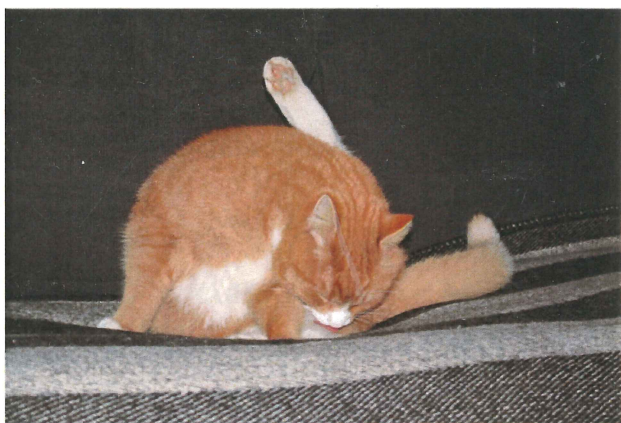


**Institutt for sports- og familiedyrmedisin, Seksjon for smådyrsykdommer  
Norges veterinærhøgskole**

## **Virus som årsaksfaktor til lidelser i de nedre delene av urinveiene hos katt (FLUTD)**



**En klinisk studie av 55 katter diagnostisert og behandlet i perioden januar  
2006 til februar 2007**

**Fordypningsoppgave våren 2007**

av

**Solveig Myking Kull-01**

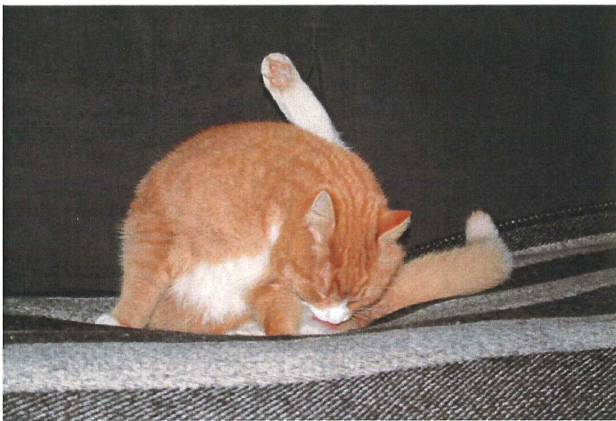
**Jonna A. Jensen Kull-01**

**Veiledere: Anna Vigdís Eggertsdóttir  
og Espen Rimstad**



Institutt for sports- og familiedyrmedisin, Seksjon for smådyrsykdommer  
Norges veterinærhøgskole

## **Virus som årsaksfaktor til lidelser i de nedre delene av urinveiene hos katt (FLUTD)**



**En klinisk studie av 55 katter diagnostisert og behandlet i perioden januar 2006 til februar 2007**

**Fordypningsoppgave våren 2007**

**av**

**Solveig Myking Kull-01**

**Jonna A. Jensen Kull-01**

**Veiledere: Anna Vigdís Eggertsdóttir  
og Espen Rimstad**



# INNHALDSFORTEGNELSE

Side

Definisjon.....	3
Forekomst og predisponerende faktorer.....	3
Anatomiske forhold ved de nedre urinveiene.....	3
Årsaker til FLUTD.....	4
Ikke obstruktive lidelser.....	4
Felin idiopatisk cystitt.....	4
Infeksiøse cystitter.....	5
Neoplasier.....	5
Adferd/Misdannelser.....	5
Obstruktive lidelser.....	6
Urinsteiner.....	6
Struvittstein.....	6
Kalsium-oksalatsteiner.....	7
Plugger i urinveiene.....	7
Behandling.....	7
Sammendrag.....	9
Introduksjon.....	10
Materiale og metoder.....	11
Resultater.....	18
Diskusjon.....	25
Summary.....	27
Etterskrift.....	28
Referanser.....	29

# Lidelser i de nedre delene av urinveiene hos katt.

## Definisjon

Sykdommer i de nedre delene av urinveiene hos katt blir også kalt FLUTD som er en forkortelse av den engelske betegnelsen på dette syndromet – feline lower urinary tract disease. FLUTD er et samlebegrep for en rekke forskjellige lidelser med liknende klinisk bilde. Symptomene karakteriseres av varierende grad av dysuri, stranguri, hematuri, pollakiuri, anuri/oliguri, periuri, og/eller endret oppførsel hos de rammede kattene. De kliniske symptomene er derfor sjeldent indikative på en bestemt lidelse og videre undersøkelser må til for å stille en eksakt diagnose (1, 2, 3).

## Forekomst og predisponerende faktorer

FLUTD opptrer både hos hann- og hunnkatter, og i alle aldersgrupper, men sees oftest hos overvektige, middelaldrende, kastrerte hannkatter som er lite aktive. Andre faktorer som kan være predisponerende for at katter skal utvikle FLUTD kan være begrenset ute tilgang, ensidig fôring med tørrfôr, og stress som følge av flere katter i husholdningen (1, 3, 4).

## Anatomiske forhold ved de nedre delene av urinveiene

De nedre delene av urinveiene består av to ureteres, urinblæren, og urethra. Uretrene går fra nyre hilus og munner inn i blæren ved blærehalsen. Urethra fører urinen fra blærehalsen og ut. Hos hunnkatter ligger urethra mellom bekkenbunnen og vagina, og munner ut ventralt i vestibulum i skjeden. Hos hannkatter deles urethra inn i en bekkendel og en penisdell der urethra munner ut ved penistuppen (5).

Lumen i urethra hos hannkatter er smal i hele dens lengde, men den er smalest helt distalt ved penistuppen. Urethra hos hunnkatter er kortere og har større lumen enn hos hannkatter. Denne

forskjellen i anatomisk utforming av urethra mellom kjønnene gjør at obstruksjoner i urethra med urinstein eller plugg forekommer oftere hos hannkatter (6).

## **Årsaker til FLUTD**

Det er en rekke lidelser som kan forårsake FLUTD, og disse deles ofte inn i ikke obstruktive og obstruktive lidelser (1).

### **Ikke obstruktive lidelser:**

#### **Felin idiopatisk cystitt**

Hos katter med FLUTD kan man i 55-69 % av tilfellene ikke finne noen underliggende årsak til symptomene og de får diagnosen felin idiopatisk cystitt (FIC). Studier har vist at FIC hos katt har likheter med en idiopatisk, ikke malign urinveislidelse hos menneske, særlig kvinner, kalt "interstitiell cystitt". Ved denne lidelsen foreligger det en inflammasjon i blæreveggen. Ved cystoskopi kan det sees hemoragiske petekkier i submukosa som er karakteristisk for felin idiopatisk cystitt. Det kan i tillegg også forekomme ulcerasjoner i submukosa men disse er sjeldnere hos katt enn hos menneske. Kattene har ofte tilbakevendende episoder med dysuri, stranguri og hematuri og disse symptomene forsvinner ofte uten behandling i løpet av 3-7 dager. Hvor alvorlig symptomene er og hvor hyppig de kommer tilbake, er variabelt. Stress ser ut til å kunne være en fremskyndende årsak ved tilbakefall av sykdommen. Det en kan finne ved urinundersøkelse er mild til moderat pyuri, hematuri og proteinuri. Ved ultralyd og røntgenundersøkelse kan man se en generell fortykkelse av blæreveggen. Patofysiologien til FIC er ennå ukjent og det foreligger hypoteser om at interaksjoner mellom en rekke kroppssystemer kan være årsaken. Det kan foreligge patologiske forandringer i det endokrine og kardiovaskulære systemet og i nervesystemet, i tillegg til forandringer i urinblæren (1, 2, 4, 7, 8, 9, 10,11).

## Introduksjon

Betegnelsen *Feline Lower Urinary Tract Disease (FLUTD)* brukes som et samlebegrep for symptomer forårsaket av irritasjon av mucosa i urinblære og urethra hos katter. De klassiske symptomene omfatter dysuri, stranguri, hematuri, pollakiuri og periuri, og kan skyldes infeksjose agens, urinstein, urethralplugg, tumorer, misdannelser eller traume. I mange av tilfellene finner man imidlertid ikke noen årsak til problemet og katten blir diagnostisert med idiopatisk (interstitiell) cystitt. Således har man i flere undersøkelser funnet at 55-69% av alle episoder med FLUTD er idiopatiske (1, 7, 8, 9, 10, 11).

Det er i dag to hypoteser til den bakenforliggende årsaken til felin idiopatisk cystitt (FIC): virusinfeksjon og nevrogen inflammasjon (17). Det er funnet at katter med FIC har kliniske symptomer og makroskopiske og histologiske forandringer i urinblæren som ligner dem funnet hos kvinner med interstitiell cystitt. Abnormaliteter i lokale blærefaktorer, sensoriske nevroner, sentralnervesystemet og sympatiske nevroner forekommer både hos mennesker og katter (18).

Nylig har to hittil ukjente varianter av felint calicivirus blitt isolert fra urin hos katter med FLUTD (19). I tidligere studier har calicivirus, herpesvirus og felint syncytiedannende virus blitt isolert fra urin og vev hos katter med FLUTD (13, 16, 20, 21, 22, 23, 24).

Felint immunsvikt virus (FIV) og felint leukemivirus (FeLV) er assosiert med en rekke symptomkomplekser hos katt. Hittil har det imidlertid ikke vært påvist noen sammenheng mellom disse virusinfeksjonene og FLUTD (25, 26).

Vi ville med dette studiet undersøke om vi kunne finne virus i urinen hos norske katter

## **Infeksiøse cystitter**

Det ble tidligere antatt at bakterielle cystitter hos katt var sjeldent forekommende, men et nyere studium foretatt ved Norges veterinærhøgskole viser at bakterielle cystitter hos norske katter med FLUTD symptomer kan være underdiagnostisert. I dette studiet ble 25% av kattene diagnostisert med infeksiøs cystitt, mens det i tidligere studier kun har blitt diagnostisert hos 2% av de undersøkte kattene. Bakteriene som oftest ble funnet som årsak til urinveisinfeksjoner var *Escherichia coli*, streptokokker, enterokokker og stafylokokker. Disse bakteriefunnene stemmer overens med tidligere publiserte undersøkelser (12).

Virus har blitt påvist i urin og urinveisvev hos katt med FLUTD symptomer men det er ennå uklart om disse virusene har hatt noen betydning for sykdomsutviklingen hos disse kattene.

Virus som har blitt isolert er felint calicivirus, bovint herpesvirus 4, og felint synsytial dannende virus (2, 4, 6, 13).

## **Neoplasier**

Nydannelser i blæren hos katt er sjeldent, og det er enda sjeldnere å finne de i uretrene eller urethra. En rekke ulike nydannelser har blitt rapportert, og overgangscellekarsinom er den vanligste, og utgjør omtrent 50% av tilfellene. De fleste tilfellene forekommer hos eldre katter over 8 år (2).

## **Adferd/misdannelser.**

Hos katter der det eneste kliniske symptomet er periuri, men ikke markering, kan det være vanskelig å avgjøre om det er sykdom eller adferd som er årsaken. Cystoskopi av kattene med periuri viser at over 50% har forandringer i blæren som er forenelig med FIC det vil si hemoragiske petekkier i submukosa. I de tilfellene man ikke kan stille en diagnose kan en prøve å behandle disse kattene som om de hadde FIC (4).

Medfødte misdannelser i de nedre delene av urinveiene hos katt kan føre til inkontinens. Slike misdannelser kan blant annet være unilateral eller bilateral ektopisk ureter, eller hypoplasi av urethra. Begge disse lidelsene er sjeldent forekommende hos katt (2, 14).

## **Obstruktive lidelser**

### **Urinsteiner**

Urinsteiner er organiserte konkrementer som kan dannes i urinveiene, og som primært inneholder mineralkrystaller og en mindre andel organisk materiale.

De fleste urinsteinene hos katt består av magnesium ammonium fosfat (struvitt) eller kalsium oksalat. Kattene kan ha urinsteiner uten at dette fører til kliniske symptomer, eller de kan føre til inflammasjon og hematuri eller obstruksjon med påfølgende stranguri og dysuri.

Sekundære urinveisinfeksjoner kan forekomme på grunn av inflammasjon og skader i blæreveggen forårsaket av steinene (2, 4, 6, 15).

### **Struvittstein**

Struvittsteiner forekommer oftest i urinblæren, men de kan også forekomme andre steder i urinveiene. Hos katter dannes vanligvis struvittstein i steril urin. Studier har vist at for mye magnesium i føret er en primærårsak til dannelsen av struvittstein, og at alkalisk urin øker risikoen for at disse steinene skal kunne dannes (2, 4).



## **Kalsium-oksalatsteiner**

Kalsium-oksalatsteiner finner man som oftest i blæren og urethra, men de kan også oppstå i nyrene. For å forebygge dannelsen av struvitt steiner har fôrproduzentene redusert magnesium innholdet i fôret, og tilsatt ingredienser som skal danne en surere urin. Dette har ført til en økning i forekomsten av kalsium oksalat steiner fordi sur urin øker risikoen for dannelse av disse steinene. Kostholdsendring løser ikke opp kalsium-oksalatsteiner, men kan forhindre tilbakefall. Disse steinene bør derfor fjernes kirurgisk (2, 4).

## **Plugger i urinveiene**

Urinplugger er den vanligste årsaken til obstruksjon i urethra hos hannkatter. Det er sjeldent at urethra hos hunnkatter blir tilstoppet. Dette skyldes forskjellene i den anatomiske utformingen av urethra hos de ulike kjønn. Pluggene består av en kombinasjon av proteinkolloid matriks (mukoproteiner, albumin, globuliner, celler etc.) og mineralkrystaller (oftest struvitt). Som oftest består pluggene hovedsakelig av kolloid matriks. Hvis katten også har krystalluri kan krystaller bli fanget i matriksen og bidra til obstruksjon. Når det foreligger blødninger i urinveiene kan blodkoaglene som dannes føre til tilstopping av urethra (1, 4, 6, 15, 16)

## **Behandling av katter med FLUTD**

Skal behandlingen bli vellykket er det viktig å stille korrekt diagnose. Obstruksjoner i urethra kan være livstruende og må behandles umiddelbart. Hindringen bør fjernes varsomt under sedasjon. Man kan forsøke å massere penistuppen for å løse opp eventuelle plugg. Hvis dette ikke hjelper kan man kateterisere katten og spyle urethra med fysiologisk saltvann for å fjerne hindringen. Cystocentese kan være nødvendig før spyling hvis blæren er veldig spent. Ved tilbakefall av obstruksjonen vil man som oftest legge inn et kateter i urethra. Dette bør

sitte inne i 1-3 dager for å holde urethra åpen mens vevet heler. Ved stadig tilbakevendende episoder kan det være aktuelt å foreta en perineal urethrostomi. Hvis katten er tydelig dehydrert, har azotemi eller er acidotisk bør det gis væske intravenøst. I mindre alvorlige tilfeller kan det være tilstrekkelig å gi væske subkutant (1, 2, 3, 6)

Bakteriell cystitt behandles med antibiotika etter dyrkning og resistensbestemmelse (2).

Behandling av katter med urinstein avhenger av hvilken type stein som foreligger. Ved struvittstein kan fôring med spesialfôr som surgjør urinen være tilstrekkelig til å få løst opp steinen. Kirurgisk fjerning kan imidlertid være nødvendig. Kalsiumoksalatsteiner bør alltid fjernes kirurgisk (1, 2, 3, 4).

Ved nydannelser i blære eller urethra kan man forsøke kirurgisk ekstirpasjon, men prognosen er dårlig da tumorer her som regel vokser infiltrativt og oppdages først sent i forløpet (2).

Hos katter med FIC forsvinner symptomene som regel uten behandling i løpet av 3-7 dager. For å forhindre tilbakefall kan man forsøke å øke kattens vanninntak. Dette kan blant annet gjøres ved å gradvis bytte ut tørrfôret med våtfôr, og ved å plassere vannskåler med friskt vann flere steder rundt omkring i boligen (2, 4). Man bør forsøke å unngå forandringer som kan virke stressende for katten. Slike faktorer kan være brå fôrendringer, endringer i miljøet, for mange katter eller nye katter/mennesker i husholdningen (1, 4). Kattetoalettet bør rengjøres ofte, og man kan også forsøke å bytte til en annen type kattesand. Hvis det er muligheter for det, bør katten ha tilgang til å være ute. Bruk av en syntetisk analog ("Feliway", Ceva Animal Health) til kattens naturlige ansiktsferomon kan redusere stress og øke trykghetsfølelsen hos katten (1, 2, 4). Analgesi kan være indisert i akutte tilfeller for å redusere ubehaget hos katten (2). I de tilfellene man ikke kan identifisere en underliggende årsak bør katten behandles som for felin idiopatisk cystitt (FIC) (2, 4).

## Sammendrag

Feline Lower Urinary Tract Disease (FLUTD) er et samlebegrep brukt om lidelser i de nedre urinveiene hos katt, og regnes for å være en av de vanligst stilte diagnosene hos denne arten. Det finnes flere årsaker til dette symptomkomplekset, men mange forfattere har konkludert med at felin idiopatisk cystitt (FIC) er den hyppigste årsaken til FLUTD. En hypotese går ut på at virus kan være årsaken til FIC.

I perioden januar 2006 til februar 2007 ble 55 katter med symptomer fra nedre urinveier inkludert i en studie ved Norges Veterinærhøgskole. Alle kattene gjennomgikk en grundig klinisk undersøkelse og det ble tatt blodprøver for hematologi og biokjemi. Urinanalysen inkluderte urinstix, spesifikk vekt, mikroskopisk undersøkelse av sediment og mikrobiologisk dyrkning. I tillegg ble urinen analysert for felint calicivirus (FCV), og et utvalg av prøvene ble også testet for felint herpesvirus 1 (FHV-1) og bovint herpesvirus 4 (BHV-4). Serum ble undersøkt for tilstedeværelse av FeLV (felint leukemivirus) antigener og FIV (felint immunsviktvirus) antistoffer.

Av de 55 kattene som var med i undersøkelsen ble 17 (30,9%) diagnostisert med obstruktiv FLUTD, og 38 (69,1%) med ikke-obstruktiv FLUTD. Totalt 34,6% av kattene fikk diagnosen FIC.

Det ble ikke påvist virus i urinen hos noen av kattene. Det ble heller ikke påvist FeLV-antigener hos noen av kattene, mens 3 av kattene hadde antistoffer mot FIV. Dette utgjør imidlertid ingen signifikant forskjell fra katter i totalpopulasjonen. Denne undersøkelsen støtter derfor ikke opp under hypotesen om at virusene det ble undersøkt for kan være årsak til FLUTD.

med FLUTD, og i tillegg teste disse kattene for FIV/FeLV for å se om vi kan påvise noen sammenheng mellom systemisk infeksjon med disse virusene og FLUTD.

## **Materiale og metoder**

Materialet bestod av prøver tatt av 55 katter, med diagnosen FLUTD, undersøkt ved Norges Veterinærhøgskole i perioden januar 2006 til februar 2007. Rase kjønn, alder og vekt, samt kattens miljømessige bakgrunn og eventuelle sesongmessige variasjon i opptreden av symptomer ble registrert i et standardisert skjema. Det ble tatt urinprøver ved cystosentese, kateterisering eller manuell tømning av blæren, og disse prøvene ble sendt videre til Seksjon for mikrobiologi, immunologi og parasittologi for videre undersøkelse. Den bakteriologiske undersøkelsen ble primært foretatt på cystocentesurin, mens den virologiske undersøkelsen benyttet urin fra alle de tre prøvetakingsmetodene. Alle kattene i studiet gjennomgikk en grundig klinisk undersøkelse og det ble tatt blodprøver for hematologi og klinisk kjemi. Det ble i tillegg tatt ut fullblodprøver for virologisk undersøkelse. Disse ble sentrifugert etter koagulering og serum tatt av og oppbevart ved -20° C. Urinprøvene ble analysert ved bruk av kommersielle urinsticks (KRULAB urinsticks, KRUUSE, Marslev, Danmark), måling av spesifikk vekt med refraktometer (URC-Ne, ATAGO, Tokyo, Japan) og mikroskopisk undersøkelse av sedimentet. Ultralydundersøkelse av urinveiene ble foretatt på 43 (78,2%) av kattene, mens 9 (16,4%) av kattene ble undersøkt radiologisk. For de siste 3 kattene (5,4%) var det ikke registrert billeddiagnostisk undersøkelse.

Kvantitativ bakteriologisk undersøkelse ble foretatt ved å plate ut 1 µl urin på blodagar, mens den kvalitative undersøkelsen ble foretatt ved dyrking fra sedimentet etter sentrifugering. I de tilfellene hvor det forelå positivt dyrkningsresultat ble bakteriene testet for antibiotikaresistens etter standard metoder.

På virologisk laboratorium ble urinprøven delt i to fraksjoner. Den ene delen ble sentrifugert ved 13000 rounds per minute (rpm) i 10 minutter, og supernatanten ble adskilt fra pelleten. Den andre fraksjonen forble ubehandlet. Urinen ble så frosset ned ved -20 ° C frem til videre analyse.

## 1) PCR-undersøkelse.

### a) RT-PCR for felint calicivirus (FCV)

Det ble ekstrahert RNA fra den ubehandlede urinen ved hjelp av *QIAamp Viral RNA Mini kit* (Qiagen). Fremgangsmåte som beskrevet av fabrikant ble brukt. For hver prøve ble 560 µl buffer AVL inneholdende bærer-RNA, og 140 µl urin tilsatt i et 1,5 ml mikrosentrifugerør og blandet ved puls-vortexing i 15 sek. Dette lyserer virus slik at man får fritt RNA i prøven, fullstendig lysis oppnås etter inkubering i 10 minutter ved romtemperatur. RNaser og potensielle infeksiøse agens inaktiveres av AVL bufferen. RNaser er meget vanlig forekommende og må inaktiveres ved enhver RNA-ekstraksjon. Mikrosentrifugerørene ble deretter lett sentrifugert for å fjerne dråper fra lokket. Det ble tilsatt 560 µl 96% etanol og blandet inn ved puls-vortexing i 15 sek. og deretter ble det hele lett sentrifugert for å fjerne dråper fra lokket. Av denne løsningen ble 630 µl overført til "QIAamp-spin"-søylen i et 2 ml samlerør og sentrifugert ved 8000 rpm i 1 min. Filtratet ble kastet, og sentrifugeringen gjentatt. I denne prosessen bindes viralt RNA til silikat-gel-membranen i QIAamp-røret. Det ble så tilsatt 500 µl vaskebuffer "AW1" til QIAamp-søylen, og etter sentrifugering v/8000 rpm i 1 min, ble filtratet kastet, og 500 µl vaskebuffer "AW2" tilsatt. Dette ble sentrifugert ved 13200 rpm i 3 min., filtratet ble kastet, QIAamp-søylen plassert i et nytt samlerør og sentrifugert i ytterligere 1 min ved 13200 rpm. Til slutt ble QIAamp-søylen plassert i et rent 1,5-ml mikrosentrifugerør, tilsatt 60 µl AVE-buffer, inkubert et minutt ved

romtemperatur og sentrifugert ved 8000 rpm i et minutt. AVE-bufferen frigjør viralt RNA fra membranen i QIAamp-søylen, og RNA vil da være løst i AVE-bufferen. Det ble deretter satt opp en RT-PCR med *Ready-to-Go-RT-PCR-Beads* (Invitrogen) og FCV-primere. Til hvert rør ble det tilsatt 1,5 µl av hver primer, 42 µl sterilt vann og 5 µl templat. Dette ga en løsning på 15 picomol av hver av primerne per prøve. FCV-primere som ble brukt var spesifikke for FCV-genomet, men de var såkalte degenererte primere. Det vil si at ved syntetiseringen ble noen av basene tilfeldig valgt (tabell 1). Dette ble gjort for å øke sannsynligheten for å påvise et bredt spekter av FCV-varianter. Ulempen er at FCV da blir noe mindre sensitiv. Det ble inkludert en positiv og en negativ kontroll i oppsettet.

Det ble kjørt følgende RT-PCR-program:

#### RT

Antall sykler	Temperatur	Tid
1	25 <sup>0</sup> C	10 minutter
1	42 <sup>0</sup> C	5 minutter
1	95 <sup>0</sup> C	15 minutter

#### PCR

Antall sykler	Temperatur	Tid
40	94 <sup>0</sup> C	30 sekunder
	53 <sup>0</sup> C	30 sekunder
	72 <sup>0</sup> C	1 minutt
	72 <sup>0</sup> C	1 minutt
	4 <sup>0</sup> C	∞ (uendelig)

Det ble støpt en 2% Seakem GTG Agarose gel. Til hver brønn ble det tilsatt 10 µl PCR-blanding og 2 µl bromfenolblått (stoppmix). Gelen ble så kjørt på 90 volt og 400 ampere i 60 min. Til slutt ble gelen farget i et bad med ethidium bromid en

halvtime og lest av.

*b) PCR for felint herpesvirus 1 (FHV-1) og bovint herpesvirus 4 (BHV-4)*

Nitten av kattene ble testet for FHV-1 og BHV-4. Virus i familien *Herpesviridae* er cellebundne DNA-virus. Det ble her kjørt PCR direkte på pelleten fra 12 av kattene, uten ekstraksjon av DNA først. For 7 av prøvene ble PCR kjørt direkte på den ubehandlede urinen. Det ble satt opp en 50 µl reaksjon i hvert PCR-rør:

Reagens	Mengde
FHV-1 forward	1,5 µl
FHV-1 reverse	1,5 µl
BHV-4 forward	1,5 µl
BHV-4 reverse	1,5 µl
dNTP	1 µl
MgC12	1,5 µl
10x buffer	1,5 µl
Destillert vann	30,5 µl
Taq-polymerase	1 µl
Templat (prøve)	5 µl

Taq-polymerase har en nontemplat-avhengig terminal transferase-aktivitet som henger på en ekstra deoxyadenosine (A) til 3'enden av PCR-produktet. Det ble ikke inkludert positiv og negativ kontroll.

Det ble kjørt følgende PCR-program:

Antall sykler	Temperatur	Tid
1	94 <sup>0</sup> C	2 minutter
40	94 <sup>0</sup> C	1 minutt
	55 <sup>0</sup> C	40 sekunder
	72 <sup>0</sup> C	30 sekunder
1	72 <sup>0</sup> C	10 minutter

PCR-produktene ble kjørt på en 2% Seakem GTG agarose gel, tilsvarende som for FCV og resultatene sammenlignet med ladder. Forventede produkter var på 383 bp for FHV-1 og 179 bp for BHV-4.

Tabell 1: Oversikt over primere brukt i PCR-undersøkelsen (27).

Primer	Sekvens (5`-3`)
FCV-SWs	5'-GNAAAGCWCAACAAATTGAATT-3'
FCV-SWas	5'-CHTGTACCCFYTGCTCAAG-3'
FHV-1 Forward	5'-GCATTTACATAGATGGTGCCT-3'
FHV-1 Reverse	5'-ATATCTTGCGAGTGGGAAACAG-3'
BHV-4 Forward	5'-CCATATCAGAGATGGGGAGGTAAAG-3'
BHV-4 Reverse	5'-CGCCTTGGAAGGTCTTTGTATCTAC-3'

For FCV-primere er enkelte av basene i sekvensen byttet ut med degenererte baser, dette gjør at FCV-primere kan gjenkjenne et bredere spekter av FCV-isolater, men gir samtidig noe lavere sensitivitet. W = A eller T, Y = C eller T, H = A, C eller T og N = A, C, G eller T.

## 2) Sekvensering av PCR-produkt

DNA-fragmenter av uventet størrelse ble funnet etter PCR for FHV-1 og BHV-4 og de ble skåret ut av gelen, renset, TOPO TA-klonet og sendt til sekvensering hos det tyske



firmaet GATC. pCR 2.1 TOPO er en lineær plasmidvektor med et enkelt 3'thymidin(T)-overheng for TA kloning. Dette gjør at PCR-produktet (som har et A-overheng heftet på av Taq-polymerase) kan liggeres effektivt med vektor.

Plasmidvektoren er også tilsatt enzymet topoisomerase I som binder seg til dobbeltrådet DNA på spesifikke steder og kutter fosfodiesterskjelettet etter 5'CCCTT på en av trådene. Reaksjonen ble satt opp med 4 µl PCR-produkt, 1 µl saltløsning (1,2 M NaCl; 0,06 MgCl<sub>2</sub>), 1 µl TOPO® vektor og inkubert ved romtemperatur i 15-20 min. Plasmidet pCR 2.1 TOPO koder for kanamycinresistens. Etter kloningsreaksjonen ble TOPO-produktet transformert inn i kjemisk kompetente *E. coli*. Disse ble sådd ut på kanamycin-skåler tilsatt X-gal, som farger kolonier uten insert i plasmidet blå, og inkubert over natten ved 37° C. Man får da fremvekst av blå og hvite *E.coli*-kolonier. Hvite kolonier består av *E.coli* med insert i plasmidet. Et insert i plasmidet vil ødelegge genet for enzymet β-galaktosidase. Dermed mister bakteriene evnen til å omdanne blåfarge til hvitfarge som følge av X-gal tilsetning. Det ble plukket syv hvite kolonier som ble satt til i hver sitt rør med 3 ml LB-medium og 50 µg/µl ampisillin. Rørene ble satt til inkubering ved 37° C over natt og bakteriene spunnet ned ved 5000 rpm i 10 min. Det ble så kjørt en koloni-PCR på bakteriekoloniene. Som primere ble det brukt M13 forward og reverse. Oppsettet i hvert rør ble da som følger.

	Mengde
M13 forward	0,5 µl
M13 reverse	0,5 µl
dNTP	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl
10x buffer	2,5 µl
Destillert vann	19 µl
Taq-polymerase	0,25 µl
Bakteriekultur	1 µl

Etter kjøring av gel ble to av bakteriekulturene valgt ut for plasmidrensing på bakgrunn av størrelsen på båndet. For isolering av plasmidene ble det brukt *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Man får da ut rensset DNA. Etter måling av absorbanse ved spektrofotometri for å sjekke renhetsgraden av DNA, ble det sendt til firmaet GATC i Tyskland for sekvensering. Absorbans og konsentrasjon av DNA ble som følger:

Klon	Absorbans	Konsentrasjon
1	0,089	222,7
3	0,045	112,1

### 3) Serologisk undersøkelse

#### a) Undersøkelse for felint leukemivirus (FeLV)

Sera fra 38 av kattene ble testet for FeLV ved bruk av Idexx *Petcheck FeLV* ELISA-kit. Dette kittet bruker antistoffer spesifikke for FeLV p27 (kapsid-protein) for å påvise antigenet i serum hos infiserte katter. Det ble inkludert en positiv og en negativ kontroll. Hver prøve, samt den positive kontrollen, ble applisert i to rene brønner, A og B, 50 µl i hver brønn. Del A ble forbehandlet med 10 µl av en ikke-reaktiv prøvefortynner, mens del B ble forbehandlet med 10 µl av en løsning med nøytraliserende antistoff. Dersom det er antigener tilstede i prøven vil disse danne komplekser med antistoffet og redusere fargedannelsen med 50% eller mer i brønn B i forhold til brønn A. Etter inkubering ved romtemperatur i 5 minutter ble 50 µl av hver prøve overført til de anti-FeLV-coatede testbrønnene. 50 µl av den negative kontrollen ble satt til den siste brønnen. Til hver brønn ble det så tilsatt 50 µl anti-FeLV konjugert med horseradish peroksidase og prøvene ble forsiktig blandet. Etter inkubering ved romtemperatur i 5 minutter ble prøvene helt ut og brønnene vasket fem

ganger med vaskebuffer. Til slutt ble det tilsatt 100 µl TMB substratløsning til hver brønn, dette ble satt til inkubering i 5 min før 25 µl stopp-mix ble satt til hver brønn og prøvene lest av.

#### *b) Undersøkelse for felint immunsvikt virus (FIV)*

Sera fra 71 katter (48 av de 55 kattene som opprinnelig var med i undersøkelsen, samt prøver fra 23 andre katter diagnostisert med FLUTD i perioden februar til april 2007) ble undersøkt for FIV ved hjelp av *Idexx PetCheck Plus Anti-FIV*-kit. Dette er en ELISA-test som detekterer spesifikke antistoffer mot FIV gag (p24) og env (gp40) proteiner. Testen baserer seg på bruk av antigen-coatede brønner og antigen konjugert til enzymet horseradish peroksidase (HRPO). Det ble applisert 50 µl negativ kontroll i de to første brønnene og 50 µl positiv kontroll i de to neste brønnene. Det ble deretter applisert 50 µl serum fra hver katt i hver sin brønn. Til hver av brønnene ble det så tilsatt 50 µl FIV-antigen:HRPO-konjugat. Det hele ble blandet forsiktig og inkubert i 30 min ved romtemperatur. Brønnene ble så tømt og vasket 5 ganger med vaskebuffer. 100 µl TMB substratløsning ble tilsatt hver brønn og inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Deretter ble det tilsatt 100 µl stoppløsning til hver av brønnene for å stanse den enzymatiske reaksjonen og prøvene ble lest av ved å måle absorbansen ved 650 nm.

## **Resultater**

Av de 55 kattene i studien var 43 (78,2%) kastrede hannkatter, 4 (7,3%) ukastrede hannkatter, 6 (10,9%) kastrede hunnkatter og 2 (3,6%) ukastrede hunnkatter.

Videre var 48 (87,3%) av kattene huskatter, de resterende kattene var enten av rasen perser (7,3%), burmeser (1,8%), hellig birma (1,8%) eller maine coon (1,8%).

Gjennomsnittsalderen var 5,8 år og gjennomsnittsvekten 5,6 kg. Holdet ble vurdert til å være over middels hos 37 (67,3%) av kattene, 8 (14,5%) ble regnet som normale, 6 (10,9%) som for tynne og 4 (7,3%) var ikke vurdert.

### **Kattenes bakgrunn**

Tidligere episoder av FLUTD hadde forekommet hos 21 (38,2%) av kattene. Når det gjaldt miljøforhold ble 25 (45,5%) holdt innendørs, mens 18 (32,3%) også hadde utetilgang. Hos de resterende 12 (21,8%) var status ikke registrert. Sesongmessig var flest tilfeller registrert i sommerhalvåret, med 34,5% av tilfellene i mars-mai og 29,1% i juni-august. Mars og juni pekte seg ut som de månedene med flest tilfeller, med 20% i hver av månedene. Klimaet var tørt i 41,8% av tilfellene, vekslende i 14,5%, fuktig i 21,8% og ikke registrert i 21,8% av tilfellene.

I tabell 2 er det listet opp en del faktorer som kan ha innvirkning på kattenes predisposisjon for å utvikle FLUTD. Det er også tatt med en kolonne som viser fordelingen av antall katter med FIC med hensyn på de potensielt innvirkende faktorene. Diagnosen FIC er her gitt til katter hvor det ikke er gjort funn av bakterier, urinstein, plugger eller krystaller.

Tabell 2. Forekomst av FLUTD med hensyn på potensielt innvirkende faktorer.

Potensielt innvirkende faktorer		FLUTD-tilfeller (%)	Tilfeller av FIC (%)
Kjønn	Hann	4 (7,3)	1 (5,3)
	Kastrert hann	43 (78,2)	16 (84,2)
	Hunn	2 (3,6)	0 (0)
	Sterilisert hunn	6 (10,9)	2 (10,5)
Alder	1-4 år	24 (43,6)	10 (52,6)
	4-8 år	20 (36,4)	6 (31,6)
	8-12 år	4 (7,3)	2 (10,5)
	> 12 år	6 (10,9)	1 (5,3)
	Ukjent	1 (1,8)	0 (0)
Vekt	< 3 kg	2 (3,6)	0 (0)
	3-5 kg	17 (30,9)	6 (31,5)
	5-7 kg	23 (41,8)	7 (36,8)
	> 7 kg	9 (16,4)	5 (26,3)
	Ikke registrert	4 (7,3)	1 (5,3)
Miljø	Inne	25 (45,5)	7 (36,8)
	Ute/ute og inne	18 (32,3)	9 (47,4)
	Ikke registrert	12 (21,8)	3 (15,8)
Flere dyr i husholdningen	Nei	27 (49,1)	9 (47,4)
	Flere katter	16 (29,1)	6 (31,6)
	Andre dyr	4 (7,3)	2 (10,5)
	Katter og andre dyr	1 (1,8)	0 (0)
	Ukjent	7 (12,7)	2 (10,5)

## Diagnose

Av de 55 kattene som var med i undersøkelsen ble 17 (30,9%) diagnostisert med obstruktiv FLUTD, og 38 (69,1%) med ikke-obstruktiv FLUTD. Tabell 3 viser den tentative diagnosen kattene fikk basert på funn ved klinisk undersøkelse, urinanalyse og ultralyd/røntgen.

Tabell 3. Tentativ diagnose hos kattene i undersøkelsen.

Tentativ diagnose	Obstruktiv	Ikke-obstruktiv	Total
Bakteriell cystitt	0%	15,8%	10,9%
Idiopatisk cystitt (FIC)	0%	50%	34,6%
Krystalluri	52,9%	26,3%	34,6%
Urinstein	17,7%	5,3%	3,6%
Andre plugger	29,4%	0%	9,1%
Urinstein + bakteriuri	0%	2,6%	1,8%

## Bakteriologisk undersøkelse

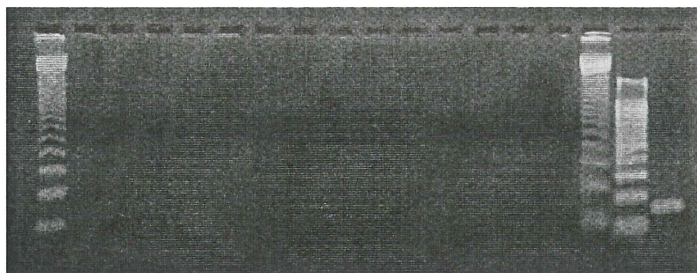
Det ble funnet moderat til rikelig forekomst av bakterier (over  $10^3$  cfu/ml) i urinen til 11 (20%) av kattene i undersøkelsen. Disse ble diagnostisert med bakteriell cystitt. Hos tre av kattene var det ikke sendt urin til dyrkning.

## Virologisk undersøkelse

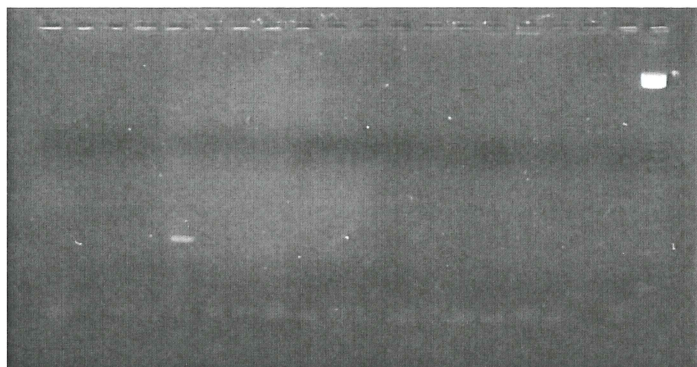
### 1) PCR-undersøkelse

#### a) *Felint calicivirus (FCV)*

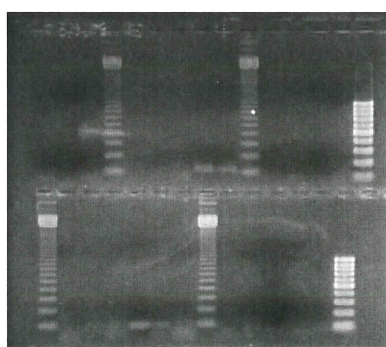
Av de 55 kattene som ble testet ble ingen funnet positive.



*Figur 1*



*Figur 2*

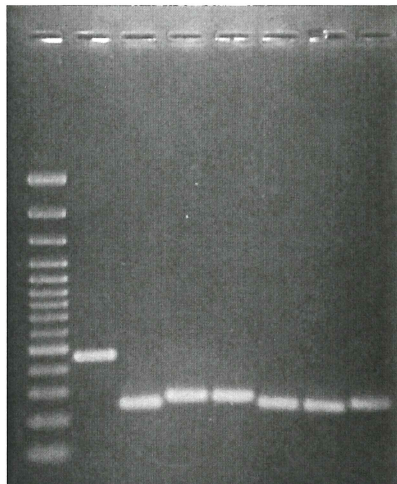


*Figur 3*

*Figur 1, 2 og 3 viser gelene med resultatene fra PCR-undersøkelsen. 123-baseparstiger ble Brukt.*

## b) FHV-1 og BHV-4

19 av kattene ble testet for FHV-1 og BHV-4, men det var ingen sikre funn. Noen DNA-fragmenter var av uventet størrelse og ble skåret ut av gel, klonet og satt inn i plasmider i *E.coli* og sendt til firmaet GATC i Tyskland for sekvensering.



Figur 4

Figur 4 viser gelen med resultatet fra PCR-undersøkelsen. Her er det brukt 100 baseparstige.

## 2) Sekvensering av PCR-produkt

Resultatene av sekvenseringen av de uventede DNA-fragmentene ble sjekket opp mot GenBank ved hjelp av programmet BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

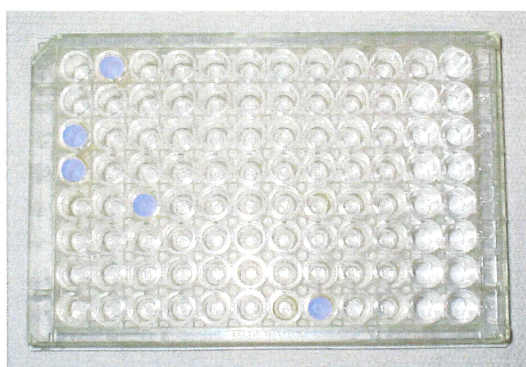
GenBank er en database over alle tilgjengelige nukleotidsekvenser og BLAST brukes til å søke frem sekvenser som er homologe med hverandre. Det ble ikke funnet noen homologe sekvenser mot FHV-1 og BHV-4 annet enn for primerene.



### 3) Serologisk undersøkelse

Ingen av de undersøkte kattene ble funnet positive for FeLV-antigenet p27.

Av de 71 undersøkte kattene ble tre stykker funnet positive for FIV-antistoffer. Dette tilsvarer 4,2% av kattene. Tabell 4 viser fordelingen av de FIV-positive kattene med hensyn på rase, alder og kjønn.



*Figur 5. Figuren viser de 2 positive kontrollene i kolonne 1 og resultatene fra de FIV-positive kattene i kolonne 2, 3 og 8 (blå farge).*

*Tabell 4. Fordeling av rase, alder og kjønn hos de FIV-positive kattene.*

Journalnr.	Rase	Alder	Kjønn
2006-2873	Huskatt	5	Kastrert hann
2006-9763	Huskatt	14	Ukastret hann
2006-12021	Huskatt	9	Kastrert hann

## Diskusjon

Hos de 55 kattene vi testet ble det ikke påvist FCV i urinen ved hjelp av RT-PCR. Det ble heller ikke påvist FHV1 eller BHV4 hos de 19 kattene vi undersøkte for dette. Vi fant altså ingen indikasjoner på at disse kattenes urinveisproblemer var assosiert med infeksjon med FCV, FHV1 eller BHV4. Dette stemmer ikke overens med resultatene fra enkelte andre undersøkelser, hvor det har blitt isolert virus fra urinen hos en del katter med FLUTD (8, 11, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Det finnes imidlertid en del mulige feilkilder. Urin inneholder en del stoffer som kan virke inhiberende på RT-PCR, men erfaringsmessig har dette liten betydning (Espen Rimstad, personlig meddelelse).

RNA ble ekstrahert ved bruk av et kit som er designet for å rense RNA og fjerne blant annet inhiberende stoffer. Man kunne ha testet dette bedre dersom man hadde hatt en "naturtro" positiv kontroll, det vil si felin urin med en kjent mengde FCV. En annen årsak kan være at RT-PCR har for lav sensitivitet, det vil si at det er for lite virus i urinen til å kunne detekteres med denne metoden. Generelt sett er imidlertid RT-PCR en relativt sensitiv påvisningsmetode. For det tredje er FCV et RNA-virus med stor genetisk variasjon (28). Dette kan medføre at primerene ikke bindes korrekt til templatet, selv om primerene vi brukte var såkalt degenererte. Det vil si at noen av basene i sekvensen var valgfrie (27). Degenererte primere gir imidlertid noe lavere sensitivitet i PCR enn vanlige primere.

Når det gjelder virus i serum ble det ikke påvist FeLV antigener hos noen av kattene. Dette utelukker imidlertid ikke at noen av kattene kan ha antistoffer mot FeLV, men det er kattene med antigener som vil være av betydning i denne undersøkelsen, da det er disse kattene som er aktive virusutskillere. I en undersøkelse foretatt av Ueland i 1991 (29) fant man at 1,2% av friske katter og 2,2% av syke katter hadde FeLV antigenemi. Dette er betydelig lavere enn det man funnet i en del undersøkelser fra

andre land (30, 31, 32). I et nyere studium fra USA fant man imidlertid at bare 2,3% av kattene som deltok var FeLV-positive (33).

Det ble funnet antistoffer mot FIV hos 3 av de undersøkte kattene. Dette tilsvarer omtrent 4% av kattene. I den nevnte undersøkelsen av Ueland (29) ble det funnet antistoffer mot FIV hos 5,9% av klinisk friske katter og 10,1% av syke katter.

Våre funn som viste at 4% av kattene var FIV-antistoff-positive er derfor omtrent i det området hvor en ville forvente at prevalensen hos tilfeldig testede katter vil ligge.

En kan derfor i utgangspunktet ikke sette dette i sammenheng med FLUTD.

## **Konklusjon**

Det kan utfra denne undersøkelsen ikke hevdes at infeksjon med FCV, FHV-1, BHV-4, FeLV eller FIV er en sannsynlig årsak til FLUTD. Det kan imidlertid ikke utelukkes at andre virus kan være involvert. Kattene i undersøkelsen ble ikke testet for felint coronavirus (FCoV) og felint syncytiedannende virus (FSV).

## Summary

Feline lower urinary tract disease is considered to be one of the most common diagnoses in feline patients. This syndrome may have a number of different etiologies, but several authors have concluded that feline idiopathic cystitis (FIC) is the most common cause of FLUTD, and it is hypothesized that viruses may be a cause of this disease complex.

In the period from January 2006 to February 2007, 55 cats presented with signs of lower urinary tract disorders were included in a study at the Norwegian School of Veterinary Science. All the cats went through a physical examination, and blood samples for haematology and clinical chemistry were collected. The urine analysis included urine stix, specific gravity, microscopic examination of the sediment and microbiological culturing. In addition the urine from all cats was examined for feline calicivirus (FCV) and the urine from 19 of the cats also were examined for feline herpesvirus 1 (FHV-1) and bovid herpesvirus 4 (BHV-4). The blood samples were examined for feline leukemia virus (FeLV) antigens and feline immunodeficiency virus (FIV) antibodies.

Of the 55 cats included in the study, 30,9% were diagnosed with obstructive and 69,1% with non-obstructive lower urinary tract disease. In total 34,6% of the cats were diagnosed with idiopathic cystitis.

No viruses were detected in the urine from the cats in the study. None of the cats had FeLV (feline leukemia virus) antigens in the blood and only three of the cats had FIV (feline immunodeficiency virus) antibodies in the serum. This was not significantly

different from the cats in the total population. This study indicates none of the viruses tested for as a potential cause

## **Etterskrift**

Vi vil takke Anna Vigdis Eggertsdóttir og Espen Rimstad for god veiledning.

Vi ønsker også å rette en stor takk til Stine Braaen på virologen for tålmodighet og god hjelp med våre analyser. Til slutt vil vi takke Berit Gamnes på virologen og Grethe Johansen på immunologen.

## Referanser

1. Gunn-Moore DA (2003) Feline lower urinary tract disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 5, 133-138
2. Gaskell RM, Gaskell CJ, Chandler EA: *Feline medicine & Therapeutics* 2007. 52-69, 313-323.
3. Heiene R: Urinveislidelser hos katt. *Norsk veterinær tidsskrift* nr.10 1993, Tema Kattesjukdommer. 977-985.
4. Ettinger SJ, Feldman EC: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, sixth edition. 1828-1850.
5. Fletcher TF: Applied anatomy and physiology of the feline lower urinary tract. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. 1996; 26: 181-195
6. Ling GV,: *Lower Urinary Tract Diseases of Dog and Cats*. Diagnosis, medical management, prevention. 179-186.
7. Kruger JM, Osborne CA, Goyal SM, Wickstrom SL, Johnston GR, Fletcher TF, Brown PA: Clinical evaluation of cats with lower urinary tract disease. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1991; 199, 211-216.
8. Buffington CAT et al: Clinical evaluation of cats with nonobstructive urinary tract disease. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1997; 210, 46-50.

9. Kalkstein TS et al: Feline idiopathic lower urinary tract disease. PartI. Clinical manifestations Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 1999; 21, 15-26.
10. Kalkstein TS et al: Feline idiopathic lower urinary tract disease. PartII. Potential causes. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 1999; 21, 148-154.
11. Cameron ME et al: A study of environmental and behavioural factors that may be associated with feline idiopathic cystitis. Journal of Small Animal Practice 2004; 45, 144-147.
12. Eggertsdóttir AV, Lund HS, Krontveit R, Sørnum H: Bacteriuria in cats with feline lower urinary tract disease: A clinical study of 134 cases in Norway. Sendt til/submitted to Feline Medicine and Surgery mars 2007.
13. Kruger JM, Osborne CA, Venta PJ, Sussman MD: Viral infections of the feline urinary tract. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1996; 26: 281-296.
14. Kruger JM, Osborne CA, Lulich JP, Oakley RE: Inherited and congenital diseases of feline lower urinarytract. Vet Clin North Am Pract 1996:26:2. 265-279.
15. Osborne CA, Lulich JP, Kruger JM, Ulrich LK, Bird KA, Koehler LA: Feline urethral plugs ethiology and pathophysiology. Vet Clin North Am Pract 1996:26.2. 233-253.

16. Osborne CA et al: Feline urolithiasis. Etiology and pathophysiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996; 26: 217-232.
17. Bartges J: Feline lower urinary tract disease. Diagnosis and management. Hill's European Speaker Tour 2002.
18. Buffington CA: Visceral pain in humans: Lessons from animals. *Curr Pain Headache Rep* 2001; 5: 44-51.
19. Rice CC et al: Genetic characterization of 2 novel feline caliciviruses isolated from cats with idiopathic lower urinary tract disease. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 293-302.
20. Fabricant CG: Viruses associated with diseases of the urinary tract. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1980; 9: 631-644.
21. Gaskell RM, Gaskell CJ, Page W, Dennis P, Voyle CA: Studies on a possible viral aetiology for the feline urological syndrome. *Vet Rec* 1979; 105: 243-247.
22. Kruger JM, Osborne CA: The role of uropathogens in feline lower urinary tract disease. Clinical implications. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1993; 23: 101-123.
23. Kruger JM, Osborne CA: The role of viruses in feline lower urinary tract disease. *J Vet Intern Med* 1990; 4: 71-78.



24. Fabricant C: Herpesvirus-induced urolithiasis in specific pathogen-free male cats. *Am J Vet Res* 1977; 38: 1837-1842.
25. Barsanti JA, Brown J, Marks A, Reece L, Greene CE, Finco DR: Relationship of lower urinary tract signs to seropositivity for feline immunodeficiency virus in cats. *J Vet Med.* 1996 Jan-Feb; 10(1):34-8.
26. Reinacher M: Diseases associated with spontaneous feline leukemia virus (FeLV) infection in cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 1989 May; 21(1):85-95.
27. Kilde for primersekvens: Wilhelm og Truger (2006).
28. Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, Gaskell RM: Feline calicivirus. *Veterinary Research* 2007; 38, 319-335.
29. Ueland K, Lutz H: Prevalence of feline leukemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in Norwegian cats. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1992 Feb;39(1): 53-58.
30. Bandecchi P, Dell'Omodarme M, Magi M, Palamidessi A, Prati MC: Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. *Veterinary Record* 2006; 158, 555-557.

31. Hosie MJ, Robertson C, Jarrett O: Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Veterinary Record* 1989; 128, 239-297.
32. Reinacher M, Theilen G: Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *American Journal of Veterinary research* 1987; 48, 939-945.
33. Levy JK, Scott HM, Lachtara JL, Crawford PC: Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of American Veterinary Association* 2006; 228, 371-376.

