

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO DO HERPES VÍRUS FELINO TIPO 1 (HVF-1) PELA
TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM
OS SINAIS OCULARES EM UMA POPULAÇÃO DE GATOS
DOMÉSTICOS**

Celina Bertelli Simões
Médica Veterinária

Araçatuba - SP
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO DO HERPES VÍRUS FELINO TIPO 1 (HVF-1) PELA
TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM
OS SINAIS OCULARES EM UMA POPULAÇÃO DE GATOS
DOMÉSTICOS**

Celina Bertelli Simões
Orientador: Prof. Adj. Dr. Alexandre Lima de Andrade

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Araçatuba - SP

2013

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Simões, Celina Bertelli

S593d

Detecção de herpesvirus felino tipo 1(HVF-1) pela técnica de PCR em tempo real e sua associação com achados oculares em uma população de gatos domésticos / Celina Bertelli Simões.

Araçatuba: [s.n], 2013 76f. il.; +
CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientador: Prof Adj. Alexandre Lima de Andrade

1. Herpesvirus 2. Gatos. 3. Conjuntivite viral 4. Ceratoconjuntivite
5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real I

CDD 636.8112

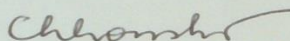
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Deteção do Herpes Vírus Felino Tipo 1 (HVF-1) pela técnica de PCR em tempo real e sua associação com sinais oculares em uma população de gatos domésticos.

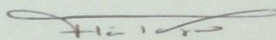
AUTORA: CELINA BERTELLI SIMÕES

ORIENTADOR: Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

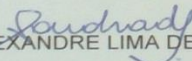
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.



Dra. CRISTIANE DOS SANTOS HONSHO

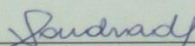


Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO



Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

DATA DA REALIZAÇÃO: 3 de setembro de 2013.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CELINA BERTELLI SIMÕES - Filha de Reinaldo Henrique Fernandez Simões e Rosemeiri Bertelli Simões nasceu na cidade de Bauru, São Paulo, no dia 15 de junho de 1985. É médica veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araçatuba, SP em 2008. Durante o curso de graduação foi bolsista de iniciação científica pela Fapesp. Em 2009 ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional (residência) em Medicina Veterinária na área de clínica, cirurgia e anestesiologia de pequenos animais, no Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”- Centro Universitário de Rio Preto, São José do Rio Preto, SP. Nesta mesma instituição, cursou pós-graduação *latu sensu* na área de clínica e cirurgia de pequenos animais também com início no ano de 2009. Em março de 2011, ingressou no curso de pós-graduação em ciência animal, área de concentração em fisiopatologia médica e cirúrgica, na FMVA – UNESP, Campus de Araçatuba, SP, sob orientação do Professor Adjunto Doutor Alexandre Lima de Andrade, sendo bolsista de mestrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP (nº do processo 2011/05010-9).

***“Para cada esforço disciplinado
há uma retribuição múltipla”***

Jim Rohn

***A todos que percorrem o árduo caminho em busca do conhecimento
científico,
Dedico...***

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Reinaldo e Rosemeiri, e à minha irmã Luiza, que estiveram incondicionalmente ao meu lado em todas as minhas escolhas e sem os quais jamais teria alcançado meus objetivos.

Ao meu companheiro Amaury por todo apoio, carinho e compreensão.

Ao professor Alexandre Lima de Andrade pela orientação, disponibilidade, colaboração e conhecimentos transmitidos.

À professora Tereza Cristina Cardoso Silva por possibilitar a realização das análises moleculares deste trabalho.

À professora Sílvia Helena Venturoli Perri e à amiga Denise Bueno pelo apoio e auxílio na realização das análises estatísticas.

A todos os amigos e aqueles que, de uma maneira ou outra, estiveram sempre presentes.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de auxílio financeiro (processo nº 2011/05010-9).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
SUMMARY	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. O globo ocular	15
2.2. A Córnea	14
2.3. A conjuntiva	17
2.4. O Complexo Respiratório Felino (CRF)	17
2.5. Herpes vírus Felino tipo 1 (HFV-1)	20
2.5.1. Caracterização do agente	20
2.5.2. Transmissão e Patogenia	21
2.5.3. Manifestações Clínicas	22
2.5.4. Principais Manifestações Oculares	23
2.5.4.1. Conjuntivite	24
2.5.4.2. Ceratites	25
2.5.4.3. Ceratoconjuntivite Seca (CCS)	27
2.5.4.4. Sequestro Corneal	28
2.5.4.5. Ceratite Eosinofílica	29
2.5.5. Diagnóstico do HFV-1	29
2.5.6. Tratamento	31
2.5.6.1. Terapias adjuvantes	36
2.5.7. Controle e Profilaxia	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. População de animais estudada	40
3.2. Exame Físico Geral e Oftálmico	40
3.3. Procedimentos de colheita dos fragmentos conjuntivais	41
3.4. PCR em tempo real	43
3.4.1. Extração do DNA	43
3.4.2. Amplificação do DNA por tecnologia TaqMan	43
3.5. Análise Estatística	44
4. RESULTADOS	44

5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERENCIAS	61
8. ANEXO.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

µl - Microlitro

CRFK - “Crandell Rees feline kidney” (células renais felinas de Crandell Rees)

Ct - “Cycle threshold” (número do ciclo durante o qual a emissão de fluorescência ultrapassa o limiar)

CVF - Calicivírus felino

DNA - “Deoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucleico)

EDTA - “Ethylenediaminetetraacetic acid” (ácido etilenodiaminotetracético)

ELISA - “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ensaio imunoenzimático)

EUA - Estados Unidos da América

FAM – Corante fluorescente

FeLV - “Feline leukemia vírus” (vírus da leucemia felina)

FIV - “Feline immunodeficiency vírus” (vírus da imunodeficiência felina)

g - Grama

HVF-1 - Herpesvírus felino-1

IFN - Interferon

kg - Quilograma

M. felis - *Mycoplasma felis*

mg - Miligrama

ml – Mililitro

NaCl – Cloridrato de sódio

ng – Nanograma

nM - Milimolar

PCR - “Polymerase chain reaction” (reação em cadeia da polimerase)

RNA - “Ribonucleic acid” (ácido ribonucleico)

RT-PCR - “Reverse transcription-PCR” (PCR com transcrição reversa)

UI - Unidades internacionais

DETECÇÃO DO HERPESVIRUS FELINO TIPO 1 (HVF-1) PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS SINAIS OCULARES EM UMA POPULAÇÃO DE GATOS DOMÉSTICOS

RESUMO – O presente estudo buscou detectar o herpesvirus felino tipo 1 (HVF-1) em fragmentos de conjuntiva de uma população de gatos pela técnica de PCR em tempo real. Além disso, procurou-se associar estes resultados aos sinais oculares verificados nestes animais. Para isso, foram utilizados 70 gatos, que conviviam em contato direto, provenientes de uma residência da cidade de Araçatuba, SP. Por meio de PCR em tempo real, foi detectado DNA de HVF-1 em 78,1% (25/32) dos gatos com ao menos um sinal ocular e em 26,3% (10/38) dos assintomáticos, totalizando uma prevalência de 50% (35/70) na amostra global. Nos animais com sinais de conjuntivite, em 60% (21/35) dos gatos positivos havia ao menos um destes sinais e nenhum destes nos 40% (14/35) restantes. Nos gatos com sinais de ceratite, em 49% (17/35) dos positivos havia ao menos um destes sinais e nenhum deste nos 51% (18/35) restantes. Foi detectada a presença de HVF-1 em todos (17/100%) os gatos com defeito epitelial corneal. Houve associação significativa entre a presença de ao menos um sinal ocular, ao menos um sinal de conjuntivite e de ceratite com os resultados do PCR. Em relação a cada sinal ocular, somente o defeito epitelial corneal e o blefarospasmo tiveram associação significativa com estes resultados e também estavam associados entre si, sugerindo que, nos gatos com sinais de ceratoconjuntivite, o defeito epitelial corneal pode ser um fator de influência ao surgimento do blefarospasmo. A elevada prevalência da infecção ocular por HVF-1 encontrada nos animais com sinais oculares sugere o agente como possível causador destas lesões.

Palavras-chave: Ceratite Herpética, Ceratoconjuntivite, Conjuntivite Viral, Gatos, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

**DETECTION OF FELINE HERPESVIRUS TYPE 1 (FHV-1) FOR REAL-TIME
PCR AND ITS ASSOCIATION WITH THE OCULAR SIGNS IN A
POPULATION OF DOMESTIC CATS**

SUMMARY – This study aimed to detect feline herpesvirus type 1 (FHV-1) in the conjunctival fragments of a cat population by PCR real-time. In addition, we sought to associate these results to ocular signs observed in these animals. For this, we used 70 cats that lived in direct contact, from a residence from Araçatuba, SP. By means of real-time PCR, DNA was detected FHV-1 in 78.1% (25/32) of cats with at least one ocular sign and 26.3% (10/38) of asymptomatic patients, a total prevalence 50% (35/70) in the sample. In animals with signs of conjunctivitis in 60% (21/35) cats were positive at least one of these signals and none of the 40% (14/35) remaining. In cats with signs of keratitis in 49% (17/35) were positive from at least one of the signals and none of the 51% (18/35) remaining. We have detected the presence of FHV-1 at all (17/100%) cats with corneal epithelial defect. There was a significant association between the presence of at least one eye sign, at least a sign of conjunctivitis and keratitis with PCR results. For each ocular sign, only the corneal epithelial defect and blepharospasm were significantly associated with these outcomes and also were associated with each other, suggesting that, in cats with signs of keratitis, corneal epithelial defect may be a factor influencing the emergence of blepharospasm. The high prevalence of ocular infection by FHV-1 found in animals with ocular signs suggested as a possible causative agent of these injuries.

Keywords: Herpetic Keratitis, Keratoconjunctivitis, Viral Conjunctivitis, Cats, Real-time Polimerase Chain Reaction

1. INTRODUÇÃO

O gato doméstico (*Felis catus*) é um animal da família dos felídeos. A primeira associação com os humanos da qual se tem notícia ocorreu há cerca de 9.500 anos, mas acredita-se que a domesticação desta espécie seja muito mais antiga. Atualmente, os gatos são bastante populares e criados como animais de companhia.

O aumento na população de gatos favoreceu a disseminação de importantes agentes etiológicos e consequentemente, ocasionou um acréscimo no número de atendimentos clínicos, devido às enfermidades infecciosas, tal como complexo respiratório felino (CRF) (LARA, 2012).

Em gatos domésticos, a infecção pelo vírus da rinotraqueíte felina (Herpesvirus felino tipo 1) é uma enfermidade infecto-contagiosa responsável por doenças do trato respiratório superior (CRF) e por quadros de ceratite e/ou conjuntivite agudas ou crônicas, sendo a causa infecciosa mais estudada na espécie (NELSON; COUTO, 2006; SLATTER, 2005).

No caso do Herpesvirus felino tipo 1 (HVF-1), o emprego de técnicas de diagnóstico molecular tem facilitado a identificação da presença do DNA do vírus em diferentes tecidos oculares (SJODAHL-ESSÉN et al., 2008). No Brasil, a infecção pelo HVF-1 tem sido relatada em vários estados, contudo, pouco se conhece sobre sua prevalência (FRANCO; ROHE, 2007).

Dentro do contexto da medicina felina, em termos mais estritos, a realização de pesquisas que forneçam subsídios científicos ao conhecimento desta enfermidade no país, particularmente com relação à presença direta do agente na população de gatos, pode auxiliar na definição da importância do HVF-1 como causador de doenças oculares em felinos domésticos brasileiros.

Diante disto, o presente estudo buscou detectar a presença de HVF-1 em fragmentos de conjuntiva de uma população de gatos domésticos da cidade de Araçatuba, SP, pela técnica de PCR em tempo real. Além disso, buscou-se

associar estes resultados aos sinais oculares verificados no exame oftálmico destes animais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O globo ocular

O globo ocular ocupa a órbita óssea por inteiro, sendo a pequena quantidade de espaço existente entre os dois preenchida por músculos, fáscia e gordura. A sua função consiste em receber os raios luminosos, convertê-los em impulsos nervosos e transmiti-los aos centros superiores do cérebro (DIESEM, 1986).

É constituído por três túnicas dispostas concêntricamente: a camada externa, formada pela esclera ou esclerótica e pela córnea; a camada média, designada úvea ou túnica vascular e formada pela coroide, corpo ciliar e íris; e a camada interna ou retina. Conservado na sua posição normal pela zônula ciliar (estrutura que se insere no corpo ciliar), localiza-se o cristalino, estrutura biconvexa e transparente, responsável pela focagem dos objetos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Além das três túnicas concêntricas, o globo ocular compreende ainda três compartimentos: a câmara anterior, situada entre a íris e a córnea; a câmara posterior, entre a íris e o cristalino; e a câmara vítrea, localizada atrás do cristalino e delimitada pela retina. A câmara anterior comunica com a câmara posterior através da pupila, sendo ambas preenchidas pelo humor aquoso. A câmara vítrea contém o humor vítreo (DIESEM, 1986).

Os órgãos oculares acessórios são: a fáscia orbital, os músculos extraoculares, as pálpebras, a membrana nictitante, a conjuntiva e o aparelho lacrimal (GELATT, 2003).

2.2. A Córnea

A córnea é o elemento refrativo primário do aparelho visual e constitui o prolongamento anterior da esclera, sendo a zona de transição entre córnea e esclera denominada de limbo (SLATTER, 2005).

A córnea apresenta cinco camadas:

1. Filme lacrimal pré-corneal.
2. Epitélio e membrana basal.
3. Estroma.
4. Membrana de Descemet.
5. Endotélio.

O filme pré-corneal ou lacrimal possui uma espessura variável, em função da exposição do filme à evaporação, durante os intervalos do ato de piscar. Possui estrutura trilaminar composta por uma camada lipídica (secretada pelas glândulas tarsais), uma aquosa (secretada pelas glândulas lacrimais) e uma mucínica (secretada pelas células caliciformes ou Glândulas de Henley) (HERRERA, 2008).

O epitélio corneal é estratificado pavimentoso, possui seis a oito camadas celulares que se renovam a cada dez dias graças a um ciclo biológico de morte celular programado chamado de apoptose. É formado por uma camada de células basais, uma a três camadas de células intermediárias ou aladas e as células superficiais ou escamosas, que compõem uma a duas camadas celulares. As células ligam-se por tonofibrilas ou pontes intercelulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A superfície do epitélio corneal é recoberta por microvilosidades, que são digitações do citoplasma em sentido vertical. Estas estruturas aumentam a superfície de troca metabólica com o filme lacrimal, tal qual a mucosa intestinal. Além de ser um elemento mecânico necessário para a fixação do filme lacrimal sobre a córnea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O estroma corresponde a nove décimos da espessura corneal e é formado por tecido conjuntivo bem especializado, fazendo parte da sua

estrutura as fibras colágenas, substância fundamental amorfa e ceratócitos. Os ceratócitos correspondem a 3% do volume total estromal, são responsáveis pela produção e manutenção da substância fundamental e das fibrilas em caso de perda (SLATTER, 2005).

O espaçamento perfeito entre as fibrilas de colágeno é determinado por vários fatores, como a hidratação da córnea, e a presença de uma série de glicoproteínas e mucopolissacarídeos que possuem carga negativa, as quais ficam distribuídas ao redor das fibrilas de colágeno e se repelem com igual intensidade, de modo que forças positivas e negativas mantêm uma distância perfeita entre as fibrilas, sendo fundamental para manter a transparência da córnea (GELATT, 2003).

A Membrana de Descemet é o limite posterior do estroma e destaca-se facilmente do mesmo. É considerada a membrana basal do endotélio, sendo secretada por ele. Interrompe-se no limbo e é altamente elástica. Contém fibronectina que promove sua aderência ao estroma e endotélio. Este é de função vital, pois separa dois meios diferentes: um meio aquoso de outro pobremente hidratado. É uma monocamada celular, com células frágeis ligadas por cimento intercelular (HERRERA, 2008; TURNER, 2010).

O endotélio corneal apresenta mínima capacidade de replicação e quando perdido por trauma, doenças ou cirurgia, o defeito é substituído pela migração de células adjacentes. Com o avançar da idade o número de células endoteliais diminui (TURNER, 2010).

Os tecidos corneais se utilizam do metabolismo da glicose para efetuarem as suas necessidades energéticas. Em decorrência de a córnea ser avascular, o oxigênio é disponível a partir de outras fontes como humor aquoso, filme lacrimal e atmosfera, plexo capilar límbico e capilares da conjuntiva palpebral (SLATTER, 2005). Como não existem vasos no epitélio da córnea, o mecanismo de cicatrização é totalmente dependente de fatores de crescimento e da interação entre as células epiteliais e do estroma. O fator de crescimento epidérmico é um dos fatores de crescimento mais importantes que

induz tanto migração quanto proliferação. Da mesma forma, são também importantes as neurotropinas e interleucinas (GELATT, 2003).

Em sua camada basal, a córnea é intensamente innervada por fibras do nervo trigêmeo. Qualquer distúrbio nessas terminações nervosas pode levar à diminuição da sensibilidade corneal e transtornos de epitelização. A menor migração e proliferação das células da córnea se devem ao fato de que estas terminações nervosas liberam as neurotropinas, que são fundamentais para a cicatrização do epitélio (SLATTER, 2005).

2.3. A conjuntiva

Consiste de uma membrana mucosa de pigmentação variável que se divide em três porções. A conjuntiva nictitante reveste a face interna e externa da membrana nictitante. A conjuntiva palpebral reveste a face interna das pálpebras superior e inferior, refletindo-se nos fórnices dorsal e ventral para se continuar sobre o globo ocular sob a designação de conjuntiva bulbar, a qual cobre a superfície anterior da esclera e episclera (DIESEM, 1986; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Histologicamente, é constituída por um epitélio não queratinizado com células caliciformes e pelo estroma subjacente. O estroma compreende uma camada superficial, com tecido linfóide, e uma camada profunda, onde encontramos tecido conjuntivo, nervos e vasos sanguíneos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.4. O Complexo Respiratório Felino (CRF)

O CRF é o termo utilizado para descrever um conjunto de sinais e sintomas clínicos causados pelos vírus da rinotraqueíte felina, o herpesvirus felino tipo 1 (HV-1) e da calicivirose felina (CVF); pela infecção pela *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydomphila felis* (*C. felis*) e, eventualmente, pelo *Mycoplasma* spp. Dentre os quatro principais agentes etiológicos do complexo, acredita-se que cerca de 80% a 90% dos casos de CRF decorram da infecção

por HVF-1 e/ou CVF, considerados seus agentes primários (KANG; PARK, 2008). Em associação ou separados, ambos ocasionam quadro clínico de espirros, secreção nasal e ocular, dispneia, conjuntivite e tosse. Além disso, os gatos com calicivirose apresentam ulcerações orais e estomatites crônicas. Deve-se enfatizar que os animais curados da infecção tornam-se portadores e, obviamente, são fontes de infecção para outros gatos (CAI et al., 2002; GASKELL et al., 2007; LOW et al., 2007; MITCHEL, 2006).

Alguns fatores relacionados ao hospedeiro são considerados predisponentes para ocorrência do CRF, sendo que, entre estes, se destacam o estresse provocado pela aglomeração de animais em gatis e abrigos públicos, o transporte e o estado fisiológico do gato (GLASKELL et al., 2007; ORIÁ et al., 2012). Fatores fisiológicos que podem provocar estresse nos animais incluem: prenhez, lactação, estro, ou outras doenças sistêmicas concomitantes. Já os eventos exógenos se relacionam a mudança de ambiente, à introdução de novos indivíduos, sejam eles o homem ou animais no habitat e administração de corticosteroides (GLAZE, 2002; STILES, 2003). Helps et al. (2005) realizaram uma pesquisa para determinar os fatores de risco para CRF, e os resultados demonstraram que a falta de higiene, o contato com cães com doença respiratória e a superpopulação de gatos favorecem a ocorrência da enfermidade. As infecções do trato respiratório superior são consideradas as doenças mais relatadas em 30% da população de felinos que vivem em abrigos nos Estados Unidos (EUA) (BURNS et al., 2011).

A capacidade limitada dos agentes etiológicos em estimular a imunidade tardia nos animais, sem dúvida, contribui para o desenvolvimento de doença crônica e para a dificuldade de limitar a infecção nestes ambientes com aglomerado de animais. A manutenção de um grau de imunidade pode explicar a ausência de sinais respiratórios nos gatos adultos com conjuntivite (GASKELL et al., 2007; STILES, 2003; THIRY, et al., 2009).

O HVF-1 e a *C. felis* são relativamente instáveis fora do corpo, com sobrevivência de menos de 48 horas em estufa a 37°C. Portanto, a

transmissão requer contato íntimo entre os animais infectados e suscetíveis (GRUFFYDD-JONES et al., 2009).

O CVF é um RNA vírus que, diferente do HVF-1, não possui envoltório, dessa forma, é mais resistente no ambiente, podendo sobreviver por semanas fora do hospedeiro, sob condições propícias. Trata-se de um vírus pouco sensível à maioria dos desinfetantes, mas inativado por hipoclorito de sódio (RADFORD et al., 2009; VEIR et al., 2008).

Há vários sorovares do CVF, pois sendo um vírus altamente mutante, possui uma grande variabilidade genética. Diferentes cepas podem apresentar patogenicidades diversas e, dessa forma, alguns deles provocam inúmeras manifestações clínicas, de acordo com a susceptibilidade do animal acometido, desde úlceras orais, doença respiratória e a síndrome hemolítica (ANDREW, 2001; BINNS et al., 2000; MITCHEL, 2006).

A *C. felis* causa conjuntivite importante em gatos e possui potencial zoonótico. Esta afecção geralmente é unilateral, mas pode ser disseminada para o outro olho dentro de sete dias. A rinite pode estar presente. Inicialmente a conjuntiva é rosa-acinzentada e o lacrimejamento aumenta. Dentro de dois dias observa-se um exsudato mucoso evoluindo para purulento. Se não tratada a doença pode resolver-se espontaneamente dentro de alguns meses (GRUFFYDD-JONES et al., 2009; SHEWEN et al., 1978; SYKES, 2005).

O *Mycoplasma* spp. É outra causa de conjuntivite em gatos e, aproximadamente 90% dos gatos normais abrigam o organismo apesar de haver estudos conflitantes (DINNADE et al., 2009; HOLST et al., 2010). Este patógeno causa conjuntivite folicular de aspecto seroso, que se caracteriza pela presença de hipertrofia conjuntival papilar. A secreção pode tornar-se mucopurulenta e causa, frequentemente, a formação de pseudomembranas (HERRERA, 2008; PLONECZKA-JANESCZKO et al., 2011).

Há poucas informações referentes à patogenicidade da *B. bronchiseptica* em gatos. Entretanto, alguns fatores de patogenicidade já foram identificados, os quais permitem concluir que essa bactéria é um patógeno primário do trato respiratório de felinos. Os gatos acometidos apresentam

espirros, secreção oculonasal, tosse, pirexia, letargia e linfadenomegalia submandibular (BANNASCH; FOLEY, 2005). A importância clínica do isolamento positivo da *B. bronchiseptica* não é conhecida, uma vez que a bactéria é isolada de muitos gatos saudáveis. Sua ocorrência tem sido associada aos locais com superpopulação de animais, como gatis e abrigos públicos e os cães com doença respiratória são considerados fatores de risco para os gatos (BURNS et al., 2011).

2.5. Herpesvirus Felino tipo 1 (HFV-1)

2.5.1. Caracterização do agente

O HFV-1, também chamado de vírus da rinotraqueíte felina, pertence à família *Herpesviridae* que é compreendida por vírus que atingem uma ampla miríade de animais e divide-se em três subfamílias: *alpha*, *beta* e *gamma herpesvirinae*. Este patógeno é um típico alphaherpesvírus e sua variação de hospedeiros se restringe aos felídeos (GASKELL et al. 2007; HARA, et al., 1996; STILES, 2003).

O gato doméstico é o principal hospedeiro (THIRY et al., 2009), mas o vírus já foi previamente isolado de outros felinos, incluindo guepardos (*Acinonyx jubatus*) e leões (*Panthera leo*), e anticorpos anti-HFV-1 já foram detectados em pumas (*Felis concolor*) (BINNS et al., 2000).

Assim como outros membros da família *Herpesviridae*, o HFV-1 consiste de um núcleo contendo uma molécula de DNA de fita dupla linear, de um capsídeo icosaédrico envolvido por uma camada protéica amorfa, chamada de tegumento e de um envelope lipoproteico. A presença do envelope lipoproteico torna o HFV-1 relativamente frágil às condições ambientais e aos desinfetantes (STILES, 2003). O vírus perde a infectividade após o contato com isopropanol ou etanol a 70-80% por cinco minutos, formaldeído a 0,2- 0,8% e glutaraldeído a 2% (SOUZA; CALIXTO, 2003).

Apenas se conhece um sorotipo, havendo poucas variações entre as estirpes quando se realiza uma análise por enzimas de restrição. O HFV-1 é

relacionado antigenicamente ao herpesvirus canino, entretanto não se sabe ainda de infecção cruzada entre as espécies (GASKELL et al., 2007). Até ao momento, não há evidências de contágio do vírus para humanos (THIRY et al., 2009).

2.5.2. Transmissão e Patogenia

O HVF-1 é eliminado através das secreções orais, nasais e oculares, dando-se a transmissão principalmente por contato direto com animais infectados que se encontrem em fase de excreção (ou seja, indivíduos com infecção aguda e portadores que sofrem reativação da infecção latente) (NELSON; COUTO, 2006; SOUZA; CALIXTO, 2003). Há infecção primária do epitélio nasal com subsequente proliferação para o saco conjuntival, faringe, traqueia, brônquio e bronquíolos. As lesões são caracterizadas por necrose multifocal do epitélio, com infiltração neutrofílica e inflamação (ANDREW, 2001; SOUZA; CALIXTO, 2003).

Uma vez que o tempo de sobrevivência fora do animal é limitado, a transmissão indireta, por fômites e contaminação ambiental, apenas ocorre em curto prazo, considerando-se relevante nos casos em que os indivíduos são mantidos em grande número num ambiente confinado (GASKELL et al., 2007; STILES, 2003).

Uma viremia transitória associada às células sanguíneas mononucleares pode, raramente, ser observada após a infecção natural. Este fato excepcionalmente é detectado em neonatos, ou também em indivíduos com hipotermia, em que a replicação viral usualmente invade tecidos com baixas temperaturas. As excreções virais têm início 24 horas após a infecção e, geralmente, duram cerca de uma a três semanas. Os quadros agudos são resolvidos em 10 a 14 dias (COHN, 2011; GASKELL et al., 2007).

Após a infecção primária, que ocorre normalmente no animal jovem, cerca de 80% dos gatos tornam-se portadores para o resto da vida. Durante a infecção, o vírus se espalha ao longo dos nervos sensoriais e alcança os

neurônios, particularmente o gânglio trigêmeo, o qual é o principal sítio de latência, sendo o estado de *portador* assim caracterizado (GASKELL et al., 2007; MAGGS, 2005; PARZEFALL et al., 2010).

A reativação viral pode ocorrer de maneira espontânea após a administração de glicocorticoides ou ocorrência de períodos de stress, tais como viagens, mudança de ambiente, parto e lactação. Estes, ao precipitar em excreção viral na gata, levam à infecção da sua descendência, estando a gravidade do quadro clínico desenvolvido pelos filhotes dependente dos níveis de anticorpos de origem materna (GASKELL et al., 2007; HELPS et al., 2005; NELSON; COUTO, 2006; SOUZA; CALIXTO, 2003).

A reativação viral pode, ainda, ser atribuída, em alguns animais, à imunossupressão sistêmica causada pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou pelo vírus da leucemia felina (FeLV) em animais co-infectados com estes patógenos (ANDREW, 2001; HELPS et al., 2005). Nesta fase, o animal excreta ativamente o HVF-1 desenvolvendo, em alguns casos, sinais de doença (GASKELL et al., 2007), o que se designa recrudescência (THIRY et al., 2009).

2.5.3. Manifestações Clínicas

Em animais susceptíveis, a infecção pelo HVF-1 causa doença aguda do trato respiratório superior com elevada morbidade e reduzida mortalidade. Após um período de incubação de dois a seis dias, os sinais clínicos consistem inicialmente em depressão, espirros, inapetência e febre. Segue-se o aparecimento de corrimento seroso nasal e ocular, indicando rinite e conjuntivite (BINNS et al., 2000; SOUZA; CALIXTO, 2003; STILES, 2003).

Posteriormente, devido à infecção bacteriana secundária, o corrimento oculonasal torna-se purulento, podendo haver acúmulo de exsudado seco ao redor das narinas e pálpebras (GLAZE, 2002). Nos casos mais graves, surge tosse e dispneia e, ocasionalmente, desenvolve-se pneumonia viral em animais muito jovens ou debilitados. A ulceração da cavidade oral é rara (LOW et al., 2007; NELSON; COUTO, 2006).

Em alguns casos, a infecção aguda causa lesão permanente da mucosa e dos turbinados, podendo desenvolver-se formas crônicas de rinite bacteriana, osteomielite dos turbinados, sinusite e conjuntivite. As raças braquicefálicas mostram maior tendência para estas complicações (GASKELL et al., 2007; SOUZA; CALIXTO, 2003).

Algumas vezes, surgem alterações reprodutivas, como reabsorção fetal e aborto, caso a fêmea seja infectada durante a gestação. Abortamentos poderão ocorrer como sinais clínicos secundários, embora, em contraste com outros tipos de herpesvirus, não são uma consequência direta à replicação viral. Alternativamente, os filhotes podem nascer infectados ou desenvolver sinais clínicos pouco tempo depois do parto (STILES, 2003).

Alguns animais adultos, quando ocorre reativação da infecção latente, apresentam sinais clínicos, sendo a ceratoconjuntivite o mais comum. Nesta fase, a sintomatologia respiratória é pouco frequente (HERRERA, 2008; THIRY et al., 2009).

É importante salientar que os animais afetados de forma crônica ou recorrente pelo HVF-1 constituem, na realidade, uma pequena minoria dentro da população infectada. Estes indivíduos desenvolvem, provavelmente, respostas imunológicas diminuídas na presença do vírus (MAGGS, 2005).

2.5.4. Principais Manifestações Oculares

O HVF-1 é um importante agente patogênico ocular, podendo originar doença na córnea, na conjuntiva ou em ambas as estruturas (ANDREW, 2001; BINNS et al., 2000).

O aparecimento de conjuntivite severa (com possível formação de simbléfaro em animais jovens), ceratoconjuntivite seca, ceratites (em alguns casos com sequestro corneal em gatos adultos), são as síndromes oculares normalmente observadas em animais portadores do vírus (GOULD, 2011; HERRERA, 2008; SLATTER, 2005).

2.5.4.1. Conjuntivite

É a manifestação ocular mais comum em gatos com sinais agudos da infecção viral (GLAZE, 2002; NASISSE, et al., 1989; STILES, 2003).

Na infecção primária, após o período de incubação de dois a seis dias, ocorre conjuntivite aguda e rinotraqueíte. Os sinais clínicos são caracterizados por conjuntivite uni ou bilateral, com hiperemia da conjuntiva, quemose, blefarospasmo e descarga ocular serosa que pode evoluir para mucopurulenta mesmo sem infecção bacteriana secundária; além da presença de descarga nasal, tosse e espirros (HERRERA, 2008; STILES, 2003; TURNER, 2010).

O curso da doença, em geral, varia de 10 a 14 dias, mas o tempo de incubação e o período de duração estão condicionados à quantidade de vírus inoculado (GLAZE, 2002; THIRY et al., 2009).

Nos gatos recém-nascidos, é típico o desenvolvimento de *ophthalmia neonatorum*, uma conjuntivite grave que ocorre antes da abertura das pálpebras, com infecção bacteriana secundária. Os filhotes em geral, permanecem com os olhos fechados por até 15 dias após o nascimento; se a infecção pelo HVF-1 ocorrer nesse período, grande quantidade de debris inflamatórios pode acumular-se no saco conjuntival. A ação citolítica do vírus no epitélio conjuntival favorece a iniciação de um processo inflamatório, e com isto há o acúmulo de secreção mucopurulenta no saco conjuntival, o que resulta na distensão da pálpebra ainda fechada (ANDREW, 2001; GELATT, 2003; MAGGS, 2005).

A replicação do HVF-1 no interior das células produz efeitos citopáticos resultando na erosão do epitélio (NASISSE et al., 1989). Em quadros crônicos, a conjuntiva pode apresentar ulcerações graves na mucosa, com exposição da substância própria (MAGGS, 2005), podendo ocorrer, ainda, adesão da conjuntiva a si mesma ou à córnea, o que é denominado simbléfaro (ANDREW, 2001; STILES, 2003). Esta afecção pode causar outros problemas oculares significativos incluindo a incapacidade de piscar, obstrução ou destruição dos ductos lacrimais (com resultado funcional de ceratoconjuntivite seca) e

conjuntivalização da córnea, levando ao déficit visual (GOULD, 2011; STILES; PROGRANICHNIY, 2008).

A reativação do vírus latente pode levar ao aparecimento das manifestações oculares, mesmo em gatos que tenham sofrido pré-exposição ao vírus por meio vacinação ou até mesmo em virtude de infecção prévia. Em gatos adultos, a conjuntivite é a afecção ocular mais relatada em episódios de recrudescência, e pode estar associada ou não à doença respiratória (BINNS et al., 2000; HELPS et al., 2005; STILES, 2003).

2.5.4.2. Ceratites

A ceratite ulcerativa felina é um motivo comum de apresentação à consulta e a infecção pelo HVF-1 representa provavelmente a sua causa mais frequente (GELATT, 2003; HARTLEY, 2010a; SLATTER, 2005).

Tem sido sugerido que, na espécie felina, todas as úlceras corneais devem ser atribuídas a este vírus até que se prove o contrário (HARTLEY, 2010a; MAGGS, 2005). Alguns animais afetados são positivos para infecção por FIV ou FeLV e, nestes indivíduos, a ceratite herpética parece resultar de uma infecção oportunista num hospedeiro imunocomprometido (GOULD, 2011; THIRY et al., 2009).

A ceratite herpética é uma afecção que ocorre principalmente nos gatos adultos, resultando normalmente de reativação viral (ANDREW, 2001; SLATTER, 2005), embora também possa surgir durante a infecção viral aguda (GELATT, 2003).

A presença de úlceras corneais dendríticas é considerada patognomônica para a infecção do HVF-1 (GELATT, 2003; HERRERA, 2008; NASISSE et al., 1989; ORIÁ et al., 2012; SLATTER, 2005). A infecção das células epiteliais pelo HVF-1 na infecção primária aguda resulta em lesões corneais lineares ou defeitos epiteliais ramificados e ambos podem ter aparência muito discreta. Desta forma, o exame oftálmico deve ser feito utilizando magnificação e devendo observar a córnea na escuridão com

incidência de uma luz proveniente de azul cobalto após aplicação do corante (HARTLEY, 2010a; SLATTER, 2005; TURNER, 2010).

O corante de Rosa Bengala, bem como o de Verde Lissamina, é utilizado para coloração de células epiteliais corneais mortas ou desvitalizadas, sendo úteis no exame oftálmico para identificação de úlceras dendríticas recentes que, provavelmente, não tiveram perda de epitélio e exposição do estroma corneal. Neste caso, utiliza-se a aplicação tópica de fluoresceína para identificação de possíveis ulcerações corneais (ANDREW, 2001; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Várias úlceras dendríticas podem aumentar de tamanho e coalescerem, originando as úlceras geográficas (MITCHEL, 2006; ROZE, 2005; SLATTER, 2005). Ocasionalmente, estas úlceras podem progredir e envolver o estroma ou mesmo levar ao aparecimento de descemetocelose ou perfuração da córnea (GELATT, 2003; GOULD, 2011; NASISSE et al., 1989).

As úlceras de córnea secundárias ao HVF-1 podem curar de forma espontânea ou se tornar úlceras indolentes crônicas (HARTLEY, 2010a; SLATTER, 2005; STILES, 2003). Estas são pouco frequentes em gatos e caracterizam-se pela presença de úlcera ou erosão corneal superficial não cicatrizante com bordas do epitélio não aderente. O local mais comum para a formação da lesão é a córnea central, sendo os gatos braquicefálicos aqueles considerados os mais predispostos (HERRERA, 2008; ORIÁ; LAUS, 2009).

Muitas vezes, graças aos seus efeitos citopáticos sobre o epitélio da córnea e à supressão da imunidade local, o vírus alcança o estroma corneal, originando uma ceratite estromal. Tal enfermidade é uma reação inflamatória imunomediada, resultante de uma resposta imunopatológica ao antígeno viral mediada por células inflamatórias, em especial os linfócitos. Sendo assim, é secundária à presença do vírus e não causada por uma ação direta do mesmo sobre os ceratócitos (ANDREW, 2001; HARTLEY, 2010a; NASISSE et al., 1989). A ceratite estromal é precedida por ausência prolongada do epitélio corneal, favorecendo alterações inflamatórias crônicas como a fibrose e a vascularização, que podem resultar na opacidade da córnea. Esta lesão

promove um comprometimento da transparência corneal e constitui uma potencial ameaça à capacidade visual (GOULD, 2011; MAGGS, 2005; THIRY et al., 2009).

Raramente, a ulceração provocada pelo HVF-1 evolui para liquefação da córnea (designada ceratomalácia ou *melting* corneal). O estroma assume uma aparência gelatinosa e mostra-se brando e móvel ao toque, podendo surgir um infiltrado leucocitário que lhe confere um aspecto gelatinoso. Neste fenômeno, as proteases endógenas, liberadas pelos neutrófilos e células epiteliais corneais lesionadas, representam uma fonte mais importante de collagenases do que as proteases de origem bacteriana (GOULD, 2011; HARTLEY, 2010a).

Em episódios de reativação do vírus latente, este atua no epitélio corneal provocando lesões em suas camadas (NASISSE, et al., 1989). Nem sempre todas as camadas da córnea são atingidas, sendo incomum a exposição da camada estromal profunda da córnea (HERRERA, 2008; MAGGS, 2005).

2.5.4.3. Ceratoconjuntivite Seca (CCS)

A etiologia da CCS em gatos não foi totalmente esclarecida, mas acredita-se que uma intensa conjuntivite, muitas vezes associada à infecção pelo HVF-1, pode ser a responsável pela oclusão do ducto excretor, ou ainda, provocar uma inflamação intensa da glândula lacrimal, resultando assim em uma diminuição da produção da parte aquosa do filme lacrimal pré-corneal (LIM; CULLEN, 2005; NASISSE et al., 1989; SLATTER, 2005).

A maioria dos gatos desenvolve ceratoconjuntivite seca transitória, voltando à produção lacrimal aos valores normais, com a resolução da doença herpética ativa. Uma pequena percentagem apresenta uma redução permanente na produção de lágrima (ORIÁ; LAUS, 2009; STILES, 2003).

Os sinais clínicos podem incluir hiperemia conjuntival, córnea com aparência ressecada, hiperplasia epitelial corneal, blefaroconjuntivite e ulceração corneal. O diagnóstico baseia-se nos sinais clínicos e no valor do teste de Schirmer (ANDREW, 2001; GELATT, 2003; HERRERA, 2008).

2.5.4.4. Sequestro Corneal

O sequestro corneal é uma condição que acomete as espécies felina e equina caracterizada pela necrose do colágeno da córnea. Existem sinônimos para esta afecção como ceratite necrosante, córnea negra (*cornea nigrum*), necrose da córnea e mumificação corneal focal (FEATHERSTONE et al., 2004; GELATT et al., 1973).

Não há uma predisposição sexual, machos e fêmeas podem ser afetados igualmente. No entanto, parece haver uma predisposição racial nos Persas, Himalaios, Siameses e seus mestiços (FEATHERSTONE; SANSOM, 2004).

A etiologia exata da afecção ainda não foi determinada. Entretanto, sabe-se que a irritação crônica da superfície corneal pode levar à formação do sequestro. Entre as causas mais prováveis são citados: trauma corneal, ceratite ulcerativa crônica, predisposição racial, conformação craniana braquicefálica com lagofalmo, ceratopatia por exposição, entrópion, distiquíase, uso crônico de corticoides, distrofia corneal primária, alteração do metabolismo estromal, distúrbio neurológico, deficiências qualitativas do filme lacrimal e a infecção pelo HVF-1 (CULLEN et al., 2005; FEATHERSTONE et al., 2004).

A aparência clínica desta doença é bem característica. A lesão é invariavelmente pigmentada, desde uma difusa coloração castanha a uma massa negra em região central ou paracentral da córnea. Seu formato pode ser circular ou ovalado e reflete a degeneração do colágeno estromal e acúmulo de pigmento castanho. Em certos casos, pode ocorrer mineralização do estroma necrótico (CULLEN et al., 2005; TOWNSEND et al., 2008).

Normalmente é unilateral, mas a forma bilateral também pode ser observada (ANDREW, 2001; FEATHERSTONE; SANSOM, 2004). A profundidade da lesão no estroma varia, podendo restringir-se à superfície do estroma ou alcançar até mesmo a membrana de Descemet (ANDREW, 2001), com possível perfuração corneal (FEATHERSTONE; SANSOM, 2004).

A lesão pode permanecer estática por muitos anos ou desenvolve-se de maneira rápida em poucos dias ou semanas ou pode desprender-se de forma natural da superfície do estroma (GELATT et al., 1973).

2.5.4.5. Ceratite Eosinofílica

A ceratite eosinofílica, também conhecida como ceratoconjuntivite proliferativa, é uma ceratopatia progressiva e infiltrativa da córnea que ocorre em gatos. Caracteriza-se pelo aparecimento de edema, vascularização e placas róseas e/ou esbranquiçadas na córnea que surgem inicialmente na região temporal do limbo ou, com menor frequência, em sua região nasal, podendo envolver outras estruturas oculares como a conjuntiva bulbar e a membrana nictitante (ALLGOEWER et al., 2001; HERRERA, 2008; ORIÁ et al., 2012; SLATTER, 2005).

Acredita-se que seja causada por uma reação de hipersensibilidade a um estímulo antigênico desconhecido, tendo sido associada ao HVF-1 (GOULD, 2011). Este foi identificado, em gatos com ceratite eosinofílica, em uma percentagem significativamente superior à dos animais saudáveis (HODGES, 2005). Volopich et al. (2005) demonstraram também, nos seus trabalhos, a existência de uma relação entre a presença de eosinófilos na citologia e a detecção do vírus pela técnica de PCR.

2.5.5. Diagnóstico do HVF-1

Os procedimentos que têm sido utilizados no diagnóstico da infecção por herpesvirus felino incluem o isolamento viral, coloração por imunofluorescência indireta e identificação do DNA viral pela técnica de PCR e suas variações. Além do alto custo e da disponibilidade restrita, cada método tem suas próprias limitações para serem empregadas clinicamente (HARTMANN et al., 2010; LOW et al., 2007); .

O prévio tingimento da córnea pela fluoresceína como conduta semiotécnica usual, induz a resultados falso-positivos quando se opta pelo

método de imunofluorescência indireta na identificação do agente (VOGTLIN et al., 2002).

A citologia de impressão pode apontar indícios da infecção, no caso do HVF-1, onde se observam células conjuntivais com corpos de inclusão intranucleares acidofílicos, associados a infiltrados com predomínio de neutrófilos e células gigantes. Estes corpos de inclusão não são constantes e costumam ser apreciados mais comumente durante o processo de infecção primária (SLATTER, 2005; VOLOPICH et al., 2005).

Uma vez que a maioria dos gatos já sofreu exposição ao vírus ou realizou vacinação, a sorologia não é considerada útil no diagnóstico (RAMSEY; TENNANT, 2001).

No caso do HVF-1, o emprego de técnicas de diagnóstico molecular tem facilitado a identificação da presença do DNA do vírus em diferentes tecidos oculares (SJODAHL-ESSÉN et al., 2008).

A utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem-se mostrado efetiva neste sentido, com maior sensibilidade do que as outras técnicas de imunodiagnóstico como o ELISA ou a imunofluorescência (IF) (BURGESSER et al., 1999; MAGGS; CLARKE, 2005; STILES; POGRANICHNIY, 2008; SANDMEYER et al., 2010).

A técnica de PCR permite a identificação e amplificação de amostras extremamente pequenas. Neste sentido, uma modificação da PCR, a “nested-PCR”, que utiliza uma segunda análise, permite melhorar a sensibilidade diagnóstica. A técnica de “nested-PCR” pode revelar resultados falsos-positivos em animais normais; resultados positivos são difíceis de serem interpretados, de modo que o DNA viral pode estar presente em um animal que não apresenta infecção clínica (DEAN et al., 2005; HARA et al., 1996).

Resultados falso-positivos também são possíveis de ocorrer devido à contaminação ambiental presente nos laboratórios que realizam os testes com o DNA viral, que é detectado por esse teste muito sensível (GOULD, 2011; MAGGS; CLARKE, 2005).

Comparada ao PCR convencional, a técnica “real-time” apresenta numerosas vantagens uma vez que o acúmulo de produto final é monitorizado dentro do tubo de reação, não é necessário recorrer a um método de detecção separado, e a duração do processo é assim reduzida, por vezes para menos de uma hora. Além disso, o método “real-time” permite quantificar a quantidade de DNA amplificado (HELPS et al., 2003; VOGTLIN et al., 2002) e apresenta ainda maior sensibilidade e especificidade do que o PCR convencional (HUSSEIN; MENASHY; FIELD, 2008; SJODAHL-ESSÉN et al., 2008; VEIR; LAPPIN, 2010).

Qualquer amostra biológica pode ser utilizada para detectar o vírus; no entanto, devido à sua natureza intracelular obrigatória, esta detecção será tanto mais eficiente quanto maior for o número de células do hospedeiro colhidas. Assim, é mais provável obter resultados positivos numa amostra obtida por biopsia do que numa raspagem; por sua vez, a raspagem apresenta maior sensibilidade do que um esfregaço efetuado com um suabe (MAGGS; CLARKE, 2005).

Normalmente, utiliza-se o material proveniente de uma raspagem ou biopsia conjuntival, de esfregaços orofaríngeos (STILES, 2003) ou conjuntivais (BURGESSER et al., 1999), ou ainda, o epitélio corneal proveniente do desbridamento de uma úlcera (STILES, 2003).

Uma pequena amostra de conjuntiva pode ser obtida sob anestesia tópica (uma gota de colírio anestésico a cada 30 segundos por 3 minutos) e, por elevação da conjuntiva bulbar com uma pinça tecidual de Adson, é realizada a colheita de um fragmento de conjuntiva com o auxílio de uma tesoura de estrabismo. A aplicação de fenilefrina a 10% pré e pós-biopsia auxilia no controle da hemorragia local (SLATTER, 2005).

2.5.6. Tratamento

O tratamento da conjuntivite depende da gravidade do quadro clínico e se está, ou não, acompanhada de ceratite ulcerativa. A conjuntivite sem ulceração corneal pode ser tratada somente com antibióticos tópicos,

profilaticamente, a exemplo da tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, ou gentamicina (HERRERA, 2008; SLATTER, 2005). Nos casos de *ophthalmia neonatorum*, deve-se abrir prematuramente as pálpebras com o auxílio de uma tesoura de tenotomia de ponta romba, após o que se recomenda tratar a infecção bacteriana secundária e realizar a lavagem frequente dos olhos e das pálpebras para prevenir recorrências (GELATT, 2003; HERRERA, 2008).

É contra-indicado o uso de colírios e pomadas oftálmicas a base de corticosteroides nos casos de conjuntivite com ulceração corneal concomitante (HERRERA, 2008; SLATTER, 2005). Estes fármacos potencializam a ação das collagenases, especialmente nas ceratites herpéticas, estimulando a transição da ceratite epitelial para o estroma e supressão da resposta imunológica, favorecendo a disseminação das partículas virais (HARTLEY, 2010b; ORIÁ; LAUS, 2009).

As úlceras de córnea provocadas pelo HVF-1 requerem, além do tratamento etiológico, medidas terapêuticas gerais que são independentes da causa da úlcera (NELSON; COUTO, 2006). Dentre elas estão a administração tópica de antibiótico e, nas úlceras profundas (em que há perda de estroma), acompanhadas frequentemente de uveíte, atropina tópica a 1% para contrariar o espasmo do músculo ciliar e assim aliviar a dor (HARTLEY, 2010b; LAPPIN, 2008; SLATTER, 2005).

As anticolagenases e antiproteases tópicas são importantes em caso de ceratomalácia, devendo-se aplicar com intervalos de uma a duas horas. Várias substâncias têm sido sugeridas para esta função, incluindo a acetilcisteína, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), a heparina, tetraciclina e ainda plasma e soro (HARTLEY, 2010b; MAGGS, 2009; SLATTER, 2005).

Se a úlcera evoluir para descemetocel, deve-se intervir cirurgicamente, a fim de se realizar um enxerto conjuntival ou de membranas biológicas (HARTLEY, 2010c; HERRERA, 2008; SLATTER, 2005). Segundo Barros et al. (2005), membranas biológicas têm sido uma alternativa cirúrgica para reparar defeitos da superfície ocular para várias condições na córnea e na esclera. A membrana amniótica consiste de um epitélio, membrana basal e estroma que

facilitam a migração de células epiteliais. Além disso, reforça a adesão das células epiteliais basais, promove a diferenciação epitelial, reduz a apoptose das células epiteliais, diminui a atividade antiprotease e minimiza a cicatriz corneal. Em seu estudo, realizou-se a ressecção do tecido aderente presente no bulbo do olho de um felino com simbléfaro, e protegeu-se a superfície corneal com membrana amniótica canina congelada. No pós-operatório, utilizou-se colírio antimicrobiano a base de tobramicina 0,3%, a cada seis horas e colírio de anti-inflamatório a base de diclofenaco de sódio a 0,1%, a cada oito horas. Após 30 dias da cirurgia, notava-se apenas um leucoma corneal central e o simbléfaro resolvido.

Na presença de sinais oculares graves, persistentes ou recorrentes, e quando há envolvimento da córnea, particularmente se existe ulceração, recomenda-se a utilização de antivirais (MAGGS, 2005), que devem ser administrados durante um período mínimo de duas semanas, continuando-se pelo menos por uma semana após a resolução dos sinais clínicos (GOULD, 2011; HARTLEY, 2010b; MAGGS, 2009).

Numerosos agentes têm sido propostos para o tratamento da ceratite herpética, notadamente a trifluorotimidina (trifluridina), a idoxuridina, a vidarabina, a bromovinildeoxuridina, o aciclovir, o valaciclovir, o ganciclovir, o penciclovir, o famciclovir, o cidofovir e o foscarnet (HARTLEY, 2010b). Com exceção do foscarnet, que é um análogo dos pirofosfatos, estes compostos pertencem ao grupo dos análogos de nucleosídeos (HUSSEIN; MENASHY; FIELD, 2008; MAGGS, 2009).

Os análogos nucleosídeos inibem a replicação viral ao integrarem o genoma viral durante este fenômeno, criando assim um “falso” DNA, portanto são considerados agentes virostáticos (MAGGS, 2005). Estes compostos têm geralmente boa atuação contra os herpesvirus humanos, mas até ao momento, nenhum antiviral foi desenvolvido especificamente para gatos, e, portanto, para o HVF-1 (GASKELL et al., 2007; MAGGS, 2010). Uma vez que o vírus reside no interior das células e utiliza as organelas intracelulares, os compostos antivirais são geralmente tóxicos para o hospedeiro, o que limita

significativamente a sua administração sistêmica, mas raramente a aplicação tópica (MAGGS, 2005; MAGGS, 2010). A utilização destes compostos não deverá nunca substituir a administração de antibióticos quando uma infecção bacteriana secundária estiver presente (GOULD, 2011; MAGGS, 2005).

Uma vez que os referidos medicamentos têm ação virostática, recomenda-se uma elevada frequência de administração. Esta exigência é normalmente de difícil cumprimento por parte dos proprietários. Além disso, a maioria destes produtos causa irritação local (ANDREW, 2001). Muitos gatos não toleram um tratamento tão intensivo, que pode assim, uma vez que o *stress* desempenha um papel importante na patogenia da doença, tornar-se mesmo contraproducente (HARTLEY, 2010b).

A eficácia *in vitro* é considerada máxima para a trifluridina, seguindo-se, por ordem decrescente, a idoxuridina, vidarabina, bromovinildeoxuridina e aciclovir (GOULD, 2011; NASISSE, et al., 1989).

Maggs e Clarke (2005) relataram, em células renais felinas de Crandell Rees (CRFK) infectadas com HVF-1, uma eficácia superior da idoxuridina e do ganciclovir em relação ao cidofovir e ao penciclovir que, por sua vez, ultrapassaram o aciclovir e o foscarnet.

Atualmente, a trifluridina e a idoxuridina são considerados os antivirais de eleição no tratamento da ceratite herpética felina (MAGGS, 2005). Durante muitos anos, a trifluridina ocupou o lugar de maior importância; no entanto, devido à irritação e toxicidade que decorrem da sua aplicação tópica, tem vindo a ser substituída pela idoxuridina, que apresenta a vantagem adicional de ser mais económica (VAN DER MEULEN et al., 2006). Stiles (2003) recomenda para ambas, a dose de uma gota, quatro a seis vezes por dia, devendo o tratamento prolongar-se por duas a três semanas. A trifluridina deve ser utilizada numa concentração de 1%, enquanto a idoxuridina, na concentração de 0,1%, ambas administradas por via tópica ocular.

A vidarabina é bem tolerada e também utilizada de forma tópica (MAGGS, 2005), tal como o aciclovir, cujo uso sistêmico se encontra associado

à supressão da medula óssea, com neutropenia e anemia, e o ganciclovir, que ainda não foi testado no gato (HARTLEY, 2010b).

O famciclovir, antiviral sistêmico e precursor do penciclovir, parece ser eficaz nos animais com sinais oculares e no tratamento da dermatite e rinossinusite associadas ao HVF-1, mostrando-se bem tolerado pelo organismo. Pelo contrário, o valaciclovir, precursor do aciclovir, não exerce qualquer efeito sobre a replicação do HVF-1 e pode conduzir a displasia mielóide fatal, não devendo ser utilizado (HARTLEY, 2010a).

O cidofovir diminuiu significativamente a excreção viral e a gravidade dos sinais clínicos em gatos inoculados com HVF-1, quando aplicado duas vezes por dia sob a forma de uma solução a 0,5% em ambos os olhos, durante dez dias. Não foram detectados efeitos adversos nestes animais (FONTENELLE et al., 2008). Num estudo *in vitro*, o penciclovir mostrou ser um potente inibidor do vírus, com superioridade sobre o cidofovir e aciclovir (HUSSEIN; MENASHY; FIELD, 2008).

Algumas úlceras de córnea secundárias ao HVF-1 curam espontaneamente, enquanto que em outros casos tornam-se indolentes apesar de serem tratadas com antivirais. Nestes casos, faz-se o desbridamento para a remoção do epitélio não aderido juntamente com as partículas virais (STILES, 2003). Após o desbridamento, é recomendada a proteção da córnea com recobrimento de terceira pálpebra ou com o uso de lentes de contato terapêuticas específicas para felinos. Ainda, as membranas biológicas podem ser uma alternativa (HARTLEY, 2010c; STILES, 2003). A ceratotomia em grade é contraindicada, já que esse procedimento pode predispor à formação do sequestro corneal (HERRERA, 2008; SLATTER, 2005).

O sequestro corneal geralmente não é responsivo ao tratamento medicamentoso, sendo a ceratectomia superficial, com ou sem o recobrimento com enxertos conjuntivais, recomendada na maioria dos casos (GOULD, 2011; FEATHERSTONE; SANSOM, 2004).

Nos casos de ceratite proliferativa o tratamento preconizado é a utilização tópica de corticosteroides a base de dexametasona a 0,1% ou de

acetato de prednisolona a 1%, pois irão suprimir a reação inflamatória e consequentemente os sinais clínicos (SLATTER, 2005).

O uso de corticosteroides pode piorar a infecção por HVF-1 tanto na fase ativa quanto na fase latente do vírus (ANDREW, 2001; HERRERA, 2008), além de piorar a cicatrização de uma úlcera de córnea concomitante. Nesses casos, a ciclosporina A a 1% tópica é uma alternativa de tratamento. Porém, a ciclosporina pode causar desconforto ocular e por ser imunossupressora pode também reativar o vírus latente (ALLGOEWER et al., 2001; HODGES, 2005).

Além disso, recomenda-se o uso oral de acetato de magesrol na dose de 5 mg/dia, durante 5 dias, reduzindo a dose a 5 mg em dias alternados, durante uma semana. Ainda, pode-se manter uma dosagem semanal de 5 mg. O acetato de magesrol deve ser usado com cautela, já que pode induzir a diabetes mellitus, piometra, neoplasia mamária, mudanças comportamentais e polifagia (HERRERA, 2008). Em casos crônicos, a lesão pode se apresentar com intensa proliferação, por isso uma ceratectomia superficial pode ser necessária (HERRERA, 2008; HODGES, 2005; SLATTER, 2005).

2.5.6.1. Terapias adjuvantes

Células infectadas com HVF-1 *in vitro* requerem arginina para a replicação viral. Com isso, células privadas de arginina falham no desenvolvimento do efeito citopático associado à replicação viral. Isso é explicado pelo fato da L-lisina ser um aminoácido essencial que limita a replicação viral por competir com a arginina, evitando a sua incorporação dentro do genoma viral. A restrição de arginina não é recomendada, já que ela desempenha um papel importante no ciclo da ureia, ou seja, por meio da enzima arginase a arginina se transforma em ornitina, assim eliminando a amônia (REES; LUBINSKI, 2008; STILES et al., 2002).

Segundo o estudo de Stiles et al. (2002), gatos que receberam L-lisina oral precocemente na dosagem de 500 mg, a cada 12 horas, seis horas antes da infecção experimental, desenvolveram conjuntivite induzida por HVF-1 em

graus menos severos do que os gatos que receberam placebo. Entretanto, o tempo para a resolução dos sinais clínicos não foi diferente entre os grupos. Além disso, esse estudo afirma que a dosagem de 1000 mg diária foi bem tolerada pelos felinos, já que a L-lisina em altas doses apresenta um gosto desagradável.

Maggs (2005) recomenda a administração, em caso de doença aguda, de 500 mg de lisina, por via oral, de doze em doze horas. Nos gatinhos, a dose de 250 mg é mais adequada (STILES, 2003). Esta terapêutica pode também servir como medida profilática a longo termo nos animais que apresentam sinais crônicos recorrentes (MAGGS, 2005), indicando-se a mesma posologia que para a doença aguda. A fim de evitar problemas gástricos, a lisina deve ser dada com alimento (STILES, 2003).

O papel do interferon ômega felino (IFN- ω) e do interferon alfa humano (IFN- α) na terapia antiviral tem sido estudado. Ambos podem ser administrados por via tópica ou oral, sendo que nesta última a absorção pode ser prejudicada uma vez que o aparelho gastrointestinal pode destruir estas moléculas antes que atrevessem a mucosa da orofaringe. Os INF são membros de uma família de citocinas que medeia a imunidade não específica, apresentando funções antivirais, antiproliferativas e imunorreguladoras (HARTLEY, 2010b). Estas citocinas mostram-se ativas contra uma grande variedade de vírus DNA e RNA, podendo inclusive serem utilizados em espécies animais diferentes daquela de onde provêm. Quanto maior a proximidade entre as espécies, maior será a eficácia do IFN e a facilidade com que é tolerado pelo organismo do animal (DOMÉNECH et al., 2011; STILES, 2003).

A dose indicada para o IFN- ω felino é, para a via oral, de 50 a 100 UI/dia. Na administração tópica, recomenda-se diluir 10.000 UI em 19 ml de NaCl a 0,9% e aplicar, então, duas gotas em cada olho, cinco vezes por dia, durante dez dias (THIRY et al., 2009).

Quanto ao IFN- α humano, pode ser administrado por via oral, na dose de 5 a 35 UI a cada vinte e quatro horas, até à resolução dos sinais clínicos (THIRY et al., 2009). Para os casos crônicos pode-se adotar um tratamento em

longo prazo, no qual o animal recebe a referida dose durante sete dias, a que se seguem sete dias de descanso, repetindo-se este ciclo indefinidamente. Também é possível adotar um esquema de administração em dias alternados (LAPPIN, 2008; SLATTER, 2005; SOUZA; CALIXTO, 2003). Na terapêutica tópica, e utilizando uma concentração de 100 a 1000 UI/ml, pode-se empregar a posologia de uma gota, quatro a seis vezes por dia, durante duas a três semanas (HARTLEY, 2010b; STILES, 2003).

A lactoferrina, uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais das mucosas de muitos mamíferos, tem sido sugerida no combate à infecção pelo HVF-1 (MAGGS, 2005), uma vez que, num ensaio realizado *in vitro*, a replicação viral foi inibida pela lactoferrina bovina.

Outras terapêuticas têm sido investigadas, nomeadamente a suplementação oral com *Enterococcus faecium* SF68 para fortalecer a imunidade, diminuindo a reativação viral e o aparecimento de conjuntivite em animais com infecção latente pelo HVF-1. Os resultados obtidos após a sua administração experimental parecem encorajadores, embora sejam necessários mais estudos para determinar a eficácia clínica deste probiótico (LAPPIN et al., 2009).

2.5.7. Controle e Profilaxia

O controle e a profilaxia devem ser realizados mediante vacinação e manejo adequado dos felinos. Sabe-se que a infecção por HVF-1 é altamente prevalente, facilmente transmissível e que a doença pode-se apresentar de maneira severa, por isso a vacinação de todos os felinos é preconizada. A frequência da vacinação depende do risco que cada área apresenta (GASKELL et al., 2007; NELSON; COUTO, 2006; SOUZA; CALIXTO, 2003).

Estão disponíveis vários tipos de vacinas contra HVF-1, e são sempre associadas às vacinas para CVF. Podem ser vacinas vivas modificadas ou inativadas com adjuvante e são administradas por via parenteral, sendo que, em alguns países, está também disponível uma vacina viva modificada para

administração intranasal (LAPPIN et al., 2006; THIRY et al., 2009). Esta vacina viva modificada induz rapidamente o começo da proteção em dois a quatro dias, quando comparada com a vacina injetável, mas existe um pequeno risco de produzir doença respiratória contagiosa. A instilação da vacina no saco conjuntival desenvolve uma grande probabilidade de ocasionar doença ocular (LAPPIN et al., 2006; STILES, 2003).

Sugere-se a primovacinação contra HVF-1 com nove a dez semanas de vida, com repetição da dose entre a 12^o e 14^o semanas de vida e reforço a cada três anos pelo resto da vida (NELSON; COUTO, 2006).

A vacinação para herpesvirus parece ter efeito na contenção de surtos de doença ocular. O uso de vacina viva modificada pode induzir sinais clínicos em alguns felinos. No entanto, sabe-se que a vacinação não necessariamente evita a infecção e, provavelmente, tem pouco efeito no gato que já está infectado ou é um carreador latente do HVF-1 (GELATT, 2003; SOUZA; CALIXTO, 2003).

Os gatos infectados por FIV ou FeLV assintomáticos, com doença crônica estabilizada (como hipertireoidismo e insuficiência renal crônica) e as fêmeas gestantes deverão ser vacinadas, preferencialmente com vacinas inativadas (GASKELL et al., 2007; THIRY et al., 2009).

Juntamente com a profilaxia médica, é necessário ter atenção às medidas de profilaxia sanitária, que são especialmente importantes em locais com um grande número de gatos. O controle dos surtos de rinotraqueíte nesses estabelecimentos é complexo, tornando-se necessário programar medidas específicas, que incluem, além da vacinação, a separação dos animais mais jovens, o isolamento dos indivíduos infectados, a limpeza e desinfecção corretas das instalações e a ventilação adequada do ambiente (SOUZA; CALIXTO, 2003).

Para a prevenção no gato individual, deve-se evitar a exposição aos agentes infecciosos, impedindo o livre acesso ao exterior. Os cuidados de saúde gerais contribuem para o bom estado geral do animal, fortalecendo a imunidade (NELSON; COUTO, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de animais estudada

O estudo foi conduzido junto à residência (abrigo) de uma criadora de gatos domésticos da cidade de Araçatuba sob o consentimento da mesma. O espaço físico contava com uma população de 70 animais sem raça definida, sendo que seis deles apresentavam conformação craniana braquicefálica e foram definidos pela criadora como mestiços da raça Persa. Não foi realizada distinção de sexo na escolha dos animais, sendo 41 machos e 29 fêmeas, todos considerados adultos pela avaliação da dentição.

Todos os gatos deste “abrigo” conviviam em contato direto, o que acarreta condições propícias à presença dos agentes envolvidos no complexo respiratório felino. Os animais se alimentavam de comida caseira e ração seca de diversas marcas. Nenhum dos gatos recebeu qualquer tipo vacina ou tratamento medicamentoso prévio.

Em relação aos aspectos éticos, o presente trabalho obteve aprovação pelo Comitê de Ética Animal com número de processo 584/2013.

3.2. Exame Físico Geral e Oftálmico

Inicialmente, todos os animais foram submetidos ao exame físico geral de rotina avaliando todos os parâmetros clínicos já estabelecidos e consagrados, a fim de determinar o *status* clínico de cada animal, bem como identificar os sinais clínicos sistêmicos relativos ao complexo respiratório felino, ou outra condição clínico-sistêmica.

Ato contínuo e, imediatamente, após a condução do exame físico geral, foi realizado o exame oftálmico de rotina em ambos os olhos, empregando para isso a biomicroscopia com lâmpada em fenda (modelo SL-15, Kowa - Optimed®) e, em alguns animais suspeitos, o teste de tingimento da fluoresceína. Ainda, foram investigados parâmetros clínicos oftalmológicos,

com o preenchimento de ficha específica modificada segundo Andrade et al. (2009), adotando-se os seguintes escores: **blefarospasmo**: (0) ausência, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso; **secreção ocular**: (0) ausência, (1) leve, (2) moderada e (3) intensa; **quemose**: (0) ausência e (1) presença; **vascularização corneal**: (0) ausência, (1) proliferação vascular até 2 mm do limbo, (2) proliferação vascular até 4 mm do limbo, (3) proliferação vascular até 6 mm do limbo e (4) proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual); **defeito epitelial corneal**: (0) ausência - ausência de defeito epitelial, (1) presença de defeito epitelial; **opacidade corneal**: (0) não há dificuldade de observar detalhes da íris, (1) discreta - há borramento dos detalhes da íris, (2) moderada - há dificuldade em definir detalhes da íris e (3) severa - não é possível observar detalhes da íris; **conjuntivalização**: (0) ausência e (1) presença; **descemetocèle**: (0) ausência e (1) presença; **perfuração corneal**: (0) ausência e (1) presença; **hiperemia conjuntival**: (0) ausência, (1) leve, (2) moderada e (3) intensa. Outros testes diagnósticos e exames oftalmológicos foram empregados na semiotécnica oftálmica (Andrade, 2004).

Posteriormente, com base nos sinais oculares detectados, estes animais foram divididos em grupos. Cada um deles foi composto por gatos com ao menos um dos seguintes sinais: Blefarospasmo, Secreção Ocular, Quemose e/ou Hiperemia Conjuntival (Grupo Conjuntivite) ou Defeito Epitelial Corneal, Opacidade Corneal e/ou Vascularização Corneal (Grupo Ceratite).

3.3. Procedimentos de colheita dos fragmentos conjuntivais

Após o término do exame físico geral e oftálmico, os 70 animais foram conduzidos ao procedimento de colheita das amostras do tecido conjuntival.

Sob jejum alimentar e hídrico de doze e duas horas, respectivamente, os indivíduos foram canulados com cateter (Safelet – Nipro Medical Ltda) através da veia cefálica e submetidos à fluidoterapia com solução de Ringer com Lactato (Ringer com Lactato de Sódio® - JP Indústria Farmacêutica S.A.) na taxa de infusão de 10 ml/kg/hora. Foi realizada a analgesia com a

administração de cloridrato de tramadol (Tramal® - Pfizer) na dose de 3,0 mg/kg, seguida de anestesia dissociativa, empregando-se midazolam (Dormonid® - ROCHE) na dose de 0,5 mg/kg e cloridrato de cetamina (VETASET® - Fort Doge) na dose de 9,0 mg/kg, ambos por via intramuscular. Além disso, foi realizada anestesia tópica empregando-se colírio a base de cloridrato de proximetacaína (Anestalcon® - Alcon).

A colheita dos fragmentos conjuntivais foi realizada com auxílio de tesoura de íris reta e pinça anatômica de ponta fina, estéril (Figura 1). Em casos onde havia manifestações de sinais oculares bilaterais, optou-se por realizar a colheita no olho, cuja apresentação do sinal clínico era mais expressiva, evitando-se, portanto, maior incomodo ao animal.

Após a realização do procedimento de coleta, foi aplicada topicamente pomada oftálmica a base de tobramicina 0,3% (Tobrex® - Alcon). Todos os procedimentos de colheita foram conduzidos respeitando-se os critérios de assepsia, com uso de material estéril, evitando-se, portanto, riscos de contaminação e infecção.

As amostras colhidas (fragmentos de aproximadamente 3,0 mm) foram introduzidas em microtubos tipo Eppendorf estéreis e transportadas sob refrigeração em caixa de isopor com gelo até o laboratório, para então serem acondicionadas em freezer -80°C, para posteriormente serem processadas. O tempo de transporte das amostras não excedeu 60 minutos.

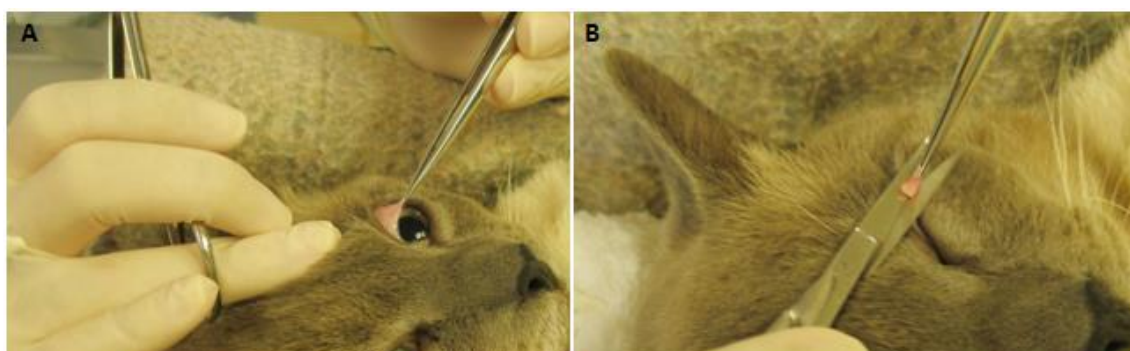


FIGURA 1 – Imagens fotográficas do procedimento de coleta de fragmento conjuntival em globo ocular esquerdo do animal número 37. Em **A** observa-se a exposição da conjuntiva palpebral superior. Em **B** observa-se o recorte de um fragmento conjuntival com tesoura de íris.

3.4. PCR em tempo real

3.4.1. Extração do DNA

Para a realização das análises de PCR em tempo real para detecção do HVF-1, os DNAs das amostras foram extraídos de acordo com o protocolo viral DNA/RNA “Purelink Purification” (Invitrogen®). Aproximadamente 100 ng do DNA total de cada amostra foi utilizado na reação.

3.4.2. Amplificação do DNA por tecnologia TaqMan

O protocolo utilizado foi o mesmo descrito por Vogtlin et al. (2002) e por Swenson et al. (2012). A reação de amplificação de DNA foi realizada no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, câmpus de Araçatuba, pelo sistema de detecção de sequência “ABI Prism 7700” (Applied Biosystems™). Os “primers” e sonda foram designados com o “Software Primer Express” (versão 1.0, Applied Biosystems™) para amplificar uma sequência de 81 pares de bases a partir do gene da glicoproteína B (GB) do HVF-1 (“GenBank” adesão S66371). Os “primers” e a sonda foram sintetizados pela Applied Biosystems™.

A amplificação por PCRTaqMan foi realizada utilizando o “primer forward” 5′ AGA GGC TAA CGG ACC ATC GA 3′, o “primer reverse” 5′ GCC CGT GGT GGC TCT AAA C 3′ e a sonda 5′ FAM-TAT ATG TGT CCA CCA CCT TCA GGA TCT ACT GTC GT-TAMRA 3′. Para tanto, foi utilizado 25,0 µl de uma mistura de reação, contendo 12,5 µl de Mastermix (Applied Biosystems™), 0,5 µl (400 nM) de cada iniciador, 0,2 µl (80 nM) de sonda, 1,3 µl de água estéril, e 10 µl do DNA extraído. As condições foram definidas da seguinte forma: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos, consistindo de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e alongamento sob aquecimento a 60°C, durante 1 minuto.

O fragmento amplificado das 70 amostras foi detectado pela emissão de fluorescência do corante FAM devido à deslocação da sonda pela atividade de

exonuclease 5'-3' da DNA polimerase, no equipamento de PCR "real-time". A análise foi realizada pelo "Software OneStepPlus" (versão 2.2.2, Applied Biosystems™).

Considerando o ponto de corte (C_t = "threshold") igual a 25, todas as amostras positivas foram amplificadas acima de 25 ciclos. Como controle positivo para a reação foi utilizada a vacina comercial contra a rinotraqueíte felina Felocell® CVR-C (Laboratórios Pfizer Ltda). Como controle negativo foi utilizada água ultra-pura desde a fase de extração de ácidos nucleicos até a amplificação.

3.5. Análise Estatística

A descrição dos achados oculares clínicos foi apresentada por meio de frequência absoluta (n) e proporção de ocorrência (%).

As seguintes variáveis foram avaliadas quanto a associação com os resultados do PCR em tempo real: sexo; presença de ao menos um sinal ocular; cada um dos sinais oculares encontrados individualmente e os sinais oculares divididos nos grupos conjuntivite e ceratite. Além disso, foi avaliada a presença de associação entre os sinais blefarospasmo e defeito epitelial corneal.

Para todas as análises foi utilizado o teste de Qui-quadrado e as associações significantes determinadas para valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS® versão 10.5.

4. RESULTADOS

Do total de animais incluídos no estudo, 32 (45,7%) deles apresentaram ao menos um sinal clínico ocular, sendo 38 (54,3%) restantes, considerados assintomáticos. Dentre os sintomáticos, apenas três (9,4%) apresentaram lesões em ambos os olhos e 29 (90,6%) de forma unilateral. Não houve

associação entre os achados do exame oftálmico e os resultados do PCR quanto ao sexo dos animais ($p>0,05$).

As alterações oculares encontradas foram: presença de **blefarospasmo** (19; 27,14%); **defeito epitelial corneal** (17; 24,3%) (Figura 2A); **secreção ocular** (12; 17,1%); **hiperemia conjuntival** (12; 17,1%); **quemose** (2; 2,9%); **vascularização corneal** (2; 2,9%) (Figura 2B); **opacidade corneal** (1; 1,4%) e **conjuntivalização** (1; 1,4%). Em nenhum dos animais foi observada descemetocelose ou perfuração corneal e, em 26 (81,3%) deles, observou-se a presença de mais de um dos sinais oftálmicos avaliados.

Os achados oculares no exame oftálmico, bem como sua intensidade de manifestação, estão apresentados na Tabela 1 e no Gráfico 1.

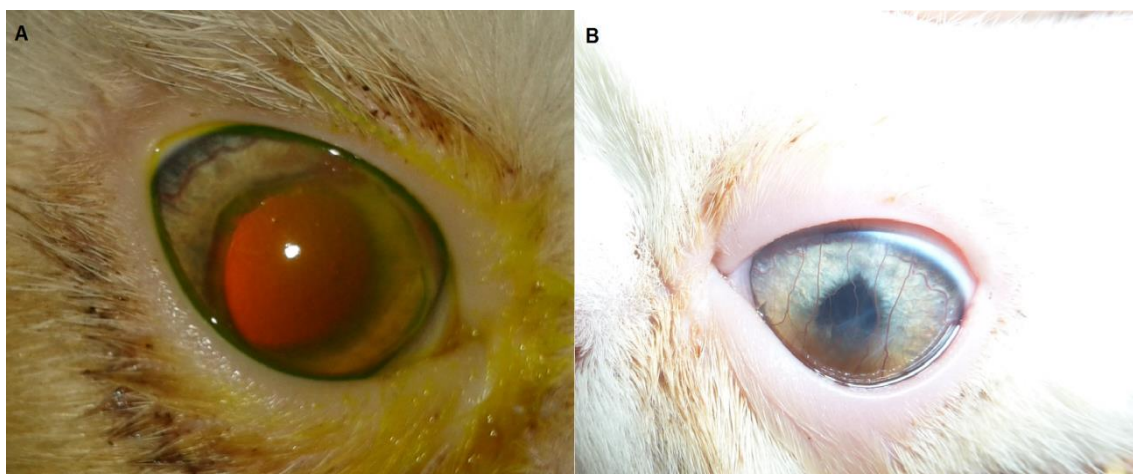


FIGURA 2 – Em **A**, observa-se úlcera de córnea geográfica corada pela fluoresceína no animal identificado pelo número 58. Em **B**, observa-se vascularização corneal intensa e presença de pigmentação de coloração amarronzada em região do polo ventral da córnea no animal identificado pelo número 65.

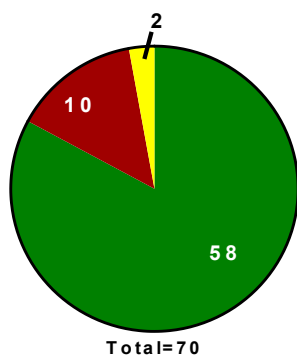
Tabela 1 – Frequência absoluta (n) e proporção relativa (%) de sinais oculares segundo escores, observadas em uma população de 70 gatos da cidade de Araçatuba, SP.

Sinal Ocular	Frequência/Proporção relativa n (%)
Quemose	
0	68 (97,1%)
1	02 (2,9%)
Vascularização Corneal	
0	68 (97,1%)
3	01 (1,4%)
4	01 (1,4%)
Defeito Epitelial Corneal	
0	53 (75,7%)
1	17 (24,3%)
Opacidade Corneal	
0	69 (98,6%)
1	01 (1,4%)
Conjuntivalização	
0	69 (98,6%)
1	01 (1,4%)

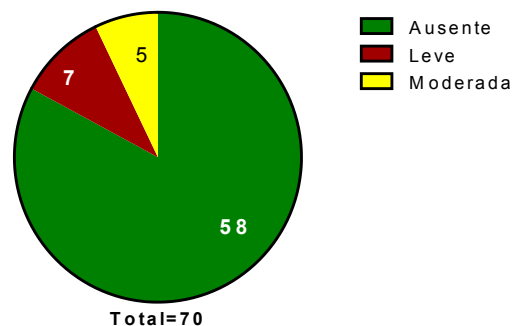
Legenda: **Quemose**: (0) ausência e (1) presença; **Vascularização Corneal**: (0) ausência, (3) proliferação vascular até 6 mm do limbo e (4) proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual); **Defeito Epitelial Corneal**: (0) ausência - ausência de defeito epitelial, (1) presença de defeito epitelial; **Opacidade Corneal**: (0) não há dificuldade de observar detalhes da íris, (1) discreta - há borramento dos detalhes da íris; **Conjuntivalização**: (0) ausência e (1) presença.

A

Intensidade da Secreção Ocular



Intensidade de Hiperemia Conjuntival



B

C

Intensidade do Blefarospasmo

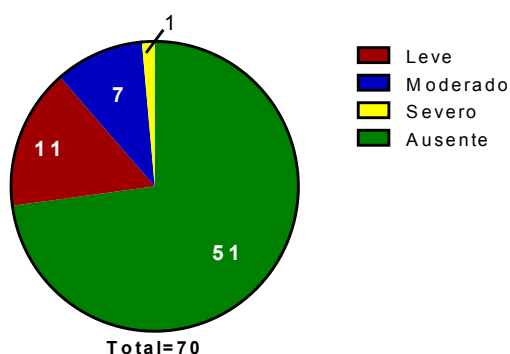


GRÁFICO 1 – Distribuição, em escores, de felinos avaliados na cidade de Araçatuba, SP, quanto a presença de secreção ocular (A), hiperemia conjuntival (B) e blefarospasmo (C).

Em relação ao PCR, foi observado que 28 (73,7%) animais que não manifestaram sinais oculares, tiveram resultados negativos para o PCR. Outros sete (21,9%) gatos, estes portadores de ao menos um dos sinais oculares avaliados, também foram negativos. Além disso, 10 (28,6%) de um total de 35 gatos positivos para o PCR foram assintomáticos, sendo os 25 (71,4%) restantes, portadores de ao menos um sinal ocular. Nos animais avaliados, houve associação significativa entre os resultados do PCR em tempo real e a presença de ao menos um sinal ocular (Tabela 2).

Tabela 2 – Associação entre o número de gatos com ausência ou presença de ao menos um sinal ocular e resultados de PCR, positivo ou negativo, para a infecção por HVF-1.

Sinal Ocular	PCR em tempo real					
	Negativo		Positivo		Total	p
	N	(%)	n	(%)	n (%)	
Ausência	28	73,7	10	26,3	38 (100,0)	0,04
Presença	7	21,9	25	78,1	32 (100,0)	
Total	35	50,0	35	50,0	70 (100,0)	

Legenda: **n(%)**: número absoluto e proporção relativa de gatos; **p**= significância estatística para associações, obtida por meio do Teste Qui-Quadrado.

Em relação ao Grupo Conjuntivite, composto por 28 animais, 21 (60%) gatos foram positivos para o PCR e apresentaram ao menos um dos sinais de conjuntivite (blefarospasmo, secreção ocular, quemose e/ou hiperemia conjuntival), sendo que os outros 14 (40%) animais positivos foram considerados assintomáticos em relação a estes sinais. No caso dos animais com resultados negativos, sete deles (20%) apresentaram ao menos um dos sinais oculares de conjuntivite e, os 28 (80%) restantes eram assintomáticos. Houve associação significativa entre a prevalência de conjuntivite e o resultado do PCR em tempo real (Gráfico 2).

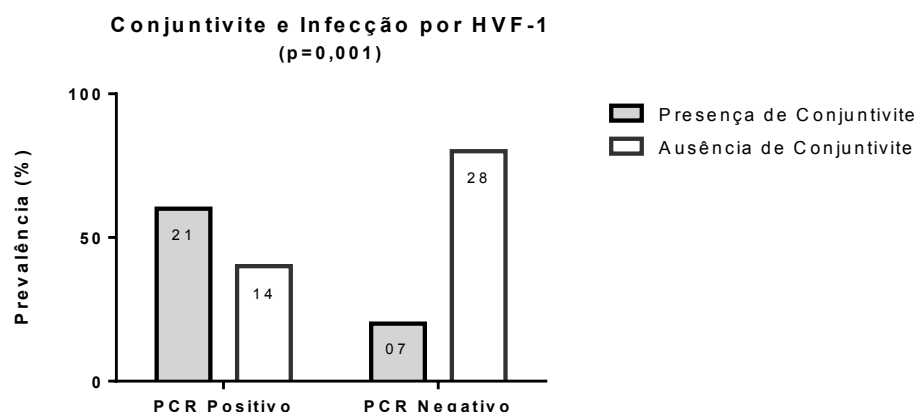


GRÁFICO 2 – Associação entre a prevalência de conjuntivite em gatos com resultados de PCR positivo ou negativo para a infecção por herpesvirus felino tipo 1 (HVF-1). **p**: significância estatística para associações, obtida por meio do Teste Qui-Quadrado.

Em relação ao Grupo Ceratite, composto por 17 animais, 17 (49%) dos gatos com resultado positivo para o PCR manifestaram ao menos um dos sinais de ceratite (defeito epitelial corneal, vascularização e/ou opacidade corneal). Os outros 18 (51%) não apresentaram estes sinais, assim como todos os gatos negativos para o PCR. Houve associação significativa entre a prevalência de ceratite e o resultado do PCR em tempo real (Gráfico 3).

Dois (33,33%) dos seis gatos braquicefálicos avaliados apresentavam ceratite, sendo ambos positivos para a infecção por HVF-1.

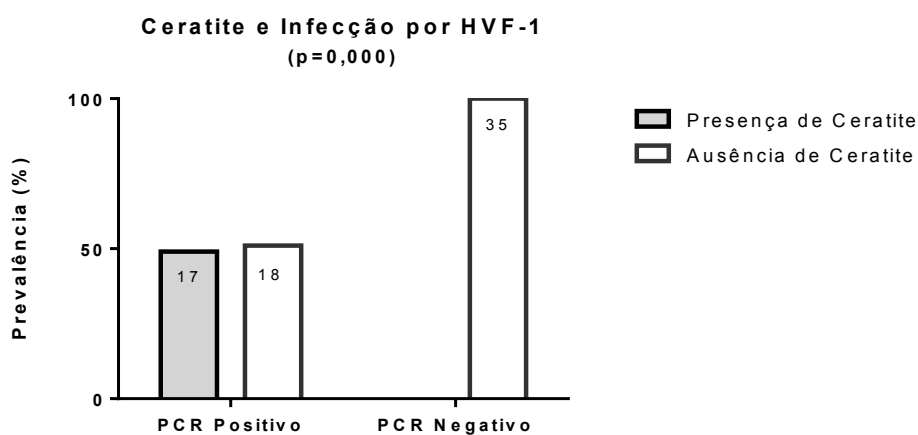


GRÁFICO 3 – Associação entre a prevalência de ceratite em gatos com resultados de PCR positivo ou negativo para a infecção por herpesvirus felino tipo 1 (HVF-1). p : significância estatística para associações, obtida por meio do Teste Qui-Quadrado.

Do mesmo modo, foi testada a associação entre cada um dos sinais oculares e os resultados do PCR. Neste caso, apenas os sinais blefarospasmo e defeito epitelial corneal apresentaram associação significativa. Dos 19 gatos com blefarospasmo, 16 (84,2%) foram positivos e três (15,8%) negativos para o PCR. Dos 17 animais portadores de defeito epitelial corneal, todos (100%) foram positivos (Tabela 3).

Tabela 3 – Número absoluto (n) e proporção relativa (%) de gatos analisados, em relação a apresentação de cada sinal ocular, bem como suas associações aos resultados de PCR positivo ou negativo para a infecção por HVF-1.

PCR em tempo real					
Sinal Ocular	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	p
Blefarospasmo					
0	32	(91,4)	19	(54,3)	0,009
1	00	(00,0)	11	(31,4)	
2	03	(08,6)	04	(11,4)	
3	00	(00,0)	01	(02,9)	
Secreção ocular					
0	31	(88,6)	27	(77,1)	0,308
1	03	(8,6)	07	(20,0)	
2	01	(2,9)	01	(2,9)	
3	00	(0,0)	00	(0,0)	
Quemose					
0	35	(100,0)	33	(94,3)	0,154
1	00	(0,0)	02	(5,7)	
Vascularização Corneal					
0	35	(100,0)	33	(94,3)	0,159
1	00	(0,0)	00	(0,0)	
2	00	(0,0)	00	(0,0)	
3	00	(0,0)	01	(2,9)	
4	00	(0,0)	01	(2,9)	
Defeito Epitelial Corneal					
0	35	(100,0)	18	(51,4)	0,000
1	00	(0,0)	17	(48,6)	
Opacidade Corneal					
0	35	(100,0)	34	(97,4)	0,317
1	00	(0,0)	01	(2,9)	
2	00	(0,0)	00	(0,0)	
3	00	(0,0)	00	(0,0)	
Conjuntivalização					
0	35	(100,0)	34	(97,1)	0,317
1	00	(0,0)	01	(2,9)	
Hiperemia Conjuntival					
0	32	(91,4)	26	(74,3)	0,146
1	01	(2,9)	06	(17,1)	
2	02	(5,7)	03	(8,6)	
3	00	(0,0)	00	(0,0)	

Legenda: **Blefarospasmo**: (0) ausência, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso; **Secreção Ocular**: (0) ausência, (1) leve e (2) moderada, (3) intensa; **Quemose**: (0) ausência e (1) presença; **Vascularização Corneal**: (0) ausência, (2) proliferação vascular até 4 mm do limbo, (3) proliferação vascular até 6 mm do limbo e (4) proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual); **Defeito Epitelial**: (0) ausência, (1) presença; **Opacidade Corneal**: (0) não há dificuldade de observar detalhes da íris, (1) discreta - há borramento dos detalhes da íris, (2) moderada - há dificuldade em definir detalhes da íris, (3) severa - não é possível observar detalhes da íris; **Conjuntivalização**: (0) ausência e (1) presença; **Hiperemia Conjuntival**: (0) ausência, (1) leve, (2) moderada, (3) intensa. **p**: significância estatística para associações, obtida por meio do Teste Qui-Quadrado.

Pelo fato do blefarospasmo e o defeito epitelial corneal serem os únicos sinais a apresentarem associação significativa com o resultado do PCR, foi testada também a associação entre eles que foi significativa (Tabela 4). Dos 17 (100,0%) gatos que apresentaram defeito epitelial corneal, 11 (64,7%) também tiveram blefarospasmo. Dos 19 (100,0) animais que manifestaram este último, 8 (42,1%) não apresentaram defeito epitelial concomitante.

Tabela 4 – Associação entre o número de gatos (n) e sua proporção relativa (%) com presença ou ausência de blefarospasmo e defeito epitelial corneal.

Defeito Epitelial Corneal							
Blefarospasmo	Ausente		Presente		Total		P
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Ausência	45	82,2	06	11,8	51	100,0	0,000
Presença	08	42,1	11	57,9	19	100,0	
Total	53	55,7	17	24,3	70	100,0	

Legenda: **p**: significância estatística para associações, obtida por meio do Teste Qui-Quadrado.

O exame físico geral dos animais demonstrou maioria de pacientes assintomáticos, sendo os parâmetros alterados encontrados: 10 animais com quadro de emaciação (evidenciação de gradil costal e osso temporal), quatro com desidratação moderada, dois com mucosas pálidas, 5 com linfadenomegalia, 9 com descamação cutâneas e áreas alopecicas e 27 com pulicose. Os demais animais não apresentavam alterações clínicas.

5. DISCUSSÃO

A infecção pelo HVF-1 está amplamente distribuída na população mundial de felinos, estimando que mais de 90% dos gatos domésticos sejam soropositivos (GOULD, 2011). No Brasil, a infecção pelo HVF-1 tem sido relatada em vários estados, contudo, pouco se conhece sobre sua prevalência (FRANCO; ROHE, 2007). Em nosso trabalho foi observada prevalência de 50% que corroboram com outros estudos que relataram prevalências que variaram

de 13% a 98% identificados por métodos de biologia molecular (CAI et al., 2002; KANG; PARK, 2008; VEIR et al., 2008). A infecção por HVF-1 é a causa mais frequente das doenças oculares em felinos (HARTLEY, 2010a). A presença deste agente viral está associada a quadros de conjuntivite e ceratite em gatos domésticos, sendo a causa infecciosa mais estudada nesta espécie (ANDREW, 2001; SLATTER, 2005).

No presente trabalho, a prevalência de infecção por HVF-1, determinada por PCR em tempo real, mostrou-se elevada nos animais com sinais oculares (78%) e na amostra global (50%). Helps et al. (2003) utilizaram a mesma técnica para detecção de HVF-1 em 22,9% das amostras obtidas por suabes conjuntivais de gatos com afecção ocular. Paralelamente, estes mesmos autores, concluíram que a técnica de PCR em tempo real é mais sensível para a detecção de HVF-1 em comparação ao isolamento viral e o PCR convencional. O mesmo foi constatado anteriormente por Vogtlin et al. (2002) ao analisarem amostras de secreção ocular e raspados conjuntivais de gatos que apresentavam sinais compatíveis com infecção ocular pelo HVF-1. De acordo com os nossos resultados, a presença de ao menos um sinal ocular apresentou associação com o resultado positivo de PCR em tempo real, sugerindo maior probabilidade de haver infecção pelo vírus em gatos com manifestações oculares.

Maggs (2005) sugeriu que amostras de tecidos profundos e com um número maior de células (*p.e.* biópsia) podem estar associadas ao aumento da taxa de detecção do HVF-1 por se tratar de um vírus intracelular obrigatório. Isto é melhor observado principalmente nos casos de infecções crônicas ou recrudescentes, onde a excreção viral é reduzida. Entretanto, Volopich et al. (2005) não encontraram diferença entre várias técnicas de colheita (suabes, raspados ou biópsias) e a capacidade de detecção do HVF-1, exceto para amostras de sequestro de córnea. Um estudo empregando a técnica de PCR em tempo real demonstrou que maiores quantidades de DNA viral felino foram encontradas em fragmentos de ceratectomia, raspados e suabes conjuntivais, respectivamente (SJODAHL-ESSÉ et al., 2008). Deste modo, utilizamos a

técnica de biópsia conjuntival, pois esta representa um método de colheita mais eficiente para detecção de DNA nas análises moleculares.

Não há descrição na literatura de predisposição sexual para o desenvolvimento de sinais oculares pela infecção por HVF-1. De fato, em nosso estudo não houve associação entre os achados do exame oftálmico e os resultados do PCR com o sexo dos animais, o que corrobora com os dados obtidos por outros autores (NELSON; COUTO, 2006; GELATT, 2003; SLATTER, 2005).

Nenhum dos gatos avaliados possuía raça definida e apenas seis deles (8,6%) eram animais braquicefálicos. Tal constatação reflete a proporção encontrada na população felina do Brasil, onde os animais sem definição de raça são encontrados em maior número (SOUZA; CALIXTO, 2003). Não consideramos válida a associação entre os achados oculares e a raça dos animais devido ao reduzido número de braquicefálicos, sugeridos pela proprietária do abrigo como sendo mestiços da raça Persa. Esta raça apresenta uma sensibilidade corneal reduzida, o que pode acarretar episódios de ceratite ulcerativa mais frequentes. Assim, é provável que estes desenvolvam quadros de ceratite nos casos de reativação do HVF-1 latente (ORIÁ; LAUS, 2009). De fato, em nosso estudo, dois dos seis gatos braquicefálicos apresentavam ceratite, sendo ambos positivos para a infecção por HVF-1.

Ao contrário da doença aguda, as manifestações oculares recorrentes por infecção pelo HVF-1 são geralmente unilaterais e, frequentemente, caracterizadas por blefarospasmo intermitente, hiperemia conjuntival leve, secreção ocular serosa e, até mesmo, quadros de ceratite sem sinais de infecção respiratória (GASKELL et al., 2007). De fato, todas estas características foram observadas no exame oftálmico em grande parte dos animais e, em nenhum deles, houve presença de sinais sistêmicos de doença respiratória. Com isso, podemos sugerir que nos gatos com resultado positivo para infecção por HVF-1, esta encontrava-se na fase de recrudescência da infecção latente.

No presente estudo, o PCR em tempo real revelou que 75% dos animais com ao menos um sinal de conjuntivite foram positivos para a presença do HVF-1. Stiles et al. (1997) obtiveram um resultado semelhante ao detectarem o vírus em 54% (27 de 50) dos animais acometidos com conjuntivite e, em apenas, 12% (6 de 50) dos animais assintomáticos detectados pela técnica de PCR convencional. Por meio desta mesma técnica, Burgesser et al. (1999) encontraram prevalência de 13,7% analisando amostras de suabes conjuntivais e orofaríngeos de gatos com sinais oculares de conjuntivite.

Low et al. (2007) também pesquisaram este agente em esfregaços conjuntivais pela técnica PCR em tempo real e o detectaram apenas em 12,2% dos indivíduos com conjuntivite e 9,2% do total das amostras (animais com e sem conjuntivite). Porém, nesse estudo, os autores levantaram a hipótese de que o tratamento prévio com L-lisina, indicado em alguns dos gatos avaliados, pode ter diminuído a eliminação viral nas secreções oculares e, assim, interferido nos resultados encontrados. Em nosso estudo, nenhum animal recebeu qualquer tratamento prévio à coleta dos fragmentos conjuntivais, portanto, não houve interferência na carga viral avaliada. Desta forma, a técnica de PCR em tempo real parece ser efetiva na detecção do HVF-1, como demonstrado pelos nossos resultados.

A ceratite ulcerativa felina, encontrada em alguns dos nossos animais, é um motivo comum de apresentação à consulta oftálmica, constituindo-se esta, provavelmente, em uma causa frequente relacionada à infecção por HVF-1 (GELATT, 2003; HARTLEY, 2010a; SLATTER, 2005). Neste estudo, os mesmos resultados foram observados, uma vez que houve positividade da presença do vírus em todos os animais com quadro de ceratite. De fato, Hartley (2010a) sugere que o HVF-1 seja indutor destes quadros, a menos que se prove a interferência de outra causa. Volopich et al. (2005) também encontraram associação semelhante ao detectar a presença do DNA viral no PCR em 83,3% (5/6) dos animais com ceratite epitelial.

Nos casos em que houve presença de sinais de ceratoconjuntivite, sugere-se que o resultado positivo do PCR esteja relacionado à presença de

defeito epitelial corneal que conjuntamente com o blefarospasmo foram os únicos sinais considerados significativos para associação à presença do vírus. O blefarospasmo é um sinal ocular secundário à irritação ou a lesões oculares, e é comumente associado à conjuntivite e quadros de ceratite (SLATTER, 2005). Isto foi observado neste estudo, pois houve associação entre estes dois sinais oculares. Ainda, há que se considerar que o defeito epitelial corneal presente nos animais, pode ter influenciado na ocorrência do blefarospasmo.

No animal de número 36 foi constatada a presença de aderência palpebral à conjuntiva em associação à conjuntivalização na porção lateral da córnea. Esta condição, também denominada de simbléfaro, significa a adesão de alguma porção da conjuntiva palpebral, bulbar ou da membrana nictitante a ela mesma ou à córnea (ANDREW, 2001). A causa ainda não está totalmente elucidada, porém há autores que admitem que a maioria dos casos decorra de inflamação conjuntival grave, geralmente com características sugestivas de infecção pelo HVF-1 (ORIÁ; LAUS, 2009). De fato, este animal apresentou um quadro de ceratoconjuntivite importante com presença de úlcera de córnea dendrítica e ceratite estromal.

Os quadros de úlcera dendrítica são considerados patognomônicos da infecção viral por HVF-1, já que as úlceras lineares são resultantes de lesões diretas do vírus à camada basal de células do epitélio corneal (GELATT, 2003; HERRERA, 2008; NASISSE et al., 1989; ORIA et al., 2012; SLATTER, 2005). A ceratite estromal é uma reação inflamatória imunomediada, resultante dos efeitos citopáticos do HVF-1 sobre o epitélio da córnea, associada à supressão da imunidade local. Sendo assim, ela é secundária à presença do vírus e não causada pela ação direta do mesmo sobre os ceratócitos (ANDREW, 2001; HARTLEY, 2010a; NASISSE et al., 1989). Assim, a infecção ocular por HVF-1 neste animal pôde ser confirmada pela técnica de PCR em tempo real. O mesmo ocorreu em um estudo de Sjodahl-Essén et al. (2008) em que a presença do vírus, detectada pela mesma técnica, foi identificada em um único animal portador de ceratite estromal. Anteriormente, Volopich et al. (2005)

relataram a presença de HVF-1 pela técnica de PCR em 3 de 11 animais com a mesma condição ocular.

No animal número 58 foi identificada úlcera de córnea geográfica indolente. Este sinal é originado a partir da união de várias úlceras dendríticas na superfície da córnea, resultando no formato de um “mapa” (GELATT, 2003; HERRERA, 2008; NASISSE et al., 1989; SLATTER, 2005). As úlceras de córnea secundárias ao HVF-1 podem se resolver espontaneamente ou tornarem-se úlceras indolentes crônicas (HARTLEY, 2010a; SLATTER, 2005; STILES, 2003), sendo que os gatos braquicefálicos, aqueles considerados mais predispostos ao seu surgimento (HERRERA, 2008; ORIÁ; LAUS, 2009). De fato, o animal em questão era um dos caracterizados como braquicefálicos e também teve resultado positivo para a presença do vírus pelo método molecular de identificação utilizado.

O sequestro corneal felino é uma doença oftalmológica com grande repercussão na clínica de pequenos animais, caracterizado pela presença de secreção ocular, ceratite ulcerativa, diferentes graus de vascularização e edema de córnea (FEATHERSTONE; SANSOM, 2004; CULLEN et al., 2005). Há grande incidência em felinos de raças braquicefálicas, principalmente os Persas (HERRERA, 2008; ORIÁ; LAUS, 2009). Em nosso estudo, estas características foram encontradas no animal 65 que se tratava de um dos seis gatos braquicefálicos avaliados e, além disso, teve a confirmação da presença do HVF-1 em sua conjuntiva.

Embora o método de escolha para diagnóstico do HVF-1 seja o PCR (HARTLEY, 2010a), estudos conduzidos com o intuito de se diagnosticar o envolvimento de HVF-1 na patogenia do sequestro corneal felino, demonstraram-se como insatisfatórios, pois a doença ocular foi descrita em animais sem o envolvimento pelo vírus e, também, em animais saudáveis com reação positiva para HVF-1 (HERRERA, 2008). Cullen et al. (2005) revelaram a presença de HVF-1 através da técnica de PCR em 44% (4/9) das amostras corneais acometidas com sequestro de córnea. Stiles et al. (1997), utilizando a técnica de “nested” PCR, revelaram resultados positivos em 18% das amostras

corneais acometidas por sequestro e em 46% dos gatos clinicamente normais. Porém, não encontraram associação significativa entre os animais positivos e a presença ou ausência de sequestro de córnea.

É interessante ressaltar que, de acordo com os resultados, apenas um animal apresentou sinais de sequestro corneal, sendo também positivo para HVF-1, pela técnica de PCR em tempo real. Devido à obtenção de uma única amostra para o sequestro de córnea, não foi possível determinar uma associação válida entre o sinal apresentado e a presença da infecção viral em questão.

Em nenhum dos animais avaliados houve presença de descemetocel ou perfuração corneal. Nasisse et al. (1989) relatam que em episódios de reativação do vírus latente, este atua no epitélio corneal provocando lesões em suas camadas. Porém, nem sempre todas são atingidas, sendo incomum a exposição da camada estromal profunda da córnea (HERRERA, 2008; MAGGS, 2005).

A maioria dos animais avaliados não apresentou alterações oculares, o que não exclui a possibilidade de estarem infectados pelo HVF-1, uma vez que, após a infecção primária, cerca de 80% dos animais tornam-se portadores vitalícios e na fase de latência da infecção, os animais podem permanecer assintomáticos durante longos períodos (GASKELL et al., 2007; MAGGS, 2005; PARZEFALL et al., 2010). De todos os animais avaliados, 10 (26,3%) dos que não apresentaram sinais oculares foram positivos para o PCR, sugerindo que os mesmos se encontravam na fase de recrudescência da infecção viral. Kang e Park (2008) também encontraram elevada prevalência de infecção por HVF-1, ao avaliarem uma população de 78 gatos assintomáticos de um abrigo em Yangju, na Coreia do Sul. Nesse estudo, amostras obtidas por suabes conjuntivais e orofaríngeos foram submetidas à análise pela técnica de PCR convencional, a qual revelou que 48 animais (63%) eram positivos para o HVF-1. Em outro estudo, Stiles e Pogranichniy (2008) analisaram córneas de 31 gatos a partir de técnicas de isolamento viral, PCR em tempo real e

imunofluorescência, concluindo que o HVF-1 pode estar presente em córneas de felinos assintomáticos.

O fato dos animais avaliados conviverem em um abrigo também deve ser considerado, já que isso os expõe ao contato direto facilitando, assim, a disseminação do agente viral infeccioso (GASKELL et al., 2007; STILES, 2003). O HVF-1 possui risco de morbidade de aproximadamente 100%, principalmente em lugares onde há aglomerações de gatos (LARA, 2012). Veir et al. (2008) encontraram o DNA do HVF-1 por PCR em 98% dos gatos que viviam em um abrigo nos EUA (51 de 52), em suabes orofaríngeos. Em um estudo anterior realizado por Burgesser et al. (1999), no mesmo país, foi encontrada uma prevalência de 31% para a infecção por HVF-1 em amostras de suabes conjuntivais e orofaríngeos de uma população de gatos sem sinais oculares e que viviam em um abrigo.

Apesar da prevalência da infecção ocular por HVF-1 ter sido relativamente elevada em nosso estudo, o resultado positivo do PCR só foi capaz de demonstrar que o felino foi infectado em algum momento, porém não prova que a infecção ativa esteja ocorrendo (ANDREW, 2001; GASKELL et al., 2007). Além disso, em alguns destes animais foram detectados sinais oculares concomitantes a resultados negativos do PCR para HVF-1, sugerindo que estes foram causadas por outros fatores ou agentes etiológicos.

A causa mais importante de conjuntivite felina, além do HVF-1, é a *Clamydophila felis* (Helps et al., 2003). Bannasch e Foley (2005) afirmam que gatos que vivem em abrigos públicos são predispostos a doenças respiratórias e oculares causadas por esta bactéria. Durante a fase aguda, observa-se blefarospasmo, epífora, presença de intensa quemose, congestão conjuntival e protrusão da terceira pálpebra. Inicialmente, um dos olhos é acometido, e após 5 a 21 dias a forma bilateral pode ser instituída. Nos quadros crônicos a conjuntiva pode apresentar-se hiperêmica, espessada e com presença de folículos (GRUFFDD-JONES et al., 2009; HERRERA, 2008). Na maioria dos gatos naturalmente infectados, a doença é auto limitante e os sinais de conjuntivite podem desaparecer 60 dias após a infecção (SYKES, 2005). Um

estudo utilizando a técnica de PCR em suabes conjuntivais encontrou prevalência de 14,3% (66/462) em gatos australianos com complexo respiratório felino (SYKES et al., 1999). Em outro, von Bomhard et al. (2003) detectaram a presença deste agente em 11,5% (26/226), pela mesma técnica, em gatos suíços com sinais de conjuntivite. Portanto, não se pode descartar a possibilidade de infecção ocular pela *C. felis* nos animais avaliados em nosso estudo, porém, os gatos caracterizados com sinais de conjuntivite severa foram positivos para a presença de HVF-1, sugerindo, nestes casos, uma possível infecção concomitante entre estes agentes.

Em relação à infecção pelo CVF, o quadro clínico típico caracteriza-se, entre outros sinais, pelo desenvolvimento de conjuntivite e presença de descarga ocular, embora de forma mais sutil e branda, do que na infecção pelo HVF-1 (GASKELL et al., 2007). Porém, a contribuição do CVF nas manifestações oculares é questionável e sugere-se que esta esteja associada à co-infecção por outros agentes (SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). Portanto, apesar dela se constituir em um importante agente envolvido no CRF, não é relevante no desenvolvimento de sinais oculares (HERRERA, 2008), estando relacionado principalmente a ulcerações orofaríngeas e quadros respiratórios (SOUZA; CALIXTO, 2003).

É importante destacar que quadros de conjuntivite felina também estejam envolvidos com a presença do *Mycoplasma* spp.. Low et al. (2007) verificaram que o *Mycoplasma* spp. foi o microrganismo mais prevalente em animais com conjuntivite do que em animais saudáveis, sugerindo a intervenção no surgimento da doença. A principal manifestação ocular deste agente é a conjuntivite folicular (HERRERA, 2008), entretanto, esta afecção não foi observada em nenhum dos animais avaliados.

Embora a *Bordetella bronchiseptica* seja considerada um agente patogênico primário do trato respiratório superior dos felinos (GASKELL et al., 2007), não é relatado na literatura qualquer manifestação ocular decorrente da infecção por esta bactéria no gato.

Ressalta-se a importância clínica do referido trabalho, em sugerir que na vigência de sinais oculares, como os que foram apresentados anteriormente, deve-se levantar a hipótese de que tais sinais possam estar ocorrendo por ação do HVF-1. Outros trabalhos devem ser conduzidos com o intuito de diagnosticar outros agentes que também podem ser os responsáveis em causar lesões oculares em gatos. Apesar, das controvérsias, trata-se de assunto que merece novas e originais investigações.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo objetivando a detecção direta de Herpesvirus felino tipo 1 em uma população de 70 gatos domésticos provenientes de uma residência (abrigo) na cidade de Araçatuba, depois de analisados e discutidos, em confronto com dados da literatura compilada, permitem às seguintes conclusões:

1. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), realizada pela técnica em tempo real foi capaz de detectar DNA de HVF-1 em amostras biológicas (fragmentos conjuntivais) de gatos domésticos, com sinais oculares sugestivos de infecção recrudescente por HVF-1, bem como, em gatos sem qualquer sinal ocular. A presença de DNA do HVF-1 nestes animais pode ser atribuída a infecções sub-clínicas;
2. A elevada prevalência da infecção ocular por HVF-1 encontrada nos animais com sinais oculares, especialmente em relação aos quadros de ceratite, sugere o agente como possível causador destas lesões. Tal fato ressalta que deve haver maior atenção ao tratamento clínico das ceratoconjuntivites nos felinos, além de enfatizar a importância da detecção viral por métodos moleculares à indicação de fármacos e terapias antivirais adjuvantes.

7. REFERENCIAS

ALLGOEWER, I.; SCHAFFER, E. H.; STOCKHAUS, C.; VOGTLIN, A. Feline eosinophilic conjunctivitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, p. 69-74, 2001.

ANDRADE, A. L. Semiologia do sistema visual dos animais domésticos. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 1 º ed. São Paulo: Roca, 2004. cap 14, p. 689-722.

ANDRADE, A. L.; GOMES, J. A. P.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V.; CAMPOS, M. Aspectos clínicos e morfológicos do transplante da membrana amniótica sobre a córnea de coelhos com deficiência induzida de células germinativas do limbo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 127-142, 2009.

ANDREW, S. E. Ocular manifestations of feline herpesvirus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, p. 9-16, 2001.

BANNASCH, M. J.; FOLEY, J. E. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 7, n. 2, p. 109-119, 2005.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; GODOY, C. A.; SOUZA, M. S. B.; BARROS, L. F. M.; BROOKS, D. E. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 3, p. 189-192, 2005.

BINNS, S. H.; SPEAKMAN, A. J.; HART, C. A. 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**, v. 2, n. 3, p. 123-133, 2000.

BURGESSER, K. M.; HOTALING, S.; SCHIEBEL, A.; ASHBAUGH, S. E.; ROBERTS, S. M.; COLLINS, J. K. Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 2, p. 122-126, 1999.

BURNS, R. E.; WAGNER, D. C.; LEUTENEGGER, C. M.; PESAVENTO, P. A. Histologic and Molecular Correlation in Shelter Cats with Acute Upper Respiratory Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2454–2460, 2011.

CAI, Y.; FUKUSHI, H.; KOYASU, S.; KURODA, E.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. An Etiological Investigation of Domestic Cats with conjunctivitis and Upper Respiratory Tract Disease in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 64, p. 215-219, 2002.

COHN, L. A., Feline Respiratory Disease Complex. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 41, p. 1273–1289, 2011.

CULLEN, C. L.; WADOWSKA D. W.; SINGH A.; MELEKHOVETS Y. Ultrastructural findings in feline corneal sequestra. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8 n. 5, p. 295-303, 2005.

DEAN, R.; HARLEY, R.; HELPS, C.; CANEY, S.; GRUFFYDD-JONES, T. Use of Quantitative Real-Time PCR to Monitor the Response of *Chlamydomphila felis* Infection to Doxycycline Treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1858-1864, 2005.

DIESEM, C. Órgãos dos sentidos do carnívoro e tegumento comum: órgão da visão. In Sisson, S., Grossman, J. D., Getty, R. **Anatomia dos animais**

domésticos. 1º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1986, v.2, p. 1635-1660.

DINNADE, J. D.; SCARLETT, J. M.; RICHARDS, J. R. Descriptive epidemiology of feline upper respiratory tract disease in an animal shelter. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 816-825, 2009.

DOMÉNECH, A.; MIRÓ, G.; COLLADO, V. M.; BALLESTEROS, N.; SANJOSÉ, L.; ESCOLAR, E.; MARTIN, S.; GOMEZ-LUCIA, E. Use of recombinant interferon omega in feline retrovirois: From theory to practice. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 3-4, p. 301– 306, 2011.

FEATHERSTONE, H. J.; FRANKLIN, V. J.; SANSOM, J. Feline corneal sequestrum: Laboratory analysis of ocular samples from 12 cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 4, p. 229-238, 2004.

FEATHERSTONE, H. J.; SANSOM, J. Feline corneal sequestra: a review of 64 cases (80 eyes) from 1993 to 2000. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 4, p. 213-227, 2004.

FONTENELLE, J. P.; POWELL, C. C.; VEIR, J. K.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Effect of topical ophthalmic application of cidofovir on experimentally induced primary ocular feline herpesvirus-1 infection in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 2, p. 289-293, 2008.

FRANCO, A. C.; ROHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p. 435-447.

GASKELL, R.; DAWSON, S.; RADFORD, A.; THIRY, E. Feline herpesvirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 337-354, dez. 2007.

GELLAT, K. N. **Manual de oftalmologia veterinária**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2003. 594p.

GELATT, K. N.; PEIFFER, R. L.; STEVENS, J. Chronic ulcerative keratitis and sequestrum in the domestic cat. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.9, p. 204-213, 1973.

GLAZE, M. Feline infectious conjunctivitis. **Harris County Veterinary Medical Association Newsletter**, 2002. Disponível em: <http://www.vetquinolusa.com/studies/FHV/FelineInfectious.pdf>. Acesso em 12 ago. 2013.

GOULD, D. Feline Herpesvirus-1. Ocular manifestations, diagnosis and treatment options. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 5, p. 333–346, 2011.

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

HARA, M.; FUKUYAMA, M.; SUZUKI, Y.; KISIKAWA, S.; IKEDA, T.; KIUCHI, A.; TABUCHI, K. Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 48, n. 3-4, p. 345-352, 1996.

HARTLEY, C. Aetiology of corneal ulcers – assume FHV-1 unless proven otherwise. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 1, p. 24-35, 2010a.

HARTLEY, C. Treatment of corneal ulcers – what are the medical options? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 5, p. 384-397, 2010b.

HARTLEY, C. Treatment of corneal ulcers – when is surgery indicated? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 5, p. 398-405, 2010c.

HARTMANN, A.; 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**, v. 12, n. 10, p. 775-782, 2010.

HELPS, C. R.; LAIT, P.; DAMHUIS, A.; BJORNEHMMAR, U.; BOLTA, D.; BRAVIDA, C.; CHABANNE, L.; EGBERINK, H.; FERRAND, G.; FONTBONNE, A.; PENNISI, M. G.; GRUFFYDD-JONES, T.; GUNN-MOORE, D.; HARTMANN, K.; LUTZ, H.; MALANDAIN, K.; MOSTL, K.; STENGEL, C.; HARBOUR, D. A.; GRAAT, E. A. M. 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. **Veterinary Record**, v. 159, n. 21, p. 669-673, 2005.

HELPS, C. R.; REEVES, N.; EGAN, K.; HOWARD, P.; HARBOUR, D. Detection of *Chlamydomphila felis* and Feline Herpesvirus by Multiplex Real-Time PCR Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 6, p. 2734-2736, 2003.

HERRERA, D. H. Conjuntivites. In: HERRERA, D. **Oftalmologia clínica em animais de companhia**. 1 ed. São Paulo, SP: MedVet, 2008. Cap. 13. p. 243-246.

HODGES, A. Eosinophilic keratitis and keratoconjunctivitis in a 7-year-old domestic shorthaired cat. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n. 11, p. 1034–1035, 2005.

HOLST, B. S.; HANA'S, S.; BERNDTSSON, L. T.; HANSSON, I.; DERLUND, R. S.; ASPA'N, A.; DAHL-ESSÉN, T.; ISKE, G.; GREKO, C. Infectious causes for feline upper respiratory tract disease e a case-control study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 10, p. 783-789, 2010.

HUSSEIN, I. T.; MENASHY, R. V.; FIELD, H. J. Penciclovir is a potent inhibitor of feline herpesvirus-1 with susceptibility determined at the level of virus-encoded thymidine kinase. **Antiviral Research**, v. 78, n. 3, p. 268-274, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

KANG, B.; PARK, H. Prevalence of feline herpesvirus 1, feline calicivirus and *Chlamydomphila felis* in clinically normal cats at a Korean animal shelter. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 207-209, 2008.

LAPPIN, M. R. How I treat feline herpesvirus infections. In: Southern European Veterinary Conference. **Proceedings...** IVIS. Barcelona, Spain, 2008.

LAPPIN, M. R.; SEBRING, R. W.; PORTER, M., RADECKI, S. J., VEIR, J. Effects of a single dose of an intranasal feline herpesvirus 1, calicivirus, and panleukopenia vaccine on clinical signs and virus shedding after challenge with virulent feline herpesvirus 1, **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, n.3, p.158-63, 2006.

LAPPIN, M. R.; VEIR, J. K.; SATYARAJ, E.; CZARNECKI-MAULDEN, G. Pilot study to evaluate the effect of oral supplementation of *Enterococcus faecium* SF68 on cats with latent feline herpesvirus 1. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 8, p. 650-654, 2009.

LARA, V. M. Complexo respiratório felino: Principais agentes infecciosos. **ARS Veterinária**, v. 28, n. 3, p.169-176, 2012.

LIM, C. C.; CULLEN, C. L. Schirmer tear test values and tear film break-up times in cats with conjunctivitis. **Veterinary ophthalmology**. v. 8, n. 5, p. 305-310, 2005.

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

MAGGS, D. J. Feline herpesvirus infections. **Vet Clin Small Anim**, v. 40, p. 1055–1062, 2010.

MAGGS, D. J. Update on the diagnosis and treatment of feline herpesvirus. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS WSAVA, 34., 2009. São Paulo. **Proceedings ...** IVIS, São Paulo; Brazil: IVIS, 2009.

MAGGS, D. J. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. **Clin Tech Small Anim Pract** , v. 20, n. 2, p. 94-101, 2005.

MAGGS, D. J.; CLARKE, H. E., Relative sensitivity of polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpesvirus type 1 DNA in clinical samples and commercial vaccines, **American Journal of Veterinary Residence**, v. 66, n. 9, p. 1550-1555, 2005.

MITCHEL, N. Feline ophthalmology Part 2: Clinical presentation and aetiology of common ocular conditions. **Irish Veterinary Journal**, v. 59, n. 4, p. 223-232, 2006.

NASISSE, M. P.; GUY, J.; DAVIDSON, M. G.; SUSSMAN, W. A.; FAIRLEY N.M. Experimental Ocular herpesvirus infection in the cat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 30, n. 8, p. 1758-1768, 1989.

NELSON, R. W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2006. 1325p.

ORIÁ, A. P; LAUS, J. L. Tópicos em oftalmologia dos felinos. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2009. p.190-224.

ORIÁ, A. P.; SILVEIRA, C. P. B.; SOUZA, M. R.; PINNA, M. H.; COSTA-NETO, J. M.; DÓREA NETO, F. A. Síndromes oculares secundárias a infecção pelo Herpesvirus felino-1- Revisão. **Medicina Veterinária**, v. 6, n. 4, p. 16-25, 2012.

PARZEFALL, B.; SCHMAHL, W.; FISCHER, A.; BLUTKE, A.; TRUYEN, U.; MATIASSEK, K. Evidence of feline herpesvirus-1 DNA in the vestibular ganglion of domestic cats. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 371–372, 2010.

PŁONECZKA-JANECZKO, K.; KIEŁBOWICZ, Z.; BANIA, J.; BEDNAREK, K. Real-time PCR detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats suffering from chronic conjunctivitis (Poland). **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 4, p. 679-681, 2011.

RADFORD, A. D.; 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.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline calicivirus infection – ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 556-564, 2009.

RAMSEY, I.; TENNANT, B. Manual of canine and feline infectious diseases. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 928, 2001.

RESS, T.; LUBINSKI, J. L. Oral supplementation with L-lysine did not prevent upper respiratory infection in a shelter population of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 510-513, 2008.

ROZE, M. Ocular manifestations of feline systemic diseases. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 2005, **Proceedings ... IVIS**, Cidade do Mexico; Mexico, 2005.

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**, v. 51, p. 629–633, 2010.

SHEWEN, P. E.; POVEY, R. C.; WILSON, M. R. Feline chlamydial infection. **Canadian Veterinary Journal**, v. 19, p. 289-292, 1978.

SJODAHL-ESSÉN, T.; TIDHOLM, A.; THOREN, P.; PERSSON-WADMAN, A.; BOLSKE, G.; ASPAN, A.; TREIBERG-BERNDTSSON, T. Evaluation of different sampling methods and results of real-time PCR for detection of feline herpes virus-1, *Chlamydophila felis* and *Mycoplasma felis* in cats. **Veterinary ophthalmology**. v. 6, p. 375-380, 2008.

SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2005. 686p.

SOUZA, H. J. M.; CALIXTO, R. Complexo Respiratório Viral Felino. In: SOUZA, H. J. M. **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. Rio de Janeiro, RJ: L. F. Livros, 2003. p. 51-66.

STILES, J. Feline Herpesvirus. **Clinical Techniques Small Animal Practice** , v. 18, p 178-185, 2003.

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**, v. 58, n. 4, p. 338-42, 1997.

STILES, J.; POGRANICHNIY, R. Detection of virulent feline herpesvirus-1 in the corneas of clinically normal cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 2, p. 154-159, 2008.

STILES, J.; TOWNSEND, W. M.; ROGERS, Q. R.; KROHNE, S. G. Effect of oral administration of L-lysine on conjunctivitis caused by feline herpesvirus in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 1, p. 99-103, 2002.

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

SYKES, J. E. Feline Chlamydiosis. **Clinical Techniques Small Animal Practice** . v. 20, p. 129-134, 2005.

SWENSON, C. L.; GARDNER, K.; ARNOCKY, S. P. Infectious feline herpesvirus detected in distant bone and tendon following mucosal inoculation

of specific pathogen-free cats. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 484-487, 2012.

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

TOWNSEND, W. M.; RANKIN, A. J.; STILES, J.; KROHNE, S. G. Heterologous penetrating keratoplasty for treatment of a corneal sequestrum in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v. 11, n. 4, p. 273–278, 2008.

TURNER, S. M. **Oftalmologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 370p.

VAN DER MEULEN, K.; GARRÉ, B.; CROUBELS, S.; NAUWYNCK, S. *In vitro* comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n.13, p. 1-7, 2006.

VEIR, J. K.; LAPPIN, M. R. Molecular Diagnostic Assays for Infectious Diseases in Cats. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 40, p. 1189–1200, 2010.

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 cats with upper respiratory tract disease, **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 551-557, 2008.

VOGTLIN, A.; FRAEFEL, S.; ALBINI, C. M.; LEUTENEGGER, E.; SCHRANER, B.; SPIESS, H.; LUTZ; ACKERMANNI, M. Quantification of Feline Herpesvirus

1 DNA in Ocular Fluid Samples of Clinically Diseased Cats by Real-Time TaqMan PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 519-523, 2002.

VOLOPICH, S.; BENETKA, V.; SCHWENDENWEIN, I.; MOSTL, K.; SOMMERFELD-STUR, I.; NELL, B. Cytologic findings, and feline herpesvirus DNA and *Chlamydophila felis* antigen detection rates in normal cats and cats with conjunctival and corneal lesions. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 1, p. 25-32, 2005.

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

8. ANEXO

Anexo 1

Tabela 5 – Resultado do PCR e sinais oculares segundo escores, observados em uma população de 70 gatos da cidade de Araçatuba, SP.

Gatos	Sexo	Resultado do PCR	Sinal Ocular							
			Blefarospasmo	Secreção Ocular	Quemose	Vascularização Corneal	Defeito Epitelial Corneal	Opacidade Corneal	Conjuntivalização	Hiperemia Conjuntival
1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	1
2	2	1	1	0	0	0	1	0	0	1
3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
10	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
11	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0
12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
15	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0
16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0

Continua...

Continuação de:

Tabela 5 – Resultado do PCR e sinais oculares segundo escores, observados em uma população de 70 gatos da cidade de Araçatuba, SP.

19	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
20	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
26	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
27	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
28	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
29	2	1	0	1	0	0	1	0	0	0
30	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
31	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
32	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
36	1	1	2	2	1	6	1	1	1	2
37	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua...

Continuação de:

Tabela 5 – Resultado do PCR e sinais oculares segundo escores, observados em uma população de 70 gatos da cidade de Araçatuba, SP.

40	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
42	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
43	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
45	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
46	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0
47	2	1	2	0	0	0	0	0	0	2
48	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
49	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
50	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1
51	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	2	1	1	0	0	0	1	0	0	1
54	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
55	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0
57	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	1	1	3	1	0	0	1	0	0	2
59	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0
61	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua...

Continuação de:

Tabela 5 – Resultado do PCR e sinais oculares segundo escores, observados em uma população de 70 gatos da cidade de Araçatuba, SP.

62	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
63	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0
65	1	1	0	0	0	8	1	0	0	1
66	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0
69	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: **Sexo:** (1) macho, (2) fêmea; **Resultado do PCR:** (0) negativo, (1) positivo; **Blefarospasmo:** (0) ausência, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso; **Secreção Ocular:** (0) ausência, (1) leve, (2) moderada e (3) intensa; **Quemose:** (0) ausência e (1) presença; **Vascularização Corneal:** (0) ausência, (2) proliferação vascular até 2 mm do limbo, (4) proliferação vascular até 4 mm do limbo, (6) proliferação vascular até 6 mm do limbo e (8) proliferação vascular até 8 mm do limbo (vasos no eixo visual); **Defeito Epitelial Corneal:** (0) ausência - ausência de defeito epitelial, (1) presença de defeito epitelial; **Opacidade Corneal:** (0) não há dificuldade de observar detalhes da íris, (1) discreta - há borramento dos detalhes da íris, (2) moderada - há dificuldade em definir detalhes da íris e (3) severa - não é possível observar detalhes da íris; **Conjuntivalização:** (0) ausência e (1) presença; **Hiperemia Conjuntival:** (0) ausência, (1) leve, (2) moderada e (3) intensa.