

Hepadnavirusowe zapalenie wątroby kotów domowych – nowa zagrażająca choroba

Zdzisław Gliński, Andrzej Żmuda

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Hepadnavirus hepatitis in domestic cats – the emerging disease

Gliński Z., Żmuda A. Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

We aim at the presentation of a newly emerging domestic cat hepadnavirus (DCH), the causative agent of chronic hepatitis, hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma, which was recently identified in several countries. The first report is from 2018 and describes DCH isolation from immunocompromised cat. DCH is a partially double stranded, circular, small DNA virus belonging to the *Orthohepadnavirus* genus, *Hepadnaviridae* family. It has a genome of approximately 3.2 kb of compact DNA, which encodes in four overlapping open reading frames (ORFs), for the polymerase (L), surface (S), core (C), and X proteins, similarly to other hepadnaviruses. Transmission is likely direct, but indirect iatrogenic infection via blood transfusion is also possible. DCH infection is more frequent in feline leukemia (FeLV) or feline immunodeficiency virus (FIV) infected pet cats. In addition to the hepadnavirus viremia and liver pathologies, positive-DCH immunoreactivity was found in various other organs, including kidneys, lungs, heart, intestine, brain, and lymph nodes, providing evidence of systemic inflammatory disease. Only a small proportion of cats with biochemical alterations indicating liver disease were DCH positive. The testing for DCH is based on histopathological analysis of liver biopsies, and blood or hepatic tissue PCR screening. The control consists of limiting iatrogenic and nosocomial virus transmission. No specific vaccine exists for DCH.

Keywords: domestic cat hepadnavirus, emerging feline hepatitis.

Wirusy hepatotropowe zakażają wiele gatunków ssaków, gadów, płazów, ryby i ptaków (1). U ludzi wywołują groźne zapalenia wątroby typów od A do E (2). Wynikiem zakażenia u człowieka może być ostre zapalenie wątroby lub prawie bezobjawowy stan przewlekły oraz marskość wątroby. Innym groźnym następstwem zakażenia jest rak wątroby. Wśród wirusów hepatotropowych przedstawiciele z rodzaju *Orthohepadnavirus* (*Hepadnaviridae*) zakażają ssaki naczelne, koty, nietoperze i gryzonie. U ludzi zakażonych wirusem zapalenia wątroby B uszkodzenie wątroby może prowadzić do marskości narządu i raka wątrobowokomórkowego (*hepatocellular carcinoma*; 3).

W 2018 r. opisano w Australii pierwszy przypadek choroby spowodowanej zakażeniem kota domowego przez nowy gatunek hepadnavirusa. Od 7-letniego kota kastrata z postępującą utratą masy ciała, wymiotami, zdiagnozowanym chłoniakiem z komórek B i dodatnim wynikiem testu PCR w kierunku zakażenia wirusem niedoboru immunologicznego kotów (FIV) wyizolowano wirus, który otrzymał nazwę hepadnavirus kotów domowych (DCH, domestic cat hepadnavirus). Cechował się on 73–94%

identycznością aminokwasów z białkiem rdzenia, białkami powierzchniowymi i polimerazą znanych hepadnavirusów, ale wykazywał odrębność genetyczną i filogenetyczną od znanych przedstawicieli *Orthohepadnavirusów* (4). Obecność DCH stwierdzono testem PCR we krwi 10% FIV-pozytywnych kotów i 3,2% kotów FIV-negatywnych. Zakażenie DCH zidentyfikowano w 10,8% surowic kotów we Włoszech. Zakażeniu towarzyszyło przewlekłe zapalenie wątroby i rak wątrobowokomórkowy (5). DCH stwierdzono także u kotów w Tajlandii (6), Wielkiej Brytanii, Malezji (7) i Japonii. Analiza filogenetyczna białka X DCH (Japan/KT116/2021) izolowanego w Japonii wykazała odrębność tego szczepu od izolowanych w innych krajach (8).

Charakterystyka wirusa DCH

Hepadnavirus kotów domowych jest osłonkowym wirusem o wirionie kształtu dwudziestościanu (42–50 nm) z częściowo dwupasmowym genomem zbudowanym z kolistego DNA (~3,200 zasad). Genom koduje polimerazę P (837 aminokwasów), białko powierzchniowe S (381 aminokwasów), białko rdzenia C (218 aminokwasów) i białko X (145 aminokwasów) (1). Polimeraza P jest enzymem z funkcją primingu białek i syntezy DNA-zależnej, zarówno od RNA, jak i DNA oraz o aktywności rybonukleazy H (9). Białko o trzech domenach (LHD – duża, MHB – średnia i SHB – mała) odgrywa istotną rolę w przyłączaniu wirusa i odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu (10). Białko C wchodzi w skład kapsydów wirusa i może wpływać modulująco na epigenetykę gospodarzy (11). Białko X pełni wiele funkcji regulatorowych, m.in. wpływa na szlaki degradacji białek, apoptozę, transkrypcję, transdukcję sygnałów, cykl rozwoju komórkowego i stabilność genetyczną wirusa (12). U wirusa zakaźnego zapalenia wątroby B (HBV) białko X wpływa na wygaszanie odpowiedzi przeciwwirusowej organizmu gospodarza i pobudza transkrypcję wirusa (13). Wirusy DCH występują w klastrze hepadnavirusów ssaków, a w ich drzewach filogenetycznym wyróżnia się trzy klady (grupa A, B i C).

Wirus cechuje się tropizmem do wielu narządów. Poza hepatocytami występuje w pełnej krwi i w surowicy (6), zakaża wiele narządów, a mianowicie serce, płuca, jelita, nerki i śledzionę (14). Liczba kopii genomu wirusa/g tkanki zależy od zakażonego narządu i wynosi dla wątroby $1,23 \times 10^4$ – $1,28 \times 10^8$, serca $2,42 \times 10^1$ – $1,59 \times 10^5$, płuc $0,18 \times 10^1$ – $9,30 \times 10^7$, jelit $2,41 \times 10^7$ – $1,82 \times 10^9$, nerek $1,54 \times 10^3$ – $1,39 \times 10^5$, pęcherza moczowego <1 i śledziony $2,63 \times 10^7$ – $1,49 \times 10^8$.

Wirus drogą hematogenną osiąga wątrobę gdzie intensywnie się replikuje. Namnożone i uwalniane z hepatocytów wirusy zakażają inne narządy. Liczne wiriony DCH i antygen DCH występują w jądrze i cytoplazmie zakażonych hepatocytów i niekiedy w komórkach przewodów żółciowych, pojedyncze wiriony stwierdza się w błonie jądra komórkowego. Wiriony DCH występują także w cytoplazmie fibroblastów, prawdopodobnie w nich się replikują, podobnie jak i inne hepadnawirusy (15). Wirus ulega inaktywacji w 60°C, po wpływie 80% etanolu w 11°C po 2 min, 70% po 2 min, 0,01% kwasu nadcotowego, 2% aldehydu glutarowego w temperaturze pokojowej po 5 min, i w 98°C po 2 min, 2% formaldehydu po 2–30 min.

Czynniki ryzyka

Najważniejszym czynnikiem ryzyka w hepadnawirusowym zapaleniu wątroby kotów jest immunosupresja, w której kluczowe znaczenie odgrywa zakażenie wirusem niedoboru immunologicznego kotów (FIV, feline immunodeficiency virus). Przemawiają za tym badania Aghazadeh i wsp. (4), którzy wykryli wirus DCH u kota z chłoniakiem oraz zwrócili uwagę na współistnienie zakażenia wirusem DCH i FIV. Testem PCR stwierdzono zakażenie 6 (10%) z 60 kotów zakażonych FIV i tylko 2 (3,2%) z 63 kotów wolnych od FIV było zakażone wirusem DCH. Wysoki odsetek kotów z wiremią spowodowaną przez hepadnawirus kotów u kotów FIV-pozytywnych przypomina sytuację obserwowaną u ludzi zakażonych wirusem niedoboru immunologicznego i współzakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B (4). Testem PCR stwierdzono obecność wirusa DCH w surowicach 12,4% kotów domowych i w wątrobie 20% sekcjonowanych kotów chorych na zapalenie wątroby, przy czym w populacji kotów seropozytywnych duży odsetek zwierząt była zakażona wirusem niedoboru immunologicznego kotów. Aż 15 (57,7%) kotów DCH-seropozytywnych była zakażona przez FIV, 3 (11,5%) DCH-pozytywnych kotów było zakażone wirusem białaczki kotów (FeLV) oraz 3,8% kotów seropozytywnych w kierunku DCH była seropozytywna w kierunku FIV i FeLV w testach PCR (6). Różnice w współzakażeniu wirusem DCH i retrowirusami są istotne statystycznie ($p = 0,017$), a w przypadku zakażenia FIV wykazują najwyższą wartość ($p < 0,00001$). Badania przeprowadzone w szpitalach zwierząt potwierdzają także współistnienie zakażenia DCHV i wirusami immunosupresyjnymi. W badaniach przeprowadzonych w Australii w 2018 r. częstość zakażenia DCHV wynosiła 6,5%, rozpoznano chłoniaki i współzakażenie FIV, we Włoszech w 2019 r. częstość zakażenia DCHV wynosiła 10,8%, rozpoznano wiremiię i współzakażenie FIV lub FeLV, w Tajlandii w 2020 r. częstość zakażenia DCHV wyniosła 12,4%, rozpoznano wiremiię i współzakażenie FIV lub FeLV, zaś w Malezji w 2021 r., częstość zakażenia DCHV wyniosła 14,9%, stwierdzono podwyższoną aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i występowało współzakażenie FeLV (6). Wiek i płeć kotów nie wpływa na częstość zakażenia wirusem DCH.

Nie udało się ustalenie wrót i dróg zakażenia. Nie wykryto wirusa DCH w wymazach z jamy ustnej, spojówek, napletka i odbytnicy dwóch kotów zakażonych na drodze naturalnej (16). Wirus DCH występuje w dużych ilościach we krwi, w cytoplazmie komórek nabłonka krypt jelitowych i w komórkach nabłonka blaszki właściwej kosmków jelitowych. Wiremiię stwierdzono u 6,5–10,8% kotów (5, 17). Przypuszcza się, że zakażenie przenosi się za pośrednictwem krwi w okresie wiremii (zadrapania, walka, krwawe zabiegi, transfuzja krwi). Być może pewną rolę w transmisji zakażenia podgrywiają kontakty bezpośrednie oraz droga pokarmowa.

Objawy kliniczne oraz zmiany anatomopatologiczne

Oprócz jawnej postaci choroby, jaką jest przewlekłe zapalenie wątroby lub rak wątrobowokomórkowy, występują zakażenia bezobjawowe. Procesowi patologicznemu w wątrobie nie zawsze towarzyszą zmiany w aktywności enzymów wątrobowych (17, 18). U około 50% kotów zakażonych wirusem DCH wzrosła aktywność ALT, transaminazy asparaginianowej (AST), fosfatazy zasadowej (ALP), glutamylotransferazy (GGT) oraz poziom bilirubiny. Zmiany były skorelowane ze stopniem uszkodzenia wątroby (5). Również Anpuanandam i wsp. (7) stwierdzili u około 50% kotów zakażonych wirusem DCH zwiększoną aktywność ALT, natomiast prawdopodobieństwo zakażenia i wiremii istnieje u 21% u kotów z aktywnością tego enzymu poniżej wartości prawidłowej.

Zmiany patologiczne dotyczą wielu narządów. Stwierdza się zapalenie wątroby, zwłóknienie wątroby z naciekiem limfocytarnym sinusoidów o różnym nasileniu i zapalenie kłębuszków nerkowych. Kanałki nerkowe były zwłókniałe i wypełnione makrofagami z agregatami hemosyderyny, korę nerek naciekały limfocyty i komórki plazmatyczne. Ponadto występuje limfocytarno-plazmocytarne zapalenie jelit, histiocytarne zapalenie węzłów chłonnych, odoskrzelowo-śródmiąższowe zapalenie płuc i wielogniskowa martwica mięśnia sercowego. Immunoreaktywność na wirus DCH występuje także w nerkach, płucach, sercu, jelitach, mózgu i węzłach chłonnych. Wiriony DCHV zidentyfikowano w jądrze i cytoplazmie hepatocytów, komórkach nabłonka oskrzeli i w fibroblastach (6).

Rozpoznanie i postępowanie

Rozpoznanie hepadnawirozy jest możliwe na podstawie stwierdzenia obecności kopii wirusa DCH we krwi oraz w punktatach wątroby kotów podejrzanych o chorobę lub chorych w teście PCR oraz w oparciu o badanie histopatologiczne punktatów wątroby (8). Tylko w około 50% przypadków zakażeniu towarzyszy wzrost aktywności enzymów wątrobowych. Według Scavone i wsp. (19) odsetek kotów zakażonych, u których aktywność ALT lub ALT i ALP we krwi jest znacznie podwyższona, wynosi tylko 6,8% (19). Punktaty wątroby, a nie krew, są preferowane jako materiał diagnostyczny ponieważ rzadziej stwierdza się

materiał genetyczny wirusa DCH we krwi, a jest on obecny w wątrobie, która jest narządem docelowym wirusa (7).

Zapobieganie chorobie polega na izolacji zwierząt chorych i podejrzanych o zakażenie. Siewstwo wirusa utrzymuje się prawdopodobnie przez kilka tygodni. W leczeniu jest zalecany interferon- α (INF- α) stosowany u ludzi w terapii zakaźnego zapalenia wątroby typu B. Obecnie dostępny jest rekombinant interferonu kociego omega (Virbagen Omega, Virbac). Nie ma danych o jego skuteczności w DCH. U ludzi w terapii hepadnawirusowej stosuje się fosfony nukleozydów (tenofovir), u kotów z FIV jego analog (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurine ([R]-PMPDAP). Brak danych o stosowaniu tych leków u kotów z DCH. Brakuje szczepionki. Nie badano możliwości stosowania u kotów szczepionek przeciwko zapaleniu wątroby typu B człowieka. Filogenetycznie wirusy DCH i zakaźnego zapalenia wątroby typu B są blisko spokrewnione (2).

Przy braku danych o zakażeniach doświadczalnych zdrowych kotów wirusem DCH mogą rodzić się pewne wątpliwości co do roli wirusa DCH w etiologii zapalenia wątroby i raka tego narządu. Za udziałem hepadnawirusa kotów domowych w tych procesach chorobowych przemawia m.in. obecność DNA wirusa potwierdzona testem qPCR, jak i ekspresją HBCAg i badaniem immunohistochemicznym. Wirus występuje w wątrobie 43% kotów z przewlekłym zapaleniem wątroby i u 28% kotów z nowotworem wątroby. Natomiast jest on z reguły nieobecny w przewodach żółciowych i zdrowych wątrobach. Lokalizację wirusa potwierdzono hybrydyzacja *in situ* w zapalnie zmienionych odcinkach wątroby i w nowotworach tego narządu (19). Ponadto występuje korelacja pomiędzy zakażeniem kotów wirusem DCH i uszkodzeniem wątroby. Według Lanave i wsp. (5) przy średniej ilości wirusa we krwi $1,3 \times 10^6$ kopii genomu/ml i średniej mediany $2,1 \times 10^4$ kopii genomu/ml u 50% kotów parametry hematologiczne i chemiczne świadczą o uszkodzeniu wątroby. U 7 z 10 kotów z podejrzeniem zapalenia wątroby krew zawierała ponad 10^4 kopii genomu wirusa DCH/ml, tj. powyżej progu uznawanego za zagrożenie zapaleniem i uszkodzeniem wątroby przez wirus HBV. Stwierdzano też zakażenie u kotów z prawidłowymi wartościami parametrów określających czynność wątroby. Taką sytuację spotyka się u ludzi z przewlekłą postacią wirusowego zapalenia wątroby typu B w fazie kontrolowanej immunologicznie (immune-control phase), gdy występują antygeny HBV w surowicy przy normalnej aktywności ALT i niskim poziomie wiremii HBV-DNA (20).

Piśmiennictwo

- Magnius L., Masom W.S., Taylor J., Kann M., Glebe D., Dény P., Sureau C., Norder H.: ICTV virus taxonomy profile: Hepadnaviridae. *J. Gen. Virol.* 2020, **101**, 571–572.
- Capozza P., Decaro N.: Emerging hepatotropic viruses in cats: A brief review. *Viruses* 2021, **13**, 1162. Doi: 10.3390/v130611.
- Liang T.J.: Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009, **49**, 13–21.
- Aghazadeh M., Shi M., Barrs V.R., McLuckie A. J., Lindsay S. A., Jameson B., Hampson B., Holmes E. C., Beatty J. A.: A novel hepadnavirus

identified in an immunocompromised domestic cat in Australia. *Viruses* 2018, **10**. Doi: 10.3390/v10050269.

- Lanave G., Capozza P., Diakoudi G., Catella C., Catucci L., Ghergo P., Stasi F., Barrs V., Beatty J., Decaro N., Buonavoglia C., Martella V., Camero M.: Identification of hepadnavirus in the sera of cats. *Sci. Rep.* 2019, **9**, 10668.
- Piewbang C., Wardhani S. W., Chaiyasak S., Yostawonkul J., Chai-In P., Boonrungsiman S., Kasantikul T., Techangamsuwan S.: Insights into the genetic diversity, recombination, and systemic infections with evidence of intracellular maturation of hepadnavirus in cats. *PLoS One* 2020, **15**, e0241212.
- Anpuanandam K., Selvarajah G. T., Choy M. M. K., Ng S. W., Kumar K., Ali R. M., Rajendran S. K., Ho K. L., Tan W. S.: Molecular detection and characterization of domestic cat hepadnavirus (DCH) from blood and liver tissues of cats in Malaysia. *BMC Vet. Res.* 2021, **17**, 9.
- Takahashi K., Kaneko Y., Shibana A., Yamamoto S., Katagiri A., Osuga T., Inoue Y., Kuroda K., Tanabe M., Okabayashi T., Naganobu K., Minobe I., Saito A.: Identification of domestic cat hepadnavirus from a cat blood sample in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2022, **84**, 648–652.
- Clark D. N., Tajwar R., Hu, J., Tavis J. E.: The hepatitis B virus polymerase. *Enzyme* 2021, **50**, 195–226.
- Churin Y., Roderfeld M., Roeb E.: Hepatitis B virus large surface protein: function and fame. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2015, **4**, 1–10.
- Zlotnick A., Venkatakrishnan B., Tan Z., Lewellyn, E., Turner W., Francis S.: Core protein: a pleiotropic keystone in the HBV life cycle. *Antiviral Res.* 2015, **121**, 82–93.
- van Hemert F. J., van de Klundert M. A. A., Lukashov V. V., Kootstra N. A., Berkhout B., Zaaijer H. L.: Protein X of hepatitis B virus: origin and structure similarity with the central domain of DNA glycosylase. *PLoS One* 2011, **6**:e23392.
- Aufiero B., Schneider R.J.: The hepatitis B virus trans activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J.* 1990, **9**, 497–504.
- Shofa M., Kaneko Y., Takahashi K., Okabayashi T., Saito A.: Global prevalence of domestic cat hepadnavirus: An emerging threat to cats' health? *Front. Microbiol.* 2022. *Sec. Virology* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.938154>.
- Korba B.E., Gowans E.J., Wells F.V., Tennant B.C., Clarke R., Gerin J.L.: Systemic distribution of woodchuck hepatitis virus in the tissues of experimentally infected woodchucks. *Virology* 1988, **165**, 172–181.
- Capozza P., Lanave G., Diakoudi G., Stasi F., Ghergo, P., Ricci D., Santò G., Arena G., Grillo I., Delle Done E., Di Lizio F., Zini E., Callegari C., Valente L., Camero M., Di Martino B., Beatty L., Barrs V.R., Buonavoglia C., Martella V.: A longitudinal observational study in two cats naturally infected with hepadnavirus. *Vet. Microbiol.* 2021, **254**:108999. Doi: 10.1016/j.vetmic.2021.108999.
- Pesavento P.A., Jackson K., Scase T., Tiffany Tse., Hampson B., Munday J.S., Barrs V.R., Beatty J.A.: A novel hepadnavirus is associated with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma in cats. *Viruses* 2019, **11**, 969. Doi: 10.3390/v11100969.
- Scavone D., Lauzi S., Stranieri A., Tramontano D., Ratti G., Paltrinieri S.: Evacuating the presence of domestic cat hepadnavirus in cats with biochemical alterations suggestive of liver disease. *Vet. Rec.* 2022; e1626.
- Hoyumpa Vogt A., Rodan I., Brown M., Brown S., Buffington C.A., Larue Forman M.J., Neilson J., Sparkes A.: AAEP-AAHA; feline life stage guidelines. *J. Feline Med. Surg.* 2010, **12**, 43–54.
- Terrault N.A., Lok A.S.F., McMahon B.J., Chang K.M., Hwang J.P., n Jonas M.M., Brownjr. R.S., Bzowej N.H., Wong J.B.: Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology* 2018, **67**, 1560–1599.