

FERNANDA FIDELIS GONSALES

**Ocorrência de *Chlamydophila felis* e do plasmídeo críptico em gatis nas
cidades de São Paulo e Osasco**

São Paulo

2013

FERNANDA FIDELIS GONSALES

Ocorrência de *Chlamydophila felis* e do plasmídeo críptico em gatis nas cidades de São Paulo e Osasco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

fwif
00/11/2013

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2900
FMVZ

Gonsales, Fernanda Fidelis
Ocorrência de *Chlamydophila felis* e do plasmídeo críptico em gatis nas cidades de São Paulo e Osasco. / Fernanda Fidelis Gonsales. -- 2013.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. *Chlamydophila felis*. 2. Plasmídeo críptico. 3. Vírus da leucemia felina. 4. Vírus da imunodeficiência felina. 5. Herpesvírus felino do tipo 1. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “A ocorrência da *Chlamydophila felis* e da presença do plasmídeo criptico em gatil”, protocolado sob o nº 2308/2011, utilizando 95 (noventa e cinco) gatos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research “The occurrence of *Chlamydophila felis* and the presence of cryptic plasmid in cattery”, protocol number 2308/2011, utilizing 40 (ninety five) cats, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 22 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GONSALES, Fernanda Fidelis

Título: Ocorrência de *Chlamydophila felis* e do plasmídeo críptico em gatos nas cidades de São Paulo e Osasco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

"Noventa por cento do sucesso se baseia simplesmente em insistir."

Woody Allen

"E o futuro é uma astronave
Que tentamos pilotar
Não tem tempo, nem piedade
Nem tem hora de chegar
Sem pedir licença
Muda a nossa vida
E depois convida
A rir ou chorar."
Aquarela - Toquinho

Aos animais, que sempre me fascinaram e despertaram o interesse pelo conhecimento científico. Em especial aos meus animais, meus grandes companheiros de jornada, que me fazem um bem enorme com seu amor incondicional.

Agradecimento

À meu orientador Prof. Dr. Nilson Roberti Benites pela orientação, pelo apoio nos momentos difíceis e em especial por acreditar não somente que esse projeto era viável, mas principalmente pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, por toda a generosidade em discutir por horas as questões técnicas do trabalho, além de deixar as portas do LABMAS abertas.

Ao Carlos Alberto, por sempre me apoiar, incentivar e permitir que eu realizasse meus sonhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Proc. 2011/15.636-2) e do auxílio à pesquisa (Proc. 2012/12.000-2).

Aos amigos da pós: Patrícia Filippesen, Juan David Valencia, Grazi Benvenga, Tati Jimenez, Sandra Salaberry, pela ajuda nas coletas. Aos queridos, Herbert Souza, Evê Zuniga, André Saindenberg, Carol Torres Alejo, Priscilla Anne Melville, pela paciência, apoio, pelas muitas risadas, sem vocês seria difícil concluir esse trabalho.

À Aline Santana da Hora, que desde da graduação me ajuda em meus projetos de pesquisa, não somente nos auxílios com as coletas, nas discussões das técnicas clínicas e moleculares, mas principalmente por ser uma fonte de inspiração de como um aluno de pós-graduação deve ser em termos acadêmicos e éticos.

À Dr^a. Leda Ponti, a Médica Veterinária Joyce Fuji, a estudante de Medicina Veterinária Talita Pitta Bueno e a todos os funcionários do CCZ SP, que tanto me auxiliaram.

À D^a. Araci, D^a. Maria, Gisele e ao Guerra (*in memorian*) e aos seus animais

que permitiram não somente as coletas, como foram muito receptivos e interessados em prover adequações em suas moradias para a melhor qualidade de vida dos gatos.

Aos funcionários do VPS da FMVZ USP que colaboraram muito para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

GONSALES, F. F. **Ocorrência de *Chlamydophila felis* e do plasmídeo críptico em gatis das cidades de São Paulo e Osasco.** [Occurrence of *Chlamydophila felis* and cryptic plasmid in catteries in the cities of São Paulo and Osasco]. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A infecção de trato respiratório superior em gatos é uma afecção muito frequente em indivíduos que vivem em abrigos, com elevada morbidade e em alguns casos, fatal. O herpesvírus felino tipo1 (FHV-1) e a *Chlamydophila felis* estão entre os principais causadores. O FHV-1 ocasiona quadros de espirros, secreção nasal e alterações oculares como conjuntivite. A *C. felis* é responsável pelos piores casos de conjuntivite e apresenta um plasmídeo críptico como possível fator de virulência. A presença dos retrovírus da leucemia felina (FeLV) e/ou imunodeficiência dos felinos (FIV) debilita a função do sistema imunológico, causando imunossupressão e consequentemente aumento no índice de morbidade e mortalidade. Neste trabalho foram avaliados quatro abrigos, três gatis particulares não-comerciais (um localizado em Osasco/SP e outros dois São Paulo/SP). Os gatis possuíam alta densidade populacional e a procedência dos gatos alojados era desconhecida. A detecção de FHV-1, como de *C. felis* e de três genes do plasmídeo críptico foram realizadas por PCR em amostras de mucosa oral e de conjuntiva ocular de ambos os olhos obtidas com swabs de algodão, secos e estéreis. Amostras de sangue foram coletadas para a detecção do FIV e FeLV por meio de teste imunoenzimático. Os sintomas clínicos dos animais foram classificados de 1 a 4, sendo 4 atribuído àqueles que apresentavam pior sintomatologia. A ocorrência de FIV e FeLV no 1º gatil foi de 4,63% e 3,70%, no 2º gatil foi de 0% e 6,45%, enquanto que no 3º gatil foi 75% e 0% respectivamente, estes vírus não foram detectados no 4º gatil. FHV-1 foi observado em 61,11% dos gatos no 1º gatil; 90,32% no 2º gatil, 100% no 3º gatil e em 89,74% dos animais do 4º gatil. No 1º gatil, 7,41% das amostras apresentavam *C. felis*, no 2º gatil, 58,06%; no 4º gatil, 23,08%; enquanto que no 3º gatil o agente não foi detectado. Dentre as amostras positivas para *C. felis*, os genes do plasmídeo críptico foram detectados; no 1º gatil o gene 1 estava presente em 62,50% das amostras, o gene 2 e 3 em 75%, para o 2º gatil obteve-se 61,11% de positividade

para os genes 1 e 2 e 55,56% para o gene 3; no 4º gatil o gene 1 e 3 estavam presentes em 77,78% das amostras, o gene 2 em 55,56%. Os óbitos relatados no período do estudo foram de animais classificados com sintomas 3 ou 4 e positivos para *C. felis* e para o plasmídeo críptico. No presente trabalho foi observada uma elevada ocorrência de *C. felis* e de seu plasmídeo críptico, apesar da baixa ocorrência de FIV e FeLV nos gatis.

Palavras-chave: *Chlamydophila felis*. Plasmídeo críptico. Vírus da leucemia felina. Vírus da imunodeficiência felina. Herpesvírus felino do tipo 1.

ABSTRACT

GONSALES, F. F. **Occurrence of *Chlamydomphila felis* and cryptic plasmid in catteries in the cities of São Paulo and Osasco.** [Ocorrência de *Chlamydomphila felis* e do plasmídeo críptico em gatis das cidades de São Paulo e Osasco]. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The infection of upper respiratory disease in cats is very common in individuals that living in shelters, with high morbidity, and in some cases, fatal. The feline herpesvirus type 1 (FHV- 1) and *Chlamydomphila felis* are agents the main causes. The FHV- 1 causes sneezing, nasal discharge and ocular abnormalities such as conjunctivitis. The *C. felis* is responsible for the worst cases of conjunctivitis and features a cryptic plasmid as a possible virulence factor. The presence of the feline leukemia virus (FeLV) and/or vírus of feline immunodeficiency (FIV) weaken the function of the immune system, causing immunosuppression and therefore increased morbidity and mortality. This study evaluated four shelters, three catteries private non-commercial (one located in Osasco/SP and two in São Paulo/SP). Catteries possessed high population density and cats housed origin was unknown. The detection of FHV- 1 as three genes of the *C. felis* and cryptic plasmid was performed by PCR in oral mucosa and the ocular conjunctiva of both eyes obtained with cotton swabs, dried and sterile. Blood samples were collected for the detection of FeLV and FIV by enzyme immunoassay. The clinical symptoms of animals were classified from 1 to 4 , with 4 assigned to worst symptoms. The presence of the FIV and FeLV was in the first cattery 4.63% and 3.70%, in the second cattery was 0% and 6.45%, while in the third cattery was 75% and 0%, respectively, these viruses do not were detected in the 4th cattery. FHV- 1 was observed in 61.11 % of the cats in the first cattery; 90.32 % in the second cattery 100 % in the third and 89.74% of the animals of the fourth cattery. In the first cattery, 7.41% of the samples had *C. felis*, the second cattery, 58.06 %, in the fourth cattery, 23.08%, while the third cattery the agent was not detected. Among the samples positive for *C. felis* genes were detected cryptic plasmid; in the first cattery, the first gene was present in 62.50%, gene 2 and 3 in 75% of the samples; for the second cattery was obtained 61.11 % positive for 1 and 2 genes and 55.56 % to the third gene; in fourth cattery the first and the third genes were present at

77.78% of the samples in the second gene was in 55.56%. The deaths reported during the study period were classified in animals with symptoms 3 or 4 and positive for *C. felis* and the cryptic plasmid. In this study we observed a high incidence of *C. felis* and the cryptic plasmid, despite the low occurrence of FIV and FeLV in catteries.

Keywords: *Chlamydomphila felis*. Cryptic plasmid. Feline leukemia virus. Feline immunodeficiency virus. Feline herpesvirus type 1 .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta de material biológico – amostras sanguíneas.....	30
Figura 2 - Coleta de material biológico – “swabs.....	31
Figura 3 - Intensidade da sintomatologia clínica.....	32
Figura 4 - Snap FIV/FeLV.....	33
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose – controle positivos e negativos para Chlamydomphila felis	34
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo.....	35
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose do FHV-1	38
Figura 8 - Animal do 2º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP.....	42
Figura 9 - Animal do 4º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP, transferido para o CCZ SP (1º Gatil do estudo)	43
Figura 10 - Gatil do CCZ SP, bloqueios e avisos de restrição ao público das área de observação e tratamento.....	51
Figura 11 - Gatil do CCZ SP, área de observação, gaiola de animal em tratamento para esporotricose sinalizada aos funcionários a não liberação do mesmo e a necessidade do uso de luvas para manipulá-lo	52
Figura 12 -Gatil do CCZ SP, área de tratamento, em que os animais debilitados eram atendidos.....	53
Figura 13 -Gatil do CCZ SP, vassoura de fogo aplicada em gaiola após desocupação de um animal.....	54
Figura 14 -Gatil do CCZ SP, gaiolas em área externa, enriquecimento ambiental e possibilidade de banho de sol para os gatos hígidios.....	55
Figura 15 - 2º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de Osasco/SP.....	56
Figura 16 -4º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP	57
Figura 17 -4º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP	57
Figura 18 -4º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	41
Gráfico 2 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos gatis em que a C. felis foi detectada - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	45
Gráfico 3 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos gatis em que o FHV-1 foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	49
Gráfico 4 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	60
Gráfico 5 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos grupos em que a C. felis foi detectada - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	63
Gráfico 6 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos grupos em que o FHV-1 foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência absoluta e relativa de machos e fêmeas, nos quatro gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	40
Tabela 2 - Frequência absoluta e relativa da intensidade sintomatológica clínica observada nos quatro gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	41
Tabela 3 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência dos retrovírus FIV e FeLV nos quatro gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	44
Tabela 4 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência de Chlamydomphila felis nos quatro gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	45
Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa de intensidade dos sintomas clínicos observados nos animais em foi detectada a Chlamydomphila felis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	46
Tabela 6 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência dos genes 1, 2 e 3 do plasmídeo críptico, a partir das amostras em que a Chlamydomphila felis estava presente - gatis 1, 2 e 4 - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	47
Tabela 7 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos gatis 1, 2 e 4 em que o gene 1 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	47
Tabela 8 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos gatis 1, 2 e 4 em que o gene 2 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	48
Tabela 9 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas foi detectado. São Paulo, junho 2012 a agosto 2013.....	48
Tabela 10 - Frequência absoluta e relativa da intensidade sintomatológica clínica observada nos quatro gatis, nos animais em que a FHV-1 foi detectada - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	49
Tabela 11 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos gatis 1, 2 e 4 em que o gene 3 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	50
Tabela 12 - Frequência absoluta e relativa de machos e fêmeas, nos três grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	60
Tabela 13 - Frequência absoluta e relativa da intensidade sintomatológica clínica observada nos três grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	61
Tabela 14 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência dos retrovírus FIV e FeLV nos três grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	61
Tabela 15 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência de Chlamydomphila felis nos três grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	62
Tabela 16 - Frequência absoluta e relativa de intensidade dos sintomas clínicos observados nos animais em foi detectada a Chlamydomphila felis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	63

Tabela 17 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência dos genes 1, 2 e 3 do plasmídeo críptico, a partir das amostras em que a Chlamydomphila felis estava presente nos três grupos analisados - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	64
Tabela 18 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos grupos A, B e C em que o gene 1 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	65
Tabela 19 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos grupos A, B e C, em que o gene 2 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	65
Tabela 20 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos grupos A, B e C, em que o gene 3 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	66
Tabela 21 - Frequência absoluta e relativa da intensidade sintomatológica clínica observada nos três grupos, nos animais em que a FHV-1 foi detectada - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013.....	66
Tabela 22 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos grupos A, B e C, em que o gene 3 do plasmídeo críptico foi detectado- São Paulo - junho 2012 a agosto 2013	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Primers sense e anti-sense para detecção de Chlamydomophila felis.....	34
Quadro 2 - Primers sense e anti-sense para análise dos genes do plasmídeo de Chlamydomophila felis	35
Quadro 3 - Primers sense e anti-sense para detecção de Herpesvírus felino do tipo1	38

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleosídeos trifosfatados
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FCV	calicivírus felinos
FeLV	vírus da leucemia felina
FIV	vírus da imunodeficiência dos felinos
FHV-1	herpesvírus felinos do tipo 1
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
p	valor crítico amostral
RNA	ácido ribonucléico
s	segundos
U	unidade
X	vezes
μM	micromolar
μl	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

- negativo
- % porcentagem
- + positivo
- = igual
- °C graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
3	OBJETIVOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Animais	29
4.2	Coleta do material biológico	30
4.3	Sintomatologia clínica	31
4.4	Determinação dos animais com FIV/FeLV	32
4.5	Extração de DNA	33
4.6	Detecção de <i>Chlamydomphila felis</i> – Reação em cadeia pela polimerase, controles positivo e negativo	33
4.7	Detecção do plasmídeo críptico – Reação em cadeia pela polimerase	34
4.8	Sequenciamento de DNA - controles positivo do plasmídeo	36
4.8.1	Purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento de DNA	36
4.8.2	Edição das seqüências	37
4.9	Detecção do Herpesvírus felino do tipo 1 – Reação em cadeia pela polimerase, controles positivo e negativo	37
4.10	Análise estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Animais	40
5.2	Sintomatologia Clínica	40
5.3	Determinação dos animais com FIV/FeLV	43
5.4	Detecção de <i>Chlamydomphila felis</i>	44
5.5	Detecção do plasmídeo críptico	46
5.6	Detecção do Herpesvírus felino do tipo 1	48
5.7	Gatis	50
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

A infecção de trato respiratório superior (ITRS) em gatos é uma afecção muito frequente em indivíduos que vivem em abrigos. Justificando tal ocorrência, temos alguns fatores importantes como: a alta densidade destes animais, alojamentos sem separação entre grupos de animais infectados e não-infectados, não separação por idade e sexo, acomodações sem adequada ventilação e frequência irregular de limpeza (BANNASCH; FOLEY, 2005). É essencial para controle da ITRS que seja realizado o isolamento dos animais sintomáticos, pois a propagação da mesma é decorrente do contato direto entre animais infectados e não-infectado, os animais sintomáticos eliminam os agentes infecciosos via tosse, espirro e através de material contaminado como secreções (nasal e ocular) (HALÁNOVÁ et al., 2010). Os animais sintomáticos que não recebam adequado cuidado veterinário (seja pela administração de medicamentos, bem como pela orientação de isolamento e higiene do ambiente) podem apresentar agravamento do quadro e óbito (GRUFFYDD-JONES et al., 2009).

A ITRS não é causada por um agente infeccioso isolado, dentre os principais causadores tem-se: calicivírus felino (FCV), herpesvírus felino tipo1 (FHV-1), espécies de *Mycoplasma*, *Chlamydophila felis* e a *Bordetella bronchiseptica* (HARBOUR et al., 1991; CAI et al., 2002).

Pelo fato da ITRS ser uma afecção cosmopolita, diversos estudos epidemiológicos sobre a ocorrência dos agentes causadores são realizados. Bannasch e Foley (2005), analisaram a população de gatos de oito abrigos nos Estados Unidos da América; este grupo detectou frequência de 41% para o FHV-1, 67% para o FCV; 15% para *Chlamydophila felis* e de 31% para *Bordetella bronchiseptica*. Em outro estudo, realizado na Alemanha por Gerriets et al. (2012), demonstrou a ocorrência de 17% para FHV-1, 17% para FCV, 25% de *C. felis* e 8% para *Mycoplasma spp.* No Brasil, o primeiro estudo sobre clamidiose felina foi realizado em 2008, em animais domésticos provenientes de cinco municípios da região nordeste do estado de São Paulo. Neste estudo, foi observado frequência de 6% de *C. felis* (SEKI, 2008).

O herpesvírus felino do tipo1 está associado aos quadros de rinite, conjuntivite, ceratoconjuntivite e afecções da córnea. Os felinos acometidos também podem apresentar descarga de secreção nasal e ocular (SHELDON TAI et al., 2010).

A *Chlamydophila felis* é uma bactéria Gram negativa intracelular obrigatória e oportunista, não sendo detectada isoladamente nos felinos. É considerada a principal causadora de conjuntivite em animais acometidos pela ITRS. Apesar de não ser o agente mais prevalente da ITRS, em todos casos clínicos graves, a *C. felis* está associada (LONGBOTTOM; COULTER, 2003). Há discussão sobre a virulência das estirpes de *Chlamydophila felis* e se a presença do plasmídeo críptico (~7,5kb) poderia ser considerado um fator de virulência e de patogenicidade clamidial (HARLEY et al., 2010).

O agravamento dos sintomas da ITRS ocorre nos casos em que os animais acometidos apresentam algum grau de debilidade em seu sistema imunológico, tendo em vista este aspecto, no presente trabalho foi pesquisada a presença do vírus da leucemia felina (FeLV), visto que a ocorrência é alta em animais com acesso a rua e de abrigos. A disfunção que a FeLV causa no sistema imunológico do felino é a imunossupressão devida a perda progressiva dos linfócitos T e B (GREGGS et al., 2011). Outro retrovírus que infecta e debilita os felinos é o FIV (vírus da imunodeficiência dos felinos), a imunossupressão é decorrente da depleção da imunidade celular e progressiva diminuição da razão de linfócitos CD4+:CD8+ (ERCIVAS et al., 2006).

Levando-se em consideração o crescente número de gatos domésticos confinados em áreas urbanas, a realização de estudos sobre a presença de *Chlamydophila felis* e de seus fatores de virulência são necessários. Deste modo, o presente estudo objetivou-se em verificar a ocorrência da *Chlamydophila felis* e do plasmídeo críptico em quatro gatis através da técnica de PCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A infecção de trato respiratório superior (ITRS) em gatos é uma afecção muito frequente em indivíduos que vivem em abrigos, com elevada morbidade e em alguns casos, fatal. A alta predisposição de ITRS em abrigos é decorrente da alta rotatividade na população, em sua maioria provenientes de vias públicas, alta densidade, estresse e a precariedade prévia de cuidados médicos veterinários, inadequada nutrição e aos recorrentes antecedentes mórbidos (BANNASCH; FOLEY, 2005).

Para os felinos, o vírus da leucemia felina (FeLV) representa um alto índice de mortalidade (BORETTI et al., 2011). O reservatório do vírus da leucemia felina (FeLV) é o gato assintomático, persistentemente virêmico. A principal via de transmissão é a lambedura através da saliva contaminada. Também pode ser transmitida pelo coito, bem como via vertical, através da mãe para os filhotes (LUTZ et al., 2009). A maior ocorrência é em animais provenientes da rua, seguida por animais que vivem em grandes populações como os abrigos (MARUYAMA et al., 2003). A FeLV é uma afecção que debilita e diminui a função do sistema imunológico, causando imunossupressão (perda progressiva dos linfócitos T e B, com evolução para a perda de neutrófilos); essa, por sua vez, predispõe desordens citoproliferativas como os linfomas, fibrossarcomas e distúrbios mieloproliferativos ou secundários como o aparecimento dos sinais clínicos da ITRS (GREGGS et al., 2011).

Outro retrovírus que debilita os felinos é o FIV (vírus da imunodeficiência dos felinos), a principal via de transmissão são as mordeduras havendo inoculação de partículas virais ou de células infectadas pelo vírus, deste modo a ocorrência é maior em machos inteiros e com acesso a rua, que frequentemente disputam territórios ou brigam por fêmeas. (DUNHAM; GRAHAM, 2008). A imunossupressão é decorrente da depleção da imunidade celular e progressiva diminuição da razão de linfócitos CD4+:CD8+ (ERCIVAS et al., 2006).

Alguns estudos relacionam cinco agentes, como os principais causadores da ITRS dos felinos: calicivírus felino (FCV), herpesvírus felino tipo1 (FHV-1), espécies de *Mycoplasma*, *Chlamydomphila felis* e a *Bordetella bronchiseptica* (HARBOUR et al., 1991; CAI et al., 2002). Dentre estes, os de maior relevância em termos clínicos e

epidemiológicos são o calicivírus felino, o herpesvírus felino e a clamidiose.

O primeiro agente a ser isolado da doença foi a *Chlamydomphila felis* em 1942 (BAKER), anteriormente era denominada *Chlamydia psittaci* variante *felis*, a revisão taxonômica ocorreu em 1999 por Everett et al. Nos anos de 1950 foram descobertos e associados a ITRS o FCV e o FHV-1, deste modo a clamidiose torna-se não o único agente da ITRS, mas seu papel fica determinado como o agente causador de conjuntivite aguda e crônica em gatos (LONGBOTTOM; COULTER, 2003).

Um estudo realizado por Bannasch e Foley (2005), em oito abrigos de animais, detectou que na ITRS tem-se a prevalência de 41% para o herpesvírus felino tipo1 (FHV-1), 67% para o calicivírus felino (FCV); 15% para *Chlamydomphila felis* e de 31% para *Bordetella bronchiseptica*.

O FHV-1 é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicelloviru*. É um vírus envelopado, que apresenta dupla fita de DNA, com genoma de paroximadamente 134kb (SHELDON TAI et al., 2010); há somente um sorogrupo descrito para o herpesvírus felino, apresentando pouca variedade antigênica entre as cepas (THIRY et al., 2009).

As clamídias são bactérias Gram negativas intracelulares obrigatórias. Possuem ácido desoxirribonucléico (DNA – desoxyribonucleic acid) e ácido ribonucléico (RNA – ribonucleic acid) (LONGBOTTOM; COULTER, 2003). O desenvolvimento do ciclo clamidial envolve a alternância entre a fase predominante extracelular de corpúsculo elementar infeccioso, medindo cerca de 0,3 µm de diâmetro, e o intracelular e metabolicamente ativo corpúsculo reticulado, medindo de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro (SYKES, 2005). A duração do ciclo na cultura varia de 48 a 72h. Para a maioria das clamídias, o corpúsculo reticulado divide-se dentro de um vacúolo intracelular denominado de inclusão, então os corpúsculos reticulados reorganizam-se em corpúsculo elementar infeccioso. Posteriormente, o corpúsculo elementar infeccioso é eliminado da célula hospedeira e poderá infectar uma nova célula hospedeira, onde irá reorganizar-se em corpúsculo reticulado. Os corpúsculos elementares sobrevivem apenas alguns dias a temperatura ambiente (SYKES, 2005). A sobrevivência por até um mês em 4°C pode ser possível (BAKER, 1942). Os corpúsculos elementares são facilmente inativados por solventes líquidos e detergentes (SYKES, 2005).

As clamídias pertencem a ordem *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*. O gênero *Chlamydia* possui quatro espécies: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C.*

pneumoniae e *C. pecorum*. Após análise do RNA ribossômico (RNAr) 23S demonstrou-se que as clamídias podem ser divididas em nove grupos, que se relacionam com a espécie de hospedeiro infectada. Assim estas foram divididas em dois gêneros: o *Chlamydia* e o *Chlamydophila* (EVERETT et al., 1999). As clamídias que acometem o ser humano são a *Chlamydia trachomatis* e a *Chlamydophila pneumoniae* causando, respectivamente, ceratoconjuntivite crônica e pneumonia, além de estar associada com bronquite aguda ou crônica, sinusite, faringite, arteriopatia coronariana, asma, doença cerebrovascular, sarcoidose e artrite reativa. Dentre as variantes comprovadamente zoonóticas tem-se a: *Chlamydophila psittaci* que acomete aves e causa doença respiratória (DICKIE; SNIFF, 1980) e a *Chlamydophila abortus* que acomete os ovinos e causa afecções reprodutivas (ENTRICAN et al., 2010).

O estudo realizado por Yerasimides (1960) sugere a existência de muitas linhagens de *C. felis*, as quais podem diferir em relação a virulência. Pudjiatmoko et al. (1997) demonstram pelo menos a existência de duas linhagens felinas. Embora o principal local de variação antigênica em *C. trachomatis* esteja no gene da proteína da membrana externa principal (*ompA*), a análise de DNA tem demonstrado que o *ompA* é altamente conservado entre diferentes isolados de *C. felis* (SAYADA et al., 1994; SYKES, 2005).

O trabalho de Harley et al. (2010) conclui que o plasmídeo na *C. felis* é altamente conservado e pode estar diretamente relacionado com o fator de virulência da *Chlamydophila felis*. Tanto no gênero *Chlamydophila* quanto no gênero *Chlamydia* tem-se a presença do plasmídeo críptico (~7,5kb) (EVERETT et al., 1999); na *Chlamydia trachomatis* o plasmídeo é altamente conservado, entretanto na *Chlamydophila pneumoniae* foi relatado somente em duas linhagens de origem animal (MYERS et al., 2009). Thomas et al. (1997) sugerem a ancestralidade comum do plasmídeo nas espécies de clamídias. Alguns estudos identificaram algumas estirpes com ou sem o plasmídeo (LUSHER et al., 1989; EVERETT et al., 1999; AZUMA et al., 2006). O efetivo papel do plasmídeo ainda está indefinido, mas há evidências que sugerem o seu envolvimento na virulência e patogenicidade clamidial (O'CONNELL et al., 2007; CARLSON et al., 2008).

A bactéria parece ter predileção por células epiteliais conjuntivais. A provável transmissão ocorre por meio de contato próximo com outros gatos infectados e seus aerossóis e por meio de fômite (HALÁNOVÁ et al., 2010). Para a transmissão entre

gatos é necessário intenso contato com o animal infectado, em especial com as secreções oculares que provavelmente são os fluidos corpóreos de maior relevância no processo. A maior ocorrência é em gatos com menos de um ano de vida. O período de incubação da *C. felis* é de 2 a 5 dias (GRUFFYDD-JONES et al., 2009).

Em estudo realizado por Sykes (2005), foram encontrados os seguintes sintomas associados à infecção por *C. felis*: conjuntivite, espirros, febre transitória, inapetência transitória, moderada perda de peso, moderada descarga nasal, descarga vaginal, claudicação, peritonite, gastrite.

Em geral, as infecções clamidiais tendem a seguir um curso crônico e insidioso, progredindo para estágios assintomáticos (GRUFFYDD-JONES et al., 2009). Não está claro se a doença crônica resulta de reinfecção repetida ou da presença de clamídias persistentes.

A *Chlamydophila felis* também pode ser capaz de entrar em estado persistente por vários meses. Já foram isolados bactérias da conjuntiva até 215 dias após a infecção experimental, embora a maioria dos gatos cesse a disseminação conjuntival cerca de 60 dias após a infecção (O'DAIR et al., 1994). Elevações persistentes nos títulos séricos de *C. felis*, apesar da interrupção aparente da disseminação, também sugerem que alguns gatos possam ser capazes de abrigar clamídias persistentes. O trato intestinal pode ser um local de infecção persistente em gatos, como demonstrado em aves e ruminantes. Documentaram-se excreções retal e vaginal prolongadas em gatos com conjuntivite clamidial induzida experimentalmente. O achado ocasional de *C. felis* no baço, no fígado e no peritônio de gatos não foi consistente, e a relevância da presença da bactéria nesses locais permanece incerta (DICKIE; SNIFF, 1980).

Bannasch e Foley (2005) relatam que os animais acometidos pela *Chlamydophila felis* tendem a ter descarga nasal e conjuntivite enquanto os gatos acometidos por FCV e FHV-1 tendem a ter descarga nasal e ocular e espirros. O estudo também ressalta que apesar da *C. felis*, não ser o agente mais prevalente, em todos os casos clínicos graves este agente estava associado. Holst et al. (2006) demonstraram a prevalência de 15% de *Chlamydophila felis* e 31% de FCV em animais positivos para ITRS na Suécia.

Outro estudo epidemiológico realizado na Austrália por Sykes et al. (1999), constatou, por PCR duplex, a prevalência de 14,3% de *Chlamydophila felis* e 21,2% de FHV-1. Os animais deste estudo, provenientes de clínicas particulares, foram

previamente vacinados contra os patógenos respiratórios FHV-1 e FCV somente, visto que a vacina contra clamidiose não está disponível na Austrália.

No Brasil, o primeiro estudo sobre clamidiose felina foi realizado em 2008, em animais domésticos provenientes de cinco municípios da região nordeste do estado de São Paulo. Neste estudo, foram comparadas as técnicas de PCR (reação de polimerase em cadeia) e de RIFI (reação de imunofluorescência indireta) de 151 amostras. Na técnica de PCR há a detecção de DNA *C. felis* enquanto que a RIFI, obtidas de "swabs" de conjuntiva, resultando em positividade para o agente de 6% na PCR e de 72,1% na RIFI (SEKI, 2008). A detecção do agente não significa presença de quadro sintomatológico.

Em relação às técnicas laboratoriais, o emprego de PCR demonstra ser vantajoso devido à possibilidade de detectar o agente, mesmo com reduzida quantidade de DNA na amostra e a falta de necessidade de organismos viáveis (McDONALD et al., 1998). A cultura celular para isolamento e identificação do agente torna-se inviável, devido às características intrínsecas deste microrganismo intracelular obrigatório: como a dificuldade do cultivo, meio de transporte especial e tempo de consumo (SYKES et al., 1999). No teste RIFI há detecção de anticorpos anti-*Chlamydiaceae*. Ao usar esta técnica, mesmo obtendo alto títulos de anticorpos, pode ser inferido que houve exposição prévia ao agente ou que o animal foi vacinado, não necessariamente representa que o animal esteja infectado no momento da mensuração (McDONALD et al., 1998; HOLST et al., 2006). Logo, como o objetivo do trabalho é detectar a presença do agente, a técnica escolhida para o mesmo é a PCR, não havendo relevância se o animal foi previamente vacinado ou se apresenta sintomatologia clínica.

Apesar do desenvolvimento e emprego da vacina na rotina clínica contra o FHV-1 e do FCV (atenuada e inativa) desde 1986, Mochizuki et al. (2000) referem a observação de muitos casos clínicos de ITRS no Japão. Para a identificação dos agentes, coletou-se amostra de 111 gatos em cerca de 2,5 anos, constatando a inversão da maior prevalência do FCV em relação ao FHV-1 (21,6% contra 3,6% respectivamente) em relação aos estudos iniciais nos anos 1970. A *Chlamydomphila felis* amplificada pela técnica de PCR foi detectada em 26,9% dos 26 animais que apresentavam conjuntivite e rinite, clinicamente. Este trabalho também comparou a detecção destes agentes de amostras obtidas de "swabs" coletados de mucosa oral, nasal e ocular, encontrando maior prevalência de FHV-1 e de FCV em amostras

obtidas de mucosa oral (22,7% e 4,9% respectivamente); contudo pela técnica de PCR, só foi constatada a *C. felis* em amostra obtida de "swab" ocular.

Em relação a vacinação, a World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) considera que as vacinas contra o FHV-1 e de FCV são essenciais (DAY et al., 2007).

No Brasil, apesar dos poucos trabalhos referentes à clamidiose felina, as vacinas (inativada e viva modificada) que conferem proteção contra essa afecção são amplamente comercializadas no mercado veterinário brasileiro e utilizadas nas clínicas veterinárias para imunização dos gatos.

3 OBJETIVOS

- A. Investigar a ocorrência da *Chlamydomphila felis* e do plasmídeo críptico em amostras de “swabs de conjuntivas oculares e oral de felinos de origem desconhecida pertencentes a três gatis particulares não-comerciais e de felinos que estão sob cuidados do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de São Paulo.
- B. Investigar a ocorrência do vírus da leucemia felina e da imunodeficiência dos felinos, nestes quatro gatis.
- C. Investigar a ocorrência do Herpesvírus felino do tipo1 nestes quatro gatis.
- D. Relacionar a presença ou ausência de sintomatologia clínica (secreção nasal e ocular) com a presença de *C. felis*, do plasmídeo críptico, FIV, FeLV e FHV-1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram incluídos no estudo 186 felinos de 4 abrigos: 1º. gatil do CCZ SP (108 felinos), 2º gatil particular não-comercial localizado na cidade de Osasco/SP (31 animais), 3º gatil particular não-comercial localizado na cidade de São Paulo/SP (8 animais), 4º gatil particular não-comercial localizado na cidade de São Paulo/SP (39 animais).

As populações dos abrigos estudados eram compostas de gatos de origem desconhecida, recolhidos de vias públicas, sem raça definida.

As amostras sanguíneas e de “swabs” de conjuntivas oculares e mucosa oral foram obtidas entre os meses de junho e julho de 2012 e junho, julho e agosto de 2013, período de maior ocorrência e de evidência de sintomas clínicos da ITRS no hemisfério sul.

As amostras obtidas foram armazenadas a -80°C até o momento dos testes no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS) e no Laboratório de Doenças Infecciosas (Bacteriologia e Micologia), ambos pertencentes ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ USP).

As amostras foram obtidas conforme consentimento expresso dos proprietários dos felinos dos gatis não-comerciais. No CCZ as amostras foram obtidas sob supervisão da Médica Veterinária responsável pelo gatil.

A seleção dos mesmos foi realizada pelos responsáveis, assim sendo, haviam animais que apresentam ou não sintomatologia clínica no momento da coleta. Todos os felinos participantes do estudo não possuíam raça definida, nem eram separados por sexo ou idade (sendo na maioria dos casos de idade desconhecida). Animais muito jovens ou debilitados não participaram do projeto. Deste modo o critério estabelecido para coleta foi a permanência dos mesmo nestes dois locais.

Este projeto de pesquisa está de acordo com os princípios éticos na utilização de animais para fins de pesquisa da Comissão de Bioética da FMVZ –USP (Protocolo 2308/2011) e pelo GAP – Grupo de Avaliação de Projetos da Gerencia do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo (projeto 02/2012 Of. CEUAVET nº 156/FMVZ/2011).

4.2 Coleta do material biológico

As amostras sanguíneas foram coletadas por meio de punção da veia jugular ou cefálica. Uma alíquota de 0,5mL de sangue de cada felino foi acondicionada em frasco com anticoagulante EDTA – K3 7,5% (Vacutainer, Becton Dickinson, USA) (Figura 1).

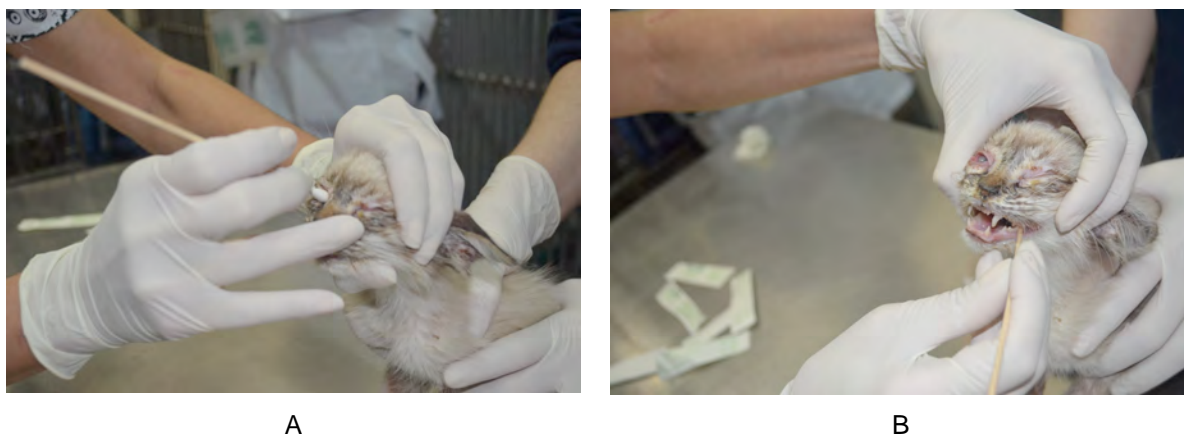
Figura 1 - Coleta de material biológico – amostras sanguíneas.



Legenda: A - venopunção cefálica. B – venopunção jugular.
Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

Os “swabs” secos e estéreis após serem gentilmente passados nas conjuntivas oculares e mucosa oral dos gatos, foram armazenados em tubos eppendorfs e refrigerados durante o transporte (Figura 2).

Figura 2 - Coleta de material biológico – “swabs”.



Legenda: A – conjuntiva ocular. B – mucosa oral.
Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

4.3 Sintomatologia clínica

No momento da coleta, os gatos foram classificados de acordo com a intensidade de sintomatologia clínica apresentada, com a numeração variando de 1 a 4 (do menos para o mais grave). Deste modo, os animais classificados como número 1 foram os que apresentaram a sintomatologia mais branda, apresentando discreta secreção serosa ocular e/ou nasal; já os animais 2, apresentaram moderada secreção muco-purulenta ocular e/ou nasal; os classificados como 3, apresentaram intensa secreção muco-purulenta ocular e/ou nasal; e finalizando os animais 4, com a sintomatologia mais grave, apresentaram intensa secreção muco-purulenta ocular e/ou nasal bem como eritema, edema e lesões (uveíte, hifema e/ou úlcera) (Figura 3).

Figura 3 - Intensidade da sintomatologia clínica.

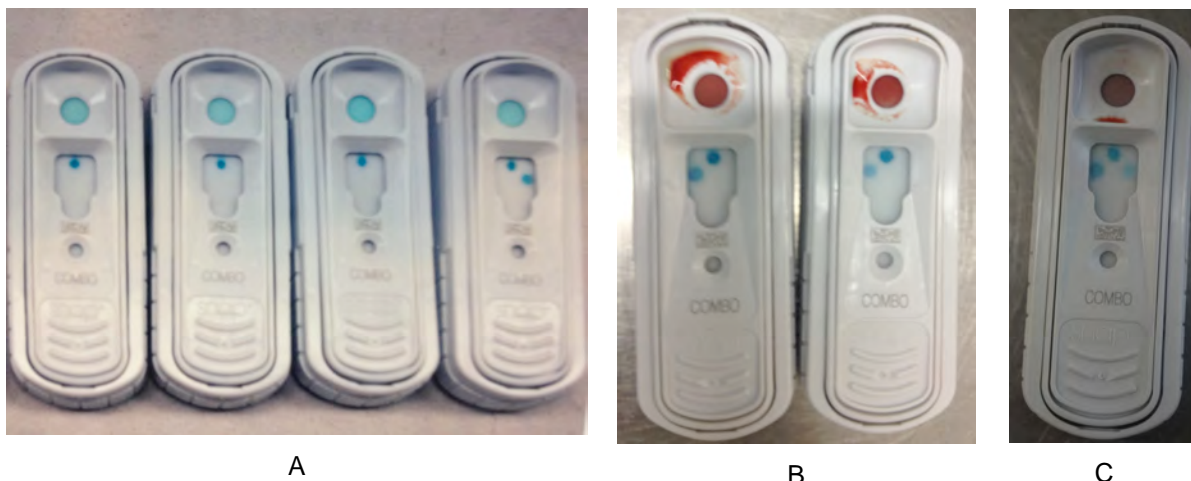


Legenda: A- Animal apresentando discreta secreção serosa ocular e/ou nasal, B - Animal apresentando moderada secreção muco-purulenta ocular e/ou nasa, C - Animal apresentando intensa secreção muco-purulenta ocular e/ou nasal, D - Animal apresentando intensa secreção muco-purulenta ocular e/ou nasal, apresentando eritema, edema e lesões como uveíte, hifema, ulcera.
Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

4.4 Determinação dos animais com FIV/FelV

Para a determinação dos retrovírus da imunodeficiência dos felinos (FIV) e da leucemia felina (FeLV) foi optado pelo teste de imunoensaio (snap FIV/FelV da Idexx) que detecta anticorpos contra a FIV e antígenos do FeLV (Figura 4). Este kit comercial é um teste ELISA (Enyme Liked Immunoabsorbent Assay). O kit foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante.

Figura 4 - Snap FIV/FeLV.



Legenda: A: Os 3 primeiros testes apresentam o controle de funcionalidade do teste (controle positivo: coloração azulada na porção superior de visualização do resultado, o controle positivo localizado na porção inferior do teste não deve ser visualizado), o quarto kit apresenta além do controle positivo, a coloração azulada à direita representa o ponto antígeno do FeLV. B: os 2 testes demonstram positividade para FIV (coloração azulada à esquerda) além de demonstrarem o controle positivo. C: duplo positivo – neste teste foi observado além do controle positivo, a positividade para FIV (coloração azulada à esquerda) como para a FeLV (coloração azulada à direita).

Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

4.5 Extração de DNA

A extração total de DNA dos “swabs” coletados visando a detecção da *Chlamydomphila felis* e do Herpesvírus felino do tipo 1 (FHV-1), foi realizada por kit comercial “DNeasy tissue” (Qiagen, Crawley, Reino Unido) de acordo com as orientações do fabricante.

4.6 Detecção de *Chlamydomphila felis* – Reação em cadeia pela polimerase, controles positivo e negativo

Os primers senso (for) e anti-senso (rev) utilizados foram descritos no quadro 1 (HELPS et al., 2001). A mistura para a PCR consistiu em 0,2 μ M de cada primer, tampão 1X, 0,2mM de cada dNTPs, 1,5mM de $MgCl_2$, 0,625 U Platinum[®] TaqDNA Polymerase (Life technologies, Brasil), 5 μ l de DNA da amostra, e água ultrapura

para completar um volume final de solução de 25µl. As condições para a reação foram: 1 ciclo a 94°C por 3min, 35 ciclos a 94°C por 45s, 55°C por 30s, 72°C por 45s e 1 ciclo a 72°C por 7min. Como controle positivo foi utilizada a vacina Felocell CVR®-C Pfizer. Água ultrapura autoclavada foi utilizada como controle negativo da reação.

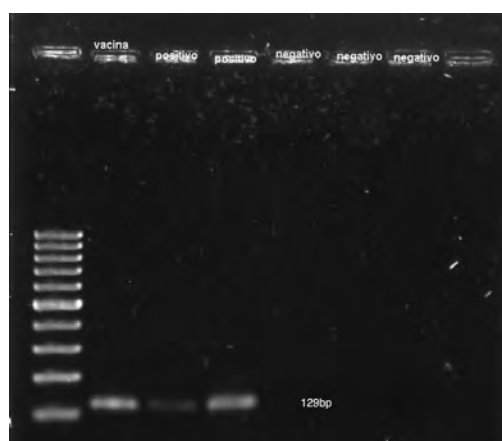
Quadro 1 - Primers sense e anti-sense para detecção de *Chlamydomphila felis*

Primers	Sentido	Sequencia	Região do gene MOMP
<i>Chl for</i>	Senso	5'-ATGCTTGTTCCATACATTGGGG-3'	965-986
<i>Chl rev</i>	Anti-senso	5'-TCCTAAAAGAGTTGGGTTCCAGG-3'	1071-1093

Sequencia do GenBank acesso X61096, MOMP (principal proteína de membrana externa)

O produto da amplificação juntamente com um marcador de peso molecular foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,1 µg de brometo de etídeo por mL e visualizado através de sistema de captura de imagem ultravioleta. As amostras com banda de 129 pb foram consideradas positivas (Figura 5).

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose – controle positivos e negativos para *Chlamydomphila felis*



Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

4.7 Detecção do plasmídeo críptico – Reação em cadeia pela polimerase.

Os primers utilizados estão descrito no quadro 2 (HARLEY et al., 2010). A mistura para a PCR consistiu em: 0,2 μ M de cada primer, tampão 1X, 0,2mM de cada dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 0,625U Platinum[®] TaqDNA Polymerase (Life technologies, Brasil), 5 μ l de DNA da amostra, e água ultrapura para completar um volume final de solução de 25 μ l. As condições para a reação foram: 1 ciclo a 94°C por 3min, 35 ciclos a 94°C por 45s, 55°C por 30s, 72°C por 45s e 1 ciclo a 72°C por 7min.

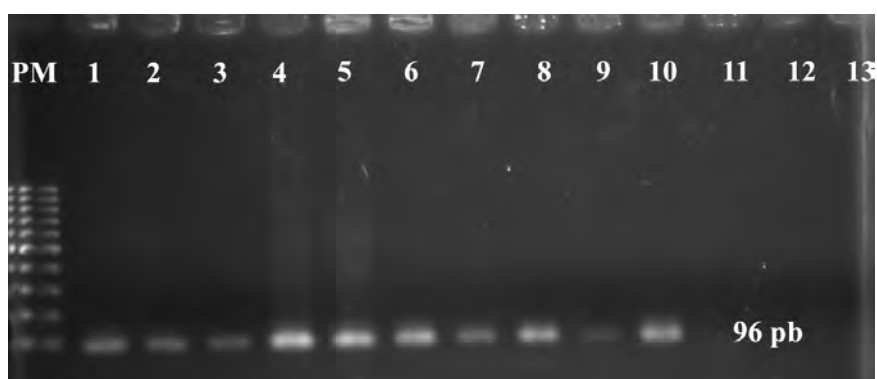
Quadro 2 - Primers sense e anti-sense para análise dos genes do plasmídeo de *Chlamydomophila felis*

Primers	Primer sense (5' – 3')	Primer anti-sense (5' – 3')	Fragmento (posição)
<i>pCF01</i>	GGCAACTTTATCTCCAATCACC	CTTTCCAGCTTCATAGAACCATC	96 pb (221-316)
<i>pCF02</i>	CTGAGGTTGCACGATTTAAGAA	TCATTGGTCCGAGGGAAC	80 pb (1765-1844)
<i>pCF03</i>	CGAGGCGATAAAAGACCAA	AAGATTACATCCGCATCCTGT	74 pb (3417-3490)

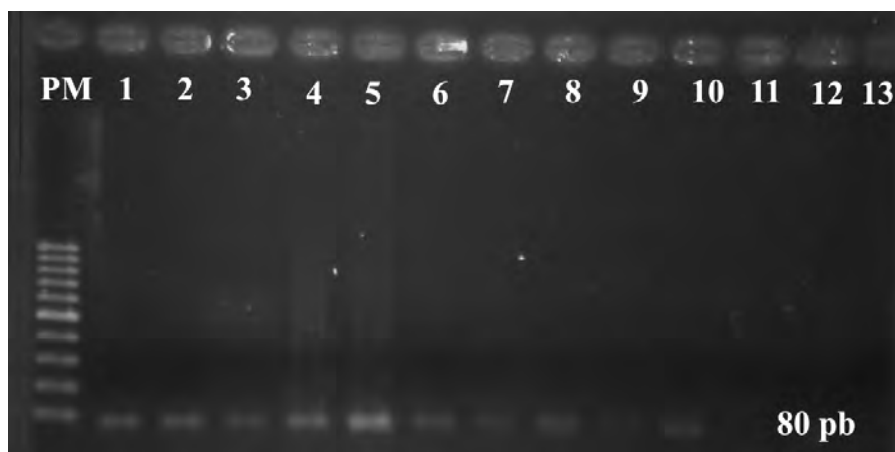
Sequencia do GenBank acesso AP006862

O produto da amplificação juntamente com um marcador de peso molecular foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,1 μ g de brometo de etídeo por mL e visualizado através de sistema de captura de imagem ultravioleta (Figura 6).

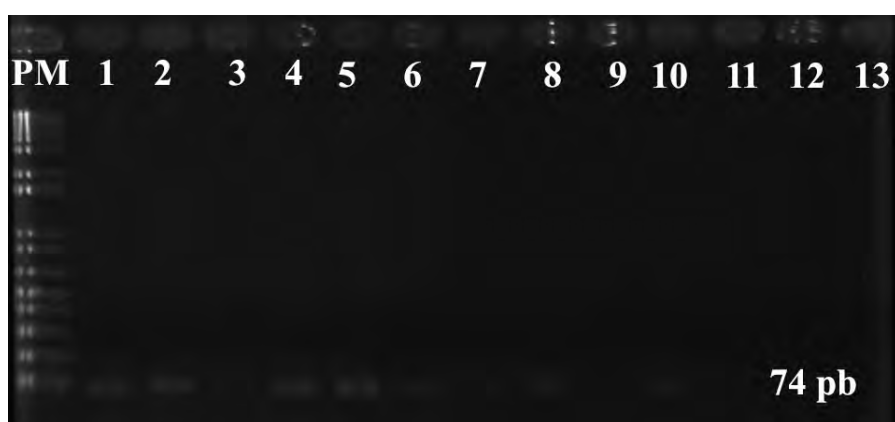
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo.



A



B



C

Legenda: A – amplificação do gene pCF01 (96pb) – detecção nas amostras n° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. B – amostras amplificação do gene pCF02 (80pb), detecção nas amostras n° 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. C – amplificação do gene pCF03 (74pb), detecção nas amostras n° 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, e 10.
 Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

4.8 Sequenciamento de DNA - controles positivo do plasmídeo

4.8.1 Purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento de DNA

Foram selecionados 3 amplicons (1 de cada amplificação dos 3 genes do plasmídeo – *pCF01*, *pCF02* e *pCF03*). A purificação destas amostras foi realizada utilizando-se *GFX PCR DNA and gel band Purification Kit* (GE Healthcare®), sendo o DNA assim purificado quantificado visualmente com Low Mass DNA Ladder (Invitrogen®) segundo instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento de DNA consistiu em 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 4 µL de 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems™), 3,2 µmol de cada primer em reações separadas, 30ng do DNA alvo e água ultra-pura esterilizada q.s.p. para uma reação final de 10 µL, levando-se ao termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf™) para 35 ciclos de 96°C/10 segundos, 50°C/5 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 1°C/segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12.000 x g/25 minutos, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g/5 minutos e secando-se o precipitado.

Após esta etapa, as seqüências foram resolvidas em sequenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems™).

4.8.2 Edição de seqüências

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo Phred *online* em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> para avaliação da qualidade dos mesmos, utilizando-se apenas posições com escore superior a 20 (1 erro a cada 100 nucleotídeos).

A seguir, os cromatogramas foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (1998-2002 Technelysium Pty LTD®) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciada.

A seqüência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn para confirmação do seqüenciamento em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

4.9 Detecção do Herpesvírus felino do tipo 1 – Reação em cadeia pela polimerase, controles positivo e negativo

Os primers utilizados estão descrito no quadro 3 (RECHE Jr et al., 2009). A mistura para a PCR consistiu em: 0,5µM de cada primer, tampão 1X, 0,2mM de cada dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1,25U Platinum[®] TaqDNA Polymerase (Life technologies, Brasil), 2,5µl de DNA da amostra, e água ultrapura para completar um volume final de solução de 25µl. As condições para a reação foram: 1 ciclo a 94°C por 3min, 35 ciclos a 94°C por 30s, 57°C por 30s, 72°C por 45s e 1 ciclo a 72°C por 5min. Como controle positivo foi utilizada a vacina Felocell CVR[®]-C Pfizer. Água ultrapura autoclavada foi utilizada como controle negativo da reação.

Quadro 3. Primers sense e anti-sense para detecção de Herpesvírus felino do tipo1

Primers	Sentido	Sequencia	Posição
FHV-TK-S	Senso	5' GAGCCGCCCAATAAACACTC 3'	201 pb (66218 - 66237)
FHV-TK-A	Anti-senso	5' TCATTCTGAACGGGGATGGT 3'	201 pb (66418 - 66399)

Sequencia do GenBank acesso FJ478159-2

O produto da amplificação juntamente com um marcador de peso molecular foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,1µg de brometo de etídeo por mL e visualizado através de sistema de captura de imagem ultravioleta (Figura 7).

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose do FHV-1.



Legenda: amplificação do gene da timidina quinase (201pb) – detecção nas amostras n° 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 e 12. A amostra 13 é o controle positivo.

Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

4.10 Análise estatística

O “software” GRAPHPAD INSTAT 1992-98 foi utilizado para a elaboração das análises estatísticas. As variáveis: sexo, apresentar ou não FIV/FeLV, presença de *Chlamydophila felis*, dos genes do plasmídeo críptico e do Herpesvírus felino do tipo 1 da hipótese foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado. Já as verificações da hipótese de associação entre a intensidade da sintomatologia clínica observada nos gatis e a detecção dos patógenos estudados foram obtidos através do teste Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 Animais

A idade de todos os gatos foi estimada entre 2 meses e 8 anos, no 1º grupo 60,18% (65/108) dos animais encontram-se abaixo de 1 ano, para o 2º grupo 16,12% (5/31) e para o 4º grupo 74,36% (29/39), nenhum animal do 3º grupo estava abaixo de 1 ano de vida. Houve um maior número de filhotes abaixo de 1 ano amostrados, no 1º gatil em relação ao 2º ($p=0,0061$), e no 4º gatil em relação aos gatis 2º ($p=0,0039$) e ao 3º ($p=0,0208$).

O número de machos do 1º grupo foi de 42,59%, do 2º foi 52%, do 3º foi 50% e do 4º 35,90% enquanto que o de fêmeas para o 1º grupo foi de 57,41%, para o 2º de 48%, para o 3º 50% e para o 4º 64,10% (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência absoluta e relativa de machos e fêmeas, nos quatro gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

	Machos		Fêmeas	
	n	%	n	%
Gatil 1	46	42,59%	62	57,00%
Gatil 2	16	51,61%	15	48,39%
Gatil 3	4	50,00%	4	50,00%
Gatil 4	14	35,90%	25	64,10%
Total	80		106	

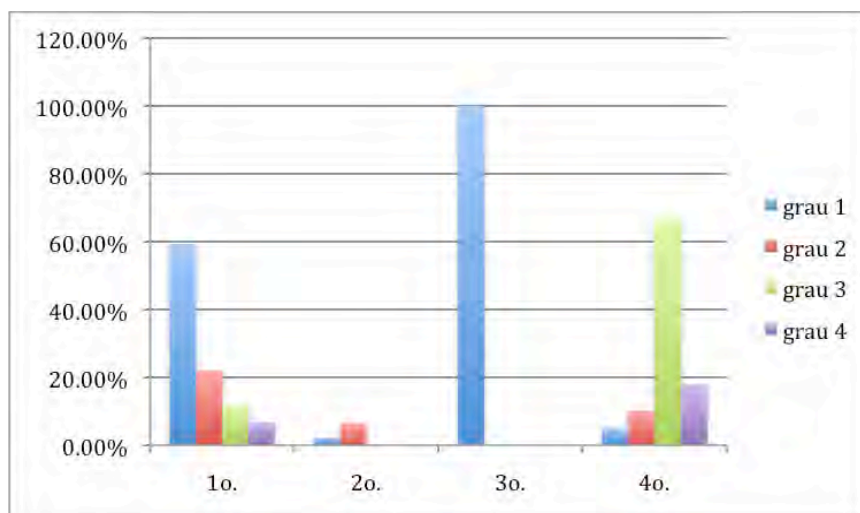
n: número de animais, %: porcentagem

Em relação ao gênero, houve diferença estatística entre o 4º gatil e os demais ($p= 0,0094$), tendo sido trabalhado com um número maior de fêmeas do que de machos neste gatil em relação aos demais que apresentaram uma proporção equivalente entre o número de machos e fêmeas.

5.2 Sintomatologia Clínica

A sintomatologia clínica foi observada em 54,63% (59/108) dos gatos do 1º gatil, em 100% dos animais dos 3 outros gatis. O gráfico 1 demonstra a distribuição dos sinais.

Gráfico 1 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013



No 1º gatil a sintomatologia 1 foi observada em 59,32% (35/59) dos gatos, a 2 em 22,03% (13/59), a 3 em 11,86% (7/59) e a 4 em 6,78% (4/59); no 2º gatil, obteve-se 16,13% (5/31) para 1, 25,81% (8/31) para 2, 38,71% (12/31) para 3 e 19,35% (6/31) para a intensidade de sintoma 4; já para o 3º gatil obteve-se 100% (8/8) para a intensidade de sintomas clínicos classificado como grau 1; e por fim no 4º gatil foi observado a intensidade 1 em 5,13% (2/39) dos gatos, a 2 em 10,26% (4/39), a 3 em 66,67% (26/39) e 17,95% (7/39) para a intensidade de sintomas clínicos 4 (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência absoluta e relativa da intensidade sintomatológica clínica observada nos quatro gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de Sintomas	Gatil 1		Gatil 2		Gatil 3		Gatil 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1	35	59,32%	5	2,15%	8	100,00%	2	5,13%
2	13	22,03%	8	6,45%	0	0,00%	4	10,26%
3	7	11,86%	12	0,00%	0	0,00%	26	66,67%
4	4	6,78%	6	0,00%	0	0,00%	7	17,95%
Total	59		31		8		39	

N: numero de animais, %: porcentagem

Houve diferenças estatísticas apresentadas entre a intensidade dos sintomas do 2º e o 1º gatil ($p < 0,001$), entre 2º e o 3º gatil ($p < 0,001$), entre 3º e o 4º gatil ($p < 0,001$) e entre 1º e o 4º gatil ($p < 0,001$). A mediana da intensidade dos sintomas clínicos observados foi 1 para o 1º (variando do grau 1 ao grau 4) e o 3º (somente apresentando o grau 1) gatis, enquanto que o para o 2º e para o 4º gatil foi 3 (ambas variando entre os graus 1 a 4).

No desenvolvimento do projeto foi possível acompanhar a evolução de dois animais, machos, sem raça definida, com cerca de 1,5 mês de vida, ambos apresentaram o grau 4 da intensidade de sinais clínicos. O primeiro era integrante do 2º gatil e foi acompanhado da introdução ao gatil até o 15º dia, onde houve seu óbito (Figura 8).

Figura 8 - Animal do 2º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP.



Legenda: A – Introdução no gatil, animal não apresentava qualquer sintomatologia clínica. B – após 14 dias, animal intensa secreção muco-purulenta ocular e nasal, eritema e edema palpebrais e ulcera em olho esquerdo. No 15º animal veio a óbito.
Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

O segundo animal pertencia ao 4º gatil e foi removido ao 1º gatil (CCZ SP), o animal foi acompanhado semanalmente do dia de sua transferência ao dia de sua alta clínica, realizada após 2 meses de tratamento (Figura 9).

Figura 9 - Animal do 4º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP, transferido para o CCZ SP (1º Gatil do estudo).



A

B



C

Legenda: A – Introdução no gatil, animal apresentava intensa secreção muco-purulenta ocular e nasal, eritema e edema palpebrais e ulcera em língua. B. Após 15 dias de tratamento, animal apresenta significativa melhora da descarga nasal e ocular, contudo o comprometimento ocular ainda era evidente. C – Após dois meses de tratamento animal obteve ganho de peso, crescimento e somente o olho esquerdo ficou sequelado, o animal perdeu a visao deste olho, contudo apresentava-se em perfeito estado de saúde e foi posto para adoção.

Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

5.3 Determinação dos animais com FIV/FeLV

Dos 186 animais participantes, foi detectado FIV em 5,91% (11/186) e 3,23% (6/186) de FeLV. A ocorrência de FIV e FeLV no 1º gatil foi de 4,63% e 3,70%; enquanto que no 2º gatil foi de 0% e 6,45; e no 3º gatil foi de 75% e 0% respectivamente. No 4º gatil não foi detectado nem FIV nem FeLV (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência dos retrovírus FIV e FeLV nos quatro gatis - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Gatil	FIV		FeLV	
	n	%	n	%
1	5	4,63%	4	3,70%
2	0	0,00%	2	6,45%
3	6	75,00%	0	0,00%
4	0	0,00%	0	0,00%
Total	11		6	

n: numero de animais, %: porcentagem

Como o número de animais positivos para FeLV foi baixo, estatisticamente não houve diferenças entre os grupos estudados. Já para a FIV, houve diferença significativa entre o 1° e o 3° gatis ($p= 0,0001$), encontrando-se um maior número de animais positivos para FIV no 3° gatil.

5.4 Detecção de *Chlamydomphila felis*

A *Chlamydomphila felis* foi detectada em 18,82% (35/186) do total de amostras analisadas. A ocorrência de *Chlamydomphila felis* no 1° gatil foi de 7,41% (8/108), no 2° gatil foi de 58,06% (18/31) e no 4° gatil foi de 23,08% (9/39). No 3° gatil não foi detectada a *C. felis* (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência de *Chlamydomphila felis* nos quatro gatis- São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

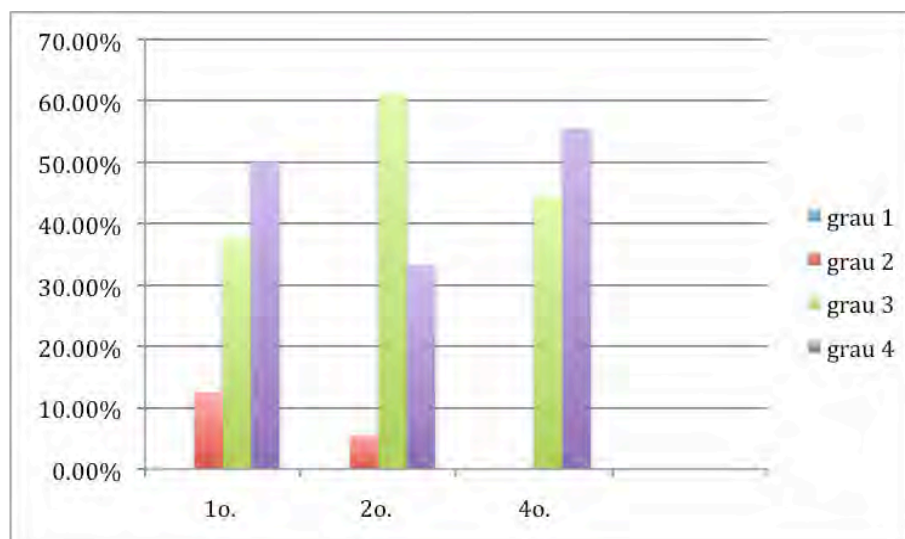
Gatil	+		-	
	n	%	n	%
1	8	7,41%	100	92,59%
2	18	58,06%	13	41,94%
3	0	0,00%	8	100,00%
4	9	23,08%	30	76,92%
Total	35		151	

+: presente, -: ausente, n: numero de animais, %: porcentagem

O 2º gatil apresentou um número maior de animais positivos para a *C. felis* que os demais gatis (para o 1º gatil, $p=0,001$; no 3º gatil obteve-se $p= 0,004$ e para o 4º gatil, $p= 0,0035$). A outra diferença estatística observada entre os quatro grupos, foi o maior de animais positivos para a *C. felis* no 4º gatil comparando-se com o 1º ($p= 0,0165$).

O gráfico 2 demonstra a distribuição dos sinais clínicos observados, nos gatis em que a *C. felis* foi detectada.

Gráfico 2 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos gatis em que a *C. felis* foi detectada - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013



Nestes animais em que a *C. felis* foi detectada, a intensidade de sintomas clínicos observados para o 1º gatil foi de 12,50% (1/8) para o grau 2, 37,50% (3/8) para o 3 e 50% (4/8) para a intensidade 4. No 2º gatil observou-se 5,56% (1/18) para o 2, 61,11% (11/18) para o 3 e 33,33% (6/18) para a intensidade de sintoma 4;

já para o 4º gatil obteve-se 44,44% (4/9) para de intensidade de sintomas clínicos classificado como grau 3 e 55,56 (5/9) para o grau 4. A intensidade de sintomas clínicos de grau 1 não foi observado em nenhum dos 3 gatis em que a *C. felis* foi detectada (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa de intensidade dos sintomas clínicos observados nos animais em foi detectada a *Chlamydophila felis* - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de Sintomas	Gatil 1		Gatil 2		Gatil 4	
	n	%	n	%	n	%
1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
2	1	12,50%	1	5,56%	0	0,00%
3	3	37,50%	11	61,11%	4	44,44%
4	4	50,00%	6	33,33%	5	55,56%
Total	8		18		9	

n: numero de animais, %: porcentagem

Não houve diferenças estatísticas apresentadas entre a intensidade dos sintomas nos três gatis em que a *C. felis* foi detectada. A mediana da intensidade dos sintomas clínicos observados nesses gatis foi 3,5 para o 1º gatil (variando do grau 2 ao grau 4); no 2º gatil foi 3 (variando do grau 2 ao grau 4) e 4 no 4º gatil (variando do grau 3 ao grau 4).

5.5 Detecção do plasmídeo críptico

Para os 35 animais em que foi detectada a *Chamydophila felis* foi realizada uma segunda reação de PCR no intuito de detectar o plasmídeo críptico. Visando minimizar a possibilidade de resultados falsos negativos decorrentes de processos de mutação que o plasmídeo poderia sofrer, foram utilizados três segmentações genéticas diferentes para a detecção de DNA plasmidial de cada uma das amostras.

A ocorrência dos genes plasmidial no 1º gatil foi de 75% (6/8) para os genes 2 e 3, e 62,50% (5/8) para o gene 1; já no gatil 2 foi observado em 61,11% (11/18) nos genes 1 e 2; e 55,56% (10/18) para gene 3. No 4º gatil obteve-se 77,78% (7/9) de detecção dos genes 1 e 3, e 55,56% (5/9) no gene 2 (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência dos genes 1, 2 e 3 do plasmídeo críptico, a partir das amostras em que a *Chlamydomphila felis* estava presente - gatis 1, 2 e 4 - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Plasmídeo	Gatil 1		Gatil 2		Gatil 4	
	n	%	n	%	n	%
gene 1	5	62,50%	11	61,11%	7	77,78%
gene 2	6	75,00%	11	61,11%	5	55,56%
gene 3	6	75,00%	10	55,56%	7	77,78%
Total de <i>C. felis</i>	8		18		9	

n: numero de animais, %: porcentagem

Em relação aos sintomas clínicos e a ocorrência dos genes plasmidial, observou-se para as amostras em que o gene 1 foi detectado, a intensidade de grau 3 em 45,45% (5/11), e em 54,55% (6/11) para o grau 4 nos gatos do 1º gatil, obteve-se no 2º gatil 60% (3/5) das amostras com intensidade grau 3 e 40% (2/5) para o grau 4. Já no 4º gatil observou 28,57% (2/7) para o grau 3 e 71,43% (5/7) para o grau 4 (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos gatis 1, 2 e 4 em que o gene 1 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de sintomas	Gatil 1		Gatil 2		Gatil 4	
	n	%	n	%	n	%
1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
2	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
3	5	45,45%	3	60,00%	2	28,57%
4	6	54,55%	2	40,00%	5	71,43%
Total	11		5		7	

n = numero de animais, % = porcentagem

Para o gene 2, observou-se a intensidade de grau 3 em 45,45% (5/11) dos gatos, e em 54,55% (6/11) para o grau 4 nos animais do 1º gatil; no 2º gatil 50% (3/6) das amostras apresentavam a intensidade de sintomas classificadas como grau 3 e 4. Já no 4º gatil observou 40% (2/5) para o grau 3 e 60% (3/5) para o grau 4 (Tabela 8).

Tabela 8 - Freqüência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos gatis 1, 2 e 4 em que o gene 2 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de sintomas	Gatil 1		Gatil 2		Gatil 4	
	n	%	n	%	n	%
1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
2	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
3	5	45,45%	3	50,00%	2	40,00%
4	6	54,55%	3	50,00%	3	60,00%
Total	11		6		5	

n = numero de animais, % = porcentagem

Para o gene 3, nos gatis 1 e 2, observou-se 50% de intensidade de sintomas grau 3 e 4. Já no 4º gatil observou 28,57% (2/7) para o grau 3 e 71,43% (5/7) para o grau 4 (Tabela 9).

Tabela 9 - Freqüência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos gatis 1, 2 e 4 em que o gene 3 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de sintomas	Gatil 1		Gatil 2		Gatil 4	
	n	%	n	%	n	%
1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
2	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
3	5	50,00%	3	50,00%	2	28,57%
4	5	50,00%	3	50,00%	5	71,43%
Total	10		6		7	

n: numero de animais, %: porcentagem

Nos 3 gatis em que foi detectada a *C. felis* e pesquisou-se a presença dos 3 genes plasmidiais, não foram observadas as intensidades de sintomas clínicos grau 1 ou 2.

Tanto em relação às frequências obtidas dos genes bem como a intensidade dos sintomas clínicos nos 3 genes do plasmídeo críptico observado nos gatis analisados, não foram encontradas diferenças estatísticas.

5.6 Detecção do Herpesvírus felino do tipo 1

O herpesvírus felino do tipo 1, foi detectado em 73,66% (137/186) dos felinos analisados neste estudo. A ocorrência de FHV-1 no 1º gatil foi de 61,11% (66/108), no 2º gatil foi de 90,32% (28/31), 100% (8/8) no 3º gatil, enquanto que no 4º gatil foi de 89,74% (35/39) (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequência absoluta e relativa da intensidade sintomatológica clínica observada nos quatro gatis, nos animais em que a FHV-1 foi detectada - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

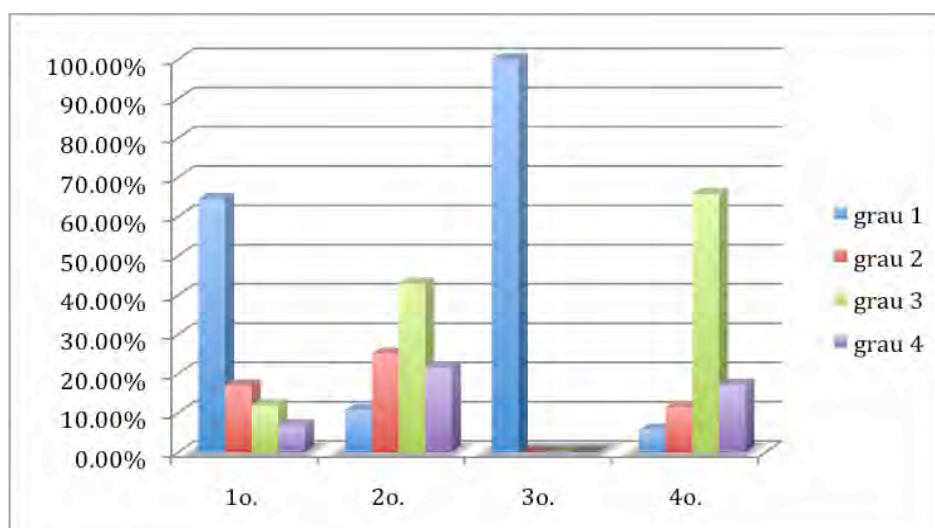
Gatil	+		-	
	n	%	n	%
1	66	61,11%	42	38,89%
2	28	90,32%	3	9,68%
3	8	100,00%	0	0,00%
4	35	89,74%	4	10,26%
Total	137		49	

+: presente, - : ausente, n: numero de animais, %: porcentagem

Observou-se um número maior de animais positivos para FHV-1 no 2º gatil ao se comparar com o 1º. Gatil ($p= 0,0020$) e no 4º gatil em relação ao 1º gatil ($p= 0,0010$).

O gráfico 3 demonstra a distribuição dos sintomas clínicos observados, nos quatro gatis em que o FHV-1 foi detectado.

Gráfico 3 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos gatis em que o FHV-1 foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013



A sintomatologia clínica observada para os animais em que o FHV-1 foi detectado, era de 64,41% (38/59) dos gatos para o grau 1, a 2 em 16,95% (10/59), a 3 em 11,86% (7/59) e a 4 em 6,78% (4/59) no 1º gatil; já para o 2º gatil, obteve-se 10,71% (3/28) para o 1, 25% (7/28) para o 2, 42,86% (12/28) para o 3 e 21,43% (6/28) para a intensidade de sintoma 4; já para o 3º gatil obteve-se 100% (8/8) para de intensidade de sintomas clínicos classificado como grau 1; e por fim no 4º gatil foi observado a intensidade 1 em 5,71% (2/35) dos gatos, a 2 em 11,43% (4/35), a 3 em 65,71% (23/35) e 17,14% (6/35) para a intensidade de sintomas clínicos 4 (Tabela 11). Somente no 1º gatil observou-se um número superior de animais que apresentavam sintomas clínicos em relação à detecção do FHV-1.

Tabela 11 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos gatis 1, 2 e 4 em que o gene 3 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de Sintomas	Gatil 1		Gatil 2		Gatil 3		Gatil 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1	38	64,41%	3	10,71%	8	100,00%	2	5,71%
2	10	16,95%	7	25,00%	0	0,00%	4	11,43%
3	7	11,86%	12	42,86%	0	0,00%	23	65,71%
4	4	6,78%	6	21,43%	0	0,00%	6	17,14%
Total	59		28		8		35	

n: número de animais, %: porcentagem

Houve diferenças estatísticas apresentadas entre a intensidade dos sintomas do 2º e o 1º gatil ($p < 0,001$), entre 2º e o 3º gatil ($p < 0,001$), entre 3º e o 4º gatil ($p < 0,001$) e entre 1º e o 4º gatil ($p < 0,001$). A mediana da intensidade dos sintomas clínicos observados foi 1 para o 1º (variando do grau 1 ao grau 4) e o 3º (somente apresentando o grau 1) gatis, enquanto que o para o 2º e para o 4º gatil foi 3 (ambas variando entre os graus 1 a 4).

5.7 Gatis

Os gatis participantes do projeto possuíam características referentes ao manejo, estrutura e acesso a tratamento médico veterinário muito distintos. No 1º. gatil (CCZ SP), haviam 3 áreas distintas e isoladas em que o animais eram dispostos, o público

somente tinha acesso à 1ª área e haviam bloqueios (portas e cadeados) bem como sinalizações que evitavam a entrada de pessoas não autorizadas nos demais recintos (Figura 10).

Figura 10 - Gatil do CCZ SP, bloqueios e avisos de restrição ao público das áreas de observação e tratamento.



A



B

Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

Os animais que eram recolhidos e entravam no gatil, eram separados em gaiolas conforme o comportamento e agressividade, não sendo misturados animais recolhidos de diferentes sítios e/ou períodos. Deste modo a organização destas três áreas eram: 1ª setor de adoção - animais hígidos, castrados e vacinados eram expostos para o visitante que tivesse interesse em adotar um gato. As áreas 2 e 3 eram restritas a pessoas autorizadas, sendo a 2ª área, destinada a observação – neste setor encontravam-se animais recém recolhidos e hígidos, que aguardariam ao menos uma semana de observação antes de irem para o setor de adoção, outro grupo de animais que também era alojado nesse setor eram as gatas que estivessem para parir ou com ninhada, as mesmas aguardavam em gaiolas isoladas

com a cria até o desmame, uma outra condição que era possível de ser encontrada nesse setor, eram os animais em tratamento e com quadro clínico estável, que apresentavam afecções crônicas ou de longo tratamento, sendo que para este último grupo, as gaiolas estavam devidamente sinalizadas com as informações pertinentes aos funcionários como medida de segurança (Figura 11).

Figura 11 - Gatil do CCZ SP, área de observação, gaiola de animal em tratamento para esporotricose sinalizada aos funcionários a não liberação do mesmo e a necessidade do uso de luvas para manipulá-lo.



Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

Na 3ª e última área do gatil, encontravam-se os animais que necessitavam de cuidados veterinários intensivos (Figura 12). Todas as áreas do gatil eram supervisionadas durante todo o dia por médicos veterinários e estes se dedicavam a maior parte do tempo aos animais da 3ª área, administrando os tratamentos necessários as afecções apresentadas.

Figura 12 - Gatil do CCZ SP, área de tratamento, em que os animais debilitados eram atendidos.



A



B

Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

No CCZ SP, os responsáveis pelo gatil estabeleceram protocolos sanitários visando o controle de doenças infecto-contagiosas, deste modo, no momento em que a gaiola ocupada por um animal era liberada, a equipe de desinfecção era requisitada para início do trabalho, este processo consistia na aplicação de produtos químicos desinfetantes bem como na aplicação de vassoura de fogo (Figura 13), somente após este procedimento a gaiola poderia ser novamente utilizada por outro animal.

Figura 13 - Gatil do CCZ SP, vassoura de fogo aplicada em gaiola após desocupação de um animal.



Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

Outro foco de atenção dado pelos responsáveis pelo gatil do CCZ SP era proporcionar bem estar aos animais alojados. Na área externa ao gatil havia algumas gaiolas que ficavam dispostas em local de boa intensidade solar, contendo alguns atrativos como bolas, cordas e outros brinquedos. Os felinos que se encontravam aptos, segundo os critérios de saúde dos médicos veterinários responsáveis, podiam ficar algumas horas por dia nesse espaço (Figura 14).

Figura 14 - Gatil do CCZ SP, gaiolas em área externa, enriquecimento ambiental e possibilidade de banho de sol para os gatos hígidios.



Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

Os demais gatis participantes deste projeto, estavam localizados nas residências dos proprietários e possuíam rotina e manejo sanitário diferentes do CCZ SP. No 2º gatil particular não-comercial localizado na cidade de Osasco/SP, os animais ao serem recolhidos de vias públicas, não eram separados ou isolados por sexo e idade, sendo introduzidos diretamente à população instalada. A população deste gatil oscilava em cerca de 40 animais e quando algum animal morria o proprietário recolhia um novo animal da rua. Os animais ficavam alojados em um cômodo da residência (Figura 15) e as medidas sanitárias estabelecidas pelo proprietário eram limpeza do local com produtos químicos desinfetantes três vezes por semana, o proprietário era responsável pela alimentação e recolhimento dos dejetos dos mesmos. Ao apresentar algum sintoma clínico o proprietário levava o animal para consulta em médico veterinário; em decorrência da oneração relacionada ao grande número de animais, este proprietário recorria a hospital escola veterinário da Universidade de São Paulo.

Figura 15 - 2º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de Osasco/SP. Alojamento dos animais em um cômodo da residência do proprietário.



Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

No 3º gatil particular não-comercial localizado na cidade de São Paulo/SP, as condições sanitárias e de manejo era muito similares ao do 2º gatil. Contudo, a proprietária foi encaminhada a uma casa de repouso e por ordem judicial os animais deste gatil foram encaminhados ao CCZ SP e deveriam ficar em observação até a decisão final do juiz.

O 4º gatil particular não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP, era um sobrado, sendo a parte inferior destinada a moradia da proprietária e a parte superior destinada como abrigo para os gatos. A população deste gatil oscilava em torno de 200 gatos, no momento da coleta foram estimados 186 felinos. A proprietária abrigava além dos felinos mais 20 cães, sendo que 3 cães jovens de pequeno porte e sem raça definida, conviviam com os felinos, em decorrência de brigas entre os cães e a necessidade de separá-los (Figura 16). A proprietária era a única responsável pela limpeza dos recintos e alimentação dos animais.

Figura 16 - 4º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP. Os felinos dividiam o abrigo com 3 cães de pequeno porte e sem raça definida. Esta era a única área ventilada do abrigo e onde os animais podiam tomar sol.



Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

As instalações do gatil possuíam graves problemas sanitários, como infiltração, mofo e ausência de ventilação (Figura 17).

Figura 17 - 4º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP. O abrigo possuía problemas de infiltração, mofo e falta de ventilação adequada .



Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

A limpeza dos ambientes também era precária e os animais eram alimentados em recipientes sujos, muitas vezes com resíduos alimentares em decomposição (Figura 18).

Figura 18 - 4º Gatil particular, não-comercial, localizado na cidade de São Paulo/SP. Precariedade e falta de higiene na alimentação dos felinos.



A



B

Fonte: Gonsales, F. F. (2013).

A proprietária refere que não recolhia animais de vias públicas, mas que seus vizinhos introduziam continuamente animais em sua residência. Esse gatil não atendia as especificações da Lei Municipal Nº 13.131, de 18 de maio de 2001, da cidade de São Paulo, que limita em dez o número de animais domésticos por residência. A prefeitura da cidade de São Paulo aplicou multa à proprietária, que aumentou o muro da casa no intuito de evitar que os vizinhos introduzissem mais animais em sua residência, o CCZ SP não possuía estrutura para recolher um número tão grande de animais, deste modo a solução encontrada foi a responsabilidade do CCZ SP em esterilizar todos os animais, recolher e cuidar dos animais mais debilitados e promover campanha de conscientização e posse responsável no bairro.

Tendo evidenciado as divergências entre os gatis estudados, uma nova abordagem para análise dos resultados foi proposta. Deste modo, utilizando o critério de similaridade entre os gatis e os classificando qualitativamente, os quatro gatis foram assim, reorganizados em três grupos, sendo o grupo A, o grupo que apresentou bom manejo clínico e sanitário, foi composto pelos 108 animais do CCZ SP; o grupo B apresentou manejo clínico e sanitário mediano, mas ainda assim considerado abaixo dos critérios ideais para a continuidade do gatil, foi composto por 39 animais, destes, 31 animais eram do anteriormente classificado 2º gatil, localizado em Osasco/SP e 8 animais do 3º gatil localizado em São Paulo/SP e o grupo C, apresentou um manejo clínico e sanitário ruim, muito abaixo do aceitável para a continuidade do gatil, foi composto pelos 39 animais do anteriormente classificado 4º gatil localizado em São Paulo/SP.

Os dados organizados segundo essa proposta, seguem abaixo:

Animais

Com a nova organização, houve um equilíbrio entre a proporção de machos e fêmeas (Tabela 12). Não havendo diferença estatística entre os três grupos.

Tabela 12 - Frequência absoluta e relativa de machos e fêmeas, nos três grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

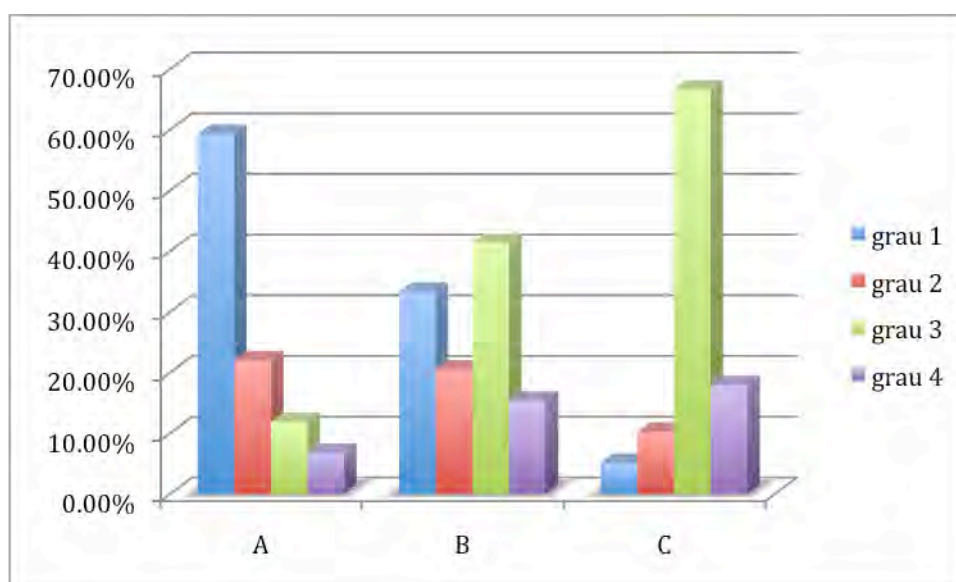
	Machos		Fêmeas	
	n	%	n	%
A	46	42,59%	62	57,41%
B	20	51,28%	19	48,72%
C	14	35,90%	25	64,10%
Total	80		106	

n: numero de animais, %: porcentagem

Sintomatologia clínica

A distribuição dos sintomas clínicos observados nos três grupos está representada no gráfico 4.

Gráfico 4 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013



No grupo A a sintomatologia 1 foi observada em 59,32% (35/59) dos gatos, a 2 em 22,03% (13/59), a 3 em 11,86% (7/59) e a 4 em 6,78% (4/59); no grupo B, obteve-se 33,33% (13/39) para 1, 20,51% (8/39) para 2, 41,38% (12/39) para 3 e 15,38% (6/39) para a intensidade de sintoma 4; já o grupo C foi observado a

intensidade 1 em 5,13% (2/39) dos gatos, a 2 em 10,26% (4/39), a 3 em 66,67% (26/39) e 17,95% (7/39) para a intensidade de sintomas clínicos 4 (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência absoluta e relativa da intensidade sintomatológica clínica observada nos três grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de Sintomas	A		B		C	
	n	%	n	%	n	%
1	35	59,32%	13	33,33%	2	5,13%
2	13	22,03%	8	20,51%	4	10,26%
3	7	11,86%	12	41,38%	26	66,67%
4	4	6,78%	6	15,38%	7	17,95%
Total	59		39		39	

n: numero de animais, %: porcentagem

Houve diferenças estatísticas em relação a intensidade dos sintomas clínicos observados entre os três grupos, entre o grupo A e B ($p < 0,05$), entre os grupos B e C ($p < 0,001$) e entre o grupo A e o C ($p < 0,001$). A mediana da intensidade dos sintomas clínicos observados para o grupo A foi 1 (variando do grau 1 ao grau 4), para o grupo B foi 2 (variando do grau 1 ao grau 4), enquanto que o grupo C foi 3 (variando do grau 1 ao grau 4).

Determinação dos animais com FIV/FeLV

A ocorrência de FIV e FeLV no grupo A foi de 2,69%, enquanto que no 2º gatil foi de 0% e 6,45. Já no 3º gatil foi de 75% e 0% respectivamente. No 4º gatil não foi detectado nem FIV nem FeLV (Tabela 14).

Tabela 14 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência dos retrovírus FIV e FeLV nos três grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Gatil	FIV		FeLV	
	n	%	n	%
A	5	4,63%	4	3,7%
B	6	15,38%	2	5,13%
C	0	0,00%	0	0,00%
Total	11		6	

n: numero de animais, %: porcentagem

Como o número de animais positivos para FeLV foi baixo, estatisticamente não houve diferenças entre os grupos estudados. Já para a FIV, houve diferença significativa entre os grupos B e C ($p= 0,0254$), encontrando-se um significativamente maior número de animais positivos para FIV no grupo B.

Detecção de *Chlamydomphila felis*

A ocorrência de *Chlamydomphila felis* no grupo A foi de 7,41% (8/108), no grupo B foi de 46,15% (18/39) e no grupo C foi de 23,08% (9/39) (Tabela 15).

Tabela 15 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência de *Chlamydomphila felis* nos três grupos - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

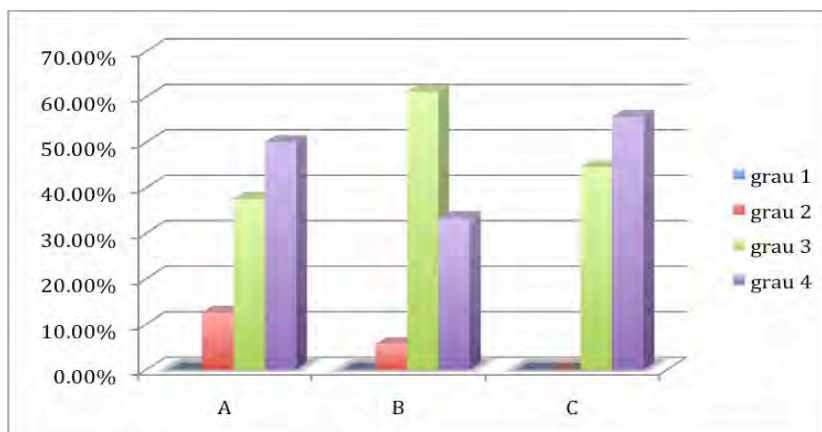
Gatil	+		-	
	n	%	n	%
A	8	7,41%	100	92,59%
B	18	46,15%	21	53,85%
C	9	23,08%	30	76,92%
Total	35		151	

+: presente, -: ausente, n: número de animais, %: porcentagem

O grupo B detectou um maior número de animais com *C. felis* em comparação ao grupo A ($p < 0,0001$), do mesmo modo o grupo C detectou um maior número de animais com *C. felis* em comparação ao grupo A ($p = 0,0165$).

A distribuição dos sintomas clínicos observados, nos três grupos em que a *C. felis* foi detectada está representada no gráfico 5.

Gráfico 5 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos grupos em que a *C. felis* foi detectada - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013



Nestes animais em que a *C. felis* foi detectada, a intensidade de sintomas clínicos observados para o grupo A foi de 12,50% (1/8) para o grau 2, 37,50% (3/8) para o 3 e 50% (4/8) para a intensidade 4. No grupo B observou-se 5,56% (1/18) para o 2, 61,11% (11/18) para o 3 e 33,33% (6/18) para a intensidade de sintoma 4; já para o grupo C obteve-se 44,44% (4/9) para de intensidade de sintomas clínicos classificado como grau 3 e 55,56 (5/9) para o grau 4. A intensidade de sintomas clínicos de grau 1 não foi observado em nenhum dos 3 gatis em que a *C. felis* foi detectada (Tabela 16).

Tabela 16 - Frequência absoluta e relativa de intensidade dos sintomas clínicos observados nos animais em foi detectada a *Chlamydomphila felis* - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de Sintomas	A		B		C	
	n	%	n	%	n	%
1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
2	1	12,50%	1	5,56%	0	0,00%
3	3	37,50%	11	61,11%	4	44,44%
4	4	50,00%	6	33,33%	5	55,56%
Total	8		18		9	

n: numero de animais, %: porcentagem

Não houve diferenças estatísticas apresentadas entre a intensidade dos sintomas nos três grupos em que a *C. felis* foi detectada. A mediana da intensidade dos sintomas clínicos observados nesses grupos foi 3,5 para o grupo A (variando do

grau 2 ao grau 4); no grupo B foi 3 (variando do grau 2 ao grau 4) e 4 no grupo C (variando do grau 3 ao grau 4).

Detecção do plasmídeo críptico

A ocorrência dos genes plasmidial no grupo A foi de 75% (6/8) para os genes 2 e 3, e 62,50% (5/8) para o gene 1; já no grupo B foi observado em 61,11% (11/18) nos genes 1 e 2; e 55,56% (10/18) para gene 3. No grupo C obteve-se 77,78% (7/9) de detecção dos genes 1 e 3, e 55,56% (5/9) no gene 2 (Tabela 17).

Tabela 17 - Frequência absoluta e relativa da ocorrência dos genes 1, 2 e 3 do plasmídeo críptico, a partir das amostras em que a *Chlamydophila felis* estava presente nos três grupos analisados - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Plasmídeo	A		B		C	
	n	%	n	%	n	%
gene 1	5	62,50%	11	61,11%	7	77,78%
gene 2	6	75,00%	11	61,11%	5	55,56%
gene 3	6	75,00%	10	55,56%	7	77,78%
Total de <i>C. felis</i>	8		18		9	

n: numero de animais, %: porcentagem

Em relação aos sintomas clínicos e a ocorrência dos genes plasmidial, observou-se para as amostras em que o gene 1 foi detectado, a intensidade de grau 3 em 45,45% (5/11), e em 54,55% (6/11) para o grau 4 nos gatos do grupo A, obteve-se no grupo B 60% (3/5) das amostras com intensidade grau 3 e 40% (2/5) para o grau 4. Já no grupo C observou 28,57% (2/7) para o grau 3 e 71,43% (5/7) para o grau 4 (Tabela 18).

Tabela 18 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos grupos A, B e C em que o gene 1 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de sintomas	A		B		C	
	n	%	n	%	n	%
1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
2	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
3	5	45,45%	3	60,00%	2	28,57%
4	6	54,55%	2	40,00%	5	71,43%
Total	11		5		7	

n = numero de animais, % = porcentagem

Para o gene 2, observou-se a intensidade de grau 3 em 45,45% (5/11) dos gatos, e em 54,55% (6/11) para o grau 4 nos animais do grupo A; no grupo B, 50% (3/6) das amostras apresentavam a intensidade de sintomas classificadas como grau 3 e 4. Já no grupo C observou-se 40% (2/5) para o grau 3 e 60% (3/5) para o grau 4 (Tabela 19).

Tabela 19 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos grupos A, B e C, em que o gene 2 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de sintomas	A		B		C	
	n	%	n	%	n	%
1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
2	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
3	5	45,45%	3	50,00%	2	40,00%
4	6	54,55%	3	50,00%	3	60,00%
Total	11		6		5	

n = numero de animais, % = porcentagem

Para o gene 3, nos grupos A e B, observou-se 50% de intensidade de sintomas grau 3 e 4. Enquanto que no grupo C foi observado 28,57% (2/7) para o grau 3 e 71,43% (5/7) para o grau 4 (Tabela 20).

Tabela 20 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos grupos A, B e C, em que o gene 3 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de sintomas	A		B		C	
	n	%	n	%	n	%
1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
2	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
3	5	50,00%	3	50,00%	2	28,57%
4	5	50,00%	3	50,00%	5	71,43%
Total	10		6		7	

n: numero de animais, %: porcentagem

Nos 3 grupos em que foi detectada a *C. felis* e pesquisou-se a presença dos 3 genes plasmidiais, não sendo observadas as intensidades de sintomas clínicos grau 1 ou 2.

Tanto em relação às frequências obtidas dos genes, como a intensidade dos sintomas clínicos nos 3 genes do plasmídeo críptico observado nos grupos analisados, não foram encontradas diferenças estatísticas.

Detecção do Herpesvírus felino do tipo 1

A ocorrência de FHV-1 no grupo A foi de 61,11% (66/108), no grupo B foi de 92,31% (36/39), enquanto que no grupo C foi de 89,74% (35/39) (Tabela 21).

Tabela 21 - Frequência absoluta e relativa da intensidade sintomatológica clínica observada nos três grupos, nos animais em que a FHV-1 foi detectada - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

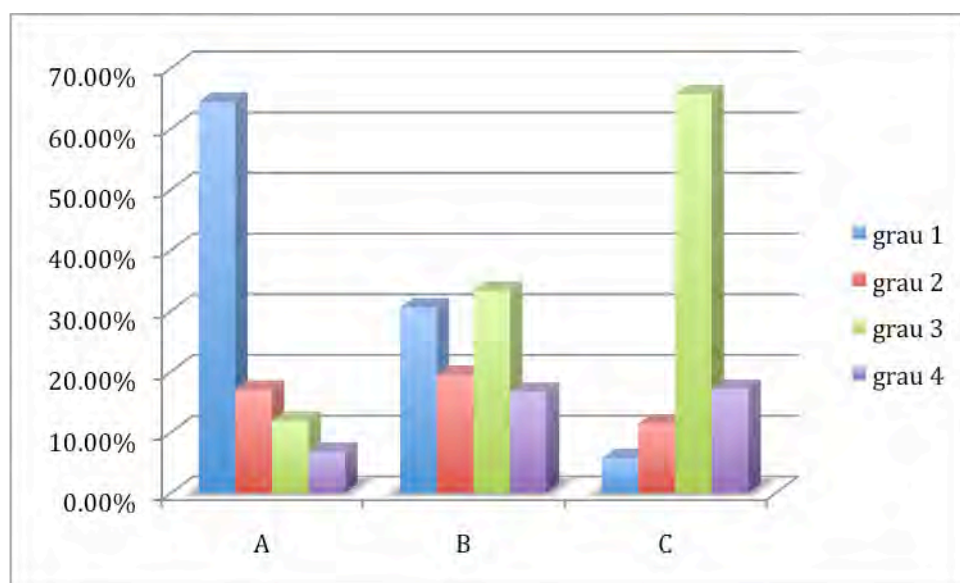
Gatil	+		-	
	n	%	n	%
A	66	61,11%	42	38,89%
B	36	92,31%	3	7,69%
C	35	89,74%	4	10,26%
Total	137		49	

+: presente, - : ausente, n: numero de animais, %: porcentagem

Observou-se um número maior de animais positivos para FHV-1 no grupo B ao se comparar com o grupo A ($p= 0,0002$) e no grupo C em relação ao grupo A ($p= 0,0010$).

A distribuição dos sintomas clínicos observados, nos três grupos em que o FHV-1 foi detectado está representada no gráfico 6.

Gráfico 6 - Distribuição da intensidade de sinais clínicos nos grupos em que o FHV-1 foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013



A sintomatologia clínica observada para os animais em que o FHV-1 foi detectado, era de 64,41% (38/59) dos gatos para o grau 1, a 2 em 16,95% (10/59), a 3 em 11,86% (7/59) e a 4 em 6,78% (4/59) no grupo A; no grupo B, obteve-se 30,56% (11/36) para o 1, 19,45% (7/36) para o 2, 33,33% (12/36) para o 3 e 16,67% (6/36) para a intensidade de sintoma 4 e por fim no grupo C foi observado a intensidade 1 em 5,71% (2/35) dos gatos, a 2 em 11,43% (4/35), a 3 em 65,71% (23/35) e 17,14% (6/35) para a intensidade de sintomas clínicos 4 (Tabela 22).

Tabela 22 - Frequência absoluta e relativa da intensidade de sintomas clínicos observados nas amostras dos grupos A, B e C, em que o gene 3 do plasmídeo críptico foi detectado - São Paulo - junho 2012 a agosto 2013

Intensidade de Sintomas	A		B		C	
	n	%	n	%	n	%
1	38	64,41%	11	30,56%	2	5,71%
2	10	16,95%	7	19,45%	4	11,43%
3	7	11,86%	12	33,33%	23	65,71%
4	4	6,78%	6	16,67%	6	17,14%
Total	59		36		35	

n: numero de animais, %: porcentagem

Houve diferenças estatísticas apresentadas entre a intensidade dos sintomas observados entre os grupos B e A ($p < 0,001$) e entre os grupos C e A ($p < 0,001$). A mediana da intensidade dos sintomas clínicos observados foi 1 para o grupo A, enquanto que para os grupos B e C foi 3 (sendo que os três grupos variam entre os graus 1 a 4).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou averiguar a ocorrência de *Chlamydophila felis* em gatis através da técnica de PCR, bem como buscou relacionar a presença deste patógeno com a gravidade dos sintomas clínicos apresentados pelos felinos acometidos, além de pesquisar a presença do plasmídeo críptico e se este poderia ser um fator virulência e patogenicidade.

Os gatis participantes do estudo foram escolhidos por serem abrigos, com alta densidade populacional, acomodando animais de origem desconhecida, recolhido de vias públicas, possibilitando deste modo, amostrar felinos com a provável maior freqüência da infecção do trato respiratório dos felinos (BANNASCH; FOLEY, 2005; DINNAGE et al., 2009).

Neste estudo, obteve-se freqüência de 18,82% (35/186) para *Chlamydophila felis*, do total de amostras analisadas; tal freqüência não apresenta diferença estatística entre a freqüência relatada por outros grupos de pesquisa como o de Holst et al. (2006) que demonstraram a prevalência de 11% (23/214) de *Chlamydophila felis*, contudo as amostras dos felinos participantes deste trabalho eram proveniente de clínicas/hospitais particulares na Suécia; bem como Sykes et al. (1999), ao demonstrarem prevalência de 14,3% (66/462) de *Chlamydophila felis*, em amostras obtidas de clínicas/hospitais particulares na Austrália. Em contrapartida, a ocorrência do presente trabalho ao se comparar com o único outro estudo brasileiro sobre clamidiose felina (SEKI, 2008), que obteve freqüência de 6% (9/151) para *C. felis*, a partir de amostras de clínicas/hospitais particulares como abrigos, demonstrou-se maior ($p=0,0019$).

Todavia, no 2º gatil estudado a detecção de *Chlamydophila felis* foi de 58,06% (18/31), essa ocorrência é elevada quando comparada ao próprio estudo, bem como aos estudos relatados anteriormente ($p<0,001$ para todos os estudos comparados).

Alguns autores (DINNAGE et al., 2009; GRUFFYDD-JONES et al., 2009) observaram uma maior predisposição dos filhotes à infecção por *Chlamydophila felis*. Entretanto, o gatil cujo ocorrência de *C. felis* foi a maior, apresentou um número amostrado de filhotes (com idade inferior a 1 ano), menor que a do 1º gatil ($p=0,0062$) e do 4º gatil ($p=0,0039$). No 3º gatil, os animais eram todos adultos e a *C. felis* não foi detectada. Ao considerar esses dados podemos referir que para as

populações estudadas, a idade não foi um fator determinante no desenvolvimento dos sintomas clínicos de *C. felis*.

Não há relatos em literatura que correlacione gênero com frequência de acometimento por *C. felis*, no presente estudo as populações de machos e fêmeas analisadas foi equivalente, sendo discretamente maior somente no 4º gatil.

A maioria dos felinos participantes deste projeto apresentava algum sintoma clínico de ITRS descrito em literatura, ou seja: conjuntivite, espirros, febre transitória, inapetência transitória, moderada perda de peso, moderada descarga nasal, descarga vaginal, claudicação, peritonite e/ou gastrite (SYKES, 2005). Deste modo optou-se pelo estabelecimento de uma escala qualitativa dos sintomas clínicos mais relevantes à ITRS, graduando deste modo os felinos de 1 a 4 (do menos para o mais grave) no momento da coleta. Houve diferenças estatísticas apresentadas entre a intensidade dos sintomas do 2º e o 1º gatil ($p < 0,001$), entre 2º e o 3º gatil ($p < 0,001$), entre 3º e o 4º gatil ($p < 0,001$) e entre 1º e o 4º gatil ($p < 0,001$). Os felinos sintomatológicos do 1º e do 3º gatil apresentaram mediana de escore 1 para a intensidade dos sintomas clínicos, enquanto que para o 2º e o 4º gatil a mediana foi de 3, deste modo, os piores casos clínicos observados encontravam-se nestes dois últimos gatis citados.

Ao analisar a ocorrência de *C. felis* por gatil e associá-la com a intensidade dos sintomas clínicos, o presente trabalho concorda com a afirmação de Longbottom et al. (2003), que apesar da *C. felis*, não ser o agente mais prevalente da ITRS, em todos os casos clínicos graves este agente estava associado. Deste modo, nenhum dos gatis participantes deste estudo, detectou a *C. felis* em amostra cujo felino fosse classificado com o grau 1 (mais ameno) de sintomas clínicos. No 3º gatil não houve a detecção deste patógeno (todos os animais foram classificados como 1). Nos demais gatis, o escore da mediana dos sintomas clínicos nos animais que apresentaram a *C. felis* foi de 3,5 para o 1º gatil, 3 para o 2º gatil e 4 para o 4º gatil. Não houve diferenças estatísticas entre a mediana da intensidade dos sintomas apresentados por esses três gatis em que a *C. felis* foi detectada, evidenciando assim, que neste estudo, a *C. felis* foi detectada somente em animais sintomatológicos e que estes apresentavam-se como os casos clínicos mais graves.

Além de verificar a ocorrência da *C. felis* nos gatis participantes e a sua correlação clínica, o presente estudo verificou a ocorrência do plasmídeo críptico nas amostras em que a *C. felis* foi detectada, a ocorrência foi mensurada em três

diferentes genes do plasmídeo críptico, visando deste modo, minimizar a possibilidade de falsos negativos em decorrência de possíveis mutação gênica.

Apesar do plasmídeo críptico ser altamente conservado (HARLEY et al., 2010) e haver sugestões do seu envolvimento na virulência e patogenicidade clamidial (O'CONNELL et al., 2007; CARLSON et al., 2008), no presente estudo não averigou-se significância estatística de tal envolvimento, tanto pelas frequências obtidas dos genes, bem como pela intensidade dos sintomas clínicos nos animais acometidos.

Na busca por fatores que pudessem favorecer o desenvolvimento dos sintomas clínicos da ITRS nos felinos acometidos destes abrigos e por ser a *Chlamydomphila felis* um agente oportunista (HARBOUR et al., 1991; CAI et al., 2002), foi investigada a ocorrência de FIV e FeLV nestes gatis, por debilitarem a função do sistema imunológico, favorecendo assim, afecções secundárias (GREGGS et al., 2011; ERCIVAS et al., 2006). Relata-se que o grupo de risco para FIV e FeLV são populações de animais de rua e/ou abrigos (MARUYAMA et al., 2003; DUNHAM; GRAHAM, 2008). Contudo, a ocorrência observada da FeLV nas amostras dos animais analisados foi baixa, não havendo correlação entre os sintomas clínicos e a presença do vírus. Do mesmo modo, a FIV somente foi detectada em dois gatis, e apesar da diferença significativa entre gatis (1º e 3º gatis, com $p=0,0001$), no gatil cujo número de animais positivos para FIV era maior não foi detectado nenhum animal com *C. felis* e todos os felinos apresentavam intensidade de sintomas clínicos grau 1, logo não houve correlação entre a presença deste vírus e sintomatologia clínica.

O herpesvírus felino tipo1 (FHV-1), foi também pesquisado por ser um dos mais prevalentes patógenos associados a ITRS. A frequência foi elevada em todos os gatis analisados, observou-se um número maior de animais positivos para FHV-1 no 2º gatil ao se comparar com o 1º. Gatil ($p=0,0020$) e no 4º gatil em relação ao 1º gatil ($p=0,0010$). Diferentemente da *C. felis*, o FHV-1 foi encontrado em todas as gradações de sintomas clínicos e em todos os gatis, não havendo deste modo associação entre piora do quadro clínico a presença do mesmo, inclusive foi detectado, no 1º gatil, o FHV-1 em amostras de felinos assintomáticos.

As condições sanitárias em que os felinos foram abrigados nos quatro gatis estudados eram distintas, variando de um gatil adequado a albergar grandes populações (CCZ SP) até um gatil sem a menor condição (4º gatil). Visando evidenciar essas diferenças, foi feito um reagrupamento baseado nas condições

oferecidas aos animais, deste modo o 2º e 3º gatis foram agrupados e renomeados como grupo B, o CCZ SP tornou-se grupo A e por fim o 4º gatil ficou denominado como grupo C.

Um dos enfoques sugeridos por essa nova organização dos grupos foi o fato da provável transmissão de *C. felis* ocorrer por meio de contato próximo com outros gatos infectados e seus aerossóis e por meio de fômite (HALÁNOVÁ et al., 2010), logo se espera que um gatil com baixa sanidade encontre-se uma maior ocorrência dos patógenos infecto-contagiosos, visto que para ocorrer a transmissão é necessário o intenso contato com o animal infectado (GRUFFYYDD-JONES et al., 2009). Este aspecto foi comprovado ao verificar uma maior ocorrência de *C. felis* entre o grupo B ao comparar-se com o grupo A ($p < 0,0001$), bem como o grupo C detectou um maior número de animais com *C. felis* em comparação ao grupo A ($p = 0,0165$). Bem como, o FHV-1 foi observado em maior frequência no grupo B ao se comparar com o grupo A ($p = 0,0002$) e no grupo C em relação ao grupo A ($p = 0,0010$). Já para o plasmídeo críptico não houve diferenças estatísticas entre as frequências encontradas nos três grupos.

Apesar desses dados, surgiu o questionamento do porque o abrigo de pior condição sanitária (grupo C) não apresentar diferença estatística entre o grupo dos gatis de manejo intermediário (grupo B). Dentre os pontos abordados para o esclarecimento deste questionamento temos: 1- a influência da interação dos animais entre os gatis, já que o contato direto entre os animais portadores favorece a transmissão dos agentes infecto-contagiosos. Abordando essa questão e acompanhando os animais, verificou-se que os gatos do grupo B disputavam muito mais o território e brigavam muito mais do que os animais do grupo C, logo essa via de pensamento não seria a mais provável como resolução da questão; 2- A concentração do patógeno oscilar nas diferentes regiões da cidade, deste modo, o gatos do grupo B estariam mais expostos do que os animais do grupo C. Infelizmente essa suposição era inviável de ser avaliada visto que para a mesma, deveria ser feito um grande estudo sobre a prevalência da *C. felis* em todo o estado de São Paulo, bem como a distinção entre as cepas encontradas e possíveis fatores de virulência. 3- O gatil C por apresentar alta mortalidade (ao menos 3 óbitos por semana), oferecia um ambiente muito desafiador aos felinos, e os animais portadores vinham tão rapidamente a óbito, que estes não eram fontes de infecção por longos períodos e não possibilitavam uma grande propagação do agente.

Além da ocorrência atentou-se para a correlação entre presença de *C. felis* com a intensidade do sintoma clínico apresentado pelos animais. Apesar de não ser observada diferença estatística entre a intensidade sintomatológica dos três grupos, o grupo em que foi observado o pior manejo sanitário, demonstrou o escore de mediana mais grave (4).

O acompanhamento de dois felinos de idade similar e apresentando a mesma gravidade de sintomas clínicos, chamou a atenção pelo curso de evolução e resolução do quadro. O animal que estava em um gatil do grupo B, rapidamente teve seu curso agravado e em 15 dias veio a óbito, o proprietário não conseguiu isolar esse animal, nem oferecer o tratamento intensivo que este animal necessitava; em contrapartida, o outro animal que estava no gatil do grupo C foi transferido para o gatil do grupo A, recebendo cuidados veterinários diários e intensivos; com dedicação e adequado suporte medicamentoso, o animal recuperou-se, tendo por seqüela somente a perda da visão de um dos olhos. Obviamente pode-se discutir a questão da virulência e também que não foi demonstrado se as cepas que acometeram os dois animais eram a mesma, contudo, a importância das condições em que os animais eram abrigados e a assistência médica que era oferecida devem ser enfatizadas.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, verificou-se a ocorrência de 18,82% de *Chalmydophila felis* nos quatro gatis. Todos os animais em que *C. felis* foi detectada apresentavam sintomas clínicos da ITRS e a intensidade dos sintomas apresentados concentrava-se entre os graus 3 e 4, evidenciando que apesar da *C. felis* não ser encontrada nos animais assintomáticos contactantes como em nem todos os gatos em que o herpesvírus felino do tipo 1 foi detectado, quando esta bactéria está associada aos quadros sintomáticos de ITRS, estes apresentam-se nos casos de maior gravidade, de tal modo que em alguns casos há perda da visão e óbito. Confirmou-se neste estudo, que *C. felis* não se encontra isolada nos casos clínicos de ITRS, sendo que o FHV-1 foi detectado em todas as amostras positivas de *C. felis*.

Observou-se neste estudo, que apesar dos vírus da FIV e FeLV serem encontrados frequentemente em população de abrigos e estes causarem imunocomprometimento dos animais infectados e favorecerem infecções secundárias e oportunistas, a frequência observada destes vírus não foi representativa nos grupos estudados, não estando portanto correlacionado com a gravidade da intensidade sintomatológica demonstrada.

Apesar da frequência média encontrada no grupo todo estudado ser próxima a frequência descrita em literatura, um dos gatis destacou-se por apresentar uma elevada ocorrência de 58% dos animais com *C. felis*. A diferença entre as frequências encontradas foi associada com a rotina e o manejo sanitário dos abrigos em que esses animais estavam alojados. No gatil em que os animais clinicamente doentes eram isolados, ambientados em recinto frequentemente limpo e arejado, além de ser fornecida proteção contra frio e vento, recebiam adequada nutrição e tratamento médico veterinário, e após liberação destes animais havia a correta higienização das gaiolas ocupadas, esses animais recuperavam-se mais rapidamente, com poucos relatos de perda de visão ou óbito, apesar da continuada entrada de animais provenientes de vias públicas ou de outros gatis sem controle de doenças infecto-contagiosas, a frequência encontrada foi de 7,41%. Ainda focando em manejo, no outro gatil em que as condições sanitárias eram muito próximas ao de gatil cuja ocorrência de *C. felis* foi muito elevada, não detectou nenhum animal

com *C. felis*, contudo todos os gatos deste grupo apresentavam os sintomas mais discretos da ITRS (grau 1).

O gatil em que as condições sanitárias eram as piores, apresentando um ambiente completamente inapropriado para a manutenção dos felinos, seja por falta de higiene, bem como de instalações mofadas e sem ventilação adequada além da desnutrição dos felinos, não foi o que demonstrou maior ocorrência de *C. felis* (23,08%), neste gatil a situação era tão crítica e os óbitos tão frequentes que se acredita não ter encontrado uma frequência maior desta bactéria pois os animais portadores não sobreviviam tempo suficiente para disseminar o agente.

Além da *C. felis*, o estudo verificou a ocorrência do plasmídeo críptico nas amostras em que a bactéria foi detectada, contudo não foi associada correlação entre virulência e intensidade dos sintomas clínicos observados.

Deste modo, o presente estudo demonstra que a presença da *Chlamydophila felis* é frequentemente encontrada em gatis de super população e em abrigos e que além da presença do agente e da necessidade de investigação de fatores de patogenicidade e virulência, o ambiente em que os animais acometidos vivem está diretamente associado com a propagação do patógeno bem como com a gravidade dos casos clínicos, logo deve-se levar em conta não somente o planejamento da adequada terapêutica nestes casos como as alterações em instalações e manejo para um controle desta importante doença infecto-contagiosa.

Levando em conta a importância em termos de ocorrência, além da morbidade e mortalidade evidenciadas, são necessários outros estudos em gatis para que se possa compreender melhor a patogenicidade da *Chlamydophila felis* e sua associação como afecção em felinos que vivem em condições de elevada densidade populacional.

REFERÊNCIAS

- AZUMA, Y.; HIRAKAWA, H.; YAMASHITA, A.; CAI, Y.; RAHMAN, M. A.; SUZUKI, H.; MITAKU, S.; TOH, H.; GOTO, S.; MURUKAMI, T.; SUGI, K.; HAYASHI, H.; FUKUSHI, H.; HATORI, M.; KUHARA, S.; SHIRAI, M. Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydophila felis*. **DNA Research**, v. 13, n. 1, p. 15-23, 2006.
- BAKER, J. A. A Virus Obtained from a Pneumonia of Cats and Its Possible Relation to the Cause of Atypical Pneumonia in Man. **Science**, v. 96, n. 2499, p. 475-476, 1942.
- BANNASCH, M. J.; FOLEY, J. E. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 7, n. 2. p. 109-119, 2005.
- BORETTI, F. S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. FeLV infection in the cat: clinically relevant aspects. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 153, n. 11, p. 501-504, 2011.
- CAI, Y.; FUKUSHI, H.; KOYASU, S.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 3, p. 215-219, 2002.
- CARLSON J. H.; WHITMIRE, W. M.; CRANE, D. D.; WICKE, L.; VIRTANEVA, K.; STURDEVANT, D. E.; KUPKO, J. J. 3rd; PORCELLA, S. F.; MARTINEZ-ORENGO, N.; HEINZEN, R. A.; KARI, L.; CALDWELL, H. D. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2273-2283, 2008.
- DAY, M. J.; HORZINKE, M. C.; SCHULTZ, R. D. Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 528, p. 41, 2007.
- DICKIE, C. W.; SNIFF, E. S. Chlamydia infection associated with peritonitis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 176, n. 11, p. 1256-1259, 1980.
- DINNAGE, J. D.; SCARLETT, J. M.; RICHARDS, J. R. Descriptive epidemiology of feline upper respiratory tract disease in an animal shelter. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 10. p. 816-825, 2009.
- DUNHAM, S. P.; Graham, E. Retroviral infections of small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, p. 879-901, 2008.

ENTRICAN, G.; WATTEGEDERA, S.; WHEELHOUSE, N.; ALLAN, A.; ROCCHI, M. Immunological paradigms and the pathogenesis of ovine chlamydial abortion. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 4, p. 287-294, 2010.

ERCIVAS, K.; ORBAK, R.; KAVRUT, F.; KAYA, H. The changes in T lymphocytes subsets following periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 41, n. 3, p. 165-170, 2006.

EVERETT, K. D.; BUSH, R. M.; ANDERSEN, A. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 49, pt 2, p. 415-440, 1999.

GERRIETS, W.; JOY, N.; HUEBNER-GUTHARDT, J.; EULE, J. C. Feline calicivirus: a neglected cause of feline ocular surface infections?. **Veterinary Ophthalmology**, v. 15, n. 3, p. 172-179, 2012.

GREGGS III, W. M.; CLOUSER, C. L.; PATTERSON, S. E.; MANSKY, L. M. Broadening the use of antiretroviral therapy: the case for feline leukemia virus. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 7, p. 115-122, 2011.

GRUFFYDD-JONES, T. J.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. *Chlamydophila felis* infection. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 605-609, 2009.

HALÁNOVÁ, M., SULINOVÁ, Z.; CISLÁKOVÁ, L.; TRBOLOVÁ, A.; PÁLENÍK, L.; WEISSOVÁ, T.; HALÁN, M.; KALINOVÁ, Z. *Chlamydophila felis* in Cats - Are the Stray Cats Dangerous Source of Infection?. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 7, p. 519-522, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARBOUR, D. A.; HOWARD, P. E.; GASKELL, R. M. Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. **Veterinary Records**, v. 128, n. 4, p. 77-80, 1991.

HARLEY, R.; DAY, S.; DI ROCCO, C.; HELPS, C. The *Chlamydophila felis* plasmid is highly conserved. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1-2, p. 172-174, 2010.

HELPS, C.; REEVES, N.; TASKER, S.; HARBOUR, D. Use of real-time quantitative PCR to detect *Chlamydophila felis* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2675-2676, 2001.

HOLST, B. S.; ENGLUND, L.; PALACIOS, S.; RENSTRÖM, L.; BERNDTSSON, L. T. Prevalence of antibodies against feline coronavirus and *Chlamydophila felis* in Swedish cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 3, p. 207-211, 2006.

LONGBOTTOM, D.; COULTER, L. J. Animal chlamydiosis and zoonotic implications. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 217-244, 2003.

LUTZ, H.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, n. 7, p. 565-574, 2009

LUSHER, M.; STOREY, C. C.; RICHMOND, S. J. Plasmid diversity within the genus *Chlamydia*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 5, p. 1145-1151, 1989.

MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; NAKAO, R.; TANAKA, S.; SAKAI, T.; XUAN, X.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 2, p. 147-153, 2003.

McDONALD, M.; WILLETT, B. J.; JARRET, O.; ADDIE, D. D. A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats. **Veterinary Records**, v. 143, n. 4, p. 97-101, 1998.

MOCHIZUKI, M.; KAWAKAMI, K.; HASHIMOTO, M.; ISHIDA, T. Recent epidemiological status of feline upper respiratory infections in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 7, p. 801-803, 2000.

MYERS, G. S. A.; MATHEWS, S. A.; EPPINGER, M.; MITCHELL, C.; O'BRIEN, K. K.; WHITE, O. R.; BENAHMED, F.; BRUNHAM, R. C.; READ, T. D.; RAVEL, J.; BAVOIL, P. M.; TIMMS, P. Evidence that human *Chlamydia pneumoniae* was zoonotically acquired. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 7225-7233, 2009.

O'CONNELL, C. M.; INGALLS, R. R.; ANDREWS JR., C. W.; SCURLOCK, A. M.; DARVILLE, T. Plasmid-deficient *Chlamydia muridarum* fail to induce immune pathology and protect against oviduct disease. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 4027-4034, 2007.

O'DAIR, H. A.; HOPPER, C. D.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A.; WATERS, L. Clinical aspects of *Chlamydia psittaci* infection in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Veterinary Records**, v. 134, n. 15, p. 365-368, 1994.

PUDIATMOKO, H.; FUKUSHI, H.; OCHIAI, Y.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. Diversity of feline *Chlamydia psittaci* revealed by random amplification of polymorphic DNA. **Veterinary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 73-83, 1997.

RECHE JR., A.; DANIEL, A. G. T.; GERALDO Jr., C. A.; ALBINO, M. V. C.; PELLEGRINO, A.; TEIXEIRA, B. M.; BRANDÃO, P. E. Prevalence of feline calicivirus and herpesvirus type 1 in Maine Coon with chronic gingivitis. In: CONGRESS PROCEEDINGS OF THE ACVIM FORUM, 2009, Montréal, Québec. **Proceedings**. p. 775.

SAYADA, C.; ANDERSEN, A.; RODRIGUEZ, P.; EB, F.; MILON, A.; ELION, J.; DENAMUR, E. Homogeneity of the major outer membrane protein gene of feline *Chlamydia psittaci*. **Research in Veterinary Science**, v. 56, n. 1, p. 116-118, 1994.

SEKI, M. C. ***Chlamydomphila felis* em gatos (*Felis catus*): detecção de antígeno e pesquisa de anticorpos**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus Jaboticabal.

SHELDON TAI, S.H.; NIIKURA, M.; CHENG, H. H.; KRUGER, J. M.; WISE, A. G.; MAES, R. K. Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1 (FHV-1). **Virology**, v 401, n. 2, p. 215-227, 2010.

SYKES, J. E. Feline chlamydiosis. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, n. 2, p. 129-134, 2005.

SYKES, J. E.; ANDERSON, G. A.; STUDDERT, V. P.; BROWNING, G. F. Prevalence of feline *Chlamydia psittaci* and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 153-162, 1999.

SYKES, J. E.; STUDDERT, V. P.; BROWNING, G. F. Comparison of the Polymerase Chain Reaction and Culture for the Detection of Feline *Chlamydia psittaci* in Untreated and Doxycycline-Treated Experimentally Infected Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 146-152, 1999.

THIRY, E.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 547-555, 2009.

THOMAS, N. S.; LUSHER, M.; STOREY, C. C.; CLARKE, I. N. Plasmid diversity in *Chlamydia*. **Microbiology**, v. 143, pt 6, p. 1847-1854, 1997.

YERASIMIDES, T. G. Isolation of a new strain of feline pneumonitis virus from a domestic cat. **The Journal of Infection Diseases**, v. 106, p. 290-296, 1960.