

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE
Chlamydomphila felis EM GATOS DOMÉSTICOS
(*Felis catus*)**

Meire Christina Seki
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Outubro de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MEIRE CHRISTINA SEKI – Filha de Toyoshi Seki e Maria Soledade Barros Seki, nasceu na cidade de São Paulo, São Paulo, no dia 12 de agosto de 1980. É médica veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal – SP, em 2003. Durante o curso de graduação foi bolsista de iniciação científica do PIBIC-CNPq. Em fevereiro de 2004 ingressou no curso de Aprimoramento Profissional (residência) em Medicina Veterinária na área de Patologia Clínica Veterinária, no Hospital Veterinário “Governador Naudó Latel” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Universidade Estadual Paulista (UNESP)- Câmpus de Jaboticabal-SP. Em março de 2006, ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia Animal, na FCAV-UNESP, Jaboticabal- SP, sob orientação do Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto, sendo bolsista de mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP, Processo 05/58236-3), obtendo o título de mestre em fevereiro de 2008. Em março de 2008, ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia Animal, na FCAV-UNESP, Jaboticabal- SP, sob orientação do Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto, sendo bolsista de doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP, Processo 07/59892-7). Desde agosto de 2010 é professora colaboradora do curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) – PR.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
III. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.1. Objetivos específicos.....	16
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Animais.....	17
4.2. Colheita de material biológico.....	17
4.3. Produção do antígeno para os testes sorológicos.....	18
4.4. Detecção de anticorpos anti- <i>Chlamydomphila</i>	19
4.4.1. Reação de Imunofluorescência Indireta para <i>Chlamydiaceae</i> através de kit comercial (RIFI COMERCIAL).....	19
4.4.2. Reação de imunofluorescência indireta para antígenos <i>Chlamydiaceae</i> produzidos em ovos embrionados (RIFI OVO).....	22
4.4.2.1. Preparação do Antígeno.....	22
4.4.2.2. Descrição da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	23
4.4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto.....	24
4.4.3.1. Elementos da reação.....	24
4.4.3.1.1. Antígeno.....	24
4.4.3.1.2. Purificação dos Corpos Elementares (CE) de <i>Chlamydomphila</i> <i>abortus</i>	26
4.4.3.1.3. Controle negativo do antígeno.....	27

4.4.3.1.4. Determinação da diluição ótima de uso do antígeno, do controle negativo e dos soros testes.....	27
4.4.3.2. Descrição da reação com concentração e diluente dos soros testes definidos	28
4.4.3.3. Leitura e interpretação dos resultados.....	29
4.4.3.4. Análise estatística dos dados.....	29
4.5. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	29
4.5.1. Extração de DNA.....	29
4.5.2. Amplificação.....	30
4.5.2.1. Gene da ompA do gênero Chlamydiaceae	30
4.5.2.2. Gene da omp2 do gênero Chlamydiaceae	31
4.5.2.3. Gene da MOMP do gênero Chlamydiaceae	31
4.5.2.4. Gene timidina quinase do herpesvírus felino tipo I.....	32
4.5.3. Detecção do produto amplificado.....	32
4.5.4. Enzimas de restrição.....	33
4.6. Sequenciamento.....	34
4.7. Análise das Seqüências.....	34
4.8. Detecção de anticorpos para FIV e de antígeno para FeLV.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Detecção de anticorpos anti-Chlamydomphila.....	36
5.1.1. Correlação entre os testes sorológicos.....	43
5.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	46
5.2.1. Pesquisa de DNA de <i>Chlamydiaceae</i>	46
5.2.2. Pesquisa de DNA de Herpesvirus Felino tipo 1.....	51
5.3. Correlação entre os testes sorológicos (RIFI COMERCIAL, RIFI OVO e ELISA) nas amostras de soros de felinos contendo fragmentos de DNA para <i>Chlamydiaceae</i>	54
5.4. Pesquisa de anticorpos para FIV e de antígeno p 27 para FeLV.....	55

5.5. Coinfecção de <i>Chlamydomphila felis</i> com herpesvirus felino tipo 1, FIV e FeLV.....	58
VI. CONCLUSÕES	60
VII. REFERÊNCIAS	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Número de amostras de soro e de suabes de conjuntivas colhidas dos felinos domésticos estudado e o local de procedência.....	19
Tabela 2:	Resultados dos títulos dos soros de felinos domésticos (n=201) submetidos à detecção de anticorpos anti- <i>Chlamydophila</i> spp, pelas Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI COMERCIAL e RIFI OVO).....	41
Tabela 3:	Resultados dos testes sorológicos (RIFIs e ELISA) dos felinos domésticos, conforme o local de origem.....	42
Tabela 4	Resultados obtidos nos exames sorológicos nas amostras de soro de felinos domésticos.....	44
Tabela 5	Resultado da análise comparativa das RIFI para <i>Chlamydiaceae</i> (RIFI COMERCIAL), RIFI OVO e ELISA indireto (ELISA).....	44
Tabela 6	Resultados de títulos de anticorpos anti- <i>Chlamydophila</i> spp, obtidos pela RIFI COMERCIAL, pela RIFI OVO e ELISA Indireto nas amostras de soros de felinos domésticos positivos pela PCR.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Reação de Imunofluorescência Indireta para *Chlamydiaceae* com kit comercial (RIFI COMERCIAL). A: Reação negativa, Aumento de 400X. B: Reação positiva, aumento de 400X.....21
- Figura 2 Reação de imunofluorescência indireta para antígeno de *Chlamydiaceae* produzidas em ovos embrionados (RIFI OVO) A: Reação positiva. Objetiva de imersão. B: Reação negativa. Objetiva de imersão.....25
- Figura 3: Resultados das pesquisas de anticorpos anti-*Chlamydomphila* realizadas nas 201 amostras de soro de felinos domésticos submetidas às RIFI (RIFI COMERCIAL e RIFI OVO) e ao ELISA Indireto (ELISA).....38
- Figura 4: Número de felinos domésticos reagentes nos testes sorológicos RIFI COMERCIAL (n=162), RIFI OVO (n= 111) e ELISA Indireto (n= 69), conforme o local de origem.....39
- Figura 5: Resultados da PCR dos suabes de conjuntiva de felinos domésticos (n= 235) submetidos à detecção de fragmentos de DNA para os genes MOMP, OmpA e Omp2.....47
- Figura 6: Resultados da eletroforese em gel de agarose (1%), realizados com os produtos da *Chlamydomphila* sp para o gene MOMP, provenientes de suabe de conjuntiva de felinos domésticos. Da esquerda para direita: Marcador de Pares de Base (100p.b.); controle negativo (1), amostra negativa (2), amostra positiva (3), controle positivo (4).....48
- Figura 7 Resultado da digestão dos produtos amplificados segundo protocolo de HARTLEY et al. (2001) com enzima Alu I, em gel de agarose a 2%. Ordem das canaletas no gel: 1- Marcador Phi X 174/ Hae II; 2- Cepa positiva para *Chlamydomphila* sp sem digestão enzimática (Fragmento de 603 pb); 3- Controle positivo da PCR (cepa vacinal de *Chlamydomphila felis*), (Fragmentos de 224, 142, 93, 85,47 e 46 pb); 4- Cepa de *Chlamydomphila abortus*, utilizada como fonte de antígeno para os exames sorológicos (Fragmentos de 352 e 235 pb); 5- Cepa de pombo positivo para *Chlamydomphila psittaci* (Fragmentos de 227, 220 e 140); 6- Amostra clínica de pombo inconclusiva, 7- Controle negativo da reação; 8 - Cepa de pombo positivo para *Chlamydomphila psittaci*.....49

- Figura 8: Resultado da eletroforese em gel de agarose (1%), realizado com os produtos da PCR para Hesperivirus Felino tipo 1, provenientes de suabe de conjuntiva de gatos domésticos. Da esquerda para direita: Marcador de pares de base (100p.b.); amostra positiva (1 e 3), controle positivo (2) e controle negativo (4).....53
- Figura 9: Resultados da detecção de anticorpos para FIV e de antígeno p27 para FeLV realizadas em soro de gatos domésticos (n= 150).....56

LISTA DE ABREVIações

ATP- adenosina trifosfato
BGM – buffalo green monkey
BSA – soro albumina bovina
CE- corpo elementar
CECF- centro de esterilização de caninos e felinos
CR- corpo reticular
CRFK – crabdell feline kidney
CVF- calicivírus felino
DNA – ácido desoxirribonucleico
DO- densidade óptica
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – ensaio imunoenzimático
FCAV- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária
FeLV – vírus da leucemia felina
FITC- isotiocianato de fluoresceína
FIV- vírus da imunodeficiência felina
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HVF-1 – herpesvírus felino tipo 1
IgG – imunoglobulina tipo G
IgG 1 – imunoglobulina tipo G1
IgG 2 - imunoglobulina tipo G2
LPS- lipopolissacarídeo
MIF- micro imunofluorescência
MOMP – proteína de membrana
Omp 2 – proteína de membrana tipo 2
Omp A- proteína de membrana tipo A
OPD – ortofenilenodiamino
pb – pares de base
PBS – 0,01 M PO₄⁻, 0,14 M NaCl, pH 7,4

PBS-T- PBS contendo 0,05% de tween 20

PCR – reação em cadeia pela polimerase

RFC- reação de fixação de complemento

RIFI – reação de imunofluorescência indireta

RIFI COMERCIAL – reação de imunofluorescência indireta para Chlamydiaceae com kit comercial

RIFI OVO - reação de imunofluorescência indireta para Chlamydiaceae produzidos em ovos embrionados

RNA – ácido ribonucleico

SDS - dodecil sulfato de sódio

SPF – specific pathogen free – livre de patógenos

TBE- Tampão tris-borato-EDTA

UNESP- Universidade Estadual Paulista

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Chlamydomphila felis* EM FELINOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*)

RESUMO: O presente trabalho teve o objetivo de realizar o diagnóstico sorológico de *Chlamydomphila felis* utilizando duas técnicas sorológicas: imunofluorescência indireta, nas modalidades de kit comercial (RIFI COMERCIAL), e ensaio *in house* (RIFI OVO), e ELISA, sendo estes testes de RIFI OVO e ELISA preparados com antígeno de *Chlamydomphila abortus* produzidos em ovos embrionados SPF de galinha. Adicionalmente, objetivou-se a realização do diagnóstico molecular de *C. felis* e estabelecimento do diagnóstico diferencial da clamidiose felina em relação à infecção pelo herpesvírus felino tipo 1 (HVF-1), vírus da Imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV). Anticorpos anti-*Chlamydiaceae* foram detectados pela RIFI COMERCIAL em 81% dos animais (162/201), pela RIFI OVO em 55% (111/201) e pelo ELISA em 31% (69/201) das amostras. Verificou-se que o antígeno de *Chlamydomphila abortus* inoculado em ovos embrionados não é indicado para utilização em técnicas imunológicas, devido à baixa sensibilidade, especificidade e correlação entre os testes estudados. Das amostras de suabes de conjuntiva submetidas à PCR, em 5,1% (12/235) foi amplificado o gene MOMP de *C. felis* e três amostras (1,3%) foi detectado DNA de herpesvírus. Houve coinfeção para os dois agentes em 0,4% (1/235) das amostras analisadas. Ademais, 150 amostras de soro foram avaliadas, sendo anticorpos anti-FIV detectados em 8 amostras (5,3%) e o antígeno de FeLV detectado em 11 amostras (7,3%). Não houve coinfeção por *C. felis* e HVF-1 com os vírus imunossupressores, demonstrando não haver correlação entre a infecção de FIV e/ou FeLV e o complexo respiratório felino.

Palavras-Chave: clamidiose, complexo respiratório felino, reação de Imunofluorescência Indireta, ELISA teste, reação em cadeia pela polimerase.

**Serological and molecular diagnosis of domestic *Chlamydomphila felis* in cats
(*Felis catus*)**

ABSTRACT: This study aimed at performing the serological diagnosis of *Chlamydomphila felis* by three serological approaches, using a commercial kit for Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT COMMERCIAL), and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT EGG) and ELISA prepared with *Chlamydomphila abortus* with antigen produced in SPF embryonated chicken eggs. Additionally, our study aimed at performing the molecular diagnosis of *C. felis* and establishing the differential diagnosis of feline chlamydiosis in relation to Feline Herpesvirus type-1 (HV-1) in cat conjunctival swab samples, as well as investigate the presence of antibodies to Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and presence of Feline Leukemia Virus (FeLV) antigen in cat serum samples. IgG antibodies to *Chlamydomphila* sp. were detected by in 81% (162/201), 55% (111/201), and 31% (69/201) of serum samples, by IFA *Chlamydiaceae* COMMERCIAL, IFA EGG and ELISA, respectively. The use of *Chlamydomphila* spp antigen produced in embryonated eggs is not indicated for serological tests due to its low sensitivity, specificity and correlation with other serological tests. Twelve (5.1%) out of 235 conjunctival swab samples were positive to *C. felis*- MOMP gene PCR; three samples (1.3%) were positive to herpesvirus PCR. Co-infection for both agents (*C. felis* and Herpesvirus) was found in 1 cat (0.4%). Furthermore, 150 serum samples were evaluated by commercial ELISA kit-Snap® Combo FeLV-FIV. IgG antibodies to FIV were detected in 8 samples (5.3%), and FeLV antigen was detected in 11 samples (7.3%). The presence of co-infection for *C. felis* and HV-1 with immunosuppressive viruses was not observed, showing no correlation between FIV infection and / or FeLV and upper respiratory tract disease.

Keywords: Chlamydiosis, upper respiratory tract disease, Indirect Immunofluorescence, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction.

I. INTRODUÇÃO

A clamidiose ou pneumonite felina é uma doença infecto-contagiosa do trato respiratório superior (complexo respiratório felino), responsável por conjuntivite variando de aguda à crônica em felinos domésticos. A comprovação da suspeita clínica desta enfermidade, tendo em vista que outros microrganismos, entre os quais, *Mycoplasma*, calicivírus e o herpesvírus felino tipo 1 (HVF-1), também apresentam sinais clínicos semelhantes (conjuntivite; secreção ocular e nasal; espirros), necessita maior investigação. O diagnóstico laboratorial, importante para o tratamento efetivo e o controle da clamidiose é realizado por meio do isolamento e identificação do agente causal, ou indiretamente por meio do sorodiagnóstico.

Por se tratar de assunto pouco estudado em nosso país, foi delineado o presente estudo com o propósito de pesquisar DNA de *Chlamydomphila felis* na conjuntiva de felinos domésticos naturalmente infectados, assim como avaliar o estado imune humoral de felinos frente a essa enfermidade. Para atingir tais objetivos, foi necessário estabelecer as condições ideais de uso das técnicas moleculares (PCR), para detecção genômica de *Chlamydomphila felis*, e de métodos imunológicos (reação imunoenzimática - ELISA e de imunofluorescência - RIFI), para detecção da resposta imune humoral. Adicionalmente, por entender que o maior entrave na rotina clínica é estabelecer o diagnóstico diferencial da clamidiose felina em relação aos demais agentes responsáveis por conjuntivite (complexo respiratório felino), foi também realizada a pesquisa de fragmentos de DNA para o HVF-1, assim como a pesquisa de agentes imunossupressores virais da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV), complementado com o sequenciamento dos produtos amplificados, com vistas a se obter informações sobre a similaridade do material genético com a amostra de *Chlamydomphila felis* e a estirpe de HVF-1.

II- REVISÃO DE LITERATURA

As publicações científicas que trazem algum tipo de informação sobre a clamidiose ou pneumonite felina, particularmente no Brasil, ainda são escassas. Desta forma, justifica-se a necessidade de mais pesquisas sobre o tema. Nossa intenção é revisar e enfatizar apenas aspectos relacionados à temática do presente trabalho, ou seja, o melhor conhecimento a situação da doença no país. Antes, porém, por ser assunto pouco estudado em nosso país, julgamos de importância, embora de maneira sintética, fornecer algumas informações sobre o agente, a doença, o hospedeiro e o diagnóstico, na esperança de que tal medida possa contribuir para um melhor entendimento do assunto, motivo da presente investigação.

A *Chlamydomphila felis* está associada às bactérias gram negativas, pertencente à Ordem *Chlamydiales* e a Família *Chlamydiaceae*. Até 1999, era conhecida como *Chlamydia psittaci* var. *felis* (EVERETT, 2000). São parasitas intracelulares obrigatórios, devido à incapacidade de produzir adenosina trifosfato (ATP) e, apresentam um ciclo de desenvolvimento bifásico característico (LONGBOTTON & COULTER, 2003). Na forma infecciosa, também denominada de corpo elementar (CE), cujo tamanho é de aproximadamente 0,3 µm de diâmetro, o microrganismo é estável no meio ambiente. Após a fixação do CE em receptores específicos da célula do hospedeiro, ocorre a endocitose, ficando este envolvido em um vacúolo dentro da célula infectada. Na fase seguinte, ainda dentro do vacúolo, o CE sofre divisão binária, diferenciando-se em uma nova partícula, denominada de corpo reticular (CR), cujo tamanho varia de 0,5-1,0µm. Os CR resultantes da divisão dão origem às inclusões dentro do citoplasma da célula hospedeira e, posteriormente, novamente diferenciam-se em CE, os quais podem ser eliminados das células hospedeiras, infectando novas células. O ciclo tem a duração de 24-48h (MOULDER, 1991).

A patogenia da clamidiose felina ainda não está totalmente esclarecida. O primeiro relato sobre isolamento do agente etiológico da clamidiose felina ocorreu em 1942, a partir de material proveniente do pulmão de um felino naturalmente infectado (BAKER, 1942). Em decorrência deste fato, a doença foi denominada de pneumonite felina, termo este erroneamente empregado, tendo em vista que o microrganismo raramente causa pneumonia em gatos (BART et al., 2000). Em 1967, CELLO, citado por RAMSEY (2000), relatou conjuntivite em gatos causada por *C. felis*. A partir daí, ficou demonstrado o tropismo deste agente pelas células do epitélio da conjuntiva, causando conjuntivite aguda à crônica (HOOVER et al., 1978).

A bactéria já foi isolada de pulmões, fígado, baço e rins de gatos (DICKIE, 1980; WILLS et al., 1988; MASUBUSHI et al., 2002), não obstante o significado da presença deste microrganismo nestes locais ainda continua obscuro. *C. felis* também tem sido encontrada na mucosa gástrica de gatos, em macrófagos e células de descamação no exsudato peritoneal, além de células intestinais (DICKIE, 1980, HARGIS et al., 1983; GAILLARD et al., 1984), estes são indícios de que o trato gastrointestinal seria um local de infecção persistente em felinos, assim como ocorre em outras espécies de clamídias que parasitam aves e ruminantes (SYKES, 2001).

A transmissão horizontal de *C. felis* de felinos domésticos infectados a gatos susceptíveis, independente da presença de sinais clínicos da doença, ocorre primariamente por meio de contato direto com secreções oculares contaminadas e, indiretamente, pela contaminação de fômites. A transmissão por aerossóis tem sido motivo de controvérsia entre alguns autores. Assim, HOOVER et al. (1978) relataram a ocorrência de infecção experimental em gatos submetidos experimentalmente à nebulização de *C. felis* durante 3 minutos. Entretanto, POVEY (1990) propõe que a transmissão por aerossóis não é um evento comum, uma vez que dificilmente a *C. felis* compromete o trato respiratório superior e, ainda, segundo esse autor, os felinos possuem um pequeno volume de secreção expiratória, o que limita a produção e projeção de gotículas contendo CE. A transmissão venérea em felinos ainda não foi comprovada, contudo, sabe-se que

a transmissão para neonatos ocorre na superfície da mucosa do trato reprodutivo e no ducto nasolacrimal durante o parto (TERWEE et al., 1998).

Os sinais clínicos da doença variam conforme a idade do animal, imunocompetência, modo de exposição ao agente (experimental ou natural), tecido e volume inoculado (RAMSEY, 2000). Em geral, na infecção natural os sinais clínicos da doença são observados entre 5 a 14 dias pós-exposição. Durante a fase aguda da doença, observa-se secreção ocular serosa profusa, com presença de quemose, hiperemia da mucosa conjuntival e blefarospasmos. Inicialmente, um dos olhos é atingido e, após 5 a 21 dias, o outro olho também apresenta os mesmos sinais. A hipertermia pode ou não ocorrer, bem como coinfeções na conjuntiva, resultando em descarga ocular purulenta (WILLS et al., 1984).

Secreção nasal e espirros têm sido observados em alguns felinos, sendo tal ocorrência mais comumente observada em animais jovens (cinco semanas a nove meses de idade). Na maioria dos felinos naturalmente infectados, a doença é auto limitante. Infecções brandas em filhotes regridem espontaneamente após duas a seis semanas e em menos de duas semanas em gatos mais velhos (RAMSEY, 2000). Os sinais clínicos melhoram após poucas semanas, contudo a conjuntivite pode persistir por meses. Em alguns casos, a conjuntivite melhora 60 dias pós-infecção, mas os gatos continuam a abrigar o agente (O'DAIR et al., 1994). Anticorpos maternos contra *C. felis* foram detectados no colostro provenientes de gatas expostas a uma infecção prévia, os quais persistiram e protegeram os filhotes durante nove a 12 semanas de vida (WILLS et al., 1984). Por outro lado, *C. felis* também foi isolada de felinos neonatais com conjuntivite, embora muitos dos filhotes aparentemente estivessem protegidos pelos anticorpos maternos (SYKES, 2005).

Acredita-se que a *C. felis* também possa estar envolvida em casos de abortos, mortalidade neonatal e infertilidade em gatos, embora tal suspeita ainda não tenha sido definitivamente confirmada (BRANDT et al., 1986). Todavia, POINTON et al. (1991) demonstraram que a infertilidade e abortos estão igualmente distribuídos em gatis com ou sem infecção por *C. felis*.

Consoante revelam SYKES et al. (1999a), a infecção de tecido placentário por *C. felis* já foi confirmada por meio da PCR em uma gata experimentalmente infectada durante o período de gestação. Embora tenha tido parto normal, a gata eliminou *C. felis*, via vaginal, do momento do parto até 12 dias pós-parto, apesar de no exame histopatológico, não ter apresentado placentite.

A habilidade da *Chlamydophila* em causar doenças do trato reprodutivo também depende do estágio de prenhez em que ocorre a infecção, além de coinfeção com outros microrganismos, imunossupressão concomitante, grau de infecção e a amostra envolvida (SYKES, 2005).

O potencial zoonótico da *C. felis* ainda é controverso e está sendo investigado. Alguns autores atribuem a *C. felis* a etiologia de casos de pneumonia atípica (COTTON & PARTRIDGE, 1998), de hepatoesplenomegalia (GRIFFITHS et al., 1978), de glomerulonefrite e de endocardite (REGAN et al., 1979) em humanos. Entretanto, em todos os casos assinalados, as associações foram baseadas em resultados de provas sorológicas gênero-específicas e no contato destes pacientes com gatos, contudo não foi realizado um teste laboratorial de diagnóstico confirmatório da presença do agente nos animais. Por outro lado, HARTLEY et al. (2001) relatam, após a tipificação do DNA, por meio de enzimas de restrição, que uma amostra de clamídia isolada de um homem HIV positivo apresentando sintoma de conjuntivite crônica era idêntica à amostra isolada de um filhote de gato recentemente adquirido por ele.

O diagnóstico precoce de infecção por *C. felis* é importante, pois possibilita um tratamento adequado e previne a disseminação da doença (OHYA et al., 2010). Tal diagnóstico é passível de ser realizado por meio da detecção direta do agente em amostras de tecidos ou em suabes ou por meio da pesquisa de anticorpos anti-clamídia, realizada em amostras de sangue (SACHSE et al., 2009).

O isolamento do agente em cultura de células ou ovos embrionados é o método padrão para o diagnóstico de *Chlamydiaceae*, porém, a necessidade de técnicos experientes e laboratório de biossegurança dificultam a realização do procedimento como técnica de rotina, restringindo este tipo de diagnóstico a

poucos laboratórios (PEELING & BRUNHAM, 1996). Em síntese, o diagnóstico da infecção por clamídia é difícil, pois o isolamento do patógeno requer pelo menos duas semanas para ser concretizado (SACHSE et al., 2009). Usualmente o isolamento da *C. felis* é realizado em cultura de células das linhagens McCoy, HeLa, Vero, L929 e BGM ou em ovos embrionados de galinha de 6 a 7 dias de incubação, a partir de amostras oriundas de conjuntiva, orofaringe, reto, fezes, secreção vaginal ou de tecidos dos animais suspeitos. As monocamadas de células entre o 2º e o 6º dia pós-inoculação e os esfregaços das membranas dos sacos vitelinos dos embriões mortos entre 4º e 12º dias são fixados em metanol e submetidos aos métodos de coloração de Gimenez, Macchiavello ou Stamp para a visualização do agente. Anticorpos monoclonais gênero-específicos, acoplados ao isotiocianato de fluoresceína, são também utilizados para identificar as inclusões intracitoplasmáticas de *Chlamydiaceae* nas células hospedeiras (ANDERSEN, 1998). O procedimento de inoculação em ovos embrionados, por ser demorado, é comumente utilizado para conservação de amostras e produção de antígeno (GRIMES, 1996).

A técnica de PCR vem sendo avaliada na medicina veterinária em comparação às técnicas tradicionais de diagnóstico de *Chlamydiaceae*. Tem como vantagem a capacidade de detectar pequenas quantidades de DNA presente na amostra e não necessitar de organismos viáveis (MCDONALD et al., 1998; SYKES et al., 1999a). Amostras para o isolamento podem ser colhidas do saco conjuntival de gatos, por meio de suabes embebidos com salina. Por se tratar de microrganismo intracelular, é importante obter suabes com quantidade suficiente de células conjuntivais (GRUFFYDD-JONES et al., 2009).

SYKES et al. (1999a) demonstraram que a cultura celular permanece positiva um dia após o início do tratamento com doxiciclina, enquanto na PCR, o DNA do microrganismo continua sendo detectado após cinco dias de tratamento. Segundo estes autores, a técnica de PCR é significativamente mais sensível que a de cultura celular em gatos não tratados (85,7% para PCR versus 72,9% para

cultura) e em gatos com sinais clínicos da doença (89,2% para PCR e 79,2% para cultura).

O diagnóstico molecular das *Chlamydiaceae* é baseado na detecção dos genes 16S, 23S e dos genes codificadores para as proteínas de membrana (ompA, omp2, MOMP) presentes na parede da bactéria (SACHSE et al., 2009). Deve ser considerado que o diagnóstico pela PCR é gênero-específico e não espécie-específica, razão pela qual, se faz necessário o uso de enzimas de restrição (EVERETT et al., 1999; HARTLEY et al., 2001).

Teste de detecção gênero-específico do antígeno clamidial usando ELISA também pode ser utilizado no diagnóstico, apesar de tais procedimentos serem menos sensíveis e confiáveis que a PCR (GRUFFYDD-JONES et al., 2009).

O exame de esfregaços de conjuntiva corados com Giemsa ou Gimenez também pode ser utilizado como método auxiliar no diagnóstico da clamidiose felina; contudo, não é um método seguro, pois depende da experiência do citopatologista. As inclusões intracitoplasmáticas, adjacentes ao núcleo de célula, aparecem coradas (de azul a púrpura); corpos reticulares livres podem ser reconhecidos como manchas bipolares (LAVACH et al., 1977). Os corpos reticular e elementar devem ser diferenciados dos grânulos de melanina, restos nucleares, bactérias ou inclusões induzidas por medicamentos tópicos como a Neosporina (LAVACH et al., 1977; WILLS et al., 1988; VON BOMHARD, 2003).

O sorodiagnóstico é o procedimento mais comumente utilizado para a detecção de anticorpos na rotina das doenças causadas por *Chlamydiaceae*. Entre as provas sorológicas, as mais utilizadas são a reação de fixação do complemento (RFC), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Em felinos não vacinados, a detecção de anticorpos é indicativa de infecção por *C. felis* (GRUFFYDD-JONES et al., 2009).

A RFC é utilizada desde 1930 para o diagnóstico de clamidioses (FUKUSHI et al., 1985; WERTH, 1989; BART et al. 2000). O teste é gênero-específico, ou seja, é bastante específico, porém de baixa sensibilidade; utiliza o lipopolissacarídeo (LPS) como fonte de antígeno, comum a todas as

Chlamydiaceae, sendo empregado para confirmar um diagnóstico presuntivo (MANNION, 1991). É relativamente pouco sensível, particularmente na presença de uma infecção em andamento. Entretanto pode ser útil na detecção de anticorpos tardios (CELLO, 1971).

WILLS et al. (1988) relatam que a RFC não é um teste sorológico confiável, já que alguns autores não têm conseguido detectar anticorpos fixadores de complemento em felinos experimentalmente infectados (CELLO, 1971; SHEWEN et al., 1980). Segundo esses autores, provavelmente ocorra em felinos um fenômeno semelhante ao que ocorre em infecção por clamídia em bovinos, em cuja espécie a resposta de IgG2 é maior que IgG1, particularmente nos casos de infecções locais (PEREZ-MARTINEZ & STORZ, 1986). Como o soro de cobaio fixa melhor IgG1 e não IgG2, a reação pode dar um falso negativo, tornando assim a RFC um método não confiável para a detecção de anticorpos em algumas espécies de animais (SCHMMER et al., 1987), entre elas os felinos.

A RFC, embora específica, é menos sensível do que a RIFI, quando utilizada na pesquisa de anticorpos anti-*Chlamydiaceae* em felinos domésticos, uma vez que em somente 9,4% (10/106) dos soros positivos à RIFI, foram detectados anticorpos fixadores do complemento (SEKI et al., 2010). WILLS et al. (1987), ao estudarem comparativamente os resultados das RFC e RIFI em soros de felinos vacinados e não vacinados, ambos infectados experimentalmente após a imunização, observaram que soros de animais cujos títulos de anticorpos foram ≥ 1024 na RIFI, não apresentaram níveis detectáveis de anticorpos fixadores de complemento.

A RIFI é um método eficiente para detecção de anticorpos séricos em animais infectados. Contudo, face à possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outras bactérias, baixos títulos (≤ 32) na RIFI são considerados negativos. Infecções ativas ou recentes são frequentemente associadas com títulos > 512 . Dessa forma, a sorologia pode ajudar a confirmação de uma infecção endêmica em um grupo, onde a presença de altos títulos de anticorpos sugere que a *Chlamydophila* seja agente etiológico, enquanto baixos títulos

descartam o envolvimento da bactéria (GRUFFYDD-JONES et al., 2009). A utilização de testes sorológicos, por meio de titulação de soro pareada, com intervalos de três semanas, também pode caracterizar o diagnóstico de uma infecção ativa (PEREZ-MARTINEZ & STORZ, 1986).

Em estudo realizado por WILLS et al. (1988), mais de 95% dos felinos positivos para detecção direta da *C. felis* apresentaram títulos séricos superiores a 32, contudo em 7,5% dos animais, nos quais não foi possível a detecção direta do agente, também foram detectados soros com títulos nesses mesmos patamares (32). Na Suécia, pesquisa de anticorpos pela RIFI em felinos, sem sinais clínicos de clamidiose, revelou que a maioria dos animais apresentou títulos de anticorpos inferiores a 128 (HOLST et al., 2006). Embora altos títulos de anticorpos sejam indício de exposição prévia ao agente, não indicam necessariamente que um felino esteja com uma infecção ativa. Consoante revelam MCDONALD et al. (1998) revelam que somente 41% dos gatos soropositivos pela RIFI foram positivos na PCR, reafirmando a importância da detecção direta do agente.

No que diz respeito às técnicas imunoenzimáticas (ELISA), são poucos os estudos sorológicos descritos em que tais métodos são utilizados no diagnóstico indireto da *C. felis*. LANG (1992), utilizando uma amostra de *C. abortus* como fonte de antígeno para ELISA, obteve positividade em 22% dos 132 felinos atendidos em rotina hospitalar. WASMOEN et al. (1992) utilizaram com sucesso um kit imunoenzimático comercial (ELISA) aplicado ao diagnóstico humano de clamídias (*C. trachomatis*), em estudo objetivando verificar a soroconversão em animais vacinados. Um ano após a imunização e o desafio dos animais com *C. felis*, anticorpos ainda foram detectados por este teste. Estudos utilizando proteínas recombinantes como fonte de antígeno no ELISA, revelaram ser possível a diferenciação de felinos vacinados de não vacinados (OHYA et al., 2008, OHYA et al., 2010).

Comparações entre técnicas de ELISA, RFC e RIFI, utilizando-se amostras de soros de ovinos revelaram uma correlação de 50 a 98% entre a RFC e ELISA e de 70,5% a 94,3% entre a RIFI e ELISA (MARKEY et al., 1993; GRIFFITHS et al.,

1996). Os resultados obtidos por esses autores comprovam a possibilidade de utilização de antígeno anti-*Chlamydiaceae*, ou seja, gênero-específico, na realização de provas sorológicas.

Antígeno de *Chlamydomphila psittaci* produzido a partir de ovos embrionados infectados foi utilizado por SALINAS et al. (1993) para detecção de anticorpos anti-clamídia em pombos, pelo método de microimunofluorescência Indireta (MIF). Ao comparar as amostras de soro destes pombos submetidas à MIF e RIFI, RFC e ELISA, observaram que MIF é um eficiente método para diagnóstico sorológico, entretanto o ELISA revelou-se mais sensível embora menos específico.

Trabalhos realizados com amostras de *Chlamydia trachomatis* de origem humana revelaram que a reação de ELISA é mais sensível que a RFC e, ainda, há uma boa correlação entre o ELISA e a RIFI (MAHONY et al., 1983; SAIKKU et al., 1983).

A RIFI é um teste relativamente fácil de ser executado e interpretado, todavia requer o uso de um microscópio equipado para fluorescência. Por outro lado, o ELISA elimina interpretações subjetivas inerentes a RIFI, devido aos valores objetivos da espectrofotometria (PEREZ-MARTINEZ & STORZ, 1986).

Estudos referentes à detecção direta e indireta de *C. felis* em felinos domésticos já foram realizados em vários países. A presença de anticorpos variou de 0 a 40% em estudos realizados pela RFC (STUDDERT & MARTIN, 1970; POVEY & JOHNSON, 1971; STUDDERT et al., 1981; WERTH, 1989) e de 5,3 a 59% pela RIFI (GETHINGS et al., 1987, WILLS et al., 1988, GUNN-MOORE et al., 1995, HOLST et al., 2006). A presença do antígeno foi revelada em 11,5% dos animais estudados após o isolamento em cultura celular (WILLS et al., 1988); 14,1 e 76,92% pelo ELISA direto (GRUFFYDD-JONES et al., 1995; TRÁVNICEK et al., 2002); 18 a 49% pela imunofluorescência direta (POINTON et al., 1991; NASISSE et al., 1993) e 1,1 a 23% pela PCR (MCDONALD et al., 1998; SYKES et al., 1999b, MOCHIZUKI et al., 2000; RAMPAZZO et al., 2003; VON BOMHARD et al., 2003; MARSÍLIO et al., 2004).

A diferenciação entre a *C. felis* e outros agentes causadores de conjuntivite e doença do trato respiratório superior de felinos é de suma importância para confirmação do diagnóstico clínico da doença. Os agentes mais comumente envolvidos no complexo respiratório felino além da *C. felis* são: calicivírus felino (CVF), vírus da rinotraqueíte viral felina ou herpesvírus felino tipo 1 (HVF-1) e *Mycoplasma* sp. A distinção clínica entre *C. felis* e HVF-1 é bem difícil, uma vez que os sinais clínicos são similares e o diagnóstico conclusivo do agente é importante para o tratamento efetivo e a adoção de medidas profiláticas específicas. Portanto, a associação destes agentes com a *C. felis* pode mascarar ou dificultar o diagnóstico clínico (GASKELL & DAWSON, 1990).

Felinos domésticos com infecções concomitantes por CVF e clamidiose felina frequentemente apresentam, além da conjuntivite, ulcerações orais. Os calicivírus são menos virulentos, podendo ou não produzir lesões pulmonares; as estirpes virais mais patogênicas causam pneumonia severa acompanhadas de transtorno do trato respiratório inferior. Uma leve rinite também pode ocorrer (LOVE, 1972; POVEY, 1976; RAMSEY, 2000). Na rinotraqueíte viral felina, causada pelo HVF-1, rinite e traqueíte associados a outros sinais clínicos, principalmente descarga nasal, são mais severas que a pneumonia (LOVE, 1972; POVEY, 1976). Coinfecções com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) prolongam a duração da conjuntivite e o tempo de eliminação da *Chlamydomphila* (O'DAIR et al., 1994).

O HVF-1 é um alfa herpesvírus, com dupla fita de DNA que possui envoltório bilipídico e capsídeo icosaédrico. Têm tropismo pelo epitélio da conjuntiva, da córnea e do trato respiratório superior (NASISSE et al., 1989; STILES, 1995; STILES, 2000). Acomete principalmente filhotes e jovens adultos e estima-se que 80% dos felinos apresentam infecções latentes, característica comum aos membros da família *Herpesviridae* (GASKELL & POVEY, 1977; GASKELL & POVEY, 1979). A transmissão horizontal ocorre por contato direto com secreções nasais e oculares contaminadas. Devido ao efeito citopático do vírus, ocorrem erosão e inflamação dos epitélios (THIRY et al., 2009). Em linhas

gerais, a fase aguda da rinotraqueíte viral felina é caracterizada por conjuntivite, na maioria das vezes bilateral, acompanhada de descarga serosa ou mucopurulenta, assim como, envolvimento do trato respiratório superior acompanhado de descarga nasal, traqueíte, tosse e espirros. Nos casos severos, ocorre ceratite e úlceras de córnea (NASISSE et al., 1989; NASISSE et al., 1992; STILES et al., 1997; STILES, 2000). De distribuição mundial, em muitos felinos a infecção pode ser reativada em situações de estresse e tratamento a base de imunossupressores (corticoides ou quimioterápicos) (THIRY et al., 2009).

O diagnóstico sorológico do HVF-1 é obtido por meio do teste de vírus neutralização, apesar deste teste ser pouco utilizado, uma vez que os títulos de anticorpos são variavelmente baixos após uma infecção primária; títulos mais elevados raramente são observados em felinos com infecções recrudescentes (MAGGS, 2005). A detecção direta do HVF-1 pode ser realizada por meio do isolamento do vírus em linhagem celular de rim de felino (CRFK- Crandell feline kidney) e da PCR (SYKES et al., 1997b; STILES et al., 1997, MAGGS et al., 1999). Contudo, o resultado positivo da PCR deve ser interpretado com cautela, uma vez que pode representar uma pequena quantidade de vírus sendo eliminada ou que se trata de uma infecção latente e não necessariamente que o felino avaliado apresente sinais clínicos causados pelo herpesvírus felino, devendo ser levantada a possibilidade de uma coinfeção com outros agentes patogênicos (VOGTLIN et al., 2002).

Em pequenas populações de felinos domésticos saudáveis a ocorrência da eliminação do HVF-1 foi menor que 1% e em grandes populações, especialmente quando os animais apresentavam sinais clínicos, o índice foi de 20% (GASKELL & POVEY, 1982; COUTTS et al., 1994, BINNS et al., 2000, HELPS et al., 2005). Alguns estudos relatam a coinfeção de HVF-1 e *Chlamydophila felis* em gatos domésticos, sendo esta infecção dupla relatada em 0,6% dos gatos domésticos na Austrália, 3% no Reino Unido, 7% na Itália e 10,6% no Japão (SYKES et al., 1999b; YAN et al., 2000; RAMPAZZO et al., 2003; HELPS et al., 2003). No Brasil, não encontramos relato de coinfeção em gatos domésticos. Além da coinfeção com *C. felis*, existe a possibilidade de uma coinfeção com agentes virais

imunossupressores, como os vírus da FIV e FeLV, os quais podem exacerbar a apresentação clínica de uma enfermidade (HVF-1 e/ou *C. felis*) ou ainda, aumentar a eliminação do agente patogênico, facilitando desta forma a disseminação da enfermidade (REUBEL et al., 1992, O'DAIR et al., 1994).

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um retrovírus do gênero *Lentivírus*, cuja estrutura, ciclo e patogenia são muito semelhantes ao do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MILLER et al., 2000). O FIV é endêmico nas populações de gatos domésticos em todo o mundo, com ocorrência estimada em 1-14% em gatos sem sinais clínicos e em mais de 44% em gatos com manifestações clínicas ou na fase crônica da doença (PEDERSEN et al., 1987; HARTMANN, 1998). A transmissão vertical é rara de ocorrer, contudo o vírus é transmitido por mordidas, podendo ocorrer à transmissão durante o coito, tendo em vista que nesse momento, o macho tem o comportamento de morder a fêmea (YAMAMATO et al., 1989). Os gatos domésticos infectados permanecem assintomáticos por vários anos, sendo que alguns deles nem chegam a manifestar clinicamente a doença (ADDIE et al., 2000). Os sinais clínicos só se manifestam no momento da ocorrência da imunodeficiência, a qual é caracterizada por infecções secundárias, tais como gengivite-estomatite, rinite crônica, linfadenomegalia, perda de peso e glomerulonefrite imunomediada (HOSIE et al., 2009). O diagnóstico laboratorial direto é usualmente realizado por meio de cultura de células ou pela PCR; no caso específico da PCR, a sensibilidade e especificidade desta técnica variam entre 40 e 100%, quando comparado aos testes sorológicos (BIENZLE et al., 2004). A análise por Western blot é considerada o “teste ouro” para sorologia do FIV, pois detecta anticorpos que reconhecem a proteína p24 e o peptídeo da proteína de transmembrana (HOSIE et al., 2009).

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um *Gammaretrovírus* transmitido principalmente pelo contato direto frequente ou prolongado entre animais e ainda pela ingestão de água e alimentos contaminados (HOOVER & MULLINS, 1991). O

vírus também pode ser transmitido pelas secreções respiratórias, lacrimais, pelo leite, urina e fezes (ARJONA et al., 2000), além de ser possível a transmissão venérea e durante a gestação (HARBOUR et al., 2002). Os sinais da infecção incluem leucemias, linfomas, síndromes mieloproliferativas e imunossupressão (LUTZ et al., 2009). Felinos jovens, que vivem em grupos, devido ao contato íntimo são mais susceptíveis à infecção (HOOVER & MULLINS, 1991).

O diagnóstico direto da infecção é realizado pelo método de ELISA, utilizando para tanto a proteína p27 do vírus da FeLV, que é um marcador da infecção, apesar de nem sempre indicar viremia. Trata-se, portanto, de teste de alta sensibilidade (98,6%) (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001) e especificidade (98,2%) (HARTMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2007; PINCHES et al., 2007). A imunocromatografia também é outro teste que pode ser utilizado para o diagnóstico da enfermidade, pois sua sensibilidade e especificidade são comparadas ao do teste de ELISA (HARTMANN et al., 2007; PINCHES et al., 2007). O teste de imunofluorescência direta em esfregaços sanguíneos também pode ser utilizado; contudo, em felinos leucopênicos ou quando poucos leucócitos estão infectados pelo vírus, limitam o uso desta técnica. O diagnóstico molecular tem por base a detecção do DNA (provírus) ou do RNA viral. Entretanto, o diagnóstico molecular somente tem sido preconizado nos casos em que o ELISA (baseado no p27) for inconclusivo. Os métodos sorológicos de diagnóstico em animais infectados pelo FeLV são difíceis de serem interpretados, uma vez que muitos gatos desenvolvem anticorpos contra retrovírus endógeno (LUTZ et al., 2009).

De distribuição cosmopolita, a prevalência do FeLV vai depender da densidade da população de felinos domésticos. Quando há somente um felino doméstico, a prevalência é menor que 1% enquanto em gatis com grande população de gatos, e sem medidas de prevenção da enfermidade, esta percentagem excede os 20% (SARMA et al., 1973, ANDERSON et al., 2000; HOSIE et al., 1989; LEVY et al., 2006). Poucos trabalhos relatam a ocorrência de coinfeção por *C. felis*, Herpesvírus felino tipo 1, FIV e FeLV em felinos

domésticos. O'DAIR et al. (1994) após realização de infecção experimental com *Chlamydophila felis* em felinos domésticos infectados ou não com FIV, demonstraram que nos animais com infecção secundária há exacerbação da progressão clínica da infecção viral e que os sinais clínicos da clamidiose são mais duradouros, levando ao aparecimento de conjuntivite crônica nestes felinos. A coinfeção por FIV e HVF-1 em felinos domésticos revelou que felinos infectados pelo FIV são mais propensos a ficarem doentes do que felinos não infectados por tais agentes, requerendo um tratamento mais adequado (REUBEL et al., 1992).

Assim, a clamidiose e o herpesvírus felino são importantes patógenos do trato respiratório superior dos felinos domésticos e a coinfeção com agentes imunossupressores, particularmente FIV e o FeLV, podem piorar os sinais clínicos e o controle de tais agentes respiratórios nas populações de felinos acometidos. Portanto, a pesquisa destes agentes se torna importante, uma vez que na literatura nacional, são ainda escassos os trabalhos sobre este tema.

III- OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de infecção por *Chlamydophila felis* e a coinfeção por herpesvírus felino tipo 1, vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina, em gatos domésticos por meio de técnicas sorológicas e moleculares.

3.2 - Objetivos específicos

- Produzir em ovos embrionados de galinha SPF, inoculados via saco vitelino, suspensão antigênica purificada de *Chlamydophila abortus*, antígeno para os testes sorológicos: reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA indireto;
- Detectar, por meio da PCR, a presença de DNA de *Chlamydophila felis* comparando protocolos de PCR utilizando-se diferentes genes, e a presença de DNA de herpesvírus felino tipo 1, em suabes de conjuntiva de gatos domésticos,
- Avaliar comparativamente os resultados obtidos por meio da PCR com aqueles obtidos na RIFI e ELISA indireto.
- Detectar anticorpos anti FIV assim como antígeno de FeLV, por meio do kit comercial ELISA Snap-Combo® FIV-FeLV, na população de gatos domésticos naturalmente infectados, bem como investigar a ocorrência de coinfeção com *Chlamydophila felis* e HVF-1.

IV- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais

Foram avaliados 235 gatos domésticos, machos e fêmeas, jovens e adultos, sem histórico de vacinação para *C. felis*, dos quais, 145 eram oriundos do Centro de Esterilização de Caninos e Felinos (CECF) da FCAV – UNESP, *Campus* de Jaboticabal, cujo exame físico não apresentou sinais clínicos compatíveis com complexo respiratório felino; 20 oriundos de um gatil com histórico e sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina na cidade de Jaboticabal e 70 gatos eram provenientes da cidade de São Luís, Estado do Maranhão, cujos proprietários não relataram histórico de complexo respiratório felino.

4.2- Colheita de material biológico

A colheita bilateral de material da membrana conjuntival (n=235) foi realizada com auxílio de suabes esterilizados que, após a colheita e identificação de cada amostra, foram acondicionados em microtubos plásticos contendo 1 mL de etanol absoluto. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas à temperatura de -20° C para posterior processamento.

A colheita de sangue dos gatos (n=201) foi realizada por punção da veia jugular, com agulha (20 mm x 5,5 mm) e seringas esterilizadas de 3 mL descartáveis. Após a formação do coágulo, o soro foi separado do sangue total por centrifugação (800 x g) e acondicionado à temperatura de -20° C até o momento de uso. Não foi possível a colheita de sangue de 31 felinos. O número de amostras de soro (n= 201) e de suabe de conjuntiva (n= 235) conforme o local de procedência dos animais encontra-se sumariado na Tabela 1.

Tabela 1: Número de amostras de soro e de suabes de conjuntivas colhidas dos felinos domésticos e o local de procedência. Jaboticabal-SP, 2011

Local de Procedência	Número de amostras de soro	Número de amostras de suabe de conjuntiva
CECF	136	145
Gatil – Jaboticabal-SP	19	20
São Luís-MA	46	70
TOTAL	201	235

CECF- centro de Esterilização de Caninos e Felinos

4.3 – Produção do antígeno para os testes sorológicos

O antígeno a ser utilizado nas reações sorológicas foi produzido em ovos embrionados – SPF (*Specific Pathogen Free* – livre de patógenos), gentilmente cedidos pela Hyline do Brasil. Para sua produção, foi utilizada a amostra de referência de *Chlamydia psittaci* sorotipo 1 (amostra S26/3), oriunda de aborto ovino (atualmente denominada *Chlamydophila abortus*), a qual foi propagada em ovos embrionados SPF, aos 7 dias de incubação. A suspensão de *Chlamydophila abortus* foi previamente diluída em solução salina tamponada com fosfato esterilizado (PBS - 0,01 M PO_4^- 0,14 M NaCl pH 7,4), contendo antibióticos e antifúngicos (100µg/mL de cloridrato de vancomicina, 100µg/mL de sulfato de estreptomicina, 50µg/mL de sulfato de gentamicina e 10µg/mL de anfotericina B). A propagação foi realizada com a inoculação de 0,1 mL da suspensão de 200µg/mL do microrganismo no saco vitelino de cada ovo, em ponto de inoculação previamente demarcado, com o auxílio de um ovoscópio, segundo protocolo preconizado por e RASO et al (2006). Os ovos foram incubados à temperatura de 37° C, durante 4 a 12 dias e observados diariamente. Embriões mortos durante as primeiras 72 horas foram descartados. Os ovos contendo embriões mortos e todos aqueles que permaneceram vivos até o 19º dia de incubação foram abertos para visualização de alterações e para colheita da membrana do saco vitelino. A membrana corioalantóide foi retirada e o conteúdo de cada ovo colocado em placa de Petri esterilizado; as membranas dos sacos vitelinos foram recolhidas,

posteriormente acondicionadas em criotubos estéreis e armazenadas à temperatura de -70° C.

Para a confirmação da presença do microrganismo, foram realizados decalques dos fragmentos de cada saco vitelino, os quais foram secos ao ar, fixados com metanol por cinco minutos e corados pela técnica de Gimenez modificada (ANDERSEN, 1998). Os decalques foram considerados positivos quando inclusões de *Chlamydophila* foram visualizadas nas lâminas, por meio de microscópio de luz. As inclusões foram quantificadas, observando-se cinco campos microscópicos (aumento de 1000x), e considerando-se para leitura os escores: 0 (nenhuma inclusão), 1 (≤ 10 inclusões), 2 (11 a 20 inclusões) e 3 (≥ 21 inclusões).

Como controle à purificação do antígeno específico e para identificação de eventuais reações inespecíficas entre proteínas do saco vitelino e soros de gato, optou-se em utilizar, como controle negativo do antígeno, sacos vitelinos de ovos embrionados, de 13 a 17 dias de incubação, não inoculados. Os procedimentos de colheita dos sacos vitelinos e armazenamento dos mesmos foram idênticos aos descritos acima.

4.4- Detecção de anticorpos anti-*Chlamydophila*

4.4.1.- Reação de Imunofluorescência Indireta para *Chlamydiaceae* com kit comercial (RIFI COMERCIAL)

Com o intuito de ter um “*Gold Standart Test*” ou teste de referência, realizou-se pesquisa de anticorpos nas 201 amostras de soro de felinos domésticos do presente estudo, utilizando-se o kit comercial de RIFI, contendo como antígeno *Chlamydia trachomatis* cultivada em cultura de células L929, segundo protocolo adaptado previamente (SEKI et al, 2010). Como controle positivo da reação utilizou-se o soro proveniente de um felino imunizado com

vacina contendo antígeno de *C. felis*, e o controle negativo foi um soro proveniente de um felino clinicamente sadio, com sorologia e PCR negativos para *C. felis*.

Em linhas gerais, cada amostra de soro foi diluída 1:32 em PBS. Vinte e cinco microlitros da amostra diluída (1:32) de soro de cada animal foram adicionados à concavidade apropriada da lâmina – KIT COMERCIAL para Chlamydiaceae (BION™ Chlamydia-G Antibody Test System, Bion Interprises, EUA) já contendo o antígeno fixado para a RIFI. As lâminas, após incubação em câmara úmida a 37° C por 30 minutos, foram lavadas três vezes com PBS durante 10 minutos e, finalmente, secas ao ar. Em seguida, foram adicionados a cada concavidade das lâminas 25µL de conjugado (anticorpo anti-IgG felino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína FITC™, F4262, Sigma Aldrich, EUA), diluído na sua dose de reatividade ótima, em PBS adicionado de 0,02% de azul de Evans, seguido de nova incubação em câmara úmida a 37° C por 30 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas por duas vezes consecutivas em PBS e uma vez em água destilada, secas ao ar e montadas. Para cada lâmina utilizada foram preparados controles positivo e negativo da reação num volume de 25µL cada. A leitura das lâminas foi realizada com auxílio de microscópio equipado com luz fluorescente (Olimpus® Mod. BX60, Tokyo, Japão), em aumento de 400x. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fluorescência na diluição 1:32 (Figura 1). Após a triagem das amostras positivas, realizou-se a diluição seriada das amostras positivas para a obtenção do título final de anticorpos.

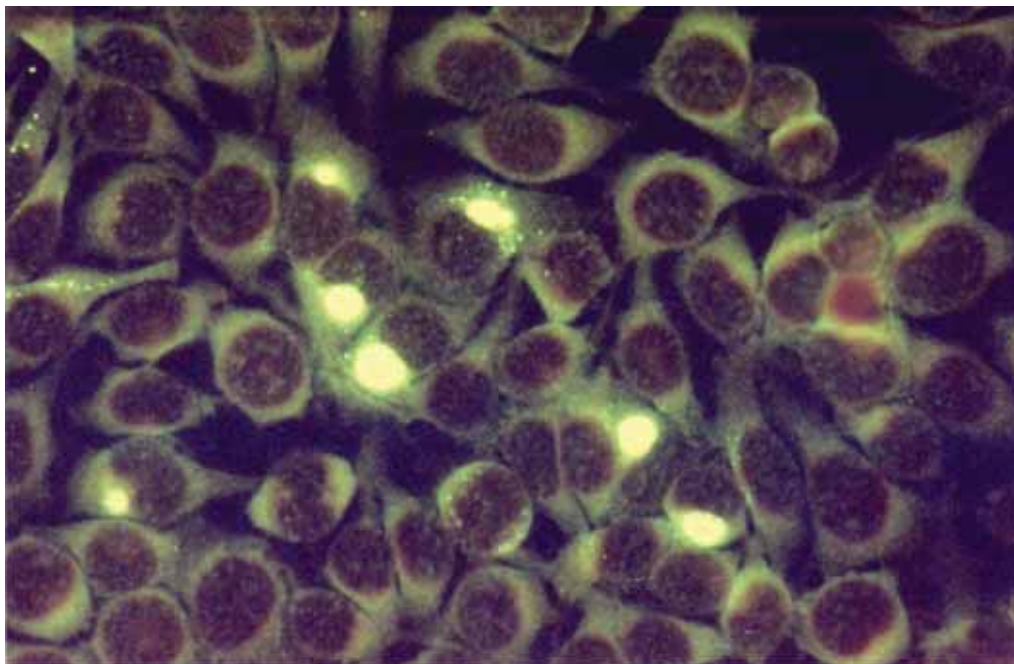
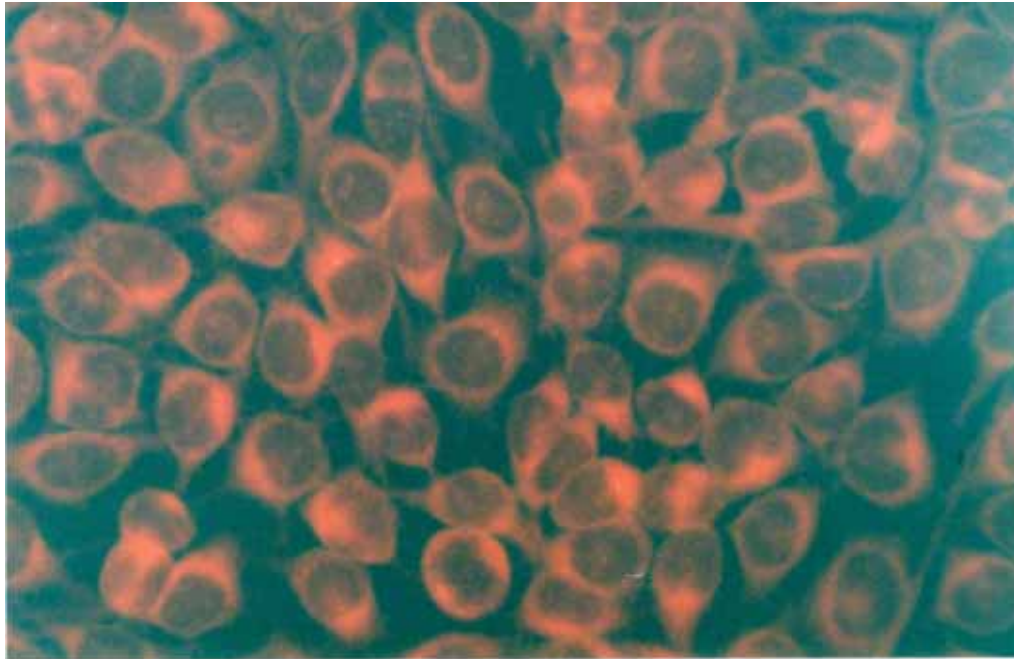


FIGURA 1: Reação de Imunofluorescência Indireta para *Chlamydiaceae* com kit comercial (RIFI COMERCIAL). **A:** Reação negativa, aumento de 400X. **B:** Reação positiva, aumento de 400X. Jaboticabal, 2011.

4.4.2.- Reação de imunofluorescência indireta para Antígeno de *Chlamydiaceae* produzidas em ovos embrionados (RIFI OVO)

4.4.2.1.- Preparação do Antígeno

O antígeno utilizado nas reações sorológicas foi produzido em ovos embrionados SPF conforme o protocolo descrito por HANNA et al, (1972), com algumas alterações.

Os sacos vitelinos com escore 2 ou 3 foram homogeneizados com auxílio de pérolas de vidro autoclavadas e 1mL de uma solução de tripsina 0,1% para cada saco vitelino, durante cinco minutos. A seguir, o material homogeneizado foi diluído em nove partes de PBS, e centrifugado a 500 × g por 5 minutos a 4° C. Após a centrifugação, em cada tubo foram visualizadas três bandas, sendo a superior constituída predominantemente por resíduos de saco vitelino, a intermediária correspondente à suspensão de *Chlamydomphila*, e a inferior formada pela pérola de vidro e detritos celulares. Na sequência, a camada intermediária foi separada das demais, por meio de aspiração, utilizando uma pipeta Pasteur, e centrifugada a 10000 × g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em PBS contendo 1% de formol, seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugando novamente a 10000 × g por 10 minutos a 4° C para a retirada do excesso de tampão fixador. Após tal procedimento, o sedimento foi ressuspense em PBS contendo 1% de soroalbumina bovina (BSA) e centrifugado a 500 × g por 5 minutos a 4° C. Objetivando uma melhor clarificação do antígeno, foi acrescentado a este igual volume de PBS, seguido de três ciclos de centrifugação a 500 × g por 5 minutos a 4° C, sempre colhendo o sobrenadante e descartando o sedimento. O sobrenadante final foi então colhido e considerado a solução estoque de antígeno. A concentração ótima de uso do antígeno a ser colocada nas concavidades da lâmina foi obtida a partir de reações realizadas em lâminas com diluições seriadas do antígeno estoque. Após o teste de RIFI, realizado com um soro na diluição de 1:32 de gato doméstico, sabidamente positivo, aquela concentração cuja

aparência microscópica foi a mais homogênea e, ademais, melhor distribuída, foi a escolhida para a preparação do substrato antigênico das lâminas. Portanto, 10 µL da suspensão do antígeno assim aferida, ou seja, na sua concentração ótima de uso, foram adicionadas a cada concavidade das lâminas de RIFI. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, envoltas individualmente em papel higiênico de folha dupla e separadas em blocos contendo quatro lâminas, envoltas em papel alumínio e devidamente etiquetadas. Após, as lâminas foram acondicionadas em sacos plásticos hermeticamente fechados, estocadas a -20° C até o momento do uso.

4.4.2.2.-Descrição da reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Foram avaliadas por meio deste ensaio sorológico, 201 amostras séricas de gatos domésticos. No momento da reação, as lâminas contendo o extrato antigênico foram descongeladas à temperatura ambiente. A seguir, 10µL de cada amostra de soro, diluída a 1:32 em PBS foram depositados em cada concavidade das lâminas. Estas foram incubadas a 37° C por 30 minutos, em câmara úmida e, a seguir, foram submetidas a duas lavagens de 5 minutos cada em PBS. Seguiu-se a secagem das lâminas e a adição de 10 µL do conjugado (anticorpo anti-IgG felino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína - FITC-Sigma, EUA), diluído a 1:150 em PBS contendo 0,01% de azul de Evans. A seguir, as lâminas foram novamente incubadas a 37° C, por 30 minutos, após o qual, foram feitas mais duas novas lavagens, conforme anteriormente descrito, seguido de montagem das lâminas com lamínula e glicerina tamponada com bicarbonato de sódio, pH 9,6. Em cada lâmina utilizava-se soro de gato controle positivo e soro de gato controle negativo, diluídos a 1:32. A leitura das lâminas foi feita com auxílio de microscópio equipado com luz fluorescente (Olympus Mod. BX60, Tokyo, Japão).

Após a triagem das amostras na diluição de 1:32, realizadas em duplicata, as amostras positivas foram tituladas, partindo-se de diluições seriadas (1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024). Após a leitura em microscópio equipado para fluorescência, consideraram-se positiva as reações contendo partículas brilhantes

e bem demarcadas do antígeno (corpos elementares-CE) cujo título foi maior a 32 (Figura 2).

4.4.3.- Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto

A reação de ELISA indireto foi baseada nos protocolos recomendados por MARKEY et al. (1993), com as devidas modificações que se fizeram necessárias para a otimização da reação. As condições ideais dos diferentes componentes da reação, ou seja, diluições de antígeno, anticorpo, além do tempo e temperaturas ideais de incubação das diferentes fases da reação foram estabelecidos, bem como a escolha dos melhores reagentes e tipo de placas a serem utilizados, com o propósito de se obter uma maior sensibilidade e especificidade da técnica. Foram avaliadas por este protocolo 201 amostras de soros de felinos domésticos.

4.4.3.1.- Elementos da reação

4.4.3.1.1- Antígeno

O antígeno foi produzido por meio de inoculações em ovos embrionados (SPF) de galinhas com 7 dias de incubação, a partir de uma suspensão da amostra de referência *Chlamydophila abortus*. O DNA extraído da amostra foi submetido a sequenciamento nucleotídico, após amplificação de fragmentos genômicos pela PCR, para sua melhor caracterização, confirmando desta forma a sua origem.

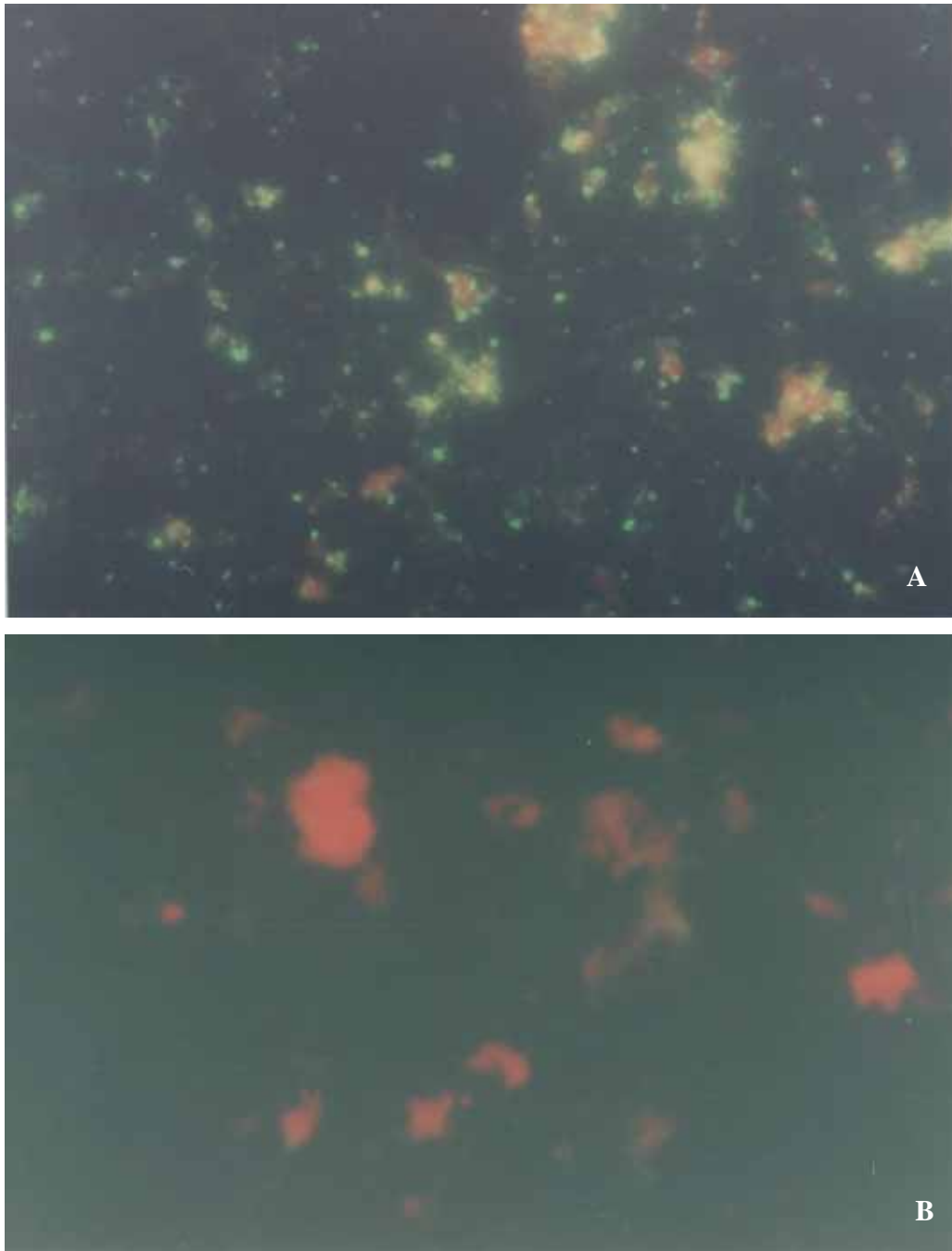


Figura 2: Reação de imunofluorescência indireta para antígeno de *Chlamydiaceae* produzidas em ovos embrionados (RIFI OVO)
A: Reação positiva. Objetiva de imersão. **B:** Reação negativa. Objetiva de imersão. Jaboticabal, 2011.

4.4.3.1.2- Purificação dos Corpos Elementares (CE) de *Chlamydomphila abortus*

Os sacos vitelinos provenientes da inoculação do antígeno foram classificados com escores de presença de corpos elementares, após a coloração de Gimenez Modificada. Este escore variava de zero a três, sendo, zero ausência de corpos elementares e três, número de inclusões igual ou maior que 21, quando avaliados cinco campos microscópicos. Isto posto, os sacos vitelínicos com escore 2 ou 3 foram homogeneizados com auxílio de areia esterilizado e, a seguir, ressuspensos em 1 mL de PBS esterilizado para cada saco vitelino macerado. Após homogeneização, o material foi submetido a $800 \times g$, sob refrigeração durante 5 minutos. Após a centrifugação, em cada tubo foram visualizadas três bandas, sendo a superior constituída predominantemente por resíduos de saco vitelino, a segunda (banda intermediária) correspondente à suspensão de *Chlamydomphila*, e a inferior, formada por areia e detritos celulares. Na sequência, a camada intermediária foi separada das demais por meio de aspiração com auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo a seguir tratada com clorofórmio na proporção de 1/3 (v/v), ou seja, 1 mL de clorofórmio para 2 mL da amostra, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após o tratamento, a suspensão foi novamente centrifugada a $900 \times g$ por 10 min a $4^{\circ} C$, resultando em três camadas distintas, constituídas, respectivamente, de clorofórmio (base), saco vitelino (intermediária) e PBS (sobrenadante). A fase intermediária foi adicionada de igual volume de PBS, pH 7,2, e a seguir armazenada a $-70^{\circ} C$ até a fase de purificação.

O procedimento de purificação do antígeno consistiu em peletagem em colchão de ditrizoato sódico de meglumina (Pielograf 76%, Justesa Imagem do Brasil S/A). Conforme preconizado por MARKEY et al (1993), a suspensão antigênica foi submetida a dois ciclos de centrifugação a $24000 \times g$ por 2 horas a $4^{\circ} C$; sendo o primeiro com 20% de ditrizoato sódico de meglumina e o segundo com 32% de ditrizoato sódico de meglumina, ambos em PBS. O sedimento originado da purificação através dos ciclos citados, foi centrifugado a $17000 \times g$ durante 15 minutos a $4^{\circ} C$ e o sedimento resultante ressuspense em 0,5 mL de

uma solução de SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 1% em PBS, a seguir, incubado a 37° C por 1 hora. Após este período de incubação, foi submetido à diálise (membrana de celulose D9277, SIGMA) durante 18 horas em PBS à 4° C.

A presença do antígeno foi confirmada por meio da RIFI, frente a um soro de referência positivo.

O conteúdo proteico do antígeno solúvel foi determinado pelo método do ácido bicinonínico, utilizando-se o *kit* de reagentes BCA (BCA Reagents Kit- Pierce Chemical Company), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.3.1.3- Controle negativo do antígeno

Como controle à purificação do antígeno específico e com o propósito de identificar eventuais reações inespecíficas entre proteínas do saco vitelino e soros de felinos, o mesmo protocolo realizado para a purificação de CE oriundos de sacos vitelinos infectados, também foi usado, porém com sacos vitelinos não inoculados com o antígeno, de ovos embrionados de 13 a 17 dias de incubação.

4.4.3.1.4.- Determinação da diluição ótima de uso do antígeno, do controle negativo e dos soros testes

As diluições ótimas de reatividade do antígeno e do controle negativo foram determinadas pela diluição dos reagentes nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL de proteína, em tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6.

Os soros testes foram diluídos nas concentrações de 1:100, 1:200, 1:300 e 1:400. Foram testadas três soluções de diluição: PBS –tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado, PBS-tween 20 acrescido de 0,5% de soro albumina bovina (BSA) e PBS-tween 20 acrescido de 4% de soro equino.

4.4.3.2- Descrição da reação com concentração e diluente dos soros testes definidos

Inicialmente, microplacas rígidas de fundo chato de 96 cavidades (Polysorb NUNC Immunoplate, NUNC, Dinamarca) foram sensibilizadas com 100 µL, por cavidade, da suspensão do antígeno e de seu respectivo controle negativo, na concentração de 1 µg/mL de proteína, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6. Após 24 horas de incubação, em câmara úmida, à temperatura de 4° C, as microplacas foram lavadas por cinco vezes com PBS, contendo 0,05% de tween 20 (PBS-T). Entre todas as fases da reação, as microplacas foram submetidas ao mesmo tratamento de lavagem. Na sequência, adicionaram-se, a cada cavidade da microplaca, 200µL da substância bloqueadora (PBS-T contendo 4% de soro equino), seguida de incubação em câmara úmida à temperatura de 37° C por 60 minutos. Após serem lavadas, conforme descrito anteriormente, as microplacas receberam 100 µL dos soros de referência (positivo e negativo), diluídos a 1:100 em PBS-T contendo soro de equino a 4%, e foram incubadas à temperatura de 37° C por 60 minutos, em câmara úmida. Na etapa seguinte, foram adicionados às microplacas lavadas, 100µL do conjugado imunoenzimático (IgG de caprino anti-IgG de gato (Anti-Cat IgG [H&L] – KPL - EUA) acoplado à peroxidase), na sua dose de reatividade ótima de uso (1:2000), diluído em PBS-T contendo 4% de soro de equino. As microplacas foram novamente incubadas em câmara úmida, por 60 minutos, à temperatura de 37° C. Finalmente, após a lavagem das microplacas foram adicionados a cada cavidade da microplaca, 100 µL do substrato enzimático, composto de uma solução cromógena de 10mg de ortofenilenodiamino (OPD) diluída em 25 mL de solução de citrato de sódio-fosfato pH 5,0, acrescida de 10 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30%. As microplacas foram mantidas a 37° C durante 10 minutos e, a seguir, bloqueadas por meio de 50 µl de uma solução de ácido sulfúrico 3M.

4.4.3.3.- Leitura e interpretação dos resultados

A leitura final das densidades ópticas (DOs) de cada cavidade das microplacas foi realizada em leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a 490 nm (conjugado acoplado à peroxidase), contra branco constituído unicamente pelo substrato e bloqueador enzimático. O valor de ELISA do soro (DO líquida) foi expresso pela diferença dos valores de DO entre o antígeno e o controle negativo do antígeno. O ponto de corte da reação, calculado para cada placa, foi determinado pela média dos valores de diferença de DO (DO líquida) de soros de felinos utilizados como controle negativo, acrescido de três desvios-padrão (SOUSA et al., 2008).

4.4.3.4. Análise estatística dos dados

A determinação da sensibilidade, especificidade e a estatística kappa foi realizada pela tabela de contingência, utilizando o kit comercial BION™ Chlamydia-G Antibody Test System (Bion Interprises, EUA) como teste de referência (BRAILE & GODOY, 1999). O valor do coeficiente de correlação (r de Pearson) foi determinado pela correlação entre os títulos obtidos na RIFI COMERCIAL e a RIFI OVO e os títulos obtidos na RIFI COMERCIAL e as DOs líquidas obtidos no teste ELISA.

4.5-Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

4.5.1-Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras de suabes de conjuntiva de gatos domésticos (n=235), colhidas em tubos contendo etanol. Os suabes foram descartados e os tubos centrifugados a $20.000 \times g$, à temperatura de 4°C, durante 30 minutos (RASO et al., 2006). O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento submetido ao protocolo de extração proposto pelo

fabricante do kit Genomic DNA from Tissue[®] (Macherey-Nagel, Alemanha). Ao final do procedimento, o material extraído foi diluído em 70 µL de tampão Tris/HCl, pH 8,0.

4.5.2- Amplificação

Com o intuito de se obter um fragmento maior e posteriormente utilizar enzimas de restrição para a confirmação da espécie de *Chlamydiaceae* envolvida, optou-se em testar três protocolos de PCR, cada um baseado na amplificação parcial de um gene (ompA, omp2 e MOMP).

4.5.2.1- Gene da ompA do gênero *Chlamydiaceae*

Utilizaram-se iniciadores correspondentes à região conservada do gene da ompA do gênero *Chlamydiaceae*, conforme descrito por SYKES et al. (1997a). Foram utilizados os iniciadores Chla F (5'-ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG-3') e Chla R (5'-CAAGATTTTCTAGACTTCATTTTGTT-3'), amplificando fragmento de 1094 pares de base (pb). A amplificação das amostras foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 10mM de tampão tris-HCl pH 8,3 (Tampão 10X Biotools, Espanha), 1,5 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen, EUA), 50 mM de cloreto de potássio, 200 µM de dATP, dTTP, dGTP e dCTP (Biotools, Espanha), 1 µg de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, EUA), 1,25U de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha), 5 µL de amostra de DNA extraído e água ultrapura autoclavada. A seguir, a reação foi colocada em termociclador automático (MJ Research - PTC 200) programado para 1 ciclo de 95° C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 90° C por 1 minuto, de 56° por 1 minuto e um ciclo final de 72° C por 1 minuto. Foi utilizado como controles positivos da reação uma amostra de vacina contendo antígeno de "*Chlamydia psittaci*" (Fel-O-Vax LVK-IV[®], FortDodge, EUA) e como controle negativo, água ultrapura autoclavada.

4.5.2.2- Gene da omp2 do gênero *Chlamydiaceae*

O protocolo de HARTLEY et al. (2001) utiliza iniciadores correspondentes à região conservada do gene da omp2 do gênero *Chlamydiaceae*. Foram utilizados os iniciadores Ch 1 (5'-ATG TCC AAA CTC ATC AGA CGA G-3') e Ch 2 (5'-CCT TCT TTA AGA GGT TTT ACC CA -3'), amplificando fragmento de 603 pares de base (pb). A amplificação das amostras foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 10mM de tampão tris-HCl pH 8,3 (Tampão 10X Biotools, Espanha), 1,5 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen, EUA), 200 µM de dATP, dTTP, dGTP e dCTP (Biotools, Espanha), 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, EUA), 1,25U de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha), 5 µL de amostra de DNA extraído e água ultrapura autoclavada. A seguir, a reação foi colocada em termociclador automático (MJ Research - PTC 200) programado para 1 ciclo de 94° C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos de 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto, 72° por 1 minuto, e um ciclo final de 72° C por 7 minutos. Foi utilizado como controle positivo da reação uma amostra de vacina contendo antígeno de "*Chlamydia psittaci*" (Fel-O-Vax LVK-IV[®], FortDodge, EUA) e como controle negativo, água ultra pura autoclavada.

4.5.2.3- Gene da MOMP do gênero *Chlamydiaceae*

A PCR para detecção da região conservada do gene da MOMP das *Chlamydiaceae* foi realizada conforme descrito por BUXTON et al. (1996), com algumas modificações já padronizadas (RASO et al., 2004). Foram utilizados os iniciadores 1 (5'-CAGGATATCTTGTCTGGCTTTAA-3') e 2 (5'-GCAAGGATCGCAAGGATC-3'), amplificando fragmento de 260 pares de base (pb). A amplificação das amostras foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 10mM de tampão tris-HCl pH 8,8 (Tampão 10X Biotools, Espanha), 0,2mM de DNTPs (Biotools, Espanha), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, EUA), 1,25U de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha), 5 µL de amostra de DNA (para a reação de PCR) e água ultrapura autoclavada. A seguir,

a reação foi colocada em termociclador automático (MJ Research - PTC 200) programado para 1 ciclo de 94° C por 10 minutos, seguido por 34 ciclos de 94° C por 1 minuto, 54° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto e 30 segundos e um ciclo final de 72° C por 4 minutos. Foram utilizados como controles positivo e negativo da reação, uma amostra de vacina contendo antígeno de “*Chlamydia psittaci*” (Fel-O-Vax LVK-IV®, FortDodge, EUA) e água ultra pura autoclavada, respectivamente.

4.5.2.4- Gene timidina quinase do herpesvírus felino tipo I

A PCR para detecção de herpesvírus felino 1 foi realizada conforme protocolo descrito por SYKES et al. (1997b). Os iniciadores utilizados foram derivados da sequência do gene timidina quinase do herpesvírus felino tipo I (5'-GACGTGGTGAATTATCAGC-3' e 5'-CAACTAGATTTCCACCAGGA-3'), amplificando fragmento de 287 pares de base (pb). A amplificação das amostras foi realizada em volume total de 50 µL, contendo 10mM de tampão Tris-HCl pH 8,3 (Tampão 10X Biotools, Espanha), 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 200mM de DNTPs (Amersham Biotools, Spain), 1 µg de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, EUA), 1,25U de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha), 10 µL de amostra de DNA (para a reação de PCR) e água ultrapura autoclavada. A seguir, a reação foi colocada em termociclador automático (MJ Research - PTC 200) programado para 1 ciclo de 95° C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 90° C por 1 minuto, 56° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto e um ciclo final de 72° C por 4 minutos. Foram utilizados como controles positivos da reação uma amostra de vacina contendo antígeno de “Herpesvírus felino I” (Fel-O-Vax LVK-IV®, FortDodge, EUA) e como controle negativo, água ultrapura autoclavada.

4.5.3-Detecção do produto amplificado

Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose, preparado a 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (Tampão TBE) 1X. Uma mistura de 8 µL de produto amplificado com 2µL de

tampão de carregamento foi colocada em um poço do gel, com brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese sob voltagem de 100 volts, durante 80 minutos. A visualização do produto amplificado foi realizada a um comprimento de onda de 254 nm em transiluminador de luz ultravioleta.

4.5.4 – Enzimas de restrição

Os produtos amplificados dos controles positivos, pelos protocolos preconizados por SYKES et al. (1997a) e HARTLEY et al. (2001) foram submetidas à incubação com *Alu I* a 37° C por 1h, seguida de corrida de eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE por 1 h.

4.6- Sequenciamento

O sequenciamento das amostras positivas em estudo foi realizado com o objetivo de confirmar a similaridade das amostras detectadas na PCR com a amostra padrão de referência *Chlamydomophila felis* e de Herpesvirus felino tipo 1.

Para tanto, o sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por método automatizado, ou seja, com base no método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados na PCR. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado, conforme preconizado pelo fabricante do kit big dye terminator cycle sequencing ready reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems), com algumas modificações. Utilizaram-se 3,5 µL do tampão 2,5 X (200mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂); 0,5 µL de big dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo (os mesmos utilizados na PCR), 2,5 µL de água ultrapura e 1,5 µL de DNA (sendo o volume de DNA ajustado de acordo com sua concentração, mensurado em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific). As amplificações foram realizadas inicialmente no termociclador (MJ Research-Inc) a 96° C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 96° C por 45 segundos, anelamento por 30

segundos (temperatura de anelamento ajustada segundo o protocolo de PCR de cada agente) e extensão a 60° C por 4 minutos e mantida a 4° C por tempo indeterminado.

O processo de lavagem das amostras foi feito adicionando-se 80 µL de isopropanol a 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro à temperatura ambiente, foi centrifugada a 4000 × g por 30 minutos, a 20° C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol a 70% foram adicionados e a placa novamente centrifugada, agora por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a mesma quantidade de etanol 70% foi acrescida, repetindo o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração 1) e, em seguida, colocada na bomba de vácuo por 5 minutos para completa secagem das amostras. O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

4.7.- Análise das Sequências

As sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas a alinhamento e análise no Laboratório de Bioinformática do Laboratório de Biologia Molecular da FCAV- UNESP. A “trimagem” foi realizada pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos sequenciamentos dos clones, observando-se a qualidade dos picos correspondentes à cada base sequenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. O programa BLAST (BENSON et al., 2002) foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTN), com vistas à procura e comparação de sequências similares em banco de dados internacionais (GenBank), com aquelas obtidas no presente trabalho.

4.8- Detecção de anticorpos para FIV e de antígeno para FeLV

Para a pesquisa de anticorpos para FIV e de antígeno (P27) para FeLV, as amostras de soros dos felinos foram submetidos à técnica de imunocromatografia, através de um kit comercial ELISA Snap-Combo® FIV-FeLV (IDEXX Laboratories), conforme as instruções do fabricante. A presença do antígeno p27 do FeLV representa o diagnóstico de infecção pelo FeLV, e a presença de anticorpos específicos do FIV indica de que o felino foi exposto ao FIV e pode apresentar uma infecção ativa pelo FIV. Das 201 amostras de soro coletadas, foram avaliadas 150 amostras, uma vez que as demais apresentaram volume insuficiente para a realização dos testes.

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado com o propósito de avaliar o estado imune humoral, assim como pesquisar na conjuntiva de felinos domésticos naturalmente infectados, DNA de *Chlamydomphila felis*. Para atingir tais objetivos foi necessário, inicialmente, estabelecer as condições ideais de uso dos testes sorológicos reação imunoenzimática - ELISA e de imunofluorescência - RIFI, para detecção da resposta imune humoral e dos métodos moleculares (reação em cadeia pela polimerase (PCR), para detecção genômica de *Chlamydomphila felis*. Adicionalmente, por entender que o maior entrave na rotina clínica é estabelecer o diagnóstico diferencial entre a clamidiose felina e os demais agentes responsáveis por conjuntivite (complexo respiratório felino), foi também realizada a pesquisa de DNA para o HVF-1 e teste por imunocromatografia para os agentes imunossupressores virais da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV), complementado com o sequenciamento dos produtos amplificados, com vistas a obter informações sobre a similaridade do material genético com a amostra de *Chlamydomphila felis* e a estirpe de HVF-1.

Os resultados e discussão que se seguem foram distribuídos em tópicos específicos para um melhor entendimento do assunto em questão.

5.1. Detecção de anticorpos anti-*Chlamydomphila*

O diagnóstico sorológico das *Chlamydomphila* é baseado na pesquisa de anticorpos anti-lipopolissacarídeo (LPS), constituinte da membrana dos corpos elementares (CE) desta bactéria. Todas as bactérias da família *Chlamydiaceae* possuem em comum este componente antigênico, o qual tem sido amplamente utilizado no diagnóstico sorológico gênero-específico (WILLS et al., 1988; ANDERSEN, 1998; MCDONALD et al., 1998). Tal componente foi utilizado como fonte de antígeno tanto nas reações de imunofluorescência indireta (RIFI) como nas reações imunoenzimáticas (ELISA Indireto).

Nas RIFIs realizadas por meio de um kit comercial (RIFI COMERCIAL), teste ouro da avaliação sorológica deste trabalho, a fonte de antígeno consistiu de uma amostra de *Chlamydia trachomatis* cultivada em cultura de células (L929), enquanto que nas RIFIs OVO e no teste imunoenzimático (ELISA indireto), a fonte antigênica consistiu de uma amostra de *Chlamydoghila abortus*, propagada em saco vitelino de ovos embrionados SPF, sendo este último uma suspensão antigênica purificada.

Os resultados das pesquisas de anticorpos anti-*Chlamydoghila* realizadas nas 201 amostras de soro de felinos domésticos submetidos às RIFI (RIFI COMERCIAL, RIFI OVO) e ELISA Indireto (ELISA), encontram-se sumariados na Figura 3 e 4 e na Tabela 2.

Pela RIFI COMERCIAL encontramos presença de 81% (162) de amostras sororeagentes e 19% (39) de amostras negativas (Figura 3). Dentre tais amostras, 67,3% (109/162) foram provenientes de soro de felinos colhidos no Centro de Esterilização de Caninos e Felinos (CECF), 10,5% (17/162) de soros de felinos com histórico e sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina, colhidas em gatil situado na cidade de Jaboticabal (SP) e 22,2% (36/162) de soros de felinos colhidos na cidade de São Luís (MA) (Figura 4).

Os resultados da RIFI OVO revelaram a presença de 55% (111) de soro reagentes e 45% (90) de amostras negativas (Figura 3). Dentre tais amostras, 60,4% (67/111) eram provenientes de soro de felinos colhidos no CECF, 16,2% (18/111) de soros de felinos com histórico e sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina, colhidas em gatil situado na cidade de Jaboticabal (SP) e 23,4% (26/111) de soro de felinos colhidos na cidade de São Luís (MA) (Figura 4).

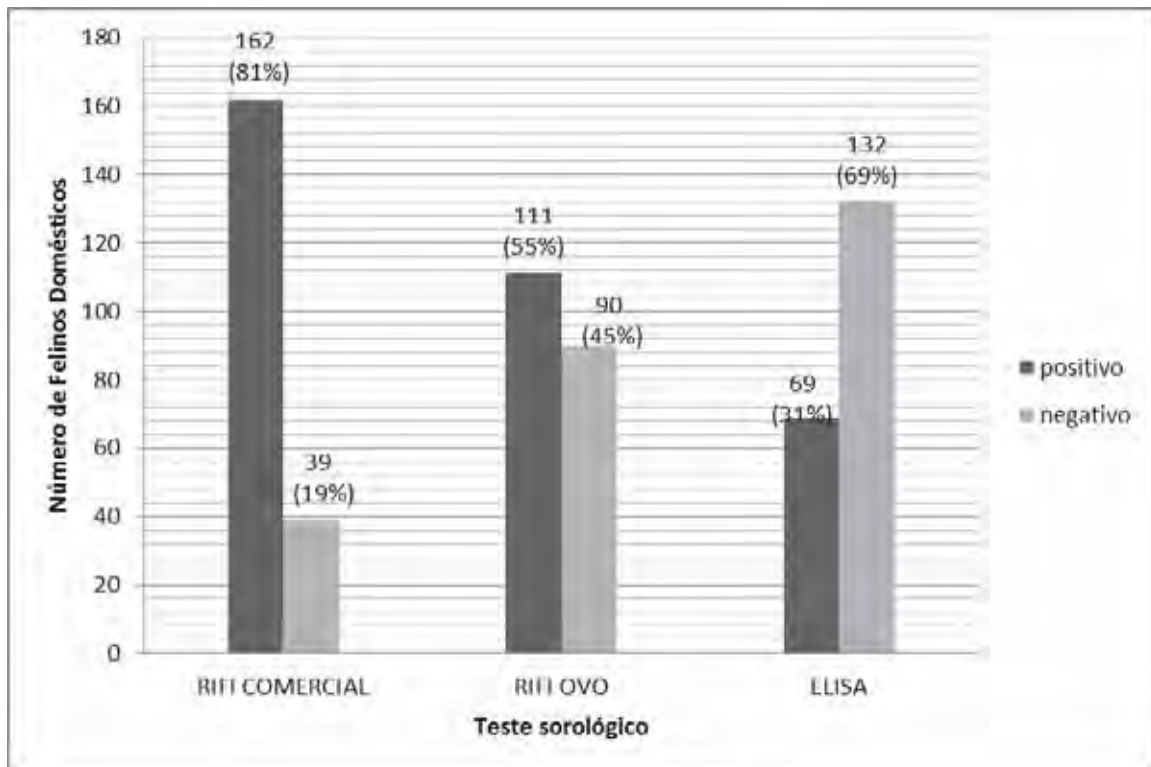


Figura 3: Resultados das pesquisas de anticorpos anti-*Chlamydophila* realizadas nas 201 amostras de soro de felinos domésticos submetidos às RIFI (RIFI COMERCIAL, RIFI OVO) e ELISA Indireto (ELISA). Jaboticabal-SP, 2011.

Por outro lado, os resultados do ELISA revelaram a presença de 31% (69/201) de sororeagentes e 69% (132/201) de amostras negativas (Figura 3). Dentre tais amostras, 59,4% (41/69) foram provenientes de soro de felinos colhidos no CECF, 20,3% (14/69) de soros de felinos com histórico e sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina, do gatil situado na cidade de Jaboticabal, SP e 20,3% (14/69) de soros de felinos colhidos na cidade de São Luís, MA (Figura 4).

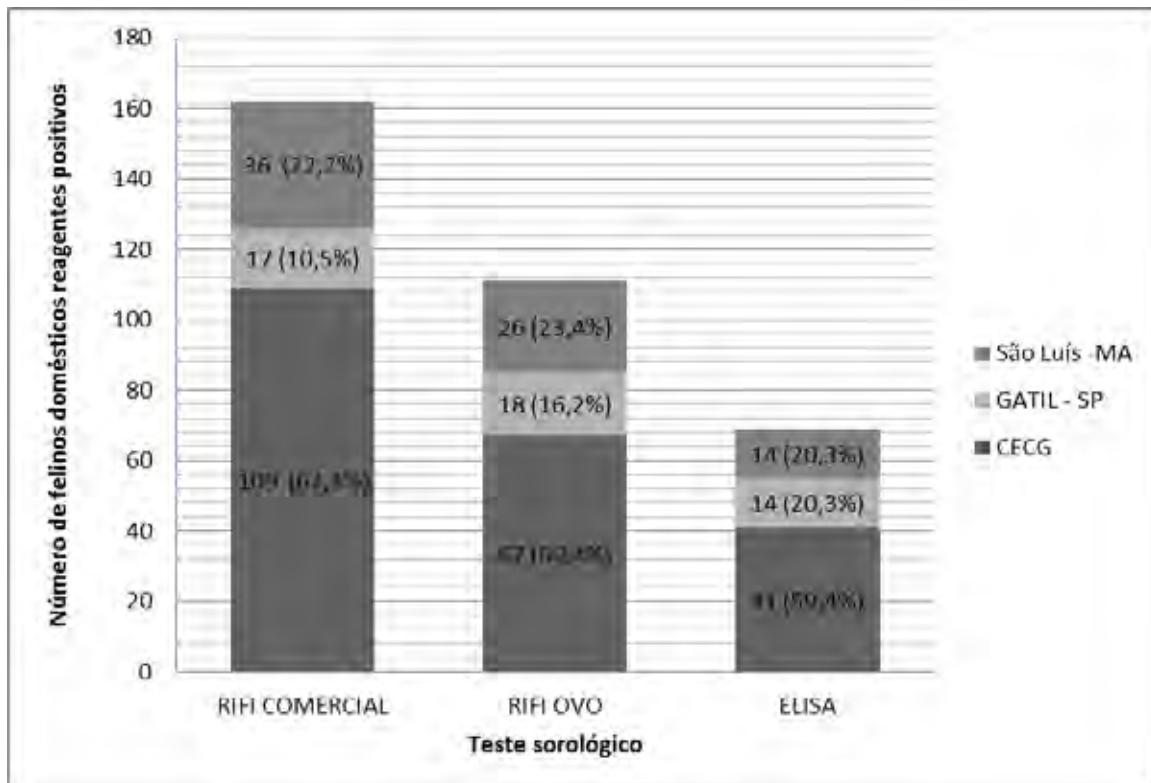


Figura 4: Número de felinos domésticos reagentes nos testes sorológicos RIFI COMERCIAL (n=162), RIFI OVO (n= 111) e ELISA (n= 69), conforme o local de origem. Jaboticabal-SP, 2011.

No que concerne aos resultados obtidos pela RIFI COMERCIAL e pela RIFI OVO (Figuras 3 e 4), estes confirmam os resultados de levantamentos sorológicos realizados no Reino Unido, nos quais foi detectada a presença de anticorpos anti-*Chlamydomphila* em 45% (23/51) dos felinos domésticos mantidos em fazendas (GETTINGS et al., 1987), em 60% de felinos com conjuntivite e em 96% de felinos com clamidiose recorrente (WILLS et al., 1988). No Brasil, verificou-se o mesmo, em 72% dos felinos domésticos (SEKI et al., 2010). Adicionalmente, outros trabalhos também revelaram uma alta ocorrência de clamidiose felina, sendo de 57,70% na Eslovênia (DOVC et al., 1998 *apud* DOVC et al., 2008) e de 30,20%, na Itália (DI FRANCESCO et al., 2004). Por outro lado, DOVC et al. (2008) e HOLST et al. (2006) encontraram uma baixa percentagem (16,70% e 11,00% respectivamente) na ocorrência de anticorpos anti-

Chlamydophila em felinos domésticos, sem sinais clínicos compatíveis com complexo respiratório felino, à semelhança dos dados obtidos por NASISSE et al. (1993) os quais detectaram a presença de anticorpos anti-*C. felis* em 18% de felinos domésticos com conjuntivite. É importante ressaltar que, a presença de anticorpos indica exposição ao agente infeccioso e não necessariamente uma infecção ativa, consoante revelam WILLS et al. (1988), assertiva essa por nós compartilhados.

No que diz respeito à presença de anticorpos em 31% dos felinos avaliados pelo ELISA (Figura 3), tal percentagem está perfeitamente compatível com os achados obtidos por LANG et al. (1992), os quais, utilizando-se também de *C. abortus* como fonte de antígeno, encontraram 22% de sororeagentes. A esse respeito, na literatura nacional e internacional consultada não foi encontrado nenhum estudo sorológico utilizando ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-*Chlamydophila* em soros de felinos domésticos, impossibilitando, dessa maneira, uma análise mais acurada sobre os resultados obtidos neste teste.

Os resultados da quantificação dos títulos de anticorpos detectados nas 201 amostras de soro avaliadas revelaram títulos ≥ 512 em 33,83% (68/201) dos felinos submetidos à RIFI COMERCIAL e em 8,97% (18/201) nos submetidos à RIFI OVO (Tabela 2). Nesse sentido, felinos domésticos com títulos de anticorpos ≥ 512 , embora clinicamente sadios, são considerados com infecções prévias ou crônicas por clamídia, segundo GUNN-MORE et al. (1995). Ainda, de acordo com GRUFFYDD-JONES et al. (2009), a presença de sinais clínicos da clamidiose, particularmente sinais oculares, associada a uma grande percentagem de animais com títulos de anticorpos ≥ 512 é um forte indício de que a população estudada apresenta a doença de forma endêmica; ao contrário, baixos títulos descarta a ocorrência da clamidiose no gatil. Contudo, estudos demonstram que a presença de grande percentagem de animais com títulos de anticorpos ≥ 512 , ocorra devido à imunização ativa dos animais (SEKI et al., 2010). Dentro deste contexto, no

presente estudo, optou-se por trabalhar com grupo experimental de felinos previamente selecionados sem histórico de vacinação. Assim sendo, a percentagem de animais com títulos de anticorpos ≥ 512 pela RIFI COMERCIAL (33,83%), da população de felinos estudada na presente pesquisa, pode ser atribuída à circulação do agente, e não a presença de anticorpos vacinais.

Tabela 2: Resultados dos títulos dos soros de felinos domésticos (n=201) submetidos à detecção de anticorpos anti-*Chlamydomphila*, pelas Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI COMERCIAL e RIFI OVO). Jaboticabal-SP, 2011.

Títulos	Percentual relativo (%)	
	RIFI COMERCIAL	RIFI OVO
≤ 128	48,8 (98/201)	84,57 (170/201)
256	17,41 (35/201)	6,46 (13/201)
≥ 512	33,83 (68/201)	8,97 (18/201)

Ainda analisando a quantificação de anticorpos contra *C. felis*, dentre a população de animais sororeagentes avaliados por meio da RIFI COMERCIAL, 48,8% (98/201) apresentaram títulos de anticorpos inferiores a 128 e 84,57% (170/201), títulos de anticorpos nestes mesmos patamares quando avaliados pela RIFI OVO (Tabela 2). Do mesmo modo, títulos de anticorpos ≤ 128 também foram obtidos por outros estudos (HOLST et al., 2006). Segundo estes autores a grande quantidade de animais com estes títulos de anticorpos se deve ao fato da transmissão da doença ocorrer por contato direto entre animais doentes ou via fômites, com maior frequência de infecção em locais com grande concentração de animais. Na população de felinos domésticas estudada no presente trabalho, grande parte dos animais eram do CECF e da cidade de São Luís (MA), e não viviam aglomerados ou em gatis, tornando-se assim a transmissão da doença menos frequente.

Avaliando-se em separado as populações de felinos domésticos sob estudo, segundo local de origem, observou-se que os soros de felinos colhidos no CECF, 109/136 (80,1%), 67/136 (49,3%) e 41/136 (30,1%) foram soro reagentes,

respectivamente na RIFI COMERCIAL, RIFI OVO e ELISA. Dos 19 soros colhidos no gatil de Jaboticabal, 17/19 (89,5%), 18/19 (94,7%) e 14/19 (73,7%) foram reagentes, respectivamente frente ao RIFI COMERCIAL, RIFI OVO e ELISA. Dos 46 soros colhidos na cidade de São Luís (MA), 41 (30,1%), 14 (73,3%) e 14 (30,4%) apresentaram anticorpos, respectivamente frente à RIFI COMERCIAL, RIFI OVO e ELISA (Tabela 3).

De uma forma geral, verifica-se que os anticorpos anti-*Chlamydomphila* foram mais frequentes na população de felinos domésticos estudada no gatil de Jaboticabal. Essa elevada percentagem de felinos soropositivos certamente está relacionada ao fato destes animais conviverem em galpão, separados em subgrupos de três animais, em recintos de dois metros de comprimento por um metro de largura, cercados apenas por tela e que não tinham acesso à rua. Apesar da boa ventilação, a separação por tela entre um recinto e outro permite a passagem de aerossóis contaminados, e a eliminação de secreções contaminadas pelos espirros, favorecendo a transmissão da enfermidade (BANNASCH e FOLEY, 2005; SYKES, 2005). Já os felinos provenientes do CECF e da cidade de São Luís do Maranhão, pertenciam a proprietários que mantinham no máximo cinco felinos conviventes, com livre acesso à rua.

Tabela 3: Resultados dos testes sorológicos (RIFIs e ELISA) dos felinos domésticos, conforme o local de origem. Jaboticabal-SP, 2011.

LOCAL DE ORIGEM	RIFI COMERCIAL		RIFI OVO		ELISA		TOTAL
	+	-	+	-	+	-	
CECF	80,1% (109/136)	19,9% (27/136)	49,3% (67/136)	60,7% (69/136)	30,1% (41/136)	69,9% (95/136)	136
Gatil- Jaboticabal-SP	89,5% (17/19)	10,5% (2/19)	94,7% (18/19)	5,3% (1/19)	73,7% (14/19)	21,3% (5/19)	19
São Luís- MA	78,3% (36/46)	11,7% (10/46)	56,5% (26/46)	4,5% (20/46)	30,4% (14/46)	69,6% (32/46)	46
TOTAL	162	39	111	90	69	132	201

Por outro lado, uma maior predisposição a doenças respiratórias em gatis está relacionada à alta rotatividade de animais, ao estresse, ao cuidado clínico-

veterinário deficiente, à nutrição inadequada e a problemas clínicos recorrentes (BANNASCH e FOLEY, 2005). OHYA et al. (2010) revelam que o sorodiagnóstico não distingue felinos vacinados de naturalmente infectados. Em vista disso, no presente estudo, preconizou-se a formação de um grupo amostral composto apenas de felinos sem histórico de imunização ativa. Nestas condições, a presença de anticorpos se deve ao contato com *C. felis* em alguma fase da vida.

A desvantagem do sorodiagnóstico é tão somente indicar exposição prévia a um agente e não necessariamente a presença de uma infecção ativa, ou seja, doença (WILLS et al., 1988). Daí, a necessidade de realização de estudos mais detalhados em animais soro reagentes para se estabelecer qual a real extensão da infecção, e se animais clinicamente sadios, porém contendo anticorpos anti-*C. felis* detectáveis podem carrear e disseminar o agente e, conseqüentemente, atuar como fonte de infecção. Em tais condições, torna-se necessário uma profunda avaliação do potencial de reativação da infecção, de manifestação de sinais clínicos e do risco de infecção a outros animais (HOLST et al., 2006). De fato, a detecção de uma infecção ativa é importante para prevenir a propagação do agente a outros felinos e monitorar a eficiência do tratamento (MCDONALD et al., 1998); para tal, o diagnóstico direto do agente é invariavelmente, o teste mais efetivo para a determinação do estado de infecção dos animais.

5.1.1.- Correlação entre os testes sorológicos

Na tabela 4 encontram-se sumariados os resultados dos testes sorológicos realizados nas 201 amostras de soro de felinos domésticos avaliados, sendo a RIFI COMERCIAL, o teste de referência adotado. Os dados demonstram que houve concordância entre a presença de anticorpos anti-*Chlamydomphila* pela RIFI COMERCIAL, RIFI OVO e ELISA em 25,9% das amostras testadas, assim como concordância na ausência de anticorpos pelos três testes em 12,4% dos felinos domésticos. Houve concordância entre pelo menos dois testes sorológicos em 30,9% das amostras positivas e em 30,8% das amostras negativas.

Tabela 4: Resultados obtidos nos exames sorológicos nas amostras de soro de felinos domésticos. Jaboticabal-SP, 2011.

RIFI COMERCIAL	RIFI OVO	ELISA	Amostras
+	+	+	25,9% (52/201)
+	+	-	25,4% (51/201)
+	-	+	5% (10/201)
+	-	-	24,3% (49/201)
-	+	+	0,5% (1/201)
-	-	+	3% (6/201)
-	+	-	3,5% (7/201)
-	-	-	12,4% (25/201)

A relação entre as RIFI COMERCIAL e RIFI OVO e RIFI COMERCIAL e ELISA tem sido estudada por meio da regressão linear, calculando-se o coeficiente de correlação (r) entre dois testes (Tabela 5). Da análise de tais resultados, verifica-se que a RIFI COMERCIAL é mais sensível que a RIFI OVO, havendo uma fraca correlação entre os testes conforme análise estatística kappa, cujo valor foi de 0,29 e $r = 0,44$. Denota-se ainda que a RIFI COMERCIAL foi mais sensível que o teste ELISA, havendo uma fraca correlação entre os testes conforme análise estatística kappa, cujo valor foi de 0,11 e $r = 0,47$ (Tabela 5).

Tabela 5: Resultado da análise comparativa das RIFI para Chlamydiaceae (RIFI COMERCIAL), RIFI OVO e ELISA indireto (ELISA). Jaboticabal-SP, 2011.

Método Testado		Teste de Referência		Total	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	kappa	R
		RIFI COMERCIAL +	-					
RIFI OVO	+	103	8	111	63,6	79,5	0,29	0,44
	-	59	31	90				
ELISA	+	62	7	69	38,2	82,1	0,11	0,47
	-	100	32	132				
Total		162	39	201				

Com efeito, em termos estatísticos, houve uma baixa correlação entre os testes realizados, corroborando com resultados de estudos realizados com ovinos (MARKEY et al., 1993) e pombos (SALINAS et al., 1993). A causa da baixa correlação, assim como da sensibilidade e especificidade entre os testes, pode ser atribuída à diferença de antígenos utilizados, assim como, à origem destes, ou seja, na RIFI COMERCIAL o antígeno foi produzido em cultura de células (L929), a partir de amostra de *Chlamydia trachomatis*. Enquanto o antígeno utilizado nas RIFI OVO e no ELISA, foram produzidos em ovos embrionados (SPF) de galinhas, com sete dias de incubação, inoculados com a amostra S26/3 de *Chlamydia abortus*, oriunda de aborto ovino. Tais resultados estão concordes com os achados experimentais de SALINAS et al. (1993) que atribuíram a baixa correlação entre os testes sorológicos às diferenças na produção do antígeno.

Dentro de tal contexto, apesar do diagnóstico sorológico das *Chlamydiaceae* ser gênero-específico, uma vez que o antígeno imunodominante é o lipopolissacarídeo (LPS), a origem do antígeno parece alterar a especificidade da interação antígeno-anticorpo, provavelmente devido à presença de constituintes interferentes, nas suspensões utilizadas como antígenos, para os testes sorológicos, originários dos substratos onde a clamídia é cultivada. Nesse aspecto, consoante relatam CEVENINI et al. (1989), também pode haver ligação do anticorpo com outras proteínas presentes nas suspensões antigênicas, indicando o uso de tratamentos para o bloqueio de “ruídos”. Por oportuno, durante a fase experimental de padronização do ELISA, foram testadas várias soluções de bloqueio (leite em pó desnatado, soro albumina bovina e soro de equino). O soro de equino diluído em PBS-T a 4% foi o que apresentou melhores resultados, sendo, por isso, utilizado como bloqueio para a reação enzimática. Contudo, a adoção de medida de correção do sinal proveniente de possíveis reações inespecíficas frente à intensidade de sinal de interações específicas antígeno-anticorpo (D.O. líquida), numa primeira análise, não conferiu uma boa sensibilidade do teste, uma vez que a percentagem de soros que reagiram nesta técnica sorológica foi menor que as que reagiram frente às RIFIs. No entanto, não se pode desconsiderar o nível de interferência de possíveis modificações

conformacionais na exposição de epítomos decorrentes da interação com o material da placa de poliestireno ou lâmina onde as reações de ELISA e RIFI, respectivamente, são realizadas (BUTLER, 2000). Outrossim, na tentativa de reduzir o nível de substâncias interferentes na suspensão antigênica final, diferentes protocolos de purificação do antígeno, tais como sonicação e gradiente contínuo com sacarose, foram realizados. Em verdade, o processo de purificação que apresentou melhores resultados foi aquele com dois ciclos de centrifugação em “colchão” de ditrizoato sódico de meglumina a 20 e 32%, respectivamente. Assim, também é plausível que a menor sensibilidade do protocolo de ELISA tenha sido decorrente, ao menos em parte, ao processo de purificação do antígeno, onde não foi possível a total purificação do mesmo, contribuindo para a permanência de moléculas interferentes do saco vitelino, local de inoculação e produção do antígeno, na suspensão antigênica final (CEVENINI et al., 1989).

Outro ponto a ser levado em consideração para justificar a diferença de resultado entre os testes seria a presença de reações cruzadas com outras bactérias. Neste aspecto, estudos têm demonstrado que o epítomo do lipopolissacarídeo do gênero *Chlamydophila* é idêntico ao das bactérias do gênero *Bartonella* (KNOBLOCH et al., 1988; MAURIN et al., 1997). Para evitar tal tipo de reação cruzada, recomenda-se que títulos inferiores a 32 pela RIFI sejam considerados negativos, título de corte este, adotado no presente estudo (GRUFFYDD-JONES et al., 2009).

5.2.- Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

5.2.1- Pesquisa de DNA de *Chlamydiaceae*

A pesquisa de DNA de *Chlamydophila sp* por meio da PCR foi baseada na detecção de fragmentos de genes codificadores de proteínas (MOMP, OmpA e Omp2) de natureza antigênica, presentes na membrana bacteriana do grupo *Chlamydiaceae*.

Os resultados obtidos para as 235 amostras de suabes de conjuntiva de felinos domésticos, conforme protocolo preconizado por BUXTON et al.(1996) e com modificações realizadas por RASO et al. (2006), além de orientações de SYKES et al. (1997a) e HARTLEY et al. (2001), estão sumariados na Figura 5. Dentre tais amostras, 5,1% (12) foram positivas para o gene MOMP (Figura 6); nenhuma foi positiva quando submetida aos protocolos para os genes OmpA e Omp2.

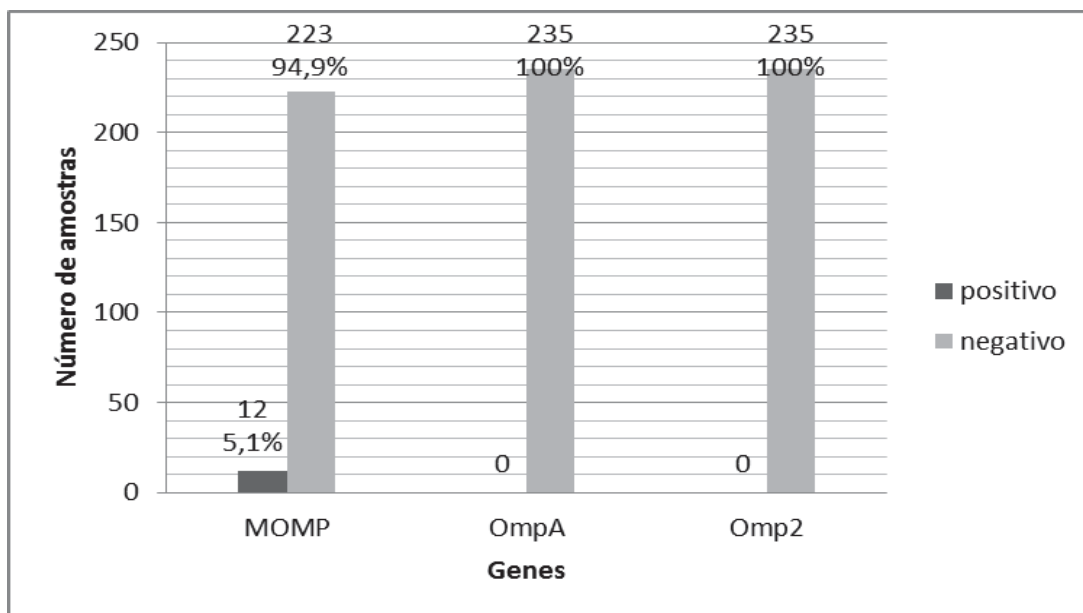


Figura 5: Resultados da PCR dos suabes de conjuntiva de felinos domésticos (n= 235) submetidos à detecção de fragmentos de DNA para os genes MOMP, OmpA e Omp2. Jaboticabal-SP, 2011.

Resta salientar também que, para confirmar se o produto amplificado segundo protocolo de BUXTON et al. (1996) foi realmente *C. felis*, foi realizado o sequenciamento do produto da PCR. A análise da similaridade, cujo resultado variou de 93 a 100% entre os produtos amplificados e o genoma da *Chlamydomphila felis* (número de acesso no GenBank AP006861-1) (AZUMA et al., 2006).

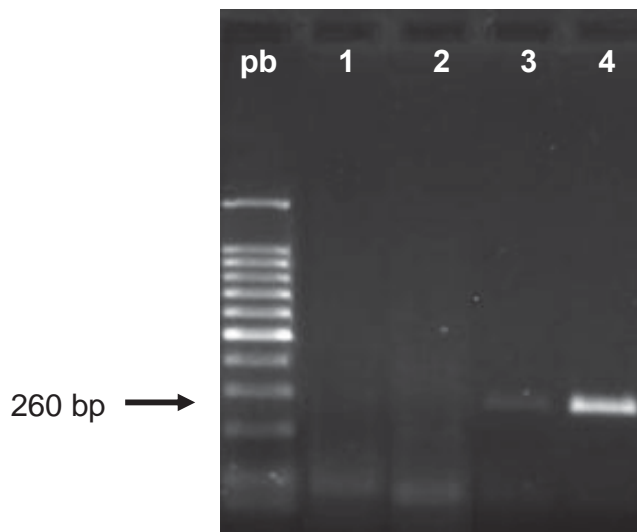


Figura 6: Resultado da eletroforese em gel de agarose (1%), realizada com os produtos da *Chlamydophila sp* para o gene MOMP, provenientes de suabe de conjuntiva de felinos domésticos. Da esquerda para direita: Marcador de Pares de Base (100pb); controle negativo (1), amostra negativa (2), amostra positiva (3), controle positivo (4). Jaboticabal-SP, 2011.

Com o propósito de avaliar os protocolos preconizados por SYKES et al. (1997a) e por HARTLEY et al. (2001), fragmentos amplificados do gene Omp2 os antígenos controles positivos (*Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus* e *Chlamydophila felis*) foram avaliados frente a enzimas de restrição (Alu 1). Conforme ilustrado na Figura 7, é possível confirmar a espécie dos controles positivos, uma vez que os protocolos da PCR são gênero-específicos e a espécie da *Chlamydophila* deve ser determinada mediante o uso de enzimas de restrição (HARTLEY et al., 2001). Dentro de tal contexto, a presença de bandas no gel de eletroforese para cada um dos controles positivos, demonstrou que os protocolos da PCR estavam sendo realizados adequadamente, reafirmando assim que as amostras de suabes de conjuntiva dos felinos domésticos não amplificaram sequências parciais dos genes Omp2 e OmpA de *C. felis*.

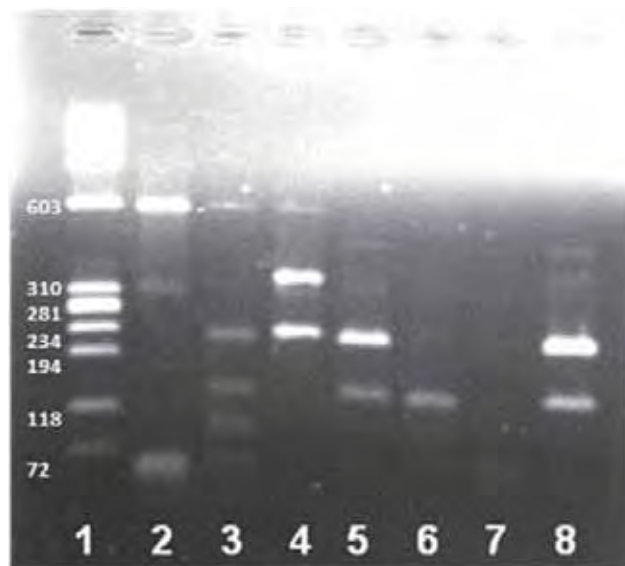


Figura 7: Resultado da digestão dos produtos amplificados segundo protocolo de HARTLEY et al. (2001) com enzima *Alu I*, em gel de agarose a 2%. Ordem das canaletas no gel: 1- Marcador *Phi X 174/ Hae II*; 2- Amostra positiva para *Chlamydophila spp* sem digestão enzimática (Fragmento de 603 pb); 3- Controle positivo da PCR (amostra vacinal de *Chlamydophila felis*), (Fragmentos de 224, 142, 93, 85,47 e 46 pb); 4- Amostra de *Chlamydophila abortus*, utilizada como fonte de antígeno para os exames sorológicos (Fragmentos de 352 e 235 pb); 5- Amostra de pombo positivo para *Chlamydophila psittaci* (Fragmentos de 227, 220 e 140); 6- Amostra clínica de pombo inconclusiva, 7- Controle negativo da reação; 8 – Amostra de pombo positivo para *Chlamydophila psittaci*. Jaboticabal-SP, 2011.

Outro aspecto a ser ponderado na presente pesquisa diz respeito à escolha do local de colheita de amostra com vista à detecção da eliminação de *C. felis*. Estudos realizados por TRÁVNICEK et al. (2002); MARSILIO et al. (2004); VEIR et al. (2008) e HALÁNOVÁ et al. (2011), revelaram que suabes de conjuntiva são mais sensíveis que amostras coletadas da orofaringe ou da nasofaringe, tanto em animais com infecções clínicas e/ou assintomáticas, sendo, desta forma, os sítios de eleição para a colheita de material para a detecção direta de *C. felis*.

Apesar disso, conforme observado no presente estudo, as mesmas amostras de suabe de conjuntiva submetidas aos três protocolos apresentaram

resultados diferentes, sendo detectados fragmentos de DNA tão somente no protocolo recomendado por BUXTON et al. (1996), baseado na detecção do gene MOMP. Consoante revelam SANDMEYER et al. (2010), diferenças entre os protocolos da PCR para detecção de *C. felis*, pode ser a causa de resultados diferentes, uma vez que em um estudo realizado por estes autores no Canadá, das 48 amostras de suabes de conjuntiva e de córnea de felinos domésticos com problemas oculares, encaminhadas a dois laboratórios comerciais para diagnóstico de *Chlamydomphila felis* pela PCR, somente uma (2%) foi positiva no laboratório A e oito (17%) amostras positivas no laboratório B.

Outra variável que deve ser ponderada na detecção de material genético para o diagnóstico direto em uma amostra clínica é a forma como o material biológico é coletado. As *Chlamydiaceae* são bactérias intracelulares obrigatórias, sendo necessário um número representativo de células parasitadas no suabes de conjuntiva para a detecção do agente (GRUFFYDD-JONES et al., 2009). Distinto fator também a ser analisado é a forma como é extraído o material genético e a quantidade de DNA extraído do material biológico. Dentro de tal contexto, há relatos de ocorrência de discordância no diagnóstico de *C. felis* realizado em dois laboratórios comerciais distintos. Ou seja, as mesmas amostras clínicas coletadas e submetidas a fracionamento em tubos diferentes e protocolo de extração também diferente, não foram coincidentes. Tal divergência de diagnóstico encontrada foi atribuída à metodologia de extração de material genético adotada (SANDMEYER et al., 2010). No presente trabalho, a extração do material genético não interferiu na diferença de diagnóstico pelos diferentes protocolos de PCR, uma vez que o DNA utilizado em cada teste era originário da mesma alíquota de DNA extraído. Assim, como se nota tal diferença de resultados entre os protocolos de SYKES et al. (1997a); HARTLEY et al. (2001) e BUXTON et al. (1996) se deve a sensibilidade do teste e ao tipo de gene pesquisado e não a quantidade de DNA presente na amostra clínica avaliada.

A presença de fragmentos do gene MOMP de *C. felis* em 5,1% (12/235) das amostras de suabes de conjuntiva, corroboram com outros dados da pesquisa

da bactéria na região Sudoeste do Estado de São Paulo, onde 6,9% das amostras de conjuntiva apresentaram DNA clamidial pelo mesmo protocolo da PCR (SEKI et al., 2010). Outros estudos utilizando a PCR como meio de diagnóstico para *C. felis* foram realizados na Austrália, onde a ocorrência variou de 11,5 a 14,3% (SYKES et al., 1997a; SYKES et al., 1999b; SYKES et al., 2001), na Suíça foi de 11,5% (VON BOMHARD et al., 2003), no Reino Unido entre 6,7% e 17,7% (MCDONALD et al., 1998; HELPS et al., 2001), e no Japão, variando de 4,5% e 26,9% (IWAMOTO et al., 2001; MOCHIZUKI et al., 2000).

Com referência a presença de fragmento de DNA clamidial em suabes de conjuntiva de felinos domésticos conforme o local de origem dos animais avaliados observou-se que dos 145 suabes dos felinos do CECF, em 3 (2,1%) foram detectados DNA de *Chlamydophila*; dos 20 animais do gatil da cidade de Jaboticabal, 6 (30%) apresentaram material genético de *C. felis*, e entre os 70 suabes de conjuntiva dos felinos oriundos da cidade de São Luís (MA), 3 (4,3%) foram positivos pela PCR. Assim, os resultados obtidos na presente pesquisa estão concordes com os achados de SYKES et al. (1999a), que afirmaram que a presença de *C. felis* é mais comum em felinos que vivem em gatis e/ou abrigos, devido à alta densidade populacional nestes locais.

Conforme relatado na literatura compulsada, há uma estreita associação entre a presença de sinais clínicos de complexo respiratório felino e a presença de PCR positivo, contudo, segundo LOW et al. (2007), não há diferença significativa na amplificação do DNA de *C. felis* em animais com sinais clínicos e animais clinicamente sadios, apesar da frequência do primeiro ser maior que o segundo. Nos resultados do presente trabalho verificou-se a amplificação do gene MOMP em 30% dos animais do gatil com sinais clínicos compatíveis com complexo respiratório felino corroborando com os dados de MARSILIO et al. (2004), que avaliaram uma população de 40 felinos com sinais clínicos respiratórios, detectando o DNA de *C. felis* em 22,5% dos animais e com HARTMANN et al. (2010) que detectaram pela PCR a bactéria em 56% (23/41) das amostras avaliadas. YAN et al. (2000) também observaram uma alta positividade, em 59,1%

(39/66) dos felinos provenientes de abrigos municipais com sinais clínicos de complexo respiratório felino. Em contrapartida, BANNASCH e FOLEY (2005) detectaram fragmento de DNA para *C. felis* em somente 2,8% de felinos de abrigos públicos (n= 528) com sinais clínicos de complexo respiratório felino. No mesmo ano, em oito países europeus foi detectado, por meio da PCR, infecção por *C. felis* em 10% da população dos gatis estudados (HELPS et al., 2005).

Quando analisamos as populações de felinos domésticos sem sinais clínicos da doença no momento da colheita do suabe de conjuntiva, avaliadas na presente investigação, observa-se que 2,1% (3/145) dos felinos do CECF foram positivos pela PCR e 4,3% (3/70) dos felinos oriundos da cidade de São Luís (MA) exibiram material genético de *C. felis*. Tais percentagens são bem semelhantes às observadas por LOW et al. (2007), que detectaram a presença de *C. felis* pela PCR em 3,2% (4/124) dos felinos domésticos sem conjuntivite e por VON BOMHARD et al. (2003) e DI FRANCESCO et al. (2004) que também observaram a presença do fragmento de DNA da bactéria, respectivamente, em 3% e 4,1% dos suabes de conjuntiva colhidos de felinos clinicamente sadios. É importante enfatizar que o isolamento de *C. felis* em felinos domésticos sem sinais clínicos da doença já foi relatado em estudos anteriores (GRUFFYDD-JONES et al., 1995; MCDONALD et al., 1998).

5.2.2- Pesquisa de DNA de Herpesvirus Felino tipo 1

Dentre as 235 amostras de suabe de conjuntiva de felinos domésticos submetidas à detecção molecular de Herpesvírus felino tipo 1, três (1,3%) apresentaram DNA para herpesvírus (Figura 8), sendo estes três animais provenientes de um gatil com histórico e sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina na cidade de Jaboicabal, caracterizando 15% (3/20) desta população estudada. O resultado do sequenciamento do produto amplificado revelou 96% a 98% de similaridade com o genoma do Herpesvirus Felino tipo 1 (número de acesso no Genbank FJ478159. 2 e M26660. 1) (NUMBERG et al., 1989; TAI et al., 2010).

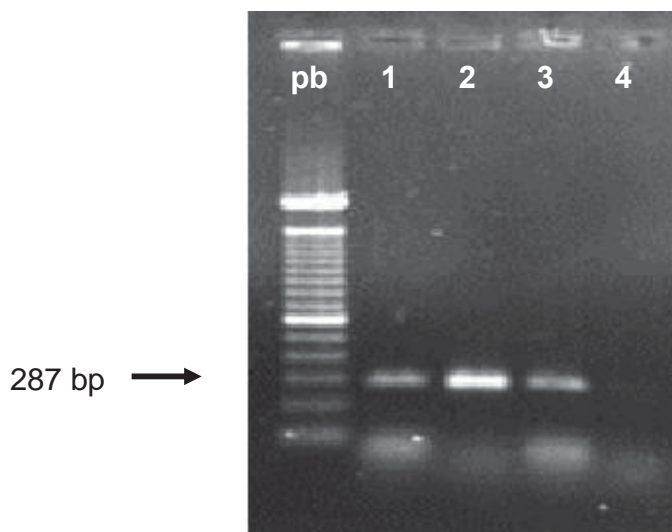


Figura 8: Resultado da eletroforese em gel de agarose (1%), realizados com os produtos da PCR para Herpesvírus Felino tipo 1, provenientes de suabe de conjuntiva de felinos domésticos. Da esquerda para direita: Marcador de Pares de Base (100 pb.); amostra positiva (1 e 3), controle positivo (2) e controle negativo (4). Jaboticabal-SP, 2011.

Estudos epidemiológicos comprovam que o HVF-1 ocorre com mais frequência em gatis e abrigos públicos (MAGGS, 2005), fato este demonstrado no presente estudo. Entretanto, 80% dos felinos infectados mantem o vírus na forma latente e cerca de 45% destes podem eliminar vírus ao longo da vida (GASKELL e POVEY, 1977). Resta salientar também que, a presença de animais negativos pela PCR para HVF-1, pode ser explicada pelo fato de que no momento da colheita do suabe de conjuntiva, o vírus não se encontrava em fase ativa de eliminação. Sendo assim, é possível que o HVF-1 esteja mais disseminado na população de felinos estudada, indicando uma falsa negatividade no presente trabalho.

Estudos realizados em vários países chamam atenção para a presença do HVF-1, detectada pela PCR em 6,7% (8/120) de felinos com e sem conjuntivite também nos EUA (LOW et al., 2007), em 18% (9/50) em felinos com sinais clínicos nos EUA (STILES et al., 1997) e em 42,5% (175/412) de felinos com conjuntivite e sequestro de córnea no Reino Unido (COUTS et al., 1994). A esse

respeito, merece ser ressaltado que, em felinos saudáveis a ocorrência foi de 5% a 12% (COUTS et al., 1994; STILES et al., 1997).

5.3. Correlação entre os testes sorológicos (RIFI COMERCIAL, RIFI OVO e ELISA) nas amostras de soros de felinos contendo fragmentos DNA para *Chlamydiaceae*.

De 12 amostras de suabes de conjuntivas contendo DNA para *Chlamydiaceae*, em duas não foi possível a colheita de amostra de sangue para obtenção do soro. Das 10 amostras restantes, 60% (6/10) continham anticorpos para *Chlamydomphila* pela RIFI OVO e RIFI COMERCIAL e 50% (5/10) pelo ELISA (Tabela 6). TOZON et al. (2006), por sua vez, correlacionarem os dados da detecção direta do agente, realizada por meio do ELISA direto e a pesquisa de anticorpos por meio da RIFI, e constataram que dos onze animais positivos no ELISA e com sinais clínicos compatíveis com o complexo respiratório felino, somente 5 (45,5%) apresentaram anticorpos pela RIFI.

Tabela 6: Resultados de títulos de anticorpos anti-*Chlamydomphila*, obtidos pela RIFI COMERCIAL, pela RIFI OVO e ELISA Indireto nas amostras de soros de felinos domésticos positivos pela PCR. Jaboticabal-SP, 2011.

AMOSTRA POSITIVA NA PCR	RIFI COMERCIAL	RIFI OVO	ELISA
249	-	-	-
264		Sem amostra de soro	
276	256	-	-
315		Sem amostra de soro	
327	-	-	+
328	-	-	+
402	512	64	-
403	256	32	-
442	1024	256	+
493	1024	1024	+
499	512	128	+
510	-	64	-

De um modo geral, a ausência de anticorpos em animais PCR positivos pode ser explicada com base na resposta imunológica nas infecções primárias por clamídias. Cerca de duas semanas após os primeiros sinais clínicos, ocorre um aumento dos títulos de anticorpos IgA e IgM, os quais alcançam seu ponto máximo cerca de cinco semanas após, declinando por volta da 10^a semana. Aproximadamente no momento da atividade máxima dos anticorpos IgM e IgA, começa a produção dos anticorpos IgG, que alcançam o seu ponto máximo cerca de 12 semanas após os primeiros sintomas, e podem ser detectados durante alguns anos (MATTER et al., 2006). Na presente investigação, a classe de anticorpos estudada foi a IgG; conseqüentemente, o animal poderia estar na fase mais inicial da doença, condição não adequada para detecção de anticorpos.

5.4- Pesquisa de anticorpos para FIV e de antígeno p27 para FeLV

Dentre as 150 amostras de soros de felinos domésticos submetidos ao kit Snap Combo, 8 (5,3%) apresentaram anticorpos contra FIV, sete das quais eram provenientes dos felinos domésticos de São Luís (MA), caracterizando 10% (7/70) desta população, e uma amostra foi proveniente de um felino oriundo do CECF, representando 0,7% (1/145) da população (Figura 9). Dentre os animais FIV positivos, quatro (50%) eram fêmeas e quatro eram (50%) machos.

A presença de anticorpos contra FIV em 5,3% das amostras contrapõe outros estudos realizados em felinos domésticos domiciliados e de rua, no Brasil, onde a ocorrência da FIV foi de 20,2% em gatos do Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2002), e de 37,5% no Rio Grande do Sul (CALDAS et al., 2000). Segundo HOSIE et al. (2009), a FIV é endêmica nos felinos domésticos de todo o mundo.

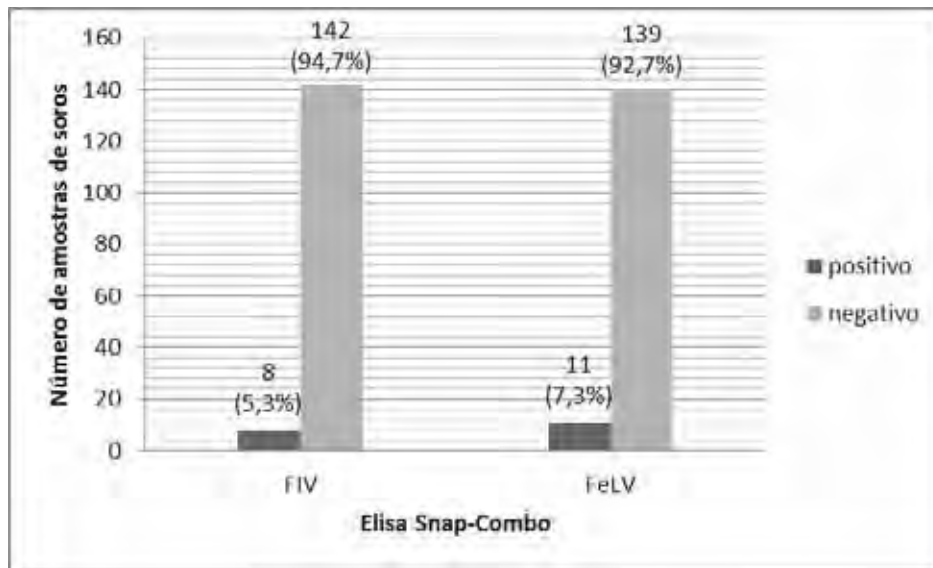


Figura 9: Resultados da detecção de anticorpos para FIV e de antígeno p27 para FeLV realizadas em soros de felinos domésticos (n= 150). Jaboticabal-SP, 2011.

A patogenia da FIV é dividida em três fases. Na fase de infecção primária, apresenta um período de viremia de várias semanas, com linfadenopatia generalizada, febre e neutropenia. A segunda fase caracteriza-se por um longo estágio assintomático, que pode durar vários anos, durante o qual há redução dos linfócitos T CD4+ (NOVOTNEY et al., 1990; BARLOUGH et al., 1991). No estágio terminal, a imunodepressão é evidente, com manifestações clínicas decorrentes das infecções oportunistas (PEDERSEN et al., 1987; YAMAMOTO et al., 1989). Não obstante, a percentagem de anticorpos é estimada em 1-14% em felinos sem sinais clínicos e em mais de 44% em felinos com manifestações clínicas ou na fase crônica da doença (PEDERSEN et al., 1987; HARTMANN, 1998). Neste contexto, no presente trabalho, os felinos domésticos avaliados não manifestavam clinicamente a doença no momento da colheita do soro, justificando assim a presença de anticorpos em 5,3% da população estudada.

Quanto à origem da população de felinos estudada pode-se observar que os felinos oriundos da cidade de São Luís-MA, apresentaram uma maior percentagem (10%) de sororeagentes, sugerindo que os animais desta localidade

estão mais susceptíveis a infecção pelo FIV, sendo considerado grupo de risco os animais que tem acesso à rua (PEDERSEN et al., 1987). É importante enfatizar que em um estudo realizado por YAMAMOTO et al. (1989), índices de soropositividade de 1,2% para animais de grupos considerados de pequeno risco e de 14% em grupos de alto risco foram detectados.

Não houve diferença referente ao sexo entre os animais positivos pelo kit Snap Combo para detecção de anticorpos anti-FIV. Tais informações são discrepantes com dados na literatura compulsada, a qual caracteriza felinos machos como um grupo de alto risco a infecção, uma vez que a ocorrência entre machos é três vezes maior que em fêmeas (YAMAMOTO et al., 1989).

Das 150 amostras testadas, 11 (7,3%) apresentaram antígeno para FeLV (Figura 9). Conforme a procedência do animal estudado, dentre essas amostras, 6,9% (10/145) foram de felinos provenientes do CECF e 5,3% (1/19) do gatil situado na cidade de Jaboticabal, SP. Dentre os animais FeLV positivos, 5 (45,5%) eram machos e 6 (54,5%) eram fêmeas. Apenas uma amostra (0,6%), proveniente de um felino macho do CECF, foi positiva para os dois vírus imunossupressores.

Estudos realizados no Brasil em felinos domésticos domiciliados e de rua revelaram a presença de FeLV em 8,0, 17,0 e 32,5% pelo ELISA, nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, respectivamente (RECHE JR et al., 1997, SOUZA et al., 2002, TEIXEIRA et al., 2007). Ainda, um estudo realizado em várias cidades do Brasil, demonstrou a presença do FeLV em 6,04% (118/1952) dos esfregaços sanguíneos pela técnica de imunofluorescência direta (HAGIWARA et al., 2007). No exterior, a ocorrência é de 1 a 44% para FIV e 1 a 38% para FeLV (HOSIE et al., 1989; ISHIDA et al., 1989; BRALEY, 1994).

Na presente investigação, o vírus da FeLV foi detectado em maior proporção em felinos que participaram da castração eletiva, sendo que somente um animal do gatil de Jaboticabal foi positivo. Usualmente, a ocorrência de FeLV na população de felinos domésticos está relacionada com a densidade populacional a qual está diretamente relacionado com a cadeia epidemiológica da

doença (LUTZ et al., 2009). Assim, em populações de felinos que vivem isolados a ocorrência é baixa (menos de 1%); enquanto que em gatis ou abrigos públicos, onde a densidade populacional é maior, a presença do vírus ocorre em mais de 20% dos animais (HOSIE et al., 1989; LUTZ et al., 1990; LEVY et al., 2006). Por outro lado, felinos que tem acesso à rua são mais susceptíveis a doença por estarem mais sujeitos a brigas e conseqüentemente, em contato mais frequente com saliva de um animal infectado, que seria a maior fonte de infecção da doença (HARTMANN, 1998; LUTZ et al., 2009). Assim sendo, tais dados sugerem que, apesar de viverem em grupos menores, os felinos domésticos provenientes da CECF tinham um maior acesso a rua, sendo, portanto, considerado grupo de risco a exposição da infecção.

No que diz respeito à predisposição sexual, na presente investigação não foi observada diferença representativa entre os sexos dos felinos positivos para a enfermidade, nesse aspecto, discordante da literatura, onde gatos machos, face à seu comportamento de disputa pelo território, brigam entre si, resultando em mordidas, ocorrência de feridas que são porta de entrada do vírus presente na saliva (YAMAMOTO et al., 1989; LURIA et al., 2004; LEVY et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007).

5.5- Coinfecção de *Chlamydomphila felis* com Herpesvirus Felino tipo 1, FIV e FeLV.

No que tange a presença de coinfecção de *C. felis* e HVF-1, em somente um felino foram detectados os dois agentes, (coinfecção em 0,4%), dado similar ao encontrado por SYKES et al. (1999b), os quais encontraram coinfecção em 0,6% da população de felinos avaliada. Por outro lado, em estudos realizados no Japão, a presença de coinfecção entre *C. felis* e HVF-1 foi de 10,6% dos felinos avaliados (YAN et al., 2000), enquanto que no Reino Unido foi de 3% (16/538) (HELPS et al., 2003), contrastando com pesquisas realizadas na Itália, onde

todos os animais positivos para *Chlamydophila spp*, também foram positivos para HVF-1 (MARSILIO et al., 2004).

No que se refere à comparação da frequência individual de cada um dos dois agentes causadores do Complexo Respiratório Felino, pode se observar que no trabalho em tela, a *C. felis* (5,1%) ocorreu em maior frequência que o HVF-1 (1,3%) na população de felinos domésticos estudada, legitimando os achados de YAN et al., (2000), onde a percentagem de felinos *C. felis* PCR positivo (59,1%) foi maior que para HVF-1 (16,7%). Contudo em vários outros estudos a percentagem de felinos positivos para HVF-1 foi maior que para *C. felis*, respectivamente de, 21,6% e 3,6% no Japão, (MOCHIZUKI et al., 2000); 21,2% e 14,3% na Austrália, (SYKES et al., 1999b); 56,75% e 22,5% na Itália, (MARSILIO, et al., 2004). Por outro lado, estudo realizado em sete abrigos públicos nos EUA, revelou que, em quatro deles a prevalência de HVF-1 foi maior que a de *C. felis*, enquanto que, em dois, não foi detectado nenhum agente e, ainda, em somente um a prevalência de *C. felis* foi superior a de HVF-1 (BANNASCH e FOLEY, 2005). É importante enfatizar que altas percentagens de animais com HVF-1 e *C. felis* em gatos está associado a más condições de higiene (HELPS et al., 2005).

No que diz respeito à coinfeção da clamidiose felina e os vírus imunossupressores, no presente trabalho, os animais positivos pela PCR para *Chlamydiaceae* não apresentaram anticorpos anti-FIV e, tampouco, apresentaram antígeno para FeLV. Tais achados corroboram com DOVC et al., (2008) que demonstraram não haver correlação entre a infecção de FIV e/ou FeLV e os sinais clínicos de doença do trato respiratório superior. Contudo, segundo O'DAIR et al., (1994), felinos experimentalmente infectados com FIV, apresentaram sinais clínicos mais duradouros e desenvolveram conjuntivite crônica quando coinfectados experimentalmente com *C. felis*.

VI – CONCLUSÕES

Suspensão antigênica de *Chlamydophila abortus* produzida em ovos embrionados SPF de galinha não demonstrou ser uma boa fonte de substrato antigênico para os testes sorológicos do presente estudo quando comparada com suspensão antigênica de *Chlamydia trachomatis*.

O protocolo baseado no gene MOMP demonstrou ser mais sensível do que os protocolos para amplificação de fragmentos dos genes Omp2 e OmpA, concernente a detecção de fragmentos específicos de DNA de *Chlamydiaceae* em amostras de conjuntiva de felinos domésticos.

A *C. felis* demonstrou ser mais frequente que o HVF-1, como agente causador de doença do trato respiratório superior, sendo a coinfeção pelos dois agentes pouco comum na população de felinos doméstico estudada.

No presente estudo, não se detectou coinfeção dos agentes causadores de doença do trato respiratório superior (*C. felis* e HVF-1) e vírus imunossupressores (FIV e FeLV).

VII- REFERÊNCIAS*

ADDIE, D. D.; DENNIS, J. M.; TOTH, S.; CALLANAN, J. J.; REID, S.; JARRETT, O. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. **Veterinary Record**, London, v. 146, n. 15, p. 419-424, 2000.

ANDERSEN, A. A. Chlamydiosis. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W. (Ed.). **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4. ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1998, p. 81-88.

ANDERSON, M. M.; LAURING, A. S.; BURNS, C. C.; OVERBAUGH, J. Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. **Science**, Washington, v. 287, n. 5459, p. 1828-1830, 2000.

ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; MARTIN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 9, p. 3448-3449, 2000.

AZUMA, Y.; HIRAKAWA, H.; YAMASHITA, A.; CAI, Y.; RAHMAN, M. A.; SUZUKI, H.; MITAKU, S.; TOH, H.; GOTO, S.; MURAKAMI, T.; SUGI, K.; HAYASHI, H.; FUKUSHI, H.; HATTORI, M.; KUHARA, S.; SHIRAI, M. Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydophila felis*. **DNA Research**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 15-23, 2006.

*De conformidade à norma da ABNT-NR6023

BAKER, J. A. A virus obtained from a pneumonia of cats and its possible relation to the cause of atypical pneumonia in man. **Science**, Washington, v. 20, 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**, London, v. 7, n. 2, p. 109–119, 2005.

BARLOUGH, J. E.; ACKLEY, C.D.; GEORGE, J.W.; LEVY, N.; ACEVEDO, R.; MOORE, P.F.; RIDEOUT, B.A.; COOPER, M.D.; PEDERSEN, N.C. Acquired immune dysfunction in cats with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome.**, New York, v. 4, n. 3, p. 219-227, 1991.

BART, M.; GUSCETTI, F.; ZURBRIGGEN, A.; POSPISCHIL, A.; SCHILLER, I. Feline infectious pneumonia: a short literature review and a retrospective immunohistological study on the involvement of *Chlamydia spp.* and distemper virus. **The Veterinary Journal**, London, v. 159, n. 3, p. 220-230, 2000.

BENSON, D. A. KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.

BIENZLE, D. A.; REGGETI, F.; WEN, X.; LITTLE, S.; HOBSON, J.; KRUTH, S. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 45; n. 9, p. 753-757; 2004.

BINNS, S. H.; DAWSON, S.; SPEAKMAN, A. J.; CUEVAS, L. E.; HART, C. A.; GASKELL, C. J.; MORGAN, K. L.; GASKELL, R. M. A study of feline upper

respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 2, n. 3, p. 123-133, 2000.

BRAILE, D. M.; GODOY, M. F. Teste de diagnostic- versão 1999. Disponível em: <www.braille.com.br/DOWNLOAD/TestDiag.xls>. Acesso em: 31 out. 2010.

BRALEY, J. FeLV and FIV: survey shows prevalence in the United States and Europe. **Feline Practice**, Santa Barbara, v. 22, p. 25-28, 1994.

BRANDT, R.; GRANT, W.; RUDE, T.; SCOTT, F.; STANZ, J.; WILLIAMS, L. A closer look at chlamydiosis in cats (a discussion). **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 81, p.47-47, 1986.

BUTLER J. E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. **Methods**, San Diego, v. 22, n. 1, p. 4-23, 2000.

BUXTON, D.; RAE, A. G.; MALEY, S. W.; THOMSON, K. M.; LIVINGSTONE, M.; JONES, G. E.; HERRING, A. J. Pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 114, n. 3, p. 221-230, 1996.

CALDAS, A. P. F.; LEAL, E. S.; SILVA, E. F. A.; RAVAZZOLO, A. P. Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.20, n. 1, p.20-25, 2000.

CELLO, R.M. Microbiological and immunologic aspects of feline pneumonitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 158, n. 3, p. 932-938, 1971.

CEVENINI, R.; MORONI, A.; SAMBRI, V.; PERINI, S.; LA PLACA, M. Serological response to chlamydial infection in sheep, studied by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. **FEMS Microbiology Immunology**, Amsterdam, v. 1, n. (8-9), p. 459-464, 1989.

COTTON, M. M.; PARTRIDGE, M. R. Infection with feline *Chlamydia psittaci*. **Thorax**, London, v. 53, n. 1, p. 75-76, 1998.

COUTTS, A.; DAWSON, S.; WILLOUGHBY, K.; GASKELL, R. M. Isolation of feline respiratory viruses from clinically healthy cats at UK cat shows. **Veterinary Record**, London, v. 135, n. 23, p. 555-556, 1994.

DICKIE, C. W. Chlamydia infection associated with peritonitis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 176, n. 11, p. 1256-1259, 1980.

DI FRANCESCO, A.; DONATI, M.; BATTELLI, G.; CEVENINI, R.; BALDELLI, R. Seroepidemiological survey for *Chlamydomydia felis* among household and feral cats in northern Italy. **Veterinary Record**, London, v. 155, n. 13, p. 399-400, 2004.

DOVC, A.; VLAHOVIC, K.; SUHADOLC-SCHOLTEN, S.; TOZON, N. Presence of Ig G antibodies against *Chlamydomydia felis* in cats positive to FIV and/or FeLV. **Acta Veterinaria**, Beograd, v. 58, n. 1, p. 17-23, 2008.

EVERETT, K. D. E. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 109-126, 2000.

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 Systematics Bacteriology**, Washington, v. 49, n. 2, p. 415–440, 1999.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 175-1985, 1998.

FUKUSHI, H.; OGAWA, H.; MINAMOTO, N.; HASHIMOTO, A.; YAGAMI, K.; TAMURA, H.; SHIMAKURA, S.; HIRAI, K. Seroepidemiological surveillance of *Chlamydia psittaci* in cats and dogs in Japan. **Veterinary Record**, London, v. 117, n. 19, p. 503-504, 1985.

GAILLARD, E. T.; HARGIS, A. M.; PRIEUR, D. J.; EVERMANN, J. F.; DHILLON, A. S. Pathogenesis of feline gastric chlamydial infection. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 45, n. 11, p. 2314-2321, 1984.

GASKELL, R. M., DAWSON, S. Feline respiratory disease. In GREENE, C.E. (Ed.): **Infections diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p. 346-357.

GASKELL, R. M.; POVEY, R. C. Experimental induction of feline viral rhinotracheitis virus re-excretion in FVR-recovered cats. **The Veterinary Record**, London, v. 100, n. 7, p. 128–133, 1977.

GASKELL, R. M.; POVEY, R. C. Feline viral rhinotracheitis: Sites of virus replication and persistence in acutely and persistently infected cats. **Research in Veterinary Science**, London, v. 27, n. 2, p. 167–174, 1979.

GASKELL, R. M.; POVEY, R. C. Transmission of feline viral rhinotracheitis. **The Veterinary Record**, London, v. 111, n. 16, p. 359-362, 1982.

GETHINGS, P. M.; STEPHENS, G. L.; WILLS, J. M.; HOWARD, P.; BALFOUR, A. H.; WRIGHT, A. I.; MORGAN, K. L. Prevalence of chlamydia, toxoplasma, toxocara and ringworm in farm cats in south-west England. **The Veterinary Record**, London, v. 121, n. 10, p. 213-216, 1987.

GRIFFITHS, P. D.; LECHLER, R. I.; TREHARNE, J. D. Unusual chlamydial infection in a human renal allograft recipient. **British Medical Journal**, London, v. 2, n. 6147, p. 1264-1265, 1978.

GRIFFITHS, P. D.; PLATER, J. M.; HORIGAN, M. W.; ROSE, M. P.; VENABLES, C.; DAWSON, M. Serological Diagnosis of ovine enzootic abortion by comparative inclusion immunofluorescence assay, recombinant lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay, and complement fixation test. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 1512-1518, 1996.

GRIMES, J. E. Detection of Chlamydial Infections. In: ROSSKOPF Jr., W. J.; WOERPEL, R. W. (Ed.) **Diseases of cage and aviary birds**. 3. ed. Malvern: Willians & Wilkins, 1996. p. 827-835.

GRUFFYDD-JONES, T. J.; JONES, B. R.; HODGE, H.; RICE, M.; GETHING, M. A. Chlamydia infection in cats in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 43, n. 5, p. 201-203, 1995.

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**, London, v. 11, n. 7, p. 605-609, 2009.

GUNN-MOORE, D.A.; WERRETT, G.; HARBOUR, D.A.; FEILDEN, H.; GRUFFYDD-JONES, T.J. Prevalence of *Chlamydia psittaci* antibodies in healthy pet cats in Britain. **The Veterinary Record**, London, v. 136, n. 14, p. 366-367, 1995.

HAGIWARA, M.K.; JUNQUEIRA-JORGE, J., STRICAGNOLO, C. Infecção pelo vírus da leucemia felina em gatos de diversas cidades do Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 66, p. 44-50, 2007.

HALÁNOVÁ, M.; SULINOVÁ, Z.; CISLÁKOVÁ, L.; TRBOLOVÁ, A.; PÁLENÍK, L.; WEISSOVÁ, T.; HALÁN, M.; KALINOVÁ, Z.; HOLIČKOVÁ, M. *Chlamydomphila felis* in Cats - Are the Stray Cats Dangerous Source of Infection? **Zoonoses and Public Health**, doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01397.x, 2011.

HANNA, L.; JAWETZ, E.; NABLI, B.; HOSHIWARA, I.; OSTLER, B.; DAWSON, C. Titration and typing of serum antibodies in trich infections by immunofluorescence. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 108, n. 1, p. 102-109, 1972.

HARBOUR, D. A.; GUNN-MOORE, D. A.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; CANEY, S. M.; BRADSHAW, J.; JARRETT, O.; WISEMAN, A. Protection against oronasal challenge with virulent feline leukaemia virus lasts for at least 12 months following a primary course of immunisation with Leukocell™ 2 vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 20, n. 23-24, p. 2866-2872, 2002.

HARGIS, A. M.; GUNN-MOORE, D. A.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; CANEY, S. M.; BRADSHAW, J.; JARRETT, O.; WISEMAN, A. Chlamydial infection of the gastric mucosa in twelve cats. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 20, n. 2, p. 170-178, 1983.

HARTLEY, J. C.; STEVENSON, S.; ROBINSON, A. J.; LITTLEWOOD, J. D.; CARDER, C.; CARTLEDGE, J.; CLARK, C.; RIDGWAY, G. L. Conjunctivitis due to

Chlamydophila felis (*Chlamydia psittaci* feline pneumonits agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. **Journal of Infection**, London, v. 43, n. 1, p. 7-11, 2001.

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. **Veterinary Journal**, London, v.155, n. 2, p. 123–137, 1998.

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C. E.; VIDYASHANKAR, A. N.; JARRETT, O.; EGBERINK, H. F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 9, n. 6, p. 439-445, 2007.

HARTMANN, A. D.; HAWLEY, J.; WERCKENTHIN, C.; LAPPIN, M. R.; HARTMANN, K. Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 12, n. 10, p. 775-782, 2010.

HARTMANN, K.; WERNER, R. M.; EGBERINK, H.; JARRETT, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. **The Veterinary Record**, London, v. 149, n. 11, p. 317-320, 2001.

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

HELPS, C.; REEVES, N.; EGAN, K.; HOWARD, P.; HARBOUR, D. Detection of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 6, p. 2734-2736, 2003.

HELPS, C. R.; LAIT, P.; DAMHUIS, A.; BJÖRNEHAMMAR, U.; BOLTA, D.; BROVIDA, C.; CHABANNE, L.; EGBERINK, H.; FERRAND, G.; FONTBONNE, A.; PENNISI, M. G.; GRUFFYDD-JONES, T.; GUNN-MOORE, D.; HARTMANN, K.; LUTZ, H.; MALANDAIN, E.; MÖSTL, K.; STENGEL, C.; HARBOUR, D. A.; GRAAT, E. A. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydomphila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. **The Veterinary Record**, London, v. 156, n. 21, p. 669-673, 2005.

HOFMANN-LEHMANN, R.; HUDER, J. B.; GRUBER, S.; BORETTI, F.; SIGRIST, B.; LUTZ, H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 7, p.1589-1596, 2001.

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

HOOVER, E. A.; MULLINS, J. L. Feline leukemia virus infection and diseases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 199, n. 10, p. 1287-1297, 1991.

HOOVER, E. A.; KAHN, D. E.; LANGLOSS, J. M. Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). **American Journal of Veterinary Research**, Washington, v. 39, n. 4, p. 541-547, 1978.

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemiavirus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, London, v.125, n. 11, p. 293–97, 1989.

HOSIE, M. J.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 11, n. 7, p. 575-584, 2009.

ISHIDA, T.; WASHIZU, T.; TORIYABE, K.; MOTOYOSHI, S.; TOMODA, I.; PEDERSEN, N.C. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.194, n. 2, p.221–225, 1989.

IWAMOTO, K.; MASUBUCHI, K.; NOSAKA, H.; KOKUBU, T.; NISHIDA, K.; TOSHIDA, T.; YAMANAKA, M. Isolation of *Chlamydia psittaci* from domestic cats with oculonasal discharge in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 63, n. 8, p. 937-938, 2001.

KNOBLOCH, J., BIALEK, R.; MÜLLER, G.; ASMUS, P. Common surface epitope of *Bartonella bacilliformis* and *Chlamydia psittaci*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 39, n. 5, p. 427-433, 1988.

LANG, G. H. Prevalence of antibodies of *Coxiella* and *Chlamydia* spp. in cats in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 33, n. 2, p. 134, 1992.

LAVACH, J. D.; THRALL, M. A.; BENJAMIN, M. M.; SEVERIN, G. A. A cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 10, n. 9, p. 722-727, 1977.

LEVY, J. K.; SCOTT, H. M.; LACHTARA, J. L.; CRAWFORD, P. C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. **Journal of the**

American Veterinary Medical Association, Schaumburg, v. 228, n. 3, p. 371–376, 2006.

LONGBOTTOM, D.; COULTER, L. J. Animal chlamydiosis and zoonotic implications. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 128, n. 4, p. 217-144, 2003.

LOVE, D. N. Review of viral disease of cats. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 48, n. 8, p. 467-471, 1972.

LOW, H. C.; POWELL, C. C.; VEIR, J. K.; HAWLEY, J. R.; LAPPIN, M. R. Prevalence of feline herpesvirus 1, **Chlamydomphila felis**, and Mycoplasma spp DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 68, n. 6, p. 643-648, 2007.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 6, n. 5, p. 287-296, 2004.

LUTZ, H.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; 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**, London, v. 11, n. 7, p. 565-584, 2009.

LUTZ, H.; LEHMANN, R.; WINKLER, G.; KOTTWITZ, B.; DITTMER, A.; WOLFENSBERGER, C.; ARNOLD, P. Feline immuno-deficiency virus in

Switzerland: clinical aspects and epidemiology in comparison with feline leukemia virus and coronaviruses. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 132, p. 217-225, 1990.

MAGGS, D. J. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 94-101, 2005.

MAGGS, D. J.; LAPPIN, M. R.; REIF, J. S.; COLLINS, J. K.; CARMAN, J.; DAWSON, D. A.; BRUNS, C. Evaluation of serologic and viral detection methods for diagnosing feline herpesvirus-1 infection in cats with acute respiratory tract or chronic ocular disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 214, n. 4, p. 502-507, 1999.

MAHONY, J. B.; SCHACHTER, J.; CHERNESKY, M. A. Detection of antichlamydial immunoglobulin G and M antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 18, n. 2, p. 270-275, 1983.

MANNION, P. T., MALLINSON, H., TREHARNE, J. D. Serological Diagnosis with the Chlamydia Spot-IF test. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 35, n. 4, p. 244-248, 1991.

MARKEY, B. K.; MCNULTY, M. S.; TODD, D. Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 36, n. 3-4, p. 233-252, 1993.

MARSILIO, F.; DI MARTINO, B.; AGUZZI, I.; MERIDIANI, I. Duplex polymerase chain reaction assay to screen for feline herpesvirus-1 and *Chlamydophila spp.* in mucosal swabs from cats. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 295-98, 2004.

MASUBUSHI, K.; NOSAKA, H.; IWAMOTO, K.; KOKUBU, T.; YAMANAKA, M., SHIMIZU, Y. Experimental infection of cats with *Chlamydomonas felis*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 64 , n. 12, p. 1165-1168, 2002.

MATTER, L.; BLATTER, S.; SUTER, B.; GERBER, A.; KELLER, A. **Chlamydien Infektion**. Disponível em: <http://www.viomecum.viollier.ch/de/konz/Infektiologie/391-392_Chlamydien.html>. Acesso em : 10 jun. 2006.

MAURIN, M.; EB, F.; ETIENNE, J.; RAOULT, D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: Implications for diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 9, p. 2283-2287, 1997.

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

MILLER, R. J.; CAIRNS, J. S., BRIDGES, S., SARVER, N. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 16, p. 7187-7195, 2000.

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

MOULDER, J.W. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 1, p. 143-190, 1991.

NASISSE, M. P.; DAVIS, B. J.; GUY, J. S.; DAVIDSON, M. G.; SUSSMAN, W. Isolation of feline herpesvirus 1 from the trigeminal ganglia of acutely and chronically infected cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 6, n. 2., p. 102-103, 1992.

NASISSE, M. P.; GUY, J. S.; DAVIDSON, M. G.; SUSSMAN, W. A.; FAIRLEY, N. M. Experimental ocular herpesvirus infection in the cat. Sites of virus replication, clinical features and effects of corticosteroid administration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Philadelphia, v. 30, n. 8, p. 1758-1768, 1989.

NASISSE, M. P.; GUY, J. S.; STEVENS, J. B.; ENGLISH, R. V.; DAVIDSON, M. G. Clinical and laboratory findings in chronic conjunctivitis in cats: 91 cases (1983-1991). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 203, n. 6, p. 834-837, 1993.

NOVOTNEY, C.; ENGLISH, R. V.; HOUSMAN, J.; DAVIDSON, M. G.; NASISSE, M. P.; JENG, C. R.; DAVIS, W. C.; TOMPKINS, M. B. Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. **AIDS**, London, v. 4, n. 12, p. 1213-1218, 1990.

NUNBERG, J. H.; WRIGHT, D. K.; COLE, G. E.; PETROVSKIS, E. A.; POST, L. E.; COMPTON, T.; GILBERT, J. H. Identification of the thymidine kinase gene of feline herpesvirus: use of degenerate oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologs. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 63, n. 8, p. 3240-3249, 1989.

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. **The Veterinary Record**, London, v. 134, n. 15, p. 365-368, 1994.

OHYA, K.; TAKAHARA, Y.; KURODA, E.; KOYASU, S.; HAGIWARA, S.; SAKAMOTO, M.; HISAKA, M.; MORIZANE, K.; ISHIGURO, S.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H. *Chlamydophila felis* CF0218 Is a Novel TMH family protein with

potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 10, p. 1606–1615, 2008.

OHYA, K.; OKUDA, H.; MAEDA, S.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H. Using CF0218-ELISA to distinguish *Chlamydomphila felis*-infected cats from vaccinated and uninfected domestic cats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 3-4, p. 366-370, 2010.

PEDERSEN, N. C.; HO, E. W.; BROWN, M. L.; YAMAMOTO, J. K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, Washington, v. 235, n. 4790, p. 790–793, 1987.

PEELING, R. W.; BRUNHAM, R. C. Chlamydiae as Pathogens: New Species and New Issues. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, n. 4, p. 96-103, 1996.

PEREZ-MARTINEZ, J. A.; STORZ, J. Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by MIF. **Infection and Immunity**, Washington, v. 50, n. 3, p. 905-910, 1986.

PINCHES, M. D.; DIESEL, G.; HELPS, C. R.; TASKER, S.; EGAN, K.; GRUFFYDD-JONES, T. J. An update on FIV and FeLV test performance using a Bayesian statistical approach. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 36, p.141–147, 2007.

POINTON, A. M. NICHOLLS, J. M.; NEVILLE, S. Chlamydia infection among breeding catteries in South Australia. **Australian Veterinary Practitioner**, Sydney, v. 21, p. 58-63, 1991.

POVEY, R. C. Feline respiratory infections – a clinical review. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 17, n. 4, p. 93-100, 1976.

POVEY, R. C. Feline respiratory disease. In GREENE, C. E. (Ed.): **Infections diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p. 346.

POVEY, R. C.; JOHNSON, R. H. A survey of feline viral rhinotracheitis feline picornavirus infection in Great Britain. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 243-247, 1971.

RAMPAZZO, A.; APPINO, S.; PREGEL, P.; TARDUCCI, A.; ZINI, E.; BIOLATTI, B. Prevalence of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus 1 in cats with conjunctivitis in northern Italy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 17, n. 6, p. 799-807, 2003.

RAMSEY, D. T. Feline Chlamydia and Calicivirus infections. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, Philadelphia, v. 30, n. 5, p. 1015-1028, 2000.

RASO, T. F.; GODOY, S. N.; MILANELO, L.; DE SOUZA, C. A.; MATUSCHIMA, E. R.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; PINTO, A. A. An outbreak of Chlamydiosis in captive blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 35, n. 1, p. 94-96, 2004.

RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R.; PINTO, A. A. Chlamydophila psittaci in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato grosso do sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 117, n. 2-4; p. 235-241, 2006.

RECHE JR., A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.34, p.152-155, 1997.

REGAN, R. J.; DATHAN, J. R.; TREHARNE, J. D. Infective endocarditis with glomerulonephritis associated with cat chlamydia (*C. psittaci*) infection. **British Heart Journal**, London, v. 42, n. 3, p. 349-352, 1979.

REUBEL, G. H.; GEORGE, J. W.; BARLOUGH, J. E.; HIGGINS, J.; GRANT, C. K.; PEDERSEN, N. C. Interaction of acute feline herpesvirus-1 and chronic feline immunodeficiency virus infections in experimentally infected specific pathogen free cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 35, n. 1-2, p. 95-119, 1992.

SACHSE, K.; VRETOU, E.; LIVINGSTONE, M.; BOREL, N.; POSPISCHIL, A.; LONGBOTTOM, D. Recent developments in the diagnosis of chlamydial infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 135, n. 1-2, p. 2-21, 2009.

SAIKKU, P.; PAAVONEN, J.; VÄÄNÄNEN, P.; VAHERI, A. Solid-Phase enzyme immunoassay for chlamydial antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 17, n. 1, p. 22-27, 1983.

SALINAS, J.; CARO, M. R.; CUELLO, F. Comparison of different serological methods for the determination of antibodies to *Chlamydia psittaci* in pigeon sera. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 40, n. 4, p. 239-244, 1993.

SANDMEYER, L. S.; WALDNER, C. L.; BAUER, B. S.; WEN, X.; BIENZLE, D. Comparison of polymerase chain reaction tests for diagnosis of feline herpesvirus, *Chlamydophila felis*, and *Mycoplasma spp.* infection in cats with ocular disease in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 51, v. 6, p. 629-33, 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SARMA, P. S.; TSENG, J.; LEE, Y. K.; GILDEN, R. V. Virus similar to RD114 virus in cat cells. **Nature New Biol** , London, v. 244, n. 132, p. 56–59, 1973.

SCHMMER, N.; SCHNORR, K. L.; PEREZ-MARTINEZ, J. A.; STORZ, J. Dominance of Chlamydia psittaci-specific IgG2 subclass in the humoral immune responses of naturally and experimentally infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 311-322, 1987.

SEKI, M. C.; CARRASCO, A. O. T.; MINEO, T. W. P.; RASO, T. F.; PINTO, A. A. DNA detection and evaluation of antibodies against *Chlamydophila felis* in domestic cats from the northeast of the state of São Paulo, Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 15, n. 2, p. 28-42, 2010.

SHEWEN, P. E.; POVEY, R. C.; WILSON, M. R. A comparison of the efficacy of a live and four inactivated vaccine preparations for the protection of cats against experimental challenge with *Chlamydia psittaci*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 44, n. 3, p. 244-251, 1980.

SOUSA, R. L.; MORELI, M. L.; BORGES, A. A.; CAMPOS, G. M.; LIVONESI, M. C.; FIGUEIREDO, L. T.; PINTO, A. A. Natural host relationships and genetic diversity of rodent-associated hantaviruses in southeastern Brazil. **Intervirology**, Basel, v. 51, v. 4, p. 299-310, 2008.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. **Clinica Veterinária**, São Paulo, v. 36, p. 14-21, 2002.

STILES, J. Treatment of cats with ocular disease attributable to herpesvirus infection; 17 cases (1983-1993). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 207, n. 5, p. 599-603, 1995.

STILES, J. Feline herpesvirus. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 1001-1004, 2000.

STILES, J.; MCDERMOTT, M.; BIGSBY, D.; WILLIS, M.; MARTIN, C.; ROBERTS, W.; GREENE, C. Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 338–342, 1997.

STUDDERT, M. J.; MARTIN, M. C. Virus diseases of the respiratory tract of cats. 1. Isolation of feline rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 46, n. 3, p. 99, 1970.

STUDDERT, M. J.; STUDDERT, V. P.; WIRTH, H. J. Isolation of *Chlamydia psittaci* from cats with conjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 57, n. 11, p. 515-517, 1981.

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

SYKES, J. E. Feline upper respiratory tract pathogens: *Chlamydophila felis*. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 23, n. 3, p. 231-241, 2001.

SYKES, J. E.; STUDDERT, V. P.; ANDERSON, G.; BROWNING, G. F. Comparison of *Chlamydia psittaci* from cats with upper respiratory tract disease by polymerase chain reaction analysis of the *ompA* gene. **The Veterinary Record**, London, v. 22, n. 12, p. 310-313, 1997a.

SYKES, J. E.; BROWNING, G. F.; ANDERSON, G.; STUDDERT, V. P.; SMITH, H. V. Differential sensitivity of culture and polymerase chain reaction for detection of feline herpesvirus 1 in vaccinated and unvaccinated cats. **Archives of Virology**, New York, v. 142, n. 1, p. 65-74, 1997b.

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**, Lawrence, v. 13, n. 3, p. 146-152, 1999a.

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**, Lawrence, v.13, n. 3, p. 153-162, 1999b.

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**, New York, v. 401, n. 2, p. 215-227, 2010.

TEIXEIRA, B. M.; RAJÃO, D. S.; HADDAD, J. P. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 939-942, 2007.

TERWEE, J.; SABARA, M.; KOKJOHN, K.; SANDBULTE, J.; FRENCHICK, P.; DREIER, K. J. Characterization of systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 4, p. 259-281, 1998.

THIRY, E.; ADDIE, D.; BELÁK, 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**, London, v. 11, n. 7, p. 547-555, 2009.

TOZON, N.; SCHOLTEN, S.S.; PAVLIN, D.; DOVC, A. Chlamydia felis infection in cats – clinical cases. **Slovenian Veterinary Research**, Ljubljana, v. 43, n.2, p. 109-114, 2006.

TRÁVNICEK, M.; MARDZINOVÁ, S.; CISLÁKOVÁ, L.; VALOCKÝ, I.; WEISSOVÁ, T. Chlamydial infection of cats and human health. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 47, n. 4, p. 441-444, 2002.

VEIR, J. K.; RUCH-GALLIE, R.; SPINDEL, M. E.; LAPPIN, M. R. Prevalence of selected infectious organisms and comparison of two anatomic sampling sites in shelter with upper respiratory tract disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 10, n. 6, p. 551–557, 2008.

VOGTLIN, A.; FRAEFEL, C.; ALBINI, S.; LEUTENEGGER, C. M.; SCHRANER, E.; SPIESS, B.; LUTZ, H.; ACKERMANN, M. Quantification of feline herpesvirus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time TaqMan PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n. 2, p. 519-523, 2002.

VON BOMHARD, W.; POLKINGHORNE, A.; LU, Z.H.; VAUGHAN, L.; VÖGTLIN, A.; ZIMMERMANN, D. R.; SPIESS, B.; POSPISCHIL, A. Detection of novel chlamydiae in cats with ocular disease. **American Journal of Veterinary Research**, Amsterdam, v. 64, n. 11, p. 1421-1428, 2003.

WASMOEN, T.; CHU, H. J.; CHAVEZ, L.; ACREE, W. Demonstration of one-year duration of immunity for an inactivated feline *Chlamydia psittaci* vaccine. **Feline Practice**, Santa Barbara, v. 20, n. 3, 1992.

WERTH, D. The occurrence and significance of *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii* in dogs and cats. A study of the literature. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, München, v. 102, n. 5, p. 156-161, 1989.

WILLS, J. M.; HOWARD, P. E.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in different cat populations in Britain. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 327-339, 1988.

WILLS, J. M.; GRUFFYDD-JONES, T.J; RICHMOND, S.; GASKELL, R. M.; BOURNE, F. J. Effect of vaccination on feline *Chlamydia psittaci* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, p. 2653-2657, 1987.

WILLS, J.; GRUFFYDD-JONES, T. J; RICHMOND, S.; PAUL, I. D. Isolation of *Chlamydia psittaci* from cases of conjunctivitis in a colony of cats. **The Veterinary Record**, London, v. 114, n. 14, p. 344-346, 1984.

YAMAMOTO, J. K; HANSEN, H.; HO, E. W.; MORISHITA, T. Y.; OKUDA, T.; SAWA, T. R.; NAKAMURA, R. M.; PEDERSEN, N. C. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the Continental United States and Canada and possible mode of transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 194, n. 2, p. 213-220, 1989.

YAN, C.; FUKUSHI, H.; MATSUDATE, H.; ISHIHARA, K.; YASUDA, K.; KITAGAWA, H.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. Seroepidemiological investigation of feline chlamydiosis in cats and human in Japan. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.44, n.3, p.155-160, 2000.