

2011年越南北部活禽市场从业人员A(H5N1)禽流感病毒血清学调查

Tham Chi Dung^a, Pham Ngoc Dinh^a, Vu Sinh Nam^b, Luong Minh Tan^a, Nguyen Le Khanh Hang^a, Le Thi Thanh^a 和 Le Quynh Mai^a

通讯作者: Le Quynh Mai (e-mail: lom9@nihe.org.vn 或 lom9@hotmail.com)。

目的: A(H5N1)高致病性禽流感在越南家禽间呈地方性流行。越南的人感染A(H5N1)禽流感病例数居世界第三。2001年河内的一项研究发现, 4%的活禽市场从业人员 (poultry market workers, 简称PMWs) 具有A(H5N1)禽流感病毒特异性血清抗体。本研究在河内市、太平省、清化省对PMWs开展A(H5N1)禽流感病毒血清学调查, 以确定PMWs的A(H5N1)禽流感病毒血清抗体阳性率。

方法: 从5个活禽市场选择PMWs作为研究对象, 对其进行访谈并采集血标本。随后用越南2004年以来流行的3个谱系的A(H5N1)禽流感病毒, 通过马血凝抑制试验和微量中和试验, 对血标本进行检测。

结果: 总血清流行率为6.1%(95% CI: 4.6–8.3)。河内的PMWs血清流行率最高(7.2%), 多数抗体阳性的PMWs(70.3%)为家禽宰杀和销售员。

讨论: A(H5N1)禽流感病毒在越南持续存在并不断变异, 需要在全国范围内开展全面的人间和禽间监测以及后续的PMWs研究, 以评估越南禽类将A(H5N1)禽流感病毒传播给人的风险。

2003年, A(H5N1)高致病性禽流感病毒在东南亚再次出现, 并且在家禽中持续广泛存在^[1]。截至目前已暴发多起禽间A(H5N1)禽流感疫情, 并发生了从禽到人的有限传播, 但尚不明确发生持续人传人的潜在风险。然而A(H5N1)禽流感病毒的持续变异和遗传多样性令人担忧, 因为仅仅4个氨基酸的变化便足以使病毒获得在雪貂间传播的能力, 增加了A(H5N1)禽流感病毒大流行的威胁^[2–4]。

截至2014年7月, 越南已报告127例人感染A(H5N1)禽流感病例, 其中63人死亡。自2003年越南首次出现A(H5N1)禽流感以来, 主要有3个谱系的A(H5N1)禽流感病毒流行且与人感染病例相关, 分别为clade 1、clade 2.3.4和clade 2.3.2.1^[1,5]。与病、死家禽接触一直被认为是人感染A(H5N1)禽流感病毒的危险因素, 已证明活禽市场是A(H5N1)禽流感病毒传播的重要场所^[6,7]。2001年在河内对200名活禽市场从业人员 (poultry market workers, 简称PMWs) 开展的一项血清学调查发现, 4%的研究对象具有A(H5N1)禽流感病毒特异性血清抗体^[8], 提示在官方确认的首例人感染A(H5N1)禽流感病例之前已存在A(H5N1)禽流感病毒的人间感染^[9]。此外在疫情调查中还发现有无症状感染者和轻症病例^[9–11]。泰国、柬埔寨和印尼也曾在综合性暴发调查中开展过人感染A(H5N1)禽流感血清学调查, 以评估其临床、流行病学和血清学等方面的特征。

为评估PMWs的A(H5N1)禽流感病毒暴露水平是否发生了改变, 我们于2011年在越南北部的3个省份对PMWs开展了A(H5N1)禽流感病毒血清学调查。

材料与方法

抽样及研究方案

在越南北部的河内市、太平省、清化省, 对5个活禽市场的成年从业人员开展横断面血清学调查。基于2001年河内PMWs血清学调查^[9]的A(H5N1)禽流感病毒血清抗体阳性率4%(95%CI: 2.45–5.55)来估算样本量。考虑到可能存在不合作研究对象和不合格标本, 本研究样本量确定为600人。

本研究中活禽市场的纳入条件为: 日常活禽销售人员超过100人, 位于大城市, 且所在城市出现过人感染A(H5N1)禽流感实验室确诊病例。在地方政府的支持下, 3个省市共有11个活禽市场可供选择, 最终随机选取了5个。研究对象需符合下列条件: 年龄18岁以上, 是活禽(包括水禽)销售商或宰杀人员, 在活禽市场工作时间超过6个月。我们一个市场一个市场地招募研究对象, 直至获得足够数量的参与者。

采用问卷调查收集人口学信息以及A(H5N1)禽流感病毒暴露的潜在职业危险因素, 变量包括年龄、性

^a 越南国家卫生与流行病学研究所, 越南河内市。

^b 越南卫生部预防医学司, 越南河内市。

投稿日期: 2014年4月30日; 发表日期: 2014年11月18日

doi: 10.5365/wpsar.2014.5.4.2.006

别、教育经历、既往病史、所在省份、职业、家禽相关职业暴露风险。对所有研究对象进行面对面访谈。使用EpiData v3.1录入数据, STATA v11进行数据分析。频率计算取95%可信区间。在对血清流行率进行比较时, 如遇观测值小于5, 采用Pearson卡方检验或Fisher精确检验。平均值的比较采用t检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

为确定A(H5N1)禽流感病毒的血清抗体滴度, 采集每个研究对象5ml静脉血。血标本采集后保存于4°C冰盒, 在24–48小时内被汽车运送至位于河内的越南国家卫生与流行病学研究所国家流感中心。

全血标本离心(2500 rpm, 15分钟)后取血清, 将血清分装后储存于-70 °C冰箱待检。

血清学检测

在越南国家卫生与流行病学研究所, 依照美国CDC的检测方案, 采用马血凝抑制试验(horse haemagglutination inhibition assay, 简称HHI)和微量中和试验(microneutralization assay, 简称MN)对血清进行检测。由于A(H5N1)禽流感病毒的抗体多样性可能会影响特异性抗体检测试验的灵敏度, 因此将越南2004年以来流行的3个谱系的A(H5N1)禽流感病毒均用于检测。这3个谱系的A(H5N1)禽流感病毒株分离自RT-PCR检测阳性的越南病例, 其中clade 1为2005年分离到的A/Viet Nam/HN30408/2005, clade 2.3.4为2007年分离到的A/Viet Nam/HN31244/2007, clade 2.3.2.1为2011年分离到的A/Viet Nam/CM32/2011。由于禽类/人类病毒的致病潜力未知, 所有涉及活病毒的检测均在动物生物安全3级以及生物安全3级实验室进行。

HHI试验按WHO推荐^[12]使用经受体破坏酶处理过的参考抗血清。血清标本先用8个血凝素单位的病毒和1%的马红细胞进行10倍连续稀释。所有病毒在使用前用1%的丙内酯灭活。加入马红细胞60分钟后读取HHI滴度, 以引起凝集完全抑制的最高血清稀释度的倒数作为HHI滴度。以阴性对照血清做为质控, 与马红细胞混合后呈非凝集状态时即认为试验有效。对HHI试验中最低稀释浓度(1:10)为阴性结果的标本以及HHI滴度 ≥ 40 的标本, 用MN试验检测3个A(H5N1)禽流感病毒谱系。MN试验按WHO的方案^[12,13]使用100倍TCID₅₀的活病毒。病毒先在以1:10滴度起始进行两倍连续稀释的血清中培养, 再在MDCK细胞(美国ATCC的Madin-Darby犬肾细胞)中培养过夜, 然后用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, 简称ELISA)检测流感核蛋白, 进行病毒定量。以造成感染减少50%以上的最高血清稀释度倒数作为MN滴度。

WHO对人感染A(H5N1)禽流感病例血清学检测实验室确诊的判定标准为: 发病14天后采集的单人份血清HHI滴度 >160 及MN滴度 >80 ^[14]。但这一判定标准对血清学调查研究不适用, 因为研究对象并非疑似病例。实际上, 流感血清流行病学标准化联盟尚未制定出A(H5N1)禽流感病毒血清学检测的阳性标准^[7]。在本研究中, HHI滴度 ≥ 80 及MN滴度 ≥ 20 即被确定为A(H5N1)禽流感病毒血清抗体阳性。以最高血清稀释度所对应的病毒谱系作为血清抗体阳性标本的谱系^[13]。

本研究方案通过了越南国家卫生与流行病学研究所机构审查委员会的审批。所有研究对象均签署书面知情同意书。

结果

研究人群特征

2011年9–12月采集到607名PMWs的血清标本。其中, 305份(50.3%)采集自河内市, 169份(27.8%)采集自太平省, 133份(21.9%)采集自清化省。研究对象在活禽市场的平均工作年限为7.7年(95%CI: 7.1–8.2), 最短为6个月, 最长为36年。

研究对象的平均年龄为42.3岁(95%CI: 41.4–43.2), 最小年龄为18岁, 最大年龄为74岁。214人(35.3%)为男性。约三分之二(62.6%)为活禽销售或宰杀人员, 其余(37.4%)为饲养、运输或其他人员(兽医、司机、羽毛收集人员、清洗人员、市场管理人员)。79人(13.1%)有慢性基础性疾病(高血压、糖尿病、肝炎)。555人(91.4%)有高中以上学历(表1)。

血清H5抗体阳性率

37人血清A(H5N1)禽流感病毒抗体阳性, 总阳性率为6.1%(95%CI: 4.6–8.3)。其中, 24人为clade 2.3.4, 2人为clade 2.3.2.1, 11人为clade 2.3.4和clade 2.3.2.1混合(表2)。河内市阳性率为7.2%(95%CI: 4.3–10.1), 太平省为5.3%(95%CI: 1.9–8.7), 清化省为4.5%(95%CI: 0.9–8.0), 差异无统计学意义($P=0.49$)(表1)。

25–34岁年龄组阳性率最高(8.9%, 95%CI: 3.8–13.9), 但4个年龄组间的阳性率差异无统计学意义($P=0.46$)。各组间性别($P=0.99$)、教育水平($P=0.48$)、既往病史($P=0.55$)的阳性率差异也无统计学意义(表1)。家禽宰杀和销售人员的阳性率(8.2%)高于其他从业人员(2.6%), 但差异无统计学意义($P=0.06$)(表1)。

表1. 2011年越南北部A(H5N1) PMWs禽流感病毒血清抗体阳性人群特征 ($n = 607$ 人)

特征	阳性数/总数	%	95% CI	p 值
研究地区				
河内市	22/305	7.2	4.3–10.1	0.49
太平省	9/169	5.3	1.9–8.7	
清化省	6/133	4.5	0.9–8.0	
年龄组				
0–24岁	1/31	3.2	0.0–9.8	0.46
25–34岁	11/124	8.9	3.8–13.9	
35–44岁	9/185	4.9	1.7–8.0	
45岁及以上	16/267	6.0	3.1–8.9	
性别				
男	13/214	6.1	2.8–9.3	0.99
女	24/393	6.1	3.7–8.5	
职业				
销售和宰杀	31/380	8.2	5.4–10.9	0.06
其他*	6/227	2.6	0.5–4.7	
最高学历				
高中及大学	35/555	6.3	4.3–8.3	0.48
小学及初中	2/52	3.9	0.0–9.3	
既往病史				
慢性基础性疾病	6/79	7.6	1.6–13.6	0.55
未报告有慢性基础性疾病	31/528	5.9	3.9–7.9	

CI, 可信区间。

* 饲养人员、运输人员、兽医、司机、羽毛收集人员、清洗人员、市场管理人员。

表2. 2011年越南北部A(H5N1)禽流感病毒血清抗体阳性人群的病毒谱系和省份分布

研究地区	阳性数/总数	阳性数				阳性百分比 (%)
		Clade 1	Clade 2.3.4	Clade 2.3.2.1	Clades 2.3.4和2.3.2.1混合	
河内市	22/305	0	13	2	7	7.2
太平省	9/169	0	6	0	3	5.3
清化省	6/133	0	5	0	1	4.5
合计	37/607	0	24	2	11	6.1

讨论

本研究发现37名(6.1%) PMWs具有A(H5N1)禽流感病毒clade 2.3.4和clade 2.3.2.1病毒血清抗体, 这两个谱系是越南北部2005–2013年的优势流行株^[15–17]。2003年至2005年上半年, 越南也有clade 1流行^[18], 但本研究未发现clade 1病毒血清抗体阳性的PMWs。该结果出乎意料, 因为一些从业人员在clade 1流行期间已经在活禽市场工作。本研究所选取的PMWs来自河内市、太平省和清化省, 这3个省份自2004年以来均报告多例人感染A(H5N1)禽流感病例^[6,18]。尽管

2004年越南和泰国开展的一些研究未将接触健康家禽作为A(H5N1)禽流感病毒暴露的危险因素^[6], 但2001年河内的一项研究发现4%的PMWs具有A(H5N1)禽流感病毒clade A/Goose/Viet Nam/113/2001的血清抗体^[8]。A(H5N1)禽流感病毒在越南健康的鸭子中传播^[1], 表明暴露于健康家禽的人群也存在感染A(H5N1)禽流感病毒的潜在风险。

研究人群在活禽市场的平均工作年限为7.7年(95%CI:7.1–8.2), 最短为6个月, 最长为36年。其中一些PMWs可能未曾暴露于clade 1病毒。11人同时具

有clade 2.3.4和clade 2.3.2.1血清抗体,可能是由于交叉反应、共同感染或再感染所致,因为2010年同时存在clade 2.3.4和clade 2.3.2.1病毒的流行^[12]。

本研究发现,3个地理位置不同的研究地区的阳性率差异无统计学意义,表明这些地区的PMWs工作条件或职业习惯相似。本研究中河内PMWs的阳性率(7.2%)较2001年的研究结果(4.0%)有所上升,可能是由于2003年底以来越南出现A(H5N1)禽流感病毒的传播^[15]。本研究发现,活禽宰杀和销售人员较其他从业人员的阳性率高,这与中国、泰国和孟加拉国的研究一致,表明从事直接与活禽接触的工作人员有更多机会暴露于A(H5N1)禽流感病毒^[9,15]。2010年越南一项活禽市场调查发现,3.3%的家禽标本经RT-PCR检测为A(H5N1)禽流感病毒阳性(经与越南禽流感和人流感控制与准备项目的John Weaver沟通获得)。2006年越南北部一项对健康鸭子的调查发现,尽管在健康鸭子的咽拭子或泄殖腔拭子中未检出A(H5N1)禽流感病毒,但血清学检测发现这些健康鸭子已感染A(H5N1)禽流感病毒且未表现出任何异常症状^[11]。本研究在各年龄组PMWs中均发现具有A(H5N1)禽流感病毒抗体的从业人员,提示PMWs有必要采取佩戴个人防护装备、接种疫苗等预防措施。

本研究中对A(H5N1)禽流感病毒血清抗体阳性的判定标准在WHO判定标准的基础上进行了修改。WHO的判定标准是为了对疑似病例进行进一步确认,该标准对于血清学监测研究来说实用性和灵敏度不够,因为暴露于A(H5N1)禽流感病毒6–12个月后特异性抗体滴度就开始下降甚至会消失^[20]。本研究将HHI \geq 80及MN \geq 20作为血清抗体阳性的判定标准,因为成人的MN试验灵敏度下降,低于80%^[21],而参与本研究的PMWs年龄均大于18岁。有研究表明马红细胞HHI试验可靠性高,与MN试验有良好的一致性^[22]。本研究的判定标准可能会高估研究人群的血清抗体阳性率,应在尚未检出A(H5N1)禽流感病毒的地区选取对照人群开展血清学调查研究,对该标准进行验证。有必要进一步开展A(H5N1)禽流感病毒血清学调查适用标准的研究^[7]。

由于PMWs不一定能准确回忆很长时间的职业暴露情况,故本研究在职业暴露报告方面可能会存在一些分类错误。研究对象在暴露期内还可能从事多种禽类相关职业。本研究发现,越南北部6.1%的PMWs具有A(H5N1)禽流感病毒血清抗体,但这一结果并不能外推至越南所有PMWs。收集更多的流行病学信息(如个人防护装备、接触时间、流感疫苗接种史)或许会有帮助。如果纳入对照人群(与PMWs同在一个市场工作的蔬菜、水果、海鲜销售人员)或开展进一步的随访研究,研究结果将会更有说服力。

尽管存在以上局限性,本研究仍表明在越南北部的PMWs中有6.1%的从业人员具有A(H5N1)禽流感病毒特异性血清抗体。A(H5N1)禽流感病毒在越南持续存在并不断变异,需要在全国范围内开展全面的人间和禽间监测以及后续的PMWs研究,以评估越南禽类将A(H5N1)禽流感病毒传播给人的风险。

利益冲突

未申报。

基金

无。

致谢

感谢河内市、太平省、清化省预防医学中心。感谢越南卫生部越南禽流感和人流感控制与准备项目为本研究提供经费资助。

感谢越南疾病预防控制中心前任官员David Dennis对本稿件进行编辑。

引用本文地址:

Tham DC et al. Seroprevalence survey of avian influenza A(H5N1) virus among live poultry market workers in northern Viet Nam, 2011. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2014, 5(4):21–26. doi:10.5365/wpsar.2014.5.2.006

参考文献

1. Takakuwa H et al. Possible circulation of H5N1 avian influenza viruses in healthy ducks on farms in northern Vietnam. *Microbiology and Immunology*, 2010, 54:58–62. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00170.x pmid:20055944
2. Herfst S et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, 2012, 336:1534–1541. doi:10.1126/science.1213362 pmid:22723413
3. Viruses AI, World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11:1515–1521. doi:10.3201/eid1110.050644 pmid:16318689
4. Beigel JH et al. Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A(H5N1) infection in humans. *New England Journal of Medicine*, 2005, 353:1374–1385. doi:10.1056/NEJMra052211 pmid:16192482
5. Wan X et al. Evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in Viet Nam between 2001 and 2007. *PLoS ONE*, 2008, 3:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0003462
6. Dinh PN et al; World Health Organization/Global Outbreak Alert and Response Network Avian Influenza Investigation Team in

- Vietnam. Risk factors for human infection with avian influenza A(H5N1), Vietnam, 2004. [Internet]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12:1841–1847. doi:10.3201/eid1212.060829 pmid:17326934
7. Schultzs C et al. Prevalence of antibodies against avian influenza A (H5N1) virus among cullers and poultry workers in Ho Chi Minh City, 2005. *PLoS ONE*, 2009, 4:e7948. doi:10.1371/journal.pone.0007948 pmid:19956765
 8. Uyeki TM et al. Seroprevalence of antibodies to avian influenza A(H5) and A(H9) Viruses among Market Poultry Workers, Ha Noi, Viet Nam, 2001. *PLoS One*, 2012,7(8):e43948. doi:10.1371/journal.pone.0043948 pmid: 22928049
 9. Liem NT et al. Clinical features of human influenza A(H5N1) infection in Vietnam: 2004–2006. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48:1639–1646. doi:10.1086/599031 pmid:19435433
 10. Le MQ et al. Subclinical avian influenza A(H5N1) virus infection in human, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19:1674–1677. doi:10.3201/eid1910.130730 pmid:24047510
 11. Shinya K et al. Subclinical brain injury caused by H5N1 influenza virus infection. *Journal of Virology*, 2011, 85:5202–5207. doi:10.1128/JVI.00239-11 pmid:21389133
 12. *Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases*. Geneva, World Health Organization, 2007:1–28.
 13. Dejpichai R et al. Seroprevalence of antibodies to avian influenza virus A(H5N1) among residents of villages with human cases, Thailand, 2005. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15:756–760. doi:10.3201/eid1505.080316 pmid:19402962
 14. Takakuwa H et al. Molecular epidemiology of avian influenza viruses circulating among healthy poultry flocks in farms in northern Vietnam. *Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 103:192–200. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.09.014 pmid:21974815
 15. Le QM et al. Pathogenicity of highly pathogenic avian H5N1 influenza A viruses isolated from humans between 2003 and 2008 in northern Vietnam. *Journal of General Virology*, 2010, 91:2485–2490. doi:10.1099/vir.0.021659-0 pmid:20592108
 16. Muramoto Y et al. Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2006, 68:527–531. doi:10.1292/jvms.68.527 pmid:16757902
 17. Nguyen TD et al. Multiple sublineages of influenza A virus (H5N1), Vietnam, 2005–2007. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14:632–636. doi:10.3201/eid1404.071343 pmid:18394281
 18. Long NT et al. Recent avian influenza virus A/H5N1 evolution in vaccinated and unvaccinated poultry from farms in Southern Viet Nam, January-March 2010. *Transbound Emerging Diseases*, 2011, 58:537–543. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01229.x
 19. Van NT et al. *The H5N1 vaccination trial in Viet Nam – Phase 3, 2011 – 2013 [unpublished]*.
 20. Rowe T et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37:937–943. pmid:10074505
 21. Kayali G et al. Testing human sera for antibodies against avian influenza viruses: horse RBC hemagglutination inhibition vs. microneutralization assays. *Journal of Clinical Virology*, 2008, 43:73–78. doi:10.1016/j.jcv.2008.04.013 pmid:18571465