



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Första identifieringen av felint morbillivirus hos svenska katter



Sophie Dahl

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:16*

Första identifieringen av felint morbillivirus hos svenska katter

First identification of feline morbillivirus in Swedish cat population

Sophie Dahl

Handledare: Mikael Berg, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Emeli Torsson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Maja Malmberg, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin, Veterinärprogrammet

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:16

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: felint morbillivirus, paramyxovirus, screening, urin, katter, Sverige, kronisk njursjukdom

Key words: feline morbillivirus, paramyxovirus, screening, urine, cats, Sweden, chronic kidney disease

Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Att hundar kan få valpsjuka orsakad av ett morbillivirus är något många känner till, men att katter skulle drabbas av motsvarande virus är relativt nyupptäckt. Felint morbillivirus upptäcktes först år 2012 hos katter i Hongkong och förekomsten har sedan undersökts i ett fåtal länder men inga studier har än så länge gjorts i Sverige. Syftet med det här examensarbetet var att utföra en screening för felint morbillivirus på katter från Universitetsdjursjukhuset vid SLU i Uppsala och att studera ett eventuellt samband mellan virusförekomst och riskfaktorer för virusspridning.

Urinprover samlades in från 76 katter på Universitetsdjursjukhuset vid SLU i Uppsala. RNA extraherades och Realtids-PCR användes för att amplifiera och detektera RNA från felint morbillivirus. Prover som blev positiva efter Realtids-PCR analyserades vidare med konventionell PCR och fragmenten sekvenserades med Sanger sekvensering. För att sekvensera hemagglutinin (H), fosfoprotein (P) och fusionsprotein (F) designades primers för respektive gen. cDNA syntetiserades för att sedan kunna analyseras med konventionell PCR. Resultaten från sekvenseringen jämfördes med redan kända nukleotidsekvenser och deras inbördes släktskap visades i ett fylogenetiskt träd.

Efter Realtids-PCR uppvisade 4 prover positivt resultat men efter konventionell PCR kunde endast ett tydligt band observeras för ett av proverna. Efter sekvensering kunde stor likhet med tidigare upptäckta FeMv-stammar påvisas. Vid användning av fyra primerpar som tillsammans täckte F-genen kunde band observeras vid korrekt storlek för respektive primer och efter sekvensering kunde även här likhet ses med andra upptäckta stammar.

I det fylogenetiska trädet för F-genen hamnade det svenska viruset på samma gren som några stammar från Japan och en stam från Hongkong medan stammar från Italien hamnade på en annan gren, vilket talar för en genetisk diversitet inom Europa. Precis som i tidigare studier bildade alla felina morbillivirus en egen grupp avskild från övriga morbillivirus och frågan hur felint morbillivirus ska klassificeras är oklar.

Resultatet från den här studien visar på att felint morbillivirus förekommer hos katter även i Sverige. Att vi endast hittade ett positivt prov gör det svårt att hitta samband mellan virusförekomst och riskfaktorer för virusspridning och förekomsten av viruset i Sverige behöver undersökas vidare. I många tidigare studier har ett samband mellan virusförekomst och kronisk njursjukdom påvisats men även detta behöver undersökas vidare för att få en klarare bild av virusets patogenes och om det kan förebyggas med exempelvis vaccin.

SUMMARY

Many people know that dogs may suffer from canine distemper caused by a morbillivirus but the fact that cats can suffer from a corresponding morbillivirus is newly discovered. Feline morbillivirus was discovered in cats in Hong Kong in 2012 and after that its occurrence has been studied in a few countries but no studies have so far been made in Sweden. The aim of this master thesis was to do a screening for feline morbillivirus in cats at the University Animal Hospital at SLU in Uppsala and to study an association between the presence of the virus and different risk factors.

Urine samples were collected from 76 cats at the University Animal Hospital at SLU in Uppsala. Viral RNA was extracted and a real time PCR was performed to detect feline morbillivirus. Conventional PCR was performed on positive samples and the PCR product was sequenced using Sanger sequencing. New primers were designed to sequence the phosphoprotein (P), hemagglutinin (H) and fusion protein (F). cDNA was synthesized and a conventional PCR was performed. The result from the sequencing was compared with other nucleotide sequences from related viruses and a phylogenetic tree was constructed.

Four samples were positive after real time PCR but only one stayed positive after conventional PCR. After sequencing, similarity to other previously characterized feline morbilliviruses was observed. Using primers that together covered the gene coding for the F protein, bands were observed at the correct sized and similarity to other feline morbilliviruses could be observed after sequencing also in this case.

Phylogenetic analysis demonstrated that the sequence from the Swedish virus was closely related to Japanese strains and a strain from Hong Kong but not as closely related to for example a strain from Italy, proving a genetic diversity in Europe. All the feline morbilliviruses in the tree formed a distinct group separate from other viruses of the genus *Morbillivirus*, as already described in previous studies. It is thereby uncertain how feline morbillivirus should be classified.

The result of this study shows that feline morbillivirus exist in Swedish cats. The fact that it only was one positive sample makes it difficult to find an association between existence of the virus and risk factors and more studies in Sweden are needed. In previously studies they found an association between feline morbillivirus and chronic kidney disease but this also needs further investigation to get a clearer picture of the pathogenesis and how virus infections can be prevented with vaccines.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Upptäckten av felint morbillivirus.....	2
Paramyxovirus.....	2
Biologiska karaktäristiska.....	3
Egenskaper och fylogeni.....	3
Epidemiologi och zoonotisk potential.....	4
Samband mellan felint morbillivirus och kronisk njursjukdom.....	5
Kronisk njursjukdom (CKD).....	5
Material och metoder.....	7
Provinsamling.....	7
Extraktion av RNA.....	7
Realtids-PCR.....	8
Konventionell PCR.....	9
Rening av DNA-fragment.....	10
Sekvensering av H-, P- och F-gen.....	10
Fylogenetiska studier.....	12
Resultat.....	13
Diskussion.....	20
Referenser.....	24

INLEDNING

Att hundar kan få valpsjuka orsakad av ett morbillivirus är något många känner till men att katter skulle drabbas av ett motsvarande morbillivirus är relativt nyupptäckt (Woo *et al.*, 2012). Trots det är överföring av virus mellan hundar och katter något som observerats tidigare, exempelvis hundens parvovirus som har sitt ursprung ifrån felint panleukopenivirus (Truyen, 2006). Med hypotesen att även katter kan vara värd för paramyxovirus upptäcktes felint morbillivirus år 2012 hos katter i Hongkong (Woo *et al.*, 2012). Sedan upptäckten är det endast ett fåtal länder som har undersökt förekomsten av felint morbillivirus hos katter och det finns än så länge inga studier gjorda i Sverige.

Exakt vad viruset gör och vad det orsakar för sjukdom är inte helt utrett men det finns studier som hävdar att det finns ett samband med tubulointerstitiell nefrit hos katter. Kronisk njursjukdom (CKD) är en vanligt förekommande sjukdom hos äldre katter som leder till nedsatt glomerulär filtration och så småningom till uremi. De bakomliggande orsakerna till CKD blir sällan identifierade men ju senare stadie av sjukdomen, desto allvarligare njurskador och därmed är en tidig diagnos av stor vikt (McLeland *et al.*, 2014).

Felint morbillivirus tillhör familjen *Paramyxoviridae* som består av enkelsträngade RNA-virus med negativ polaritet (Lamb & Parks, 2013). *Paramyxoviridae* delas upp i två subfamiljer, *Pneumovirinae* och *Paramyxovirinae* där den senare är förknippad med många kända patogener hos människor och djur så som mässlingvirus och valpsjukevirus (Woo *et al.*, 2012, Lamb & Parks, 2013) och även viktiga zoonotiska patogener så som Hendravirus (Eaton *et al.*, 2006). Inom *Paramyxovirinae* finns det 5 genus varav en av dem är *Morbillivirus* (Lamb & Parks, 2013).

Syftet med det här examensarbetet var att utföra en screening för felint morbillivirus i urinprover insamlade från katter som varit patienter på Universitetsdjursjukhuset (UDS) vid SLU i Uppsala. Syftet var även att studera ett eventuellt samband mellan virusförekomst i urinen och diagnostiserad kronisk njursjukdom (CKD) samt andra riskfaktorer för virusspridning med hjälp av information från UDS journaler.

LITTERATURÖVERSIKT

Upptäckten av felint morbillivirus

Trots paramyxovirus breda värdspektrum (Barret, 1999) var förekomsten av morbillivirus hos katt länge okänt. Först år 2012 upptäckte forskare för första gången förekomsten av felint morbillivirus hos katter i Hongkong. I studien kunde RNA från viruset isoleras hos 12,3 % (56/457) av katterna med hjälp av RT-PCR, både från urin, rektalsvabb och serum (Woo *et al.*, 2012).

Efter den första upptäckten i Hongkong undersöktes katter i Japan för förekomst av felint morbillivirus, där 6,5 % katter var positiva (Furuya *et al.*, 2014). Vidare har förekomsten av viruset utanför Asiens gränser undersökts och har konstaterats i USA (Sharp *et al.*, 2016), Italien (Lorusso *et al.*, 2015), Tyskland (Sieg *et al.*, 2015) samt nyligen även i Brasilien (Darold *et al.*, 2016).

Paramyxovirus

Felint morbillivirus tillhör familjen *Paramyxoviridae* och subfamiljen *Paramyxovirinae* som är enkelsträngade linjära RNA-virus med negativ polaritet (Lamb & Parks, 2013). Paramyxovirus har ett lipidhölje som omsluter kapsiden och kapsiden har ett karaktäristisk fiskbensliknande utseende (Barret, 1999). Virus inom familjen innehåller 6-10 gener som kodar för proteiner som bland annat ansvarar för transkription (Smith *et al.*, 2009). Två olika glykoproteiner, hemagglutinin (H) och fusionsprotein (F) är delaktiga i att fästa till samt sammansmälta med värdcellen och fosfoproteinet (P) samt polymerasproteinet (L) är ansvariga för transkription och replikering (Barret, 1999).

Paramyxoviridae inkluderar *Morbillivirus*, *Henipavirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Avulavirus* som tillhör subfamiljen *Paramyxovirinae* samt *Pneumovirus* och *Metapneumovirus* som tillhör *Pneumovirinae*. Till familjen hör även en del ospecificerade paramyxovirus (Chang & Dutch, 2012). Virusfamiljens värdspektra är brett och framför allt morbillivirus är förknippad med såväl hög dödlighet som ekonomiska förluster då både mässling, peste des petits ruminants virus och boskapspest är inkluderade. Även zoonotiska patogener som Hendra- och Nipahvirus är paramyxovirus (Eaton *et al.*, 2006).

De flesta morbillivirus smittar respiratoriskt och viruset binder till de cellulära receptorerna CD46, CD150 och nectin-4 via glykoprotein (H) (Chang & Dutch, 2012). I luftvägarna infekterar morbilliviruset dendritiska celler, makrofager och lymfocyter och transporteras därefter till lymfknotor där det vidare infekterar andra immunceller. Infekterade immunceller överför sedan viruset till epitelceller i olika organ. Nectin-4 är cellulära adhesionsmolekyler och det är via dessa receptorer viruset överförs från immunceller till epitelceller efter den systemiska infektionen. Nectin-4 är även involverad i celldifferentiering, proliferation och polarisering (Sato *et al.*, 2012). CD46 uttrycks på alla nukleära celler och hämmar komplementaktivering som förhindrar cytolys av cellerna (Yanagi *et al.*, 2006). CD150 uttrycks av immunceller så som lymfocyter och dendritiska celler och är involverad i aktivering av lymfocyter samt produktion av interferongamma. Receptorn reglerar bland annat NK-celler och dendritiska celler och är involverad i kroppens immunsvaret. Resultatet av att morbillivirus infekterar dessa celler blir således immunosuppression och lymfopeni (Tatsuo & Yanagi, 2002).

Biologiska karaktäristiska

I en studie undersöktes det felina morbillivirusets biologiska karaktäristiska med hjälp av indirekt immunofluorescence. Cytopatiska effekter kunde påvisas genom observation av celler som utsatts för felint morbillivirus (Koide *et al.*, 2015). Även i studier från Hongkong och Japan kunde morfologiska förändringar observeras när felina njurceller utsattes för viruset, vilket tyder på cytopatogenicitet (Woo *et al.*, 2012, Sakaguchi *et al.*, 2014).

Till skillnad från andra morbillivirus tycks felint morbillivirus inte använda trypsin-like protease för klyvning av F-protein då behandling med trypsin inte var nödvändigt vid isolering av viruset (Koide *et al.*, 2015). Trypsin-like protease hos andra morbillivirus klyver prekursorerna F0 till aktiva F1 och F2 som behövs för sammansmältning med cellmembran (von Messling *et al.*, 2004). Hos felint morbillivirus är klyvningstället monobasiskt istället för multibasiskt (Woo *et al.*, 2012, Koide *et al.*, 2015) vilket det är hos andra morbillivirus och troligen klyvs F-proteinet av ett annat proteas (Koide *et al.*, 2015).

Viruset konstaterades vara relativt stabilt i rumstemperatur och anmärkningsvärt stabilt vid 4 grader då höga virustitrar kunde bibehållas i 12 dagar vid denna temperatur. Precis som andra paramyxovirus inaktiveras felint morbillivirus effektivt med hjälp av värme. Vid 60 grader inaktiverades viruset på 10 min och vid upphettning till 70 grader gick det ännu snabbare (Koide *et al.*, 2015)

Egenskaper och fylogeni

Sekvensering av genomet från tre stammar av viruset visade på en genomstorlek på 16050 baser som innebär att felint morbillivirus har det största genomet av alla morbillivirus. Vid gruppering av generna från felint morbillivirus och andra paramyxovirus var likheten störst med genus *Morbillivirus* (Woo *et al.*, 2012).

I en studie av Sakaguchi *et al.* (2014) där antikroppar mot felint morbillivirus detekterades hos katter påvisades höga nivåer även hos de katter som var virusnegativa enligt RT-PCR, vilket skulle kunna tyda på att katter kan bli persistent infekterade (Sakaguchi *et al.*, 2014). Även enligt Woo *et al.* (2012) detekterades antikroppar både hos viruspositiva och virusnegativa katter. Vid upptäckten i USA konstaterades en kronisk infektion och en persistent virusutsöndring i urin. Genom att analysera två urinprov från en och samma katt med 15 månaders mellanrum påvisades identiska virus i båda proverna (Sharp *et al.*, 2016). I studien av Sieg *et al.* (2015) detekterades viruset i urin i flera veckor efter att katterna diagnostiserats med kronisk njursjukdom, vilket författarna menar tyder på en kronisk infektion.

Enligt Woo *et al.* (2012) var felint morbillivirus fylogenetiskt grupperad med andra morbillivirus. Sakaguchi *et al.* (2014) visade dock att stammar av felint morbillivirus skiljde sig från andra morbillivirus och paramyxovirus och menar att felint morbillivirus inte ska klassas som morbillivirus utan som oklassificerade paramyxovirus (Sakaguchi *et al.*, 2014). Studien från Brasilien menar också på att stammar av felint morbillivirus bildar en egen grupp i det fylogenetiska trädet som skiljer sig från

gruppen med virus tillhörande genus *Morbillivirus* (Darold *et al.*, 2016). Det är alltså inte fastställt om det nyupptäckta viruset tillhör genus *Morbillivirus* eller inte (Park *et al.*, 2014)

Genom att sekvensera H- och L-genen hos en av stammarna av felint morbillivirus från japanska katter och jämföra aminosyra- samt nukleotidsekvenser med isolat från Hongkong uppvisades stora likheter och i ett fylogenetiskt träd hamnade de på samma gren. Däremot avvek en japansk stam från stammar från Hongkong vilket tyder på en genetisk diversitet. Att viruset utsatts för positiv selektion kunde inte påvisas då kvoten mellan synonyma nukleotidsubstitut som kodar för proteiner (ändrar inte aminosyra) och non-synonyma (ändrar aminosyra) var mycket lägre än 1 (Kryazhimiskiy & Sergey, 2008, Sakaguchi *et al.*, 2014). Viruset som upptäcktes i USA visade på fylogenetiska likheter med virus som påvisats i Asien vilket tyder på en global distribution av felint morbillivirus (Sharp *et al.*, 2016). Vid jämförelse av nukleotidsekvenser från viruset i Italien med andra identifierade stammar uppvisades störst likhet med stammar från Hongkong men avvikelser fanns från påvisat virus i Tyskland, vilket också talar för en genetisk diversitet och heterogenitet i Europa (Marcacci *et al.*, 2016). I den tyska studien hittades tre olika grupper av virus varav den ena motsvarade de stammar som hittats i Hongkong och Japan, den andra representerade en grupp mellan felint morbillivirus och övriga morbillivirus och den tredje motsvarade inget tidigare känt paramyxovirus (Sieg *et al.*, 2015). Viruset som identifierades i Brasilien visade på fylogenetiska likheter med virusstammar som påvisats i Japan (Darold *et al.*, 2016).

Epidemiologi och zoonotisk potential

Huruvida felint morbillivirus kan överföras till andra arter än katter är inte fullständigt klarlagt (Sharp *et al.*, 2016). Canine distemper virus (CDV), ett morbillivirus vars huvudvärd tillhör *Carnivora* har setts ge infektioner och kliniska symptom hos exempelvis lejon, tigrar och sälar. I dessa fall har det varit lokala stammar av CDV och källan har bland annat varit tamhundar (Barret 1999). CDV tycks därför inte vara en strikt carnivor patogen utan kan ta sig förbi artbarriärer genom att utnyttja liknande receptorer (Ludlow *et al.*, 2014). Liknande kan gälla för andra virus så som felint morbillivirus. Enligt Sharp *et al.* (2016) kan alltså en epizootisk smittspridning av felint morbillivirus inte uteslutas och bör utredas vidare. I en studie av Sakaguchi *et al.* (2015) undersöktes värdspektrat hos felint morbillivirus genom att inokulera felint morbillivirus till 32 cellinjer från 13 olika arter. Dock var endast linjer från katt mottagliga och studien talar emot en överskridande artbarriär (Sakaguchi *et al.*, 2015).

I en studie av Park *et al.* (2014) undersöktes nukleotidsekvenser från tre stammar som detekterades i Japan varav en av stammarna visade sig vara en trolig rekombinant mellan stammar från Hongkong och Japan. Rekombinationen tros ha skett mellan F- och H-genen hos stammen då dessa gener skiljde sig från andra stammar (Park *et al.*, 2014). Rekombinationer i H-genen har tidigare observerats hos andra virus så som CDV, vilket resulterade i att viruset kunde infektera andra arter (Han *et al.*, 2008). Att rekombinationer kan ske även hos felint morbillivirus talar för att virusets värdspektrum kan påverkas.

När virus så som mässlingsvirus och CDV ska fästa till en värdcell agerar CD150 hos immunceller samt nectin-4 hos epitelceller som cellulär receptor och möjliggör virusets spridning systemiskt hos den nya värden. CDV kan inte binda till humana CD150 men användning av andra receptorer är inte omöjligt och smitta till människor går inte att utesluta. Med tanke på detta bör även den zoonotiska potentialen hos felint morbillivirus utredas vidare (Ludlow *et al.*, 2014). Studien av Sakaguchi *et al.* (2015) visade att felint morbillivirus kan infektera flera olika celltyper och använder receptorer som uttrycks i flertalet

vävnader. Dock kunde ingen infektion ses hos humana cellinjer vilket talar emot en zoonotisk spridning (Sakaguchi *et al.*, 2015).

Samband mellan felint morbillivirus och kronisk njursjukdom

Vid försöket i Hongkong (2012) kunde ett samband ses mellan förekomst av virus och tubulointerstitiell nefrit hos katter. Detta då histopatologisk undersökning visade på tubulär degeneration och inflammatorisk infiltrat i interstitiet hos katter som var positiva för viruset. Även efter fall-kontroll studier på katterna som deltog i studien sågs ett samband (Woo *et al.*, 2012).

Ett eventuellt samband kunde även ses i studie där, förutom serum och urin, provmaterial från njurvävnad från katter diagnostiserade med CKD användes och där andelen positiva katter var högre från njurproverna än från övrigt provmaterial. Författarna föreslår att detta kan bero på att fler katter som är viruspositiva har nefrit (Furuya *et al.*, 2014).

I Italien där felint morbillivirus påvisades i urinprov från en njursjuk katt menar författarna att viruset har haft en bidragande roll i kattens insjuknande. Viruset utsöndrades i urinen under 14 dagar och felint morbillivirus var den enda patogen som kunde påvisas och förklara den kliniska manifestationen (Lorusso *et al.*, 2015).

I studien av Sieg *et al.* (2015) undersöktes urinprov från katter med diagnostiserad CKD samt från friska katter. Felint morbillivirus kunde endast påvisas i provmaterial från njursjuka katter och inget felint morbillivirus-RNA hittades hos friska katter. Enligt denna studie kunde ett starkt samband mellan virusförekomst och CKD påvisas (Sieg *et al.*, 2015).

Enligt Sakaguchi *et al.* (2014) kunde dock inget samband eller virusets epidemiologiska samt patologiska roll i njursjukdomar observeras (Sakaguchi *et al.*, 2014). Inte heller i studien av Darold *et al.* (2016) kunde ett tydligt samband mellan felint morbillivirus och njursjukdom påvisas, då viruset kunde påvisas hos fler katter utan tecken på sjukdom än hos katter med njursjukdom. Även om virus kunde hittas hos tre katter med CKD, hade dessa katter också FIV-infektion som även det kan relateras till njursjukdomar (Darold *et al.*, 2016, Poli *et al.*, 2012).

Kronisk njursjukdom (CKD)

Kronisk njursjukdom (CKD) är en vanligt förekommande sjukdom hos äldre katter och innebär att en eller båda njurarna är skadade och/eller har försämrad funktion under en tidsperiod längre än 3 månader (Bartges, 2012). Orsaker till CKD kan delas in i kongenitala så som amyloidos och förvärvade så som olika infektioner (Reynolds & Lefebvre, 2013). De vanligaste diagnoserna är tubulointerstitiell nefrit och fibros (DiBartola *et al.*, 1987). Den bakomliggande orsaken identifieras dock sällan och i många fall kan det röra sig om flera etiologier som tillsammans orsakar njurskador (McLeland *et al.*, 2014). Trots det finns det ett antal potentiella riskfaktorer som är förknippade med sjukdomen där förutom en stigande ålder inkluderar även kardiovaskulära sjukdomar, urinvägsinfektioner och hyperaldosteronism (Reynolds & Lefebvre, 2013).

Konsekvensen av CKD är en nedsatt glomerulär filtration och ackumulering av bland annat kreatinin och urea i blodet som i sig bidrar till vidare utveckling av sjukdomen (McLeland *et al.*, 2014). Andra förändringar som följer med sjukdomen är systemisk hypertension, renal sekundär hyperparatyroidism, hypokalemi, anemi och metabolisk acidosis (Reynolds & Lefebvre, 2013).

Vid fastställd diagnos av CKD brukar sjukdomen graderas i stadie I-IV enligt International Renal Interest Society (IRIS), för att ge rätt prognos och behandling. Graderingen baseras på kreatinin-nivåer i serum och sedan på blodtryck och förekomst av proteinuri. (Marino *et al.*, 2013, IRIS, 2015). Proteinuri är en tydlig indikation på tubulär njurskada och CKD, då små proteiner normalt ska reabsorberas av proximala tubuli (Syme, 2009). För att veta hur allvarligt skadade njurarna är och om skadorna är irreversibla krävs dock histopatologisk undersökning. I en studie på katter i olika CKD-stadier var njurskadorna mer allvarliga i senare stadier jämfört med tidiga stadier (McLeland *et al.*, 2014). Många katter hinner avlida innan de når slutstadiet av sjukdomen (Chakrabarti *et al.*, 2012). En tidig diagnos och insatt behandling i tidigt stadie är därför av stor vikt, inklusive att försöka identifiera bakomliggande orsak (McLeland *et al.*, 2014, Reynolds & Lefebvre, 2013).

MATERIAL OCH METODER

Provinsamling

Urinprover från 76 katter samlades in under våren 2017 med hjälp av Klinisk kemiska laboratoriet på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala. Proverna kom ifrån patienter på djursjukhuset och var tagna via cystocentes som en del av patienternas utredningar. Från Klinisk kemiska laboratoriet fick vi supernatanten efter att proverna centrifugerades. Proverna förvarades i -20 °C på laboratoriet i ungefär en vecka innan de hämtades för att förvaras i -80 °C. Varje prov var kopplat till en journal och journaluppgifter från patienterna samlades in om ras, ålder, kön, Body Condition Score (BCS), ute- respektive innevistelse, hushåll med en eller flera katter, utomlandsvistelse, S-kreatinin, U-protein, U-krea/prot-kvot (för en del av proverna) samt om katten är diagnostiserad med CKD eller inte.

Extraktion av RNA

Eftersom RNA är relativt instabilt och RNaser finns överallt i omgivningen måste RNA stabiliseras och RNaser inaktiveras genom nukleinsyraextraktion. RNA extraherades från varje prov med hjälp av "NucleoSpin RNA Virus"-kit enligt tillverkarens instruktioner (tabell 1). Virus lyserades med hjälp av Lysis Buffer RAV1 innehållandes guanidinium thiocyanate vars funktion är att denaturera RNAs för att skydda RNA från att bli nedbrutet. Etanol tillsattes till provet som tillsammans med Lysis buffer ger optimala förhållanden för nukleinsyror att binda till silikonmembranet i kolonnerna. Lysis buffer var blandad med Carrier RNA som optimerar bindningen. Kontaminanter tvättades bort i tre omgångar med hjälp av etanolbaserad RAW- och RAV3-buffert. RNAs-fritt vatten tillsattes därefter för att nukleinsyran som har fångats upp i kolonnen ska släppa.

Tabell 1. *Utförande vid extraktion av RNA*

Lysering	150 µL prov + 600 µL Buffer RAV1 + Carrier RNA Inkubering 70 °C i 5 min
Optimera bindningsförhållanden	600 µL EtOH
Bindning av RNA	700 µL lyserat prov i kolonn Centrifugering 1 min Resterande lyserat prov i kolonn Centrifugering 1 min
1:a tvätt	500 µL RAW Centrifugering 1 min
2:a tvätt	600 µL RAV3 Centrifugering 1 min
3:e tvätt	200 µL RAV3 Centrifugering 5 min

Eluera RNA	50 µL RNase-fritt vatten
	Inkubering 70 °C i 1 min
	Centrifugering 1 min

Realtids-PCR

Realtids-PCR är en metod som amplifierar och detekterar en känd RNA-sekvens. Till skillnad från konventionell PCR kan amplifieringen följas i realtid och detektion av nukleinsyra sker direkt i röret. Gelelektrofores behövs således inte, utan detektion sker genom fluorescerande molekyler som i detta fall är bundna till en probe. I realtids-PCR-analysen kommer antalet amplikon att öka exponentiellt och där amplifieringskurvan skär tröskelvärde, motsvarande den fluorescensnivå kurvan ska passera för att räknas som positiv, kan cykeltröskel(Ct)-värdet avläsas.

En syntetisk del av FeMv-L-gen, som designades utifrån redan kända sekvenser, användes som positiv kontroll i försöken. Den positiva kontrollen förbereddes enligt medföljande instruktioner med centrifugering, spädning till en koncentration på 10 ng/µl och inkubering. Därefter spädades den ytterligare för att kunna testa vilken spädning som är optimal för PCR-programmet. PCR-kitet som användes i försöken var "qScript One-Step Fast Qrt-PCR" med primersekvenser samt probesekvens enligt följande;

forward primer: TACAATGTACCTTCGGGACAAG,

reverse primer: ATCTTCTAGAGCTTGTAGGTAATCC och

probe: AGTGAGTGGGATTCCGTTTATGCGAAAGA (Furuya *et al.*, 2015).

Proben var märkt med 6-FAM vid 5'-ändan och IBFQ och ZEN vid 3'-ändan. Mastermix blandades enligt tabell 2 och kördes med protokollet enligt tabell 3. När acceptabelt Ct-värde på den positiva kontrollen uppnått valdes den mest optimala spädningen att använda till resten av försöken. Vidare kördes det extraherade RNAt tillsammans med positiv och negativ kontroll enligt ovan nämnda procedur. De prover som visade positivt resultat kördes ytterligare en gång med realtids-PCR.

Tabell 2. *Komponenter och deras volymer samt koncentrationer för Mastermix*

<u>Komponent</u>	<u>Volym för 20 µL rxn</u>	<u>Slutlig koncentration</u>
Nuclease-fritt vatten	6,4 µL	
4 X buffer	5 µL	1 X
Forward primer (10 µM)	1 µL	500 nM
Reverse primer (10 µM)	1 µL	500 nM
Probe	0,6 µL	150 nM
Taq DNA polymeras	1 µL	1X
Templat	5 µL	

Total volym	20 µL
-------------	-------

Tabell 3. PCR-protokoll för ”qScript One-Step Fast Qrt-PCR”

cDNA syntes	50 °C i 5 min
Denatuering	95 °C i 30 s
PCR cykling (40 cykler)	95 °C i 3 s, 60 °C i 30 s

Konventionell PCR

De prover som visade positivt resultat på realtids-PCR analyserades vidare med konventionell PCR med primers som amplifierade ett större fragment (401 bp) än tidigare använda primers (121 bp) (Furuya *et al.*, 2014, Furuya *et al.*, 2015). Konventionell PCR bygger på att en känd DNA-sekvens i närvaro av specifikt enzym, Taq-polymeras, fria nukleinsyror och specifika primers amplifieras genom upprepade cykler av olika temperaturer. Det som används som mall är dubbelsträngat DNA. Vid konventionell PCR måste agarosgelelektrofores användas för att separera och färga in amplifierad nukleinsyra så att detektion sedan kan ske genom bestrålning med UV-ljus.

Proverna kördes utan att först syntetisera cDNA och AgPath-ID Onestep-kit användes med primersekvenser enligt följande; forward primer: CCAAATCATGCATCTGCTGT och reverse primer: GCGAACAATCGACCTACCTC (Furuya *et al.*, 2015). Mastermix blandades enligt tabell 4 och de positiva proverna samt positiv och negativ kontroll kördes med termoprotokollet enligt tabell 5. En 1 %-ig gel gjöts och proverna fick vandra längs gelen på 90 volt i 40 minuter. Storleksmarkören (stegen) som användes till samtliga försök var ”GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder”.

Tabell 4. Komponenter och deras volymer för Mastermix

<u>Komponent</u>	<u>Volym för 25 µL rxn</u>
Nuclease-free water	4,5 µL
2 X buffer	12,5 µL
Forward primer	
(10 µM)	1 µL
Reverse primer	
(10 µM)	1 µL
Taq DNA polymeras	1 µL
Templat	5 µL
Total volym	25 µL

Tabell 5. PCR-protokoll för konventionell PCR med One-step-kit

Termoprotokoll

45 °C i 10 min

95 °C i 15 min

95 °C i 30 s

50 °C i 30 s x 40

72 °C i 30 s

72 °C i 10 min

4 °C

Rening av DNA-fragment

För att skicka DNA-fragment för sekvensering renades de från agarosgelen med hjälp av ”Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction Kit” enligt tillverkarens instruktioner, tabell 10. DNA-fragmentet skars ut från gelen och lades i ett eppendorfrör och gelen löstes i en bindningsbuffer som även denaturerar proteiner och främjar DNA att binda till kolonnens membran. Kontaminanter tvättades bort i en omgång med Wash buffer innehållandes etanol. Därefter avlägsnades renat DNA från kolonnen med hjälp av Elution buffer. Renat prov skickades sedan iväg till MacroGen, tillsammans med båda primers vi använt i försöket, för sekvensering.

Tabell 10. *Utförande av rening av DNA-fragment*

Upplösning av gel, optimera bindingsförhållanden	1:1 volym av Binding Buffer (volym:vikt) Inkubering 50 °C i 10 min
Överföring till kolonn	800 µL löst gel i kolonn Centrifugering 1 min 100 µL Binding Buffer Centrifugering 1 min
Tvätt	700 µL Wash Buffer Centrifugering 1 min Centrifugering ytterligare 1 min
Avlägsna DNA	50 µL Elution Buffer Centrifugering 1 min

Sekvensering av H-, P- och F-gen

Vidare designades primers för sekvensering av H-, P och F-genen. Olika primers som täcker respektive gen skapades med hjälp av NCBI Primer-BLAST och Primer3Plus utifrån tidigare kända FeMv-genom, se tabell 11. cDNA syntetiserades för amplifiering med PCR med hjälp av "SuperScript IV Reverse Transcriptase". För att hybridisera primers till RNA-template blandades komponenter enligt tabell 12, centrifugerades, hettades upp till 65 °C i 5 minuter och inkuberades på is. Därefter blandades komponenter till reaktionsmixen enligt tabell 13 som sedan centrifugerades. Hybridiserat RNA blandades med mixen och reaktionen inkuberades i 23 °C i 10 minuter, 55 °C i 10 minuter och sedan i 80 °C i 10 minuter. För att avlägsna RNA tillsattes 1 µl *E. coli* RNase H och inkubering i 37 °C i 20 minuter.

Tabell 11. *Primersekvenser för F-genen*

<u>Primernamn</u>	<u>Primersekvens</u>	<u>Amplikonlängd (bp)</u>
FeMv-F-1-F	CCAGAATCCAGACGAGTGGG	
FeMv-F-1-R	GCAGTTGCCACTCCTAATGC	465
FeMv-F-2-F	TCTCAGGGATCATTAGACCAA	
FeMv-F-2-R	AACGTCCCAATTGCCTTAGA	867
FeMv-F-3-F	TGGGAGAGACTTACGTGACCTT	
FeMv-F-3-R	GGGGTATGTAGAGCGGTTCA	862
FeMv-F-5-F	GAGCAATCAGATAAGATTCTGGA	
FeMv-F-5-R	GCATAAGAATTATACCAGGTAAT CAAA	412

Tabell 12. *Hybridisering av primers*

<u>Komponent</u>	<u>Volym</u>
50 µL random hexamers	1 µL
10 mM dNTP mix	1 µL
Templat	10 µL
DEPC	1 µL

Tabell 13. *Komponenter till reaktionsmix*

<u>Komponent</u>	<u>Volym</u>
5 x SSIV Buffer	4 µL
100 mM DTT	1 µL
Rnase Inhibitor	1 µL
Superscript IV Reverse Transcriptase	1 µL

Det framställda cDNA från proverna samt negativ kontroll kördes vidare med ”PCRBIO Ultra Mix” som använder en färdig mix innehållandes alla reaktionskomponenter utom primers och template. Mastermix blandades enligt tabell 14 och proverna kördes med PCR-protokollet enligt tabell 15. En 1 %-ig agarosgel gjöts och proverna fick vandra på 90 volt i 40 minuter.

Tabell 14. *Komponenter till Mastermix*

<u>Komponent</u>	<u>Volym för 25 µL rxn</u>	<u>Slutlig koncentration</u>
Nuclease-fritt vatten	5,5 µL	
2 X PCRBIO Ultra Mix	12,5 µL	1X
10 µM Forward primer	1 µL	0,5 nM
10 µM Reverse primer	1 µL	0,5 nM
Template DNA	5 µL	

Tabell 15. *PCR-protokoll för konventionell PCR*

Initial denatuering	95 °C i 2 min
Denatuering	95 °C i 15 s
Annealing	55 °C i 15 s
Extension	72 °C i 15 s x 35

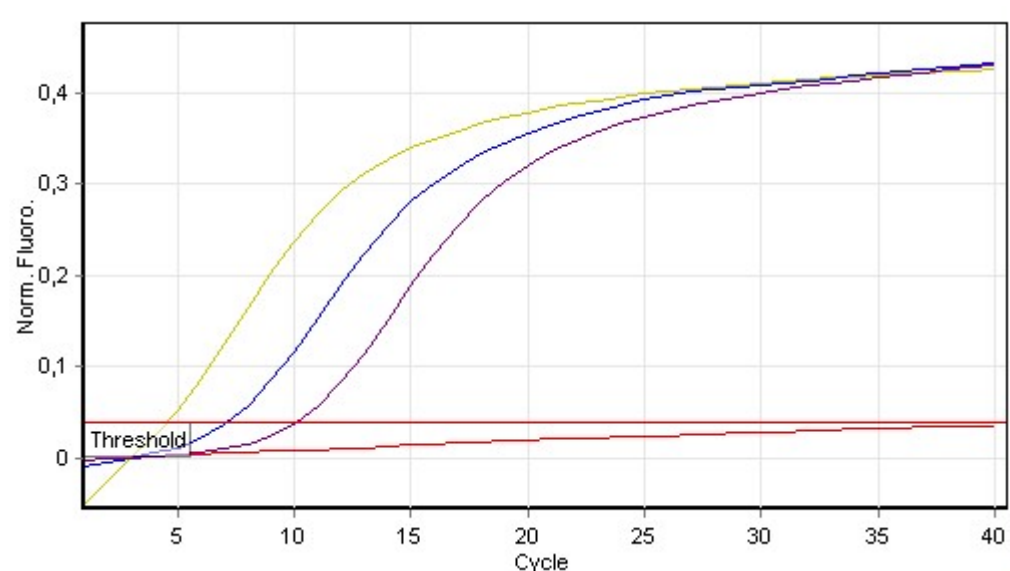
DNA-fragmenten renades sedan enligt tidigare metod med ”The GeneJet Gel Extraction Kit” för att skickas för sekvensering, tabell 10.

Fylogenetiska studier

När resultatet kommit tillbaka från sekvenseringen skapades en konsensussekvens med hjälp av programmet CodonCode genom att jämföra sekvenserna från respektive primer. Sekvensen jämfördes med andra nukleotidsekvenser från NCBI databas för att hitta likheter med andra felina morbillivirus. Ett fylogenetiskt träd skapades sedan genom maximum likelihood-metod med hjälp av programmet MEGA7. Trädet innehöll sekvensen från det svenska viruset och sekvenser från andra upptäckta felina morbillivirus samt andra paramyxovirus som hämtades från NCBI.

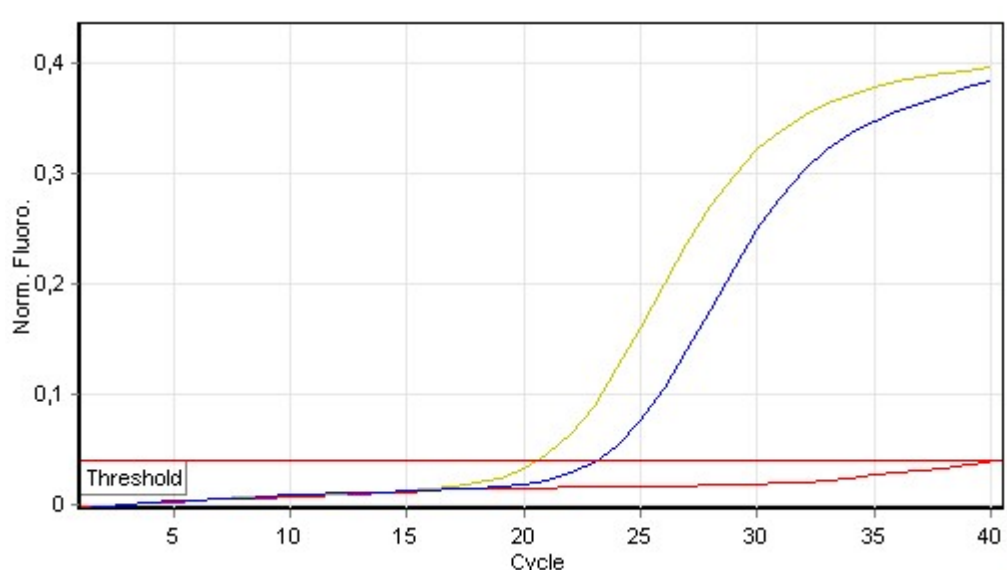
RESULTAT

Den positiva kontrollen kördes med realtids-PCR för att kontrollera optimal spädning. Spädningarna 1:10, 1:100 samt 1:1000 testades och resultatet visade att även vid högsta spädningen blev Ct-värdet väldigt lågt (10,08), se figur 1. Vidare späddes den positiva kontrollen ytterligare fyra respektive fem gånger från spädning 1:1000 och testades med realtids PCR. Resultatet visade då på ett acceptabelt Ct-värde (23,16) som användes i resten av försöken, se figur 2.



No.	Colour	Name	Type	Ct	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
1		Neg	Unknown					
2		Femv 1:10	Unknown	4,53		4,53		
3		Femv 1:100	Unknown	7,12		7,12		
4		Femv 1:1000	Unknown	10,08		10,08		

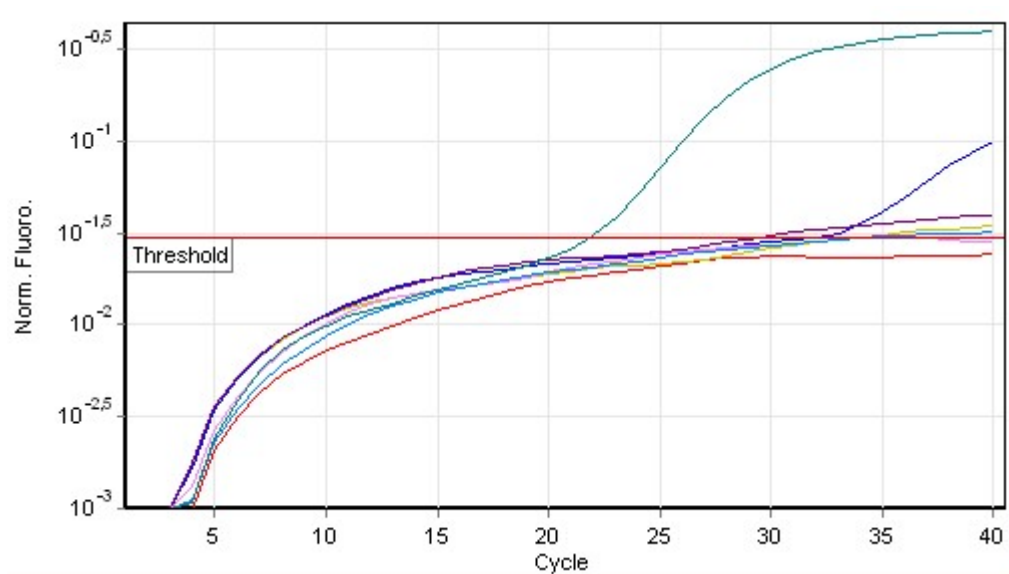
Figur 1. Realtids-PCR av positiv kontroll i olika spädningar.



No.	Colour	Name	Type	Ct	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
1		Neg	Unknown					
2		Femv 4	Unknown	20,70		20,70		
3		Femv 5	Unknown	23,16		23,16		

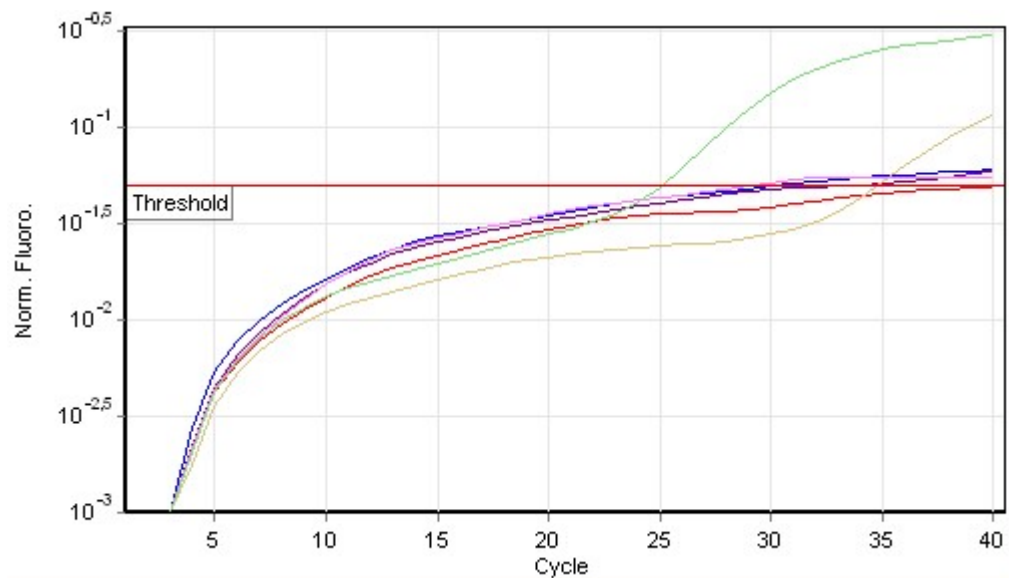
Figur 2. Realtids-PCR av positiv kontroll i ytterligare spädning.

Efter extraktion av RNA testades förekomst av felint morbillivirus i proverna med hjälp av realtids-PCR tillsammans med negativ och positiv kontroll i spädning enligt ovan. Positivt resultat påvisades vid analys av prov nr 8702282 samt prov nr 8703719, se figur 3 och 4. Dessa prover kördes med realtids-PCR ytterligare en gång och visade återigen positivt resultat. Eventuellt påvisades ett positivt resultat även för prov nr 8711644, dock med ett väldigt högt Ct-värde samt för provet vi kallar "Julius", dock med en väldigt flack kurva, se figur 5.



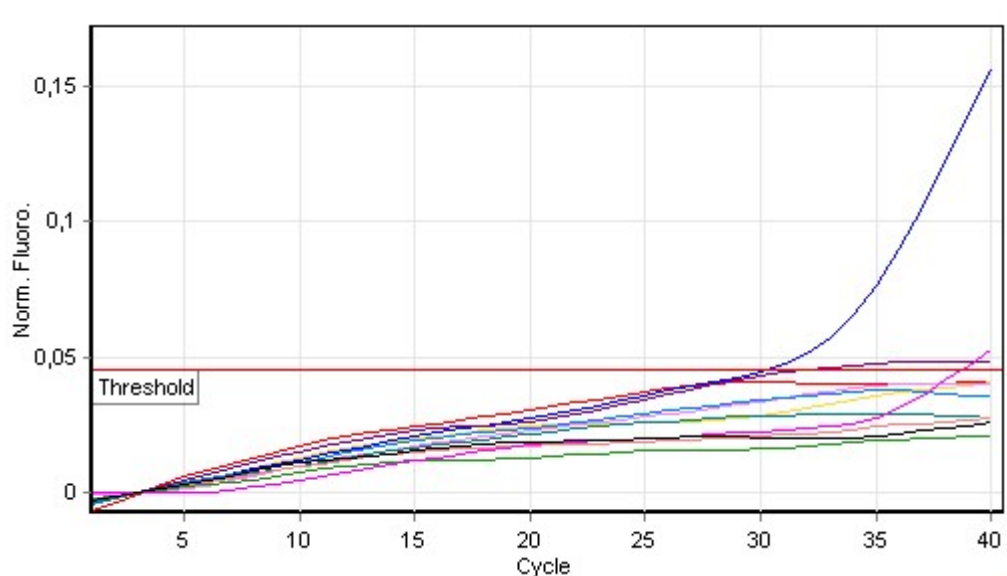
No.	Colour	Name	Type	Ct	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
1		Neg	Unknown					
2		Femv 8702375	Unknown	33,94		33,94		
3		Femv 8702282	Unknown	32,13		32,13		
4		Femv 8707822	Unknown	29,39		29,39		
5		Femv 8707606	Unknown					
6		Femv 8707753	Unknown	34,46		34,46		
7		Pos	Unknown	21,90		21,90		

Figur 3. Realtids-PCR av prover med positiv kontroll i turkost och prov nr 8702282 i blått som är positiv



No.	Colour	Name	Type	Ct	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
1		Neg	Unknown					
3		Femv 8705753	Unknown	30,32		30,32		
4		Femv 8709928	Unknown	33,98		33,98		
5		Femv 8702648	Unknown	28,99		28,99		
13		Femv 8703719	Unknown	34,79		34,79		
14		Pos	Unknown	25,06		25,06		

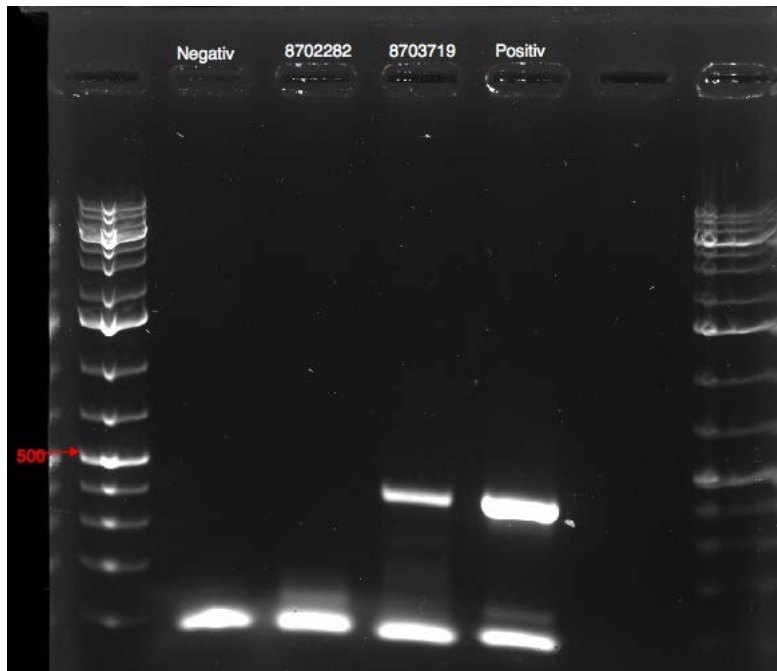
Figur 4. Realtids-PCR av prover med positiv kontroll i mintgrönt och prov nr 8703719 i beige som är positiv



No.	Colour	Name	Type	Ct	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct	Std. Dev.
1		Neg kontroll	Unknown					
2		Femv 8702282	Unknown					
3		Femv 8703719	Unknown	30,17		30,17		
4		Femv Julius	Unknown	31,44		31,44		
5		Femv 8712966	Unknown					
6		Femv 8713190	Unknown					
7		Femv 8712501	Unknown					
8		Femv 8713019	Unknown					
9		Femv 8711721	Unknown					
10		Femv 8711644	Unknown	38,62		38,62		
11		Femv 8711626	Unknown					

Figur 5. Realtids-PCR av prover med prov nr 8711644 i rosa med en sent stigande kurva, Julius i lila med en väldigt flack kurva och prov nr 8703719 i blått med brant stigande kurva.

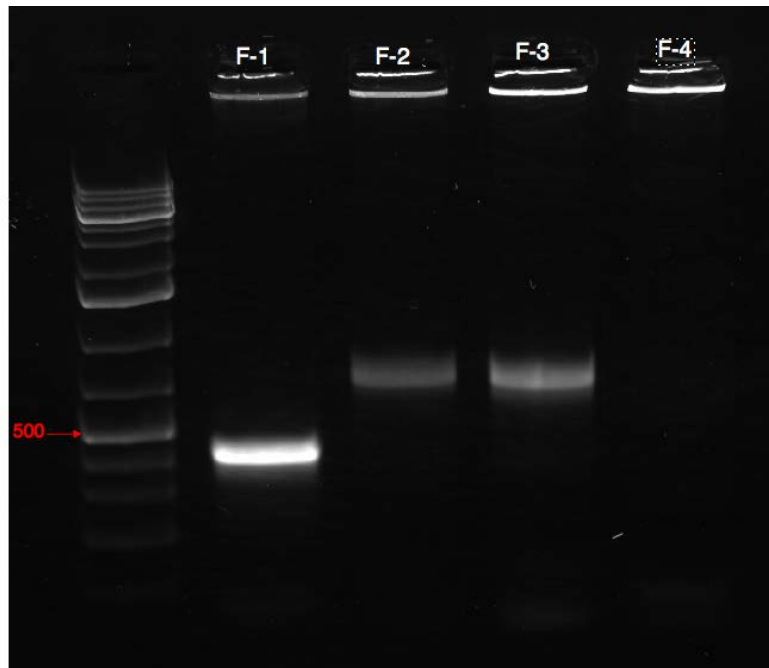
Positiva prover från realtids PCR testades vidare med hjälp av konventionell PCR och gelelektrofores. Ett tydligt band från prov nr 8703719 vid ca 401 bp kunde observeras vilket stämde väl överens med den positiva kontrollen, se figur 6.



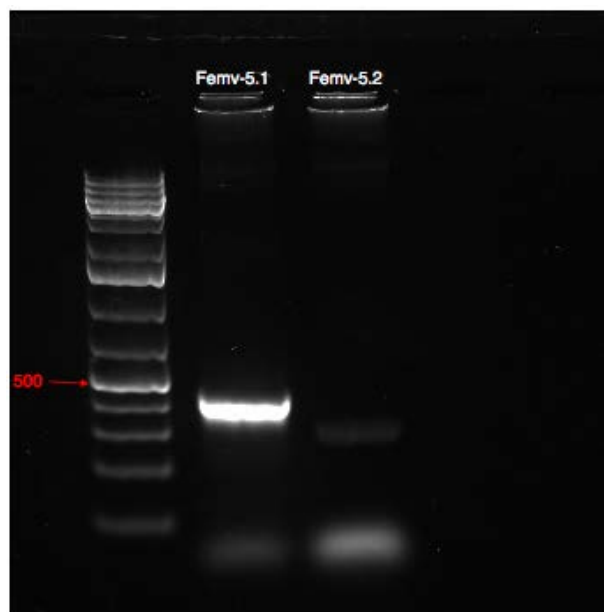
Figur 6. Agarosgel med tydligt band för prov nr 8203719.

Bandet för prov nr 8203719 skars ut och renades för att skickas iväg på sekvensering. Vid jämförelse med andra nukleotidsekvenser med hjälp av BLAST uppvisades 97 % likhet med ett flertal tidigare upptäckta stammar av felint morbillivirus, i bland annat Japan. E-värdet som representerar statistiska signifikansen för jämförelsen var väldigt nära 0.

Vidare testades primers för H-, P- och F-genen med konventionell PCR och gelelektrofores av prov nr 8203719 för sekvensering av en hel gen. Vid användning av olika primers som tillsammans täckte F-genen kunde band observeras vid korrekt storlek för respektive primer, se figur 7 och figur 8.

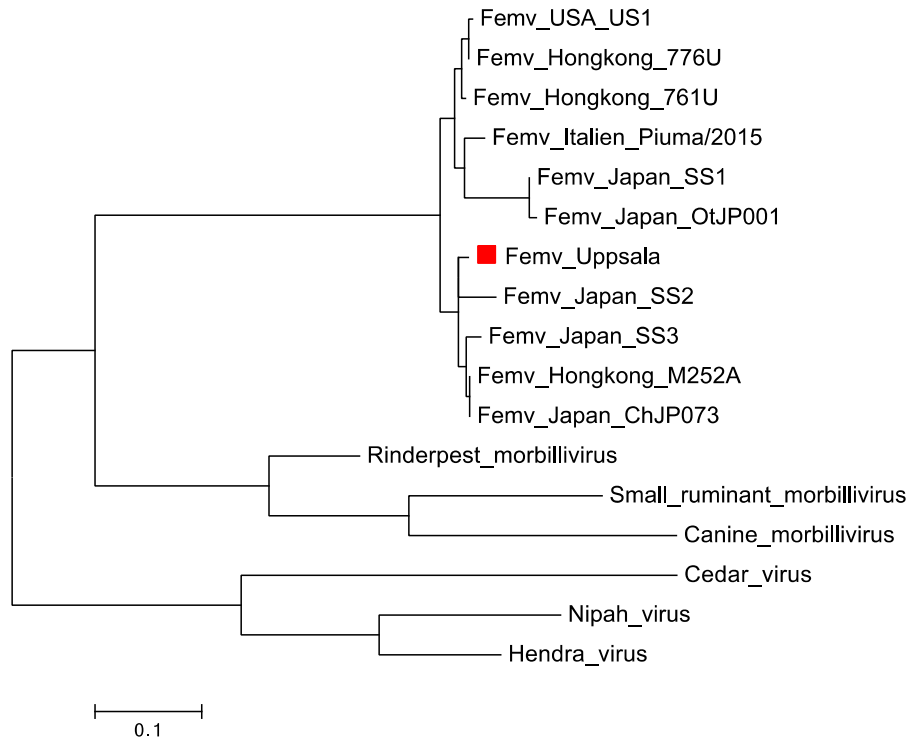


Figur 7. Agarosgel med band som täcker för *F*-genen utom den sista biten.



Figur 8. Agarosgel med band som täcker för den sista biten av *F*-genen

Banden skars ut och renades samt skickades iväg för sekvensering. Genen uppvisade 95 % likhet på nukleotidnivå med bland annat en stam upptäckt i Hongkong vid jämförelse i NCBI BLAST och E-värdet var 0. På proteinnivå uppvisades 98 % likhet med ett fusionsprotein från en japansk studie. Sekvensen fördes sedan in i ett fylogenetiskt träd tillsammans med andra felina morbillivirus, virus tillhörande genus *Morbillivirus* samt virus tillhörande genus *Henipavirus*, där vår sekvens visar nära släktskap med tidigare upptäckta stammar i Japan och Hongkong, se figur 9.



Figur 9. *Fylogenetiskt träd för F-genen med sekvensen för det svenska viruset (Femv_Uppsala) tillsammans med andra felina morbillivirus samt andra paramyxovirus.*

DISKUSSION

Felint morbillivirus är ett relativt nyupptäckt virus som först beskrevs hos katter i Hongkong år 2012 (Woo *et al.*, 2012). Förekomsten har sedan konstaterats i andra länder så som Japan, USA, Tyskland, Italien och Brasilien (Furuya *et al.*, 2014, Sharp *et al.*, 2016, Sieg *et al.*, 2015, Lorusso *et al.*, 2015, Darold *et al.*, 2016). Viruset tillhör familjen *Paramyxoviridae* (Lamb & Parks, 2013) men huruvida viruset tillhör genus morbillivirus eller inte är fortfarande inte helt klarlagt. Många studier menar att felint morbillivirus skiljer sig så pass mycket från morbillivirus att det ska räknas som en egen grupp och klassas som oklassificerade paramyxovirus. Studier har även jämfört felint morbillivirusstammars aminosyra- och nukleotidsekvenser från olika länder och observerat såväl likheter mellan virusstammar som olikheter och därmed konstaterat både en global distribution och en genetisk diversitet hos viruset.

I den här studien undersöktes förekomsten av felint morbillivirus i Sverige genom att samla in urinprover från katter på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala. Eftersom Paramyxovirus är RNA-virus (Lamb & Parks, 2013) måste det för molekylär detektion först kopieras till DNA. Den bästa diagnostiska metoden för att identifiera viruset i provmaterial är därför reverse transcriptase polymerase chain reaktion (RT-PCR) (Barret, 1999). De flesta studier har använt konventionell PCR vid detektion av viruset medan vi använde oss av realtids-PCR till en början för att sedan gå vidare med konventionell PCR av positiva prover. Enligt en studie av Furuya *et al.* (2015) där en realtids-PCR utvecklades för viruset, var sensitiviteten högre hos realtids-PCR jämfört med konventionell PCR och författarna menar också på att den här metoden är mer lämplig för analys av ett stort antal prover.

När det kommer till konventionell PCR med användning av agarosgel finns det några begränsningar. Konventionell PCR är en mer tidskrävande process eftersom den kräver gelelektrofores för att detektera nukleinsyror. Resultatet som erhålls från gelelektroforesen kommer ifrån slutet av reaktionen (end-point) medan Realtids-PCR samlar in data medan reaktionen fortfarande pågår, under den exponentiella fasen. De olika PCR-reaktionerna kommer att stanna av vid olika stadier vilket gör att mätningar vid end-point kommer att representera olika mängder jämfört med mätningar i den exponentiella fasen. Detta gör Realtids-PCR mer exakt.

I vårt fall fick vi positivt resultat på 4 prover efter Realtids-PCR men endast ett av dem var positivt efter konventionell PCR. Förutom att Realtids-PCR är mer sensitiv kan detta även förklaras av användningen av olika primers till de olika försöken. Till Realtids-PCR användes primers som genererar produkter på 121 bp medan primers som användes till konventionell PCR genererar produkter på 401 bp. PCR-produkterna vid konventionell PCR kan ha degraderats så att primern inte ha kunnat binda in och därmed visat ett negativt resultat. En annan förklaring kan vara RNA-virus tendens till att mutera, vilket gör att primersekvensen kan skilja sig för mycket från den sekvens som eftersöks. Om en mutation har skett kommer design av bra primers som verkligen binder försvåras och PCR:en kommer därmed inte att fungera.

Efter sekvensering av vårt positiva prov och efter jämförelse med andra nukleotidsekvenser uppvisades som mest 97 % likhet med andra felina morbillivirus, vilket talar för att det är felint morbillivirus vi har påvisat. E-värdet var väldigt nära 0 som gör att vi kan vara relativt säkra på att resultatet är signifikant. Efter sekvensering av hela F-genen samt jämförelse med andra nukleotidsekvenser uppvisades som mest 95 % likhet på nukleotidnivå (98 % likhet på proteinnivå) och E-värdet var 0, vilket talar för en lyckad sekvensering och ett signifikant resultat. När F-genen sedan fördes in i ett fylogenetiskt träd hamnade vår sekvens på samma gren som en stam från Hongkong (M252A) samt några stammar från Japan (SS2, SS3, ChJP073), vilket visar på ett närmre släktskap med dessa stammar än stammar från exempelvis USA och Italien som hamnade på en annan gren. Felint morbillivirus utgör alltså två grenar i trädets, vilket skulle kunna tyda på två olika genotyper av viruset. Utseendet på vårt fylogenetiska träd visar på att felint morbillivirus inte verkar vara geografiskt grupperat då två olika grupper bildades utan hänsyn till geografien. Att det finns en genetisk diversitet inom Europa har bland annat Marcacci *et al.* (2016) också konstaterat då europeiska stammar av felint morbillivirus hamnade i olika grupper. Även i andra studier har virusets heterogenitet kunnat påvisas, då exempelvis japanska stammar avvek från stammar från Hongkong (Sakaguchi *et al.*, 2014).

Det som tydligt kan observeras är att alla felina morbillivirus i trädets bildade en egen grupp frångående övriga morbillivirus men att de befann sig närmre genus *Morbillivirus* än genus *Henipavirus*, där endast ett avlägset släktskap kan observeras. Att felint morbillivirus bildar en egen avskild grupp men att det ändå är mest besläktat med andra morbillivirus stämmer överens med vad många tidigare studier har konstaterat. Diskussionen kvarstår därmed om viruset faktiskt är en ny medlem inom genus *Morbillivirus* eller om det helt enkelt ska räknas som ett oklassificerat paramyxovirus. Att det dessutom i Tyskland hittats tre olika grupper av felint morbillivirus (Sieg *et al.*, 2015) gör klassificeringen ytterligare mer komplicerad och detta är ett ämne som troligen kommer bli väl omdiskuterat.

Felint morbillivirus har konstaterats i länder runt om i världen och tycks vara en patogen som funnits hos våra katter ett tag, bara att dess existens tidigare inte varit känd. Resultatet från den här studien visar på att felint morbillivirus även förekommer hos katter i Sverige. Med tanke på att förekomsten påvisats i bland annat Tyskland vars avstånd till Sverige inte är så långt och att vi reser allt mer med våra katter är en påvisad virusförekomst i Sverige inte alls oväntad. Att vi endast hittade en individ med positivt resultat på både Realtids-PCR och konventionell PCR som vi kunde sekvensera, kan beror på flertal faktorer. Först och främst hade ett större provmaterial samt prover från fler platser i landet varit önskvärt för att öka chansen att fånga upp smittade individer. Vi vet inte heller om det fanns individer som varit smittad med viruset men som inte längre utsöndrade smittämnet i urinen och därmed uppvisade ett negativt resultat. Sub-optimal förvaring av prover kan också vara en faktor som har spelat roll. Efter Realtids-PCR hade vi några fler prover som såg positiva ut men som var negativa på konventionell PCR, vilket kan bero på användning av olika primers. Detta gör att det trots allt kan ha funnits fler individer som var viruspositiva. Förekomsten av felint morbillivirus i Sverige behöver dock undersökas vidare, gärna då med större provmaterial och från ett bredare område än endast Uppsalatrakten. Även att använda serologi för att detektera antikroppar skulle kunna vara ett bra komplement till PCR för att påvisa fler smittade katter. I vår studie lyckades vi sekvensera F-genen men det hade även varit önskvärt att sekvensera hela genomet för en bättre bild av viruset och för en mer detaljerad jämförelse med andra stammar.

I många av de studier där förekomsten av felint morbillivirus har påvisats har även sambandet mellan virusförekomst och kronisk njursjukdom undersökts. I de flesta studier kunde ett samband ses och mycket tyder på att viruset i alla fall har en bidragande roll när det kommer till njurskador (Woo *et al.*, 2012, Furuya *et al.*, 2014, Lorusso *et al.*, 2015, Sieg *et al.*, 2015). Det finns dock studier som inte har hittat något samband och där katterna haft andra infektioner som felint immunosuppressivt virus (FIV), som också kan relateras till njursjukdomar (Sakaguchi *et al.*, 2014, Darold *et al.*, 2016). Enligt journalen från vårt positiva prov var katten diagnostiserad med CKD. Dock hade vi bara ett prov att utgå ifrån så något samband går inte att påvisa. Katten hade även många andra sjukdomar så som FIV, hypertyreos och pankreatit vilket gör det desto mer svårtolkat.

Att det i andra studier har setts ett samband mellan virusförekomst och sjukdomen CKD tyder på en helt annan patogenes hos felint morbillivirus än övriga morbillivirus som oftast är respiratoriska (Chang & Dutch, 2012), vilket gör att virusets tillhörighet till morbillivirus ifrågasätts ytterligare. Att det finns ett potentiellt samband är högst intressant då CKD är ett vanligt hälsoproblem och en vanlig dödsorsak hos våra katter. I många av fallen förblir den bakomliggande orsaken okänd och möjligheten finns att felint morbillivirus ligger bakom en del av dessa katters njurproblematik. Att i så fall kunna utveckla ett vaccin mot viruset för att förebygga en av de vanligaste sjukdomarna hos katter hade varit högst önskvärt. När det kommer till andra kända morbillivirus är det just vaccination som är effektivast i att förebygga infektioner och många liv har räddats från exempelvis mässling tack vare bra vacciner (de Vries *et al.*, 2015). Även gällande sambandet med njursjukdom behövs fler studier, då det råder tveksamheter i en del studier.

I den här studien presenteras den första identifieringen av felint morbillivirus hos svenska katter. Resultatet från fylogenetisk analys av F-genen från det svenska viruset stämmer överens med vad tidigare studier har konstaterats vad gäller klassificering och genetisk diversitet. Vi lyckades endast identifiera och validera en smittad individ och fler studier behöver genomföras med ett större

provmaterial, för att bättre undersöka prevalensen, riskfaktorer och ett eventuellt samband med kronisk njursjukdom.

REFERENSER

- Barrett, T., 1999. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology* 69, 3–13.
- Bartges, J.W., 2012. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 42, 669–692, vi. doi:10.1016/j.cvsm.2012.04.008
- Chakrabarti, S., Syme, H.M., Elliott, J., 2012. Clinicopathological variables predicting progression of azotemia in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26, 275–281. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00874.x
- Chang, A., Dutch, R.E., 2012. Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End. *Viruses* 4, 613–636. doi:10.3390/v4040613
- Darold, G.M., Alfieri, A.A., Muraro, L.S., Amude, A.M., Zanatta, R., Yamauchi, K.C.I., Alfieri, A.F., Lunardi, M., 2017. First report of feline morbillivirus in South America. *Archives of Virology* 162, 469–475. doi:10.1007/s00705-016-3124-0
- de Vries, R.D., Duprex, W.P., de Swart, R.L., 2015. Morbillivirus Infections: An Introduction. *Viruses* 7, 699–706. doi:10.3390/v7020699
- DiBartola, S.P., Rutgers, H.C., Zack, P.M., Tarr, M.J., 1987. Clinicopathologic findings associated with chronic renal disease in cats: 74 cases (1973-1984). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 190, 1196–1202.
- Eaton, B.T., Broder, C.C., Middleton, D., Wang, L.-F., 2006. Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. *Nature Reviews Microbiology* 4, 23–35. doi:10.1038/nrmicro1323
- Furuya, T., Sassa, Y., Omatsu, T., Nagai, M., Fukushima, R., Shibutani, M., Yamaguchi, T., Uematsu, Y., Shiota, K., Mizutani, T., 2014. Existence of feline morbillivirus infection in Japanese cat populations. *Archives of Virology* 159, 371–373. doi:10.1007/s00705-013-1813-5
- Furuya, T., Wachi, A., Sassa, Y., Omatsu, T., Nagai, M., Fukushima, R., Shibutani, M., Yamaguchi, T., Uematsu, Y., Shiota, K., Mizutani, T., 2015. Quantitative PCR detection of feline morbillivirus in cat urine samples. *Journal of Veterinary Medical Science* 77, 1701–1703. doi:10.1292/jvms.15-0112
- Han, G.-Z., Liu, X.-P., Li, S.-S., 2008. Cross-species recombination in the haemagglutinin gene of canine distemper virus. *Virus Research* 136, 198–201. doi:10.1016/j.virusres.2008.04.022
- IRIS. 2015. *IRIS Staging of CKD*. IRIS. http://www.iris-kidney.com/pdf/003-5559.001-iris-website-staging-of-ckd-pdf_220116-final.pdf#page=7 (Hämtad 2017-09-16)
- Koide, R., Sakaguchi, S., Miyazawa, T., 2015. Basic biological characterization of feline morbillivirus. *Journal of Veterinary Medical Science* 77, 565–569. doi:10.1292/jvms.14-0623
- Kryazhimskiy, S., Plotkin, J.B., 2008. The Population Genetics of dN/dS. *PLOS Genetics* 4. doi:10.1371/journal.pgen.1000304
- Lamb, R.A., Parks, G.D., 2013. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology* 6, 957–995.
- Lorusso, A., Di Tommaso, M., Di Felice, E., Zaccaria, G., Luciani, A., Marcacci, M., Aste, G., Boari, A., Savini, G., 2015. First report of feline morbillivirus in Europe. *Veterinaria Italiana* 51, 235–237. doi:10.12834/VetIt.833.4136.2
- Ludlow, M., Rennick, L.J., Nambulli, S., de Swart, R.L., Duprex, W.P., 2014. Using the ferret model to study morbillivirus entry, spread, transmission and cross-species infection. *Current Opinion in Virology* 4, 15–23. doi:10.1016/j.coviro.2013.11.001

- Marcacci, M., De Luca, E., Zaccaria, G., Di Tommaso, M., Mangone, I., Aste, G., Savini, G., Boari, A., Lorusso, A., 2016. Genome characterization of feline morbillivirus from Italy. *Journal of Virological Methods* 234, 160–163. doi:10.1016/j.jviromet.2016.05.002
- Marino, C.L., Lascelles, B.D.X., Vaden, S.L., Gruen, M.E., Marks, S.L., 2014. Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16, 465–472. doi:10.1177/1098612X13511446
- McLeland, S.M., Cianciolo, R.E., Duncan, C.G., Quimby, J.M., 2015. A Comparison of Biochemical and Histopathologic Staging in Cats With Chronic Kidney Disease. *Veterinary Pathology* 52, 524–534. doi:10.1177/0300985814561095
- Park, E.-S., Suzuki, M., Kimura, M., Maruyama, K., Mizutani, H., Saito, R., Kubota, N., Furuya, T., Mizutani, T., Imaoka, K., Morikawa, S., 2014. Identification of a natural recombination in the F and H genes of feline morbillivirus. *Virology* 468, 524–531. doi:10.1016/j.virol.2014.09.003
- Park, E.-S., Suzuki, M., Kimura, M., Mizutani, H., Saito, R., Kubota, N., Hasuike, Y., Okajima, J., Kasai, H., Sato, Y., Nakajima, N., Maruyama, K., Imaoka, K., Morikawa, S., 2016. Epidemiological and pathological study of feline morbillivirus infection in domestic cats in Japan. *BMC Veterinary Research* 12, 228. doi:10.1186/s12917-016-0853-y
- Poli, A., Tozon, N., Guidi, G., Pistello, M., 2012. Renal Alterations in Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-Infected Cats: A Natural Model of Lentivirus-Induced Renal Disease Changes. *Viruses* 4, 1372–1389. doi:10.3390/v4091372
- Reynolds, B.S., Lefebvre, H.P., 2013. Feline CKD: Pathophysiology and risk factors — what do we know? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15, 3–14. doi:10.1177/1098612X13495234
- Sakaguchi, S., Koide, R., Miyazawa, T., 2015. *In vitro* host range of feline morbillivirus. *Journal of Veterinary Medical Science* 77, 1485–1487. doi:10.1292/jvms.15-0213
- Sakaguchi, S., Nakagawa, S., Yoshikawa, R., Kuwahara, C., Hagiwara, H., Asai, K., Kawakami, K., Yamamoto, Y., Ogawa, M., Miyazawa, T., 2014. Genetic diversity of feline morbilliviruses isolated in Japan. *Journal of General Virology* 95, 1464–1468. doi:10.1099/vir.0.065029-0
- Sato, H., Yoneda, M., Honda, T., Kai, C., 2012a. Morbillivirus Receptors and Tropism: Multiple Pathways for Infection. *Frontiers in Microbiology* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00075
- Sato, H., Yoneda, M., Honda, T., Kai, C., 2012b. Morbillivirus Receptors and Tropism: Multiple Pathways for Infection. *Frontiers in Microbiology* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00075
- Sharp, C.R., Nambulli, S., Acciardo, A.S., Rennick, L.J., Drexler, J.F., Rima, B.K., Williams, T., Duprex, W.P., 2016. Chronic Infection of Domestic Cats with Feline Morbillivirus, United States. *Emerging Infectious Diseases* 22, 760–762. doi:10.3201/eid2204.151921
- Sieg, M., Heenemann, K., Rückner, A., Burgener, I., Oechtering, G., Vahlenkamp, T.W., 2015. Discovery of new feline paramyxoviruses in domestic cats with chronic kidney disease. *Virus Genes* 51, 294–297. doi:10.1007/s11262-015-1232-7
- Smith, E.C., Popa, A., Chang, A., Masante, C., Dutch, R.E., 2009. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS Journal* 276, 7217–7227. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07401.x
- Syme, H.M., 2009. Proteinuria in cats. Prognostic marker or mediator? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 211–218. doi:10.1016/j.jfms.2009.01.003

- Tatsuo, H., Yanagi, Y., 2002. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiology and Immunology* 46, 135–142.
- Truyen, U., 2006. Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines? *Veterinary Microbiology* 117, 9–13. doi:10.1016/j.vetmic.2006.04.003
- von Messling, V., Milosevic, D., Devaux, P., Cattaneo, R., 2004. Canine Distemper Virus and Measles Virus Fusion Glycoprotein Trimers: Partial Membrane-Proximal Ectodomain Cleavage Enhances Function. *Journal of Virology* 78, 7894–7903. doi:10.1128/JVI.78.15.7894-7903.2004
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Wong, B.H.L., Fan, R.Y.Y., Wong, A.Y.P., Zhang, A.J.X., Wu, Y., Choi, G.K.Y., Li, K.S.M., Hui, J., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.H., Yuen, K.-Y., 2012. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 5435-5440. Doi:10.1073/pnas.1119972109

