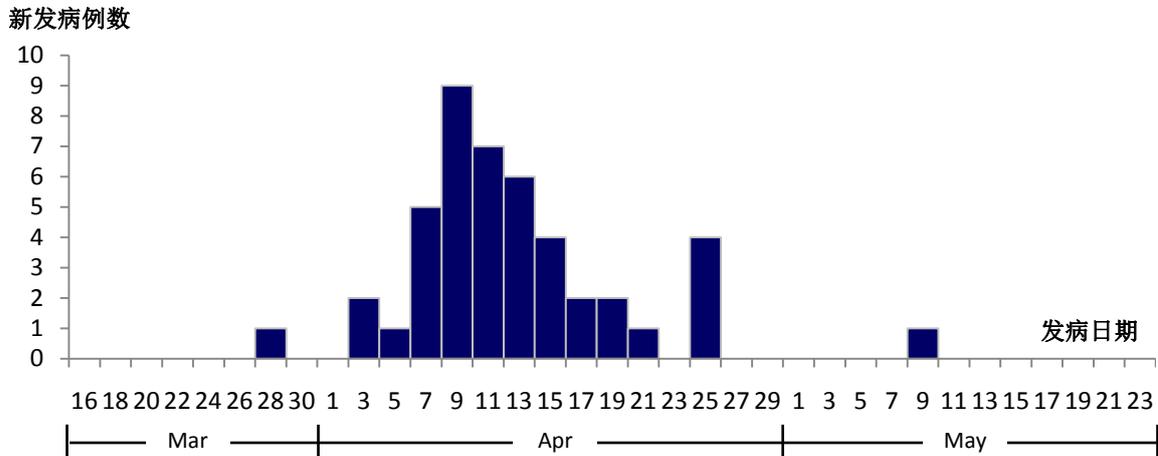


图 2. 2012 年宁夏 H5N1 疫情流行曲线

表 1. 宁夏 2012 年 H5N1 禽流感疫情临床症状分布(n=45)

临床症状	感染场	
	数量	百分比
精神不振、食欲下降	45	100.0
产蛋下降	40	88.9
急性死亡	38	84.4
鸡冠发绀	23	51.1
神经症状	18	40.0
头部水肿	6	13.3
脚鳞出血	6	13.3

H5N1 高致病性禽流感感染相关因素分析

单变量分析结果显示 H5N1 感染与废弃物或病死禽未进行无害化处理、蛋盘未进行消毒和具有外来人员来访等因素有关（详见表 2）。其中废弃物无害化处理和病死禽无害化处理两个因素高度相关($r^2=0.9$)。

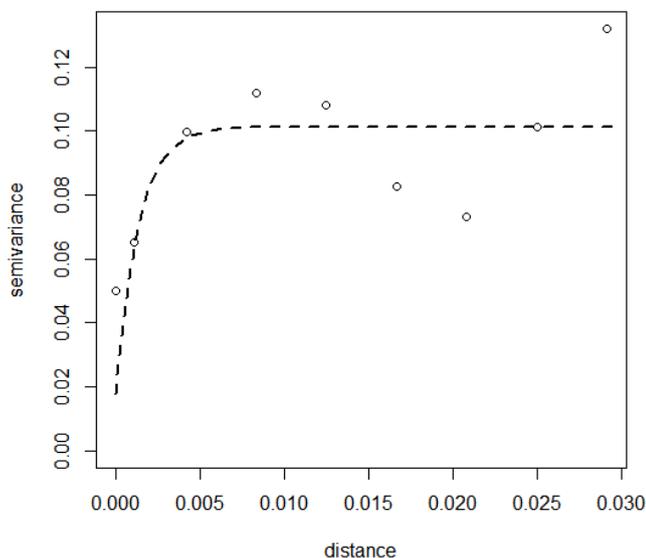


图 3. 2012 年宁夏 H5N1 高致病性禽流感疫情多变量分析模型中残差的半方差图

在多变量分析模型中，选择了废弃物无害化处理和具有外来人员来访两个因素进行分析。结果显示 H5N1 感染场与未感染场相比，废弃物未进行无害化处理造成感染的风险高近 3 倍（调整后的比值比 OR= 2.7, 95% 置信区间= 1.20-8.30），在暴发前 1 个月有外来人员造成感染的风险高 5 倍，调整后的比值比 OR = 5.5, 95%置信区间= 1.97-15.64）。

H5N1 高致病性禽流感感染残差空间差异分析

我们发现在多变量模型中分析的变量仅占感染场聚集性分布的占 20%（见图 3）。这表明养禽场之间距离较近可能是导致这些养禽场迅速传播的原因。

讨论

宁夏固原市原州区头营镇本次 H5N1 疫情的暴发采用病毒分离进行了确诊。在这次疫情暴发中，有 4 个养殖场 H5N1 病毒分离阳性，45 户 H5N1 病毒 RT-PCR 阳性，近年来不同亚型禽流感病毒之间发生片段重组的情况时有发生。¹⁰⁻¹³ 一些新重组出现的变异株导致了部分地区 HPAI 的散发。然而，在本次导致本次疫情暴发的病毒并没有发生基因重组现象，仍为 H5N1 亚型。Clade 7 类型的 H5N1 亚型禽流感病毒一直在不断地进化，本次疫情分离株与目前普遍使用的 Re-4 疫苗主要基因供体。

A/chicken/Shanxi/2/2006 (H5N1) 毒株 HA 基因核苷酸的同源性仅为 94.1%。⁸ 本次流行的 H5N1 亚型禽流感病毒在 HA1 抗原位点区一些关键位点氨基酸的替换导致了流行毒株和疫苗株的变异，如 K53E, K115E, S121H, E126N, A127T, G139E, K140N, T167A, D183N, K189M 和 T195N 等 (H5 numbering), 可能改变病毒的抗原性。我们通过采用 SPF 鸡制备疫苗株的单因子血清，采用血凝抑制试验来分析其抗原性差异，结果显示用疫苗株作为抗原测定血清的抗体效价比用分离株测定的抗体效价高 5 个滴度。⁸ 因此，导致本次疫情暴发的流行毒株与疫苗株在抗原性方面可能存在显著差异。中国农业部也认识到 clade 7 的 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒的变异趋势，目前正在考虑采用新的候选疫苗株来替代 Re-4 疫苗株以防控这种变异毒株。

表 2. 2012 年宁夏 H5N1 高致病性禽流感疫情的单变量风险因素分析

因素	类型	非感染场数量	感染场		比值比 OR (95% CI)	P-value
			数量	百分比		
养殖户年龄	≥ 44	21	27	56.3	1.0 (0.96-1.08)	0.464
	< 44	21	18	46.2		
主要收入来源	Yes	39	40	50.6	1.6 (0.37-7.19)	0.396
	No	3	5	62.5		
养殖经验 (年)	≥ 5	24	29	54.7	1.4 (0.57-3.22)	0.490
	< 5	18	16	47.1		
养殖密度 (鸡/平方米)	≥ 10	15	24	61.5	2.1 (0.87-4.87)	0.099
	< 10	27	21	43.8		
未对废弃物进行无害化处理	Yes	19	9	32.1	3.3 (1.30-8.38)	<0.05
	No	23	36	61.0		
未对病死禽进行无害化处理	Yes	19	11	36.7	2.6 (1.04-6.29)	<0.05
	No	23	34	59.6		
蛋盘消毒	Yes	28	19	40.4	0.4 (0.15, 0.87)	<0.05
	No	14	26	65.0		
外来车辆消毒	Yes	15	10	40.0	0.5 (0.20, 1.32)	0.165
	No	27	35	56.5		
引种	Yes	4	1	20.0	4.6 (0.59-36.15)	0.159
	No	38	44	53.7		
外来人员来访	Yes	8	24	75.0	4.8 (1.85-12.78)	<0.05
	No	34	21	38.2		
去过活禽市场	Yes	2	3	60.0	1.4 (0.23-9.00)	0.533
	No	40	42	51.2		
有病死禽接触史	Yes	5	8	61.5	1.6 (0.41-6.79)	0.443
	No	37	37	50.0		

在疫情暴发时进行早期预警和快速反应是降低疫病传播风险的关键。疑似疫情的延时报告可能会导致疫病迅速扩散。在本次疫情暴发过程中，我们通过调查发现首起病例发生在 2012 年 3 月 28 日，可当地兽医机构在 4 月 13 日才接到疑似疫情发生的报告。没有及时对疑似疫情报告可能导致了这次疫情的迅速扩散。因此，应强化对养殖户及时报告疑似疫情的宣传培训，提高及时发现并报告疑似疫情的能力，增强防控意识。对异常死亡的家禽进行及时报告和调查将为兽医相关机构准确记录疫病详细信息，提高疫病关键信息的准确性，为分析疫病风险因素、降低疫情扩散的范围提供支持。由于本次暴发调查是一个回顾性调查，加上部分养殖户没有详细的养殖记录，因此调查过程中搜集的部分信息数据可能存在回忆性的偏倚。在暴发调查过程中信息搜集的准确性和完整性对数据的分析和结论至关重要。

本研究证实养禽场的生物安全措施是影响 H5N1 亚型高致病性禽流感疫情扩散的决定因素。对易感家禽采用 H5N1 亚型高致病性禽流感疫苗进行免疫可降低其易感性。一旦一个养禽场出现疑似 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒感染，必须立刻采取有效措施，如扑杀、隔离等，以降低疫情扩散蔓延的风险。在本次疫情流行过程中，指示病例所在的养禽场一个未及时采用 H5N1 亚型高致病性禽流感疫苗的批次出现高死亡率（83.3%）。该养殖户在未免疫鸡出现大面积死亡后，对其余两个批次的家禽采用了不合理的淘汰措施，结果导致了疫情的进一步扩散。在免疫家禽中，由于免疫抗体的存在可能导致在病毒感染早期出现的症状不典型或者不明显。因此，在一个养禽场如果一个批次的家禽确定感染的话，宜对该养禽场所有批次的家禽采取紧急措施，如隔离、扑杀、消毒等。此外，在不同养禽场之间应强化生物安全管理，建立相对隔离措施，对外来车辆进行消毒等，以降低疫病传入风险。村级防疫员、基层兽医或商贩等外来人员来访也是本次疫情传播的风险因素。因此，应限制外来人员来访、降低与家禽接触的几率也是降低疫情发生的措施之一。

致谢

感谢美国疾病预防控制中心(US CDC) Pawin Padungtod 博士对文章提出了许多重要的评价和建议。本次调查得到中国动物卫生与流行病学中心和宁夏动物疾病预防控制中心的大力支持。

参考文献

- Williams RA, Peterson AT. Ecology and geography of avian influenza (HPAI H5N1) transmission in the Middle East and northeastern Africa. *Int J Health Geogr.* 2009 Jul 20;8:47.
- Zhang Z, Chen D, Chen Y, Liu W, Wang L, Zhao F, et al. Spatio-temporal data comparisons for global highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 outbreaks. *PLoS One.* 2010 Dec 20;5(12):e15314.
- Li Y, Shi J, Zhong G, Deng G, Tian G, Ge J, et al. Continued evolution of H5N1 influenza viruses in wild birds, domestic poultry, and humans in China from 2004 to 2009. *J Virol.* 2010 Sep;84(17):8389-97.
- Chen J, Fang F, Yang Z, Liu X, Zhang H, Zhang Z, et al. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated from poultry markets in central China. *Virus Res.* 2009 Dec;146(1-2):19-28. Epub 2009 Aug 29.
- Tian G, Zeng X, Li Y, Shi J, Chen H. Protective efficacy of the H5 inactivated vaccine against different highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated in China and Vietnam. *Avian Dis* 2010 Mar;54(1 Suppl):287-9.
- Connie Leung YH, Luk G, Sia SF, Wu YO, Ho CK, Chow KC, et al. Experimental challenge of chicken vaccinated with commercially available H5 vaccines reveals loss of protection to some highly pathogenic avian influenza H5N1 strains circulating in Hong Kong/China. *Vaccine.* 2013 Aug 2;31(35):3536-42. Epub 2013 Jun 19.
- Zou W, Ke J, Zhu J, Zhou H, Jin M. The antigenic property of the H5N1 avian influenza viruses isolated in central China. *Virol J.* 2012 Aug 6;9:148.
- Liu H, Wang X, Wang J, Zhao Y, Zheng D, Chen J, et al. Genome sequences of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated from vaccinated layers in China in 2012. *Genome Announc.* 2013 Nov-Dec;1(6): e00936-13.
- Cressie N. *Statistics for spatial data.* New York: Wiley; 1993.
- Gu M, Huang J, Chen Y, Chen J, Wang X, Liu X. Genome sequence of a natural reassortant H5N2 avian influenza virus from domestic mallard ducks in eastern China. *J Virol.* 2012 Nov;86(22):12463-4.
- Zhao G, Gu X, Lu X, Pan J, Duan Z, Zhao K, et al. Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. *PLoS One.* 2012 Sep 25;7(9):e46183.
- Zhao K, Gu M, Zhong L, Duan Z, Zhang Y, Zhu Y, et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Vet Microbiol.* 2013 May 3;163(3-4):351-7. Epub 2013 Jan 17.
- Zhao S, Suo L, Jin M. Genetic characterization of a novel recombinant H5N2 avian influenza virus isolated from chickens in Tibet. *J Virol.* 2012 Dec;86(24):13836-7.