

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

***Chlamydophila felis* EM GATOS (*Felis catus*): DETECÇÃO DE
ANTIGENO E PESQUISA DE ANTICORPOS**

Meire Christina Seki

Orientador: Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Concentração – Patologia Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO

Fevereiro de 2008

S463c Seki, Meire Christina
Chlamydophila felis em gatos (*Felis catus*): Detecção de antígeno e pesquisa de anticorpos/ Meire Christina Seki. –Jaboticabal, 2008
xii, 73 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Aramis Augusto Pinto
Banca examinadora: Tânia de Freitas Raso, Mitika Kuribayashi
Hagiwara.
Bibliografia

1. Gatos domésticos. 2. Clamidiose felina. 3. Complexo respiratório felino. I. Título. II. Jaboticabal- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.2:636.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

"PARA CADA ESFORÇO DISCIPLINADO
HÁ UMA RETRIBUIÇÃO MÚLTIPLA"

Jim Rohn

DEDICO

- Ao Adriano, por todo o amor, carinho, compreensão e principalmente paciência.
- Aos meus pais, Paulo e Soledade, por tudo.
- Aos meus irmãos, Márcia e Marcos, que mesmo distantes me apoiaram em mais uma etapa da minha vida
- Ao Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto, pela orientação.
- A Deus...

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Tânia de Freitas Raso pela idealização e a contribuição neste trabalho, principalmente no que se refere ao antígeno utilizado.

Ao Tiago Mineo pela ajuda na padronização da reação de imunofluorescência indireta.

A Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro concedido neste trabalho (Processo n^o. 06/58236-3)

Ao pessoal do laboratório (Cristiane, Tiago, Andréia, Patrícia, Trícia, Ana Carolina, Marcos, Carina, Márcia, Ana Beatriz e Cíntia.)

As amigas Nicole e Elisângela.

Aos amigos Marcos, João, Alexandre, Nancy, Pedro, Fábio, Paty e Trícia, pelos momentos de descontração e pelos almoços de fim de semana.

Aos veterinários Flávio, Silvana, Carla, Márcio, Cláudio e Mônica pela autorização de colheita de material dos gatos utilizados neste trabalho.

Ao professor Aulus e a Guabi, pela autorização de colheita de material no gatil sob sua responsabilidade.

Ao professor Alvimar e o CpPAR, pela autorização de colheita de material no gatil sob sua responsabilidade.

Ao Ricardo Moro e ao João Prieto pela ajuda na análise estatística.

Ao Prof. Aureo e a Profa. Rosângela

A todos aqueles que, de uma maneira ou de outro, sempre estiveram presentes nestes anos.

MUITO OBRIGADA

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.1. Objetivo específico.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Animais.....	16
4.2. Colheita de material biológico.....	18
4.3. Reação de fixação do complemento	20
4.3.1. Diluente.....	20
4.3.2. Hemácias de carneiro.....	20
4.3.3. Preparo e dosagem de hemolisina anti-hemáceas de carneiro.....	20
4.3.4. Complemento.....	21
4.3.5. Produção de antígeno.....	21
4.3.6. Identificação do agente.....	22
4.3.7. Purificação parcial do antígeno.....	22
4.3.8. Determinação da dose de reatividade ótima do antígeno.....	23
4.3.9. Amostras de soro.....	24
4.3.10. Reação de fixação de complemento (RFC).....	24
4.4. Reação de imunofluorescência indireta.....	26
4.5. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	27
4.5.1. Extração de DNA.....	27
4.5.2. Amplificação.....	27

4.5.3. Detecção do produto amplificado.....	28
4.6. Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1. Reação de Fixação de Complemento.....	29
5.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	30
5.2.1. Gatos domésticos provenientes de gatis.....	30
5.2.2. Gatos domésticos provenientes de abrigos públicos para animais.....	33
5.2.3. Gatos domésticos provenientes de clínicas veterinárias	35
5.2.4. Gatos domésticos imunizados contra clamidiose felina.....	37
5.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	39
5.3.1. Gatos domésticos provenientes de gatis.....	39
5.3.2. Gatos domésticos provenientes de abrigos públicos para animais.....	40
5.3.3. Gatos domésticos provenientes de clínicas veterinárias	40
5.4. Análise comparativa dos resultados de gatos domésticos submetidos às reações de fixação do complemento (RFC) e de imunofluorescência indireta (RIFI), frente aos resultados da reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	41
5.5. Avaliação dos dados de ficha clínica dos gatos examinados e sua correlação com os resultados positivos obtidos na RFC, RIFI e PCR.....	43
5.6. Análise estatística.....	45
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS.....	61
9. ANEXO.....	73

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Estudos realizados sobre prevalência da clamidiose felina por diferentes autores e em diferentes países.....	9
Tabela 2: Número de amostras colhidas em cada grupo experimental.....	16
Tabela 3: Correlação entre o título de anticorpos anti- <i>C. felis</i> de animais reagentes positivos na reação de fixação do complemento (RFC) e informações do histórico clínico (gatil de procedência; a presença de sinais clínicos; histórico de complexo respiratório felino e estado de imunização).....	29
Tabela 4: Correlação entre o título de anticorpos anti- <i>C. felis</i> de animais reagentes positivos na reação de imunofluorescência indireta e informações do histórico clínico (presença de sinais clínicos; histórico de complexo respiratório felino e estado de imunização) do grupo gatil	31
Tabela 5: Correlação entre o título de anticorpos anti- <i>C. felis</i> de animais reagentes positivos pela reação de imunofluorescência indireta e a presença ou não de sinais clínicos da doença, no momento da colheita de material do grupo abrigo público.....	34
Tabela 6: Correlação entre o título de anticorpos anti- <i>C. felis</i> de animais reagentes positivos pela reação de imunofluorescência indireta e informações do histórico clínico (presença de sinais clínicos; histórico de complexo respiratório felino e estado de imunização) do grupo clínica veterinária.....	35
Tabela 7: Número de animais soro positivos e soro negativos pela RIFI conforme o grupo vacinado e não vacinado e seu grupo de procedência	37
Tabela 8: Correlação entre procedência e presença de sinal clínico e/ou histórico de complexo respiratório felino, no momento da colheita de material, em animais positivos na reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	40
Tabela 9: Análise comparativa dos resultados das reações de fixação do complemento (RFC) e de Imunofluorescência Indireta (RIFI), frente aos resultados da Reação em cadeia pela Polimerase (PCR) dos gatos domésticos testados e positivos para <i>Chlamydomphila felis</i> , de acordo com o grupo estudado.....	41
Tabela 10: Correlação entre os resultados de RFC positivo em gatos e os resultados de RIFI e PCR.....	42
Tabela 11: Correlação entre os resultados de gatos positivos à PCR e os resultados de RFC e RIFI.....	42
Tabela 12: Caracterização da amostra populacional de gatos, de acordo com a sua procedência.....	43

Tabela 13:	Caracterização da amostra populacional de gatos com resultados positivos, conforme o meio de diagnóstico para <i>C. felis</i> utilizado.....	45
Tabela 14:	Resultados da análise estatística utilizada para avaliação dos dados obtidos na ficha clínica do animal (sexo e idade) e a procedência dos gatos (gatil, abrigo público para animais e clínica), conforme cada meio de diagnóstico utilizado, empregando-se o teste de Tukey ao nível de 5 ou 1 % de probabilidade.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: A e B – Animais do grupo gatil.....	17
Figura 2: Cinco cidades da região nordeste do estado de São Paulo, de onde se coletou as amostras avaliadas.....	17
Figura 3: Animais com sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina. A: Gato com secreção ocular serosa (seta azul) e secreção nasal unilateral mucopurulenta (seta vermelha). B: Gato com secreção nasal bilateral mucopurulenta (Setas pretas).....	19
Figura 4: Colheita de material biológico. A: Procedimento de colheita de suabe de conjuntiva de um gato. B: Procedimento de colheita de sangue da veia jugular de um gato.....	19
Figura 5: Esquematização da Reação de Fixação de Complemento.....	25
Figura 6: Reação de Imunofluorescência Indireta: A: Amostra negativa, Aumento de 400X. B: Amostra positiva, aumento de 400X.....	32
Figura 7: Representação gráfica da titulação de anticorpos anti- <i>C.felis</i> , positivos pela RIFI, e sua porcentagem, obtida a partir dos 147 soros de gatos provenientes do grupo gatil, abrigo público e clínica veterinária.....	36
Figura 8: Representação gráfica da titulação de anticorpos anti- <i>C.felis</i> , positivos pela RIFI, e sua porcentagem, obtida a partir dos 147 soros de gatos vacinados e não vacinados.....	38
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1,5% com os produtos da PCR provenientes de suabe de conjuntiva. Da esquerda para direita: Marcador de Pares de Base (100p.b.); controle negativo (1), amostra negativa (2), amostras positivas (3 a 6), controle positivo (7).....	39

***Chlamydomphila felis* EM GATOS (*Felis catus*): DETECÇÃO DE ANTIGENO E PESQUISA DE ANTICORPOS**

RESUMO: O presente trabalho, primeiro estudo sobre clamidiose felina no Brasil, teve o objetivo de pesquisar a presença direta e indireta de *Chlamydomphila felis* em gatos domésticos provenientes de cinco municípios da região nordeste do estado de São Paulo. Adicionalmente, correlacionar os dados de ficha clínica com os resultados positivos obtidos nos três testes laboratoriais utilizados, ou seja, reação em cadeia pela polimerase (PCR), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação de fixação do complemento (RFC). O grupo experimental final foi constituído de 151 animais, dos quais 73 eram provenientes de gatis, 18 de clínica/hospitais veterinários e 60 de abrigos públicos para animais. Das 151 amostras de suabes de conjuntiva submetidas à PCR, em 6,0% (9/151) foi encontrado DNA de *C.felis*. Anticorpos anti-*Chlamydiaceae* foram detectados em 72,1% (106/147) das amostras de soros submetidas à RIFI. Em somente 9,4% (10/106) dos soros positivos à RIFI, foram detectados anticorpos fixadores do complemento, revelando que a RFC, embora específica, apresenta baixa sensibilidade quando utilizada na pesquisa de anticorpos anti-*Chlamydiaceae* em gatos domésticos. Foi também observado que gatos provenientes de gatis, animais com idade maior que um ano e inferior a seis anos, bem como as fêmeas, estão mais predispostos a soroprevalência para *C.felis* pela RIFI. Entretanto, tais resultados não foram observados nos animais PCR positivo. Ademais, pode-se verificar uma estreita relação entre as presenças de DNA clamidial e de anticorpos anti-*Chlamydiaceae* em gatos domésticos brasileiros aos dados das fichas clínica relacionados à doença do trato respiratório superior, a secreção ocular e a conjuntivite.

Palavras-Chave: Clamidiose, Complexo respiratório felino, Reação de Imunofluorescência Indireta, Reação de Fixação de Complemento, Reação em Cadeia pela Polimerase.

***Chlamydomphila felis* in cats (*Felis catus*); Detection of antigen and evaluation of antibody**

SUMMARY: This work, first study about feline chlamydiosis in Brazil, had the objective to evaluate the direct and indirect presence to *Chlamydomphila felis* in domestic cats coming from five cities of northeast of São Paulo state. Additionally, relate informations of clinical records with positives results get in the three laboratories tests used, whatever, complement fixation test (CFT), immunofluorescende assay (IFI) and Polymerase Chain Reaction (PCR). Experimental group had 151 animals, witch 73 coming from catteries, 18 coming from veterinary clinical/hospital and 60 coming from public animal shelters. From 151 samples of conjunctival swabs submitted to PCR, in 6% (9/151) were detect DNA of *C.felis*. Anti-*Chlamydomphila* antibodies were detect in 72,1%(106/147) of samples of serum submitted to IFI. In just 9,4% (10/106) of the positive serums in IFI, had complement fixation antibodies, detected by CFT. The CFT, although specific, presented low sensibility when to use to research of anti-*Chlamydiaceae* antibodies in domestic cats. In cats from catteries, animals between one and six year, and female were more predispose to a presence of antibodies anti-*Chlamydomphila* by IFI. However, these results were not observed in animals PCR positive. Thus, was observed a relationship between the presence of chlamydial DNA and antibodies anti-*Chlamydiaceae* in Brazilian domestic cats, added with informations of clinical records, like with upper respiratory tract disease, ocular discharge and conjunctivitis.

Keywords: Chlamydiosis, Upper Respiratory Tract Disease, Immunofluorescende Assay, Complement Fixation Test, Polymerase Chain Reaction.

1. INTRODUÇÃO

A clamidiose ou pneumonite felina é uma enfermidade infecto-contagiosa, responsável por doenças do trato respiratório superior (Complexo respiratório felino) e por conjuntivite aguda à crônica em gatos domésticos. É importante realçar também, às suspeitas do seu envolvimento em doenças do trato reprodutivo, como provável agente causador de abortos, mortalidade neonatal e infertilidade, principalmente em gatos domésticos mantidos em gatis.

Apesar de descrita pela primeira vez em 1942, a patogenia da doença ainda não está claramente definida, bem como seu potencial zoonótico continua sendo motivo de controvérsia, provavelmente pela dificuldade em se estabelecer um diagnóstico laboratorial espécie-específico do seu agente etiológico. E, ainda, a ocorrência de outras moléstias infecto-contagiosas, dentre as quais, as causadas por herpesvírus, calicivírus e micoplasma, manifestarem sinais clínicos semelhantes àqueles verificados na clamidiose. Em face disso, merece ser ressaltado, também, o fato do diagnóstico clínico em felinos ser rotineiramente feito com base na sintomatologia clínica, procedimento nem sempre efetivamente conclusivo. Daí, a necessidade de um adequado respaldo laboratorial comprobatório, o qual consiste no isolamento e identificação do agente e, indiretamente, na pesquisa de anticorpos (sorodiagnóstico). Atualmente a detecção do agente, a *Chlamydophila felis*, tem sido feita por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR), devido à vantagem desta técnica detectar pequenas quantidades do genoma do microrganismo, sem a necessidade de manipulação de organismos viáveis. O sorodiagnóstico é mais comumente realizado por meio das reações de imunofluorescência indireta (RIFI), fixação do complemento (RFC) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Dessa forma, o emprego de provas laboratoriais, sem dúvida, permitirá o estabelecimento de um trabalho de rotina prático e seguro para confirmação do diagnóstico clínico e, também, para investigações soropidemiológicas da doença.

Dentro do contexto da medicina felina, em termos mais estritos, a realização de pesquisas que possam fornecer subsídios científicos para o conhecimento desta enfermidade no país, particularmente no tocante a presença direta e/ou indireta do agente na população de gatos, sem dúvida, pode auxiliar na definição da real importância da *C. felis* como causador de doenças em felinos domésticos brasileiros.

Nesse aspecto, no Brasil, não encontramos na literatura compulsada, trabalhos referentes a clamidiose felina, apesar de vacinas contra *C. felis*, produzidas no exterior estarem sendo comercializadas no mercado veterinário brasileiro e amplamente utilizadas em clínicas veterinárias para imunização de gatos.

Pelos motivos expostos, foi delineado o presente estudo com o propósito de adequar os testes de PCR, RFC e RIFI, com vistas respectivamente a detecção de genoma e de anticorpos anti-*Chlamydophila felis*. Para tanto, foram avaliada preliminarmente, uma população de gatos domésticos errantes instalados em abrigos públicos para animais, bem como em gatis e atendidos em clínicas e hospitais veterinários da região nordeste do estado de São Paulo.

2- REVISÃO DE LITERATURA

Ainda são muito escassos os trabalhos científicos que fazem referência à clamidiose ou pneumonite felina. No Brasil, não foi encontrado, na literatura compulsada qualquer tipo de divulgação que trouxesse informações sobre esse assunto, de suma importância dentro do contexto da medicina felina. A intenção foi revisar e enfatizar apenas aspectos mais relacionados à temática do presente trabalho, ou seja, às técnicas laboratoriais de diagnóstico direto e indireto da doença, respectivamente, Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Reações de Fixação do Complemento (RFC) e de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizadas no presente trabalho. Antes, porém, por ser assunto muito pouco estudado em nosso meio, necessário se faz, mesmo de maneira sintética, fornecer algumas informações sobre o agente, a doença, o hospedeiro e o diagnóstico, na esperança de que tal medida possa contribuir para um melhor entendimento do assunto, motivo da presente investigação.

Do ponto de vista taxonômico, a *Chlamydophila felis* era conhecida como *Chlamydia psittaci* var. *felis*. A partir de 1999, com a implantação de nova classificação taxonômica, a *C. psittaci* foi subdividida em quatro novas espécies: *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis* e *Chlamydophila caviae*, respectivamente, agentes etiológicos da clamidiose em aves e psitacose em humanos; do aborto em ruminantes; da pneumonite felina, e, da inflamação e secreção ocular em cobaias (*Cavia porcellus*), consoante revela Everett, 2000.

As *Chlamydiaceae* são microrganismos dependentes da célula hospedeira para a obtenção de energia, devido à incapacidade de produzir adenosina trifosfato (ATP), sendo, por isso, consideradas parasitas intracelulares obrigatórios. Por serem microrganismos filtráveis, dependentes de células vivas para serem replicados e, de induzir a formação de corpúsculos de inclusão citoplasmática na célula infectada, os agentes deste gênero foram inicialmente considerados como vírus. Atualmente, são considerados bactérias, devido à presença de ambos os tipos de ácidos nucléicos (DNA e RNA) na sua estrutura e de possuir membrana celular similar à de uma bactéria gram

negativa, a qual é composta por fosfolipídios, lipídeos, lipopolissacarídeos e proteínas (LONGBOTTON e COULTER, 2003).

Do ponto de vista de replicação as clamidofilas são microrganismos que apresentam um ciclo de desenvolvimento bifásico característico. Na forma infecciosa, também denominada de corpo elementar (CE), cujo tamanho aproximado é de 0,3 µm de diâmetro, o microrganismo é estável no meio ambiente. Após a fixação do CE em receptores específicos da célula do hospedeiro, ocorre uma endocitose, ficando este envolvido em um vacúolo dentro da célula infectada. Na fase seguinte, ainda dentro do vacúolo, o CE sofre divisão binária, sendo diferenciado em uma nova partícula, denominada de corpo reticular (CR), cujo tamanho varia de 0,5-1,0µm. Os CR resultantes da divisão dão origem às inclusões dentro do citoplasma da célula hospedeira e, posteriormente, são novamente diferenciados em CE, os quais podem ser eliminados das células hospedeiras, infectando novas células (LONGBOTTON e COULTER, 2003). Tal ciclo tem a duração de 24 a 48h (MOULDER, 1991).

A patogenia da clamidiose felina ainda não está totalmente esclarecida. O primeiro relato sobre isolamento do agente etiológico da clamidiose felina ocorreu em 1942, a partir de material proveniente do pulmão de um gato naturalmente infectado (BAKER, 1942 *apud* SYKES, 2005). Em decorrência deste fato a doença foi denominada de pneumonite felina, termo este erroneamente empregado, tendo em vista que este microrganismo raramente causa pneumonia em gatos (BART et al., 2000). Em 1967, CELLO (*apud* RAMSEY, 2000), relatou conjuntivite em gatos devido a *C.felis*. A partir de então ficou demonstrado o tropismo deste agente pelas células do epitélio da conjuntiva, causando conjuntivite aguda à crônica (HOOVER et al., 1978). A bactéria também já foi isolada de pulmões, fígado, baço e rins de gatos (DICKIE, 1980; WILLS et al., 1988; MASUBUSHI et al., 2002), todavia o significado da presença deste microrganismo nestes locais continua obscuro.

Ademais, a *Chlamydomphila felis* também foi encontrada na mucosa gástrica, e em macrófagos e células escamosas do exsudato peritoneal e intestinal de gatos (DICKIE, 1980, HARGIS et al., 1983; GAILLARD et al., 1984). Este fato pode ser um

indicativo que o trato gastrointestinal seja um local de infecção persistente em gatos, assim como ocorre com outras espécies de clamídias que parasitam aves e ruminantes (SYKES, 2001).

A transmissão horizontal de *C.felis* de gatos infectados a gatos susceptíveis, independente ou não da presença de sinais clínicos da doença, ocorre primariamente pelo contato direto com secreções oculares contaminadas e, indiretamente, pela contaminação de fômites. A transmissão por aerossóis tem sido motivo de controvérsia entre alguns autores. Assim, HOOVER et al. (1978) relataram a ocorrência de infecção experimental em gatos submetidos experimentalmente à nebulização de *C.felis* durante 3 minutos. Entretanto, POVEY (1990) propôs que a transmissão por aerossóis não é um evento comum, uma vez que dificilmente a *C. felis* compromete o trato respiratório superior e, ademais, os gatos produzem pequeno volume de secreção expiratória, o que limita a produção e projeção de gotículas contendo CE. A transmissão venérea em felinos ainda não foi comprovada, contudo, sabe-se que a transmissão para neonatos ocorre na superfície da mucosa do trato reprodutivo e no ducto nasolacrimal durante o parto (TERWEE et al., 1998).

A *C. felis* não tem preferência por regiões, climas ou geografia, mas a maioria dos casos positivos da doença tem sido mais comumente diagnosticada nos meses de verão, quando comparado com as demais estações do ano (SYKES et al., 1999b). Por ser doença cosmopolita, está presente tanto em climas áridos quanto úmidos. Segundo WILLS et al. (1988), gatos machos e gatos da raça Birman, são mais predispostos à infecção por *C. felis*; contudo, tal predisposição não foi observada por SYKES et al. (1999b) e RAMPAZZO et al. (2003). Estudos realizados no Japão revelaram que a clamidiose felina ocorre com mais freqüência em gatos abandonados (45,5%) do que em gatos conviventes com seus proprietários (17,3%) (YAN et al., 2000). Nos estudos realizados por SYKES et al. (1999b) e RAMPAZZO et al. (2003) ficou demonstrado que gatos com idade inferior a um ano são mais comumente infectados por *C. felis*, comparativamente a gatos mais velhos. Filhotes com menos de 5 semanas de idade são menos afetados que animais com idade entre 5 semanas e 9 meses (WILLS, 1984)

e, ainda, gatos com mais de cinco anos de idade são menos predispostos a infecção por *C. felis*. (VON BOMHARD et al., 2003). Entretanto, gatos que vivem em abrigos públicos estão mais predispostos a doenças do trato respiratório superior (BANNASCH e FOLEY, 2004).

O período de incubação da doença em felinos varia de três a cinco dias (SYKES, 2005). Os sinais clínicos variam conforme a idade do gato, imunocompetência, modo de exposição ao agente (experimental ou natural), tecido infectado e volume inoculado (RAMSEY, 2000). Em geral, na infecção natural os sinais clínicos da doença são observados depois de 5 a 14 dias de exposição ao agente. Durante a fase aguda da doença, observa-se secreção ocular serosa profusa, com presença de quemose, hiperemia da mucosa conjuntival e blefarospasmos. Inicialmente, um dos olhos é atingido e após 5 a 21 dias, o outro olho também apresenta os mesmos sinais. A hipertermia pode ou não ocorrer, além de co-infecções na conjuntiva, resultando em uma descarga ocular purulenta (WILLS et al., 1984).

Secreção nasal e espirros têm sido observados em alguns gatos; sendo tal ocorrência mais comumente observada em animais jovens (cinco semanas a nove meses de idade). Na maioria dos gatos naturalmente infectados a doença é autolimitante. Em filhotes, quando acometidos por infecções brandas, a doença regride espontaneamente após duas a seis semanas e em menos de duas semanas em gatos mais velhos (RAMSEY, 2000). Os sinais clínicos minimizam após poucas semanas, contudo a conjuntivite pode persistir por meses. Em alguns casos a conjuntivite desaparece 60 dias após a infecção, mas os gatos continuam a abrigar o agente (O'DAIR et al., 1994). Em infecções naturais, muitos gatos permanecem sadios e normoréticos, possivelmente devido a antibioticoterapia, logo após o início da conjuntivite (PETERSEN, *apud* SYKES, 2005). Contrariamente, febre e letargia foram observadas em um gato submetido a antibioticoterapia (LIPMAN et al., 1994).

C. felis também foi isolada de felinos neonatais com conjuntivite, embora muitos destes filhotes aparentemente estivessem protegidos pelos anticorpos maternos (SYKES, 2005). Da mesma forma, anticorpos maternos contra *C. felis* foram detectados

no colostro de gatas expostas a uma infecção prévia, os quais persistiram e protegeram os filhotes durante nove a 12 semanas de vida (WILLS et al., 1984).

Durante infecção experimental, HOOVER et al. (1978) reportaram o aparecimento de sinais clínicos de conjuntivite 5 a 10 dias após exposição ao agente, os quais persistiram por 22 a 45 dias. Inicialmente unilateral, a infecção evoluiu para bilateral e a severidade do processo inflamatório variou consideravelmente de um olho a outro. Em um primeiro momento, foram observados blefarospasmos, aumento de fluido conjuntival, quemose e congestão. Após três a cinco dias, o exsudato conjuntival passou de seroso para mucopurulento e a quemose e a congestão tornaram-se severas. Hiperplasia do tecido linfóide da membrana nictitante foi observada 10 dias pós-exposição, persistindo até 45 dias. Espirros intermitentes foram observados entre o sétimo e 37º dia pós-exposição e descarga nasal serosa entre o 14º e 21º dia. Anorexia, apatia e inapetência também foram observadas entre o 17º e 38º dia em todos os gatos com conjuntivite severa. Entre o 11º e 15º dia ocorreu pirexia, persistindo por três a oito dias (HOOVER et al., 1978).

Associação entre clamidiose e claudicação foi relatada em gatos experimentalmente infectados, duas semanas após o início da conjuntivite, em 10 dos 19 gatos infectados (TERWEE et al., 1998).

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

Infecção de tecido placentário por *C. felis* já foi confirmada por meio da PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) em uma gata experimentalmente infectada durante o período de gestação. Embora tenha tido parto normal, tal gata eliminou *C. felis* pela via vaginal, no momento do parto e nos 12 dias seguintes. Entretanto, placentite não foi observada, quando analisada por método histológico (SYKES et al., 1999a).

A habilidade da *Chlamydophila* em causar doenças do trato reprodutivo também depende do estágio de prenhez em que ocorre a infecção, além de co-infecção com

outros microrganismos, imunossupressão concomitante, grau de infecção e cepa envolvida (SYKES, 2005).

A diferenciação entre a *C. felis* e outros agentes causadores de conjuntivite e doença do trato respiratório superior de felinos é de suma importância dentro do contexto da medicina felina. Os agentes mais comumente envolvidos no complexo respiratório felino além da *C. felis* são: calicivírus felino (CVF), rinotraqueíte viral felina ou herpesvírus felino tipo 1 (HVF-1) e *Mycoplasma*. A diferenciação entre CVF, HVF-1 e clamidiose felina não é possível de ser realizada tão somente com base nos sinais clínicos, uma vez que a doença não apresenta nenhum sinal clínico patognomônico. Portanto, a associação destes agentes com a *C. felis* pode mascarar ou dificultar o diagnóstico clínico (GASKELL E DAWSON, 1990).

Gatos com infecção concomitante por CVF e clamidiose felina freqüentemente apresentam, além da conjuntivite, ulcerações orais. Os calicivírus são usualmente menos virulentos, podendo ou não produzir lesões pulmonares; entretanto, estirpes virais mais virulentas causam pneumonia severa acompanhada de transtorno do trato respiratório inferior. Uma leve rinite também pode ocorrer (LOVE, 1972; POVEY, 1976; RAMSEY, 2000).

Na rinotraqueíte viral felina, causada pelo HVF-1, rinite e traqueíte associadas a outros sinais clínicos, principalmente descarga nasal, são mais severas que a pneumonia (LOVE, 1972; POVEY, 1976). Ademais, co-infecções com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) prolongam a duração da conjuntivite e o tempo de eliminação da *Chlamydomphila* (O'DAIR et al., 1994).

Estudos referentes à detecção direta e indireta de *C. felis* já foram realizados em vários países, conforme sumariado na Tabela 1. Como se pode observar, a detecção de antígeno de clamidofila variou de 6,1 a 76,92 % e a pesquisa de anticorpo de 2,1 a 59% em gatos com sinais clínicos de clamidiose.

Tabela 1: Estudos realizados sobre prevalência da clamidiose felina por diferentes autores e em diferentes países. Jaboticabal, 2008.

País	Gatos (sinais clínicos)	Técnica de diagnóstico	Positivo/número total de gatos testados (%)	Referência
Austrália	Com e sem sinais clínicos	RFC	0/35 (0)	STUDDERT e MARTIN, 1970.
	Conjuntivite	RFC	17/134 (12,7)	STUDDERT et al., 1981.
	Trato respiratório superior Sem sinais clínicos	PCR	66/462 (14,3) 1/95 (1,1) 13/168 (7,7)	SYKES et al., 1999b SYKES et al., 1997
	Conjuntivite Sem sinais clínicos	RIFD	17/35 (49) 7/18 (39)	POINTON et al., 1991.
Alemanha	Com e sem sinais clínicos	RFC	0/20 (0)	SCHMATZ et al., 1977.
	Respiratórios	RFC	4/75 (5,3)	KNECHT, 1979.
	Com e sem sinais clínicos	ELISA	14/108 (13)	WERTH, 1987.
	Com e sem sinais clínicos	RIFI	27/511 (5,3)	ROOS VON DANWITZ, 1991.
Canadá	Sem sinais clínicos	ELISA indireto	29/132 (22)	LANG, 1992.
Dinamarca	Sem sinais clínicos	RFC	0/20 (0)	FRIIS, 1976.
Estados Unidos	Conjuntivite crônica	RIFD	11/61 (18)	NASISSE et al., 1993.
Eslováquia	Respiratórios e oculares	ELISA	10/13 (77)	TRÁVNICEK et al., 2002.
França		RFC	4/10 (40)	GIROUD et al., 1955.
Itália	Conjuntivite	PCR	14/70 (20)	RAMPAZZO et al., 2003.
	Com sinais clínicos	PCR	9/40 (22,5)	MARSILIO et al., 2004.
Japão	Com e sem sinais clínicos	RFC	17/823 (2,1)	FUKUSHI et al., 1985.
	Trato respiratório superior	PCR	7/26 (26,9)	MOCHIZUKI et al., 2000
	Secreção ocular e/ou conjuntivite	Cultura celular PCR	6/52 (11,5) 7/156 (4,5)	IWAMOTO et al., 2001.
	Com e sem sinais clínicos	PCR	39/66 (59,1)	CAI et al., 2002
Nova Zelândia	Com e sem sinais clínicos	ELISA direto	47/333 (14,1)	GRUFFYDD-JONES et al., 1995.
Reino Unido	Com e sem sinais clínicos	RFC	0/31 (0)	POVEY E JOHNSON, 1971.
	Sem sinais (de fazenda de ovelhas)	RIFI Cultura celular	23/51 (45) 3/49 (6,1)	GETHINGS et al., 1987.
	Conjuntivite Sem conjuntivite mas doentes	RIFI	9/116 (59) 3/40 (7,8)	WILLS et al., 1988.
	Sem sinais clínicos	RIFI	23/252 (9,1)	GUNN-MOORE et al., 1995.
	Conjuntivite	PCR	31/223 (13,9)	MCDONALD et al., 1998.
Suécia	Sem sinais clínicos	RIFI	24/214 (11,2)	HOLST et al., 2006.
Suíça	Respiratórios Sem sinais clínicos	RFC	30/93 (32,3) 5/108 (4,6)	LAZAROWICZ et al., 1982.
	Conjuntivite Sem sinais clínicos	PCR	26/226 (11,5) 7/30 (23,3)	VON BOMHARD et al., 2003.

RFC – Reação de Fixação do Complemento; ELISA – Ensaio imunoenzimático; RIFD – Reação de Imunofluorescência Direta; RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta; PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase.

Tabela adaptada de WERTH (1989) e GUNN-MOORE et al. (1995).

O potencial zoonótico da *C. felis* ainda é controverso e está sendo investigado. Alguns trabalhos atribuem à *C. felis*, a etiopatogenia da pneumonia atípica (COTTON e PARTRIDGE, 1998), da hepatoesplenomegalia (GRIFFITHS et al., 1978), da

glomerulonefrite e da endocardite (REGAN et al., 1979), em humanos. Entretanto em todos os casos, as associações foram baseadas na sorologia gênero-específica e no contato destes pacientes com gatos, sem a realização de um diagnóstico confirmativo do agente nos animais. Todavia, HARTLEY et al. (2001), após a tipificação do DNA por meio de enzimas de restrição, demonstraram que a amostra de clamidofila isolada de um homem HIV positivo apresentando sintoma de conjuntivite crônica era idêntica à amostra isolada de um filhote de gato, recentemente adquirido por ele.

As clamídias são microrganismos sensíveis as tetraciclinas, eritromicinas, rifamicinas, fluorquinolonas e a azitromicina (SYKES, 2005). A combinação da terapia sistêmica, doxiciclina (5mg/kg, duas vezes ao dia) com a terapia tópica utilizando pomadas de tetraciclina é o mais indicado em gatos (GREENE, 1990).

O isolamento do agente em cultura de células ou ovos embrionados é o método padrão para o diagnóstico de *Chlamydiaceae*, porém, a necessidade de técnicos experientes limita a realização do procedimento como técnica de rotina, restringindo este tipo de diagnóstico a alguns poucos laboratórios (PEELING, 1996). A *C. felis* pode ser isolada em cultura de células das linhagens McCoy, HeLa, Vero, L929 e BGM ou em ovos embrionados de galinha de 6 a 7 dias de incubação a partir de amostras oriundas de conjuntiva, orofaringe, reto, fezes, secreção vaginal ou de tecidos dos animais suspeitos. As monocamadas de células entre o 2º e o 6º dia pós-inoculação, bem como os esfregaços das membranas dos sacos vitelinos dos embriões mortos entre 4 e 12 dias são fixados em metanol e submetidos aos métodos de coloração de Gimenez, Macchiavello ou Stamp. Anticorpos monoclonais gênero-específicos conjugados ao isotiocianato de fluoresceína são também utilizados para identificar as inclusões intracitoplasmáticas de *Chlamydiaceae* nas células hospedeiras (ANDERSEN, 1998). O procedimento de inoculação em ovos embrionados, por ser demorado, é comumente utilizado para conservação de cepas e produção de antígeno (GRIMES, 1996). O isolamento do agente a partir de suabes de conjuntiva é dificultado devido à presença de pequena quantidade do agente na amostra e pela presença de

anticorpos na lágrima, particularmente nos casos de infecções crônicas em gatos (MCDONALD et al., 1998).

Atualmente, a PCR vem sendo amplamente utilizada na medicina veterinária com vistas à identificação de agentes de doenças, comparativamente as técnicas tradicionais de diagnóstico de *Chlamydiaceae*. Tem como vantagens a capacidade de detectar pequenas quantidades de DNA presentes na amostra e não necessitar de organismos viáveis (MCDONALD et al., 1998; SYKES et al., 1997). Amostras podem ser colhidas do saco conjuntival de gatos por meio de suabes embebidos com salina. Todavia, a discriminação definitiva da espécie de *Chlamydiaceae* só é possível por meio da técnica de RFLP (Restriction fragment length polymorphism), na qual o gene *Momp2* da *Chlamydiaceae* é examinado, após tratamento com enzimas de restrição (*Rsa I*, *Hinf I*, *Alu I*), consoante revelam HARTLEY et al., 2001 e DEMKIN e ZIMIN, 2005.

Real-Time PCR também já foi utilizada para quantificar o número de genótipos de *C. felis* presentes em amostras de suabes obtidos de conjuntiva de gatos (HELPS et al., 2001).

SYKES et al. (1999a) demonstraram que culturas celulares permanecem positivas apenas um dia após o início do tratamento com doxiciclina, enquanto na PCR o genoma do microrganismo continua sendo detectado mesmo após cinco dias de tratamento. Demonstraram também, que a PCR foi significativamente mais sensível que a técnica de cultura celular em gatos não-tratados (PCR 85,7% e cultura 72,9%) e em gatos com sinais clínicos da doença (PCR 89,2% e cultura 79,2%).

O exame de esfregaços de conjuntiva corados com Giemsa ou Gimenez pode ser utilizado como método auxiliar no diagnóstico da clamidiose felina; apesar de não ser um método seguro, pois tal método depende da experiência do citopatologista.

Inclusões basofílicas no citoplasma de células epiteliais e raramente naquele dos neutrófilos são freqüentemente vistas no início da infecção, mas nem sempre em todas as amostras (LAVACH et al., 1977). Inclusões citoplasmáticas foram observadas entre o sétimo e 14º dia após exposição experimental, sendo que a maior incidência das mesmas ocorreu no sétimo dia (HOOVER et al., 1976). As inclusões são

visualizadas nas cores que variam de azul a púrpura, aparecendo adjacentes ao núcleo da célula. Corpos reticulares livres podem ser reconhecidos como manchas bipolares. Os corpos reticular e elementar devem ser diferenciados dos grânulos de melanina, restos nucleares, bactérias ou inclusões induzidas por medicamentos tópicos como a neosporina (LAVACH et al., 1977; WILLS et al., 1988; VON BOMHARD, 2003). Na infecção por *Chlamydomphila* as células epiteliais que normalmente são vistas como um tapete de células, estão isoladas ou em grupo de duas ou três células. São encontrados também neutrófilos, células mononucleares, plasmócitos e células gigantes (LAVACH et al., 1977).

Diferentes procedimentos de testes imunoenzimáticos (ELISA) desenvolvidos para detecção de *C.trachomatis* têm sido utilizados comercialmente. Entretanto, nem todos foram avaliados para o diagnóstico da *C.felis* e, quando foram, apresentaram uma considerável diferença em sensibilidade e especificidade. São descritas variações na especificidade (80 a 94,9%) e, particularmente, na sensibilidade (25 a 84,2%) para detecção da *C.felis*, quando comparada a cultivo celular (WILLS et al., 1988; POINTON et al., 1991; GRUFFYDD JONES et al., 1995).

O sorodiagnóstico é o procedimento mais comumente utilizado para a detecção de anticorpos na rotina das doenças causadas por *Chlamydiaceae*. Entre os exames sorológicos, os mais utilizados são a Reação de Fixação do Complemento (RFC) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

A RFC vem sendo utilizada desde 1930 para o diagnóstico de clamidioses (FUKUSHI et al., 1985; WERTH, 1989; BART et al., 2000; PEELING, 2000). O teste é gênero-específico, pois utiliza como fonte de antígeno lipopolissacarídeo (LPS), antígeno comum a todas as *Chlamydiaceae*, sendo utilizado para confirmar um diagnóstico presuntivo (MANNION, 1991; PEELING, 2000; PERSSON, 2000). É relativamente pouco sensível na presença de uma infecção em andamento (WONG, 1994) sendo, porém, útil na detecção de anticorpos tardios (CELLO, 1971).

WILLS et al. (1988) relatam que a RFC não é um teste sorológico confiável, já que alguns trabalhos demonstram que não foi possível a detecção de anticorpos

fixadores de complemento em gatos infectados experimentalmente (CELLO, 1971 e SHEWEN et al., 1980b). Este mesmo autor sugere que pode acontecer em gatos um fenômeno semelhante ao que ocorre em infecção por clamídia em bovinos, em cuja espécie a resposta imune a IgG2 é maior que a de IgG1, particularmente nos casos de infecções locais. Considerando que o complemento de coelho é sensível a IgG1, o sorodiagnóstico pela RFC passa a ser menos sensível (SCHMEER et al., 1986).

A RIFI é um método eficiente para detecção de anticorpos séricos em animais recentemente infectados. Segundo relatado por WILLS et al. (1988) mais de 95% dos gatos positivos para *C. felis* tiveram títulos superiores à 1:32, contudo em 7,5% dos animais, nos quais não foi possível a detecção do agente, observaram-se títulos sorológicos nestes mesmos patamares (1:32).

Na Suécia, estudo objetivando a pesquisa de anticorpos pela RIFI em gatos sem sinais clínicos de clamidiose, revelou que a maioria dos animais analisados apresentou títulos de anticorpos inferiores a 1:128 (HOLST et al., 2006). Embora altos títulos de anticorpos seja indício de exposição prévia ao agente, não indicam necessariamente que um gato esteja infectado, ratificado no estudo de MCDONALD et al. (1998) o fato de que somente 41% dos gatos soropositivos pela RIFI, foram positivos na PCR, reafirmando a importância da detecção direta do agente.

WILLS et al. (1987) estudando comparativamente os resultados das reações de fixação do complemento e de imunofluorescência em soros de gatos vacinados e não vacinados, ambos infectados experimentalmente após a imunização, observaram que animais cujos títulos de anticorpos foram ≥ 1024 na RIFI, não apresentaram anticorpos fixadores de complemento.

Tanto as vacinas inativadas quanto vivas modificadas podem ser utilizadas na proteção contra clamidiose felina, contudo, tais vacinas não impedem a infecção por *C.*

felis, embora diminua os sinais clínicos da doença (SHEWEN et al., 1980; WILLS et al., 1987). Resta salientar também que, tanto as vacinas inativadas, quanto as vacinas vivas, induzem altos títulos de anticorpos que usualmente persistem por até um ano após a vacinação (WASMOEN et al., 1992).

Apesar da não existência de trabalhos publicados sobre a ocorrência e prevalência de *C. felis* em gatos no Brasil, duas vacinas (inativada e viva modificada) estão disponíveis em três laboratórios no mercado brasileiro, fato este que ratifica a importância desta doença em nosso país. Todavia, é importante frisar que as vacinas comercializadas contra a clamidiose felina estão associadas a outros antígenos; portanto, imunizando os animais contra outras importantes doenças de felinos domésticos. A não existência de trabalhos na literatura compulsada sobre a presença deste microrganismo no Brasil não exclui a ocorrência da doença. Tal fato revela a necessidade da realização de estudos com esta finalidade, os quais certamente fornecerão subsídios científicos para o conhecimento da doença no país, com possíveis e importantes implicações práticas para a definição do real papel deste agente como causa de doenças em felinos domésticos brasileiros.

3- OBJETIVOS

3.1-Objetivo geral:

Pesquisar a presença direta e indireta de *Chlamydomphila felis* em gatos domésticos provenientes de gatis, abrigos públicos para animais e atendidos em clínicas particulares situadas em cinco municípios da região nordeste do estado de São Paulo.

3.2-Objetivos específicos:

- Estabelecer um protocolo de uso da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção do genoma de *C. felis* em amostras biológicas (suabes conjuntivais) de gatos domésticos;
- Adaptar, para uso em microplacas, a Reação de Fixação do Complemento (RFC), técnica 50% de hemólise, para a detecção de anticorpos anti-*Chlamydiaceae* em amostras de soros de gatos;
- Adaptar e aplicar a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), “Kit” padronizado para uso humano, para a detecção de anticorpos anti-*Chlamydiaceae* em amostras de soros de gatos;
- Analisar comparativamente os resultados obtidos na reação de detecção de DNA bacteriano (PCR) de *C. felis*, com aqueles obtidos nas RIFI e RFC;
- Correlacionar os dados de ficha clínica dos gatos avaliados com os resultados positivos obtidos na RFC, RIFI e PCR.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais

Foram utilizados 151 gatos domésticos provenientes de hospitais e clínicas veterinárias, abrigos públicos para animais ou gatis (Figura 1) de cinco cidades da região nordeste do estado de São Paulo (Figura 2). Em linhas gerais, o grupo experimental final foi constituído de 18 animais provenientes de clínica/hospitais veterinários, 73 de gatis e 60 de abrigos públicos para animais, conforme sumariado na Tabela 2.

Tabela 2: Número de amostras colhidas em cada grupo experimental. Jaboticabal, 2008.

GRUPO	CIDADE	NÚMERO DE AMOSTRAS COLHIDAS		PERCENTAGEM DE MATERIAL COLHIDA
		Soro	Suabe	
Gatil 1	Jaboticabal	14	15	
Gatil 2	Jaboticabal	13	14	
Gatil 3	Jaboticabal	22	23	
Gatil 4	Descalvado	21	21	
		70	73	48%
AP 1	Sertãozinho	29	29	
AP 2	São José do Rio Preto	14	15	
AP 3	Ribeirão Preto	16	16	
		59	60	40%
Clínicas	Sertãozinho	18	18	12%
TOTAL		147	151	100%

AP: Abrigo público para animais



Figura 1: A e B – Animais do grupo gatil. Jaboticabal, 2008.

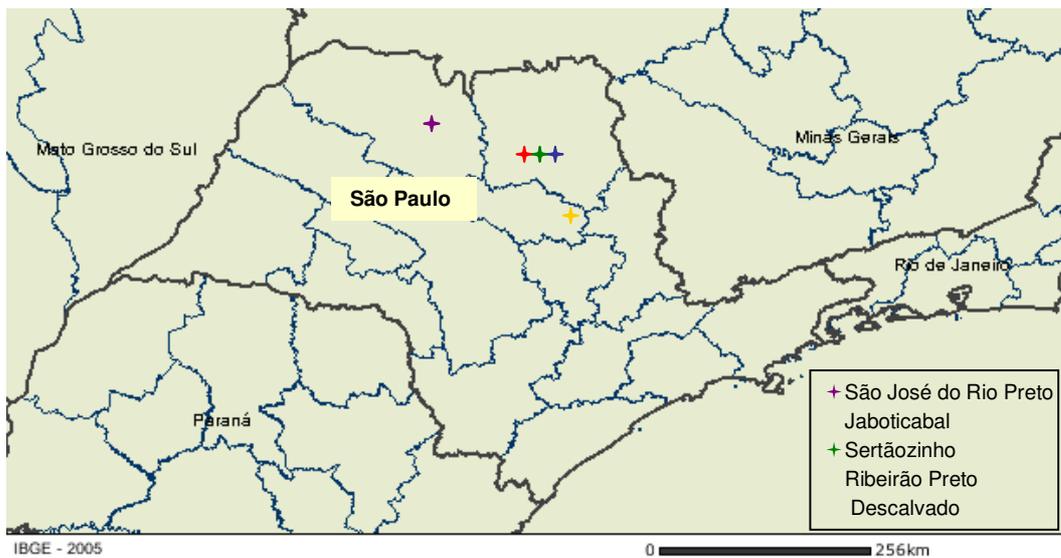


Figura 2: Cinco cidades da região nordeste do estado de São Paulo, de onde se coletaram as amostras avaliadas. Fonte: www.ibge.gov.br acessado em 07/11/2007.

No momento da colheita de cada amostra para exame laboratorial, todos os animais foram submetidos a exame clínico para observação ou não de sinais clínicos compatíveis com clamidiose e, ademais, de histórico de problemas respiratórios e oculares (Figura 3). Informações sobre os dados obtidos foram anotados em fichas clínicas individuais (Anexo 1), objetivando agregar o maior número possível de informações acerca da procedência do animal (proprietário, gatil ou animal abandonado), sexo, raça, idade, estado imune e, quando vacinado, o tipo de vacina utilizada. Tais dados serviram de subsídios na avaliação epidemiológica da enfermidade nos gatos em estudo.

4.2-Colheita de material biológico

A colheita de material da membrana da conjuntiva de gatos (n = 151) para detecção de genoma da *C. felis* foi realizada com auxílio de suabes estéreis (Figura 4A). Após a colheita e identificação, cada amostra foi acondicionada individualmente em microtubos plásticos contendo 1mL de etanol absoluto e, a seguir, mantidos à temperatura de -20°C até o momento de serem processadas.

Para colheita de sangue (n = 147), os gatos foram submetidos à punção da veia jugular, realizadas com agulhas (20 X 0,55) e seringas (3mL) estéreis e descartáveis (Figura 4B). O soro de cada animal foi separado do sangue total por centrifugação, acondicionado em microtubos e mantido à temperatura de -20°C até o momento de uso.

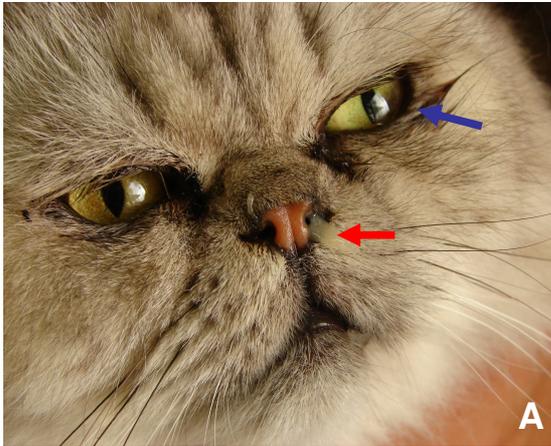


Figura 3: Animais com sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina. A: Gato com secreção ocular serosa (seta azul) e secreção nasal unilateral mucopurulenta (seta vermelha). B: Gato com secreção nasal bilateral mucopurulenta (Setas pretas). Jaboticabal, 2008.

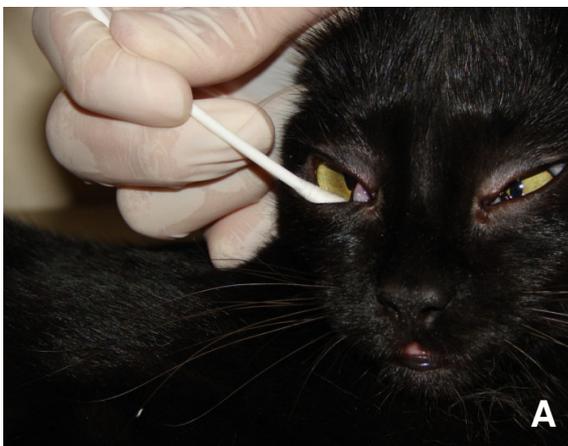


Figura 4: Colheita de material biológico. A: Procedimento de colheita de suabe de conjuntiva de um gato. B: Procedimento de colheita de sangue da veia jugular de um gato. Jaboticabal, 2008.

4.3- Reação de fixação do complemento

4.3.1- Diluente

O diluente utilizado na Reação de Fixação de Complemento (RFC) consistiu de uma solução tampão trietanolamina, preparada a partir de uma solução mãe trietanolamina diluída a 10% em água destilada.

4.3.2- Hemácias de carneiro

Em toda reação de fixação do complemento foi utilizada mistura de hemácias de dois carneiros, conservada em solução de Alsever, à temperatura de 4^oC. A obtenção de sangue de carneiro foi realizada em condições anti-sépticas, colhendo-se o sangue de carneiro em igual volume da solução conservadora, previamente submetida a um processo de tinalização. No momento do uso, as hemácias foram filtradas em algodão e lavadas (três vezes) por centrifugação, com solução tampão (trietanolamina), e centrifugadas a 800 x g durante 10 minutos. Da papa de hemácias obtida, foi preparada uma suspensão a 5% em solução tampão, a qual foi a seguir padronizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda visível de 546 nm para se obter a densidade óptica (DO) igual a 0,56.

4.3.3- Preparo e dosagem de hemolisina anti-hemácias de carneiro

Para o preparo da hemolisina foram utilizados dois coelhos machos. Para tal, foi utilizada a técnica descrita por ULRICH e MAC ARTHUR (1942), a qual consistiu de inoculação de 0,5 mL, 1,0 mL, 0,2 mL + 1,3 mL; 0,2 mL + 1,8 mL e 0,2 mL + 1,8 mL de soro de carneiro, no 1^o, 3^o, 5^o, 7^o e 9^o dia, respectivamente. Depois de um intervalo de 5 dias, ou seja, no 14^o dia, foi injetado 1,0 ml de hemácias de carneiro a 10%, no 16^o dia 0,2 ml + 2,0 ml de hemácias de carneiro, no 18^o dia 0,2 ml + 3,0 ml e, no 20^o dia 0,2 ml

+ 4,0 ml de hemácias de carneiro. Seguiu-se um intervalo de cinco dias e procedeu-se a sangria total dos coelhos.

4.3.4- Complemento

A fonte de complemento consistiu de mistura de soros de 15 ou mais cobaios machos, sangrados por punção cardíaca, após 24 horas de jejum. A mistura de soro obtida foi distribuída em pequenos tubos na quantidade de 0,5 ml e, a seguir, conservados à temperatura de -70 °C, até o momento de uso.

A determinação da dose de reatividade ótima do complemento foi obtida em tubos, fazendo-se reagir várias diluições do complemento (1/100, 1/170, 1/210, 1/280, 1/300, 1/360, 1/460, e 1/600) frente a uma suspensão padronizada de hemácias de carneiro, concentração ótima de uso, conforme preconiza a técnica de fixação do complemento utilizada na pesquisa. Os volumes da reação foram: 3,0 ml de tampão trietanolamina, 1,0 ml das diferentes diluições do complemento e 1,0 da suspensão de hemácias e o tempo e temperatura de incubação da reação, respectivamente de 1 hora a 37°C (BIER et al., 1968).

O título de complemento obtido (título em unidades 50% de hemólise) para uso na RFC foi de 334 U/ml e 300 U/ml, em duas dosagens consecutivas.

4.3.5- Produção de antígeno

O antígeno utilizado na RFC foi produzido em ovos embrionados de galinha SPF (*Specific Pathogen Free*), os quais foram inoculados com a cepa de referência de *Chlamydia psittaci* sorotipo 1 (cepa S26/3) – atualmente denominada *Chlamydophila abortus*, oriunda de aborto ovino*.

A inoculação de 200µg/mL de suspensão bacteriana cepa S26/3, diluída em solução salina tamponada com fosfatos (PBS - 0,01 M PO_4^- 0,14 M NaCl pH 7,4)

* Gentilmente cedido pelo Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezia, Itália.

contendo antibióticos e antifúngicos (100µg/mL de cloridrato de vancomicina, 100µg/mL de sulfato de estreptomicina, 50µg/mL de sulfato de gentamicina e 10µg/mL de anfotericina B) foi realizada via saco da gema de ovos embrionados SPF, aos 7 dias de incubação segundo RASO (2004) e RASO et al., 2006). Os ovos foram a seguir incubados a 37°C durante 4 a 12 dias e observados diariamente; os embriões mortos durante as primeiras 72 horas foram descartados. Os ovos contendo embriões mortos e todos aqueles que permaneceram vivos até o 19º dia de incubação, foram abertos para visualização de possíveis alterações bem como para colheita da membrana do saco vitelino. A membrana corioalantóide foi retirada e o conteúdo do ovo colocado em uma placa de petri estéril; as membranas dos sacos vitelinos, recolhidas individualmente, foram colocadas em criotubos estéreis e armazenadas à temperatura de -70º C, até o momento de uso.

4.3.6- Identificação do agente

Para confirmação da presença do agente, fragmentos de cada saco vitelino inoculado foram impressos em lâmina de vidro, secas ao ar, fixadas com metanol por cinco minutos e coradas pela técnica de Gimenez Modificada (ANDERSEN, 1998). A seguir, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico, aumento de 1.000x, em óleo de imersão. Os esfregaços foram considerados positivos quando inclusões de *Chlamydophila* foram visualizadas nas lâminas. Tais inclusões foram quantificadas, observando-se cinco campos microscópicos, sendo considerado para leitura os escores: 0 (nenhuma inclusão), 1 (\leq 10 inclusões), 2 (11 a 20 inclusões) e 3 (\geq 21 inclusões).

4.3.7- Antígeno

Foi utilizado antígeno parcialmente purificado. Para tanto, partiu-se de mistura de quatro sacos vitelino positivos com escore (3 e 4+), triturado em gral com areia estéril. Este, após suspenso em 1 mL de PBS estéril para cada saco vitelino macerado,

foi centrifugado em baixa rotação (500 x g, Rotor FA 12,94 Highconic[®], Sorval Legend[™] MACH 1.6/R) durante 5 minutos. Depois de centrifugado, foram visualizadas três camadas, a primeira das quais constituída de resíduo de saco vitelino, a segunda camada (intermediária) de suspensão de *Chlamydophila*, e a terceira de areia e detritos celulares. A camada intermediária foi separada das demais e transferida a um novo tubo, seguido da adição (v/v) de PBS e posteriormente submetida à centrifugação a 14 000 x g (Rotor FA 12,94 Highconic[®], Sorval Legend[™] MACH 1.6/R) durante uma hora a 4°C. O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimento ressuspense em PBS, novamente centrifugado a 12000 x g por 1 hora. Tal procedimento foi repetido por quatro vezes, até a completa eliminação de todo resíduo de gema. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspense em 5 mL de PBS contendo 0,3% de azida sódica, fervido durante 20 minutos para inativação da suspensão de *Chlamydophila* e, a seguir, distribuído em pequenas alíquotas e imediatamente armazenado à temperatura de -70°C.

4.3.8- Determinação da dose de reatividade ótima do antígeno

As doses de reatividade ótima dos antígenos utilizadas nas RFC foram determinadas por titulação em bloco. As reações foram realizadas segundo técnica descrita por BIER et al.(1968), adaptada a microplacas estéreis contendo 96 cavidades com fundo "U". Em linhas gerais, várias diluições seriadas do antígeno (diluições de 1:10 até 1:640), no volume de 25 µL por cavidade, foram colocadas a reagir frente a várias diluições (1:8 a 1:1024) de uma amostra de soro de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), de soro de pombo (*Columbia livia*), de soro ovino (*Ovis aries*) e de soro humano (*Homo sapiens*), da soroteca do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP, com título positivo para *Chlamydophila sp.* previamente conhecidos, também no volume de 25 µL por cavidade. Paralelamente, foram realizados os controles do antígeno, do soro, do sistema hemolítico e do complemento. O complemento diluído (2U C 50%) foi adicionado no volume de 50 µL por cavidade, e

seguiu-se a incubação em câmara úmida à temperatura de 4° C durante 18 horas (primeira fase da reação).

Após 18 horas de incubação foi adicionado o sistema hemolítico (SH), constituído de suspensão de hemácias de carneiro padronizada e sensibilizada com hemolisina, em sua dose de reatividade ótima, seguido de nova incubação das microplacas a 37° C por 30 minutos, sob agitação constante nos primeiros 15 minutos. As microplacas foram centrifugadas a 800xg durante 5 minutos e, em seguida, foi feita a leitura final do grau de hemólise, realizada com auxílio de escala de lise, conforme recomenda a técnica BIER et al., 1968.

4.3.9- Amostras de soro

As amostras de soros testadas em todo experimento foram previamente inativadas a 56°C durante 30 minutos e utilizadas a partir da diluição 1/8.

4.3.10- Reação de fixação do complemento (RFC)

A RFC foi realizada segundo a técnica descrita por BIER et al. (1968), adaptada para uso em microplacas (RASO e PINTO, 2001). Para tanto, foram utilizados 25µL das diferentes diluições dos soros de gatos em tampão trietanolamina (pH=7,4), distribuídas em cavidades de microplacas em fundo em U, a partir da diluição 1:8 até a diluição de 1:1024; 25 µL do antígeno produzido, diluído na sua dose de reatividade ótima; 50 µL do complemento (2UC 50%), seguido de incubação em câmara úmida à temperatura de 4°C por 18 horas. Após este período, foram adicionados 25 µL do sistema hemolítico e as microplacas novamente submetidas a 37°C por 30 minutos. As microplacas foram centrifugadas a 800xg por 5 minutos e, em seguida, realizada a leitura do grau de hemólise com o auxílio de escala de lise, conforme preconiza a técnica. Em conjunto com a análise das amostras, em cada placa foi realizado o controle do complemento, o controle do antígeno e o controle do sistema hemolítico (Figura 5). Os títulos da RFC foram expressos pela recíproca da maior diluição do soro com 50% de lise.

DILUIÇÃO DOS SOROS TESTE

1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256 1/512 1/1024

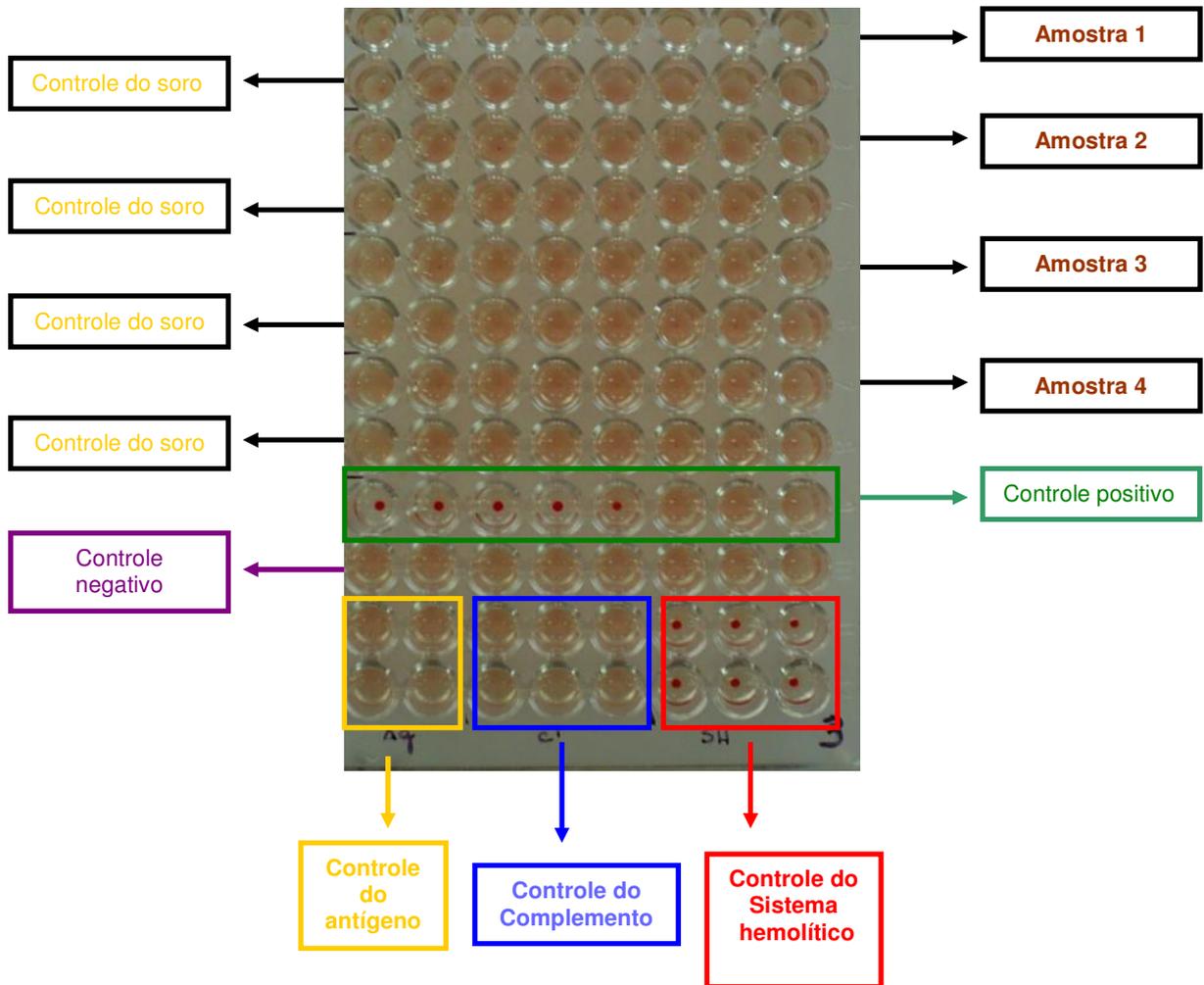


Figura 5: Esquematização da Reação de Fixação de Complemento. Esquematização da Reação de Fixação de Complemento. UNESP - Jaboticabal, 2008.

4.4- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Cada amostra de soro foi previamente inativada a 56°C por 60 minutos, em banho maria e, a seguir, diluída 1:16 em solução salina estéril tamponada com fosfatos (PBS – 0,01 M PO_4^- , 0,14 M NaCl, pH 7,2). Vinte e cinco μL da amostra de soro de cada animal, diluída (1:16), foram adicionado à cavidade apropriada da lâmina (BION™ Chlamydia-G Antibody Test System, Bion Interprises, USA) a qual continha adsorvidas células L929 infectadas por *Chlamydia* LGV tipo 1. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão durante 5 minutos cada, e secas ao ar. Posteriormente, foram adicionados a cada cavidade das lâminas 25 μL de conjugado (Anticorpo Anti-Gato IGG - Molécula inteira - Conjugado FITC™, Sigma Aldrich, USA), diluído na sua dose de reatividade ótima de uso (1:150), em PBS adicionado de 0,02% de Azul de Evans, seguido de nova incubação em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas em PBS, conforme anteriormente descrito, seca ao ar e montadas com glicerina tamponada com Carbonato-bicarbonato (pH 9,5), e lamínula. Para cada lâmina havia controles de soros (positivo e negativo), ou seja, 25 μL do soro de gato controle positivo e do soro de gato controle negativo. A leitura das lâminas foi realizada em um Microscópio equipado para fluorescência (Olimpus BX60®), em aumento de 400x.

Após a triagem das amostras na diluição de 1:16, realizou-se a titulação dos soros testes positivos, a partir de diluições seriadas (1:32; 1:64,1;128, 1:256, 1:512 e 1:1024). Após a leitura em microscópio equipado para fluorescência, foram consideradas positivas as amostras de soros que apresentaram fluorescência em diluições maiores ou igual a 1:16.

4.5- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.5.1- Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras de conjuntiva colhidas por meio de suabes e mantidas em tubos contendo etanol. Os suabes foram descartados e os tubos centrifugados a 20.000xg a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 40 µL de tampão lisozima (NaCl 0,1M; TRIS 10mM; EDTA 1mM; 5% Triton x 100).

A cada amostra foram adicionados 15 µL de proteinase K (400 u/mL, Gibco BRL, USA) seguido de incubação a 56°C durante 90 minutos. Após inativação da proteinase K a 90°C por 15 minutos, a amostra foi centrifugada a 2000xg por 2 minutos a 22°C. A partir de então, o DNA foi extraído utilizando-se o GFX Genomic Blood DNA Purification Kit® (Amersham Pharmacia Biotech, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Ao final do procedimento, o material extraído foi diluído em 50 µL de água ultrapura autoclavada.

4.5.2- Amplificação

A PCR foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos correspondentes à região conservada do gene da MOMP do gênero *Chlamydiaceae*, conforme descrito por BUXTON et al. (1996), com algumas modificações, já padronizadas por RASO (2004) e RASO et al. (2006). Foram utilizados iniciadores externos 1 (5'-CAGGATATCTTGTCTGGCTTTAA-3') e 2 (5'-GCAAGGATCGCAAGGATC-3'), amplificando fragmentos de 260 pares de base (pb). A amplificação das amostras foi realizada em dois ciclos idênticos, objetivando um aumento na sensibilidade analítica da reação. Foi utilizado volume total de 25 µL, contendo 10mM de tampão Tris-HCl pH 8,8 (Tampão 10X Biotools, Espanha), 0,2mM de DNTPs (Biotools, Espanha), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, EUA), 1,25U de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha), 5 µL de amostra de DNA extraído ou produto da PCR (no caso da

segunda amplificação) e água ultrapura autoclavada. A seguir, a mistura reagente foi colocada em termociclador automático programado para ciclos de: 1 ciclo de 94° C por 10 minutos, seguido por 34 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54° por 1 minuto e 72° C por 1 minuto e 30 segundos, um ciclo de 72° C por 4 minutos e um ciclo final de 4°C. Foram utilizados como controle positivo da reação uma amostra de vacina contendo antígeno de “*Chlamydia psittaci*” (Fel-O-Vax LVK-IV[®], FortDodge, EUA) diluída a 1:200 e negativo, água ultrapura autoclavada.

4.5.3- Detecção do produto amplificado

Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose, preparado a 1,5% em tampão TBE (Tampão tris-borato-EDTA) 1x. Uma mistura de 10 µL de produto amplificado com 2µL de tampão de corrida foi colocada em um poço do gel, com brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese sob voltagem de 100 volts, durante 2 horas. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp ladder Invitrogen[®]). A visualização do produto amplificado foi realizada em um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II – Stratagene[®]).

4.6- Análise estatística

Para comparação dos resultados dos testes sorológicos para diagnóstico da clamidiose felina, empregou-se o teste do Qui-quadrado, ao nível de 5% ou 1% de probabilidade. Para a avaliação do meio de diagnóstico da clamidiose e os dados obtidos na ficha clínica dos animais (sexo e idade) e a procedência dos felinos (abrigos, clínicas e gatis) foi utilizado o teste de Tukey, ao nível de 5% ou 1 % de probabilidade. A análise estatística foi executada utilizando-se o programa computacional GraphPad InStat (Versão 3.06, 2003).

5- RESULTADOS

5.1- Reação de fixação do complemento (RFC)

Foram avaliados 147 gatos domésticos, dos quais 70 animais provenientes de gatis, 59 de abrigos públicos para animais e 18 de clínicas/hospitais veterinários. Ao todo, em somente 10 amostras foram detectadas anticorpos fixadores do complemento para *Chlamydiaceae*, correspondendo a 6,8% dos gatos estudados.

Todos os gatos domésticos positivos na RFC eram provenientes de gatis, eram vacinados e, ademais, 40% (4/10) destes animais apresentavam antecedentes de complexo respiratório felino, apesar de não apresentarem nenhum sinal clínico da doença no momento da colheita de materiais (Tabela 3). Os títulos de anticorpos fixadores do complemento anti-*Chlamydiaceae* obtidos nas 10 amostras variaram de 16 a 128. Nenhum dos 147 soros testados apresentou atividade anticomplementar.

Tabela 3: Correlação entre o título de anticorpos anti-*C. felis* de animais reagentes positivos na reação de fixação do complemento (RFC) e informações do histórico clínico (gatil de procedência; a presença de sinais clínicos; histórico de complexo respiratório felino e estado de imunização) do grupo gatil. Jaboticabal-SP, 2008.

Gato n ^o .	Gatil	Sinal Clínico	Histórico de CRF	Vacinação anti <i>C. felis</i>	Título RFC
76	1	Não	Não	Sim	1:64
81	2	Não	Não	Sim	1:128
85	2	Não	Não	Sim	1:64
89	2	Não	Não	Sim	1:128
91	2	Não	Não	Sim	1:32
123	4	Não	Secreção nasal mucopurulenta	Sim	1:128
125	4	Não	Secreção nasal e conjuntivite	Sim	1:64
128	4	Não	Secreção nasal	Sim	1:16
130	4	Não	Não	Sim	1:32
131	4	Não	Secreção nasal	Sim	1:64

CRF= Complexo Respiratório Felino

Em nenhuma das 59 amostras de soros colhidas dos gatos provenientes do grupo de abrigos públicos, bem como nas 18 amostras de soros de gatos provenientes de clínicas veterinárias, foram detectados anticorpos fixadores de complemento anti-*Chlamydiaceae*.

5.2- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A reatividade das amostras séricas foi avaliada pela visualização bem definida de fluorescência nos corpúsculos de inclusão citoplasmáticas, perto do núcleo da célula e/ou corpúsculos elementares localizados dentro ou entre as células (Figura 6).

Das 147 amostras de soro avaliadas, 106 (72,1%) apresentaram anticorpos mensuráveis pela RIFI. De tais amostras, 70 eram provenientes de animais mantidos em gatis, 59 de abrigos públicos para animais e 18 de clínicas/hospitais veterinários.

5.2.1- Gatos domésticos provenientes de gatis.

Dos 70 soros avaliados no grupo gatil, 69 (98,6%) reagiram positivamente frente ao antígeno de *Chlamydiaceae* adsorvido na lâmina (Tabela 4). Destes 69 animais, 48 (69,6%) haviam sido imunizados contra clamidiose felina, 5 (7,2%) apresentavam sinais clínicos sugestivos de clamidiose no momento da colheita do material e 43 (62,3%) tinham histórico clínico de complexo respiratório felino. Em síntese, no total das amostras positivas na RIFI, duas (2,9%) apresentaram títulos de 64, oito (11,4%) títulos de 128, uma (1,4%) título de 256, duas (2,9%) títulos de 512 e 56 (80%) títulos ≥ 1024 (Figura 7).

Tabela 4: Correlação entre o título de anticorpos anti-*C. felis* de animais reagentes positivos na reação de Imunofluorescência indireta e informações do histórico clínico (presença de sinais clínicos; histórico de complexo respiratório felino e estado de imunização) do grupo gatil. Jaboticabal, 2008.

Gato (n ^o)	Título Final	Sinal Clínico	Histórico de CRF	Vacinação	Gato (n ^o)	Título Final	Sinal Clínico	Histórico de CRF	Vacinação
63	≥1:1024	Não	Não	Sim	101	≥1:1024	Não	Sim	Não
64	1:256	Não	Não	Sim	102	≥1:1024	Não	Sim	Não
65	≥1:1024	Não	Não	Sim	103	≥1:1024	Não	Sim	Não
66	≥1:1024	Não	Não	Sim	104	≥1:1024	Não	Sim	Não
68	≥1:1024	Sim ¹	Não	Sim	105	≥1:1024	Não	Sim	Não
69	≥1:1024	Não	Não	Sim	106	≥1:1024	Não	Sim	Não
70	≥1:1024	Não	Não	Sim	107	≥1:1024	Não	Sim	Não
71	≥1:1024	Não	Não	Sim	108	≥1:1024	Não	Sim	Não
72	≥1:1024	Não	Não	Sim	109	1:128	Não	Sim	Não
73	1:128	Não	Não	Sim	110	≥1:1024	Não	Sim	Não
74	≥1:1024	Não	Não	Sim	111	≥1:1024	Não	Sim	Não
75	≥1:1024	Não	Não	Sim	112	≥1:1024	Não	Sim	Não
76	≥1:1024	Não	Não	Sim	113	Neg	Não	Sim	Não
77	≥1:1024	Não	Não	Sim	114	≥1:1024	Não	Sim	Não
78	≥1:1024	Não	Não	Sim	115	1:128	Não	Sim	Sim
79	≥1:1024	Não	Não	Sim	116	≥1:1024	Não	Sim	Sim
80	≥1:1024	Não	Não	Sim	117	≥1:1024	Não	Sim	Sim
81	≥1:1024	Não	Não	Sim	118	≥1:1024	Não	Sim	Sim
82	≥1:1024	Não	Não	Sim	119	≥1:1024	Não	Sim	Sim
83	≥1:1024	Não	Não	Sim	120	≥1:1024	Sim ²	Sim	Sim
84	≥1:1024	Não	Não	Sim	121	1:512	Não	Sim	Sim
85	≥1:1024	Não	Não	Sim	122	≥1:1024	Não	Sim	Sim
87	≥1:1024	Não	Não	Sim	123	≥1:1024	Não	Sim	Sim
88	≥1:1024	Não	Não	Sim	124	≥1:1024	Não	Sim	Sim
89	≥1:1024	Não	Não	Sim	125	≥1:1024	Não	Sim	Sim
90	≥1:1024	Não	Não	Sim	126	1:512	Sim ³	Sim	Sim
91	≥1:1024	Não	Não	Sim	127	≥1:1024	Não	Sim	Sim
92	≥1:1024	Não	Sim	Não	128	≥1:1024	Não	Sim	Sim
93	1:128	Não	Sim	Não	129	1:128	Sim ³	Sim	Sim
94	≥1:1024	Não	Sim	Não	130	≥1:1024	Não	Sim	Sim
95	≥1:1024	Não	Sim	Não	131	1:128	Não	Sim	Sim
96	1:64	Não	Sim	Não	132	≥1:1024	Não	Sim	Sim
97	1:64	Não	Sim	Não	133	≥1:1024	Não	Sim	Sim
99	1:128	Não	Sim	Não	134	≥1:1024	Não	Sim	Sim
100	≥1:1024	Não	Sim	Não	135	1:128	Sim ³	Sim	Sim

Gato (N^o) = Número do gato, atribuído após a colheita de soros.

CRF = Complexo Respiratório Felino

Neg = negativo

1- Secreção ocular

2- Conjuntivite e doença do trato respiratório superior

3- Doença do trato respiratório superior

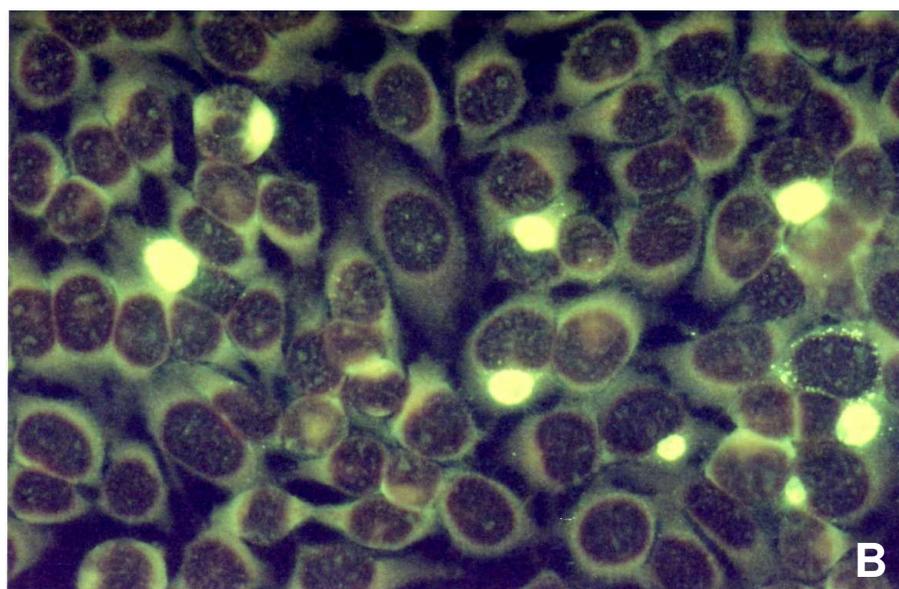
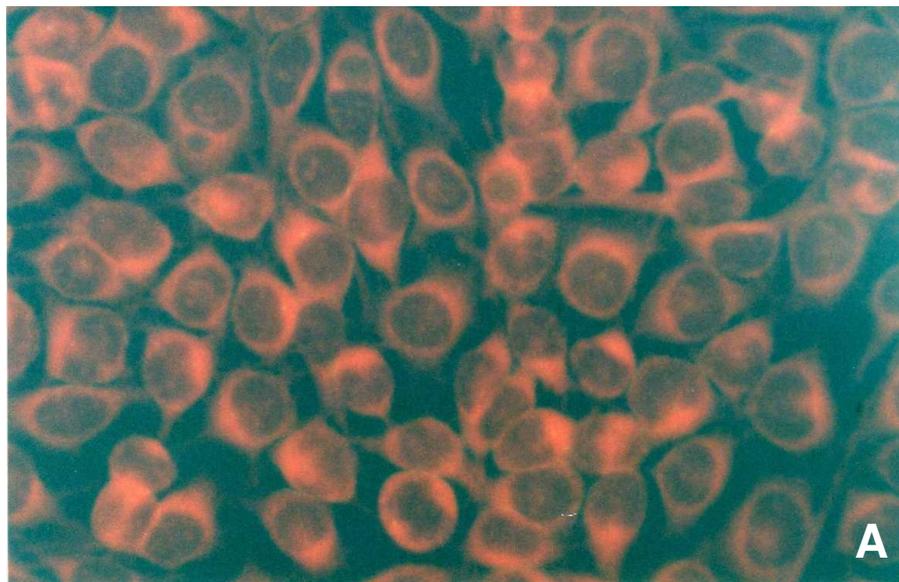


Figura 6: Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-*C. felis*: **A**: Reação negativa, Aumento de 400X. **B**: Reação positiva, aumento de 400X. Jaboticabal, 2008.

5.2.2– Gatos domésticos provenientes de abrigos públicos para animais.

Das 59 amostras de soros colhidas de gatos em abrigos públicos, avaliadas pela RIFI, 31 (53%) reagiram positivamente frente ao antígeno de *Chlamydophila* (Tabela 5). De tais amostras, 6 (19,4%) foram provenientes de animais com sinais clínicos de clamidiose felina

Devido à origem de tais animais, ou seja de abrigo público, não foi possível obter informações seguras sobre o histórico de complexo respiratório felino e de vacinação. No total das amostras de soro positivas pela RIFI, três apresentaram títulos de 16, quatro título de 32, três títulos de 64, sete títulos de 128, quatro títulos de 256, sete títulos de 512 e quatro títulos ≥ 1024 (Figura 7).

Tabela 5: Correlação entre o título de anticorpos anti-*C. felis* de animais reagentes positivos pela reação de Imunofluorescência indireta e a presença ou não de sinais clínicos da doença, no momento da colheita de material do grupo abrigo público. Jaboticabal, 2008.

Gato (n ^o)	Título	Sinal Clínico	Gato (n ^o)	Título	Sinal Clínico
4	1:128	Não	49	1:512	Não
6	Neg	Sim	50	Neg	Não
7	Neg	Sim	51	≥1:1024	Não
8	1:32	Sim ¹	52	Neg	Não
9	Neg	Sim	53	1:256	Não
10	1:32	Não	54	1:512	Não
11	Neg	Não	56	1:64	Não
20	Neg	Não	57	neg	Não
21	Neg	Sim	58	1:128	Não
22	Neg	Não	59	1:512	Sim ⁴
23	Neg	Não	60	1:128	Não
27	1:16	Sim ²	61	1:128	Não
28	Neg	Sim	62	≥1:1024	Não
29	Neg	Sim	136	1:512	Não
30	Neg	Sim	137	1:256	Não
31	Neg	Não	138	neg	Não
32	Neg	Não	139	neg	Não
33	Neg	Não	140	neg	Não
34	1:64	Não	141	neg	Não
35	1:128	Não	142	neg	Não
36	Neg	Não	143	neg	Sim
37	1:32	Não	144	1:16	Não
38	1:16 ³	Sim	145	1:256	Não
39	Neg	Não	146	1:512	Não
40	Neg	Não	147	1:128	Sim ⁴
41	1:32	Não	148	1:256	Não
42	1:64 ³	Sim	149	1:128	Não
43	Neg	Sim	150	≥1:1024	Não
44	Neg	Não	151	≥1:1024	Não
48	1:512	Não			

Gato (N^o) = Número do gato, atribuído após a colheita de soros.

Neg = negativo

1- Secreção ocular

2- Conjuntivite e secreção ocular

3- conjuntivite

4- Doença do trato respiratório superior

5.2.3 – Gatos domésticos provenientes de clínicas veterinárias.

Das 18 amostras de soros provenientes de clínicas veterinárias examinadas, 6 (33,3%) reagiram positivamente na RIFI frente ao antígeno de *Chlamydiaceae* (Tabela 6). Dentre os seis animais soropositivos, dois (33,3%) apresentaram sinais clínicos de clamidiose e um (16,7%) era vacinado e não apresentava sinais clínicos. No total das amostras positivas pela RIFI, três (50%) apresentaram títulos de 32, e três (50%) títulos de 64 (Figura 7).

Tabela 6: Correlação entre o título de anticorpos anti-*C. felis* de animais reagentes positivos na reação de reação de Imunofluorescência indireta e informações do histórico clínico (presença de sinais clínicos e estado de imunização) do grupo clínica veterinária. Jaboticabal, 2008.

Gatos (n ^o)	Título Final	Sinal Clínico	Vacinação	Gatos (n ^o)	Título Final	Sinal Clínico	Vacinação
1	neg	Não	Não	17	neg	Não	Não
2	neg	Não	Não	18	neg	Não	Não
3	neg	Não	Não	19	neg	Sim	Não
5	neg	Não	Não	24	neg	Sim	Não
12	1:32	Não	Não	25	neg	Sim	Não
13	1:64	Não	Não	26	neg	Sim	Não
14	1:32 ¹	Sim	Não	45	1:64	Sim ²	Não
15	neg	Não	Não	46	1:32	Não	Não
16	neg	Sim	Não	47	1:64	Não	Sim

Gato (N^o) = Número do gato, atribuído após a colheita de soros.

Neg = negativo

1- Doença do trato respiratório superior

2- Conjuntivite e doença do trato respiratório superior

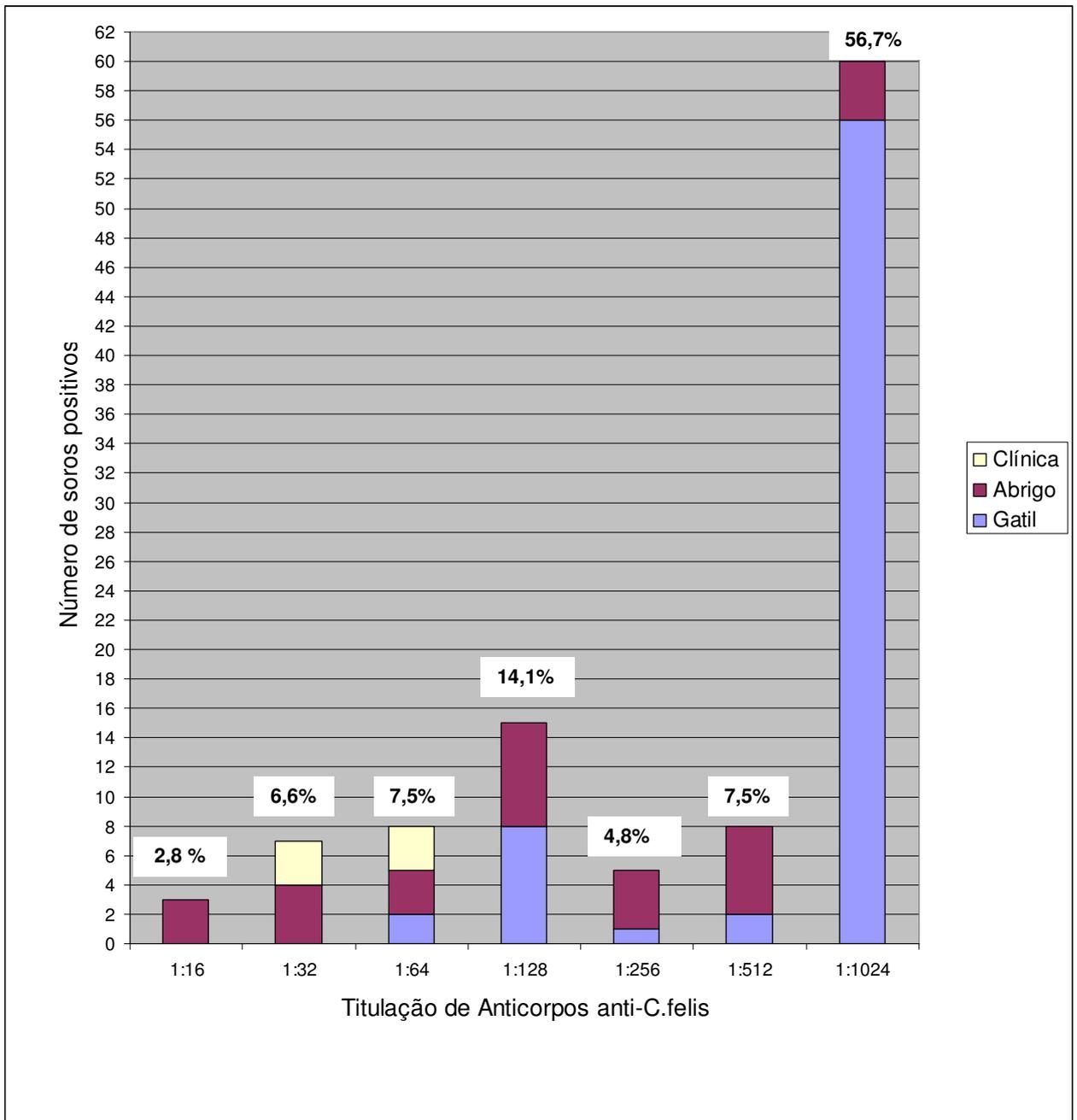


Figura 7: Representação gráfica da titulação de anticorpos anti- *C.felis*, positivos pela RIFI, e sua porcentagem, obtida a partir dos 147 soros de gatos provenientes do grupo gatil, abrigo público e clínica veterinária. Jaboticabal, 2008.

5.2.4 – Gatos domésticos imunizados contra clamidiose felina

Dos 147 soros testados, 49 eram provenientes de gatos domésticos imunizados com vacina contendo antígeno homólogo específico, ou seja, *Chlamydophila felis* e 98 eram de gatos não vacinados. Entre o grupo não imunizado, observou-se uma soropositividade pela RIFI em 58,2% (57/98) dos animais enquanto que 100% dos animais vacinados foram soro-reagentes também pela RIFI (Tabela 7).

No total das amostras de soro positivas pela RIFI no grupo de animais vacinados, um (2%) animal apresentava título de 64, cinco (10,2%) títulos de 128, um (2%) título de 256, dois (4,1%) títulos de 512 e 40 (81,7%) títulos \geq 1024. No grupo não vacinado, três (3,1%) animais apresentaram título de 16, sete (7,1%) títulos 32, sete (7,1%) títulos 64, 10 (10,2%) títulos de 128, quatro (4,1%) título de 256, seis (6,1%) títulos de 512 e 20 (20,5%) títulos \geq 1024 (Figura 8).

Tabela 7: Número de animais soro positivos e soro negativos pela RIFI conforme o grupo vacinado e não vacinado e seu grupo de procedência. Jaboticabal, 2008.

GRUPO	Vacinado		Não Vacinado		TOTAL
	Soro positivo	Soro negativo	Soro positivo	Soro negativo	
Gatil	48	0	21	1	70
Abrigo	0	0	31	28	59
Clínica	1	0	5	12	18
TOTAL	49	0	57	41	147

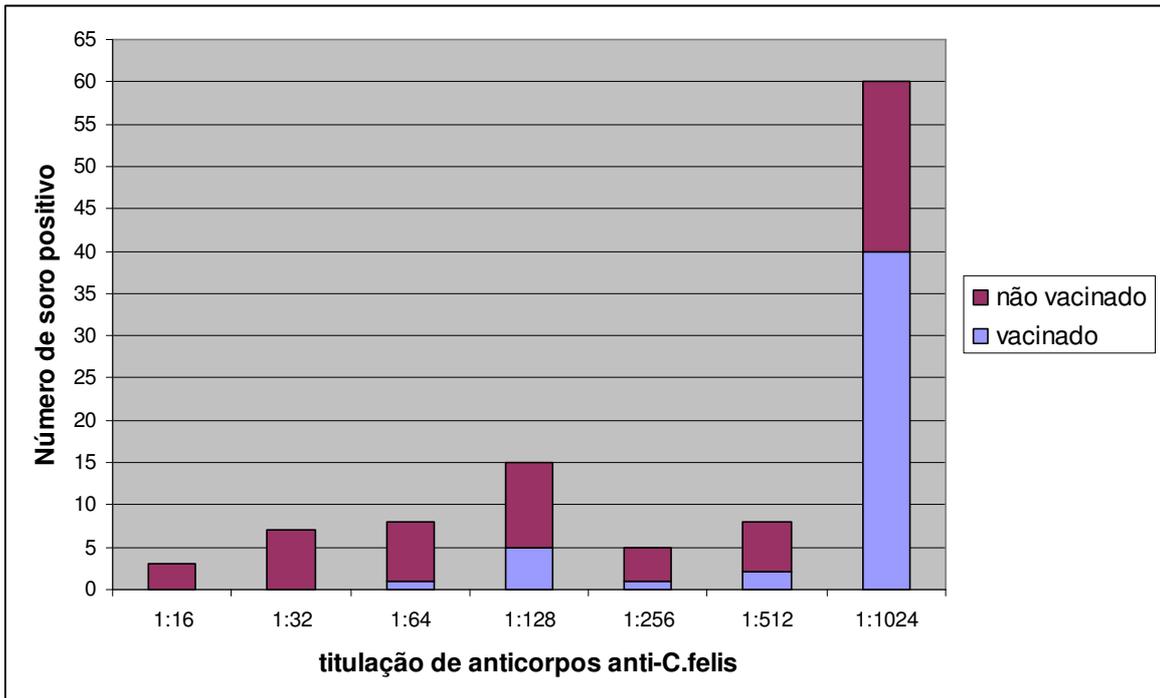


Figura 8: Representação gráfica da titulação de anticorpos anti- *C.felis*, positivos pela RIFI, e sua percentagem, obtida a partir dos 147 soros de gatos vacinados e não vacinados. Jaboticabal, 2008.

5.3- Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Das 151 amostras de suabes de conjuntiva de gatos domésticos avaliadas pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), das quais, 73 eram oriundas de animais provenientes de gatis, 60 de abrigos públicos para animais e 18 de clínicas/hospitais veterinários, em nove (6%) amostras foram detectadas DNA clamidial.

5.3.1- Gatos domésticos provenientes de gatis.

No total, foram analisadas por meio da PCR, 73 amostras de suabes colhidas de conjuntiva provenientes de gatos do grupo Gatil. Destas amostras, em quatro (5,5%), foram detectadas DNA de *C.felis* (Figura 9). Entre tais amostras, 25% (1/4) apresentavam sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina e 50% (2/4) não apresentavam histórico de complexo respiratório felino (Tabela 8). Todos os quatro animais eram vacinados.

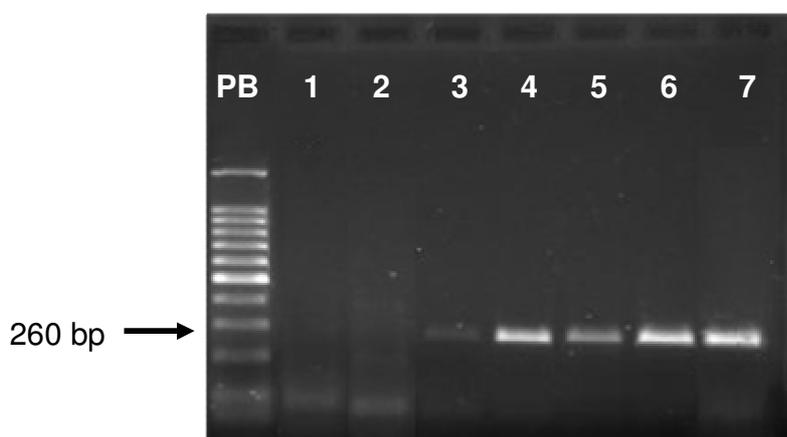


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1,5% com os produtos da PCR provenientes de suabe de conjuntiva. Da esquerda para direita: Marcador de Pares de Base (100p.b.); controle negativo (1), amostra negativa (2), amostras positivas (3 a 6), controle positivo (7). Jaboticabal, 2008.

5.3.2- Gatos domésticos provenientes de abrigos públicos para animais.

Das 60 amostras de suabes colhidas de conjuntiva provenientes de gatos do grupo abrigo público de animais, em quatro (15%) foram detectados DNA de *C.felis*. Destas quatro amostras positivas, duas foram colhidas de animais com secreção ocular presente e as outras duas de animais sem qualquer sinal clínico de clamidiose felina no momento da colheita (Tabela 8).

5.3.3 – Gatos domésticos provenientes de clínicas veterinárias.

Das 18 amostras de suabes colhidas de conjuntiva de gatos oriundos de clínicas veterinárias, em somente uma (5,5%) foi detectada DNA de *C.felis*. Tal animal positivo à PCR apresentava no momento da colheita de material, sinais clínicos característicos de clamidiose felina, ou seja, conjuntivite, secreção ocular, quemose e blefarospasmo.

Tabela 8: Correlação entre procedência e presença de sinal clínico e/ou histórico de complexo respiratório felino, no momento da colheita de material, em animais positivos na reação em cadeia pela polimerase (PCR). Jaboticabal, 2008.

Gato (nº)	Procedência	Sinal Clínico	Histórico	PCR
72	Gatil 1	Não	Não	Positivo
82	Gatil 2	Não	Não	Positivo
116	Gatil 4	Não	Sim	Positivo
135	Gatil 4	Sim ¹	Sim	Positivo
6	Abrigo 1	Sim ²	Não informado	Positivo
7	Abrigo 1	Sim ²	Não informado	Positivo
10	Abrigo 1	Não	Não informado	Positivo
57	Abrigo 2	Não	Não informado	Positivo
116	Clinica	Sim ³	Não	Positivo

1- Doença do trato respiratório superior

2- Secreção ocular

3- Secreção ocular e conjuntivite

5.4 - Análise comparativa dos resultados de gatos domésticos submetidos às reações de Fixação do Complemento (RFC) e de Imunofluorescência Indireta (RIFI), frente aos resultados da Reação em cadeia pela Polimerase (PCR).

Na Tabela 9 encontram-se os resultados das análises comparativas obtidas na pesquisa de DNA de *C. felis*, comparativamente aqueles obtidos na pesquisa de anticorpos pelas RFC e de RIFI, nas 151 amostras de suabes de conjuntiva e de 147 soros de gatos domésticos, respectivamente. Na tabela são apresentados o número de animais testados e o percentual relativo de reações PCR, RFC e RIFI positivas, de acordo com cada grupo pesquisado. Observa-se que a PCR detectou 6,0 % (9/151) de gatos positivos para *C.felis*, enquanto a RFC revelou a presença de anticorpos mensuráveis em 6,8 % (10/147) dos soros examinados, contra 72,1% (106/147) na RIFI.

Tabela 9: Análise comparativa dos resultados das reações de fixação do complemento (RFC) e de Imunofluorescência Indireta (RIFI), frente aos resultados da Reação em cadeia pela Polimerase (PCR) dos gatos domésticos testados e positivos para *Chlamydomphila felis*, de acordo com o grupo estudado. Jaboticabal, 2008.

Grupo	<u>Nº PCR positivo</u> <u>Nº animais avaliados</u>	<u>Nº de RFC positivo</u> <u>Nº animais avaliados</u>	<u>Nº de RIFI positivo</u> <u>Nº animais avaliados</u>
Gatil	4 / 73 (5,5%)	10 / 70 (14,3%)	69 / 70 (98,6%)
Abrigo	4 / 60 (6,7%)	0 / 59 (0%)	31 / 59 (52,5%)
Clínica	1 / 18 (5,6%)	0 / 18 (0%)	6 / 18 (33,3%)
TOTAL	9 / 151 (6,0%)	10 / 147 (6,8%)	106 / 147 (72,1%)

Das 10 amostras positivas pela RFC, 9 (90%) apresentaram títulos de anticorpos anti- *C. felis* \geq 1024 pela RIFI e uma (10%), títulos de anticorpos de 128, pela mesma técnica. Entretanto, estas amostras foram negativas na PCR (Tabela 10). Dentre as 9 amostras positivas na PCR, quando confrontadas aos resultados sorológicos obtidos pela RIFI, quatro (44,4%) foram negativas, uma (11,1%) tinha título de 32, uma (11,1%) título de 128 e três (33,4%) título \geq 1024 (Tabela 11). É importante

ressaltar que em nenhuma de tais amostras foi detectado anticorpo fixador do complemento para *C.felis*.

Tabela 10: Correlação entre os resultados de RFC positivo em gatos e os resultados de RIFI e PCR. Jaboticabal, 2008.

Nº do Gato positivo na RFC	Título de anticorpos na RFC	Título de anticorpos na RIFI	Resultado na PCR
76	1:64	≥ 1:1024	Negativo
81	1:128	≥ 1:1024	Negativo
85	1:64	≥ 1:1024	Negativo
89	1:128	≥ 1:1024	Negativo
91	1:32	≥ 1:1024	Negativo
123	1:128	≥ 1:1024	Negativo
125	1:64	≥ 1:1024	Negativo
128	1:16	≥ 1:1024	Negativo
130	1:32	≥ 1:1024	Negativo
131	1:64	1:128	Negativo

Tabela 11: Correlação entre os resultados de gatos positivos à PCR e os resultados de RFC e RIFI. Jaboticabal, 2008.

Nº do Gato positivo na PCR	Resultado na RFC	Resultado na RIFI
6	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo
10	Negativo	1:32
16	Negativo	Negativo
57	Negativo	Negativo
72	Negativo	≥ 1:1024
82	Negativo	≥ 1:1024
116	Negativo	≥ 1:1024
135	Negativo	1:128

5.5- Avaliação dos dados de ficha clínica dos gatos examinados e sua correlação com os resultados positivos obtidos na RFC, RIFI e PCR.

Das análises das fichas clínicas observa-se que, dos 151 gatos avaliados, 58 (38,4%) eram machos e 93 (61,6%) fêmeas, dentre os quais, 58 (38,4%) tinham idade inferior a 6 meses de idade, 4 (2,7%) idade inferior a um ano, 77 (51%) idade superior a um ano e 12 (7,9%) idade maior ou igual a 6 anos (Tabela 12). A grande maioria destes animais (91,4%) não possuía raça definida (SRD), 25,2% eram castrados e 33,8% haviam sido imunizados há menos de um ano com a vacina anti-*Chlamydomphila felis*. Ao exame físico pode-se constatar que 29 (19,2%) dos animais apresentaram sinais clínicos compatíveis com clamidiose felina e 43 (28,5%) tiveram histórico de Complexo Respiratório Felino (Tabela 12).

Tabela 12: Caracterização da amostra populacional de gatos, de acordo com a sua procedência. Jaboticabal, 2008.

	GATIL	ABRIGO	CLÍNICA	TOTAL GERAL
Número total de amostras	73/73 (100%)	60/60(100%)	18/18 (100%)	151/151(100%)
Sexo				
Macho	28/73 (38,4%)	21/60(35%)	10/18 (59%)	58/151 (38,4%)
Fêmea	45/73 (61,6%)	39/60 (65%)	8/18 (41%)	93/151 (61,6%)
Idade				
< 6 meses	6/73 (8,2%)	42/60 (70%)	10/18 (55,6%)	58/151 (38,4%)
Entre 6 meses e 1 ano	2/73 (2,8%)	1/60 (1,7%)	1/18 (5,6%)	4/151 (2,7%)
> 1 ano	53/73 (72,6%)	17/60 (28,3%)	7/18 (38,8%)	77/151 (51%)
> 6 anos	12/73 (16,4%)	0/60 (0%)	0/18 (0%)	12/151 (7,9%)
Raça				
SRD	69/73 (94,6%)	52/60 (86,7%)	17/18 (94,4%)	138/151 (91,4%)
Siamês	2/73 (2,7%)	8/60 (13,3%)	1/18 (5,6%)	11/151 (7,3%)
Outros	2/73 (2,7%)	0/60 (0%)	0/18 (0%)	2/151 (1,3%)
Castração				
Sim	36/73 (49,3%)	0/60 (0%)	1/18 (5,6%)	38/151 (25,2%)
Não	37/73 (50,7%)	60/60 (100%)	17/18 (94,4%)	113/151 (74,8%)
Presença de sinais clínicos	7/73 (9,6%)	15/60 (25%)	7/18 (38,9%)	29/151 (19,2%)
Histórico clínico de complexo respiratório felino	43/73 (58,9%)	***	0/18 (0%)	43/151 (28,5%)
Vacinação com cepa para <i>Chlamydomphila felis</i>	50/73 (68,5%)	0/60 (0%)	1/18 (5,6%)	51/151 (33,8%)

*** Informação não obtida

Dos 10 animais soro-reagente na RFC, dois (20%) eram machos e oito fêmeas (80%), um (10%) tinha idade inferior a seis meses de idade e nove (90%) idade superior a um ano e inferior a seis anos; seis (60%) eram castrados; quatro (40%) tinham sinais clínicos no momento da colheita de material e cinco (50%) tinham histórico de complexo respiratório felino. Todos os animais eram vacinados e não possuíam raça definida (Tabela 12).

Dos 106 animais positivos a RIFI, 39 (36,8%) eram machos e 67 (63,2%) fêmeas. Vinte e cinco (23,6%) tinham idade inferior a seis meses de idade, três (2,8%) idade entre seis meses e um ano, 66 (62,3%) idade superior a um ano e inferior a seis anos e 12 (11,3%) idade superior a seis anos. Cento e um (95,3%) animais não tinham raça definida, três (2,9%) eram siameses, 1 era persa e 1 da raça oriental. Trinta e cinco (33%) dos animais eram castrados, 15 (14,2%) apresentavam sinais clínicos de clamidiose no momento da colheita do material clínico e 43 (40,6%) tinham histórico de Complexo Respiratório Felino. Aproximadamente 48,1% (51/106) dos animais haviam sido vacinados contra clamidiose felina (Tabela 13).

No que tange aos nove animais positivos a PCR, 5 (55,6%) eram machos e 4 (44,4%) fêmeas; destes, 4 (44,4%) tinham idade inferior a seis meses, 4 (44,4%) idade superior a um ano e inferior a seis anos e um (11,2%), idade superior a seis anos. Nenhum animal possuía raça definida e quatro (44,4%) haviam sido vacinados contra clamidiose. Quatro (44,4%) dos animais eram castrados, três (33,3%) apresentaram sinais clínicos de clamidiose no momento da colheita de material clínico e dois (22,2%) tinham histórico de Complexo Respiratório Felino (Tabela 13).

Tabela 13: Caracterização da amostra populacional de gatos com resultados positivos, conforme o meio de diagnóstico para *C. felis* utilizado. Jaboticabal, 2008.

	RFC	RIFI	PCR
Número total de amostras	10/10 (100%)	106/106 (100%)	9/9 (100%)
Sexo			
Macho	2/10 (20%)	39/106 (36,8%)	5/9 (55,6%)
Fêmea	8/10 (80%)	67/106 (63,2%)	4/9 (44,4%)
Idade			
< 6 meses	1/10 (10%)	25/106 (23,6%)	4/9 (44,4%)
Entre 6 meses e 1 ano	0/10 (0%)	3/106 (2,8%)	0/9 (0%)
> 1 ano	9/10 (90%)	66/106 (62,3%)	4/9 (44,4%)
> 6 anos	0/10 (0%)	12/106 (11,3%)	1/9 (11,2%)
Raça			
SRD	10/10 (100%)	101/106 (95,3%)	9/9 (100%)
Siamês	0/10 (0%)	3/106 (2,8%)	0/9 (0%)
Outros	0/10 (0%)	2/106 (1,9%)	0/9 (0%)
Castração			
Sim	6/10 (60%)	35/106 (33%)	4/9 (44,4%)
Não	4/10 (40%)	71/106 (67%)	5/9 (55,6%)
Presença de sinais clínicos	4/10 (40%)	15/106 (14,2%)	3/9 (33,3%)
Histórico clínico de complexo respiratório felino	5/10 (50%)	43/106 (40,6%)	2/9 (22,2%)
Histórico de Vacinação (cepa <i>Chlamydophila felis</i>)	10/10 (100%)	49/106 (46,2%)	4/9 (44,4%)

5.6- Análise estatística

O resultado da análise estatística comparativa entre as técnicas de imunofluorescência indireta e a reação de fixação de complemento demonstrou uma diferença significativa, ao nível de significância 5%, entre os testes sorológicos, assim como uma alta sensibilidade da RIFI comparado à RFC.

Os resultados da análise comparativa do meio de diagnóstico da clamidiose e os dados obtidos na ficha clínica dos animais e a procedência do animal estão sumariados na tabela 14.

Tabela 14: Resultados da análise estatística utilizada para avaliação dos dados obtidos na ficha clínica do animal (sexo e idade) e a procedência dos gatos (gatil, abrigo público para animais e clínica), conforme cada meio de diagnóstico utilizado, empregando-se o teste de Tukey ao nível de 5 ou 1 % de probabilidade. Jaboticabal, 2008.

	Nível de Significância		
	RFC	RIFI	PCR
Gatil x Abrigo	p < 0,05	p < 0,05	ns
Gatil x Clínica	ns	p < 0,05	ns
Abrigo x Clínica	ns	ns	ns
Macho x Fêmea	p < 0,05	p < 0,01	ns
Idade < 6 meses x Idade entre 6 meses e 1 ano	ns	p < 0,01	ns
Idade < 6 meses x Idade > 1 ano	p < 0,01	p < 0,01	ns
Idade < 6 meses x Idade > 6 anos	ns	ns	ns
Idade entre 6 meses e 1 ano x Idade > 1 ano	p < 0,01	p < 0,01	ns
Idade entre 6 meses e 1 ano x Idade > 6 anos	ns	ns	ns
Idade > 1 ano x Idade > 6 anos	p < 0,01	p < 0,01	ns

ns= não significativo

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho procurou-se efetuar um estudo objetivando a detecção de anticorpos (sorodiagnóstico) e de DNA de *Chlamydomphila felis*, no sentido de se obter informações embasadas em exames laboratoriais, sobre a ocorrência de clamidiose em felinos domésticos em nosso meio. A princípio, utilizando-se as amostras de soros colhidas individualmente dos 147 gatos, distribuídos nos grupos experimentais, procurou-se pesquisar anticorpos anti-*Chlamydomphila felis*, bem como analisar comparativamente e em conjunto, os resultados obtidos em ambas as reações, com aqueles da PCR, utilizada na detecção direta do DNA do microrganismo. Para tal propósito, foram colhidas em cinco municípios da região nordeste do estado de São Paulo, amostras de 151 gatos domésticos apresentando ou não sinais clínicos e ou histórico de doenças do trato respiratório superior e conjuntivite aguda a crônica. Para facilidade de estudo, tais animais foram divididos em três grupos experimentais: gatis, abrigos públicos para animais e clínicas/hospitais veterinários, de acordo com suas origens.

No que diz respeito ao sorodiagnóstico da clamidiose, quando realizado por meio da RFC, a fonte de antígeno utilizada é uma suspensão de determinantes antigênicos grupo-específico, presentes no lipopolissacarídeo (LPS) da membrana dos Corpos Elementares (CE), os quais são comuns a todas as clamídias (ANDERSEN, 1998). Em face disto, optamos pela utilização de um tipo de antígeno semelhante na presente investigação, pois se trata de uma reação realizada com antígeno gênero-específico. Neste caso, a presença de anticorpos fixadores do complemento em gatos domésticos é indício de que o animal teve contato prévio com *C.felis*, porquanto as demais espécies de clamídia não ocorrem em felinos.

Em nosso estudo, das 147 amostras de soro testadas, em apenas 10 foram detectados anticorpos fixadores do complemento, correspondendo a 6,8% dos soros examinados. Todos os 10 animais soro-reagente positivo pela RFC pertenciam ao

grupo gatil e, ademais, eram vacinados. Dentre estes animais, 4/10 (40%) apresentavam histórico clínico da doença - três animais com secreção nasal e um com secreção nasal e conjuntivite (Tabela 3). Tal achado não é tão surpreendente, pois baixas percentagens de anticorpos anti-*C. felis* detectadas pela RFC, também foram encontradas por outros autores. Assim, no Japão, em apenas 2,1% das amostras de soro de gatos analisadas, foram detectados anticorpos fixadores de complemento (FUKUSHI et al., 1985) e, na Suíça, foram encontrados 5% de animais soro-reagente positivo (LAZAROWICZ et al., 1982). Em contraste, na Austrália, a percentagem encontrada foi maior, ou seja, 12,7% (STUDDERT et al., 1981). Por outro lado, há ainda relatos de encontro de baixos títulos de anticorpos fixadores do complemento em soro de animais vacinados e experimentalmente infectados (CELLO, 1971; SHEWEN et al., 1980), bem como há relatos sobre ausência de anticorpos fixadores do complemento anti-*C. felis* (STUDDERT e MARTIN, 1970; POVEY e JOHNSON, 1971). Em suma, a percentagem de animais soro-reagente obtida pela RFC (6,8%) na população de gatos estudada na presente pesquisa, quando analisada comparativamente com os dados obtidos pelos autores anteriormente citados, está dentro da percentagem usualmente encontrada em outros países. Nos animais dos demais grupos experimentais (abrigo público e clínica/hospitais) não foram detectados anticorpos fixadores do complemento. No presente estudo, o encontro de anticorpos fixadores do complemento nos animais do grupo gatil pode ser atribuído à imunização ativa dos gatos e ao histórico anterior da doença.

Já no que diz respeito à quantificação dos títulos de anticorpos anti-*C. felis* dos 70 soros do grupo gatil submetidos à RFC, 14,3% (10/70) apresentaram títulos ≥ 16 e 85,7% (60/70) títulos ≤ 8 , considerados soro-reagente positivo e negativo, respectivamente. Destes, 70% (7/10) soro-reagente positivo apresentou títulos de anticorpos ≥ 64 , ou seja, 4 com título 64 e 3 com título ≥ 128 ; as demais amostras, 2 apresentaram título 32 e 1 título 16, resultados bem discordantes daqueles obtidos por FUKUSHI et al. (1985), que encontraram em todos os animais avaliados, títulos entre 8 e 32, considerados baixos quando comparados aos resultados obtidos na presente pesquisa. Deve ser ressaltado que os animais utilizados no estudo realizado por esses

autores não apresentavam histórico de vacinação, bem como a técnica de fixação do complemento não foi a mesma utilizada em nossa pesquisa. Por outro lado, há relatos de estudos nos quais apenas um dentre 28 animais investigados desenvolveu anticorpos após a vacinação, sugerindo que somente a “primeira vacinação” não é capaz de induzir a formação de anticorpos fixadores do complemento em quantidade suficiente para ser detectado por esta reação (CELLO, 1971). Daí a necessidade de um estudo envolvendo um maior número de animais proveniente de diferentes localidades e condições sanitárias.

Em suma, a avaliação comparativa dos resultados da pesquisa de anticorpos fixadores do complemento nos três grupos estudados (grupos: gatil, abrigos públicos para animais e atendidos em clínicas/hospitais veterinários), ficou claro a existência de uma maior quantidade de anticorpos fixadores de complemento nos soros de gatos provenientes de gatis, do que nos dos demais grupos experimentais. Dos quatro gatis avaliados, em três foram encontrados animais com anticorpos fixadores de complemento. No primeiro e no segundo gatil, os animais eram vacinados e não apresentavam sinais clínicos da doença, enquanto que no terceiro gatil os animais apresentavam histórico de complexo respiratório felino e também haviam sido imunizados (Tabela 3). Esses resultados permitem sugerir que o encontro de anticorpos em um maior número de animais do grupo gatil, seja devido à imunização ativa dos mesmos e, no caso particular dos animais do terceiro gatil, ao histórico da doença.

Por fim, vale salientar que, embora a RFC seja a técnica mais utilizada no sorodiagnóstico de clamidiose aviária e humana (GRIMES e ARIZMENDI, 1996), e, por muito tempo considerada a técnica padrão de referência, os dados obtidos por vários autores (CELLO, 1971; SHEWEN et al., 1980; WILLS et al., 1988) e os obtidos no presente estudo sugerem que a RFC não seja o teste sorológico ideal e confiável para mensuração de anticorpos em soro de gatos. De fato, conforme demonstrado no presente estudo, soros de gatos negativos à RFC frente a antígeno de clamídia, apresentaram títulos de anticorpos ≥ 1024 quando submetidos à RIFI; resultados similares a esses também foram obtidos por WILLS (1986 *apud* WILLS et al., 1988).

Neste enfoque, em estudo realizado em bovinos infectados por *C.abortus*, consoante revelam SCHMEER et al. (1986 *apud* WILLS et al., 1988), a resposta de IgG2 domina a resposta de IgG1, particularmente nos casos em que há infecção local. O complemento de cobaio tem a peculiaridade de detectar somente IgG1 bovino e não IgG2 o que torna a RFC um método não confiável para a detecção de anticorpos em bovinos. Mecanismo semelhante também pode ocorrer nas infecções por clamídia em felinos, provável motivo dos pobres resultados obtidos pela RFC no sistema clamidiose felina, conforme sugerem WILLS et al. (1988).

No que diz respeito à pesquisa de anticorpos anti-*Chlamydomphila felis* por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), foi utilizado o “Kit” comercial (BION™ Chlamydia-G Antibody Test System, Bion Interprises, USA) de uso rotineiro no sorodiagnóstico da clamidiose humana. No presente estudo, o referido “Kit” foi parcialmente modificado para uso no diagnóstico sorológico da clamidiose em gatos. Em linhas gerais, a principal modificação consistiu na utilização de um conjugado anti-IgG de gato (Molécula inteira - Conjugado FITC™, Sigma Aldrich, USA). No caso da presença de anticorpos anti-*C. felis* nos soros em teste, estes anticorpos seriam capturados pelo antígeno fixado na lâmina, possibilitando o aparecimento de uma reação fluorescente positiva. Tal fato se deve a um compartilhamento do antígeno e da presença de um lipopolissacarídeo (LPS) antigênico comum a todas as *Chlamydiaceae*, capaz de detectar anticorpos anti-*Chlamydomphila* (inclusões totais da clamídia como substrato), já adsorvido nas lâminas do “Kit-teste”. Portanto, o emprego de “Kits” comerciais de diagnóstico já padronizado e, portanto, de qualidade conhecida, oferece uma série de vantagens, entre as quais, ganho de tempo, controle de qualidade dos reagentes utilizados (antígeno, conjugado e solução tampão), bem como a comparação de resultados entre diferentes laboratórios (MESSMER, 2001).

Analisando nossos resultados de uma maneira geral, 72,1% (106/147) dos soros testados na RIFI apresentaram anticorpos mensuráveis. Dentre estes animais positivos, 31% (33/106) apresentaram títulos de anticorpos anti-*C.felis* \leq 128 e 64,2% (68/106) anticorpos com títulos \geq 512 (Figura 7). Contudo, dentre estas amostras, 42

(61,7%) eram provenientes de animais vacinados e 16 (23,5%) provenientes de animais com histórico de complexo respiratório felino (CRF), conforme sumariado nas Tabelas 4, 5 e 6. Estes títulos de anticorpos encontrados corroboram os encontrados por GUNNMORE et al. (1995), no qual 78% dos gatos positivos pela RIFI apresentaram títulos ≥ 512 . Tais títulos, considerados elevados por esses mesmos autores, foram atribuídos às infecções prévias ou crônicas, uma vez que os animais avaliados eram clinicamente sadios. Vale ressaltar ainda que, títulos nestes mesmos patamares também foram detectados em animais com conjuntivite ativa por clamídia (WILLS et al., 1988). Assim, suspeita-se que tal taxa elevada de anticorpos, ou seja, ≥ 512 , observada em nosso trabalho, esteja relacionada à imunização ativa dos animais, bem como à histórico anterior da doença, fato que possibilita a presença de anticorpos residuais. Em contrapartida, HOLST et al. (2006) detectaram títulos ≤ 128 pela RIFI em 75% (18/24) dos gatos analisados. Tal diferença pode ser justificada, uma vez que em nosso estudo, foram utilizados animais de populações distintas, além de a amostragem empregada ser bem maior.

Dentre os 13 animais apresentando sinais clínicos compatíveis com clamidiose no momento da colheita de material e, ademais, com sorologia positiva pela RIFI, 46,2% (6/13) apresentaram sinais de doença do trato respiratório superior (DTRS), 15,4% (2/13) conjuntivite, 15,4% (2/13) secreção ocular, 15,4% (2/13) conjuntivite associado à DTRS e 7,6% (1/13) conjuntivite associado à secreção ocular (Tabela 4, 5 e 6). Por outro lado, também foi detectado anticorpo contra *C.felis* em 87,7% (93/106) de gatos sem apresentar sinais clínicos de clamidiose no momento da colheita do material (Tabela 4, 5 e 6). Da mesma forma, existe relato de ocorrência de anticorpos contra *C.felis* em gatos sem apresentar sinais clínicos de doença no momento da colheita de amostras (HOLST et al., 2006). Tal fato pode explicado conforme relata WILLS (1996 *apud* WILLS et al., 1988), pois a presença de altos títulos de anticorpos contra *C.felis* em gatos domésticos pode persistir por mais de um ano. Todavia, esse mesmo autor não esclarece se tais anticorpos apresentam meia vida longa ou se é decorrente de uma infecção subclínica persistente. Estudos realizados em humanos demonstram que níveis de anticorpos da classe IgG anti-*Chlamydia trachomatis*

persiste por muitos anos em pacientes com sub-fertilidade subclínica sem historio de reativação e re-infecção da doença (GIJSEN et al., 2002).

Entre os grupos de animais estudados, o grupo gatil foi o que apresentou maior proporção (98,6%) de animais com anticorpos anti-*C.felis* detectados pela RIFI, seguido do grupo abrigo público (52,5%) e do grupo clínica com 33,3% (Tabela 9). Além disso, é importante ressaltar que dos 51 gatos vacinados contra clamidiose felina, 48 pertenciam ao grupo gatil e nestes animais vacinados ocorreu uma nítida e eficiente conversão sorológica, pois em 81,7% (40/49) desses animais foram encontrados títulos ≥ 1024 (Figura 8). Resultados semelhantes, ou seja, 69,4%, obtidos por meio da RIFI, foram encontrados em soros de gatos em abrigos públicos para animal, na Grã-Bretanha (WILLS et al 1988). A alta percentagem de gatos com anticorpos anti-*C.felis* encontrada em animais de gatis pode ser explicada pelo fato da principal via de transmissão da doença ocorrer por meio do contato direto entre gatos e por fômites (SYKES, 2005), infectando frequentemente a colônia. Este fato também justifica a grande quantidade de animais soropositivos no grupo abrigo público. Todavia, no grupo gatil, a alta percentagem de soropositivos também pode ser atribuída à associação entre sinais clínicos, histórico de CRF e, principalmente, ao histórico de vacinação.

O sorodiagnóstico tem como maior desvantagem a indicação de exposição a um agente e não necessariamente a presença de uma infecção ativa (WILLS et al., 1988). Daí, a necessidade de estudos em animais soropositivos para se estabelecer qual a real extensão da doença, e se animais clinicamente sadios, porém contendo anticorpos anti-*C. felis* detectáveis, podem carrear o agente. Em tais condições, necessário se faz uma profunda avaliação do potencial de reativação da infecção, de manifestação de sinais clínicos e do risco de infecção a outros animais (HOLST et al, 2006). De fato, a detecção de uma infecção ativa é importante para prevenir a propagação da doença a outros gatos e monitorar a eficiência de um tratamento (MCDONALDS et al., 1998); para tal, a PCR é indiscutivelmente, o teste mais efetivo para a determinação do status de infecção dos animais.

No que tange a pesquisa de DNA de *Chlamydophila felis* por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), foi utilizado o protocolo descrito por BUXTON et al. (1996), modificado por RASO (2004) e RASO et al. (2006), o qual emprega oligonucleotídeos correspondentes às regiões conservadas do gene da MOMP presente na membrana das bactérias dos gêneros *Chlamydia* e *Chlamydophila*. A proteína codificada pelo gene MOMP, conforme já salientado, é altamente antigênica e é responsável pela resposta imune do hospedeiro (SANDBULTE et al., 1998 *apud* MOCHIZUKI et al., 2000).

Das 151 amostras de suabes de conjuntivas avaliadas, em nove (6%) foram encontradas DNA de *C.felis*. Em cinco gatos (55,6%), não foram observados sinais de clamidiose no momento da colheita do material clínico (Tabela 8). O isolamento de *C.felis* de gatos, mesmo na ausência de sinais clínicos da doença, já foi relatado (GRUFFYDD-JONES et al., 1995). No que diz respeito a presença de sinais clínicos da doença, no presente estudo 22,2% dos gatos PCR positivo apresentaram secreção ocular; 11,1% apresentaram conjuntivite e secreção ocular e 11,1% DTRS (Tabela 8). Resultados semelhantes também foram observados por MCDONALD et al., 1998, nos quais a descarga ocular (25%) foi o sinal clínico mais comum entre os animais PCR positivo, seguido de conjuntivite crônica recorrente (18%), de conjuntivite associada de sinais de DTRS (18%), de conjuntivite isolada de outros sinais clínicos (10%) e de DTRS (7%). E ainda, consoante revelam esses autores, animais sem a presença de sinais clínicos no momento da colheita também foram positivos. E, ainda, que tais animais haviam compartilhado o mesmo habitat ou tiveram contato com animais doentes ou portadores do agente, circunstância que certamente favorece a transmissão horizontal do agente.

Em nosso estudo, das nove amostras positivas obtidas, quatro (44,4%) eram provenientes de animais vacinados contra clamidiose. O fato de estes animais vacinados apresentarem a eliminação do agente, contesta o estudo realizado por RAMPAZZO et al. (2003), no qual, em nenhum animal vacinado contra *C.felis* foi detectado DNA do microrganismo na PCR. Além do mais, é importante frisar que a vacina reduz a severidade dos sinais clínicos na fase aguda da doença, não impedindo

a eliminação do agente (WILLS et al., 1987). De fato, segundo sugerem estes autores, a vacina é capaz de controlar a doença clínica, mas não a infecção. Ainda conforme estes autores, a explicação mais plausível de tal ocorrência é o fato da doença ocular aguda ser causada primariamente pelo aumento nos produtos clamidiais tóxicos solúveis na conjuntiva, e, de uma forma secundária, pelos efeitos citopáticos diretos na replicação da bactéria na mucosa conjuntival. As vacinas contra a clamidiose felina atualmente em uso induzem a produção de anticorpos neutralizantes destas toxinas, contudo, tais anticorpos não têm efeito sobre a infectividade e replicação clamidial.

A maioria dos estudos sobre a detecção direta de *C.felis*, por meio da PCR em gatos domésticos, foi realizado em animais com sinais clínicos de doenças do trato respiratório superior e/ou conjuntivite. Quando avaliados somente os animais com sinais clínicos de clamidiose no momento da colheita de material, a prevalência de 6%, encontrada em nosso estudo, passou para 13,8% (4/29), dados bem similares aos resultados obtidos em outros países, nos quais a prevalência foi bastante variada. Assim, na Austrália, a prevalência variou de 11,5 a 14,3% (SYKES et al., 1997; SYKES et al., 1999b; SYKES et al., 2001), na Suíça foi de 11,5% (VON BOMHARD et al., 2003), no Reino Unido foi de 6,7% e 18% (MCDONALDS et al., 1998; HELPS et al., 2001, respectivamente), no Japão 4,5% e 26,9% (IWAMOTO et al., 2001; MOCHIZUKI et al., 2000, respectivamente) e 59,1% em gatos provenientes de abrigos municipais para animais (CAI et al., 2001) e, na Itália, de uma população de 40 gatos avaliados, em 22,5% foram detectados DNA de *C.felis* (MARSÍLIO et al., 2004).

Quando analisado os suabes de conjuntiva colhidos de gatos clinicamente sadios, a prevalência de 4,1% obtida (Tabela 8 e 13), foi muito próxima daquela encontrada por VON BOMHARD et al., (2003), na qual 3% (1/30) dos gatos apresentaram DNA clamidial neste mesmo tipo de amostra.

No que diz respeito aos grupos experimentais estudados, não houve diferença significativa entre os números de animais positivos na PCR; em síntese, a prevalência entre cada grupo é bastante similar, ou seja, nenhum grupo apresentou predisposição maior à infecção do que outro.

Quando analisados em conjunto e comparativamente os resultados de soros de gatos domésticos submetidos à RFC e à RIFI, 90% dos gatos soro-reagente à RFC apresentaram títulos de anticorpos ≥ 1024 pela RIFI, e em somente uma amostra foi detectado título igual a 128 (Tabela 10). Portanto, nenhuma correlação entre os resultados dos títulos de anticorpos anti-*C. felis* obtidos na RFC e RIFI foi observado, resultados concordantes com os obtidos por WILLS 1986 (*apud* WILLS et al., 1988), que também não obteve correlação entre os títulos de anticorpos entre ambas às reações. Nosso estudo também revelou que em gatos, o teste sorológico mais sensível é a RIFI, do mesmo modo, que em ovinos, já havia sido demonstrado que a RIFI é mais sensível do que a RFC na detecção de anticorpos anti-*Chlamydophila abortus* (GRIFFITHS et al., 1996; MARKEY et al., 1993). Esta maior habilidade da RIFI em detectar uma maior quantidade de animais positivos em relação a RFC, provavelmente esteja relacionado ao tipo de anticorpo envolvido na reação bem como a fase de resposta imune na qual o animal se encontrava no momento da colheita das amostras.

Dentre os nove animais nos quais foi possível à detecção direta do agente pela PCR, em cinco (55,5%) foram detectados anticorpos pela RIFI (Tabela 11). Tais achados vêm corroborar resultados obtidos por TOZON et al., (2006), que ao correlacionar os dados da detecção direta do agente, realizada por meio do ELISA e a pesquisa de anticorpos por meio da RIFI, constataram que dos onze animais positivos no ELISA e com sinais clínicos compatíveis com a DTRS (secreção nasal e tosse) e/ou conjuntivite, somente 5 (45,5%) apresentaram anticorpos pela RIFI.

Dos gatos positivos à PCR, um animal apresentou título de anticorpos pela RIFI igual 32, um 128 e três ≥ 1024 (Tabela 11). Assim, 60% (3/5) dos animais PCR positivos apresentaram título de anticorpos ≥ 1024 , dados similares aos encontrados por WILLS et al., (1988), que obtiveram 95,8 % (68/71) dos gatos com infecção ativa apresentando títulos ≥ 1024 pela RIFI. Portanto, tais achados também estão concordes com os obtidos por MCDONALD et al., (1998) que detectaram DNA de *C. felis* em 41% dos gatos com títulos de anticorpos ≥ 320 e 20% dos gatos com títulos entre 8-160 pela RIFI. De acordo com esses autores, a proporção de gatos eliminando o agente

aumenta conforme aumenta o título de anticorpos, fato também observado em nosso estudo.

No que diz respeito à presença de animais positivos à PCR, mas com sorodiagnóstico negativo, pode ser explicada com base na resposta imunológica nas infecções primárias por clamídias. Cerca de 2 semanas após os primeiros sinais clínicos, ocorre um aumento dos títulos de anticorpos IgA e IgM, que alcançam o seu ponto máximo cerca de 5 semanas após, declinando por volta da 10^a semana. Aproximadamente no momento da atividade máxima dos anticorpos IgM e IgA, começa a produção dos anticorpos IgG, que alcançam o seu ponto máximo cerca de 12 semanas após os primeiros sintomas, e podem ser detectados durante alguns anos (MATTER et al., 2006). Em nosso estudo, a classe de anticorpos estudada foi a IgG; conseqüentemente, o animal poderia estar numa fase mais inicial da doença e, por essa razão, provavelmente não tenha sido possível detectar a presença de anticorpos.

Dentre as nove amostras PCR positivas, cinco (55,5%) não apresentavam sinais clínicos no momento da colheita do material ratificando que a presença do agente e a soroconversão em animais clinicamente sadios podem ocorrer devido a infecções subclínicas, consoante já revelado por MCDONALD et al., 1998.

Finalmente, quando avaliados os dados de ficha clínica dos gatos examinados com o propósito de averiguar a correlação entre os resultados positivos obtidos nos três testes, dos 10 animais soro-reagente à RFC, dois (20%) eram machos e oito fêmeas (80%), dos quais um (10%) tinha idade inferior a seis meses de idade e nove (90%) idade superior a um ano e inferior a seis anos (Tabela 13). Dos 106 animais positivos a RIFI, 39 (36,8%) eram machos e 67 (63,2%) fêmeas. Vinte e cinco (23,6%) tinham idade inferior a seis meses de idade, três (2,8%) idade entre seis meses e um ano, 66 (62,3%) idade superior a um ano e inferior a seis anos e 12 (11,3%) idade superior a seis anos (Tabela 13). A análise estatística de tais dados revelou predisposição por sexo e por faixa etária, pois o número de fêmeas e de animais com idade maior que um ano e inferior a seis anos foi significativamente maior. É provável que esta maior predisposição sexual ocorra, tendo em vista que no Brasil é grande o número de gatos

abandonados, principalmente fêmeas. Em geral, as pessoas optam em ficar com gatos machos, evitando assim o inconveniente de gestações indesejadas, razão pela qual, nos abrigos públicos a presença de gatas é mais comum. Nos gatis, a população dominante foi de fêmeas, já que os animais não eram castrados e a manutenção de gatos machos inteiros nestes estabelecimentos é difícil devido ao comportamento, muitas vezes agressivo dos mesmos. Ademais, estes gatos, na maioria das vezes, foram adotados de abrigos e não comprados, provável motivo da população de fêmeas ser maior. Segundo a literatura compulsada, a soroprevalência é maior em animais jovens, principalmente entre a idade de 5 semanas e 9 meses e em gatos machos (WILLS et al., 1988). Em outro estudo, não é observada a predisposição sexual, nem há uma correlação entre animais sem sinais clínicos de clamidioses soropositivos pela RIFI, e com idade inferior a 1 ano ou superior a 1 ano (HOLST et al., 2006).

Dos nove animais positivo a PCR, 5 (55,6%) eram machos e 4 (44,4%) fêmeas; 4 (44,4%) tinham idade inferior a seis meses, 4 (44,4%) idade superior a um ano e inferior a seis anos e um (11,2%), idade superior a seis anos (Tabela 13). Não foi observado predisposição a sexo ou idade, assim como também observado por VON BOMHARD et al., (2003).

Em estudos realizados na Austrália, observou-se que em animais com média de idade superior a 24 meses era mais freqüente a ocorrência de resultados negativos na PCR, sugerindo que a clamidiose seja mais comum em gatos jovens, com idade média de cinco meses e meio, associada ao fato de terem apresentado DTRS. Entretanto, neste mesmo estudo, não foi observada diferença na distribuição sexual da doença (SYKES et al, 1997). Por outro lado, há relatos demonstrando que gatos com idade entre nove semanas e seis meses de idade estão mais predispostos a clamidiose, enquanto que gatos com conjuntivite têm uma maior probabilidade de estarem infectado por *C.felis* do que gatos sem conjuntivite (SYKES et al., 1999b).

Segundo BANNASCH e FOLEY (2005) a idade é um fator de risco para DTRS, sendo maior em animais de zero a três meses e sete meses a 11 meses de idade. Tais riscos são reduzidos em gatos com idade superior a um ano de idade. Gatos que convivem próximos a cachorros (fator estressante) e que estão no abrigo a mais de 6

dias também apresentam uma predisposição. O aumento na densidade populacional também aumenta a prevalência de DTRS. Do mesmo modo, gatos em abrigos estão mais predispostos a DTRS devido à grande rotatividade de animais, a grande densidade populacional, ao estresse (bandejas sanitárias sujas, áreas próximo a cachorros ou a passagem de pedestres), a falta de cuidados médicos, a nutrição inadequada e a problemas médicos recorrentes.

Por fim, é importante salientar que o presente estudo, pioneiro no assunto, confirma a presença da *C.felis* em gatos domésticos no Brasil, bem como sua associação com DTRS e secreção ocular e conjuntivite. Ademais, com base nos resultados obtidos nas reações utilizadas para detecção de DNA clamidial (PCR) e pesquisa de anticorpos (RFC e RIFI) da população de animais estudada, também ficou demonstrado que a clamidiose felina possivelmente encontra-se endêmica e disseminada em gatis e abrigos para animais.

7- CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos objetivando a detecção direta e indireta de *Chlamydophila felis* em uma população de 151 gatos domésticos provenientes de gatis, abrigos públicos para animais e atendidos em clínicas e ou hospitais veterinários particulares, depois de analisados e discutidos, em confronto com dados da literatura compilada, permitem às seguintes conclusões:

- A *C.felis*, agente da clamidiose felina, está presente, de forma endêmica, em gatos no Brasil, bem como está associada às doenças do trato respiratório superior, a secreção ocular e a conjuntivite;
- A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos correspondentes à região conservada do gene da MOMP do gênero *Chlamydiaceae*, foi capaz de detectar DNA de *C. felis* em amostras biológicas (suabes conjuntivais) de gatos domésticos, com sinais clínicos de clamidiose, bem como em gatos sem qualquer sinal clínico de clamidiose felina. A presença de DNA de *C.felis* em animais sem sinais clínicos pode ser atribuído a infecções sub-clínicas;
- A Reação de Fixação do Complemento (RFC), realizada com antígeno preparado a partir de determinantes antigênicos grupo-específicos presentes em lipopolissacarídeo (LPS) de membrana dos Corpúsculos Elementares (CEs) e adaptada para uso em microplacas, permitiu a quantificação de anticorpos anti-*Chlamydiaceae* nos soros de gatos;
- A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), realizada com “kit” comercial de uso humano - Chlamydia-G Antibody Test System (Bion Interprises, USA), adaptada na presente investigação para a quantificação de anticorpos anti-*Chlamydiaceae* nos soros

de gatos, permitiu a visualização bem definida de fluorescência emanada do antígeno fixado à células L929 infectadas por *Chlamydia* LGV tipo 1.

- A presença de anticorpos detectados pelas RFC e RIFI em animais clinicamente saudáveis é atribuída às infecções inaparentes ou convalescentes;
- A presença de anticorpos anti *C.felis* detectados pela RFC ou pela RIFI é um forte indício da circulação do agente em populações de felinos e/ou a capacidade imunogênica da vacina;
- A RFC quando comparada a RIFI, apresentou baixa sensibilidade de diagnóstico na pesquisa de anticorpos anti-*Chlamydiaceae* em gatos domésticos;
- A ausência de anticorpos em animais positivos na PCR pode ser atribuída a um estágio muito inicial da infecção onde não se consegue mensurar os anticorpos;
- A soroprevalência para *C.felis* pela RIFI e pela RFC foi maior em gatos provenientes de gatis, fêmeas e animais com idade acima de um ano e inferior a seis anos.

8- REFERÊNCIAS

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

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, p.109-119, 2005.

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

BIER, O.; SIQUEIRA, M.; ESTEVES, M.B. Quantitative studies of complement fixation. I – A simplified and accurate procedure based on 50 percent hemolytic end point. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.10, n.4, p.199-208, 1968.

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

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

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

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

DEMKIN, V.V.; ZIMIN, A.L. A new amplification target for PCR-RFLP detection and identification of Chlamydiaceae species. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.183, n.3, p. 169-75, 2005.

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

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

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

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

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

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

GREENE, C.E. Immunocompromised people and pets. In: GREENE, C.E. (Ed.). **Infections diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p.710-717.

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

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

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

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

GIJSEN, A.P.; LAND, J.A.; GOOSSENS, V.J.; SLOBBE, M.E.P., BRUGGEMAN, C.A. *Chlamydia* antibody testing in screening for tubal factor subfertility: the significance of IgG antibody decline over time. **Human Reproduction**, Oxford, v.17, n.3, p.699-703, 2002.

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

HARGIS, A.M.; PRIEUR, D. J.; GAILLARD, E. T. Chlamydial infection of the gastric mucosa in twelve cats. **Veterinary Pathology**, Washington, v.20, p. 170-178, 1983.

HARTLEY, J.C.; STEVENSON, S.; ROBINSON, A.J.; LITTLEWOOD, J.D.; CARDER, C.; CARTLEDGE, J.; CLARK, C.; RIDGWAY, G.L. Conjunctivitis due to *Chlamydophila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. **The Journal of Infection**, London, v. 43, p. 7-11, 2001.

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

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

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

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

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

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

LAZAROWICZ, M.; STECK, F.; KIHM, U.; MOEHL, H. Respiratory infections of the cat – a serological survey in different populations. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 29, p. 769–775, 1982

LIPMAN, N. S.; YAN, L; MURPHY, J.C., Probable transmission of *Chlamydia psittaci* from a macaw to a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.204, n. 9, p.1479-1480, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

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

MESSMER, T.O.; MARTINEZ, J.; HASSOUNA, F.; HARRIS, W.; DOWELL, S.; CARLONE, G.M. Comparison of two commercial microimmunofluorescence kits and an enzyme immunoassay kit for detection of serum immunoglobulin G antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.8, n.3, p.588-92, 2001.

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

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

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

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

OTT, R.L. Comments on feline pneumonitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.158, n.6, p. 939-940, 1971.

PEELING, R. W.; BRUNHAM, R. C. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.2, n.4, p.96-103, 1996.

PERSSON, K; BOMAN, J. Comparison of five serologic tests for diagnosis of acute infections by *Chlamydia pneumoniae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington , v. 7, n. 5, p.739-744, 2000.

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

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

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

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

RAMPAZZO, A.; APPINO, S.; PREGEL, P. Prevalence of *Chlamydomphila felis* and feline herpesvirus 1 in cats with conjunctivitis in northern Italy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 17, p. 799-807, 2003.

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

RASO, T. F. ***Chlamydomphila psittaci* em psitacídeos de vida livre e cativo e suas implicações à saúde pública**. 2004. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária-Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RASO, T.F.; PINTO, A.A. Pesquisa de anticorpos anti-*Chlamydomphila psittaci* em papagaios brasileiros pela reação de fixação do complemento em microplacas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu, **Anais XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu: editora, 2001.

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

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

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

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

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

SHEWEN, P.E.; POVEY, R.C.; WILSON, M.R. A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 21, p. 231-233, 1980a.

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

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

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

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

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

SYKES, J.E.; STUDDERT, V. P.; ANDERSON, G.; BROWNING, G.F. Comparison of *Chlamydia psittaci* from cats with upper respiratory tract disease by polymerase chain reaction analysis of the ompA gene. **The Veterinary Record**, London, v. 140, p. 310-313, 1997.

SYKES, J.E.; STUDDERT, V. P.; BROWNING, G.F. Comparison of the Polymerase Chain Reaction and culture for the detection of feline *Chlamydia psittaci* in untreated and doxycycline-treated experimentally infected cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.13, p.146-152, 1999a.

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

SYKES, J.E.; ALLEN, J.L.; STUDDERT, V. P.; BROWNING, G.F. Detection of feline calicivirus feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 81, p. 95-108, 2001.

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

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

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

TS'AO, Y.C.; MAGEE, W. Monoclonal antibody to a major outer membrane protein of feline *Chlamydia psittaci*: antibody specificity and anti-idiotypic antibody production. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.42, p.1-13, 1994.

ULRICH, C. A.; MAC ARTHUR. F. X. An improved method for the production of anti-sheeps hemolysin. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.12, p. 84-85, 1942.

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

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

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

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

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

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

WONG, K.H.; SKELTON, S.K.; DAUGHARTY, H. Utility of complement fixation and microimmunofluorescence assays for detecting serologic responses in patients with clinically diagnosed psittacosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.10, p.2417-21, 1994.

YAN, C.; FUKUSHI, H.; MATSUDATE, H. Seroepidemiological investigation of feline chlamydiosis in cats and human in Japan. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.44, p.155-160, 2000.

ANEXO 1

FICHA CLÍNICA	NÚMERO PCF* _____	DATA DE COLHEITA:
<input type="checkbox"/> PROPRIETARIO	<input type="checkbox"/> GATIL	<input type="checkbox"/> ABANDONADO
NOME DO ANIMAL: _____		
NOME DO PROPRIETARIO: _____		
PELAGEM: _____		
SEXO <input type="checkbox"/> MACHO <input type="checkbox"/> FÊMEA		
RAÇA: <input type="checkbox"/> SRD <input type="checkbox"/> PERSA <input type="checkbox"/> SIAMÊS <input type="checkbox"/> OUTROS _____		
IDADE: _____		
VACINAÇÃO: <input type="checkbox"/> QUINTUPLA <input type="checkbox"/> QUADRUPLA <input type="checkbox"/> TRÍPLICE <input type="checkbox"/> NÃO VACINADO <input type="checkbox"/> NÃO SABE INFORMAR		
CASTRACÃO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
CONTATO COM: <input type="checkbox"/> OUTROS GATOS <input type="checkbox"/> CÃES <input type="checkbox"/> AVES _____		
ACESSO A RUA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
VERMIFUGAÇÃO ATUALIZADA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
CONJUNTIVITE NO MOMENTO DA COLETA: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> UNILATERAL <input type="checkbox"/> BILATERAL		
PROBLEMA RESPIRATÓRIO NO MOMENTO DA COLETA : <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> QUAL__		
ANTECEDENTES:		
1- CONJUNTIVITE: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> UNILATERAL <input type="checkbox"/> BILATERAL.		
2- SECREÇÃO OCULAR: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> UNILATERAL <input type="checkbox"/> BILATERAL		
3- PROBLEMA RESPIRATÓRIO: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO QUAL__		
MATERIAL COLETADO		
<input type="checkbox"/> SWAB DE CONJUNTIVA <input type="checkbox"/> SORO		
<input type="checkbox"/> ÓRGÃOS _____		

*PCF-Projeto *Chlamydomphila felis*