

PESQUISA MOLECULAR DA INFECÇÃO POR HEPADNAVÍRUS EM GATOS DOMÉSTICOS

Daniela Batista do Nascimento de Moraes

Alex Junior Souza de Souza

Lilian Rose Marques de Sá

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

danielabnmoraes@usp.br

Objetivos

O objetivo do estudo foi pesquisar a ocorrência de *Domestic cat hepatitis B virus* (DCH) em amostras clínicas (soro e plasma) de gatos domésticos e avaliar as alterações laboratoriais (bioquímica sérica) associadas à infecção pelo vírus em gatos domésticos da cidade de São Paulo.

Métodos e Procedimentos

O projeto foi apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CEUA/FMVZ/USP) sob protocolo CEUAx 2897140422. O estudo realizou a análise molecular de soro/plasma de 181 (n = 181) gatos domésticos, com diferentes condições clínicas, recebidas por demanda, entre novembro de 2022 e março de 2023, doadas por um laboratório veterinário (Alchemypet Medicina Diagnóstica Veterinária) situado na cidade de São Paulo, SP. O DNA total de cada amostra de soro/plasma (200 µL) foi purificado com o kit comercial QIAamp® DNA Mini (QIAGEN), utilizado segundo as orientações do fabricante. Após a purificação, o DNA total das amostras foi quantificado por equipamento de espectrofotometria Quibt™

(Thermo Fisher Scientific) e o kit Quant-iT™ dsDNA - Broad Range (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A triagem molecular de infecção por hepadnavírus foi desenvolvida a partir da utilizando o DNA extraído de cada amostra, que foram individualmente testadas por método de *nested* reação em cadeia da polimerase (*nested* PCR) para amplificação parcial da região S/Pol do genoma de hepadnavírus, segundo as condições de termociclagem previamente descritas por Wang et al (2017). Controle positivos (DNA obtido de soro humano positivo para vírus da hepatite B - HBV) e negativos (água DEPC) foram incluídos em todos os ensaios de *nested* PCR. Amostras com produtos próximos ao tamanho esperado amostras positivas no teste de triagem foram testadas por um protocolo adicional para amplificação de DCH previamente descrito (AGHAZADEH *et al.*, 2018). Os produtos de PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % e amostras que apresentaram bandas com tamanho aproximado a 258 pares de base (pb) no teste de triagem e 230 pb no teste confirmatório de PCR foram considerados como positivos. Os *amplicons* dos casos com tamanho próximo ao

esperado foram sequenciados em sequenciador automatizado ABI 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems) e as sequências nucleotídicas *forward* e *reverse* de cada amostra foram alinhadas, integradas e submetidas ao *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação de positividade.

Resultados

Dos 130 gatos, do total de 181 testados, cujas informações epidemiológicas e laboratoriais estavam disponíveis, 86,9% (113/130) foram identificados como sem raça definida (SRD), 5,4% (7/130) como persas, 0,8% (1/130) como Maine Coon, 0,8% (1/130) como Siamês e 6,1% (8/130) não informaram a raça do animal. As fêmeas correspondiam a 42,3% (55/130) e os machos a 56,9% (74/130), sendo que 1 animal não teve seu sexo informado. Segundo a classificação por faixa etária, foram 0,8% filhotes (1/130), 30,7% jovens (40/130), 26,1% adultos (34/130), 20,7% adultos maduros (27/130), 16,1% seniores (21/130) e 5,3% idosos (7/130). A mediana se encontrou em 6 anos, sendo que as idades variam de 1 mês a 17 anos, mas a maioria está entre animais jovens e adultos maduros, com 77,5% das amostras. Entre os 186 animais testados, 4,3% (8/186) apresentaram *amplicons* em tamanho condizente com o esperado pelo protocolo de triagem, entretanto o produto das reações foi enviado para sequenciamento que indicou ser um produto de amplificação inespecífica. As amostras também foram testadas pelo segundo protocolo de PCR, que indicou negatividade em todos os casos. Desse modo, não identificamos evidências moleculares de infecção por DCH em nenhuma das amostras testadas, o que impossibilitou uma análise entre infecção viral e parâmetros bioquímicos encontrados, apesar de 34 animais dentro da casuística apresentarem perfil bioquímico condizente com

doença hepática (hiperbilirrubinemia e/ou transaminases aumentadas).

Conclusões

Estudos têm apontado para uma baixa prevalência de DCH entre gatos domésticos na Ásia, Europa e América do Norte, entretanto a circulação do agente permanece desconhecida em muitas regiões geográficas, incluindo o Brasil. Apesar do DCH já ter sido detectado em gatos hígidos, a frequência de detecção do DCH em amostras clínicas parece ser maior entre animais com evidências de hepatopatias. Desse modo, o fato de não terem sido observadas evidências moleculares de infecção por DCH no presente estudo pode estar relacionado aos seguintes fatores: i) negatividade de viremia durante coleta; ii) menor sensibilidade dos ensaios de PCR utilizados no estudo; iii) reduzido número de animais com evidências bioquímicas de hepatopatia. Estudos com maior número de animais, associados a outras estratégias de diagnóstico laboratorial podem auxiliar na melhor compreensão da prevalência e impactos clínicos da infecção por DCH entre gatos domésticos nos neotrópicos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa Unificado de Bolsas, Pró-Reitoria de Graduação, Universidade de São Paulo, pela concessão de bolsa de iniciação científica.

Referências

AGHAZADEH, M.; SHI, M.; BARRS, V. R.; et al. A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia. *Viruses*, Australia, v. 10, n. 269, p. 1-6, 2018.
WANG, B.; YANG, X. L.; LI, W.; et al. Detection and genome characterization of four novel bat hepadnaviruses and a hepevirus in China. *Virology Journal*, v. 14, n. 40, p. 1-10. 2017.

MOLECULAR RESEARCH OF HEPADNAVIRUS INFECTION IN DOMESTIC CATS

Daniela Batista do Nascimento de Moraes

Alex Junior Souza de Souza

Lilian Rose Marques de Sá

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

danielabnmoraes@usp.br

Objectives

The objective of the study was to investigate the occurrence of domestic cat hepatitis B virus (DCH) in clinical samples (serum and plasma) from domestic cats and to evaluate laboratory changes (serum biochemistry) associated with virus infection in domestic cats in the city of São Paulo.

Materials and Methods

The project was assessed and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals, of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics of USP (CEUA/FMVZ/USP) under protocol CEUAx 2897140422. The study carried out molecular analysis of serum/plasma of 181 (n = 181) domestic cats, with different clinical conditions, received on demand, between November 2022 and March 2023, donated by a veterinary laboratory (Alchemypet Medicina Diagnóstica Veterinária) located in the city of São Paulo, SP. Total DNA from each serum/plasma sample (200 µL) was purified with the commercial QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN), used according to the manufacturer's instructions. After purification, the total DNA of the samples was quantified

using Quibt™ spectrophotometry equipment (Thermo Fisher Scientific) and the Quant-iT™ dsDNA kit - Broad Range (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Molecular screening of hepadnavirus infection was developed using the DNA extracted from each sample, which was individually tested using the nested polymerase chain reaction (nested PCR) method for partial amplification of the S/Pol region of the hepadnavirus genome, according to the thermocycling conditions previously described by Wang et al (2017). Positive controls (DNA obtained from human serum positive for hepatitis B virus - HBV) and negative controls (DEPC water) were included in all nested PCR assays. Samples with products close to the expected size positive samples in the screening test were tested by an additional protocol for DCH amplification previously described (AGHAZADEH et al., 2018). PCR products were detected by electrophoresis in 1.5% agarose gel and samples that presented bands with a size of approximately 258 base pairs (bp) in the screening test and 230 bp in the confirmatory PCR test were considered positive. The

amplicons of cases with a size close to the Expected sequences were sequenced on an ABI 3500 DNA Sequencer automated sequencer (Applied Biosystems) and the forward and reverse nucleotide sequences of each sample were aligned, integrated and submitted to the Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to confirm positivity.

Results

Of the 130 cats, out of a total of 181 tested, whose epidemiological and laboratory information was available, 86.9% (113/130) were identified as mixed breed (SRD), 5.4% (7/130) as Persian, 0.8% (1/130) as Maine Coon, 0.8% (1/130) as Siamese and 6.1% (8/130) did not inform the breed of the animal. Females corresponded to 42.3% (55/130) and males to 56.9% (74/130), with 1 animal not having its sex informed. According to the classification by age group, there were 0.8% puppies (1/130), 30.7% young (40/130), 26.1% adults (34/130), 20.7% mature adults (27/130), 16.1% seniors (21/130) and 5.3% elderly (7/130). The median was found to be 6 years, with ages varying from 1 month to 17 years, but the majority are between young animals and mature adults, with 77.5% of the samples. Among the 186 animals tested, 4.3% (8/186) presented amplicons in a size consistent with that expected by the screening protocol, however the reaction product was sent for sequencing which indicated that it was a non-specific amplification product. The samples were also tested using the second PCR protocol, which indicated negativity in all cases. Therefore, we did not identify molecular evidence of DCH infection in any of the samples tested, which made it impossible to analyze the viral infection and the biochemical parameters found, despite 34 animals within

the sample presenting a biochemical profile consistent with liver disease (hyperbilirubinemia and/or increased transaminases).

Conclusions

Studies have pointed to a low prevalence of DCH among domestic cats in Asia, Europe and North America, however the circulation of the agent remains unknown in many geographic regions, including Brazil. Although DCH has already been detected in healthy cats, the frequency of DCH detection in clinical samples appears to be higher among animals with evidence of liver disease. Therefore, the fact that no molecular evidence of DCH infection was observed in the present study may be related to the following factors: i) negativity of viremia during collection; ii) lower sensitivity of the PCR assays used in the study; iii) reduced number of animals with biochemical evidence of liver disease. Studies with a larger number of animals, associated with other laboratory diagnostic strategies, can help to better understand the prevalence and clinical impacts of DCH infection among domestic cats in the Neotropics.

Acknowledgements

We would like to thank the Unified Scholarship Program, Dean of Undergraduate Studies, University of São Paulo, for granting a scientific initiation scholarship.

References

- AGHAZADEH, M.; SHI, M.; BARRS, V. R.; et al. A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia. **Viruses**, Australia, v. 10, n. 269, p. 1-6, 2018.
- WANG, B.; YANG, X. L.; LI, W.; et al. Detection and genome characterization of four novel bat hepadnaviruses and a hepevirus in China. **Virology Journal**, v. 14, n. 40, p. 1-10. 2017.