



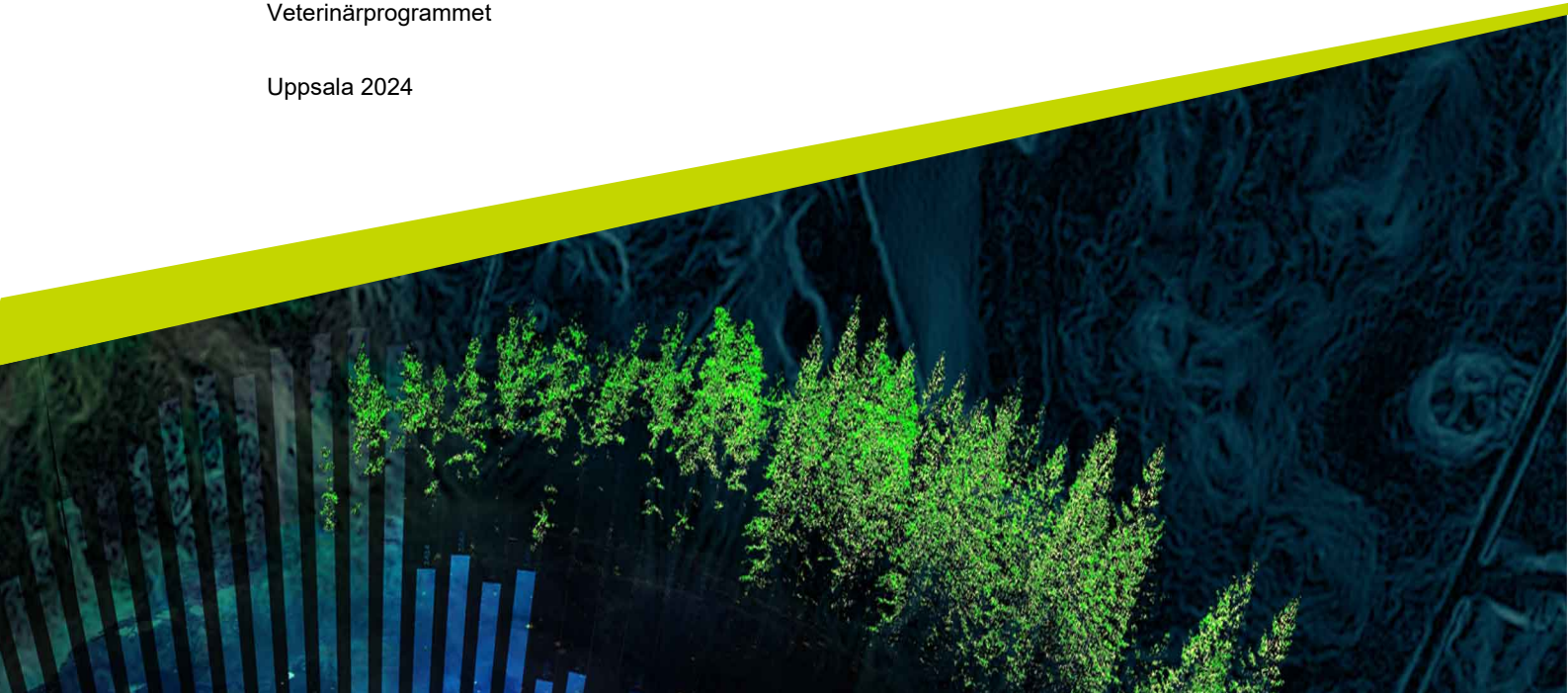
Förekomst av rustrelavirus hos katter med vingelsjuka

En immunohistokemisk undersökning av arkiverat material från de senaste fem decennierna

Emma Thilén

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Uppsala 2024



Förekomst av rustrelavirus hos katter med vingelsjuka - en immunohistokemisk undersökning av arkiverat material från de senaste fem decennierna

Presence of rustrela virus in cats with staggering disease - an immunohistochemical study of archived material from the last five decades

Emma Thilén

Handledare:	Cecilia Ley, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Bitr. handledare:	Sofia Tengstrand, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Bitr. handledare:	Jonas Wensman, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper, samt Statens veterinärmedicinska anstalt
Examinator:	Karin Vargmar, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2024
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd

Nyckelord:	Katt, vingelsjuka, rustrelavirus, icke-suppurativ meningoencefalomyelit, Sverige
-------------------	--

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Vingelsjuka hos katt är en allvarlig neurologisk sjukdom som ofta har dödlig utgång. Sjukdomen har rapporterats i Sverige sedan början av 1970-talet, huvudsakligen i området runt Mälaren. Nyligen har det nyupptäckta RNA-viruset rustrelavirus (RusV) föreslagits som sjukdomsorsak, då det har detekterats i det centrala nervsystemet (CNS) hos katter vilka drabbats av vingelsjuka. Inga studier har undersökt förekomst av viruset i perifera organ från katter och det är än så länge oklart hur viruset sprids. Syftet med den här studien var att undersöka hur många katter med potentiell vingelsjuka som har obducerats vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) mellan 1970–2019, huruvida RusV funnits och infekterat katter med vingelsjuka i Sverige sedan 1970-talet då sjukdomen först rapporterades, samt huruvida RusV kan påvisas i perifera organ hos infekterade katter.

I detta arbete har följande saker gjorts: en sammanställning av antalet katter vilka potentiellt haft vingelsjuka baserat på sektionsdiagnosen, obducerade vid SLU mellan 1970–2019; en immunohistokemisk undersökning av hjärna och ryggmärg för förekomst av RusV från katter med sektionsdiagnosen icke-suppurativ meningoencefalomyelit och från kontrollfall, samtliga obducerade vid SLU under de senaste fem decennierna; samt en immunohistokemisk undersökning av perifera organ för förekomst av RusV från katter med bekräftad RusV-infektion i CNS.

Totalt hittades 410 fall vilka haft en sektionsdiagnos som kan indikera vingelsjuka och 14 av dessa valdes slumpmässigt ut till immunohistokemisk undersökning för RusV i CNS. Av dessa uppvisade 13 katter en icke-suppurativ inflammation samt var RusV-positiva i CNS. En av de 14 katterna var morfologiskt felklassificerad och RusV-negativ. Kontrollkatterna uppvisade negativa eller osäkra resultat för RusV i CNS. RusV kunde inte detekteras i perifera organ, förutom en positivt inmärkt cell i vävnad från tunntarmen hos en katt. Inga slutsatser kunde dras angående möjliga smittvägar utifrån undersökningen av perifera organ.

För första gången visas härmed att RusV funnits i Sverige och infekterat katter från 1970-talet och framåt.

Nyckelord: katt, vingelsjuka, rustrelavirus, icke-suppurativ meningoencefalomyelit, Sverige

Abstract

Staggering disease in cats is a severe neurological disease that often ends in death. In Sweden, staggering disease has been reported since the beginning of the 1970s, mainly in the area around Lake Mälaren. Recently, the newly discovered RNA-virus rustrela virus (RusV) was suggested as the causative agent, since it could be detected in the central nervous system (CNS) in cats with staggering disease. Hitherto, no study has investigated the presence of RusV in extraneural tissues in cats and possible transmission routes remain unknown. This study aimed to investigate the number of cats with potential staggering disease that have been examined postmortem at the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) between 1970–2019, if RusV has been present in cats with staggering disease in Sweden since the disease was first reported in the 1970s, and if RusV can be detected in extraneural tissues of infected cats.

In this retrospective study the following investigations were made: a compilation of the number of cats with possible staggering disease based on the postmortem diagnosis, examined at SLU between 1970–2019; an immunohistochemical investigation for RusV in brain and spinal cord from cats with the diagnosis non-suppurative meningoencephalomyelitis and from control cats, all examined postmortem at SLU during the last five decades; and an immunohistochemical investigation for RusV in extraneural tissues from cats with previously confirmed RusV infection in the CNS.

In total, 410 cases with a diagnosis that could indicate staggering disease were found and 14 of these were randomly selected for immunohistochemical investigation for RusV in the CNS. Of these, 13 cats showed non-suppurative inflammation and were also RusV-positive. One of the 14 cats was morphologically misclassified and RusV-negative. The control cats were negative or showed uncertain results for RusV. RusV was not detected in extraneural tissues, with the exception of a single positively stained cell in the small intestine from one cat. No conclusions could be made regarding potential routes of transmission based on the extraneural tissue investigation.

This study shows, for the first time, that RusV has existed in Sweden and infected cats as far back as the 1970s.

Keywords: cat, staggering disease, rustrela virus, non-suppurative meningoencephalomyelitis, Sweden

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	9
Figurförteckning	10
Förkortningar	12
1. Inledning och syfte	13
2. Litteraturöversikt.....	15
2.1 Inflammation i CNS	15
2.1.1 Inflammation i CNS vid infektion med RNA-virus	16
2.1.2 Histologiska kännetecken för inflammation i CNS.....	16
2.2 Meningoencefalomyelit hos katt.....	17
2.3 Virala infektioner i CNS och patogenes	18
2.4 Vingelsjuka.....	19
2.4.1 Morfologiska förändringar	20
2.4.2 Diskuterade etiologier	20
2.4.3 Rustrelavirus	21
2.5 Immunohistokemi som metod för detektion av antigen i histologiska vävnadspreparat	23
2.5.1 Metoder för att säkerställa ett tillförlitligt resultat	24
2.5.2 Validering av resultat	24
3. Material och metod	26
3.1 Litteraturöversikt.....	26
3.2 Sammanställning av fall obducerade vid SLU mellan 1970–2019	26
3.3 Urval av fall för histopatologisk och immunohistokemisk undersökning.....	27
3.3.1 Undersökning av hjärna och ryggmärg från katter med okänd RusV-status	27
3.3.2 Undersökning av perifera organ från katter med känd positiv RusV-status	28
3.4 Histologisk preparering samt färgning av vävnadsmaterial	28
3.5 Bedömning av snitt	29
3.5.1 Bedömning av grad av inflammation	29
3.5.2 Bedömning av förekomst av RusV	30

4. Resultat	31
4.1 Sammanställning av fall obducerade vid SLU mellan 1970–2019	31
4.1.1 Antal fall fördelat per decennium	32
4.2 Undersökning av CNS från katter med okänd RusV-status	33
4.2.1 Demografiska data	33
4.2.2 Förekomst av inflammatoriska celler och grad av inflammation	35
4.2.3 Förekomst av RusV	39
4.3 Undersökning av perifera organ från katter med känd positiv RusV-status	45
5. Diskussion	46
5.1 Sammanställning av fall obducerade vid SLU mellan 1970–2019	46
5.2 Histologisk undersökning av CNS från katter med vingelsjuka obducerade mellan 1970–2016	47
5.2.1 Förekomst av inflammatoriska celler och gradering av inflammation	48
5.2.2 Förekomst av RusV	49
5.2.3 Samband mellan inflammationsgrad och förekomst av RusV	51
5.2.4 Begränsningar	52
5.3 Förekomst av RusV i perifera organ hos katter med känd positiv RusV-status i CNS	53
6. Slutsats	55
Referenser	56
Populärvetenskaplig sammanfattning	60
Tack	62
Bilaga 1	63
Protokoll för immunohistokemi med antikropp mot RusV	63
Reagenser	64
Bilaga 2	65
Noteringar kring individuella katters SD	65

Tabellförteckning

Tabell 1. Mikroskopisk bedömning av inflammationsgrad, baserat på protokoll från Matiassek <i>et al.</i> (2023).	30
Tabell 2. Mikroskopisk bedömning av förekomst av rustrelavirus i CNS, baserat på protokoll från Matiassek <i>et al.</i> (2023). Grad 1 till 3 tolkas som ett positivt resultat.	30
Tabell 3. Signalement, kliniska fynd och sjukdomsduration hos katterna med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit och okänd RusV-status. Kastr. = kastrerad.	34
Tabell 4. Signalement och SD hos katterna i kontrollgruppen.	35
Tabell 5. Bedömning av inflammationsgrad hos katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit.	36
Tabell 6. Andel katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit med lindrig, måttlig, respektive kraftig inflammationsgrad.	36
Tabell 7. Grad av inmärkning för RusV hos katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit.	40
Tabell 8. Grad av inmärkning för RusV hos katterna i kontrollgruppen.	44
Tabell 9. Bedömning av förekomst av RusV i perifera organ hos katter med känd positiv RusV-status. Neg. = negativ; E.u. = ej undersökt. Inm. = inmärkning.....	45

Figurförteckning

Figur 1. Schematisk bild av immunohistokemiska metoder. A: indirekt tvåstegsmetod. B: indirekt tvåstegsmetod med pepparrotsperoxidasmärkt polymerkedja. Figur av David Saulesco.	24
Figur 2. Katter med SD vilken kan tänkas vara associerad med vingelsjuka, obducerade på SLU mellan 1970–2019. *Övriga diagnoser inkluderar fall med följande SD: icke-suppurativ meningit (6 katter), icke-suppurativ spinal meningit (1 katt), icke-suppurativ meningomyelit (3 katter), icke-suppurativ myelit (1 katt), akut meningoencefalit (1 katt), samt lymfoplasmacytär meningo-encefalomyelit (1 katt).	31
Figur 3. Antal katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vingelsjuka, eller felin ataxi.	32
Figur 4. Antal katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vingelsjuka eller felin ataxi mellan 1980–2009.	33
Figur 5. Översiktsskild av storhjärna från O405/09. Inflammatoriska cellinfiltrat ses i grå substans (pilar). Vit substans markerad med stjärnor. HE-färgat preparat.	37
Figur 6. Exempelbild på lindrig inflammationsgrad med små inflammatoriska cellinfiltrat, 1–2 cellager i tjocklek. HE-färgat preparat.	37
Figur 7. Exempelbild på måttlig inflammationsgrad med medelstort inflammatoriskt cellinfiltrat, 3–5 cellager i tjocklek. HE-färgat preparat.	38
Figur 8. Exempelbild på kraftig inflammationsgrad med stora inflammatoriska cellinfiltrat, i detta fall cirka 8–15 cellager i tjocklek. HE-färgat preparat.	38
Figur 9. Lillhjärna från O373/78. Inflammatoriskt cellinfiltrat i lillhjärnans meninger (pilar). HE-färgat preparat.	39
Figur 10. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Ryggmärg från positiv kontroll (O10/17). Distinkt positiv (brun) inmärkning ses i flertalet neuron.	41
Figur 11. Ryggmärg från positiv kontroll (O10/17), behandlad med buffert i stället för primär antikropp. Ingen inmärkning påvisad.	41

Figur 12. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Storhjärna från negativ kontroll (kontroll 5.2). Ingen inmärkning påvisad.	42
Figur 13. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Exempelbild på inmärkning grad 3, storhjärna från O219/03. Distinkt positiv (brun) inmärkning i flertalet neuron.	42
Figur 14. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Exempelbild på inmärkning grad 2, ryggmärg från O857/83. Svag positiv (brun) inmärkning i flertalet neuron.	43
Figur 15. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Exempelbild på inmärkning grad 1, lillhjärna från O176/04. En enstaka purkinjecell med positiv (brun) inmärkning.	43
Figur 16. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Lillhjärna från O104/80 med små bruna granula i cytoplasman i ett fåtal purkinjeceller (pilar), osäkert resultat.	44

Förkortningar

APC	Antigenpresenterande celler
BBB	Blod-hjärnbarriären (Blod-Brain Barrier)
BDV	Bornavirus (Borna Disease Virus)
BVF	Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
CNS	Centrala nervsystemet
DAB	3,3'-diaminobenziden tetrahydrochlorid
DAMP	Damage-associated molecular patterns
FCoV	Felint coronavirus
FeLV	Felint leukemivirus
FIP	Felin infektiös peritonit
HE	Hematoxylin-eosin
IHC	Immunohistokemi
ISH	In situ-hybridisering
MHCII	Major histocompatibility complex II
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PRR	Pattern recognition receptors
PCR	Polymerase chain reaction
RT-qPCR	Reverse transcript quantity polymerase chain reaction
RusV	Rustrelavirus
SD	Sektionsdiagnos
SF	Sektionsfynd
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
TLR	Toll-likareceptorer
TNF	Tumörnekrosfaktor

1. Inledning och syfte

Vingelsjuka (staggering disease) hos katt beskrevs för första gången i Sverige i början av 1970-talet (Kronevi *et al.* 1974). Efter denna rapport började sjukdomen uppmärksammas i flera delar av Sverige, men i huvudsak i Uppland och runt Mälaren (Lundgren & Ludwig 1993). Förekomst av sjukdomen har även beskrivits i flera andra länder (Vandevelde & Braund 1979; Hoff & Vandevelde 1981; Nowotny & Weissenböck 1995). I till exempel Österrike upptäcktes flera fall av katter med tecken på vingelsjuka under 1990-talet, men förekomsten minskade sedan gradvis under 2000-talet (Weiss *et al.* 2023).

Sjukdomsbilden karaktäriseras av följande symtom: bakbensataxi som senare i sjukdomsförloppet kan övergå till parapares; feber; depression; anorexi; smärta från lumbosakralregionen; oförmåga att dra in klorna; samt beteendeförändringar, som exempelvis ökad vokalisering eller ökad tillgivenhet (Lundgren 1992). De flesta katter som drabbas av vingelsjuka avlivas på grund av sänkt livskvalitet (Wensman *et al.* 2012).

Den histopatologiska bilden som ses i det centrala nervsystemet (CNS) vid vingelsjuka karaktäriseras av en icke-suppurativ inflammation (Lundgren 1992) och är förenlig med virusinfektion (Summers *et al.* 1995). Genom åren har flera möjliga etiologier diskuterats och undersökts (Lundgren 1992; Schwab *et al.* 2007), och i två nyligen publicerade studier har rustrelavirus (RusV) påvisats i CNS hos katter med vingelsjuka (Matiassek *et al.* 2023; Weiss *et al.* 2023). Detta indikerar att RusV är en orsak till vingelsjuka. Förekomsten av RusV har undersökts hos katter från Sverige mellan 2017–2022 (Matiassek *et al.* 2023), men huruvida RusV är associerat även med tidigare fall har ej undersökts. Potentiella smittvägar för RusV hos katt, eller förekomst av viruset i andra organ utanför CNS, har inte heller undersökts.

Detta arbete har tre syften. Det första är att göra en sammanställning av antal katter, obducerade på SLU mellan 1970–2019, med en sektionsdiagnos (SD) antingen tydande på vingelsjuka eller vilken potentiellt skulle kunna vara associerad med vingelsjuka. Det andra syftet är att undersöka RusV som en möjlig orsak till vingelsjuka hos katt i Sverige från 1970-talet och framåt. Detta genom att göra en immunohistokemisk undersökning av vävnad från hjärna och ryggmärg för förekomst av RusV från katter obducerade på SLU mellan 1970–2016, vilka uppvisat histopatologiska förändringar som tyder på vingelsjuka. Det tredje syftet är att undersöka förekomst av RusV i perifera organ från katter med känd positiv RusV-status. Dessa katter obducerades på SLU mellan 2017–2022 och har ingått i en studie där förekomst av RusV påvisats i CNS (Matiassek *et al.* 2023). Frågeställningarna som kommer att undersökas i detta arbete är:

- Hur många katter, vilka obducerats på SLU mellan 1970–2019, har haft inflammatoriska förändringar i CNS av den typ som ses vid vingelsjuka?
- Har förekomsten av obducerade katter med tecken på vingelsjuka varierat över tid under de senaste fem decennierna?
- Kan RusV påvisas i hjärna och ryggmärg hos katter som obducerats på SLU under de senaste fem decennierna och vilka uppvisat histopatologiska förändringar i CNS som tyder på vingelsjuka?
- Går det att se något samband mellan grad av inflammation och förekomst av RusV i CNS?
- Kan RusV påvisas i perifera organ hos katter som är RusV-positiva i CNS?

2. Litteraturöversikt

2.1 Inflammation i CNS

Inflammation är en livsavgörande försvarsmekanism (Zachary 2022). Oavsett lokalisation i kroppen uppstår inflammation som en reaktion på någon form av skada, vilken exempelvis kan vara orsakad av ett infektiöst agens, mekaniskt trauma, värme, kyla, strålning eller cancerceller.

Immunsystemet har som funktion att övervaka förekomsten av patogener eller okända celler i kroppens olika organsystem, men på vissa punkter skiljer sig inflammation i nervsystemet från övriga delar av kroppen (Summers *et al.* 1995).

En viktig skillnad är att blod-hjärnbarriären (BBB) hindrar att olika komponenter i cirkulationen får tillträde till CNS-parenkymet (Summers *et al.* 1995). Immunceller patrullerar normalt i parenkymets angränsande delar, alltså i meningerna, det perivaskulära utrymmet, samt *plexus choroideus* (Herz *et al.* 2017). Vid sjukliga tillstånd i CNS kan dock immunceller, som monocyter, neutrofiler och lymfocyter (T- och B-celler), bryta sig igenom BBB och infiltrera CNS-parenkymet för att utöva ett cellmedierat immunsvaret (Prinz & Priller 2017).

En annan aspekt som särskiljer nervsystemet från andra vävnader är avsaknad av inneboende antigenpresenterande celler (APC) (Summers *et al.* 1995). Man har visat att mikroglia, vilka är de enda stationära leukocyterna i CNS, inte uttrycker major histocompatibility complex II (MHCII) när organsystemet är i homeostas (Mundt *et al.* 2019). Detsamma gäller även för astrocyter, pericyter, endotelceller och neuron. Man vet emellertid att mikroglia kan ändra fenotyp vid närvaro av så kallade pathogen-associated molecular patterns (PAMP) eller damage-associated molecular patterns (DAMP) och då börja uttrycka MHCII, vilket tyder på att mikroglia kan interagera med T-celler. Eftersom mikroglia ligger isolerade inne i hjärnparenkymet är det dock inte möjligt att de är delaktiga i den initiala aktiveringen av T-cellerna, utan uppregleringen av MHCII är antagligen snarare en konsekvens av inflammation.

Ytterligare en aspekt som särskiljer CNS från övriga delar av kroppen vid inflammation är att det saknas ett konventionellt lymfatiskt system (Summers *et al.* 1995). I stället har ett system, kallat det glymfatiska systemet, beskrivits (Jessen *et al.* 2015). Det fungerar så att cerebrospinalvätskan (CSF) tar sig in i parenkymet via de periarteriella utrymmena, flödar sedan genom parenkymet mot och in i de perivenösa utrymmena, varifrån vätskan sedan dräneras till de cervikala lymfknutorna.

2.1.1 Inflammation i CNS vid infektion med RNA-virus

I en review-artikel diskuteras olika mekanismer vid inflammation i CNS under infektion med RNA-virus (Klein *et al.* 2019). Vid en infektion med ett RNA-virus i CNS aktiveras det medfödda immunförsvaret genom igenkänning av PAMP via pattern recognition receptors (PRR) och toll-likareceptorer (TLR), vilket leder till uttryck av cytokiner som exempelvis typ I-interferon, tumörnekrosfaktor (TNF), samt interleukin 1 och interleukin 6. När det gäller RNA-virus utgörs PAMP huvudsakligen av enkel- eller dubbelsträngade RNA-sekvenser som antingen redan finns i det virala genomet, eller genereras under tiden för infektion. Cytokinerna som produceras hjälper till i rekryteringen av mononukleära celler för bekämpning av virusinfektionen, men kan även orsaka skada som påverkar neuronal funktion och regeneration. På grund av att CNS har begränsad förmåga till reparation måste T- och B-cellssvaret vara noggrant reglerat; T-hjälparceller, cytotoxiska T-celler samt regulatoriska T-celler är alla del av detta cellsvaret.

2.1.2 Histologiska kännetecken för inflammation i CNS

De viktigaste kännetecknen för inflammation i CNS är perivaskulära manschetter; glios; samt neuronal satellitos och neuronofagi (Summers *et al.* 1995). Vissa mer ovanligt förekommande inflammatoriska sjukdomar kan även orsaka demyelinisering.

Perivaskulära manschetter består av infiltrat av leukocyter, av en eller flera sorter, i det perivaskulära utrymmet (Summers *et al.* 1995). De perivaskulära manschetterna kan finnas kring kärl i CNS-parenkymet, meningerna, samt *plexus choroideus*. Vilka celler som infiltratet utgörs av kan variera under sjukdomens förlopp och kan även påverkas vid användning av farmaka. Det beror också på vilken typ av infektiöst agens som orsakat inflammationen och utifrån detta går det att göra en generell uppdelning. Vid bakteriella sjukdomar är oftast infiltraten suppurativa (purulenta) och består således i huvudsak av polymorfonukleära celler men även en viss del mononukleära celler. Vid svampinfektioner ses ofta en granulomatös inflammation med stora epiteloida makrofager vilka kan ha fagocyterat infektiösa ämnen. Vid virusinfektioner ses generellt en icke-suppurativ (icke-purulent) inflammation med lymfocytrika cellansamlingar samt ett mindre antal plasmaceller och monocyter. Parasitinfektioner orsakar ofta en eosinofil inflammation (Zachary 2022).

Vid glios blir gliacellerna mer framträdande i parenkymet, vilket beror på svällande cytoplasma och förvärvandet av fler cellprocesser, samt på cellproliferation (Summers *et al.* 1995). Det är dock svårt att skilja mellan ökat antal gliaceller och lymfocyter som migrerat ut i vävnaden, varför det som betecknas som glios i vissa fall även kan innefatta celler från cirkulationen.

Neuronal satellitos är ett fenomen där gliaceller prolifererat och lagt sig i ett till två cellager runt ett neurons cellkropp (soma) (Summers *et al.* 1995). Detta kan

uppstå vid infektion med neurotropa virus, vilket leder till degeneration av soma, vilket i sin tur orsakar reaktionen hos gliacellerna. Neuronofagi yttrar sig som en nodul bestående av tätt packade gliaceller samt fragment av ett dött neuron.

2.2 Meningoencefalomyelit hos katt

Termerna meningit, encefalit och myelit syftar till inflammation i hjärnhinnorna, hjärnan respektive ryggmärgen (Maxie 2015). Generellt tenderar inflammatoriska sjukdomar i CNS att ha ett akut insättande följt av ett progressivt förlopp (Platt & Olby 2013). Lesionernas utbredning är vanligtvis multifokala till diffusa, samt oftast asymmetriska. Orsaken till inflammatoriska sjukdomar i CNS kan antingen vara icke-infektiös eller infektiös.

För att beskriva fall av meningoencefalomyelit hos katter där en infektiös etiologi inte är fastställd används termen meningoencephalitis of unknown origin (MUO) (Nessler *et al.* 2020). Dock har inget klassificeringssystem för MUO hos katt fastställts och diagnosen ställs vanligtvis *ante mortem*, baserat på de kliniska fynden (Negrin *et al.* 2017). Hos hund har MUO troligtvis en autoimmun bakgrund (Barber & Barber 2022), men inga studier har gjorts för att undersöka detta hos katt (enligt författarens vetskap). Däremot har man visat en autoimmun bakgrund vid sjukdomstillståndet limbisk encefalit hos katt (Glantschnigg-Eisl *et al.* 2023).

Infektion i CNS kan orsakas av virus, svampar, parasiter och bakterier (Platt & Olby 2013). Några exempel på infektiösa smittämnen som kan orsaka sjukdom i CNS hos katt är felint coronavirus (FCoV), som orsakar felin infektiös peritonit (FIP); *Toxoplasma gondii*; *Listeria monocytogenes*; rabiesvirus; suid herpesvirus-1 (SuHV-1), som orsakar pseudorabies; West Nile-virus (WNV) (Maxie 2015); *Cryptococcus* spp. (Platt & Olby 2013); samt felint morbillivirus (FeMV) (Dawson *et al.* 2023).

I ett flertal studier har man försökt identifiera orsaken till olika inflammatoriska tillstånd i CNS hos katt, men för en stor del av fallen förblir etiologin okänd (Bradshaw *et al.* 2004; Schwab *et al.* 2007; Künzel *et al.* 2017).

I en retrospektiv studie gjordes en histopatologisk undersökning av CNS från 286 katter som uppvisat någon form av neurologisk sjukdom (Bradshaw *et al.* 2004). Av dessa katter hade 32 % inflammatoriska lesioner i CNS, och ungefär 50 % av dessa hade lesioner förenliga med FIP. Av de återstående katterna med inflammatoriska lesioner hade majoriteten en icke-suppurativ meningoencefalit, vilket talar för viral infektion. Inga vidare undersökningar gjordes för att försöka fastställa etiologin, eftersom syftet med studien endast var att kategorisera olika typer av patologiska förändringar i CNS hos katter.

I en annan studie sammanställdes information om de katter där CNS undersökts histologiskt under perioden 1998–2003 vid ett veterinärmedicinskt universitet i Tyskland (Schwab *et al.* 2007). Av dessa katter uppvisade 20 % någon typ av

förändring i CNS, och 49 % av dessa katter hade en icke-suppurativ meningoencefalit. I studien undersöktes sedan 33 katter med icke-suppurativ meningoencefalit av okänt ursprung immunohistokemiskt för förekomst av 18 olika infektiösa agens. Hos 61 % av de undersökta katterna kunde inte etiologin fastställas. Hos de katter där etiologin kunde fastställas påvisades FCoV, parvovirus, felint leukemivirus (FeLV), WNV, encefalomyokardit-virus (EMCV) och *Escherichia coli*.

Det har diskuterats huruvida fall av icke-suppurativ meningoencefalit eller meningoencefalomyelit hos katt där etiologin ej kunnat fastställas kan bero på en icke-infektiös orsak, alternativt ett smittämne som ännu ej identifierats (Nessler *et al.* 2020). Det är även möjligt att ett infektiöst agens redan har eliminerats vid tidpunkten för undersökning och att det därför inte går att identifiera.

2.3 Virala infektioner i CNS och patogenes

Neuropatogena virus inkluderar DNA- såväl som RNA-virus (Summers *et al.* 1995). Många encefalomyeliter uppkommer som en del av en generaliserad virusinfektion, men själva yttrandet av sjukdomen och dödsfall sker först vid CNS-påverkan. Virusinfektioner i CNS kan orsaka allt från ett akut sjukdomsförlopp som leder till dödsfall, som exempelvis vid rabiesinfektion, till en persisterande infektion där värdjuret bygger upp en tolerans mot infektionen, som exempelvis vid border disease hos får och get. En del virus fungerar som direkta patogener, medan andra orsakar vävnadsskada via ett aktiverat immunsvär.

De patogena effekterna som följer en virusinfektion i CNS varierar mycket, och utfallet påverkas inte bara av virusets egenskaper, utan även av egenskaper hos värdjuret, som exempelvis ålder, genetik och immunstatus (Summers *et al.* 1995). Vid de flesta virala infektioner i CNS ses påverkan på både grå och vit substans, men ofta dominerar det ena mönstret. Exempelvis ger ett neurotropt virus i högre utsträckning förändringar i den grå substansen, vilket är att förvänta, men trots detta ser man normalt sett även förändringar i den vita substansen (Maxie 2015). Efter en bekämpad virusinfektion kan morfologiska förändringar i CNS fortfarande ses under återhämtningsfasen (Summers *et al.* 1995). En kraftig viral encefalomyelit kan dock vara dödlig innan några morfologiska förändringar hinner utvecklas.

Patogeniciteten hos ett virus kan delas in i två steg: möjligheten att ta sig in i ett värdjur, replikera och nå CNS, samt kapaciteten till skadlig verkan i målorganet (virulens) (Summers *et al.* 1995). Olika virus är mer eller mindre immun-suppressiva, vilket gör det möjligt för viruset att infektera ett värdjur innan ett immunsvär hunnit utvecklas. För att en virusinfektion ska ske måste viruset först lyckas ta sig till ett värdjur som inte utvecklat ett skyddande immunsvär. Därefter sker uppförökningen av virus vanligtvis i perifer vävnad. Viral invasion av CNS kan ske hematogent eller via nerver, inklusive via olfaktoriska neuron (Maxie

2015). Vanligtvis sker invasionen hematogent, antingen genom att viruset tar sig in i leukocyter som sedan bär viruset in i CNS, alternativt genom att viruset replikerar i endotelceller i CNS. Invasionen av CNS kan även ske genom retrograd axonal transport, via motorneuron eller sensoriska neuron. Denna väg utnyttjas exempelvis vid rabies- och pseudorabiesinfektion.

2.4 Vingelsjuka

Vingelsjuka (staggering disease) hos katt beskrevs för första gången i Sverige i början av 1970-talet hos totalt 30 katter (Kronevi *et al.* 1974). Sju av dessa katter obducerades och undersöktes histopatologiskt. De 30 katterna misstänktes, utifrån den kliniska bilden och de patologiska fynden, ha drabbats av en gemensam företeelse, men ingen etiologi kunde fastställas. Efter denna rapport började sjukdomen uppmärksammas i flera delar av Sverige, men i huvudsak i Uppland och runt Mälaren (Lundgren & Ludwig 1993). Ett liknande sjukdomstillstånd har även rapporterats i andra länder, huvudsakligen i Österrike där det under 1990-talet fanns ett endemiskt område nordost om Wien (Vandevelde & Braund 1979; Hoff & Vandevelde 1981; Nowotny & Weissenböck 1995; Weiss *et al.* 2023).

Sjukdomsbilden karaktäriseras av följande symtom: bakbensataxi som senare i sjukdomsförloppet kan övergå till parapares; feber; depression; anorexi; smärta från lumbosakralregionen; oförmåga att dra in klorna; samt beteendeförändringar, som exempelvis ökad vokalisering eller ökad tillgivenhet (Lundgren 1992). Mindre vanliga symtom som observerats är klåda, hypersensitivitet för ljud och ljus, ökad salivering, hyperestesi, förstoppning, skakningar, cirkelgång, samt krampanfall. Sjukdomen har beskrivits ha ett subakut till kroniskt förlopp (Hoff & Vandevelde 1981; Matiassek *et al.* 2023).

Diagnosen vingelsjuka ställs idag utifrån de kliniska symtomen, samt den histopatologiska bilden (Wensman *et al.* 2012). Många katter med vingelsjuka har behandlats med antibiotika, kortikosteroider och/eller antivirala läkemedel, men det har ej gjorts kontrollerade studier på effekten av olika behandlingsprotokoll. Oftast avlivas sjuka katter på grund av dålig livskvalitet.

Incidensen av katter med vingelsjuka har setts vara högre under vintern och våren (december till maj), jämfört med andra halvan av året (Lundgren 1992; Matiassek *et al.* 2023). Dessutom har man sett att katter med utevistelse, samt katter som jagar gnagare har signifikant ökad risk att drabbas av vingelsjuka (Berg *et al.* 1998). Kontakt med andra katter, i hushållet eller utomhus, och slagsmål med andra katter ger däremot inte en ökad risk för sjukdom.

2.4.1 Morfologiska förändringar

Den histopatologiska bilden hos vingelsjukekatter karaktäriseras av perivaskulära manschetter bestående av lymfocytära, lymfohistiocytära och/eller lymfoplasma-cytära cellinfiltrat i leptomeninger, samt i den grå substansen av hjärnan och ryggmärgen (Vandeveldt & Braund 1979; Lundgren 1992; Matiassek *et al.* 2023). Inflammatoriska förändringar förekommer även i den vita substansen. Även fokal glios, degenererade neuron, samt neuronofagi kan ses.

Lesionernas utbredning har setts vara mest framträdande i hjärnstammen, ryggmärgen och cerebrala cortex (Lundgren *et al.* 1995b; Nowotny & Weissenböck 1995; Matiassek *et al.* 2023; Weiss *et al.* 2023). Lesionerna tenderar att vara mindre uttalade i cerebellum (Nowotny & Weissenböck 1995; Matiassek *et al.* 2023).

Virala inklusionskroppar har enligt författarens vetskap ej beskrivits i litteraturen.

2.4.2 Diskuterade etiologier

Den histopatologiska bilden som ses vid vingelsjuka är förenlig med virusinfektion (Summers *et al.* 1995). Genom åren har olika etiologier till vingelsjuka diskuterats, och i ett flertal studier har katter med icke-suppurativ meningoencefalomyelit analyserats för en rad olika agens med tekniker som immunohistokemi (IHC), polymerase chain reaction (PCR) och serologi (Lundgren 1992; Schwab *et al.* 2007; Künzel *et al.* 2017). Hos en betydande andel har dock etiologin inte lyckats fastställas.

Några exempel på diskuterade etiologier är virus med progressiv och multifokal påverkan i CNS hos katter, såsom FCoV, FeLV och feline immunodeficiency virus (FIV) (Lundgren 1992). Den kliniska och histopatologiska bilden vid vingelsjuka stämmer dock inte in med sjukdomsbeskrivningen för dessa agens. Detsamma gäller för exempelvis felint panleukopenivirus (FPV), som främst drabbar kattungar under den prenatala, samt tidigt postnatala perioden.

Ett annat agens som orsakar sjukdom i CNS hos katt är *Toxoplasma gondii*; denna protozo orsakar en granulomatös och nekrotiserande encefalit med förekomst av takyzoiter (Dubey *et al.* 2020).

Bornavirus (BDV, borna disease virus) har föreslagits som en möjlig orsak till vingelsjuka (Lundgren & Ludwig 1993; Wensman *et al.* 2014). Hästar och får är naturliga värdar för BDV (Rott & Becht 1995). Viruset orsakar hos dessa djurslag bland annat beteendeförändringar och ataxi, och histologiskt ses en polioencefalomyelit. Förekomst av BDV hos katter med vingelsjuka har undersökts i ett flertal studier med metoder som till exempel IHC, PCR och serologi (Lundgren *et al.* 1995a; Wensman *et al.* 2012; Someya *et al.* 2014; Matiassek *et al.* 2023; Weiss *et al.* 2023). Resultaten i dessa studier har dock sinsemellan inte varit samstämmiga, då vissa av studierna har pekat på BDV som orsak till vingelsjuka, medan andra ej har kunnat visa detta.

Nyligen har rustrelavirus (RusV) föreslagits orsaka vingelsjuka hos katt (Matiassek *et al.* 2023). RusV som orsak till neurologisk sjukdom hos katt och andra däggdjur diskuteras vidare i följande avsnitt.

2.4.3 Rustrelavirus

Under lång tid har rubellavirus (RuV, *Rubivirus rubellae*), som orsakar röda hund hos människa, varit det enda virus som ingått i genuset *Rubivirus* och familjen *Matonaviridae*, vilka är RNA-virus (Walker *et al.* 2019). Nyligen upptäcktes två nya virus inom denna familj, nämligen rustrelavirus (RusV, *Rubivirus strelnense*) och ruhuguvirus (RuhV, *Rubivirus ruteetense*) (Bennett *et al.* 2020b).

På en djurpark i Tyskland kunde RusV detekteras i hjärnvävnad hos en åsna (*Equus asinus*), en kapybara (*Hydrochoeris hydrochaeris*) och en rödhalsad vallaby (*Macropus rufogriseus*), vilka alla drabbats av en akut insättande neurologisk sjukdom samt icke-suppurativ meningoencefalit (Bennett *et al.* 2020b; a). Även i hjärnvävnad hos 8 av 16 testade större skogsmöss (*Apodemus flavicollis*), vilka var infångade på och i närheten av djurparken, detekterades RusV, däremot sågs inga tecken på encefalit histopatologiskt.

Från samma djurpark i Tyskland identifierades senare ytterligare tre fall av RusV-positiva djur: en utter (*Lutra lutra*) och en vanlig näsbjörn (*Nasua nasua*), vilka båda drabbats av icke-suppurativ meningoencefalit (Pfaff *et al.* 2022), samt ytterligare en rödhalsad vallaby som drabbats av akut insättande neurologiska symtom och en underliggande icke-suppurativ meningoencefalit (Voss *et al.* 2022).

Ytterligare två rödhalsade vallabyer från två andra djurparker i Tyskland drabbades också av akut insättande neurologisk sjukdom samt icke-suppurativ meningoencefalit; även dessa var positiva för RusV (Voss *et al.* 2022).

Hos de tre rödhalsade vallabyerna beskrivna av Voss *et al.* (2022) undersöktes även perifera organ för förekomst av RusV med in situ-hybridisering (ISH). Viruset kunde ej detekteras i de undersökta organen, vilka inkluderade hjärtat, magsäcken, tunntarmen och grovtarmen. Det fanns heller inga övriga histopatologiska fynd i dessa organ. Författarna diskuterade därför om rödhalsade vallabyer kan utgöra en ”dead-end host”, som själva inte sprider viruset vidare.

RusV har även kunnat detekteras i hjärna från tre lejon (de le Roi *et al.* 2023). Lejonen kom från två olika djurparker i Tyskland mellan åren 1980–1989, en period då det förekom flera fall av fatal icke-suppurativ encefalit hos olika katter i tyska djurparker. Hos de tre lejonen sågs histopatologiskt en mild, multifokal, lymfohistiocyttär meningoencefalit och vaskulit, samt glios. Alla tre lejonen var positiva för RusV med PCR och IHC, och två av lejonen var även positiva med ISH.

RusV hos katt

I en studie från 2023 undersöktes förekomsten av RusV hos 29 katter med icke-suppurativ meningoencefalomyelit eller vingelsjukeliknande sjukdomssymtom

med RT-qPCR, ISH och IHC (Matiassek *et al.* 2023). Dessa katter kom från norra Tyskland, där RusV först identifierades, från området kring Mälaren i Sverige, samt från ett område nordost om Wien i Österrike. De två senare områdena är sedan tidigare kända endemiska områden för vingelsjuka.

Katterna från Sverige och Tyskland obducerades mellan 2017–2022 och katterna från Österrike obducerades mellan 1991–1993 (Matiassek *et al.* 2023). Av 29 katter var 28 positiva för RusV i en eller flera av analyserna. Det visade sig att RusV hos katter från respektive geografiskt område tillhörde separata genetiska kluster. Det svenska och det österrikiska klustret låg närmre genetiskt, än det tyska klustret. I studien undersöktes också hjärna från större skogsmus (*Apodemus flavicollis*) och mindre skogsmus (*Apodemus sylvaticus*), insamlade i Örebro kommun. RusV kunde identifieras hos en del av de mindre skogsmössen, men inte hos några av de större skogsmössen.

I en annan studie från 2023 undersöktes hjärna och ryggmärg från 23 katter från Österrike som fått den histopatologiska diagnosen icke-suppurativ encefalomyelit mellan åren 1994–2016 för förekomst av RusV (Weiss *et al.* 2023). I denna studie användes RT-qPCR och ISH, och hos 7 av katterna kunde RusV påvisas med den ena eller båda metoderna. Sex av sju RusV-positiva katter hade insjuknat under perioden 1994–1998, och den sjunde katten insjuknade 12 år senare. Enligt studien finns inga övriga rapporteringar om katter med misstänkt vingelsjuka från Österrike efter 2010 och gnagare från Österrike har inte undersökts för förekomst av RusV.

Vid undersökning med IHC och ISH har inmärkning för RusV i CNS setts i samma områden som inflammatoriska förändringar observerats histologiskt, men ofta har inmärkning för RusV även funnits i områden där inga tecken på inflammation observerats (Voss *et al.* 2022; Matiassek *et al.* 2023).

Gnagare har diskuterats som reservoar och mellanvärd för RusV (Bennett *et al.* 2020b; Matiassek *et al.* 2023; Nippert *et al.* 2023). På grund av att man har kunnat detektera RusV i hjärna från större skogsmus samt mindre skogsmus, samtidigt som man inte har hittat några inflammatoriska förändringar histopatologiskt, misstänks gnagare utgöra persistent infekterande reservoarer för smitta (Weiss *et al.* 2023). Förekomst av RusV hos större skogsmus har även setts ha ett positivt samband med gnagarens vikt, vilket också talar för en persistent infektion eftersom vikten ökar med åldern (Nippert *et al.* 2023). Gnagares roll som reservoardjur skulle förklara den geografiska distributionen med lokala endemiska områden (Weiss *et al.* 2023). Detta eftersom gnagarna ej förflyttar sig mycket vilket skulle göra att infektionen endast spillas över på andra däggdjur som lever i samma område.

Hur transmissionen av virus sker mellan gnagare och katt är dock fortfarande oklart. I en tidigare studie har man kunnat detektera RusV i avföring och munsvabbar från större skogsmöss, varför avföring och saliv diskuterats som en möjlig smittkälla (Bennett *et al.* 2020b). I en annan studie kunde RusV detekteras hos större skogsmöss i organ tillhörande det perifera nervsystemet, nämligen i ögon,

binjurar och perifera nerver, varför även en neuronal transmissionsväg diskuterats (Nippert *et al.* 2023).

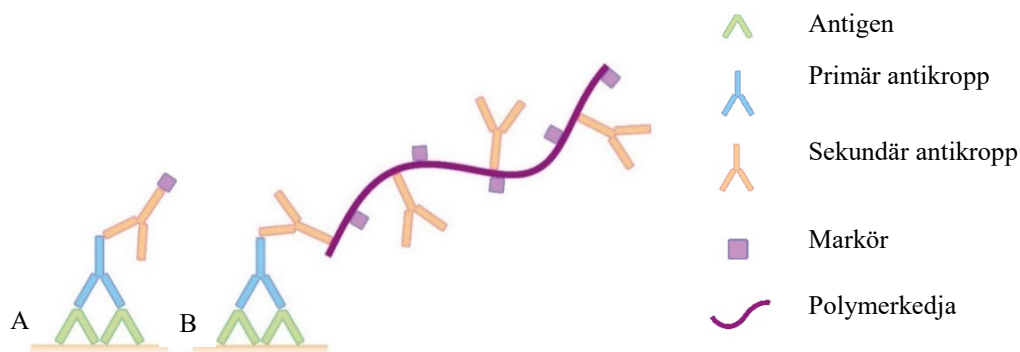
2.5 Immunohistokemi som metod för detektion av antigen i histologiska vävnadspreparat

Immunohistokemi är en teknik som används för att identifiera antigen i ett vävnadspreparat genom inbindning av en antikropp (Suvarna *et al.* 2013). Metoden används idag vanligen på formalinfixerade, paraffinbäddade preparat.

Den vanligaste använda antikroppstypen vid immunohistokemi är IgG, vilken består av ett par lätta och ett par tunga polypeptidkedjor vilka sammanlänkas av disulfidbindningar och formar en Y-struktur. Armarna på antikroppen benämns som Fab-delar (fragment antigen-binding), och änden på varje arm utgör en variabel domän. I den variabla domänen kan sekvensen av aminosyror variera och därmed kan antikroppen binda in till en specifik antigen mot vilket antikroppen är framtagen. Svansen på antikroppen benämns som Fc-delen (fragment crystallizable). Antikroppar som används till immunohistokemi kan antingen vara polyklonala, vilket innebär att antikropparna ej är identiska utan binder till olika epitoper på samma antigen, eller monoklonala, vilket innebär att alla antikroppar är identiska och binder till samma epitop.

Den vanligaste använda immunohistokemiska metoden är en indirekt tvåstegsteknik (Suvarna *et al.* 2013). Först tillsätts en primär antikropp, vilken binder in till det antigen som eftersöks i vävnadspreparatet. En sekundär antikropp, riktad mot Fc-delen av antikroppen hos det djurslag som den primära antikroppen är framtagen i, binder i sin tur in till den primära antikroppen. På den sekundära antikroppen sitter en markör (vanligtvis pepparrotsperoxidas), vilken genom inbindning med ett kromogen ger färg vid framkallning (se figur 1 A). Denna metod har högre sensitivitet jämfört med en direkt teknik där markören sitter på den primära antikroppen, eftersom flera sekundära antikroppar kan binda in till den primära antikroppen samtidigt vilket ger en starkare infärgning.

Den mest utbredd använda metoden är en variant på denna tvåstegsteknik, där ett antal sekundära antikroppar sitter fästa till en polymerkedja (dextran) märkt med upp till 70 pepparrotsperoxidas-molekyler (se figur 1 B). Platsen för det eftersökta antigenet i vävnadspreparatet identifieras genom att tillsätta ett kromogen, vanligtvis 3,3'-diaminobenziden tetrahydroklorid (DAB), som binder till pepparrotsperoxidasen och framkallar en brun färg.



Figur 1. Schematisk bild av immunohistokemiska metoder. A: indirekt tvåstegsmetod. B: indirekt tvåstegsmetod med pepparrotsperoxidasmärkt polymerkedja. Figur av David Saulesco.

2.5.1 Metoder för att säkerställa ett tillförlitligt resultat

Det finns ett antal olika felkällor som kan uppstå vid immunohistokemi (Suvarna *et al.* 2013). För att resultatet ska bli så tillförlitligt som möjligt finns det några metoder som kan användas innan applicering av de primära och sekundära antikropparna.

Fixering av vävnad med formalin samt bäddning med paraffin leder till att vävnadsantigenen döljs (Suvarna *et al.* 2013). För att göra antigenen i vävnaden tillgängliga igen kan en så kallad "antigen retrieval" utföras. Detta kan göras på flera olika sätt, exempelvis genom upphettning eller genom att tillsätta proteolytiska enzymer.

Endogena enzymer i ett vävnadspreparat kan, liksom den använda antikroppsmarkören, få ett färgomslag vid framkallning, vilket kan leda till en felaktig positiv tolkning av resultatet (Suvarna *et al.* 2013). Peroxidas samt ämnen som ger en peroxidasliknande reaktion kan förekomma i såväl normal som neoplastisk vävnad. Genom en preinkubation med väteperoxid under den immunohistokemiska proceduren blockeras peroxidas samt peroxidasliknande ämnen och på så vis kan man undvika oönskade reaktioner med dessa.

Ospecifik infärgning kan bero på flera faktorer, men den vanligaste anledningen är att den primära antikroppen attraheras till laddade områden i vävnaden (Suvarna *et al.* 2013). Det mest effektiva sättet att undvika detta är att tillsätta en oskadlig proteinlösning vilken mättar och neutraliserar laddade områden, och därmed tillåter den primära antikroppen att endast binda in till antigen.

2.5.2 Validering av resultat

För att validera resultatet vid en immunohistokemisk färgning används kontroller (Suvarna *et al.* 2013).

En negativ kontroll kan utföras på två olika sätt (Suvarna *et al.* 2013). Antigenen kan protokollet genomföras som vanligt förutom att den primära antikroppen ej tillsätts. Alternativt kan en isotyp-matchad irrelevant primär antikropp användas i stället för den antigen-riktade primära antikroppen; denna antikropp måste då vara

av samma typ av immunoglobulin som den primära antikroppen, samt framtagen från samma djurslag. I båda fallen ska det undersökta preparatet förbli oinmärkt.

En positiv kontroll är ett vävnadspreparat som känt innehåller antigenet vilken den primära antikroppen är riktad mot (Suvarna *et al.* 2013). Det undersökta preparatet ska därför bli inmärkt.

3. Material och metod

3.1 Litteraturöversikt

Insamling av litteratur genomfördes genom sökning av vetenskapliga artiklar i databaserna Google Scholar, PubMed och Web of Science. De sökord som inkluderades i de olika använda söksträngarna var bland annat "cat", "feline", "staggering disease", "feline ataxia", "meningoencephalomyelitis", "meningoencephalitis", "encephalomyelitis", "encephalitis", "rustrela virus", "borna disease", "borna disease virus". Artiklarna som användes kom från vetenskapligt granskade tidskrifter. Utifrån referenslistorna i lästa artiklar hittades ytterligare artiklar vilka också användes som referenser i detta arbete.

Även läroböcker användes som källor i litteraturöversikten. Dessa var huvudsakligen sådana som avhandlar neuropatologi och histologiska tekniker.

Totalt användes 41 referenser i litteraturöversikten.

3.2 Sammanställning av fall obducerade vid SLU mellan 1970–2019

Katter obducerade vid SLU mellan 1970–2019, med SD tydande på vingelsjuka eller med SD vilken potentiellt skulle kunna vara associerad med vingelsjuka, sammanställdes i detta arbete. Fall som obducerats vid SLU mellan dessa årtal finns arkiverade, dels i SLU:s universitetsarkiv, dels i datorprogrammet Patologen 350 (version 3.5.0.), ett egenbyggt system som tidigare användes på BVF och som var kopplat till journalsystemet Trofast. För redovisning av denna data användes Microsoft Excel (version 2309) för att skapa diagram.

För sammanställning av fall mellan 1970–2001 gicks obduktionsliggare, tillgängliga i SLU:s universitetsarkiv, igenom. För varje katt som obducerats kontrollerades SD. Om denna innehöll termerna "meningit", "encefalit", och/eller "myelit" (i valfria kombinationer), alternativt "vingelsjuka" eller "felin ataxi", antecknades fallets obduktionsnummer (O-nummer), oavsett om termerna "icke-suppurativ" eller "icke-purulent" fanns med eller ej. Däremot om termen "suppurativ" eller "purulent" fanns med, eller om det framgick att annan etiologi redan var fastställd, antecknades inte fallet. I vissa fall letades även obduktionsutlåtandet fram; detta gällde de fall där SD i obduktionsliggaren på något sätt var otydligt presenterad, exempelvis på grund av en felskrivning, eller att endast en preliminär diagnos fanns nedtecknad.

Sökfunktionen i datorprogrammet Patologen 350 användes för att hitta fall mellan åren 2002–2019. De diagnoskoder som söktes på var NHE04 Encefalit, non-

purulent; NMM04 Meningit, non-purulent; NMM07 Meningoencefalit, non-purulent; NMM09 Meningoencefalomyelit, non-purulent=vingelsjuka; NMM10 Meningoencefalomyelit, övrig; samt NRM05 Myelit, non-purulent. SD kontrollerades för sökträffarna, och om denna innehöll termerna ”meningit”, ”encefalit”, och/eller ”myelit” (i valfria kombinationer) antecknades fallets O-nummer, oavsett om termen ”non-purulent” fanns med eller ej. Däremot om termen ”purulent” fanns med, eller om det framgick att annan etiologi redan var fastställd, antecknades inte fallet.

3.3 Urval av fall för histopatologisk och immunohistokemisk undersökning

3.3.1 Undersökning av hjärna och ryggmärg från katter med okänd RusV-status

I detta arbete undersöktes hjärnvävnad och ryggmärg från 14 katter, från fem olika decennier och med okänd RusV-status för grad av inflammatoriska förändringar i CNS och för förekomst av RusV.

Utifrån de insamlade fallen beskrivna under rubrik 3.2 sorterades de fall ut där SD var non-purulent/icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vingelsjuka eller felin ataxi. Detta blev således försökets inklusionskriterium.

De exklusionskriterier som sattes var att annan bakomliggande etiologi redan var fastställd; att de mikroskopiska fynden beskrivna i obduktionsutlåtandet starkt verkade tyda på en annan sjukdom än vingelsjuka; samt ålder under ett år, eftersom de flesta fall av katter med vingelsjuka som beskrivits i litteraturen har varit i vuxen ålder (Lundgren 1992; Matiasek *et al.* 2023).

Önskvärt hade varit att endast inkludera utekatter i försöket, då man i tidigare studier sett att utekatter löper ökad risk att drabbas av vingelsjuka (Berg *et al.* 1998), men då information om huruvida katterna var inne- eller utekatter ej framgick i någon av remisserna som togs fram användes inte detta som exklusionskriterium.

Utifrån de fall vilka uppfyllt inklusionskriteriet gjordes ett slumpmässigt urval av tre fall från respektive decennium mellan 1970–2016. I en tidigare studie har man påvisat RusV i CNS hos katter med vingelsjuka i Sverige mellan 2017–2022 (även dessa obducerade vid SLU) (Matiasek *et al.* 2023), varför endast fall fram till och med 2016 ingick i detta försök. Obduktionsutlåtandet och remissen från respektive framlumpat fall togs fram. Om det utifrån dessa dokument framgick att något av exklusionskriterierna uppfylldes exkluderades fallet och ett nytt fall slumpades fram. Från 1970-talet saknades arkiverat material (klossar med formalinfixerade och paraffininbäddade vävnader) från flera fall och endast två fall från detta årtionde återfanns.

I försöket undersöktes även vävnad från hjärna och/eller ryggmärg för förekomst av RusV från fem kontrollfall, det vill säga katter som obducerats på SLU men som inte fått SD enligt studiens inklusionskriterium. Ett fall från respektive decennium mellan 1970–2016 valdes ut. Obduktionsutlåtanden arkiverade i SLU:s centralarkiv (utlåtanden från 1970- till och med 2000-talet) samt i institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskaps (BVF) arkiv (utlåtanden från 2010-talet) gick igenom i kronologisk ordning från början av respektive decennium. Det första fallet som hittades av en katt där man plockat ut hjärnvävnad och/eller ryggmärg valdes ut. Exklusionskriterier för kontrollfallen var att inflammatoriska förändringar beskrivits mikroskopiskt i CNS, samt ålder under ett år.

3.3.2 Undersökning av perifera organ från katter med känd positiv RusV-status

I detta arbete undersöktes även perifera organ för förekomst av RusV från fyra (av totalt tio) katter som obducerats vid SLU och som varit RusV-positiva i CNS i en studie från 2023 (Matiassek *et al.* 2023). Katterna som valdes ut för detta försök var de katter där flest perifera organ fanns arkiverade och därmed tillgängliga för undersökning. Undersökningsmaterialet bestod företrädesvis av vävnad från lunga, njure, mjälte och lever, samt någon del av mag-tarmkanalen, men även andra organ inkluderades beroende på tillgänglighet.

3.4 Histologisk preparering samt färgning av vävnadsmaterial

Allt vävnadsmaterial som ingått i försöket var formalinfixerat och inbäddat i paraffinklossar. En del av materialet bäddades om innan snittning på grund av att det låg inbäddat i en äldre typ av klossmodell som, vid tidpunkten för detta försök, ej passade i de maskiner som användes för snittning vid BVF.

Materialet snittades och färgades in med hematoxylin-eosin (HE) av legitimerade biomedicinska analytiker (AN och VS) på BVF. För den immunohistokemiska undersökningen av hjärna och ryggmärg valde sedan författaren (ET) ut material från storhjärna, lillhjärna, hjärnstam respektive ryggmärg från varje fall. Om det fanns flera vävnadsbitar från någon av dessa vävnadstyper valdes materialet i första hand ut efter bäst morfologi, därefter för att lokaliseringen inom vävnadstypen skulle bli så likvärdig som möjligt mellan fallen, och om inget av detta kunde avgöras valdes snitten ut slumpmässigt.

Den primära antikroppen som användes till immunohistokemin utgjordes av en monoklonal musantikropp (namn: #22/2H11B1), vilken erhöles från Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, Insel Riems, Tyskland. Antikroppen var riktad mot proteinet i RusV:s kapsid, och känd proteinkoncentration saknades. Då antikroppen

ej tidigare använts vid BVF:s laboratorium utfördes ett antal testkörningar på BVF innan projektstart där ett lämpligt färgningsprotokoll och lämplig spädning av antikroppen testades fram; detta gjordes i samråd med legitimerade biomedicinska analytiker (AN och VS) och handledare (CL och ST). All immunohistokemi i detta examensarbete utfördes av författaren (ET). För fullständigt protokoll av immunohistokemin, se bilaga 1.

I varje körning av immunohistokemin användes en positiv kontroll (O10/17) samt en variant av negativ kontroll (kontroll 5.2). Den positiva kontrollen utgjordes av ett preparat med ryggmärg från en katt som ingick i Matiassek *et al.* (2023) och var sedan dess känt positiv för RusV. Eftersom proteinkoncentrationen ej var känd för den primära antikroppen kunde inte en isotyp-matchad antikropp användas till en negativ kontroll. I stället användes ett preparat med storhjärna från en katt som också ingick i studien nämnd ovan och sedan dess var känt negativt. Denna behandlades med den antigen-riktade primära antikroppen, precis som övriga preparat.

Vissa preparat som efter genomgången immunohistokemi fått bedömningen ”osäker” (se bedömningskriterier under rubrik 3.5.2) genomgick ett immunohistokemi-protokoll där buffert (PBS) tillsattes i stället för den primära antikroppen. Detta gjordes för att kontrollera om de osäkra inmärkningarna fanns kvar utan inbindning av primär antikropp. Även den positiva samt den negativa kontrollen behandlades med buffert vid ett körningstillfälle för att kontrollera eventuell ospecifik bindning från sekundärantikroppen.

3.5 Bedömning av snitt

3.5.1 Bedömning av grad av inflammation

Samtliga HE-färgade snitt från hjärna och ryggmärg bedömdes av författaren (ET) samt en patolog (CL) för förekomst av inflammation, typ av inflammatoriska celler, samt grad av inflammation. Vid bedömningen var preparaten kodade, förutom preparaten från kontrollgruppen, eftersom dessa fall tillkom i ett senare skede av processen. Graderingen gjordes efter ett tidigare publicerat protokoll (Matiassek *et al.* 2023), med mindre förändringar (se tabell 1). Respektive snitt bedömdes separat. Om det fanns flera snitt från samma lokalisation (alltså storhjärna, lillhjärna, hjärnstam, respektive ryggmärg) gjordes en sammantagen bedömning för respektive lokalisation. Vid bedömningen togs även inflammation i meningerna i beaktning.

Tabell 1. Mikroskopisk bedömning av inflammationsgrad, baserat på protokoll från Matiassek *et al.* (2023).

Inflammationsgrad	Kriterier
Lindrig	Enstaka perivaskulära cellinfiltrat, varav de flesta består av ett till två cellager, vilka ej nödvändigtvis förekommer i alla undersökta lokalisationer. Ett till två större cellinfiltrat i samma lokalisering kan förekomma.
Måttlig	Flertal perivaskulära cellinfiltrat per lokalisering, varav de flesta består av tre till fem cellager. Mindre eller större cellinfiltrat kan förekomma i enstaka lokalisationer.
Kraftig	Många perivaskulära cellinfiltrat, varav många består av fler än fem cellager i majoriteten av undersökta lokalisationer.

3.5.2 Bedömning av förekomst av RusV

Samtliga snitt från hjärna och ryggmärg, samt perifera organ bedömdes av författaren (ET) samt en patolog (CL) för förekomst av RusV. Vid bedömningen var snitten kodade, förutom från katterna i kontrollgruppen, samt från katterna där perifera organ undersöktes, eftersom dessa katter tillkom i ett senare skede av processen. Inmärkning för RusV i snitten från CNS graderades enligt ett modifierat protokoll från Matiassek *et al.* (2023) (se tabell 2). För de perifera organen noterades endast om inmärkning observerats (ingen gradering användes).

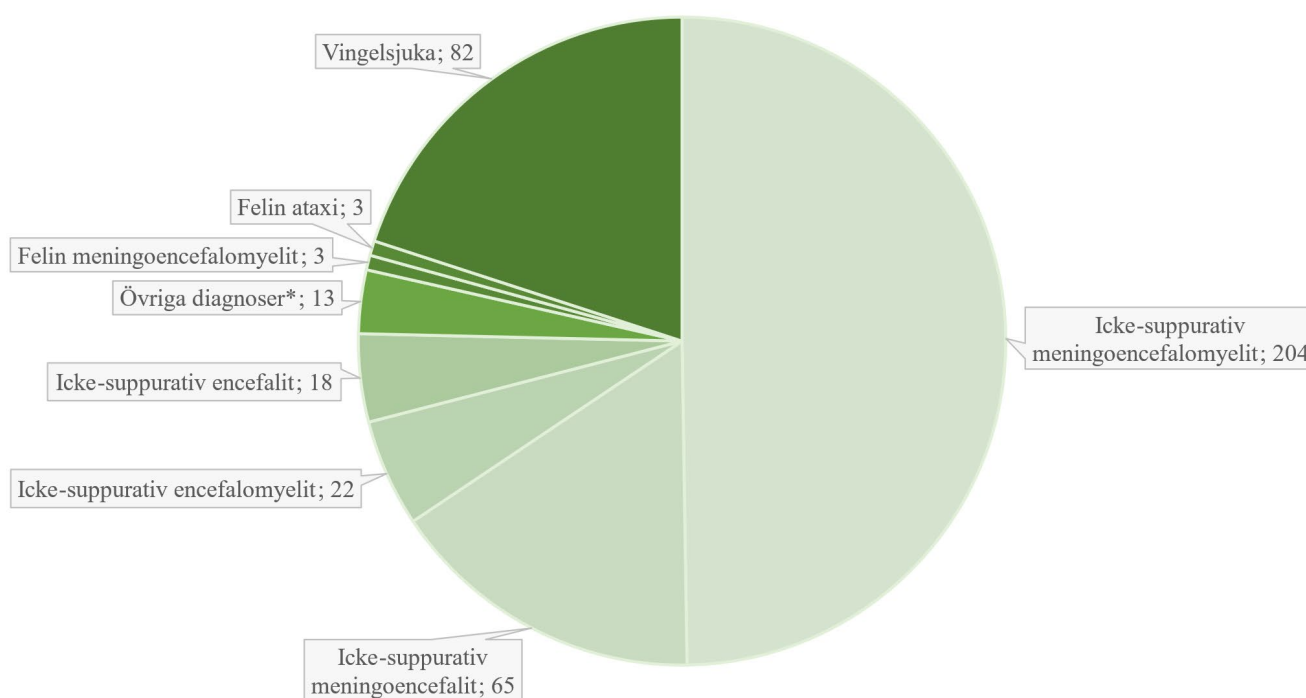
Tabell 2. Mikroskopisk bedömning av förekomst av rustrelavirus i CNS, baserat på protokoll från Matiassek *et al.* (2023). Grad 1 till 3 tolkas som ett positivt resultat.

Grad	Kriterier
Negativ	Ingen specifik detekterbar infärgning.
Osäker	Få signaler, vilka inte säkert kan sägas är cellassocierade.
1	Signal i enstaka neurons cytoplasma eller processer, och/eller gliaceller.
2	Signal i ett flertal neuron och/eller gliaceller, dock svag inmärkning.
3	Signal i ett flertal neuron och/eller gliaceller

4. Resultat

4.1 Sammanställning av fall obducerade vid SLU mellan 1970–2019

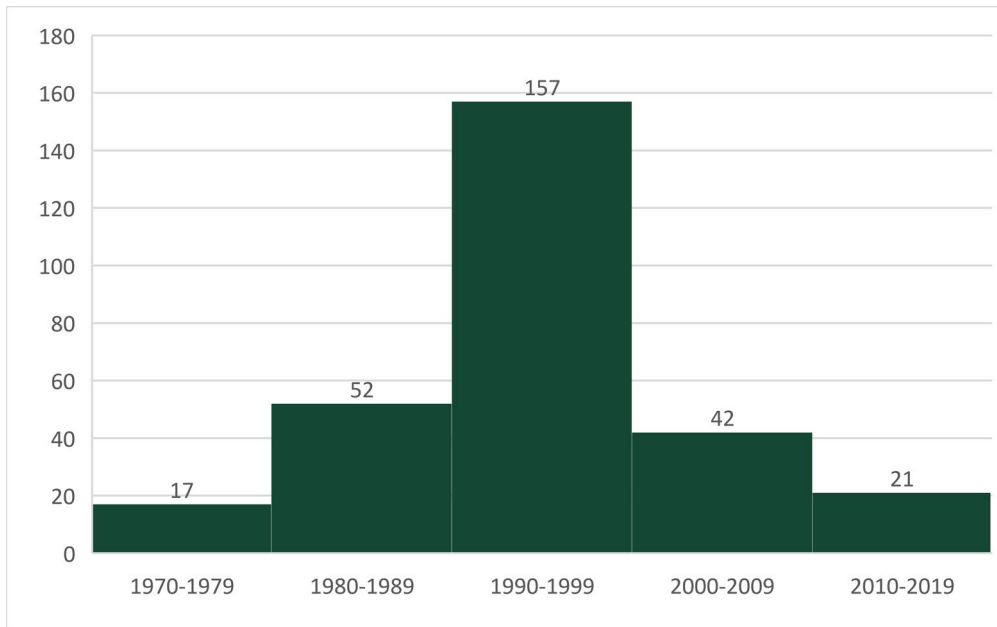
Totalt identifierades 410 fall av katter, obducerade vid SLU mellan 1970–2019, med SD vilken kan tänkas vara associerad med vingelsjuka. Fallen delades upp i åtta diagnosgrupper, vilka redovisas i figur 2. Den diagnosgrupp respektive fall tillhör är den som stämmer mest överens med fallets SD. I kommande delar av arbetet som handlar om sammanställningen av fall kommer därför begreppet SD användas synonymt med diagnosgruppen som fallen sorterats in under. Den största diagnosgruppen var katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vilken bestod av 204 fall. I bilaga 2 redovisas noteringar kring individuella falls SD, samt motivering till varför dessa fall tillhör en viss diagnosgrupp.



Figur 2. Katter med SD vilken kan tänkas vara associerad med vingelsjuka, obducerade på SLU mellan 1970–2019. *Övriga diagnoser inkluderar fall med följande SD: icke-suppurativ meningit (6 katter), icke-suppurativ spinal meningit (1 katt), icke-suppurativ meningomyelit (3 katter), icke-suppurativ myelit (1 katt), akut meningoencefalit (1 katt), samt lymfoplasmacytär meningoencefalomyelit (1 katt).

4.1.1 Antal fall fördelat per decennium

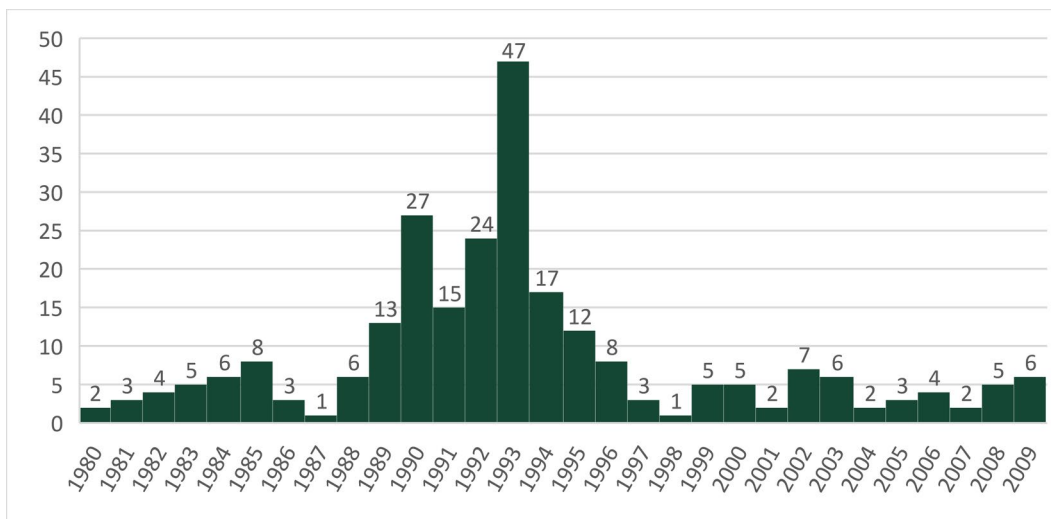
Fallen med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vingelsjuka och felin ataxi summerades ihop för respektive decennium (se figur 3). Den högsta förekomsten av obducerade fall sågs under 1990-talet, då 157 fall noterades. Den lägsta förekomsten sågs under 1970-talet, då 17 fall noterades.



Figur 3. Antal katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vingelsjuka, eller felin ataxi.

Årsfördelning av fall mellan 1985–2001

I figur 4 redovisas årsfördelningen för antalet fall med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vingelsjuka och felin ataxi under de tre decennier där antalet fall var som högst, det vill säga tidsperioden 1980–2009. Den högsta förekomsten av fall sågs 1993, då 47 fall noterades. Den lägsta förekomsten av fall under denna period sågs 1987 och 1998, då ett fall noterades under respektive år.



Figur 4. Antal katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vingelsjuka eller feline ataxi mellan 1980–2009.

4.2 Undersökning av CNS från katter med okänd RusV-status

4.2.1 Demografiska data

I försöket undersöktes CNS från totalt 19 fall, 14 fall med misstänkt vingelsjuka och 5 kontrollfall. Av katterna med misstänkt vingelsjuka obducerades två fall under 1970-talet, och tre fall under respektive decennium mellan 1980–2016. Alla 14 fall hade SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit. Åldersspannet var 2–10 år och medelåldern var 5,2 år. Två katter var intakta honor, två katter var intakta hanar, sex katter var honkastrat och fyra katter var hankastrat. Sju av individerna var huskatter, tre var europeer och en var burma. Hos övriga individer saknades information om ras.

De vanligaste kliniska symtomen som sågs enligt obduktionsremissen var bakkensataxi, beteendeförändringar, vinglighet, nedsatta posturala reflexer, smärta från länd- och korsrygg och inappetens. Sjukdomsdurationen hos de olika katterna varierade allt från några dagar upp till flera månader eller år. Detaljer kring individerna beskrivs i tabell 3.

Totalt fem kontrollfall inkluderades i försöket, ett fall från respektive decennium med början av 1970-talet. Åldersspannet var 3–15 år och medelåldern 7,4 år. Tre katter var intakta hanar och två var kastrerade hanar. Signalement och SD för respektive fall redovisas i tabell 4.

Tabell 3. Signalement, kliniska fynd och sjukdomsduration hos katterna med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit och okänd RusV-status. Kastr. = kastrerad.

Individ	Ras	Kön	Ålder	Kliniska symtom	Sjukdomsduration
O373/78	Europé	♂	8 år	Bakbensataxi; inappetens; ökad tillgivenhet; ökad vokalisering	5 veckor
O1841/78	Okänt	♀, kastr.	7 år	Progredierande bakbensparalys	1 år
O553/80	Europé	♂, kastr.	3 år	Bakbensensataxi; ovillighet att hoppa; drar sig undan	Framgår ej
O857/83	Okänt	♀, kastr.	4 år	Bakbensataxi; atrofisk bakbensmuskulatur; smärta i bakre ländrygg; nedsatta posturala reflexer; svårt att hoppa; utspärrade klor; ökad vokalisering	1,5 månad
O149/84	Europé	♀	4 år	Bakbensataxi; vinglighet; inappetens; svårt att hoppa; näsflöde; takypné och bukandning	Åtminstone 3–4 dagar
O876/90	Okänt	♂	5 år	Bakbensataxi; vinglighet; vill ej gå i trappor; tystare vokalisering än normalt; urinerat och defekerat inomhus	Åtminstone 1 månad
O01/93	Huskatt	♂, kastr.	4 år	Vinglighet; svullen i höger bakben	Cirka 3 veckor
O597/96	Burma	♀	7 år	Bakbensataxi; beteendestörning; sköter ej pålsen; urinerar och defekerar inomhus	Beteendestörningar sedan 5 års tid; övriga symtom framgår ej
O219/03	Huskatt	♂ kastr.	9 år	Vinglighet; stelhet i frambenen; grava neurologiska nedsättningar av normala reaktioner på alla fyra ben; normal smärtsensibilitet	4 dagar
O176/04	Huskatt	♀, kastr.	3 år	Bakbensataxi; kyfotisk; stelt rörelsemönster; feber; smärta i ländryggen; utspärrade klor; inappetens; ökad vokalisering; avsaknad av anal-, vulvouretral- och böjreflex (bakben)	1 månad
O405/09	Huskatt	♀, kastr.	4 år	Bakbensataxi; muskelatrofi, särskilt på bakkroppen; nedsatta posturala reflexer; beteendeförändringar; magrat av trots god aptit	2 månader
O88/14	Huskatt	♀, kastr.	3 år	Mentalt frånvarande; chocktillstånd; nedsatt hotrespons bilateralt; nedsatt palpebralreflex bilateralt; självdör	2 dagar
O159/15	Huskatt	♂, kastr.	2 år	Vinglighet; feber; inappetens; förstoppning	8–10 månader
O61/16	Huskatt	♀, kastr.	10 år	Bakbensataxi; vinglighet; nedsatta posturala reflexer framben; slöhet; smärta framför svansroten; mios; normal smärtsensibilitet alla ben; god aptit	4–5 dagar

Tabell 4. Signalement och SD hos katterna i kontrollgruppen.

Individ	Ras	Kön	Ålder	Sektionsdiagnos
O753/77	Europé	Hane	3 år	Intervertebrala ligament- och muskelrupturer med blödningar och sekundär akut myelomalaci.
O104/80	Europé	Hane	3 år	Diffus leverförfettning med periportala nekroser
O55/90	Okänd	Hankastrat	8 år	Adenokarcinom i magsäcken; gammal fraktur distalt höger ulna med neartros; muskelatrofi höger käke och höger framben
O120/00	Huskatt	Hankastrat	8 år	Diskospondylit
O40/10	Huskatt	Hane	15 år	Meningiom; adenom utgående från de langerhanska cellöarna

4.2.2 Förekomst av inflammatoriska celler och grad av inflammation

Katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit

Samtliga katter uppvisade inflammatoriska cellinfiltrat i hjärna, meninger och ryggmärg. Storhjärna, lillhjärna, hjärnstam och ryggmärg undersöktes från 13 av de 14 fallen. Från ett fall (O149/84) undersöktes endast storhjärna och ryggmärg, då material från lillhjärna och hjärnstam ej kunde återfinnas. Hos alla utom en individ dominerade inflammatoriska infiltrat av lymfocyter och histiocytära celler. Ibland förelåg även ett mindre antal plasmaceller.

En av katterna, O88/14, uppvisade infiltration av neutrofiler i hjärnan, ryggmärgen, samt meninger. Eftersom denna individ ej uppvisade en icke-suppurativ inflammation bedömdes ej inflammationsgraden.

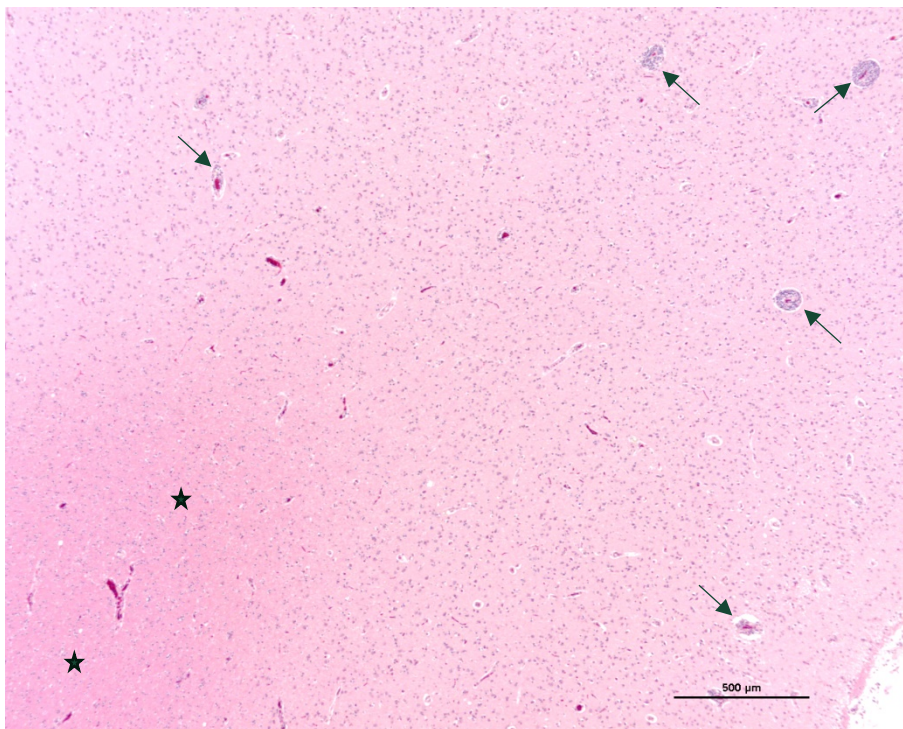
Generellt sågs de perivaskulära cellinfiltraten i storhjärnan, hjärnstammen och ryggmärgen, huvudsakligen runt kärl i den grå substansen (se figur 5). I lillhjärnans parenkym sågs perivaskulära cellinfiltrat i enstaka fall. Inflammatoriska cellinfiltrat var vanligt förekommande i meningerna; särskilt i lillhjärnans meninger sågs frekvent stora infiltrat (se figur 9). Inflammationsgraden i preparat från lillhjärna och ryggmärg bedömdes i större utsträckning som lindrig eller måttlig, jämfört med preparat från storhjärnan och hjärnstammen där inflammationsgraden i större utsträckning bedömdes som måttlig eller kraftig (se figurer 6–8). Detaljerad bedömning av inflammationsgraden hos respektive fall redovisas i tabell 5. Andelen fall med en viss inflammationsgrad i respektive lokalisering redovisas i tabell 6.

Tabell 5. Bedömning av inflammationsgrad hos katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit.

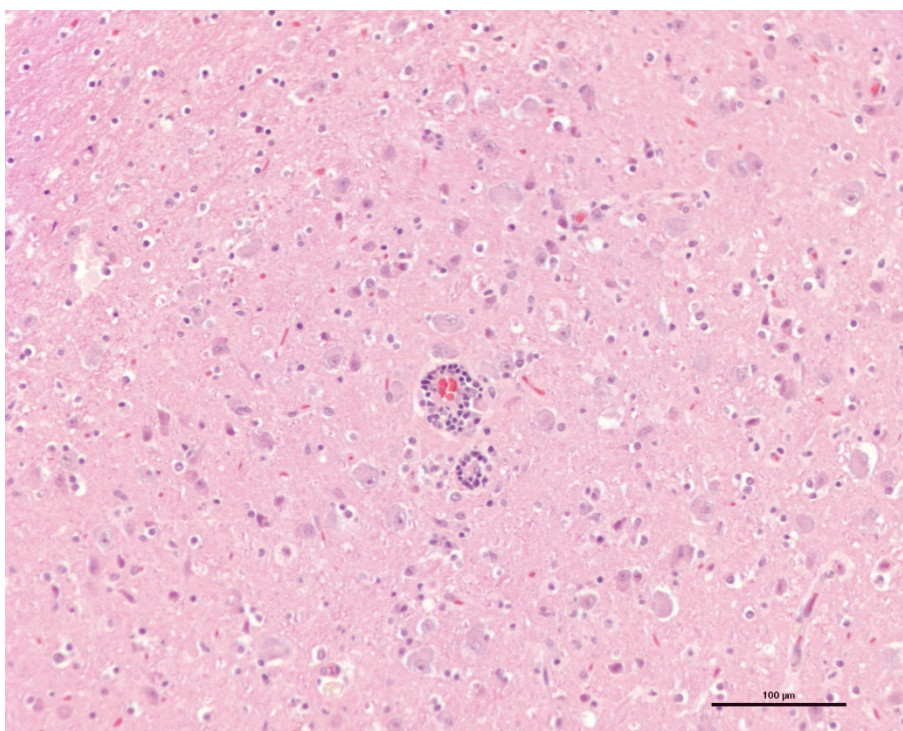
Fall	Storhjärna	Lillhjärna	Hjärnstam	Ryggmärg
O373/78	Måttlig	Måttlig	Kraftig	Måttlig
O1841/78	Måttlig	Lindrig	Måttlig	Måttlig
O553/80	Kraftig	Måttlig	Kraftig	Måttlig
O857/83	Måttlig	Lindrig	Lindrig	Lindrig
O149/84	Måttlig	Ej undersökt	Ej undersökt	Lindrig
O876/90	Måttlig	Måttlig	Måttlig	Lindrig
O01/93	Kraftig	Måttlig	Kraftig	Måttlig
O597/96	Lindrig	Måttlig	Måttlig	Lindrig
O219/03	Måttlig	Lindrig	Måttlig	Måttlig
O176/04	Lindrig	Måttlig	Kraftig	Måttlig
O405/09	Kraftig	Måttlig	Kraftig	Måttlig
O88/14	-	-	-	-
O159/15	Måttlig	Lindrig	Måttlig	Lindrig
O61/16	Kraftig	Måttlig	Kraftig	Kraftig

Tabell 6. Andel katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit med lindrig, måttlig, respektive kraftig inflammationsgrad.

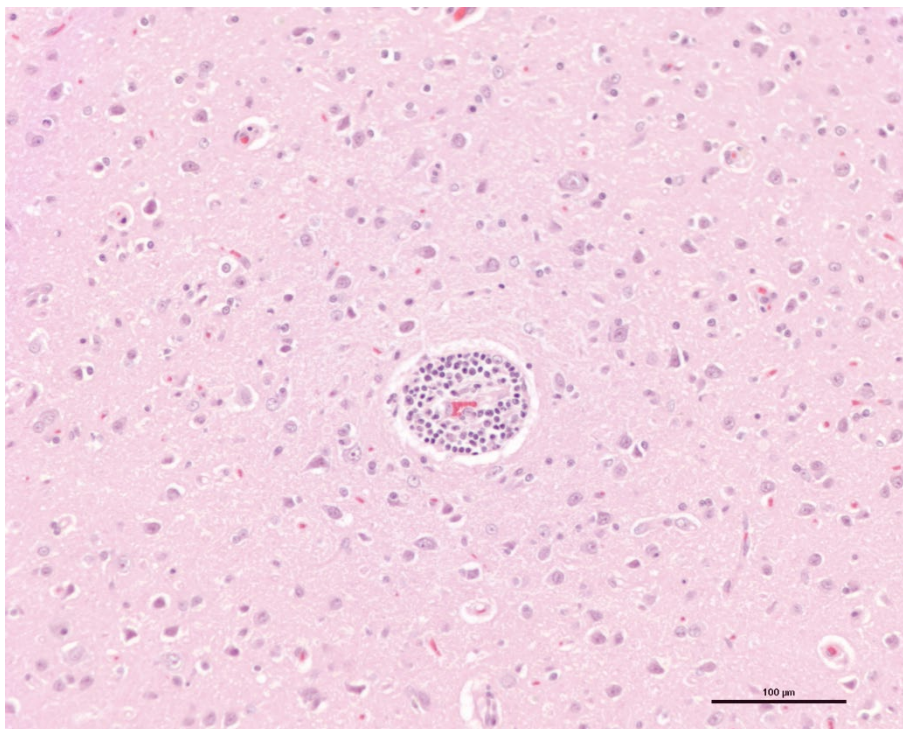
Inflammationsgrad	Storhjärna	Lillhjärna	Hjärnstam	Ryggmärg
Lindrig	Cirka 14 % (2 av 14)	Cirka 29 % (4 av 14)	Cirka 7 % (1 av 14)	Cirka 36 % (5 av 14)
Måttlig	50 % (7 av 14)	Cirka 57 % (8 av 14)	Cirka 36 % (5 av 14)	50 % (7 av 14)
Kraftig	Cirka 29 % (4 av 14)	0 % (0 av 14)	Cirka 43 % (6 av 14)	Cirka 7 % (1 av 14)



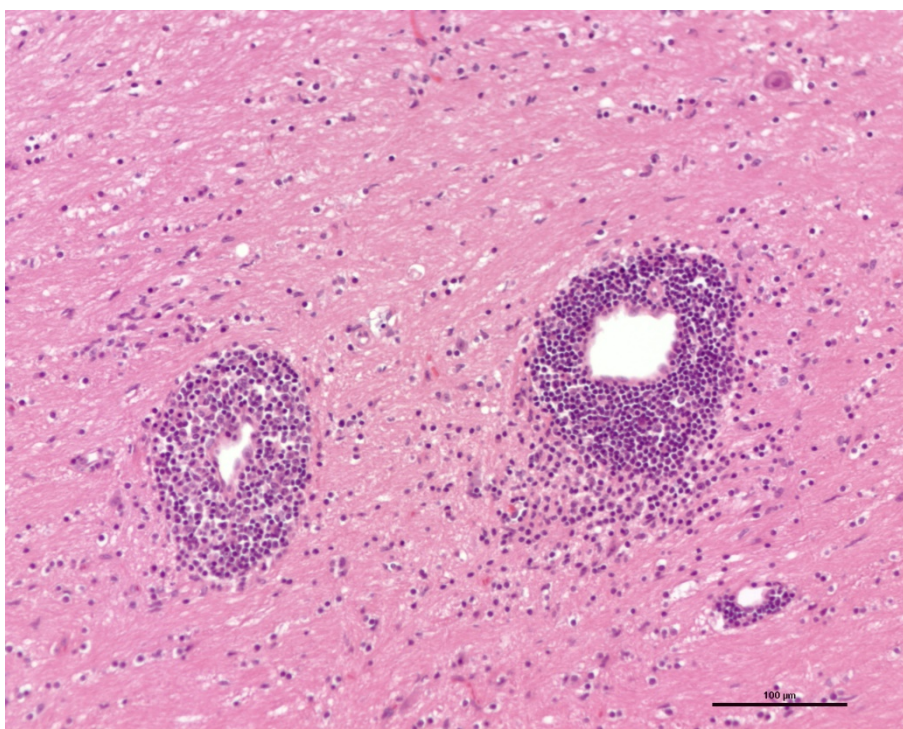
Figur 5. Översiktsbild av storhjärna från O405/09. Inflammatoriska cellinfiltrat ses i grå substans (pilar). Vit substans markerad med stjärnor. HE-färgat preparat.



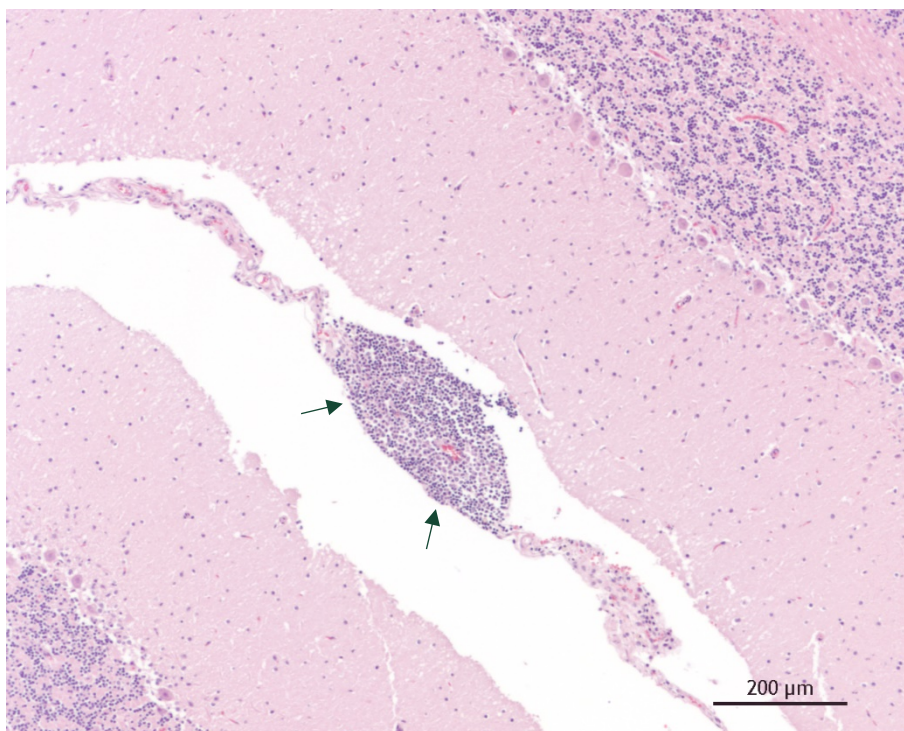
Figur 6. Exempelbild på lindrig inflammationsgrad med små inflammatoriska cellinfiltrat, 1–2 celler i tjocklek. HE-färgat preparat.



Figur 7. Exempelbild på måttlig inflammationsgrad med medelstort inflammatoriskt cellinfiltrat, 3–5 cellager i tjocklek. HE-färgat preparat.



Figur 8. Exempelbild på kraftig inflammationsgrad med stora inflammatoriska cellinfiltrat, i detta fall cirka 8–15 cellager i tjocklek. HE-färgat preparat.



Figur 9. Lillhjärna från O373/78. Inflammatoriskt cellinfiltrat i lillhjärnans meninger (pilar). HE-färgat preparat.

Katter i kontrollgruppen

Vävnad från storhjärna, lillhjärna, hjärnstam och ryggmärg undersöktes från två av katterna, och vävnad från storhjärna, lillhjärna och hjärnstam undersöktes från tre av katterna.

Inflammatoriska förändringar i CNS påvisades i tre av fem kontrollfall (O753/77, O120/99 och O40/10). O753/77 (SD intervertebrala ligament- och muskelrupturer med blödningar och sekundär akut myelomalaci) uppvisade ett fåtal spridda mononukleära celler i meningerna samt i *plexus choroideus*. O120/00 (SD diskospondylit) uppvisade infiltration av neutrofiler och lymfocyter i hjärnans och ryggmärgens meninger, samt ett perivaskulärt lymfohistiocytärt cellinfiltrat i hjärnstammen och ett i ryggmärgens vita substans. O40/10 (SD meningiom) uppvisade infiltration av lymfocyter, neutrofiler och plasmaceller i meninger, ett perivaskulärt cellinfiltrat bestående av mononukleära celler i hjärnstammen, samt makrofager i storhjärnans parenkym i anslutning till påvisat meningiom.

4.2.3 Förekomst av RusV

Katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit

Storhjärna, hjärnstam, lillhjärna och ryggmärg undersöktes från 13 av 14 fall. Från ett fall (O149/84) kunde material från lillhjärna och hjärnstam ej återfinnas.

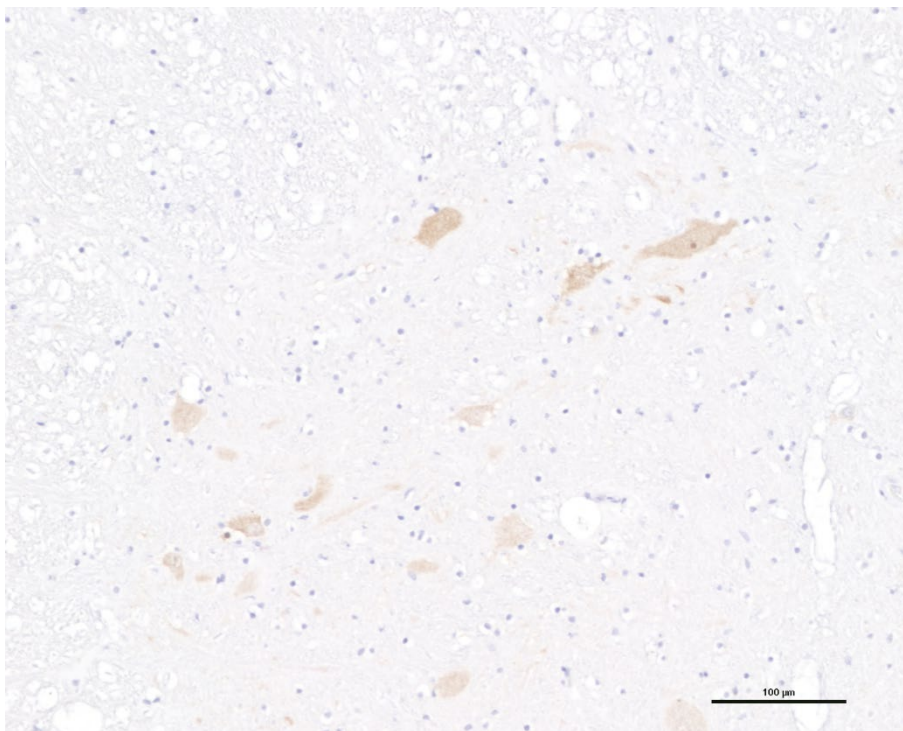
Den positiva och negativa kontrollen fungerade nöjaktigt i varje omgång av immunohistokemi (se figurer 10–12). O88/14, saknade inmärkning för RusV i alla undersökta lokalisationer. Övriga individer hade inmärkning i två eller fler lokalisationer (detaljerad bedömning redovisas i tabell 7).

Huvudsakligen sågs inmärkning i storhjärnans, lillhjärnans, hjärnstammens och ryggmärgens neuron, men undantagsvis kunde även inmärkning ses i gliaceller. Vissa neuron uppvisade en inmärkning avgränsad till cytoplasman och ingen inmärkning i cellkärnan, medan andra neuron hade en diffus och jämn inmärkning över både cytoplasma och cellkärna.

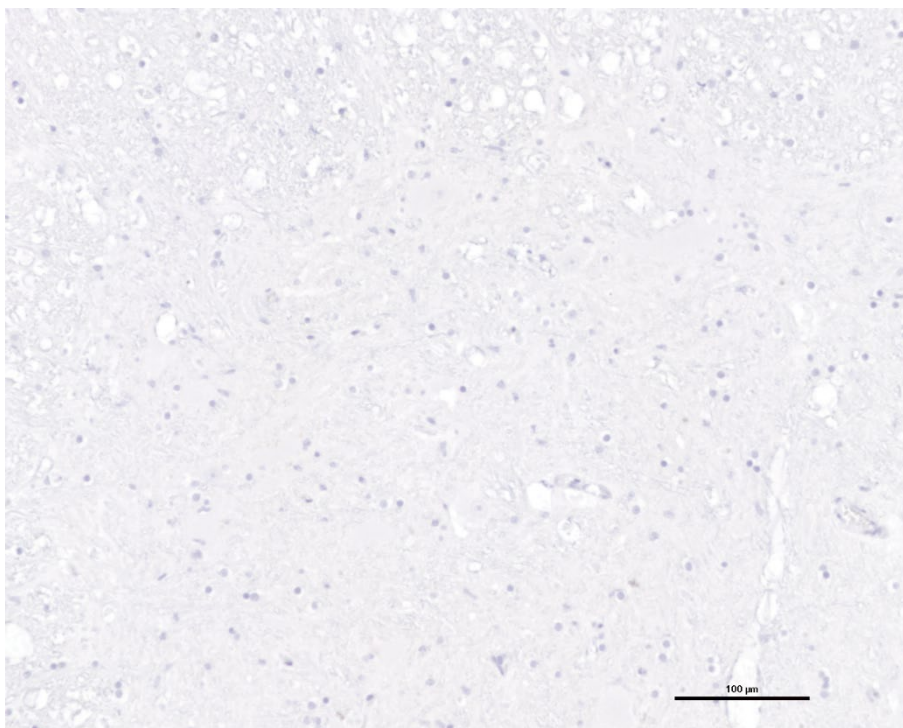
Ryggmärgen uppvisade ett negativt resultat mer frekvent än övriga undersökta lokalisationer. I de fall där ryggmärgen var negativ uppvisade övriga lokalisationer i högre utsträckning grad 1. Tre fall bedömdes som grad 3 i alla undersökta lokalisationer, detta var fallen från 1996, 2015 respektive 2016. De flesta fall med preparat vilka bedömdes som grad 2 var från 1970- och 1980-talet, men även två fall från 2000-talet hade preparat vilka bedömdes som grad 2. Exempelbilder på snitt bedömda till grad 1, 2 respektive 3 illustreras i figur 13–15.

Tabell 7. Grad av inmärkning för RusV hos katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit.

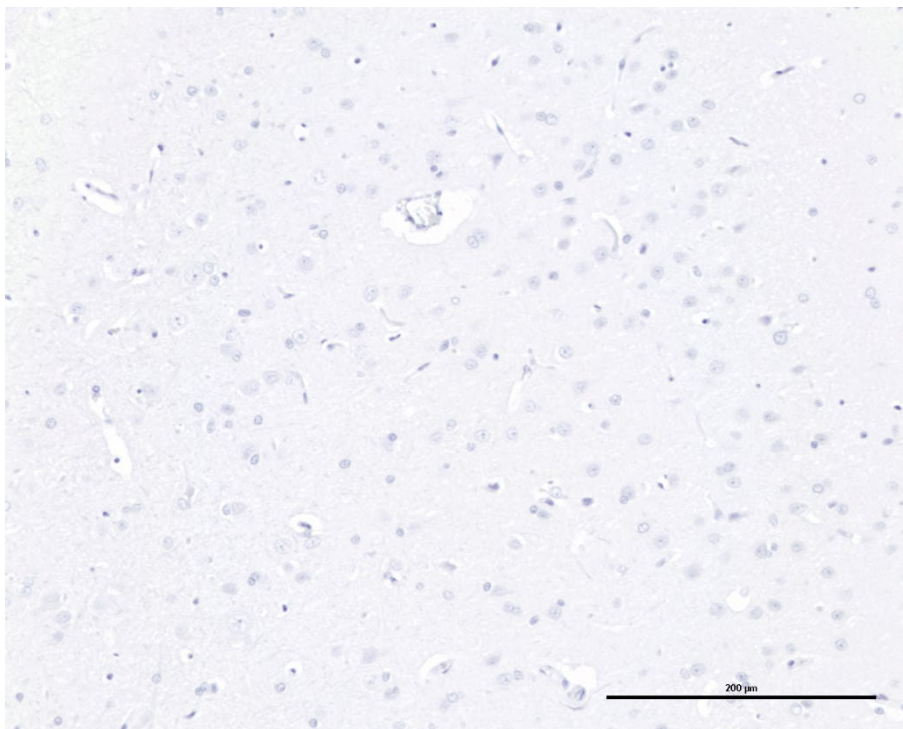
Fall	Storhjärna	Lillhjärna	Hjärnstam	Ryggmärg
O373/78	3	2	2	2
O1841/78	3	2	3	2
O553/80	Negativ	2	2	Negativ
O857/83	2	3	3	2
O149/84	3	Ej undersökt	Ej undersökt	3
O876/90	Osäker	3	1	Negativ
O01/93	1	3	1	Negativ
O597/96	3	3	3	3
O219/03	3	2	2	3
O176/04	1	1	2	Negativ
O405/09	Negativ	1	1	1
O88/14	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
O159/15	3	3	3	3
O61/16	3	3	3	3



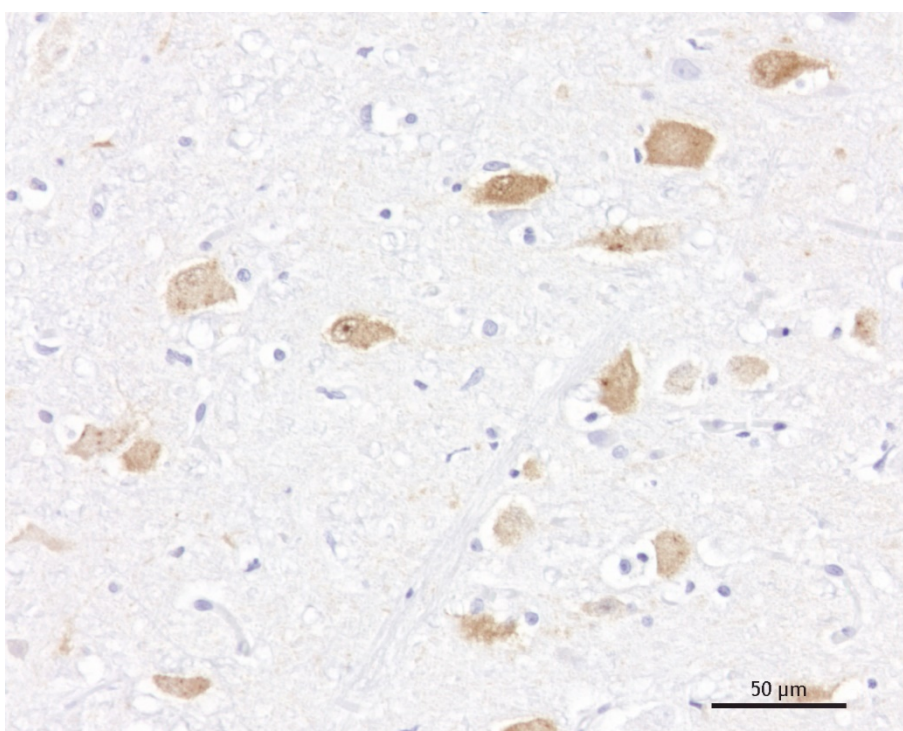
Figur 10. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Ryggmärg från positiv kontroll (O10/17). Distinkt positiv (brun) inmärkning ses i flertalet neuron.



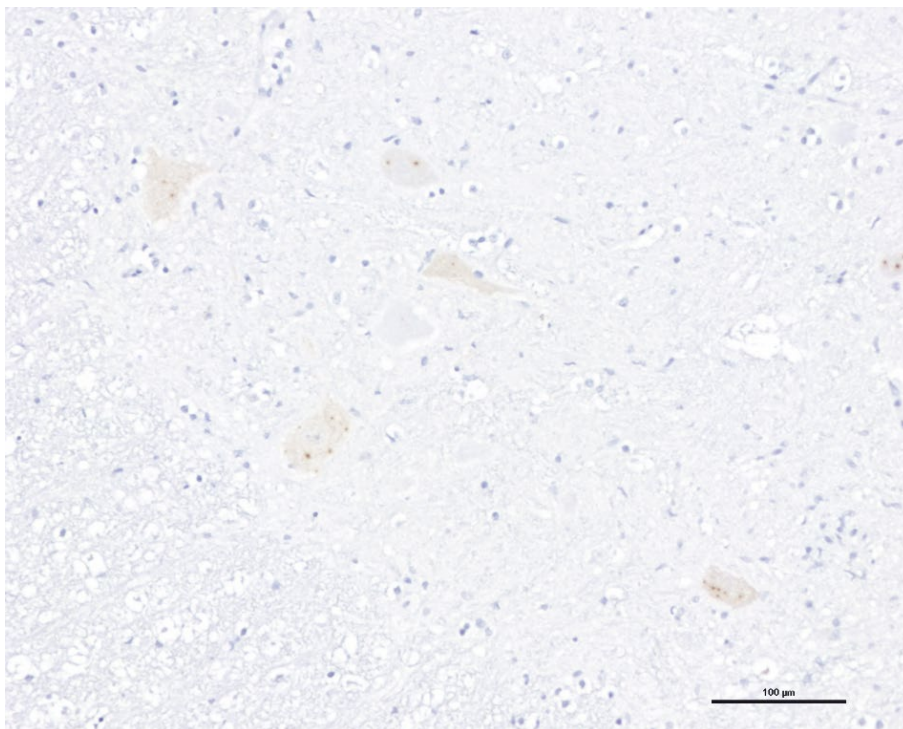
Figur 11. Ryggmärg från positiv kontroll (O10/17), behandlad med buffert i stället för primär antikropp. Ingen inmärkning påvisad.



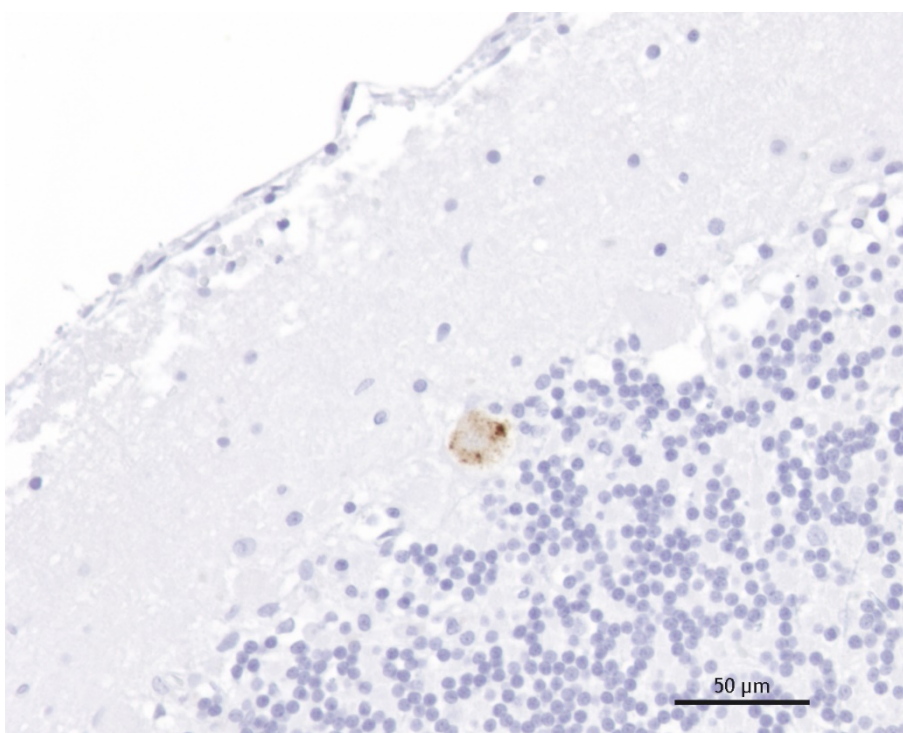
Figur 12. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Storhjärna från negativ kontroll (kontroll 5.2). Ingen inmärkning påvisad.



Figur 13. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Exempelbild på inmärkning grad 3, storhjärna från O219/03. Distinkt positiv (brun) inmärkning i flertalet neuron.



Figur 14. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Exempelbild på inmärkning grad 2, ryggmärg från O857/83. Svag positiv (brun) inmärkning i flertalet neuron.



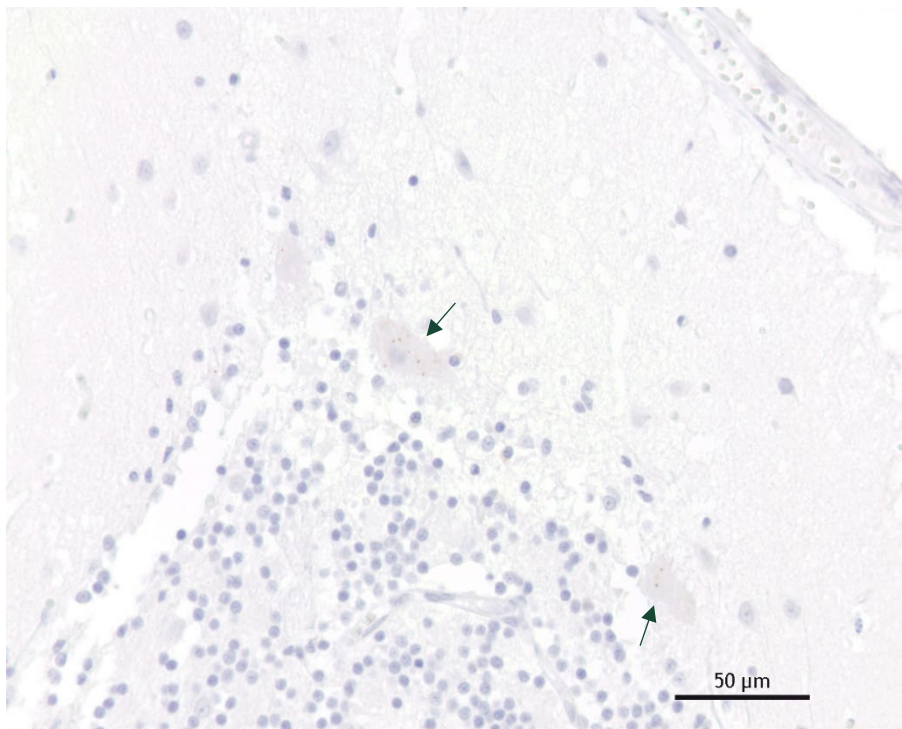
Figur 15. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Exempelbild på inmärkning grad 1, lillhjärna från O176/04. En enstaka purkinjecell med positiv (brun) inmärkning.

Katter i kontrollgruppen

Storhjärna, lillhjärna, hjärnstam och ryggmärg undersöktes hos två individer. Hos övriga tre individer undersöktes storhjärna, lillhjärna och hjärnstam. O104/80 uppvisade fokalt små spridda bruna granula i cytoplasman i ett fåtal purkinjeceller (se figur 16). O55/90 uppvisade bruna inmärknings av granulerat utseende i lillhjärnan samt hjärnstammen som ej var neuronassocierade, dock eventuellt associerade med andra celler. O40/10 uppvisade enstaka bruna inmärknings i storhjärnan, vilka ej med säkerhet var cellassocierade. I övriga undersökta lokalisationer hos samtliga fall förelåg ingen inmärkning. Detaljer angående bedömningen av inmärkning för RusV redovisas i tabell 8.

Tabell 8. Grad av inmärkning för RusV hos katterna i kontrollgruppen.

Individ	Storhjärna	Lillhjärna	Hjärnstam	Ryggmärg
O753/77	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
O104/80	Negativ	Osäker	Negativ	Ej undersökt
O55/90	Negativ	Osäker	Osäker	Ej undersökt
O120/00	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
O40/10	Osäker	Negativ	Negativ	Ej undersökt



Figur 16. Immunohistokemisk infärgning med antikropp mot RusV. Lillhjärna från O104/80 med små bruna granula i cytoplasman i ett fåtal purkinjeceller (pilar), osäkert resultat.

4.3 Undersökning av perifera organ från katter med känd positiv RusV-status

Perifera organ undersöktes från fyra katter med tidigare bekräftad positiv RusV-status i CNS (Matiasek *et al.* 2023). Lunga, lever och njure undersöktes hos alla individer och dessa organ saknade inmärkning för RusV i respektive undersökt fall. O10/17 uppvisade brun inmärkning i cytoplasman i en enstaka cell, vilken var lokaliserad till tunntarmens mukosa. Detaljer om vilka organ som undersöktes hos respektive individ, samt resultat av inmärkning för RusV redovisas i tabell 9.

Tabell 9. Bedömning av förekomst av RusV i perifera organ hos katter med känd positiv RusV-status. Neg. = negativ; E.u. = ej undersökt. Inm. = inmärkning

Individ	Lunga	Lever	Mjälte	Njure	Mag-säck	Tunntarm	Grovtarm	Bukspottkörtel	Lymfknuta
O10/17	Neg.	Neg.	E.u.	Neg.	E.u.	Inm.	E.u.	Neg.	E.u.
O36/17	Neg.	Neg.	E.u.	Neg.	Neg.	Neg.	E.u.	Neg.	Neg.
O37/17	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	E.u.	Neg.	E.u.	E.u.
O13/19	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	E.u.	E.u.	E.u.	E.u.	E.u.

5. Diskussion

5.1 Sammanställning av fall obducerade vid SLU mellan 1970–2019

Ett av syftena med detta arbete var att sammanställa antalet fall av katter obducerade vid SLU mellan 1970–2019, med SD tydande på vingelsjuka eller med SD vilken potentiellt skulle kunna vara associerad med vingelsjuka.

De katter som antogs att med stor sannolikhet ha vingelsjuka var de med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, vingelsjuka, felin ataxi, felin meningoencefalomyelit, icke-suppurativ meningoencefalit, icke-suppurativ encefalomyelit, samt icke-suppurativ encefalit.

Diagnosgruppen ”övriga diagnoser” utgjorde ungefär 3,4 % av det totala antalet fall. Fallen som inkluderades i denna diagnosgrupp var sådana där sannolikheten att katten hade vingelsjuka antogs vara jämförelsevis lägre, men inte helt utesluten.

Eftersom vingelsjuka är en diagnos som ställs baserat på morfologiska fynd samt den kliniska bilden (Wensman *et al.* 2012) blir det i många fall svårt att säkert veta om katterna har haft vingelsjuka, då den enda informationen som erhöles om majoriteten av katterna var just SD. Vidare går det inte heller utifrån denna information att säga något om vilka vävnader som plockats ut för mikroskopisk undersökning. Således är det möjligt att en katt som exempelvis fått SD icke-suppurativ myelit även hade inflammatoriska förändringar i hjärnan, men att detta aldrig upptäcktes på grund av att hjärnan ej undersöktes mikroskopiskt.

Det är inte alltid tydligt vilken typ av förändringar som har setts vid undersökning baserat på SD. Detta gäller dels för de fall som fått SD vingelsjuka och felin ataxi, dels för de fall som fått SD akut meningoencefalit och felin meningoencefalomyelit.

I SD vingelsjuka och felin ataxi är det kanske underförstått att det handlar om en icke-suppurativ inflammation, men det framgår inte i vilka delar av CNS de mikroskopiska förändringarna är lokaliserade. Exempelvis hade en katt med SD felin ataxi fått sektionfyndet (SF) ”icke-suppurativ encefalomyelit”, medan en annan katt som sorterades in i diagnosgruppen felin ataxi, hade SD ”icke-suppurativ meningit i ländryggmärgen, felin ataxi”. Detta visar på att innebörden i begreppet felin ataxi inte är entydig med en specifik morfologisk diagnos, utan att det har använts som en övergripande tolkning för det obducerade fallet.

I motsats framgår det i de andra nämnda SD (akut meningoencefalit och felin meningoencefalomyelit) vilken lokalisering (vävnadstyp) man observerat förändringarna i, men inte vilken morfologisk typ av inflammation som har setts.

För flera av fallen i denna sammanställning blir det således svårt att dra några djupare slutsatser om vilket sjukdomstillstånd respektive katt drabbats av. De ovan

beskrivna exemplen visar också på att användbarheten av data i epidemiologiska studier kan vara beroende av utformandet av SD (eller diagnoskoder) och diagnosregister.

Intressant nog fanns det en markant ökning av antalet fall under 1990-talet, särskilt under början av decenniet, med flest antal obducerade fall under 1993. Detta beror troligtvis på en forskningsassocierad insamling av fall under början av 1990-talet relaterat till Anna-Lena Bergs (tidigare Lundgren) forskning och doktorsavhandling om vingelsjuka hos katt (Lundgren 1995). En ökad medvetenhet om sjukdomen skulle också kunna vara en bidragande orsak till att fler fall obducerades.

Under 2010-talet sågs i stället ett relativt lågt antal obducerade fall, särskilt i jämförelse med 1990-talet, men även med 2000-talet. Orsaken till detta är oklar, men det skulle kunna vara relaterat till att färre katter drabbades av vingelsjuka under denna tid, eller ett minskat intresse av att fastställa diagnosen *post mortem*.

Det vore intressant att i vidare studier ta reda på om detta är en reell minskning av antalet fall, eller om andra faktorer spelar in vilket ger ett falskt lågt antal. I en nyligen publicerad studie som tittade på vingelsjuka hos historiska fall i Österrike rapporterades en ökad förekomst av vingelsjuka under 1990-talet, och sedan en minskad förekomst under 2000-talet (Weiss *et al.* 2023). Enligt studien har inga nya fall av vingelsjuka rapporterats efter 2010, och frågan ställs om sjukdomen gradvis har försvunnit i Österrike.

Om resultaten som ses i detta arbete stämmer överens med det totala antalet katter som får vingelsjuka skulle en gradvis minskad förekomst av sjukdomen även kunna vara fallet i Sverige. En minskning av sjukdomen skulle exempelvis kunna bero på minskad förekomst av reservoardjur, ändrad djurhållning (fler katter som hålls inne), eller lägre patogenicitet hos det sjukdomsframkallande smittämnet.

5.2 Histologisk undersökning av CNS från katter med vingelsjuka obducerade mellan 1970–2016

I detta arbete undersöktes 14 katter obducerade mellan 1970–2016, vilka alla hade fått SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit. Hur omfattande informationen var angående de kliniska symtomen samt sjukdomsdurationen varierade från remiss till remiss, men i de flesta fall stämde den kliniska historien väl överens med tidigare rapporteringar (Lundgren 1992; Wensman *et al.* 2012).

Sjukdomshistorien stack ut för ett fall, nämligen O88/14. Detta var samma fall som varken uppvisade de histopatologiska förändringar som typiskt sett ses vid vingelsjuka, eller inmärkning för RusV. Enligt remissen hade katten drabbats av ett väldigt akut sjukdomsförlopp (två dagar), där den gått in i chocktillstånd och sedan självdött. Vid vingelsjuka ses, som tidigare nämnts, vanligtvis ett subakut till

kroniskt förlopp med andra typer av kliniska symtom, till exempel bakbensataxi och beteendeförändringar.

Trots att denna katt inte uppvisade den typiska morfologiska bilden för vingelsjuka, eller hade klinisk historik typisk för vingelsjuka, inkluderades den ändå i den immunohistokemiska undersökningen. Detta eftersom den uppfyllde det satta inklusionskriteriet och inte något av exklusionskriterierna (se rubrik 3.3.1). Vid en omformulering av kriterierna hade ett fall kunnat exkluderas om den mikroskopiska bilden inte stämde överens med beskrivningen i det initiala obduktionsutlåtandet. Fallet är dock intressant i kontrast till de fall som uppvisade en icke-suppurativ meningoencefalomyelit, eftersom det stärker teorin att andra typer av morfologiska meningoencefalomyeliter inte är associerade med infektion med RusV.

5.2.1 Förekomst av inflammatoriska celler och gradering av inflammation

Hos en av katterna, O88/14, skiljde sig bedömningen i detta arbete från den initiala bedömningen som gjorts vid obduktionstillfället. I detta fall sågs infiltration med neutrofiler och lymfocyter i hjärnan, ryggmärgen, samt meninger, och den histologiska bilden var således förenlig med en subakut neutrofilrik (suppurativ) meningoencefalomyelit, snarare än en icke-suppurativ meningoencefalomyelit. Detta medför att denna katt var felaktigt klassificerad i diagnossystemet. Övriga 13 katter bedömdes ha en icke-suppurativ meningoencefalomyelit, precis som enligt den initiala bedömningen.

Inflammationsgraden bedömdes baserat på ett protokoll beskrivet i Matiassek *et al.* (2023). I denna studie bedömdes inflammationsgraden som kraftig hos cirka 34 % av katterna; som måttlig hos cirka 45 % av katterna; samt som lindrig eller lindrig till måttlig hos cirka 21 % av katterna. I detta arbete gjordes inte en sammantagen bedömning för hela fallet, utan inflammationsgraden bedömdes per lokalisation. Genom att titta på tabell 6 går det dock att se att resultaten i detta arbete stämmer relativt väl överens med det som beskrivits i den nämnda studien. Resultaten i detta arbete stämmer även överens med det som beskrivits i litteraturen om de inflammatoriska förändringarnas utbredning vid vingelsjuka; lesionerna är mest uttalade i hjärnstammen, ryggmärgen samt cerebrala cortex, men inte lika framträdande i lillhjärnan (Nowotny & Weissenböck 1995; Matiassek *et al.* 2023).

En aspekt som eventuellt kan ha gjort bedömningen opålitlig är att olika antal lokalisationer i CNS bedömdes hos olika fall. Detta på grund av att det från vissa fall endast kunde återfinnas enstaka vävnadspreparat, medan det från andra fall fanns många vävnadspreparat tillgängliga för undersökning. Om endast enstaka lokalisationer undersöks kan det av ren slump falla sig så att inflammatoriska förändringar antingen kommer med eller inte kommer med i det undersökta preparatet.

Hos kontrollkatterna sågs inflammatoriska förändringar i tre av fem fall. Dessa katter hade SD intervertebrala ligament- och muskelrupturer med blödningar och sekundär akut myelomalaci; diskospondylit; respektive meningiom. Det är troligt att de inflammatoriska förändringarna triggats av de påvisade sjukdomstillstånden. Detta belyser att inflammation är ett ospecifikt svar på vävnadsskada samt att ett inflammatoriskt svar kan triggas vid tumörsjukdomar. Det är därför viktigt att ta med den makroskopiska bilden såväl som sjukdomshistorien vid histopatologisk bedömning. Att inflammatoriska förändringar kan uppstå av fler anledningar än infektion belyser också vikten av undersökning för specifika etiologier vid vissa morfologiska diagnoser.

5.2.2 Förekomst av RusV

Det andra syftet med detta arbete var att undersöka förekomsten av RusV i CNS hos katter med misstänkt vingelsjuka de senaste fem decennierna. RusV kunde detekteras hos 13 av 14 katter med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit, alla dessa katter hade dessutom en icke-suppurativ inflammation i CNS. Den katt som saknade inmärkning för RusV var samma katt som var felklassificerad i diagnossystemet, eftersom den i stället uppvisade en neutrofilrik inflammation i CNS.

Dessa resultat visar att RusV har funnits och infekterat katter i Sverige redan på 1970-talet. Eftersom viruset kunde detekteras hos alla katter med en icke-suppurativ inflammation i denna studie är det troligt att vingelsjuka hos katter i Sverige sedan decennier varit RusV-associerad. Huruvida det finns någon skillnad i förekomst av RusV mellan olika decennier bör tolkas med försiktighet med tanke på studiepopulationens storlek.

En intressant observation var att ryggmärgen tenderade att sakna inmärkning för RusV oftare jämfört med övriga undersökta lokalisationer. I de fall ryggmärgen saknade inmärkning observerades också att övriga undersökta lokalisationer i högre utsträckning uppvisade inmärkning endast i enstaka celler (grad 1). Detta fynd skulle kunna indikera att viruset har större tropism för hjärna jämfört med ryggmärg.

Vidare observerades att fall obducerade under 1970- och 1980-talet hade svagare inmärkning jämfört med fall obducerade senare (alltså fick grad 2 snarare än grad 3). Detta skulle kunna bero på att epitopen i de äldre preparaten till viss del har förstörts med tiden, vilket skulle leda till att den primära antikroppen inte band in till dessa i lika hög utsträckning som i preparat från senare år. Att immunoaktiviteten försämras till följd av att antigenen förfaller i formalinfixerade paraffinbäddade vävnadspreparat som förvarats under lång tid är ett fenomen som tidigare observerats (Grillo *et al.* 2015); detta är dock inget som har undersökts specifikt för antikroppen som användes i detta arbete. Två fall från 2000-talet uppvisade också svagare inmärkning i en del av preparaten (alltså grad 2). Faktorer såsom utdragen formalinfixering innan inbäddning av vävnad och lång tid mellan

dödsfall eller avlivning och formalinfixering av vävnadsprov skulle kunna påverka mängden bibehållna epitoper för antikroppen att binda in till.

Det ska påpekas att IHC är en semikvantitativ metod för detektion av virus; därmed säger resultaten exempelvis inget om virulensen hos viruset som infekterat en viss individ. Vidare utfördes flertalet körningar av IHC för att erhålla alla resultat, och hur stark inmärknigen är kan därmed skilja sig mellan olika körningar och behöver inte nödvändigtvis endast bero på mängden virus (eller epitoper) i preparatet. En positiv kontroll fanns dock med i samtliga körningar och bedömdes avseende infärgningsintensitet för att säkerställa att resultaten mellan infärgningsomgångar var jämförbara.

Bland kontrollfallen uppvisade tre av katterna brun inmärkning i någon del av hjärnan. O55/90 och O40/10 hade inmärkning i lillhjärnan och hjärnstammen respektive storhjärnan, men inmärknigen var ej säkert cellassocierad och bedömdes troligtvis vara artefaktuell. Från O40/10 genomgick ett nytt snitt från samma vävnadspreparat ett IHC-protokoll där den primära antikroppen (riktad mot RusV) byttes ut mot buffert. Detta gjordes för att undersöka om fyndet berodde på att den primära antikroppen bundit in eller kunde representera ett icke-specifikt fynd. I detta försök sågs inte längre fyndet och det går således inte att utesluta att fyndet som sågs initialt representerade en sann inmärkning för RusV.

Den tredje katten, O104/80, hade en subtil inmärkning med spridda brunfärgade granula i ett fåtal purkinjeceller i ett fokalt område i preparatet från lillhjärnan. Ett nytt snitt från samma vävnadspreparat genomgick ett IHC-protokoll där den primära antikroppen (riktad mot RusV) byttes ut mot buffert. I detta försök sågs inte längre fyndet och det går således inte att utesluta att fyndet som sågs initialt representerade en sann inmärkning för RusV. Det ska dock betonas att fyndet var svårtolkat eftersom inmärknigen i detta preparat var mycket subtil (se figur 17) och att inga andra undersökta lokalisationer i CNS från denna katt var positiva. Att inmärknigen endast sågs i ett fokalt område i preparatet talar emot att det är en sann inmärkning, eftersom de tydliga positiva inmärkningarna som sågs i detta arbete tenderade att vara mer generellt utspridda.

Resultatet är ändå intressant eftersom det skulle kunna antyda att RusV kan förekomma i CNS-vävnad hos katter som ej uppvisar symtom på vingelsjuka. Det är rimligt att tänka att även katter som aldrig insjuknar i vingelsjuka har stött på viruset vid något tillfälle. Det kan inte heller helt uteslutas att denna katt nyligen blivit infekterad av RusV, men ännu ej hunnit utveckla några morfologiska förändringar (eller typiska kliniska symtom). Andra typer av undersökningar för virusdetektion såsom exempelvis PCR och ISH skulle kunna användas för att vidare se om virus är detekterbart hos kontrollfall med osäkert inmärkningsresultat.

Vidare forskning för att undersöka om katter som inte har vingelsjuka kan bära på viruset och vilka predisponerande faktorer som avgör att en katt insjuknar är av

intresse för att undersöka hur spritt viruset är i den svenska kattpopulationen, samt om subkliniska fall förekommer.

Det är anmärkningsvärt att alla katter som hade en icke-suppurativ inflammation i CNS även var positiva för RusV. Likaså är det anmärkningsvärt att alla katter som inte uppvisade den typiska morfologiska bilden som ses vid vingelsjuka, förutom eventuellt kontrollkatten (O104/80) nämnd ovan, bedömdes vara negativa för RusV. Detta indikerar att RusV är en orsak till vingelsjuka hos svenska katter sedan 1970-talet. Förekomst av RusV i CNS hos dessa katter är i enlighet med de i två nyligen publicerade studierna, i vilka man också påvisat RusV i CNS hos katter med vingelsjuka (Matiassek *et al.* 2023; Weiss *et al.* 2023). Detta är dock första gången RusV påvisats i CNS hos katter i Sverige under tidsperioden som detta arbete tittat på.

5.2.3 Samband mellan inflammationsgrad och förekomst av RusV

I detta arbete ställdes frågan om det går att se något samband mellan förekomst av RusV och grad av inflammation. Alla lokalisationer som bedömdes vara negativa för RusV hos katterna med SD icke-suppurativ meningoencefalomyelit (bortsett från katten som bedömdes vara felklassificerad) uppvisade varierande grad av inflammation från lindrig till kraftig. Oavsett vilken grad av inmärkning (grad 1 till 3) en lokalisation som bedömdes vara positiv för RusV uppvisade, kunde inflammationsgraden variera från lindrig till kraftig. Till exempel uppvisade både O61/16 och O405/09 måttlig till kraftig inflammationsgrad i alla lokalisationer, men O61/16 bedömdes till grad 3 för förekomst av RusV i alla lokalisationer, medan O405/09 endast bedömdes till grad 1 i tre lokalisationer (den fjärde lokalisationen var negativ). Det går således varken att se något mönster som tyder på ett samband mellan en viss inflammationsgrad och förekomsten av RusV, eller på att de inflammatoriska förändringarna endast är lokaliserade i samma delar av CNS som inmärkningarna för RusV.

Ett intressant fenomen som observerades var att RusV tenderade att förekomma i intakta neuron, och inte alltid i direkt anslutning till inflammatoriska cellinfiltrat. Exempelvis tenderade det att finnas riklig infiltration av mononukleära celler i lillhjärnans meninger, samtidigt som det sällan sågs några perivaskulära cellinfiltrat i lillhjärnans parenkym, där det i stället ofta sågs starkt inmärkning för RusV i purkinjeceller. Detta fenomen har även observerats i en tidigare studie (Matiassek *et al.* 2023). Eftersom man kan anta att immunceller rekryteras för att bekämpa infektionen, är det paradoxalt att inmärkning för RusV så ofta observeras i områden där inflammatoriska förändringar saknas. Det är också förvånande att de neuron som uppvisar inmärkning för RusV morfologiskt ser friska ut, eftersom det är förväntat att ett neurotropt virus orsakar degeneration av infekterade neuron (Berth *et al.* 2009). Detta skulle kunna tala för att RusV inte direkt orsakar lesioner i hjärnan

vilket leder till kliniska symtom hos katten, utan att lesionerna snarare är en konsekvens av en förändrad miljö i hjärnvävnaden sekundärt till den inflammatoriska reaktionen. Vidare forskning krävs för att ta reda på mer om direkta patogena effekter orsakade av RusV, samt om det inflammatoriska svar som RusV triggar.

5.2.4 Begränsningar

I detta arbete undersöktes om RusV kunde detekteras med IHC i storhjärna, lillhjärna, hjärnstam och ryggmärg hos katter med vingelsjuka. Det finns dock svaga punkter när det gäller utförandet av studien. Likaså hade ytterligare undersökningar varit önskvärda för att erhålla ett så tillförlitligt resultat som möjligt, men som var utanför ramarna för detta arbete.

Det finns flera nackdelar med IHC som metod som ej diskuteras mer ingående här, men en svaghet i detta specifika fall var att den primära antigen-riktade antikroppen som användes ej hade en känd proteinkoncentration. Detta gjorde att en isotyp-matchad antikropp ej kunde användas, varför den primära antikroppen tillsattes till ett känt negativt preparat i varje körning som en variant på en negativ kontroll. I vissa fall där ett osäkert resultat erhöles tillsattes buffert till ett nytt snitt från samma preparat i stället för den primära antikroppen. Om detta hade gjorts på alla preparat, alltså att primär antikropp respektive buffert tillsattes på två separata snitt från samma preparat, hade tillförlitligheten till resultaten stärkts.

En sak som hade varit önskvärd att genomföra i denna studie hade varit att utföra ytterligare analyser på det material som ingått i försöket, exempelvis med PCR eller ISH. Om dessa analysmetoder gav samma resultat skulle det stärka resultatet.

Det hade även varit intressant att undersöka materialet för förekomst av andra infektiösa agens, eftersom resultaten i detta arbete inte utesluter att en saminfektion föreligger. Bornavirus (BDV), som vid infektion hos får och häst orsakar en liknande histopatologisk bild som vid vingelsjuka hos katt, skulle potentiellt kunna vara en del av en saminfektion. Det vore även intressant att undersöka en eventuell saminfektion med andra agens som kan infektera CNS hos katt men som typiskt sett ger en annan morfologisk bild, exempelvis *Toxoplasma gondii*. Nyligen upptäcktes även ett felint morbillivirus (FeMV) som orsakat en lymfocytär encefalit hos en två månader gammal kattunge (Dawson *et al.* 2023); det är möjligt att detta virus i framtida undersökningar kommer upptäckas i arkiverat material. Även saminfektion med ett agens som ännu inte identifierats är möjligt.

I framtida forskning vore det även värdefullt att undersöka utbredningen av RusV i olika delar av CNS i större detalj, för att se om detta går att koppla ihop med de neurologiska symtom som ses hos katter med vingelsjuka. Exempelvis skulle man kunna undersöka utbredningen i olika delar av hjärnstammen, olika delar av storhjärnan, förekomsten i hippocampus och skillnad mellan ventral- och dorsalhorn i ryggmärgen.

5.3 Förekomst av RusV i perifera organ hos katter med känd positiv RusV-status i CNS

Det tredje syftet med detta arbete var att undersöka perifera organ hos katter som sedan tidigare har känd positiv RusV-status i CNS. I försöket ingick fyra katter vilka tidigare ingått i en studie av Matiassek *et al.* från 2023, där alla katter var positiva (i varierande grad) för RusV i CNS med IHC, ISH och RT-qPCR.

I tunntarmen från fall O10/17 sågs en cell med brun inmärkning. Detta preparat undersöktes vidare med ett immunohistokemiprotokoll där den primära antikroppen (riktad mot RusV) byttes ut mot buffert. I detta experiment kunde inte längre någon brun inmärkning ses, vilket skulle kunna tala för att en sann inmärkning för RusV sågs initialt. Det är dock möjligt att det buffert-behandlade snittet låg i ett annat cellager än snittet behandlad med primär antikropp. Det går därför inte att säga om cellen som initialt hade en brun inmärkning fanns med i det buffert-behandlade snittet men utan inmärkning, eller om cellen inte fanns med (i så fall går det inte att avgöra om inmärkning hade saknats efter utebliven behandling med primär antikropp). Det är även möjligt att den bruna inmärkningen som sågs initialt var en artefakt.

Övriga undersökta vävnader hos samtliga katter var negativa för RusV med IHC. Den positiva och negativa kontrollen fungerade tillfredställande i alla körningar av IHC som gjordes, men det finns andra faktorer som skulle kunna leda till att RusV ej kunde detekteras.

En anledning skulle kunna vara att IHC-protokollet ej var anpassat för de vävnader undersökningen gjordes på. Den positiva och negativa kontrollen fungerade nöjaktigt, men dessa utgjordes båda av vävnad från CNS. Det är möjligt att det behövs en starkare koncentration (lägre spädning) av antikroppen för att kunna detektera RusV i extraneural vävnad, alternativt att tiden för exempelvis framkallningen behöver förlängas.

En annan anledning till att RusV inte kunde detekteras i extraneural vävnad skulle kunna vara att det faktiskt inte fanns RusV i de undersökta vävnaderna. Man vet idag varken hur spridningsvägarna ser ut för RusV eller infektionsport, varför flera olika vävnader undersöktes i detta arbete. Om viruset inte fanns i de undersökta vävnaderna skulle det kunna bero på att katter inte uppvisar viremi vid RusV-infektion utan utgör en så kallad "dead end host", vilken inte sprider viruset vidare. I en studie där man undersökte förekomsten av RusV hos tre rödhalsade vallabyer med ISH kunde man inte detektera viruset i extraneural vävnad (Voss *et al.* 2022). Detta, i kombination med att man inte såg några konsekvent förekommande lesioner i andra organ än hjärnan, gjorde att författarna diskuterade möjligheten att rödhalsade vallabyer faktiskt inte sprider viruset vidare.

I detta arbete går det inte att dra säkra slutsatser om huruvida RusV förekommer i vävnad utanför CNS, och det går heller inte att utifrån resultaten spekulera om

potentiella smittvägar för viruset. I tidigare studier har man dock detekterat RusV dels i det perifera nervsystemet, dels i organ utanför nervsystemet hos större skogsmöss (Bennett *et al.* 2020b; Nippert *et al.* 2023). Således har en neuronal transmissionsväg diskuterats, såväl som smittspridning via sekretion eller exkretion.

6. Slutsats

För första gången visas härmed att RusV funnits och infekterat katter i Sverige sedan 1970-talet och framåt.

Att alla katter med icke-suppurativ inflammation i CNS även var positiva för RusV i CNS, medan katter som inte uppvisade samma morfologiska bild uppvisade negativa eller osäkra resultat för RusV i CNS, indikerar starkt att RusV orsakar vingelsjuka hos katt. Dessa resultat är i enighet med tidigare publicerade studier om RusV hos katt.

Resultaten i detta arbete antyder dessutom att det finns en skillnad i förekomst av RusV mellan hjärna och ryggmärg, då ryggmärgen mer frekvent uppvisade ett negativt resultat.

Totalt hittades 410 fall av katter med sektionsdiagnoser som skulle kunna vara associerade med vingelsjuka, obducerade vid SLU mellan 1970–2019. En troligtvis forskningsassocierad ökning av antalet fall sågs under 1990-talet.

Angående potentiella smittvägar för RusV kunde inga slutsatser dras i detta arbete, då viruset ej detekterades i perifera organ.

Vidare forskning krävs för att undersöka fördelningen av RusV i olika vävnader, då detta skulle kunna säga något om virusets patogenes och smittvägar. Det är även av vikt att undersöka predisponerande faktorer som kan påverka att katter insjuknar, exempelvis genetisk predisposition, immunsuppression eller saminfektioner med andra agens.

Referenser

- Barber, R. & Barber, J. (2022). Differential T-cell responses in dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin compared to healthy controls. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 925770. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.925770>
- Bennett, A.J., Paskey, A.C., Ebinger, A., Pfaff, F., Priemer, G., Höper, D., Breithaupt, A., Heuser, E., Ulrich, R.G., Kuhn, J.H., Bishop-Lilly, K.A., Beer, M. & Goldberg, T.L. (2020a). Author Correction: Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature*, 588 (7836), E2. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2897-1>
- Bennett, A.J., Paskey, A.C., Ebinger, A., Pfaff, F., Priemer, G., Höper, D., Breithaupt, A., Heuser, E., Ulrich, R.G., Kuhn, J.H., Bishop-Lilly, K.A., Beer, M. & Goldberg, T.L. (2020b). Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature*, 586 (7829), 424–428. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2812-9>
- Berg, A.L., Reid-Smith, R., Larsson, M. & Bonnett, B. (1998). Case control study of feline Borna disease in Sweden. *The Veterinary Record*, 142 (26), 715–717. <https://doi.org/10.1136/vr.142.26.715>
- Berth, S.H., Leopold, P.L. & Morfini, G.N. (2009). Virus-induced neuronal dysfunction and degeneration. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14 (14), 5239–5259. <https://doi.org/10.2741/3595>
- Bradshaw, J.M., Pearson, G.R. & Gruffydd-Jones, T.J. (2004). A retrospective study of 286 cases of neurological disorders of the cat. *Journal of Comparative Pathology*, 131 (2–3), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.01.010>
- Dawson, K.L.D., Wildi, N., Cavalli, M., Rubbenstroth, D., Oevermann, A. & Seuberlich, T. (2023). Feline morbillivirus infection associated with fatal encephalitis in a Bengal cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 37 (6), 2510–2513. <https://doi.org/10.1111/jvim.16916>
- Dubey, J.P., Cerqueira-Cézar, C.K., Murata, F.H.A., Kwok, O.C.H., Yang, Y.R. & Su, C. (2020). All about toxoplasmosis in cats: the last decade. *Veterinary Parasitology*, 283, 109145. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109145>
- Glantschnigg-Eisl, U., Klang, A., Kneissl, S., Lang, B., Waters, P., Irani, S.R., Binks, S.N.M. & Pakozdy, A. (2023). A feline model of spontaneously occurring autoimmune limbic encephalitis. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 296–297, 105974. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2023.105974>
- Grillo, F., Pigozzi, S., Ceriolo, P., Calamaro, P., Fiocca, R. & Mastracci, L. (2015). Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-

- embedded tissue sections. *Histochemistry and Cell Biology*, 144 (1), 93–99.
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1316-4>
- Herz, J., Filiano, A.J., Wiltbank, A.T., Yogev, N. & Kipnis, J. (2017). Myeloid cells in the central nervous system. *Immunity*, 46 (6), 943–956.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.007>
- Hoff, E.J. & Vandevelde, M. (1981). Non-suppurative encephalomyelitis in cats suggestive of a viral origin. *Veterinary Pathology*, 18 (2), 170–180.
<https://doi.org/10.1177/030098588101800204>
- Jessen, N.A., Munk, A.S.F., Lundgaard, I. & Nedergaard, M. (2015). The glymphatic system: A beginner's guide. *Neurochemical Research*, 40 (12), 2583–2599.
<https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
- Klein, R.S., Garber, C., Funk, K.E., Salimi, H., Soung, A., Kanmogne, M., Manivasagam, S., Agner, S. & Cain, M. (2019). Neuroinflammation during RNA viral infections. *Annual Review of Immunology*, 37, 73–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041417>
- Kronevi, T., Nordström, M., Moreno, W. & Nilsson, P.O. (1974). Feline ataxia due to nonsuppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nordisk Veterinärmedicin*, 26 (12), 720–725
- Künzel, F., Rebel-Bauder, B., Kassl, C., Leschnik, M. & Url, A. (2017). Meningoencephalitis in cats in Austria: a study of infectious causes, including Encephalitozoon cuniculi. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19 (2), 171–176.
<https://doi.org/10.1177/1098612X15621352>
- Lundgren, A.L. (1992). Feline non-suppurative meningoencephalomyelitis. A clinical and pathological study. *Journal of Comparative Pathology*, 107 (4), 411–425.
[https://doi.org/10.1016/0021-9975\(92\)90015-m](https://doi.org/10.1016/0021-9975(92)90015-m)
- Lundgren, A.L. (1995). *Borna disease virus infection in cats: On the etiopathogenesis of feline non-suppurative meningoencephalomyelitis (staggering disease)*. Diss: Uppsala. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Lundgren, A.L., Lindberg, R., Ludwig, H. & Gosztanyi, G. (1995a). Immunoreactivity of the central nervous system in cats with a Borna disease-like meningoencephalomyelitis (staggering disease). *Acta Neuropathologica*, 90 (2), 184–193. <https://doi.org/10.1007/BF00294319>
- Lundgren, A.L. & Ludwig, H. (1993). Clinically diseased cats with non-suppurative meningoencephalomyelitis have Borna disease virus-specific antibodies. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 34 (1), 101–103. <https://doi.org/10.1186/BF03548230>
- Lundgren, A.L., Zimmermann, W., Bode, L., Czech, G., Gosztanyi, G., Lindberg, R. & Ludwig, H. (1995b). Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *The Journal of General Virology*, 76 (9), 2215–2222.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2215>
- Matiassek, K., Pfaff, F., Weissenböck, H., Wylezich, C., Kolodziejek, J., Tengstrand, S., Ecke, F., Nippert, S., Starcky, P., Litz, B., Nessler, J., Wohlsein, P., Baumbach, C., Mundhenk, L., Aebischer, A., Reiche, S., Weidinger, P., Olofsson, K.M., Rohdin, C.,

- Weissenbacher-Lang, C., Matt, J., Rosati, M., Flegel, T., Hörnfeldt, B., Höper, D., Ulrich, R.G., Nowotny, N., Beer, M., Ley, C. & Rubbenstroth, D. (2023). Mystery of fatal "staggering disease" unravelled: novel rustrela virus causes severe meningoencephalomyelitis in domestic cats. *Nature Communications*, 14 (1), 624. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36204-w>
- Maxie, M.G. (2015). *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th ed. Oxford: Elsevier Saunders. 978-0-7020-5317-7
- Mundt, S., Greter, M., Flügel, A. & Becher, B. (2019). The CNS immune landscape from the viewpoint of a T cell. *Trends in Neurosciences*, 42 (10), 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.07.008>
- Negrin, A., Spencer, S. & Cherubini, G.B. (2017). Feline meningoencephalomyelitis of unknown origin: A retrospective analysis of 16 cases. *The Canadian Veterinary Journal*, 58 (10), 1073–1080
- Nessler, J., Wohlsein, P., Junginger, J., Hansmann, F., Erath, J., Söbbeler, F., Dziallas, P. & Tipold, A. (2020). Meningoencephalomyelitis of unknown origin in cats: A case series describing clinical and pathological findings. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 291. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00291>
- Nippert, S., Rubbenstroth, D., Geers, J.A., Ebinger, A., Hoffmann, D., Breithaupt, A., Wylezich, C., Wang, X., Haring, V.C., Starcky, P., Fruci, P., Langner, C., Trapp, C., Schulz, H., Stubbe, W., Imholt, C., Heckel, G., Beer, M., Pfaff, F. & Ulrich, R.G. (2023). Continuous presence of genetically diverse rustrela virus lineages in yellow-necked field mouse reservoir populations in northeastern Germany. *Virus Evolution*, 9 (2), 1–13. <https://doi.org/10.1093/ve/vead048>
- Nowotny, N. & Weissenböck, H. (1995). Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis ("staggering disease") and studies of its etiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (6), 1668–1669. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.6.1668-1669.1995>
- Pfaff, F., Breithaupt, A., Rubbenstroth, D., Nippert, S., Baumbach, C., Gerst, S., Langner, C., Wylezich, C., Ebinger, A., Höper, D., Ulrich, R.G. & Beer, M. (2022). Revisiting rustrela virus: New cases of encephalitis and a solution to the capsid enigma. *Microbiology Spectrum*, 10 (2), e0010322. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00103-22>
- Platt, S.R. & Olby, N.J. (2013). *BSAVA manual of canine and feline neurology*. 4th ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. 978-1-905319-34-3
- Prinz, M. & Priller, J. (2017). The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nature Neuroscience*, 20 (2), 136–144. <https://doi.org/10.1038/nn.4475>
- de le Roi, M., Puff, C., Wohlsein, P., Pfaff, F., Beer, M., Baumgärtner, W. & Rubbenstroth, D. (2023). Rustrela virus as putative cause of nonsuppurative meningoencephalitis in lions. *Emerging Infectious Diseases*, 29 (5), 1042–1045. <https://doi.org/10.3201/eid2905.230172>
- Rott, R. & Becht, H. (1995). Natural and experimental Borna disease in animals. I: Koprowski, H. & Lipkin, W.I. (red.) *Borna Disease*. Berlin: Springer. 17–30. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78618-1_2

- Schwab, S., Herden, C., Seeliger, F., Papaioannou, N., Psalla, D., Polizopoulou, Z. & Baumgärtner, W. (2007). Non-suppurative meningoencephalitis of unknown origin in cats and dogs: an immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*, 136 (2–3), 96–110. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.11.006>
- Someya, A., Fukushima, R., Yoshida, M., Tanahashi, Y., Prapeuk, T., Iizuka, R., Hiram, H., Matsuda, A., Takahashi, S., Kurita, G., Kimura, T., Seo, M., Funaba, M. & Nishino, Y. (2014). A study on Borna disease virus infection in domestic cats in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76 (8), 1157–1160. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0349>
- Summers, B.A., Cummings, J.F. & de Lahunta, A. (1995). *Veterinary neuropathology*. St. Louis: Mosby. 978-0-8016-5063-5
- Suvarna, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (2013). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7th ed. St. Louis: Churchill Livingstone. 978-0-7020-5032-9
- Vandeveld, M. & Braund, K.G. (1979). Polioencephalomyelitis in cats. *Veterinary Pathology*, 16 (4), 420–427. <https://doi.org/10.1177/030098587901600404>
- Voss, A., Schlieben, P., Gerst, S., Wylezich, C., Pfaff, F., Langner, C., Niesler, M., Schad, P., Beer, M., Rubbenstroth, D., Breithaupt, A. & Mundhenk, L. (2022). Rustrela virus infection - An emerging neuropathogen of red-necked wallabies (*Macropus rufogriseus*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 69 (6), 4016–4021. <https://doi.org/10.1111/tbed.14708>
- Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Dempsey, D.M., Dutilh, B.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Hendrickson, R.C., Junglen, S., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Nibert, M., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M. & Davison, A.J. (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Archives of Virology*, 164 (9), 2417–2429. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04306-w>
- Weiss, V., Weidinger, P., Matt, J., Weissenbacher-Lang, C., Nowotny, N. & Weissenböck, H. (2023). Rustrela virus-associated encephalomyelitis ('Staggering Disease') in cats from eastern Austria, 1994–2016. *Viruses*, 15 (8), 1621. <https://doi.org/10.3390/v15081621>
- Wensman, J.J., Jäderlund, K.H., Gustavsson, M.H., Hansson-Hamlin, H., Karlstam, E., Lilliehöök, I., Oström, I.-L.Ö., Belák, S., Berg, M. & Holst, B.S. (2012). Markers of Borna disease virus infection in cats with staggering disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14 (8), 573–582. <https://doi.org/10.1177/1098612X12446638>
- Wensman, J.J., Jäderlund, K.H., Holst, B.S. & Berg, M. (2014). Borna disease virus infection in cats. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 201 (2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.12.012>
- Zachary, J.F. (2022). *Pathologic basis of veterinary disease*. 7th ed. St. Louis: Elsevier. 978-0-323-71313-9

Populärvetenskaplig sammanfattning

Vingelsjuka (staggering disease) hos katt är en allvarlig och ofta dödlig sjukdom som rapporterades i Sverige för första gången i början av 1970-talet. Som namnet antyder blir insjuknade katter vingliga och får svårt att koordinera sina rörelser, framför allt med bakbenen. Andra vanliga symtom är beteendeförändringar, till exempel ökad vokalisering och ökad tillgivenhet, oförmåga att dra in klorna, sänkt aptit, feber, depression, smärta i länd- och korsryggen, samt tilltagande bakbensförlamning.

Sedan den första rapporten har sjukdomen setts i flera delar av Sverige, men framför allt i området runt Mälaren. Sjukdomen har även rapporterats i flera andra länder. I Österrike ökade förekomsten under 1990-talet i ett område nordost om Wien, för att sedan minska igen under 2000-talet. Vingelsjuka drabbar främst utekatter och katter som jagar gnagare.

De fynd som ses vid mikroskopisk undersökning av hjärna och ryggmärg hos katter vid vingelsjuka är typiska för virusinfektion. Flera studier har gjorts för att försöka fastställa vilket sjukdomsframkallande smittämne (inklusive virus, bakterier och parasiter) som orsakar vingelsjuka, men detta har förblivit ett mysterium.

Ett nyupptäckt virus vid namn rustrelavirus (RusV) har dock nyligen föreslagits som orsak till vingelsjuka, då man med flera olika analytiska metoder upptäckt viruset i hjärna och ryggmärg hos katter med vingelsjuka i både Sverige, Österrike och Tyskland. Det ingår i familjen *Matonaviridae* och är besläktat med rubellavirus som orsakar sjukdomen röda hund hos människa.

RusV har inte bara påvisats hos katter med vingelsjuka, utan dessutom ett flertal andra djurslag på olika djurparker i Tyskland som också drabbats av neurologisk sjukdom: en åsna, en kapybara, en utter, en vanlig näsbjörn, fyra rödhalsade vallabyer och tre lejon.

Viruset har även upptäckts hos både större och mindre skogsmöss. De har inte uppvisat några tecken på inflammation i hjärnan, varför de misstänks utgöra mellanvärdar för viruset som sprider det till andra däggdjur utan att själva bli sjuka.

I detta arbete gjordes följande saker: sammanställning av antalet katter som obducerats på Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) mellan 1970–2019 och som potentiellt kan ha haft vingelsjuka baserat på den satta diagnosen; undersökning av förekomsten av RusV i hjärna och ryggmärg (det centrala nervsystemet, CNS) från katter som haft vingelsjuka och från kontrollfall under de senaste fem decennierna;

samt undersökning av förekomsten av RusV i andra organ i kroppen utanför nervsystemet, hos katter där infektion med RusV i CNS är bekräftad.

Den analytiska metoden som användes för att detektera viruset kallas immunohistokemi, och innebär att man använder antikroppar riktade mot protein på viruset, vilket gör att antikropparna fastnar i vävnaden där viruset finns. På antikropparna sitter markörer som slår om till en brun färg vid framkallning, vilket gör det möjligt att se platsen för viruset i vävnaden i form av bruna infärgningar när man tittar på preparatet i mikroskop.

Totalt hittades 410 fall av katter som potentiellt kan ha haft vingelsjuka. Den högsta frekvensen av fall förekom under 1990-talet. Eftersom den enda informationen som samlades in var diagnosen från patologisk undersökning går det inte att säga helt säkert att alla dessa katter haft vingelsjuka, eftersom diagnosen vingelsjuka egentligen baseras på de kliniska symtomen och vad man har sett mikroskopiskt i CNS.

Utifrån det totala antalet fall gjordes ett slumpmässigt urval av 14 fall från de som bedömdes mest sannolikt ha haft vingelsjuka. Av dessa var det 13 katter som uppvisade de typiska förändringarna som ses i CNS mikroskopiskt vid vingelsjuka; samtliga 13 var även positiva för RusV i CNS. Den 14:e katten, samt fem kontrollfall, bedömdes inte ha de för vingelsjuka typiska förändringarna i CNS, och dessa uppvisade ett negativt eller osäkert resultat gällande förekomst av RusV.

De organ som undersöktes utanför CNS var vävnad från mag- och tarmkanal, lunga, njure, lever, mjälte, lymfknuta och bukspottskörtel från katter med tidigare bekräftad RusV-infektion i CNS. Alla de undersökta organen var negativa för RusV, med undantag för ett osäkert resultat vad gällde tunntarmen från en katt. Detta skulle antingen kunna bero på att RusV inte fanns i några av dessa organ, eller att viruset inte kunde upptäckas med den använda metoden.

För första gången är det härmed visat att RusV funnits och infekterat katter med vingelsjuka i Sverige från 1970-talet och framåt. Detta indikerar starkt att RusV orsakar vingelsjuka. Framtida forskning skulle behövas för att undersöka vilka fler faktorer som påverkar att katter insjuknar, om katter kan bära på viruset utan att bli sjuka, samt för att undersöka på vilket sätt viruset sprider sig mellan individer och vilken väg viruset tar in i kroppen när en katt blir infekterad.

Tack

Ett stort tack till mina handledare Cecilia Ley (BVF), Sofia Tengstrand (BVF), Jonas Wensman (KV och SVA), samt till min examinator Karin Vargmar (BVF), för det fantastiska stöd jag har fått samt den tid ni har lagt ned. Även ett stort tack till BVF:s legitimerade biomedicinska analytiker Albin Norman och Vidar Skullerud som har förberett och färgat histologiska snitt, samt varit ett stort stöd när jag genomfört de immunohistokemiska analyserna.

Ett stort tack till Michael Forsgrens stiftelse och Föreningen Jamaren som har finansierat detta arbete och därmed gjort det möjligt att genomföra ett så pass omfattande arbete.

Slutligen, ett stort tack till David Saulesco som har gjort illustrationen av immunohistokemiska tekniker som inkluderats i detta arbete.

Bilaga 1

Protokoll för immunohistokemi med antikropp mot RusV

1. Värmebehandling i ugn, 60 °C i 15 minuter.
2. Avparaffinering i xylene i 2x15 minuter. Rehydrering i absolut alkohol 2x5 minuter, 95 % alkohol i 1x5 minuter och 75 % alkohol i 1x5 minuter.
3. Sköljning med avjoniserat vatten x3.
4. "Antigen retrieval" i natriumcitrat-buffert med pH 6 i ett vattenbad, 110 °C i 15 minuter.
5. Sköljning med avjoniserat vatten. Sedan sköljning med PBS 3 gånger.
6. Spädning av väteperoxid till en 3 %-ig lösning med avjoniserat vatten. Blockering av endogent peroxidas med väteperoxidlösningen ståendes i 5 minuter i mörker. Noggrann sköljning med avjoniserat vatten.
7. Sköljning med PBS 3 gånger.
8. Ringa in snitten med fettpenna.
9. Blockering av ospecifik bindning med getserum (NGS) spädd 1:50 med PBS i fuktad låda med lock i 30 minuter i rumstemperatur.
10. Dränering.
11. Tillsätt primär antikropp spädd 1:20 med PBS och inkubera i fuktad låda med lock i 4 °C över natten.
12. Sköljning med PBS 3x5 minuter.
13. Tillsätt sekundär antikropp och inkubera i fuktad låda med lock i 30 minuter i rumstemperatur.
14. Sköljning med PBS 3x5 minuter.
15. Framkallning med DAB i 10 minuter.

16. Sköljning i rinnande kranvatten i 15 minuter.
17. Färgning med Mayers hematoxylin i 1 minut.
18. Sköljning i rinnande kranvatten i 10 minuter.
19. Dehydrering i 95 % alkohol i 2x2 minuter, i absolut alkohol i 2x2 minuter, sedan i absolut alkohol i 1x5 minuter. Sköljning i xylol, låt sedan stå i xylol i 5 minuter. Låt stå i xylolbad inför montering.
20. Montering.

Reagenser

- Primär antikropp, No./Name: #22/2H11B1 (monoklonal musantikropp; specificitet: RusV:s kapsid).
- Sekundär antikropp anti-mus (Dako EnvisionTM+ System – HRP labelled polymer; ref.: K4001; lot: 11092987).
- Dako Goat Serum, NGS (ref.: X0907; lot: 20078389).
- Fosfatbuffrad saltlösning (PBS), pH 7,4.
- Natriumcitrat-buffert, pH 6,0.
- Supelco®, Emsure® ISO Hydrogen Peroxide 30% (Merck; lot: K52822909 040).
- Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (ref.: K3468; lot: 11246742).

Bilaga 2

Noteringar kring individuella katters SD

I figur 2 redovisas antalet katter som obducerats på SLU mellan 1970–2019 med SD vilken kan tänkas vara associerad med vingelsjuka. Fallen redovisas uppdelade i 8 diagnosgrupper, baserat på vilken SD som angivits. Nedan redovisas noteringar kring individuella fall:

- Hos alla fall i diagnosgruppen vingelsjuka nämndes ordet ”vingelsjuka” på något sätt i SD. Två av katterna hade SD ”vingelsjuka/felin ataxi”; åtta hade SD ”vingelsjuka/felin meningoencefalomyelit”; fyra hade SD ”vingelsjuka/felin encefalomyelit”; övriga katter hade SD ”vingelsjuka”.
- En katt med SD ”vingelsjuka” hade SF ”icke-suppurativ meningoencefalomyelit”.
- En av katterna i diagnosgruppen felin ataxi hade SD ”myelit i ländryggsmärken, felin ataxi”.
- En av katterna i diagnosgruppen icke-suppurativ meningoencefalit hade SD ”fokal icke-suppurativ meningoencefalit”.
- En av katterna i diagnosgruppen icke-suppurativ meningoencefalomyelit hade även en ganglieneurit.
- En av katterna i diagnosgruppen icke-suppurativ meningoencefalit hade SD ”icke-suppurativ meningoencefalit med suppurativa inslag”.
- En av katterna i diagnosgruppen icke-suppurativ encefalit hade SD ”icke-suppurativ encefalit och fokal glios och neuronofagi i ryggmärgen”. En annan katt i samma diagnosgrupp hade SD ”lindrig fokal icke-suppurativ encefalit”.
- En katt med SD ”akut meningoencefalit”: enligt obduktionsutlåtandet sågs inflammatoriska celler, inklusive neutrofiler, perivaskulärt, men vingelsjuka kan ändå ej uteslutas.
- Ett fall från 1992 hade preliminär diagnos ”vingelsjuka”. Information om SD kunde ej återfinnas varken i obduktionsliggare eller obduktionsutlåtande, varför fallet ej inkluderades i statistiken.
- Ett fall från 2005 med SD ”ej fastställd” hade enligt obduktionsutlåtandet ”multifokal, lindrig meningit i cerebellum och basala delarna av cerebrum”. Fallet inkluderades inte i statistiken.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. **Som student äger du upphovsrätten** till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag ger härmed min tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag ger inte min tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.