

Anna Baumann-Popczyk

**Badanie częstości występowania zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu E
w populacji polskich myśliwych oraz analiza czynników sprzyjających nabyciu
zakażenia tym wirusem**

Praca na stopień doktora nauk o zdrowiu w zakresie epidemiologia
wykonana w Zakładzie Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Zieliński

Promotor pomocniczy: dr n med. Małgorzata Sadkowska-Todys

Warszawa 2016

Słowa kluczowe: wirus zapalenia wątroby typu E, epidemiologia, badanie przekrojowe, prevalence ratio, myśliwi.

Wstęp

Wirusowe zapalenie wątroby typu E w ostatnich latach jest w Europie uważane za nowopojawiającą się chorobę a przez niektórych badaczy nawet za nowo-powracającą. Poświęca się mu coraz więcej uwagi, w szczególności zagadnieniom związanym z występowaniem i rozpowszechnieniem zakażeń tym wirusem. Pomimo, że początkowo uważano, że zakażenia wirusem HEV nie mają większych implikacji dla zdrowia publicznego to obecnie coraz więcej danych wskazuje, że w niedalekiej przyszłości może się on stać dość istotnym problemem zdrowotnym.

W związku z coraz częstym i narastającym rozpowszechnieniem HEV zarówno w populacji ludzi jak i zwierząt oraz coraz liczniejszymi doniesieniami o negatywnych skutkach zdrowotnych będących następstwem zakażeń, znaczenia nabiera konieczność

przynajmniej wstępnego poznania sytuacji epidemiologicznej zakażeń tym wirusem w Polsce.

Sytuacja epidemiologiczna wirusowego zapalenia wątroby typu E w Polsce jest słabo poznana. Przyczyną tego może być: brak rutynowo dostępnej diagnostyki w kierunku HEV, niska świadomość problemu wśród lekarzy oraz często niespecyficzny lub bezobjawowy przebieg zakażenia.

Rezerwuarem wirusa HEV są dziki, świnie, jelenie, sarny oraz człowiek. Myśliwi, jako osoby mające najczęstszy kontakt bezpośredni z zwierzętami dzikimi stanowią grupę potencjalnie narażoną na zakażenie, którego źródłem są te zwierzęta. Poza tym wśród myśliwych wg. danych Polskiego Związku Łowieckiego 10%, to osoby zawodowo związane z rolnictwem, w tym hodowlą trzody chlewnej, co dodatkowo zwiększa ryzyko zakażenia w tej grupie. Jest to pierwsze w Polsce badanie na tak dużą skalę nad występowaniem i rozpowszechnieniem zakażeń wirusem HEV.

Cel pracy:

1. Oszacowanie rozpowszechnienia markerów zakażenia HEV w populacji polskich myśliwych.
2. Określenie czynników związanych z rozpowszechnieniem przeciwciał anti-HEV IgG w badanej grupie.

Materiały i metody:

Badanie zostało zaplanowane i zrealizowane jako badanie przekrojowe i było częścią większego projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Nr N N404 520038): „Badania rozpowszechnienia wybranych czynników zoonotycznych: *Echinococcus multilocularis*, *Trichinella spiralis* oraz wirusa zapalenia wątroby typu E (HEV) w populacji polskich myśliwych”. Próbkę do badania były gromadzone od października 2010 do lipca 2012. W oznaczeniach serologicznych wykorzystano dwa komercyjne testy immunoenzymatyczne ELISA RecomWell HEV IgM oraz IgG firmy Mikrogen. Każdą próbkę dodatnią w teście ELISA w kierunku anti-HEV IgM, badano ponownie testem potwierdzenia immunoblot recomLine HEV IgM/ IgG firmy Mikrogen. Wszystkie próbki, które uzyskały wynik dodatni w teście immunoblot zostały przebadane na obecność HEV-

RNA. Reakcję Real-Time PCR przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu ampliCube HEV 2.0 firmy Mikrogen.

Wyniki:

1. W badaniu wzięło udział 1021 myśliwych, co stanowi 0,9 % tej populacji w Polsce. Rozkłady podstawowych cech takich jak płeć, wiek oraz długość stażu łowieckiego w badanej grupie były takie same lub bardzo zbliżone jak w populacji ogólnej myśliwych.
2. Obecność przeciwciał przeciwko swoistym antygenom wirusa HEV testem immunoblot potwierdzono u 5 osób. Stanowi to 0,5% ogółu badanych. U trzech osób poza przeciwciałami anti-HEV IgM stwierdzono obecność przeciwciał anti-HEV IgG. Natomiast przeciwciała anti-HEV IgG stwierdzono u 227 (22,2%) badanych (95% CI: 19,72 – 24,91).
3. Z surowicy osób, u których potwierdzono obecność przeciwciał anti-HEV IgM nie wyizolowano RNA HEV.
4. Stwierdzono istotną różnicę w występowaniu przeciwciał anti-HEV IgG w badanej grupie w zależności od województwa zamieszkania oraz województwa wykonywania polowania. Najwyższe wartości obserwowano wśród badanych mieszkających na terenie województw opolskiego (42,4%), wielkopolskiego (30,5%) oraz pomorskiego (31,9%). Natomiast najniższe rozpowszechnienie przeciwciał anti-HEV IgG było u osób mieszkających w województwie kujawsko-pomorskim (10%) oraz łódzkim (11,2%), świętokrzyskim (13,9%).
5. Analiza metodą regresji wieloczynnikowej wykazała, że rozpowszechnienie przeciwciał anti-HEV IgG jest związane z grupą wieku. Osoby powyżej 65 r.ż miały istotnie statystycznie wyższe rozpowszechnienie przeciwciał anti-HEV IgG niż osoby w młodszych grupach wieku (aPR 1,6; 95% CI 1,03 – 2,49). Częstość występowania przeciwciał była wyższa o 40% u myśliwych mieszkających w domach, niż w mieszkaniach w bloku (aPR 1,4; 95% CI 1,09 – 2,01). Osoby badane, które deklarowały bezpośredni kontakt ze zwierzętami gospodarskim, głównie z trzodą chlewną, posiadały o 40% częściej przeciwciała przeciwko HEV aniżeli osoby, które takiego kontaktu nie miały (aPR 1,41; 95% CI 1,09 – 1,83). Ponadto mycie rąk przez myśliwego bezpośrednio po zakończeniu patroszenia pozyskanej zwierzyny istotnie zmniejszało rozpowszechnienie przeciwciał specyficznych przeciwko HEV w tej grupie (aPR 0,53; 95% CI 0,37 – 0,74). Wykazano, że również osoby badane, które

oceniły w skali pięciostopniowej średnio roczne pozyskanie na 3, w porównaniu do grupy referencyjnej miały wyższy odsetek przeciwciał. Wykazano, że spożywanie podrobów np. wątróbki poddanych duszeniu jest istotnie związane z wyższą częstością przeciwciał w badanej grupie (1,61; 95% CI 1,27 – 2,03).

6. Wyniki analizy dla myśliwych będących mieszkańcami miast wykazały, że rozpowszechnienie przeciwciał anti-HEV IgG jest w tym przypadku związane z grupą wieku. Osoby w wieku od 35 do 49 oraz od 50 do 64 w porównaniu do grupy referencyjnej >34 lat, miały istotnie statystycznie niższą częstość przeciwciał (odpowiednio aPR 0,52; 95% CI: 0,31 - 0,86; aPR 0,66; 95% CI 0,42 – 1,02). Osoby badane mieszkające w domu miały o 68% wyższy odsetek przeciwciał w porównaniu do osób mieszkających w mieszkaniu w bloku (aPR 1,68; 95% CI 1,22 – 2,31). Osoby badane mieszkające w mieście wyjeżdżające na polowania zagraniczne miały istotnie niższy odsetek rozpowszechnienia przeciwciał (aPR 0,54; 95% CI 0,3 – 0,95). Wykazano również, że rozpowszechnienie przeciwciał jest zależne od pozyskiwania dzika. W grupie badanych, którzy posiadali kota stwierdzono niższe rozpowszechnienie przeciwciał, w porównaniu do tych którzy go nie mieli (aPR 0,58; 95% CI 0,34 – 0,99).
7. W analizie wieloczynnikowej, która dotyczyła badanych mieszkających na wsi wykazano, że osoby deklarujące bezpośredni kontakt ze zwierzętami gospodarskim, posiadali o 66% częściej przeciwciała przeciwko HEV w porównaniu do myśliwych, którzy takiego kontaktu nie mieli (aPR 1,66; 95% CI 1,12 – 2,46). Poza tym, osoby badane, które przygotowywały i spożywały podroby duszone miały istotnie wyższą częstość przeciwciał (aPR 1,81; 95% CI 1,29 – 2,53). W analizie jednoczynnikowej wykazano, że bycie rolnikiem może mieć istotny wpływ na wyższą częstość przeciwciał. Natomiast w analizie wieloczynnikowej nie potwierdzono tego wyniku (PR 1,68; 95% CI 1,12 – 2,52 vs. aPR 1,24; 95% CI 0,77 – 1,98).
8. Wykazano statystycznie istotną korelację pomiędzy średnim zagęszczeniem populacji dzika a rozpowszechnieniem przeciwciał anti-HEV IgG w poszczególnych województwach, na terenie których badani myśliwi wykonywali polowanie.

Wnioski:

1. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że rozpowszechnienie przeciwciał anti-HEV IgG wśród myśliwych w Polsce jest porównywalne do

notowanego w tej grupie, w nielicznych krajach, które takie badania prowadziły (za wyjątkiem Estonii).

2. Na podstawie uzyskanych wyników, można stwierdzić, że w Polsce istnieje konieczność podjęcia szeroko zakrojonych badań związanych z poznaniem rzeczywistego rozpowszechnienia zakażeń HEV w populacji ogólnej.
3. Wyniki niniejszej pracy potwierdziły wyniki wcześniejszych badań, że najważniejsze czynniki wpływające na rozpowszechnienie przeciwciał anti-HEV IgG to: wiek, bezpośredni kontakt ze zwierzętami gospodarskim, spożywanie podrobów.
4. Przeprowadzona analiza, pomimo, że nie wyklucza łowiectwa jako czynnika sprzyjającego nabywaniu zakażenia wirusem HEV, to wskazuje, że przy obecności innych, bardziej istotnych czynników ryzyka nabycia tego zakażenia (np. bezpośredni kontakt ze zwierzętami gospodarskim, wykonywanie prac rolniczych), ma ono znacznie mniejsze znaczenie. Wykazano, że łowiectwo ma wpływ na nabywanie zakażenia przez badaną grupę osób, a dotyczy to przede wszystkim mieszkańców miast.
5. Wykazano, że w przypadku czynników związanych z polowaniem, niższe rozpowszechnienie przeciwciał występuje w grupie osób myjącej ręce bezpośrednio po patroszeniu pozyskanej zwierzyny. Dlatego należy podjąć działania informacyjne wśród myśliwych i propagować wiedzę odnośnie zagrożeń związanych z zakażeniami HEV oraz metod prewencji nakierunkowanych na przestrzeganie zasad higieny np. podczas patroszenia pozyskanej zwierzyny.

ABSTRACT

Key words: hepatitis E virus, epidemiology, cross-sectional study, prevalence ratio, hunter.

Study on the prevalence of hepatitis E infections among Polish hunters and the analysis of factors contributing to HEV infections

Background

In the last few years HEV infections have been considered as an emerging or, by some researches, as a re-emerging diseases. The virus attracts increasing attention, especially issues related to the occurrence and prevalence of infection with HEV. Despite the fact that it was initially believed that HEV infections have no serious implications for public health, currently there is more and more data indicating that in the near future it can become a rather important health problem.

Due to more frequent and increasing prevalence of HEV both among people and animals as well as a higher number of reports on negative health consequences of being infected, the need to investigate the epidemiological situation connected with the virus in Poland becomes a necessity.

As far as HEV infections are concerned, the epidemiological situation is not very well recognised in Poland. This may result from the lack of common HEV diagnostics, low awareness of the problem among doctors and the infection itself, which is often nonspecific or asymptomatic.

The sources of HEV infections include boars, pigs, deer and humans. Hunters, having the most frequent and direct contact with wild animals, are potentially exposed to being infected by the virus carried by these animals. Moreover, according to data of the Polish Hunting Association, 10% of hunters are professionally connected with agriculture, including pig farming, which additionally increases the risk of being infected. This is the first study on the occurrence and prevalence of HEV infections conducted on such a scale in Poland.

The objective of the thesis:

1. Estimate the prevalence of HEV infection markers in the population of Polish hunters.
2. Identify the factors related to the prevalence of anti-HEV IgG antibodies in the studied group.

Materials and methods:

Cross-sectional study was carried out. It was a part of a bigger project financed by the Ministry of Science and Higher Education (N N404 520038) entitled "Occurrence and prevalence of selected zoonotic agents: *Echinococcus multilocularis*, *Trichinella spiralis* and hepatitis E virus (HEV) in the population of Polish hunters". The study samples were collected between October 2010 and July 2012.

For the serologic markers two commercial immunoenzymatic tests were used: ELISA RecombiWell HEV IgM and IgG by Mikrogen. Moreover, every anti-HEV IgM antibodies positive sample in the ELISA test was confirmed with the recomLine HEV IgM/ IgG immunoblot test (Mikrogen). All positive samples in the immunoblot test were tested for the presence of HEV RNA. The Real-Time PCR reaction was performed using the commercial ampliCube HEV 2.0 set by Mikrogen.

Results:

1. The study was conducted among 1,021 hunters, which is 0.9% of the whole hunters' population in Poland. The basic characteristics, such as gender, age or experience in hunting, in the studied group were the same or very similar to those in the general hunters' population.
2. The immunoblot test confirmed the presence of antibodies against specific HEV antigens in 5 people. This is 0.5% of all studied hunters. Apart from anti-HEV IgM antibodies, anti-HEV IgG antibodies were also identified in 3 cases. Anti-HEV IgG antibodies were identified in 227 people, meaning 22.2% of the studied group (95% CI: 19.72 - 24.91).
3. HEV RNA was not isolated from the serum of people with confirmed anti-HEV IgM antibodies.
4. A significant difference in the number of cases with anti-HEV IgG antibodies in the studied group depending on the voivodeship was observed. The highest values were noted among the hunters who lived in opolskie (42.4%), wielkopolskie (30.5%) and pomorskie (31.9%). The lowest prevalence of anti-HEV IgG antibodies was recorded

among people living in kujawsko-pomorskie (10%), łódzkie (11.2%) and świętokrzyskie (13.9%).

5. The multivariable regression analysis proved that the prevalence of anti-HEV IgG antibodies is connected with age. People above 65 years old had significantly higher prevalence of anti-HEV IgG antibodies than younger people (aPR 1.6; 95% CI 1.03 – 2.49). The incidence of antibodies was 40% higher among hunters living in a house than those living in a flat (aPR 1.4; 95% CI 1.09 – 2.01). Those who declared direct contact with farm animals, mainly pigs, had anti-HEV antibodies 40% more often than those who did not have such contact (aPR 1.41; 95% CI 1.09 – 1.83). Moreover, the fact that hunters washed their hands immediately after eviscerate of animals had a significant impact on decreased prevalence of anti-HEV antibodies in this group (aPR 0.53; 95% CI 0.37 – 0.74). It was also found that compared to the reference group the studied hunters who declared average annual hunting three (on a five-point scale) indicated a higher percentage of antibodies. It was also proven that consuming stewed offal, for example liver, is strongly connected with a higher incidence of antibodies in the studied group (1.61; 95% CI 1.27 – 2.03).
6. The results of the analysis of hunters living in cities indicated that in this case the prevalence of anti-HEV IgG antibodies linked to age. Compared to the reference group below 34 years old, people between 35 and 49 years old as well as between 50 and 64 years old had a significantly lower frequency of antibodies (aPR 0.52; 95% CI: 0.31 – 0.86; aPR 0.66; 95% CI 0.42 – 1.02). People living in a house had 68% more antibodies than those living in a flat (aPR 1.68; 95% CI 1.22 – 2.31). Hunters living in a city who hunting abroad had a significantly lower percentage of antibodies prevalence (aPR 0.54; 95% CI 0.3 – 0.95). It was also proven that the prevalence of antibodies depends on preferences hunting for a wild boar. People from the studied group who had a cat had a lower seroprevalence compared to those who did not have a cat (aPR 0.58; 95% CI 0.34 – 0.99).
7. The multivariable analysis of people living in the countryside indicated that people who declared direct contact with farm animals had anti-HEV antibodies 66% more often than those hunters who did not have such contact (aPR 1.66; 95% CI 1.12 – 2.46). Moreover, people who prepared and consumed stewed offal proved a significantly higher prevalence of antibodies (aPR 1.81; 95% CI 1.29 – 2.53). Univariable analysis indicated that being a farmer may have a significant impact on the prevalence of antibodies. The multivariable

analysis did not confirm this result though (PR 1.68; 95% CI 1.12 – 2.52 vs. aPR 1.24; 95% CI 0.77 – 1.98).

8. Statistically significant correlation between the average density of wild boar population and the prevalence of anti-HEV IgG antibodies in different voivodeships was indicated.

Conclusions:

1. The results presented in this thesis indicate that the prevalence of antibodies in the studied population of hunters is comparable to that observed in this group in other countries, except for Estonia.
2. Due to high level of HEV infections it is recommended to conduct a large-scale study in the general population and/or selected risk groups in order to estimate the actual size of the problem.
3. The results of this thesis indicated that in Poland, similarly to other European countries, age and direct contact with farm animals are the most important factors of the prevalence of anti-HEV IgG antibodies.
4. The conducted analyses, although they do not exclude hunting as a factor conducive to being infected with HEV, indicate that, together with other, more important risk factors contributing to HEV infections (such as direct contact with farm animals or doing farm works), it has a significantly smaller importance. However, hunting seems to have an impact on some groups of people becoming infected. This refers mainly to city residents, especially those living in flats.
5. It was indicated that lower prevalence of antibodies were among people washing hands immediately after evisceration. Therefore, an information campaign should be organised among hunters and the knowledge about risks connected with HEV infections as well as proper prevention measures, including washing hands, using individual protective measures, such as wearing gloves while evisceration.
6. The future study should consider the results of this thesis in order to design the study as well as the questionnaire in such a way that its precision and number of questions enable to prove the potential significance of correlations or factors proven by the study.