

**MARIA MARGARIDA FERREIRA ANTUNES FORMOSINHO
VIEIRA**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E CITOLÓGICO DE
HERPESVIRUS FELINO TIPO 1, *Chlamydophila felis* E
Mycoplasma felis, EM ANIMAIS COM CONJUTIVITE
E/OU DOENÇA DO TRATO RESPIRATÓRIO
SUPERIOR**

Orientadora: Professora Doutora Margarida Alves

Co-orientadora: Mestre Odete Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2019

**MARIA MARGARIDA FERREIRA ANTUNES FORMOSINHO
VIEIRA**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E CITOLÓGICO DE
HERPESVIRUS FELINO TIPO 1, *Chlamydophila felis* E
Mycoplasma felis, EM ANIMAIS COM CONJUTIVITE
E/OU DOENÇA DO TRATO RESPIRATÓRIO
SUPERIOR**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 17 de Outubro de 2019, com o despacho Reitoral n.º. 252/2019, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Ângela Dâmaso

Arguente: Professora Doutora Ana Resende

Orientadora: Professora Doutora Margarida Alves

Co-orientadora: Mestre Odete Almeida

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

Lisboa

2019

*Ao meu Avô Fernando, a
melhor Estrela-Guia que o céu
poderia ter*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Margarida Alves e à minha co-orientadora, Mestre Odete Almeida, não só pela sugestão do tema, mas sobretudo pelo apoio, paciência e disponibilidade na execução desta dissertação.

Às Professoras do laboratório do Hospital Escolar da FMV-ULHT, Mestre Joana Fonseca e Mestre Ana Lúcia Rodrigues, por terem a gentileza de me auxiliar na elaboração deste documento. Obrigada pela ajuda e carinho com que sempre me trataram.

A todos os Professores com quem tive a honra de poder aprender, durante o meu percurso escolar, em especial, aos da FMV-ULHT. A todos devo muito do que sou hoje.

À equipa do Hospital Veterinário de Leiria, à qual serei eternamente grata, primeiro pela oportunidade de estágio e, posteriormente, pela amizade, confiança e pelo crescimento profissional e pessoal que me permitiram ter. Não podia ter escolhido melhor local para estagiar.

Aos meus amigos. Obrigada por compreenderem todas as minhas ausências e, ainda assim, exigirem sempre a minha presença; por me ensinarem tanto todos os dias e por me deixarem fazer parte das vossas vidas. Adoro-vos.

A toda a minha família. A todos os meus Primos e Tios, que tanto gosto e, em especial, aos meus Tios Carmo e Samuel, por me permitirem realizar este sonho.

Por fim, como não poderia deixar de ser, um agradecimento especial à minha Mãe e Avó, por acreditarem sempre que sou capaz, por me chamarem à atenção quando necessário, por serem a rede que me ampara quando caio e por viverem comigo os meus fracassos e vitórias ao expoente máximo que só o amor permite. São o meu maior exemplo e orgulho.

A todos, o meu mais profundo obrigada.

Tenho muita sorte em ter-vos comigo!

Resumo

A doença do trato respiratório superior (DTRS), apesar de muito comum em gatos, é, frequentemente, subvalorizada. Os sinais clínicos apresentados com mais frequência são espirros, tosse, secreção ocular e/ou nasal e conjuntivite. A conjuntivite felina apresenta, maioritariamente, uma natureza infecciosa, tendo como principais responsáveis o Herpesvírus felino-1, *Chlamydophila felis* e, possivelmente, *Mycoplasma felis*. Por vezes, o diagnóstico pode tornar-se desafiante, quer pela natureza dos agentes, quer pelos sinais clínicos inespecíficos.

O objetivo primário do presente trabalho foi realizar o diagnóstico da infeção por estes agentes, através da citologia conjuntival e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em gatos com sinais clínicos de DTRS e/ou de conjuntivite. Foram, ainda, objetivos do presente estudo avaliar a concordância entre os resultados do diagnóstico molecular e citológico e caracterizar a população em função dos agentes causadores de infeção.

Para tal, numa população de 29 gatos com sinais clínicos de DTRS e/ou conjuntivite, foram realizadas duas recolhas de amostras conjuntivais, uma com zaragatoas e outra com escova de citologia, para o diagnóstico molecular e citológico, respetivamente. As citologias foram coradas pelo método de May Grunwald-Giemsa. Para cada amostra, procedeu-se a duas PCR convencionais, para amplificação do DNA de FHV-1 e *M.felis* e uma PCR em tempo real, para deteção de DNA de *C.felis*. Foram, também, recolhidos dados clínicos e epidemiológicos dos animais em estudo, aquando das recolhas das amostras.

Ao diagnóstico molecular, foi obtida uma frequência de infeção de 58,6% para FHV-1 e de 31,0% para *C.felis*. Não foi identificado nenhum gato com infeção por *M.felis*. No diagnóstico citológico conjuntival, apenas seis animais foram diagnosticados com *C.felis*, não tendo sido feita nenhuma observação suspeita de infeção para os restantes agentes.

Os resultados evidenciaram uma elevada frequência de infeção por FHV-1 e *C.felis*. A PCR mostrou ser um meio de diagnóstico mais eficaz para a deteção dos agentes em estudo, quando comparada com a citologia conjuntival. O presente estudo deixa em aberto a dúvida sobre o papel de *M.felis* enquanto agente etiológico primário, quer em conjuntivites, quer na DTRS.

Palavras-chave: Doença do trato respiratório superior, Conjuntivite, Herpesvirus felino-1, *Chlamydophila felis*, *Mycoplasma felis*, citologia conjuntival, Diagnóstico molecular.

Abstract

The upper respiratory tract disease (URTD) is very usual in cats, but quite often underestimated. Main clinical signs are sneezes, cough, ocular and/or nasal secretions and conjunctivitis. Feline conjunctivitis has, mostly, an infectious nature with feline-1 herpesvirus, *Chlamydophila felis*, and, possibly, *Mycoplasma felis* as the main causative agents. Diagnosis can, sometimes, become challenging, both by the nature of the agents and the nonspecific clinical signs.

The primary objective of this study was to diagnose these agents through conjunctival cytology and Polymerase Chain Reaction (PCR), in cats with clinical signs of URTD and/or conjunctivitis. The secondary objective of this study was to evaluate the concordance of molecular and cytological results and to characterize the population according to the causative agents of infection.

For this purpose, in a population of 29 cats with clinical signs of URTD and/or conjunctivitis, two conjunctival samples were taken, one with a swab, for PCR and another with a cytology brush, for cytological evaluation. Cytologies were stained with May Grunwald-Giemsa. Two conventional PCRs, for FHV-1 and *M.felis*, and a real-time PCR for *C. felis*, were performed for each sample. Clinical and epidemiological data were also collected from the animals, when samples were taken.

By PCR, an infection frequency of 58.6% was obtained for FHV-1 and 31.0% for *C. felis*. *M.felis* DNA was not detected in all animals. In the conjunctival cytologic diagnosis, only six animals were positive to *C. felis*, and no signs suggestive of infection were observed for the remaining agents.

The results evidenced a high frequency of infection by FHV-1 and *C.felis*. PCR has shown to be a more effective as a diagnostic tool for detecting the studied agents, compared to conjunctival cytology. This study also reinforces the doubt about the possibility of *M.felis* playing a primary role in both conjunctivitis and URTD.

With this study, the role of *M.felis* as a primary etiologic agent for both conjunctivitis and URTD remains to be clarified.

Key words: Upper respiratory tract disease, Conjunctivitis, Feline Herpesvírus-1, *Chlamydophila felis*, *Mycoplasma felis*, Conjunctival cytology, Polymerase Chain Reaction.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

- ® – Marca registada
- % – Percentagem
- µL – Microlitro
- µm – Micrómetro
- CE – Corpo elementar
- CI – Corpo inicial
- cPLI – Imunorreatividade à lipase pancreática canina, do inglês “canine Pancreatic Lípase Immunoreactivity”
- DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”
- DTRS – Doença do Trato Respiratório Superior
- ELISA – Ensaio imunoenzimático, do inglês “Enzyme-Linked Immunossorbent Assay”
- FCV – Calicivírus felino, do inglês “Feline Calicivírus”
- fGUSB – Gene beta-glucoronidase felino, do inglês “feline beta-glucoronidase”
- FHV-1 – Herpesvírus felino tipo 1, do inglês “Feline Herpesvirus type 1”
- FIV – Vírus da imunodeficiência felina, do inglês “Feline Immunodeficiency Virus”
- FeLV – Vírus da leucemia felina, do inglês “Feline Leucemia Virus”
- g* – Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
- h – Hora
- HV FMV-ULHT – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
- HVL – Hospital Veterinário de Leiria
- IFN- α – Interferão alfa
- IFN- ω – Interferão omega
- LACH – Laboratório de Análises Clínicas de Histopatologia
- m/V – Massa por volume (concentração mássica)
- mg/Kg – Miligrama por kilograma
- min. – Minuto
- mL – Mililitro
- mM – Milimolar
- MU/Kg – Milhões de unidades por kilograma
- °C – Grau Celsius
- pb – Pares de bases
- PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”
- QUOD – Em dias alternados, do latim “*quaque altera die*”

RT- PCR – Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, “Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction”

pH – Potencial de hidrogénio

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic Acid”

SC – Subcutâneo

seg. – Segundo

SID – Toma única diária, do latim “*semel in die*”

spp. – Espécies

UV – Ultravioleta

Índice Geral

I. Relatório de estágio.....	14
II. Diagnóstico molecular e citológico de Herpesvirus Felino tipo 1, <i>Chlamydophila felis</i> e <i>Mycoplasma felis</i> , em animais com conjutivite associada a Doença do Trato Respiratório Superior	17
1. Introdução	17
1.1. Doença do Trato Respiratório Superior (DTRS).....	17
1.2. A Conjuntiva	17
1.3. Conjutivite	18
1.3.1. Hiperemia	19
1.3.2. Quemose	19
1.3.3. Secreção ocular	19
1.3.4. Diagnósticos diferenciais.....	20
1.4. Exames complementares de diagnóstico.....	20
1.4.1. Citologia conjuntival.....	20
1.4.1.1. Métodos de colheita	21
1.4.1.2. Colorações.....	22
1.4.1.3. Citologia conjuntival normal	22
1.4.1.4. Achados citológicos na infeção por <i>Chlamydophila felis</i>	23
1.4.1.5. Achados citológicos na infeção por <i>Mycoplasma felis</i>	24
1.4.1.6. Achados citológicos na infeção por Herpesvirus Felino tipo-1	25
1.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase	26
1.5. Infeção por <i>Chlamydophila felis</i>	26
1.5.1. Etiologia e epidemiologia	26
1.5.2. Patogenia.....	28
1.5.3. Manifestações clínicas.....	29
1.5.4. Diagnóstico	30
1.5.5. Prevenção	31
1.5.6. Tratamento.....	32
1.5.7. Potencial zoonótico	32
1.6. Infeção por Herpesvírus Felino tipo 1	33
1.6.1. Etiologia e epidemiologia	33
1.6.2. Manifestações clínicas.....	34
1.6.3. Diagnóstico	36

1.6.4.	Prevenção.....	38
1.6.5.	Tratamento.....	38
1.6.6.	Prognóstico.....	41
1.6.7.	Potencial zoonótico.....	41
1.7.	Infeção por <i>Mycoplasma felis</i>	41
1.7.1.	Etiologia e epidemiologia	41
1.7.2.	Manifestações clínicas.....	43
1.7.3.	Diagnóstico.....	43
1.7.4.	Prevenção.....	43
1.7.5.	Tratamento.....	44
1.7.6.	Potencial zoonótico.....	44
1.8.	Co-infeções.....	45
2.	Material e Métodos.....	47
2.1.	Descrição da população em estudo	47
2.2.	Recolha de amostras	47
2.3.	Avaliação citológica	48
2.4.	Deteção molecular dos agentes em estudo.....	48
2.4.1.	Extração de DNA.....	48
2.4.2.	Amplificação por PCR de um fragmento do gene <i>fgUSB</i>	49
2.4.2.1.	Visualização dos produtos e PCR por electroforese em gel de agarose	51
2.4.3.	PCR convencional para detecção de DNA de FHV-1	51
2.4.4.	PCR convencional para detecção de DNA de <i>Mycoplasma felis</i>	52
2.4.5.	PCR em tempo real para detecção de DNA de <i>Chlamydophila felis</i>	53
3.	Resultados	57
3.1.	Caracterização da população em estudo	57
3.2.	Análise molecular e citológica.....	62
3.2.1	Amplificação de um fragmento do gene <i>fgUSB</i>	62
3.2.2.	PCR convencional para detecção de DNA de FHV-1	63
3.2.3.	Citologia ocular para diagnóstico de FHV-1	67
3.2.4.	Amplificação por PCR convencional de DNA de <i>M. felis</i>	68
3.2.5.	Citologia ocular para diagnóstico de <i>M.felis</i>	69
3.2.6.	Resultados da PCR em tempo real para detecção de DNA de <i>C.felis</i>	69
3.2.7.	Citologia ocular para diagnóstico de <i>C.felis</i>	72
3.2.8.	Presença de co-infeções.....	73
4.	Discussão de Resultados.....	76

5. Conclusões	84
6. Referências Bibliográficas	85
Apêndice I	I
Apêndice II	V

Índice de figuras

Figura 1 – A conjuntiva.....	18
Figura 2 – Inclusões sugestivas de infeção por <i>Chlamydomphila felis</i>	24
Figura 3 – Inclusões compatíveis com o diagnóstico de <i>Mycoplasma felis</i>	25
Figura 4 – Exemplo de inclusões intranucleares suspeitas de FHV-1.	25
Figura 5 – Distribuição dos gatos em estudo em função do sexo e estado reprodutivo.	57
Figura 6 – Distribuição dos animais em estudo em função da idade.....	58
Figura 7 – Distribuição dos gatos em estudo em função do motivo da consulta.....	58
Figura 8 – Distribuição dos gatos em estudo em função dos protocolos de desparasitação.	59
Figura 9 – Distribuição dos gatos em estudo em função dos protocolos de vacinação.	60
Figura 10 – Distribuição dos gatos em estudo em função da presença de sinais de conjuntivite.....	62
Figura 11 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de um fragmento do gene <i>fGUSB</i>	63
Figura 12 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do DNA de FHV-1.	63
Figura 13 – Resumo dos resultados da PCR para detecção de FHV-1.....	64
Figura 14 – Distribuição dos gatos positivos para FHV-1 em função dos protocolos de vacinação.	64
Figura 15 – Distribuição dos gatos positivos para FHV-1 em função dos protocolos de desparasitação.	65
Figura 16 – Distribuição dos gatos positivos para FHV-1 em função do tipo de habitação... ..	65
Figura 17 – Distribuição dos gatos positivos para FHV-1 em função da existência de coabitantes e do seu estado clínico.	66
Figura 18 – Citologia conjuntival onde se observam linfócitos e neutrófilos.	68
Figura 19 – Citologia conjuntival onde se observam cocos livres.....	68
Figura 20 – Curva de <i>melting</i> de algumas das amostras em estudo..	69
Figura 21 – Resultado da PCR para <i>Chlamydomphila felis</i>	70
Figura 22 – Distribuição dos gatos positivos para <i>C.felis</i> em função dos protocolos de vacinação.	70
Figura 23 – Distribuição dos gatos positivos para <i>C.felis</i> em função dos protocolos de desparasitação.	71
Figura 24 – Distribuição dos gatos positivos para <i>C.felis</i> em função da existência de coabitantes e do seu estado clínico.	71

Figura 25 – Citologia conjuntival onde se observa inclusão intracitoplasmocitária de <i>C.felis</i>	73
Figura 26 – Distribuição dos gatos positivos por PCR para <i>C.felis</i> em função da existência de inclusões intracitoplasmáticas.....	73
Figura 27 – Frequência dos gatos infectados por FHV-1 em infecção única e co-infecção..	74
Figura 28 – Frequência dos gatos infectados por <i>C.felis</i> em infecção única e co-infecção. .	74
Figura 29 – Resumo dos resultados do diagnóstico molecular com a distribuição dos agentes em estudo.	75

Índice de tabelas

Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>fGUSB</i>	50
Tabela 2 – Condições da reação de PCR na amplificação do gene <i>fGUSB</i>	50
Tabela 3 – Sequência de <i>primers</i> utilizados para a amplificação de FHV-1.	52
Tabela 4 – Condições da reação de PCR na amplificação de DNA de FHV-1.	52
Tabela 5 – Sequência de <i>primers</i> utilizados para a amplificação de <i>Mycoplasma felis</i>	53
Tabela 6 – Condições da reação de PCR na amplificação de DNA de <i>Mycoplasma felis</i>	53
Tabela 7 – Sequência de <i>primers</i> utilizados para a amplificação em tempo real de DNA de <i>Chlamydophila felis</i>	54
Tabela 8 – Condições da reação de PCR em tempo real na amplificação de DNA de <i>Chlamydophila felis</i>	54
Tabela 9 – Sequência de <i>primers</i> utilizados para a amplificação de <i>Chlamydophila</i> spp.	55
Tabela 10 – Condições da reação de PCR na amplificação de DNA de <i>Chlamydophila</i> spp.	55
Tabela 11 – Distribuição dos gatos em estudo em função dos sinais clínicos presentes.	61
Tabela 12 – Sinais clínicos apresentados pelos 17 animais positivos para FHV-1.	66
Tabela 13 – Sinais clínicos apresentados pelos animais positivos para <i>C.felis</i>	72
Tabela 14 – Frequências dos diferentes agentes em estudo, em infecção única e em co-infecção.	74
Tabela 15 – Fármacos utilizados na terapêutica de FHV-1.	I

I. Relatório de estágio

O presente relatório consiste numa descrição sucinta do estágio curricular realizado pela autora.

O estágio foi realizado em dois locais distintos, no Hospital Veterinário de Leiria (HVL), entre 1 de setembro de 2017 e 31 de dezembro de 2017, e no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT), entre 4 de janeiro de 2018 e 30 de junho de 2018.

A descrição das atividades desenvolvidas no HVL, a seguir apresentadas, subdivide-se nas seguintes categorias:

1 – Internamento; 2 – Cirurgia; 3 – Imagiologia; 4 – Consultas; 5 – Atividades laboratoriais; 6 – Tratamentos e seguimento de casos.

1 – Internamento

As principais causas de internamento em cães foram: recobro e acompanhamento, problemas gastrintestinais e fraturas. Nos gatos, a principal causa de internamento, foi doença renal. Complicações derivadas da infeção pelos vírus da Imunodeficiência Felina (FIV, do inglês “Feline Immunodeficiency Virus”) e vírus da Leucemia Felina (FeLV, do inglês “Feline Leucemia Virus”), foram, também, causas relevantes de internamento de gatos.

Nesta área foi possível desenvolver conhecimentos e competências a vários níveis, nomeadamente, administração de fármacos (conhecer diferentes fármacos, vias de administração e cálculo de doses), escolha e colocação de cateteres endovenosos, tipos e taxas de fluidoterapia, monitorização dos animais (frequências respiratória e cardíaca, temperatura, pressão arterial, hidratação, débito urinário, monitorização da micção e defecação, entre outras) e cuidados diários (diferentes tipos de alimentação, passeios e higienização).

2 – Cirurgia

As cirurgias realizadas com maior frequência foram ovariectomias e orquiectomias, tanto em gatos, como em cães. Destartarizações, enterectomias para remoção de corpo estranho, cirurgias ortopédicas, cistotomias e exérese de neoplasias/nódulos foram, também, exemplos da variedade de cirurgias que a autora teve a possibilidade de acompanhar e auxiliar, durante o período de estágio no HVL.

No âmbito da cirurgia, foi possível, não só ver e discutir protocolos cirúrgicos, como adquirir conhecimento e prática na preparação pré-cirúrgica (tanto da sala, como do animal),

na área da anestesia (agentes anestésicos e monitorização anestésica, quer pré, intra e/ou pós-cirúrgica) e manejo da dor.

3 – Imagiologia

Neste campo foi possível cimentar conhecimentos sobre radiologia e ecografia, nomeadamente a familiarização com os aparelhos e programas informáticos necessários, a pertinência da sua utilização, a visualização/interpretação de resultados e a realização de medições.

Desta forma, foi possível aprender a distinguir imagens normais, de imagens indicadoras de possíveis complicações, como fraturas, massas intratorácicas e intra-abdominais, problemas do foro gastrintestinal, edemas pulmonares, cardiomegalias, acumulações de líquidos, infeções respiratórias, entre outros. Estes meios de diagnóstico, foram, muitas vezes, suporte para reavaliações, possibilitando comparações com imagens anteriores, dando oportunidade de inferir sobre a evolução do animal.

4 – Consultas

As consultas assistidas com maior frequência, tinham como finalidade a realização do protocolo de vacinação e/ou desparasitação (quer interna, quer externa). A autora teve, também, a possibilidade de participar em consultas de ortopedia, dermatologia, gastrenterologia, neurologia, nefrologia/urologia, cardiologia, oncologia, pneumologia, oftalmologia, endocrinologia e reprodução. Por fim, foi também possível assistir a diversas consultas de reavaliação.

As consultas representam uma parte significativa da atividade médica veterinária, na área dos pequenos animais e, por essa razão, a oportunidade de assistir a tantas e tão diversas consultas, possibilitou aprendizagens não só em termos médicos como, também, ao nível da comunicação com os tutores.

5 – Atividades laboratoriais

Durante o período de estágio foi possível aprofundar conhecimentos, não só na execução como na interpretação de diversas análises, nomeadamente, hemograma, análises bioquímicas, urianálise, exame coprológico, diversos tipos de citologias e testes rápidos de diagnóstico (por exemplo, FIV/FelV, parvovirose e cPLI).

6 – Seguimento de casos e tratamentos

Por fim, foi, também, possível adquirir conhecimento e prática em diferentes tipos e protocolos de tratamentos, como a remoção de pontos/agrafos, colheita de sangue, técnicas de contenção, diferentes tipos de pensos, entre outros.

Foi, também, possível assistir a sessões de quimioterapia, o que permitiu ter contacto com os diferentes protocolos utilizados.

O estágio no LACH, teve como principal objetivo a realização do projeto de investigação conducente à presente dissertação de mestrado. Aqui, a autora teve a oportunidade de desenvolver conhecimentos e competências nas áreas da biologia molecular, citologia e de análises clínicas. Além das técnicas realizadas pela autora e descritas ao longo da dissertação, esta teve, ainda, a oportunidade de observar de perto outros projetos de investigação e de perceber o dia-a-dia num laboratório de análises clínicas.

Este estágio, representou um desafio distinto do experienciado no HVL; porém, teve um resultado muito satisfatório, pois trouxe diversas valências, quer a nível profissional, quer a nível pessoal.

II. Diagnóstico molecular e citológico de Herpesvirus Felino tipo 1, *Chlamydophila felis* e *Mycoplasma felis*, em animais com conjuntivite associada a Doença do Trato Respiratório Superior

1. Introdução

1.1. Doença do Trato Respiratório Superior (DTRS)

A Doença do Trato Respiratório Superior (DTRS) é frequente na população felina, particularmente em abrigos e em ambientes com elevado nível de *stress* (Lee-Fowler, 2014; Litster *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2018). Fatores como a redução de probabilidade de adoção, a sua alta morbidade e o custo dos cuidados veterinários, fazem da DTRS uma das principais causas de eutanásia em abrigos (Bannasch & Foley, 2005; Edwards *et al.*, 2008; Dinnage *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos mais frequentes são espirros, tosse, secreção ocular e/ou nasal e conjuntivite (Helps *et al.*, 2005; Dinnage *et al.*, 2009).

Vírus como o Calicivirus Felino e o Herpesvirus Felino são apontados como os principais responsáveis por esta doença, assim como *Chlamydophila felis*, *Bordetella bronchiseptica* e, possivelmente, *Mycoplasma* spp. (Bannasch & Foley, 2005; Helps *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Lee-Fowler, 2014).

Num estudo realizado na Austrália, numa população de 249 gatos com DTRS, 41% tinham idades inferiores a um ano. Nesse mesmo estudo, não foi detetada nenhuma evidência de predisposição de sexo, porém, 69% dos animais eram inteiros (Nguyen *et al.*, 2018).

1.2. A Conjuntiva

A conjuntiva constitui a membrana mucosa mais exposta de todo o corpo (Maggs, 2008). Esta representa uma parte muito importante do olho, tanto pela sua função, como por estar muitas vezes afetada nas lesões oculares; porém, é frequente não lhe ser prestada a devida atenção (Turner, 2010a).

A conjuntiva é uma fina mucosa que recobre a porção exposta da esclera e as pálpebras. Do ponto de vista anatómico, divide-se em três secções, que se continuam entre si: a conjuntiva palpebral, que recobre as pálpebras, a conjuntiva bulbar, que recobre o

globo ocular, e a conjuntiva nictitante, que recobre a terceira pálpebra (figura 1) (Martin, 2010; Turner, 2010a).

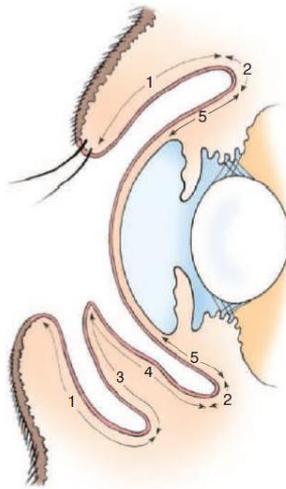


Figura 1 – A conjuntiva. 1 – conjuntiva palpebral; 2 – fórnix conjuntival; 3 – conjuntiva da membrana nictitante anterior; 4 – conjuntiva da membrana nictitante posterior; 5 – conjuntiva bulbar (adaptado de Maggs, 2008).

A conjuntiva é composta por substância própria e por um epitélio estratificado escamoso, não queratinizado. No epitélio externo contém células caliciformes, responsáveis pela produção da porção mucoide da película lacrimal; na camada intermédia contém tecido linfoide; na camada mais profunda contém tecido conjuntivo, vasos sanguíneos (especialmente na conjuntiva bulbar) e nervos (que derivam de ramos do nervo trigémino). Existe, também, pigmento em quantidade variável. A conjuntiva tem como funções proporcionar uma barreira contra os microorganismos e corpos estranhos, aumentar a motilidade palpebral e evitar a dessecação corneal (Maggs, 2008; Turner, 2010a).

1.3. Conjuntivite

A conjuntivite, ou inflamação da conjuntiva, é a doença ocular diagnosticada com maior frequência na prática clínica (Turner, 2010b).

As três reacções conjuntivais mais frequentes são a secreção ocular, a hiperemia e a quemose. Os animais nem sempre apresentam dor. A formação de folículos linfóides é comum em muitos casos de conjuntivite crónica, não sendo, porém, patognomónico de nenhuma etiologia em particular, pois qualquer conjuntivite crónica pode dar lugar à formação de folículos (Barnett, 2006; Maggs, 2008; Turner, 2010b).

Como a apresentação é semelhante independentemente da etiologia, é sempre necessário questionar o tutor acerca da evolução da doença, o estado de vacinação e o historial clínico. Devem eliminar-se causas infecciosas antes de considerar outras causas (como alergia, neoplasias ou alterações da película lacrimal), pois estas representam a etiologia mais frequente de conjuntivite felina (Martin, 2010; Turner, 2010b).

Normalmente, o quadro começa de forma aguda, apresentando hiperemia e secreção, que inicialmente é serosa; porém, em poucos dias torna-se mucopurulenta, podendo ser unilateral ou bilateral (Turner, 2010b).

Embora a hiperemia conjuntival, a quemose e a epífora com secreção serosa ou mucopurulenta, sejam sinais base de conjuntivite, nenhum deles é patognomónico de nenhuma das etiologias (Maggs, 2008; Martin, 2010; Turner, 2010b).

1.3.1. Hiperemia

A hiperemia ocorre, por norma, como resultado de uma libertação local de mediadores inflamatórios; porém, pode, também, ser consequência de uma falha na drenagem venosa, secundária à compressão por massas, quer orbitais, quer cervicais (mais raras por compressão da veia jugular) (Maggs, 2008). A sua gravidade é variável, sendo importante a sua distinção de congestão escleral ou episcleral (Martin, 2010; Turner, 2010b).

1.3.2. Quemose

A quemose é mais evidente nos casos de conjuntivite aguda, em que a tumefação ou o edema conjuntival podem ser mais relevantes, ou em caso de trauma. A disposição pouco coesa das células no estroma conjuntival permite a rápida e abundante formação de edema. Geralmente, a conjuntiva bulbar está envolvida e pode apresentar uma tumefação tão exuberante que pode impedir a vascularização do globo ocular. Em algumas ocasiões, a quemose pode ser acompanhada por hiperemia (Barnett, 2006; Turner, 2010a).

1.3.3. Secreção ocular

Esta manifestação pode ser mucosa, purulenta, mucopurulenta ou serosa e é, muitas vezes, o primeiro sinal de conjuntivite a aparecer (Turner, 2010b).

Em casos de conjuntivite viral, esta secreção pode ser mínima ou até mesmo ausente (Martin, 2010).

1.3.4. Diagnósticos diferenciais

A conjuntivite pode ter diversas etiologias. De seguida, são apresentadas algumas das mais comuns (Maggs, 2008; Turner, 2010a):

- Herpesvírus felino tipo 1 (FHV-1, do inglês, “Feline Herpesvirus type 1”), a causa infecciosa mais frequente de doenças oculares felinas,
- *Chlamydophila felis*, causa muito frequente de conjuntivite aguda e crónica,
- *Mycoplasma felis*,
- Infecção por calicivirus (raramente produz sintomas unicamente oculares),
- Conjuntivite bacteriana (raramente é primária em gatos),
- Conjuntivite alérgica,
- Corpo estranho,
- Queratoconjuntivite seca,
- Queratoconjuntivite eosinofílica,
- Neoplasia (ex: linfoma),
- Secundária a outra doença ocular: entrópico, uveíte, glaucoma, etc.

Ainda que menos comum que as etiologias infecciosas, a conjuntivite alérgica pode dever-se a reações de hipersensibilidade a tratamentos tópicos, como a clorotetraciclina, sendo esta uma causa frequente. Assim, se existem antecedentes de conjuntivite, que inicialmente respondeu a este fármaco mas que, passado algum tempo o animal desenvolveu hiperemia conjuntival acentuada, com possível envolvimento palpebral e prurido ocular, a existência de um componente alérgico deve ser ponderada. Por vezes, a cura pode passar pela interrupção de todas as medicações tópicas durante vários dias (Turner, 2010a).

Quando não se observam sinais de envolvimento sistémico, deve realizar-se uma exploração oftalmológica cuidadosa, de modo a descartar queratoconjuntivite seca, assim como causas de conjuntivite secundária, como entrópico ou corpos estranhos conjuntivais (Turner, 2010a).

As infeções bacterianas primárias são raras em gatos, embora possam existir infeções secundárias (Turner, 2010a).

1.4. Exames complementares de diagnóstico

1.4.1. Citologia conjuntival

A citologia conjuntival constitui uma técnica não invasiva, pouco dispendiosa, de fácil execução, que possibilita a obtenção rápida de resultados, permitindo não só a deteção de alguns agentes etiológicos, como a caracterização do tipo e fase do processo inflamatório presente. Esta deve ser realizada sempre que é observada conjuntivite, antes de se realizarem outro tipo de procedimentos, de custo mais elevado e mais invasivos, ou até antes de se iniciar antibioterapia (Raskin, 2006; Ollivier *et al.*, 2007; Turner, 2010b).

Embora útil, este método de diagnóstico apresenta alguns inconvenientes, como o facto de depender da experiência do citologista para avaliar os resultados e do Médico Veterinário que faz a recolha, uma vez que uma amostra com pouca celularidade pode não ser representativa e dar lugar a resultados inconclusivos (Prasse & Young, 2010).

Este método de diagnóstico apresenta menor especificidade e sensibilidade do que a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A extrusão de material nuclear e a presença de grânulos de melanina levam, com frequência, a resultados falso positivos, aquando da procura de corpos de inclusão (Sykes, 2004; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

Deste modo, a citologia conjuntival pode, por vezes, não ser suficiente, por si só, para chegar a um diagnóstico definitivo (Prasse & Young, 2010).

1.4.1.1. Métodos de colheita

Existem diversos métodos de colheita, sendo os mais comuns as zaragatoas, as escovas de citologia, as espátulas de Kimura e a parte romba de um bisturi (Dewhurst *et al.*, 2012).

As zaragatoas são pouco dispendiosas e são o método que acarreta um menor risco de trauma no momento da colheita, não necessitando de anestesia tópica. Embora esta técnica preserve a integridade celular e apresente uma boa distribuição das células, por norma, apresenta uma fraca celularidade total, o que pode revelar-se insuficiente para o diagnóstico (Dewhurst *et al.*, 2012; Featherstone & Heinrich, 2013).

A espátula de Kimura e a parte romba do bisturi permite a recolha de uma boa quantidade de células, porém fraca distribuição e integridade celular, aparecendo estas agrupadas e, por vezes, com extrusão do conteúdo celular (Willis *et al.*, 1997). O seu uso tem, também, associado um aumento do risco de traumas (Bauer *et al.*, 1996).

A escova de citologia representa, atualmente, o melhor método de recolha para citologias conjuntivais, uma vez que apresenta um baixo perigo iatrogénico, é pouco dispendiosa e de fácil utilização. Apresenta bons resultados tanto a nível da quantidade de células recolhidas, da sua integridade e distribuição ao longo da lâmina (menor sobreposição celular, o que facilita a identificação de corpos de inclusão). A escova de

citologia permite, também, a obtenção de células de camadas mais profundas, relativamente à zaragatoa (Bauer *et al.*, 1996; Willis *et al.*, 1997).

1.4.1.2. Colorações

Após a elaboração do esfregaço, este deve ser corado com Giemsa, May-Grunwald Giemsa, Diff-Quick, Romanowsky ou Papanicolau, para posterior pesquisa de corpos de inclusão (Ramsey, 2000; Gould, 2001; Volopich *et al.*, 2005; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

1.4.1.3. Citologia conjuntival normal

Na citologia conjuntival normal, observam-se camadas de células epiteliais (colunares e escamosas) e, ocasionalmente, a presença de bactérias (Lavach *et al.*, 1977; Turner, 2010). É, também, comum o aparecimento de cordões amorfos basofílicos, que correspondem a muco (Raskin, 2016).

As células epiteliais normais podem ter distintas apresentações consoante a sua origem e profundidade. As células do epitélio conjuntival palpebral apresentam um núcleo homogéneo, redondo e grande, e citoplasma abundante; as células das camadas mais profundas (imaturas, na camada basal) apresentam-se com uma morfologia que diverge entre o redondo e o cilíndrico, passando a poliédricas, na camada intermédia e, por fim, apresentando-se achatadas, na camada superficial, exposta. É, também, comum, em todo o epitélio conjuntival palpebral, a existência de células globosas, de aparência distendida, núcleo excêntrico (por vezes deslocado e comprimido), com citoplasma que pode conter grânulos vermelho-azulados e/ou vacúolos claros (Lavach *et al.*, 1977; Bolzan *et al.*, 2005; Raskin, 2016). Por outro lado, o epitélio conjuntival bulbar não apresenta células globosas; trata-se de um epitélio escamoso estratificado e, por essa razão, é comum que as células escamosas estejam em maior quantidade do que as células colunares. É, também, frequente a presença de grânulos de melanina, finos, de cor verde-escura, tanto extracelulares como intracelulares (Bolzan *et al.*, 2005; Venancio *et al.*, 2012; Young, 2014). Importa, ainda, referir que a região do fórnix é composta por um epitélio cuboidal estratificado contendo células globosas. É comum a presença de algumas células linfoides nesta região, pois a sua lâmina própria contém tecido linfoide (Streeten & Streeten, 1985; Jégou & Liotet, 1991; Bolzan *et al.*, 2005).

Observam-se, frequentemente, basófilos e eosinófilos, sendo a observação de neutrófilos, monócitos, linfócitos e células plasmáticas pouco comum (Lavach *et al.*, 1977;

Murph, 1988; Jégou & Liotet, 1991; Willis *et al.*, 1997; Brandão *et al.*, 2002; Bolzan *et al.*, 2005; Honscho *et al.*, 2012).

1.4.1.4. Achados citológicos na infecção por *Chlamydomphila felis*

A citologia conjuntival representa um dos métodos de diagnóstico de *Chlamydomphila felis*, através da visualização de inclusões características (Hillstrom *et al.*, 2012).

Podem ser identificados corpos de inclusão intraplasmocitários basofílicos dentro das células epiteliais, arredondadas, com diâmetro mínimo de 3 µm, por norma adjacentes ao núcleo (figura 2). Estas inclusões podem ter distintas apresentações, variando entre uma apresentação finamente granular a granular, porém mais grosseira, interpretada como um aglomerado de corpos elementares, assemelhando-se ao corpo reticulado. Estes corpos podem ser visualizados entre os sete e os 14 dias após a infecção (Ramsey, 2000; Rand, 2006; Hillstrom *et al.*, 2012). Após este período, o número de corpos de inclusão tende a diminuir, o que torna mais provável a existência de resultados falso negativos (Nasisse *et al.*, 1993; Ramsey, 2000).

Inicialmente é comum existir uma predominância de neutrófilos; porém, a partir dos 14-21 dias após a infecção, também é comum a existência de macrófagos e linfócitos (Hoover *et al.*, 1978; Ramsey, 2000; Sykes, 2005). Hillstrom *et al.* (2012), descreveram inflamação moderada a grave em animais com infecção por *C.felis*. Neste estudo, 37,5% apresentaram inflamação neutrofílica, 37,5% inflamação linfocítica e 25% apresentavam uma inflamação mista. Noutro estudo, foi descrito que a ausência de inflamação torna a infecção por *C.felis* improvável (von Bomhard *et al.*, 2003).

A citologia conjuntival não representa o método de diagnóstico mais fiável para *C.felis*, pois as inclusões só são visíveis no início da infecção, podendo, inclusive, nunca serem observadas. Ao já descrito, acresce, ainda, o facto de as inclusões poderem ser confundidas com grânulos de melanina, bactérias, inclusões induzidas por alguns medicamentos, ou até pela extrusão de conteúdo nuclear, aquando da recolha/distribuição de células na lâmina. Assim, de modo a evitar resultados falso positivos, a citologia só deve ser considerada positiva quando é possível visualizar um elevado número de inclusões típicas (Lavach *et al.*, 1977; Streeten *et al.*, 1985; Willis *et al.*, 1997; Von Bomhard *et al.*, 2003; Hillstrom *et al.*, 2012).

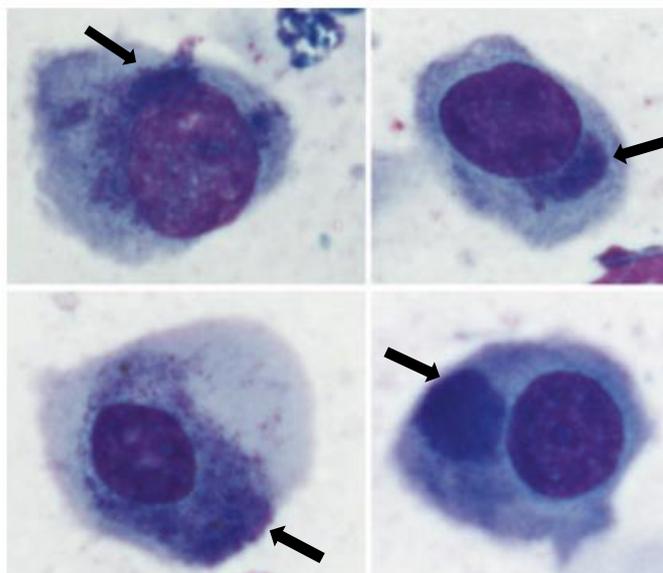


Figura 2 – Inclusões sugestivas de infecção por *Chlamydia felis* (Hillstrom *et al.*, 2012)

1.4.1.5. Achados citológicos na infecção por *Mycoplasma felis*

A citologia conjuntival é um método de diagnóstico muito pouco fidedigno para a infecção por *M.felis*, pois origina muitos resultados falso negativos (Hillstrom *et al.*, 2012). Tal como no diagnóstico de *C.felis*, a observação das lâminas deve ser realizada de forma cuidadosa, de modo a não confundir artefactos com inclusões, evitando, assim, a obtenção de resultados falso positivos (Hillstrom *et al.*, 2012).

À observação microscópica, *M. felis* tem a aparência de cocos ou cocobacilos agrupados, na periferia das células (figura 3). Comparativamente aos corpos de inclusão de *C.felis*, são menos basofílicos e menos granulares. A inflamação é, com frequência, caracterizada como neutrofílica e varia de moderada a grave. Linfócitos e eosinófilos são incomuns neste tipo de infecção (Hillstrom *et al.*, 2012).

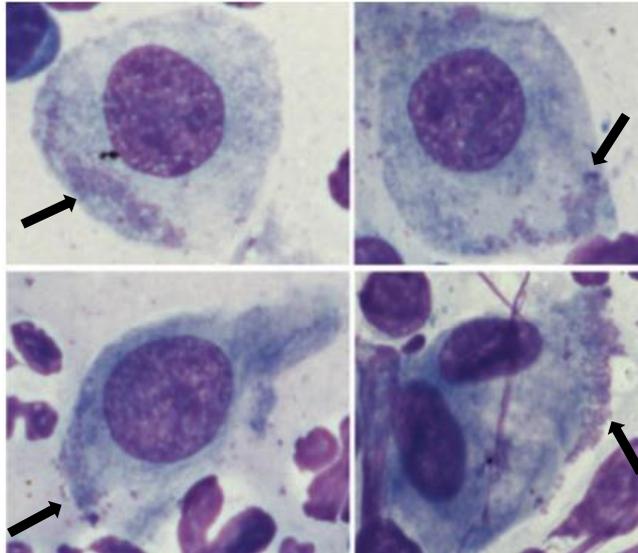


Figura 3 – Inclusões compatíveis com o diagnóstico de *Mycoplasma felis* (Hillstrom *et al.*, 2012).

1.4.1.6. Achados citológicos na infecção por Herpesvirus Felino tipo-1

Neste tipo de infecções podem visualizar-se inclusões virais intranucleares, utilizando a coloração de May-Grunwald Giemsa (também conhecida como Pappenheim) (figura 4). Contudo, a visualização destas inclusões é muito pouco comum, tornando a citologia um método de diagnóstico inadequado para infecções por FHV-1 (Volopich *et al.*, 2005; Hillstrom *et al.*, 2012).

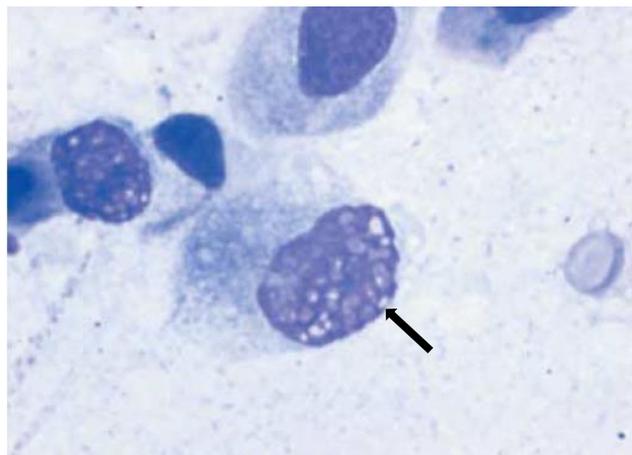


Figura 4 – Exemplo de inclusões intranucleares suspeitas de FHV-1 (Volopich *et al.*, 2005).

1.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase

A reação de PCR, consiste na amplificação exponencial de fragmentos específicos de DNA, permitindo a sua deteção, mesmo quando presente em pequena quantidade. Esta técnica apresenta uma elevada especificidade e sensibilidade (Dewhurst *et al.*, 2012).

A alta sensibilidade e especificidade da PCR, faz com que esta seja, actualmente, considerada a técnica de eleição para deteção de FHV-1, *C.felis* e *M. felis* (McDonald *et al.*, 1998; Sykes *et al.*, 1999b; Ramsey, 2000; Sjö Dahl-Essén *et al.*, 2008; Gould, 2011; Lee-Fowler, 2014).

Esta técnica é mais rápida e menos dispendiosa comparativamente ao Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA, do inglês “Enzyme-Linked Immunossorbent Assay”) e a imunofluorescência (Burgesser *et al.*, 1999; Rampazzo *et al.*, 2003; Sykes, 2005; Lee-Fowler, 2014). Tem, também, como vantagens não necessitar que o agente infeccioso se encontre viável e a deteção de pequenas quantidades de DNA (McDonald *et al.*, 1998; Sykes *et al.*, 1999a).

Outra vantagem desta técnica prende-se com o facto de permitir a colheita da amostra após o uso de fluoresceína, pois esta não influencia a sensibilidade do teste. O teste de fluoresceína é, frequentemente, utilizado no exame oftalmológico, pois permite a visualização de úlceras da córnea (Segarra *et al.*, 2011).

No caso de doenças infecciosas, existe um risco aumentado de contaminações e de resultados falso positivos, uma vez que, devido à elevada sensibilidade deste teste, segmentos muito pequenos de DNA, clinicamente insignificantes, são amplificados exponencialmente. Isso pode levar a problemas na interpretação dos resultados do teste para algumas doenças, em particular na infeção por FHV-1. Esta contaminação pode ocorrer tanto antes da submissão da amostra como após a apresentação ao laboratório (Sykes, 2005; Dewhurst *et al.*, 2012).

1.5. **Infeção por *Chlamydomphila felis***

1.5.1. Etiologia e epidemiologia

Chlamydomphila felis é uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória, pertencente à ordem *Chlamydiales* e à família *Chlamydeaceae*, que apresenta distribuição ubíqua, não tendo preferências geográficas, ambientais nem regionais (Everett *et al.*, 1999; Sykes *et al.*, 1999b; Azuma *et al.*, 2006; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

Chlamydomphila felis é causa frequente de conjuntivite felina, onde o envolvimento corneal é muito raro. Tanto gatos jovens (geralmente com mais de quatro semanas de idade) como adultos podem ser afetados, podendo a conjuntivite ser aguda ou crónica, uni ou bilateral (Turner, 2010b).

Os animais infectados por *C.felis* têm, por norma, idades inferiores a cinco anos, sendo o intervalo de idades em que a infeção aparece com mais frequência entre os dois e os nove meses. Embora até aos dois meses os animais se encontrem protegidos pelos anticorpos maternos, encontra-se também descrito que é comum a infeção a partir das cinco semanas (Wills, 1986; Wills *et al.*, 1988; Sykes *et al.*, 1999a; Ramsey, 2000; von Bomhard *et al.*, 2003; Sykes, 2005).

As infeções neonatais são raras, o que, em conjunto com a presença pouco comum de sinais respiratórios e corneais, diferencia este quadro do da infeção por FHV-1. Quando não é tratada, a infeção pode prolongar-se durante semanas ou meses observando-se, nalguns animais, a conjuntiva hiperémica com secreção ocular persistente e espessamento crónico. A combinação entre infeções repetidas, a imunidade de curta duração e o estado do portador (com o agente remanescente no trato gastrointestinal), explicam a natureza recorrente da conjuntivite em alguns gatos. Em casas nas quais convivam vários gatos ou em gatis, aconselha-se, antes de vacinar, que se realize a identificação por PCR dos portadores e que estes sejam isolados (Turner, 2010b). Gatos que coabitam com outros gatos, são infectados com maior frequência (Hanselaer *et al.*, 1989).

Esta infeção é mais comum em ambientes com muitos gatos, particularmente em gatis e criadores, o que faz com que a infeção seja mais provável em gatos de raça (Wills *et al.*, 1987). Porém, tem sido documentada uma alta prevalência em animais de rua, principalmente em animais que apresentam conjuntivite (Halanova *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013).

No Japão, num estudo seroepidemiológico foi demonstrado que *C.felis* é extensamente difundido entre gatos, apresentando taxas de prevalência de anticorpos de 50% para gatos de rua e de 20% para gatos domésticos. No mesmo estudo, foi, ainda, descrita a presença de anticorpos em 1,7% da população humana estudada e em 8,8% dos veterinários em clínicas japonesas de pequenos animais (Yan *et al.*, 2000). Outros estudos serológicos mostraram que, pelo menos, 10% de animais *indoor*, não vacinados, apresentam anticorpos para *C. felis* (Lang, 1992; Gunn-Moore *et al.*, 1995).

Em diversos estudos epidemiológicos foram descritas, em animais que apresentavam conjuntivite, prevalências deste agente patogénico entre 3,12% e 30% (Shewen *et al.*, 1980; Wills *et al.*, 1988; Hanselaer *et al.*, 1989; Gruffydd-Jones *et al.*, 1995; Iwamoto *et al.*, 2001; Rampazzo *et al.*, 2003; Low *et al.*, 2007; Baumworcel *et al.*, 2017; Fernandez *et al.*, 2017), sendo particularmente comum nos que apresentavam conjuntivites crónicas (Wills *et al.*, 1988; Fernandez *et al.*, 2017). Estes estudos recorrem a diferentes técnicas complementares de diagnóstico, pelo que os resultados obtidos devem ser analisados cautelosamente.

Em estudos realizados através da técnica de PCR, 12-20 % dos gatos com sinais de doença ocular ou do trato respiratório superior foram positivos para *C.felis*. Em gatos sem sinais clínicos, a prevalência da mesma foi inferior a 2% (Di Francesco *et al.*, 2004). Segundo diversos autores, que utilizaram mesma técnica, a prevalência de *C.felis* em gatos assintomáticos situa-se nos 5%, o que é considerado um valor baixo (Sykes *et al.*, 1999a; Rampazzo *et al.*, 2003; Von Bomhard *et al.*, 2003; Di Francesco *et al.*, 2004).

Foi, também, estudada a prevalência deste agente em vários Países. Todos estes estudos foram realizados através de zaragatoas oculares e utilizaram a técnica da PCR. Os resultados foram os seguintes: 14,3% na Austrália, em gatos com sinais de DTRS (Sykes *et al.*, 1999a); 17,7% no Reino Unido, em gatos com sinais oculares (McDonald *et al.*, 1998); 20% em Itália, em gatos com conjuntivite (Rampazzo *et al.*, 2003) e 11,5% na Suíça, em gatos com sinais oculares (Von Bomhard *et al.*, 2003).

Não existe qualquer evidência de predisposição quer racial, quer de sexo para *C.felis* (Sykes, 2005).

Embora isolado com pouca frequência em gatos clinicamente saudáveis, considera-se que *C.felis* faz parte da flora comensal da conjuntiva em gatos (Ramsey, 2000).

1.5.2. Patogenia

Como *C.felis* não se consegue replicar e sobreviver de forma autónoma fora do hospedeiro, a sua transmissão requer um contacto próximo entre animais, sendo que as secreções oculares constituem a principal forma de infeção (Ramsey, 2000; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

Uma vez que esta infeção raramente causa sinais adjacentes ao trato respiratório superior, e dado o pequeno volume corrente de secreções em gatos, o aerossol tem pouco significado enquanto via direta de transmissão. Porém, a possível existência de fómites deve ser tida em consideração como um potencial meio de transmissão (Ramsey, 2000).

O ciclo de vida de *C. felis* possui fases intracelulares e extracelulares e tem início com o corpo elementar (CE), que é considerado a forma extracelular infecciosa. Este mede entre 0,2 a 0,4 µm de diâmetro e tem a capacidade de sobreviver no ambiente, à temperatura ambiente, durante um período de até uma semana (Greene, 1998). O CE entra na célula hospedeira por endocitose, formando um fagossoma. O corpo elementar dentro do fagossoma perde a parede celular e cresce de forma rápida, formando um corpo inicial que apresenta um diâmetro de 0,5 a 1,5 µm. O corpo inicial (CI) é uma forma reprodutiva e não é infecciosa. O CI multiplica-se dentro do fagossoma, através de fissão binária, seguida por um período de rápido crescimento, formando, por fim, uma estrutura grande chamada corpo

reticulado. O corpo reticulado não é mais do que uma população grande e metabolicamente ativa que se encontra ligada à membrana de corpos iniciais que se estão a diferenciar e a amadurecer de forma a originar corpos elementares infecciosos. O corpo reticulado continua a aumentar até que a membrana se rompa, libertando, assim, os novos corpos elementares livres, capazes de infetar novas células. Este ciclo tem uma duração entre 40 a 48 horas, sendo que os corpos elementares podem ser facilmente inativados, utilizando detergentes e solventes lipídicos (Ramsey, 2000; Sykes, 2005).

A excreção pela conjuntiva termina, geralmente, cerca de 60 dias após a infeção; porém, podem desenvolver-se infeções persistentes (O'Dair *et al.*, 1994). Apesar de a excreção terminar, é possível isolar *C.felis* em gatos não tratados, até 215 dias após a infeção (Wills, 1986).

C. felis tem como alvo as mucosas, nomeadamente as células epiteliais da conjuntiva e apresenta um período de incubação de dois a cinco dias. Inicialmente, tem uma apresentação unilateral, porém os sinais clínicos rapidamente atingem ambos os olhos (Sykes, 2005; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009). A infeção tende a seguir um curso crónico e insidioso, resultando, frequentemente, em estados assintomáticos (Sykes, 2005).

A excreção retal e vaginal prolongada por parte de gatos com conjuntivite por *C.felis*, sugere que os tratos gastrintestinais e reprodutivos podem ser locais de infeção persistente (Wills, 1986). Estudos mostraram possível isolar *C.felis* através dos pulmões, baço, fígado, rins e peritoneu; porém, ainda não se encontra clarificado o significado destas infeções (Baker, 1944; Dickie & Sniff, 1980; Hoover, 1980; Masubuchi *et al.*, 2002).

1.5.3. Manifestações clínicas

A infeção por *C.felis* tem um período de incubação de três a 14 dias (Ramsey, 2000), sendo caracterizada por uma conjuntivite intensa, de apresentação unilateral. As manifestações no outro olho só aparecem cinco a 21 dias mais tarde. A gravidade da inflamação pode variar entre os dois olhos e, ainda, ser acompanhada por alguns sinais de infeção do trato respiratório superior, tais como espirros, tosse e secreção nasal (Hoover *et al.*, 1978; Wills & Gaskell, 1985; Gaillard *et al.*, 1984; Whitley *et al.*, 1993; O'Dair *et al.*, 1994; Ramsey, 2000). A infeção por *C.felis* não deve ser tida como primeiro diagnóstico diferencial em gatos que não apresentam conjuntivite (Sykes *et al.*, 1999b).

C.felis é, também, responsável por pneumonias em gatos (Cai *et al.*, 2002). Animais que apresentam conjuntivite causada por esta infeção raramente apresentam sinais do trato respiratório superior; nestes casos, a probabilidade de o agente etiológico ser FHV-1 é 2,2 vezes superior (Wills *et al.*, 1984; Sykes *et al.*, 1999b; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

Blefarospasmo, corrimento ocular seroso (que tende a tornar-se mucopurulento ou mucoide), quemose acentuada, hiperemia e desconforto ocular são as manifestações oculares mais comuns em infeções por *C.felis* (Hoover *et al.*, 1978; Wills & Gaskell, 1985; Ramsey, 2000; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

Pensa-se que a infeção por *C.felis* possa estar associada a problemas a nível reprodutor (abortos, mortalidade neonatal e infertilidade); porém, esta ligação ainda não se encontra comprovada (Pointon *et al.*, 1991; Sykes *et al.*, 1999b).

Embora a maior parte dos animais infetados permaneça bem, alguns podem apresentar episódios de piroxia transitória, perda de peso e inapetência (Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos tendem a desaparecer após algumas semanas; porém, o animal pode apresentar uma conjuntivite moderada durante meses. Embora possa existir corrimento nasal em animais infetados por *C.felis*, quando este não é acompanhado por qualquer tipo de sinal a nível ocular, torna-se pouco provável que o agente etiológico seja *C.felis* (Sykes *et al.*, 1999a).

Quando se trata de uma infeção ligeira, esta tende a regredir de forma espontânea entre duas a seis semanas, em gatos jovens, e em menos de duas semanas em gatos de maior idade (Petersen, 1988).

1.5.4. Diagnóstico

Existem diferentes métodos de diagnóstico para *C.felis*: i) PCR, que deteta o DNA do agente em estudo; ii) citologia conjuntival, que deteta as inclusões causadas pelo agente; iii) isolamento do agente, por cultura celular; iv) Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA, do inglês “Enzyme-Linked Immunossorbent Assay”), que pesquisa de anticorpos ou antigénio e v) imunofluorescência indireta, que deteta anticorpos. A deteção de anticorpos por ELISA ou imunofluorescência, apenas pode ser realizada em animais não vacinados, pois estas técnicas não permitem diferenciar a origem dos anticorpos (Sykes, 2005).

A cultura celular mostra-se ineficiente para diagnósticos de rotina, por ser morosa e apresentar baixa sensibilidade, comparativamente a outras técnicas, como a PCR. Outra desvantagem desta técnica, prende-se com o facto de o microorganismo ter de estar viável, infeccioso e capaz de proliferar. Além do anteriormente referido, a contaminação com fungos ou bactérias, como por exemplo *Mycoplasma felis*, pode comprometer o crescimento das culturas e, conseqüentemente, o resultado do teste (McDonald *et al.*, 1998; Sibitz *et al.*, 2011). A recolha das amostras deve fazer-se no início do exame oftalmológico, antes da

aplicação de anestésicos. Esta técnica permite a realização do antibiograma, útil na escolha do antibiótico a usar.

Outro método de diagnóstico é a PCR, tanto na sua vertente convencional como em tempo real. Ambas constituem um método prático e eficiente, pois detetam o DNA do microrganismo em questão. A PCR em tempo real é mais sensível do que a PCR convencional e permite, além da detecção, a quantificação de DNA de microrganismos (Everett *et al.*, 1999). Este diagnóstico é possível através da detecção dos genes *ompA*, *omp2*, *MOMP* (genes que codificam proteínas de membrana) e dos genes que codificam as subunidades 16S e 23S do RNA (ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic Acid”) ribossômico (Sachse *et al.*, 2009). Não existe diferença significativa na detecção de *C.felis* consoante o local da recolha, mas sim na quantidade de amostra recolhida (Schulz *et al.*, 2015).

Em gatos com conjuntivite crónica, a probabilidade de o animal apresentar um resultado positivo para *C. felis* é baixa, tanto por PCR, como por citologia ou por imunofluorescência (Nasisse *et al.*, 1993).

Além de isolado a partir de amostras provenientes da conjuntiva ou do trato respiratório superior, este agente foi, também, isolado a partir de amostras provenientes do estômago, fígado, baço, pulmão e rins de gatos infetados experiencialmente (Gaillard *et al.*, 1984; Masubuchi *et al.*, 2002).

1.5.5. Prevenção

O contacto com outros animais infetados deve ser evitado, devendo ser mantidas as medidas de higiene de rotina, de modo a minimizar a possibilidade de infeção por fómites, evitando infeções cruzadas (Ramsey, 2000).

A vacinação contra a *C. felis* não faz parte do grupo das vacinas *core*. Esta deve ser ponderada no caso de gatos que convivem com outros gatos e/ou quando existe um historial de surto de Clamidiose no local onde estes residem, especialmente em gatos pertencentes a associações ou a criadores. Animais imunocomprometidos e animais com sinais clínicos, apenas devem ser vacinados com vacinas inativadas e em caso de necessidade extrema. O programa de vacinação deve ser iniciado entre as oito e as dez semanas de idade e deve existir um reforço três a quatro semanas mais tarde. Daí em diante, o reforço deverá ser administrado anualmente (Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

De referir que a vacinação confere uma redução da gravidade dos sinais clínicos, mas não impede a infeção, nem o surgimento de quaisquer sinais clínicos (Wills *et al.*, 1987; Sykes, 2005).

1.5.6. Tratamento

O tratamento desta infecção passa pelo uso de antibióticos. A sua utilização sistêmica revelou-se mais eficaz do que a sua aplicação local, sendo que os mais indicados são as tetraciclina (Sparkes, *et al.*, 1999; Déan *et al.*, 2005).

A doxiciclina é o tratamento de primeira escolha (Owen *et al.*, 2003). Está recomendada a sua administração por via oral, de 12 em 12 horas, 5mg/kg, durante três semanas (Sykes *et al.*, 1999b); porém, esta pode, também, ser administrada apenas uma vez ao dia, por via oral, numa dose de 10mg/Kg, durante quatro semanas. Se os sinais clínicos se mantiverem é recomendado continuar o tratamento por mais duas semanas (Déan *et al.*, 2005). Quando administradas em gatos jovens, as tetraciclina podem ter efeitos adversos, sendo estes mais frequentes aquando da utilização de oxitetraciclina, comparativamente à doxiciclina. A utilização de fluoroquinolonas ou uma associação de ácido clavulânico e amoxicilina, durante quatro semanas, pode representar uma escolha mais segura para gatos muito jovens (Sturgess *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2008). Com vista a minimizar o risco de esofagite, deve ser administrado um bolus de água, com o auxílio de uma seringa, após a administração do comprimido.

Como terapêutica tópica, é utilizado o colírio de clortetraciclina, quatro vezes por dia, durante várias semanas, tendo atenção, pois estão descritos vários episódios de hipersensibilidade a este fármaco. Outro medicamento tópico indicado neste caso é o ácido fusídico; porém, não em doses terapêuticas. Este pode ser administrado em conjunto com a medicação oral ou quando se suspeita de uma infecção bacteriana secundária. O uso de agentes anti-inflamatórios tópicos encontra-se contraindicado. Também a oxitetraciclina e a combinação de amoxicilina com ácido clavulânico, são escolhas válidas no que diz respeito a antibioterapia sistêmica (Turner, 2010b).

Alguns autores sugerem, também, a combinação entre a terapêutica sistêmica com pomadas tópicas de tetraciclina, com aplicação a cada 6/8 horas (Gaskell & Bennett, 1996).

A duração do tratamento pode variar de animal para animal, sendo que em animais jovens pode ter uma duração entre seis a oito semanas. Independentemente da duração do tratamento, aconselha-se a continuação da terapêutica durante duas semanas, após o desaparecimento dos sinais clínicos (Gruffydd-Jones *et al.*, 1995).

1.5.7. Potencial zoonótico

Embora a infecção raramente seja detetada em humanos, existem alguns casos documentados que mostram o potencial zoonótico de *C. felis*. Estes relatam que a infecção

pode envolver não só o olho, mas também o coração, rins e o trato respiratório (Yan *et al.*, 2000; Hartley *et al.*, 2001; Azuma *et al.*, 2006; Sibitz *et al.*, 2011).

1.6. Infecção por Herpesvírus Felino tipo 1

1.6.1. Etiologia e epidemiologia

O Herpesvírus felino tipo 1 é um membro da subfamília *Alphaherpesvirinae*. Os vírus desta subfamília caracterizam-se por serem vírus de DNA em cadeia dupla, com um curto ciclo de replicação, tendência para induzir a lise celular, rápida disseminação “célula-a-célula” e pela sua persistência nos gânglios sensitivos do hospedeiro. Clinicamente, estes tendem a causar uma reação lítica aguda seguida de períodos de latência e, posteriormente, recidivas intermitentes (Gould, 2011).

Estudos serológicos mostraram que o FHV-1 se encontra disperso por todo o Mundo, sem distribuição geográfica específica, com taxas de exposição de animais ao vírus de até 97% (Maggs, *et al.*, 1999b). Esta infecção é caracterizada por baixa mortalidade, mas elevada morbidade (Stiles, 2003).

Após a exposição ao agente, mais de 80% dos gatos ficam permanentemente infetados, tornando-se portadores e, de entre esses, 45% irão excretar o vírus, aquando da reativação da infecção latente. Esta reativação pode dar-se espontaneamente ou em consequência de situações de *stress*, como a presença de novos gatos no seu território, trabalhos de construção em casa, outras doenças, anestésias, imunossupressão, parto e lactação, administração de fármacos como corticoides ou, até mesmo, o *stress* associado ao tratamento, pelo que é importante encontrar um equilíbrio entre o tratamento ideal da doença, o temperamento do gato e a gravidade dos sintomas. A reativação do vírus latente pode ter como consequência uma conjuntivite crónica ou outras sequelas, por vezes de maior gravidade, como a ulceração corneal, a queratite estromal, o simbléfaro, a queratoconjuntivite seca, a formação de sequestros e a epífora crónica (devida à oclusão dos pontos lacrimais) (Gaskell & Povey, 1977; Stiles, 2003; Turner, 2010b).

Gatos com infecção primária e/ou doença do trato respiratório superior, têm maior carga viral nas secreções e, por essa razão, têm maior probabilidade de transmitir a doença (Stiles, 2003). Notar, também, que a probabilidade de o vírus ser transmitido aumenta em casos de superlotação, como por exemplo em abrigos e gatis (Stiles, 2003).

O FHV-1 é transmitido a gatos que se encontram suscetíveis, através de contacto próximo e da transmissão de fluidos corporais, nomeadamente secreções oculares e respiratórias, por meio de espirros, fómites e condições de higiene inadequadas (Stiles,

2000; Stiles, 2003). É importante que tudo o que contacta com animais doentes seja desinfetado, de modo a que não existam fómites (Stiles, 2003).

Gatos recém-nascidos, são mais suscetíveis à infeção primária, em particular aos dois meses de idade, quando os anticorpos maternos diminuem (Stiles, 2003; Gould, 2011).

O período de incubação varia entre dois a dez dias, podendo variar em função da quantidade de vírus presente e da sua patogenicidade. A fase aguda da doença tem uma duração de aproximadamente duas semanas (Turner, 2010b).

Os locais onde primariamente se desencadeia a replicação viral, são os tecidos epiteliais, incluindo a conjuntiva, amígdalas e o epitélio da córnea, nasal e faríngeo. Após invadir as células, o vírus replica-se, levando à rutura da célula, causando um efeito citopático, que origina erosão das camadas epiteliais superficiais e uma resposta inflamatória, por vezes agravada pela invasão de bactérias (Gaskell & Povey, 1979; Nasisse *et al.*, 1989b; Stiles, 2003).

Os alfa-herpesvírus desenvolvem latência neuronal, latência essa que representa uma fase quiescente, não replicativa, durante a qual a doença está clinicamente ausente. O gânglio trigémio é um local de latência do FHV-1 e a reativação do vírus neste gânglio, seguida do seu trajeto pelas vias nervosas oculares, está documentada como meio de ação da doença, a nível ocular. Porém, é também sabido que o vírus, quando alojado dentro do próprio olho, pode ter um papel ainda mais significativo no desenvolvimento clínico da doença (Gaskell *et al.*, 1985; Stiles, 2003). Um elevado número de animais clinicamente saudáveis, possui DNA de FHV-1, na conjuntiva e na córnea (Stiles *et al.*, 1997a).

Gatos recém-nascidos com infeção primária por FHV-1, tendem a recuperar dentro de dez a 21 dias (Stiles, 2003).

O FHV-1 é relativamente instável no ambiente, persistindo por um período máximo de 18 horas (que diminui em ambiente seco), sendo suscetível à maioria dos detergentes, antissépticos e desinfetantes (Stiles, 2000; Stiles, 2003).

Estudos apontam para uma predisposição três vezes superior por parte de machos inteiros para a infeção por FHV-1 e para a DTRS (Binns *et al.*, 2000; Dinnage *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2017).

1.6.2. Manifestações clínicas

O FVH-1 é a maior causa de conjuntivite crónica e aguda (Nasisse *et al.*, 1993). Os sinais clínicos causados pela infeção por FHV-1 tendem a variar consoante a fase da infeção, a idade do animal, a exposição ao vírus, o estado imunológico do animal e a suscetibilidade individual (Stiles, 2003).

A infecção primária tende a ser mais frequente entre as duas semanas e os seis meses de vida. Entre as duas e as quatro semanas de vida, os sinais clínicos mais frequentes são, letargia, inapetência, pirexia, sinais secundários à doença do trato respiratório superior (como espirros, corrimento nasal, tosse, traqueíte, broncopneumonia e rinite), conjuntivite bilateral grave (com hiperemia, quemose e secreção ocular serosa ou purulenta abundante), ulceração corneal grave, formação de simbléfaro e oftalmia neonatal. É nesta idade que a infecção se revela potencialmente mortal. Entre os três e os seis meses de idade, continuam presentes os sinais de doença do trato respiratório superior e de conjuntivite bilateral; no entanto, a ulceração corneal tende a ser leve a moderada e, por norma, estes sinais tendem a mostrar melhorias ao fim de dez a 14 dias (Nasisse *et al.*, 1989b; Stiles, 2003; Turner 2010b; Gould, 2011).

Os animais com idades superiores a seis meses, tendem a apresentar infecções secundárias ou recorrências, com sinais clínicos distintos das infecções primárias. Os sinais clínicos mais comuns são conjuntivite e epífora crônicas, queratite estromal, ulceração frequente, formação de sequestros e queratoconjuntivite seca. A conjuntivite tende a ser, em primeira instância, unilateral, tornando-se mais tarde bilateral. Já os sinais respiratórios são mínimos e os sinais oculares tendem a ter, maioritariamente, uma apresentação unilateral (Nasisse *et al.*, 1989b; Morgan 1994; Morgan *et al.*, 1996; Stiles, 1995; Nasisse *et al.*, 1998; Allgoewer *et al.*, 2001; Turner, 2010b; Stiles, 2013). A queratite pode manifestar-se sobre três apresentações: ulceração dendrítica, ulceração corneal geográfica e queratite estromal crônica.

A ulceração dendrítica é considerada patognomónica da infecção por FHV-1 (Nasisse *et al.*, 1989b). A infecção das células epiteliais da córnea, em infecções primárias agudas, leva à ulceração corneal, que pode ser detectada através da coloração com fluoresceína e Rosa de Bengala (Gould, 2011). A ulceração corneal geográfica manifesta-se por grandes áreas de ulceração corneal. Após múltiplos surtos de doença recrudescente ou de períodos de ulceração crônica, desenvolve-se queratite estromal crônica, isto é, o estroma da córnea desenvolve alterações inflamatórias crônicas, como neovascularização, infiltração de células inflamatórias, pigmentação, cicatrização e fibrose (Nasisse *et al.*, 1995).

Dermatite periocular e uveíte anterior estão, também, descritas como manifestações clínicas de infecção por FHV-1 (Hargis *et al.*, 1999; Maggs, *et al.*, 1999a).

Embora, por norma, o vírus provoque, sobretudo, alterações a nível do trato respiratório superior e a nível ocular, por vezes, também invade os pulmões, levando a pneumonias virais e bacterianas por sobreinfecção secundária (Stiles, 2003). Além destes

locais, o vírus também já foi isolado no cérebro, fígado e baço de gatos (Gaskell & Poverly, 1979; Fulton *et al.*, 1980).

1.6.3. Diagnóstico

O diagnóstico de FHV-1 pode, muitas vezes, ser baseado apenas em sinais clínicos, dado que, geralmente, a infecção primária produz sinais clínicos característicos, como espirros recorrentes e úlceras na córnea. Além disso, não existe nenhum teste com valor diagnóstico suficiente para afirmar que a causa primária da infecção é o FHV-1, uma vez que este foi isolado, diversas vezes, em animais saudáveis. Devido à sua natureza, um teste negativo não exclui a infecção por FHV-1 (Stiles *et al.*, 1997b; Stiles, 2003).

Quando a principal suspeita se trata de uma conjuntivite por FHV-1 com a presença de úlceras na córnea, é preferível a utilização do corante Rosa de Bengala em vez de fluoresceína, já que o primeiro cora as zonas do epitélio corneal desvitalizado, que se manifestam como úlceras dendríticas, patognomónicas de FHV-1, que raramente coram apenas com fluoresceína (Turner, 2010b).

Existem três métodos de diagnóstico indicados para FHV-1 sendo eles a imunofluorescência, o isolamento vírico e a PCR. O teste de imunofluorescência é realizado em tecido conjuntivo ou córneo e deteta a presença de anticorpos. Este método caiu em desuso face ao isolamento vírico e à PCR (Gould, 2011). O isolamento vírico identifica, apenas, vírus vivos, o que o torna muito útil no diagnóstico da infecção ativa (Gould, 2011). São colhidas zaragatoas da superfície da córnea ou da conjuntiva, preferencialmente sem a utilização prévia de anestésicos tópicos, uma vez que estes diminuem a sensibilidade do teste (Storey *et al.*, 2002). Este teste tem como desvantagem o facto de ser mais demorado e menos sensível do que a PCR (Stiles *et al.*, 1997a). Contrariamente ao que acontece no isolamento vírico, na PCR, as zaragatoas, não necessitam de meio de transporte. Estas podem ser recolhidas tanto da superfície conjuntival, como da superfície da córnea, pela técnica de raspagem conjuntival ou zaragatoas orofaringeas. Embora não exista evidência de que a aplicação de anestésicos tópicos ou de fluoresceína possa ter influência nos resultados, um estudo sobre o diagnóstico de herpes vírus em humanos, mostrou que ambos reduzem significativamente a sensibilidade da PCR em tempo real (Goldschmidt *et al.*, 2006).

A PCR amplifica sequências específicas de DNA viral, o que o torna um teste muito específico e sensível. Existem vários protocolos para o diagnóstico de FHV-1, que incluem não só a PCR convencional, como também a PCR *nested* e a PCR em tempo real (Hara *et al.*, 1996; Stiles *et al.*, 1997a; Helps *et al.*, 2003; Macías & Navarro, 2018). A PCR *nested* é a técnica mais específica, tendo sido estimado que, para a deteção de FHV-1, é dez vezes

mais específica do que a PCR convencional (Stiles *et al.*, 1997a). A PCR em tempo real, além de detetar o agente, permite inferir sobre o estado da infeção, sendo que um maior número de cópias de DNA viral sugere uma infeção ativa e um número menor sugere uma infeção em estado latente (Macías & Navarro, 2018). Devido à sua grande sensibilidade, as PCR *nested* e em tempo real acarretam maior risco de contaminações (Volopich *et al.*, 2005). É de notar que a PCR é mais sensível que o isolamento vírico ou anticorpo fluorescente no diagnóstico de conjuntivites agudas e crónicas, pois deteta a presença de DNA viral, mesmo que em pouca quantidade, com especial importância no caso de recorrências (Stiles, 2003). Não existe diferença significativa na deteção de FHV-1 consoante o local da recolha, mas sim na quantidade da amostra recolhida (Schulz *et al.*, 2015).

Tanto o teste de ELISA, como a imunofluorescência, não têm valor diagnóstico, pois a maior parte dos gatos são positivos, devido aos anticorpos produzidos como consequência da vacinação (Maggs, *et al.*, 1999b).

Existem alguns problemas no diagnóstico da infeção por FHV-1. Estudos realizados em gatos, utilizando a PCR descreveram uma frequência de resultados falso positivos entre 3% e 49% (Townsend *et al.*, 2004; Low *et al.*, 2007) e uma percentagem elevada de falso negativos (Gould, 2011). Esta variabilidade nos resultados pode dever-se ao facto de os animais poderem excretar o vírus intermitentemente, a infeções recrudescentes, à técnica de recolha das amostras, a contaminações, a problemas durante o transporte das amostras que possam resultar em degradação do DNA, a quantidade insuficiente de DNA, a erros no desenho dos *primers* e à interferência do DNA proveniente da vacinação, uma vez que a técnica de PCR não permite distinguir a origem do DNA (Weigler *et al.*, 1997; Maggs & Clarke, 2005). Assim, os resultados dos testes devem ser interpretados juntamente com os sinais clínicos, pois a presença de úlceras dendríticas da córnea ou queratite com sinais de vascularização e cicatrização, lesões límbicas, simbléfaro, infeção do trato respiratório superior e conjuntivite, são indicadores de infeção por FHV-1 como primeiro diagnóstico diferencial. Outras infeções, como a associada a *Chlamydomphila felis*, apresentam um quadro menos sistémico e de características agudas (Turner, 2010b).

Em suma, no diagnóstico de infeções por FHV-1, não se devem sobrevalorizar os testes diagnósticos, sem olhar para o quadro clínico. Deve ter-se em conta o estado de vacinação, a história pregressa do animal, nomeadamente historial de infeção do trato respiratório superior quando jovem, conjuntivites/queratites recorrentes, úlceras da córnea, espirros, queratite estromal e, também, a própria resposta ao tratamento, dado que, quando se trata de FHV-1 os sinais costumam melhorar significativamente após o uso de antivíricos (Gould, 2011).

1.6.4. Prevenção

A prevenção da infecção por FHV-1 é feita, essencialmente, através da vacinação.

As vacinas disponíveis incluem a vacina modificada viva ou inativada para uso parenteral e a inativada para administração intranasal e conjuntival. Embora a vacinação reduza a gravidade da doença, principalmente quando se trata de uma infecção primária, esta não previne nem a infecção, nem a reativação do vírus latente. As vacinas conjuntivais e intranasais têm um início de ação mais rápido, comparativamente às de via parenteral. No entanto, estas podem causar conjuntivite ou sinais respiratórios, alguns dias após a administração (Stiles, 2003).

Embora seja defendido o uso da vacina intranasal e conjuntival em gatos com doença crónica, não existem dados que provem que este tipo de vacinas acelere o tratamento, pois nenhuma vacina confere melhor nível de proteção de anticorpos que o vírus natural (Stiles, 2003).

As vacinas, tanto parenterais como intranasais, conferem, apenas, imunidade parcial contra os sinais clínicos, mas nenhum tipo de proteção contra a reativação e/ou eliminação (Stiles, 2013).

1.6.5. Tratamento

A conjuntivite herpética crónica em animais mais velhos, pode ter um tratamento pouco eficaz. Nestes casos, a administração de antivirais tópicos é controversa, sendo que estes apenas estão recomendados quando existe envolvimento corneal concomitante. Quando os animais se encontram afetados com menor gravidade, recomenda-se apenas que se examine atentamente o olho diariamente, pois a conjuntivite pode ser de curta duração e auto-limitante e o *stress* inerente à administração da medicação pode ser pior do que a própria doença.

Quando existe suspeita de infecção bacteriana secundária, recomenda-se o uso de antibioterapia tópica, durante um curto período de tempo, devendo ser evitado o uso de corticosteroides tópicos, mesmo que a conjuntiva esteja muito inflamada, pois pode predispor à replicação viral e à ulceração corneal (Stiles, 2003; Turner, 2010b).

Normalmente, os antivíricos tópicos são, apenas, utilizados nos casos de queratite herpética crónica, pois estes devem ser administrados com uma frequência relativamente alta, até oito vezes ao dia, têm um custo considerável e podem desencadear uma reação de hipersensibilidade (Turner, 2010b).

É frequente a administração de antibioterapia sistêmica de largo espectro para prevenir infecções bacterianas secundárias; porém, esta prática é controversa, sendo que a limpeza dos olhos e do nariz, várias vezes ao dia, juntamente com a aplicação de antibiótico oftálmico tópico de amplo espectro, como a gentamicina ou a tetraciclina, são, por norma, suficientes para prevenir a infecção ocular bacteriana secundária (Stiles, 2003). A utilização tópica em gatos de bacitracina-neomicina-polimixina B deve ser evitada, sob pena de causar choque anafilático (Plunkett, 2000).

Gatos jovens com úlceras da córnea, conjuntivite grave ou formação inicial de simbléfaro devem ser tratados com agentes antivirais, juntamente com a quebra mecânica, das aderências do simbléfaro com proparacaína e um cotonete de algodão, de modo a evitar aderências permanentes (Stiles, 2003).

Os agentes antivirais oftálmicos são virostáticos, o que faz com que a sua administração frequente seja importante. Assim, o tratamento deve ser adaptado a cada tutor, de modo a conseguir a sua colaboração, pois poucos são os tutores que conseguirão cumprir um plano com intervalos de apenas uma ou duas horas entre cada tratamento. Nestes casos, é aconselhável optar por administrações com intervalos de quatro a seis horas (Stiles, 2003).

Gatos com conjuntivite crónica por FHV-1 que não melhoram espontaneamente e animais com surtos frequentes, devem realizar tratamento com um agente antivírico tópico, durante duas a três semanas, de modo a acelerar a recuperação. No caso de ulceração corneal associada a esta infeção, também deve ser feita terapia antivírica tópica, assim como antibioterapia tópica, principalmente se a úlcera não cicatrizar em poucos dias com suspeita de sobreinfeção. Deve, também, realizar-se o desbridamento mecânico do epitélio solto da úlcera, com o auxílio de um cotonete de algodão e proparacaína tópica, de modo a que este não impeça a adesão adequada do epitélio ao estroma subjacente durante a cicatrização e de modo a remover as partículas virais (Stiles, 2003).

Antes de se iniciar o tratamento devem ter-se em atenção alguns fatores para que o protocolo escolhido seja o indicado, nomeadamente o estado da infeção, a gravidade da doença, a colaboração dos tutores e a sua disponibilidade financeira, fatores estes que são descritos de seguida.

A decisão terapêutica deve ter em consideração a distinção entre uma infeção primária aguda, uma infeção recrudescente ou uma queratite estromal crónica. No primeiro caso, os animais costumam apresentar sinais oculares e, também, sinais de doença do trato respiratório superior. Nestes casos, deve ser realizada uma abordagem tanto sistêmica como tópica. Se se tratar de uma infeção grave, deve ser incluído um protocolo antibacteriano para combater possíveis infecções bacterianas secundárias. Deve, ainda, ser

avaliada a necessidade de implementação de uma terapêutica de suporte como fluidoterapia ou alimentação parenteral. No caso de doença recrudescente, esta ocorre, regra geral, em gatos adultos e o pilar do tratamento assenta na terapêutica antivírica. Esta é, geralmente, reativada por um fator de *stress* que pode derivar do próprio tratamento, como a administração de corticoesteroides (Gould, 2011). A queratite estromal crónica ocorre, por norma, em gatos adultos e as opções de tratamento são limitadas. Em teoria, o tratamento indicado passaria por terapêutica anti-inflamatória ou pela utilização de imunossupressores. No entanto, estes podem levar a infeções recrudescentes, especialmente quando em combinação com a administração de corticoesteróides. Existem, também, estudos que defendem o uso de ciclosporina tópica em adição à terapêutica antivírica; porém, como este é um imunossupressor muito potente, também pode levar à reativação vírica (Stiles, 2013).

É, também, importante avaliar a gravidade dos sinais clínicos pois, nalguns casos, especialmente na doença recrudescente, estes tendem a ser moderados. A doença pode ser auto-limitante, desde que as possíveis fontes de *stress* sejam minimizadas. Por vezes, apenas, parar medicação imunossupressora pode ser suficiente para que o sistema imunitário suprima a reativação do vírus (Gould, 2011).

Devemos, também, ter em consideração que nem todos os tutores podem suportar as exigências adjacentes à terapêutica instituída, principalmente quando se trata de administrações tópicas, pois esta implica custos, quer a nível monetário, quer a nível de disponibilidade pessoal e nem todos têm essa disponibilidade; assim, é fundamental que estes estejam cientes do que o tratamento acarreta (Gould, 2011).

A abordagem terapêutica pode, ainda, conciliar análogos do DNA, interferões, lisina e probióticos. Os análogos do DNA são o grupo mais eficiente para o combate às infeções por FHV-1, pois são virostáticos e atuam competindo pela DNA polimerase, impedindo assim que o DNA do vírus se replique (Galle, 2004). Neste grupo inclui-se a trifluorotimidina, que apresenta efeito *in vitro* mais eficaz, o que faz dela, teoricamente, o antivírico tópico de primeira escolha; porém, ainda não existe nenhum ensaio clínico da mesma em gatos (Nasisse *et al.*, 1989; Galle, 2004; Gould, 2011; Thomasy & Maggs, 2016).

Em gatos com sinais clínicos graves, é necessária a restauração de líquidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-base, por exemplo, a reposição das perdas de potássio e bicarbonato devidas à salivação e redução da ingestão de alimentos, preferencialmente por administração intravenosa (Thiry *et al.*, 2009).

A ingestão de alimentos é extremamente importante. Muitos gatos não comem devido à perda do sentido do olfato ou das úlceras na cavidade oral. Os alimentos devem ser muito palatáveis e podem ser misturados e aquecidos para aumentar o sabor.

Estimulantes de apetite (por exemplo, ciproheptadina) podem ser usados. Se o gato não comer por mais de três dias, deve ser colocado um tubo de alimentação (Thiry *et al.*, 2009).

De forma a prevenir infecções bacterianas secundárias, devem ser administrados em todos os casos agudos antibióticos de amplo espectro que alcançam boa penetração no trato respiratório (Thiry *et al.*, 2009).

A secreção nasal deve ser removida com solução salina e uma pomada local. Fármacos mucolíticos, como a bromexina, podem, também, ser úteis. Colírios ou pomadas podem ser administrados várias vezes ao dia (Thiry *et al.*, 2009).

A nebulização com solução salina pode ser usada para combater a desidratação das vias aéreas (Thiry *et al.*, 2009).

Por último, podem ser administradas vitaminas, embora o seu valor não seja, ainda, claro (Thiry *et al.*, 2009).

Os fármacos e dosagens recomendados para o tratamento de FHV-1 encontram-se sumariados no apêndice I.

1.6.6. Prognóstico

O prognóstico varia consoante a carga viral e a idade do animal, sendo que gatos recém-nascidos têm menor probabilidade de sobrevivência (Stiles, 2003).

1.6.7. Potencial zoonótico

Este vírus apresenta uma elevada especificidade relativamente ao hospedeiro, não existindo, por isso, evidências de potencial zoonótico (Gaskell *et al.*, 2012).

1.7. Infecção por *Mycoplasma felis*

1.7.1. Etiologia e epidemiologia

Mycoplasma felis é um organismo procariota, pertencente à classe Mollicutes, que não possui parede celular (Greene & Chalker, 2012).

Mycoplasma spp. é considerado comensal nas mucosas do trato respiratório superior, porém, não do inferior (Padrid *et al.*, 1991; Bemis, 1992; Randolph *et al.*, 1993; Reed *et al.*, 2012; Fernandez *et al.*, 2017).

Ainda não se encontra bem definido o papel de *Mycoplasma felis* no desenvolvimento de conjuntivites e da doença do trato respiratório superior (Campbell *et al.*, 1973; Tan, 1974; Haesebrouck *et al.*, 1991; Low *et al.*, 2007; Sjødahl-Essén *et al.*, 2008; Holst *et al.*, 2010; Hillström *et al.*, 2012; Stiles, 2013). Organismos do género *Mycoplasma*

foram isolados, quer em animais clinicamente saudáveis/assintomáticos, quer em animais com sinais de DTRS (Blackmore & Hill, 1973; Holst *et al.*, 2010; Gourkow *et al.*, 2013).

M.felis apresenta uma elevada prevalência em animais que vivem em abrigos e não apresentam qualquer tipo de sintomatologia de DTRS, sugerindo que estes possam representar um papel de portadores da infeção (Gourkow *et al.*, 2013). *M. felis* foi, também, isolado tanto em animais com DTRS, como em animais saudáveis que com eles coabitavam (Holst *et al.*, 2010).

Noutros estudos foi demonstrada uma associação entre *Mycoplasma* spp. e DTRS, quer em animais de abrigos, quer em animais *indoor* (Bannasch & Foley, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Spindel *et al.*, 2008; Veir *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2010; Holst *et al.*, 2010). Num deles não foi identificado qualquer outro patógeno primário (Veir *et al.*, 2008).

Um elevado número de animais onde foram isoladas espécies de *Mycoplasma* spp., associados a sinais de doença do trato respiratório inferior, apresentavam, simultaneamente sinais oculares e/ou sinais de DTRS (Foster *et al.*, 2004). Num estudo realizado em Espanha, recorrendo à técnica de PCR em tempo real e utilizando amostras provenientes de zaragoas conjuntivais e orofaríngeas, foram obtidas taxas de infeção por *M.felis* prevalências de 46,5% e 38,3%, em animais infetados com sinais clínicos de DTRS e com conjuntivite, respetivamente. A população em estudo era composta por 358 gatos, dos quais 98 eram assintomáticos, 149 apresentavam conjuntivite, 127 apresentavam sinais de DTRS e 154 apresentavam gengivoestomatite. Alguns dos animais com conjuntivite apresentavam, também, sinais de DTRS (Fernandez *et al.*, 2017). Num outro estudo, realizado na Bélgica, a prevalência de gatos com conjuntivite, infetados por *M.felis* foi de 25%. Este estudo foi realizado em 105 gatos, dos quais 65 não apresentavam sinais de conjuntivite e 40 apresentavam conjuntivite. Importa, ainda, referir que tais resultados foram obtidos através da cultura e isolamento vírico de amostras recolhidas por zaragoas conjuntivais (Haesebrouck *et al.*, 1991).

Realizou-se, também, um estudo na Polónia em animais com conjuntivite crónica, recorrendo à técnica de PCR em tempo real. Dos 57 gatos em estudo, 63,2% estavam infetados por *M.felis* (Ploneczka-Janeczko *et al.*, 2011)

Na Austrália, através da técnica de PCR, com o objetivo de identificar os agentes presentes em animais com DTRS, foram testados 3126 gatos para FHV-1, *C.felis*, *M.felis*, Calicivirus felino, *Bordetella bronchiseptica* e Influenza H1N1. Dos animais que se encontravam positivos para pelo menos um dos agentes, 21,5% estava infetado por *M.felis* (Nguyen *et al.*, 2018).

Nestas infeções, as recorrências podem tornar-se frequentes, uma vez que o agente faz parte da flora normal do trato respiratório superior. Acresce, ainda, a presença

frequente de *Mycoplasma* spp. em infecções concomitantes, o que por si só agrava o risco de recorrências. Por fim, outros fatores como o *stress*, má nutrição, sobrelotação, entre outros, podem comprometer o sistema imunitário dos animais, o que aumenta a probabilidade de reinfeções (Lee-Fowler, 2014).

1.7.2. Manifestações clínicas

Os sinais clínicos mais comuns da infecção por *M.felis* em gatos são a conjuntivite moderada unilateral ou bilateral e pneumonia (Campbell *et al.*, 1973; Haesebrouck *et al.*, 1991; Foster *et al.*, 1998; Whitley, 2000; Chalker *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2004; Barrs *et al.*, 2005; Rand, 2006; Trow *et al.*, 2008; Bongrand *et al.*, 2012). Esta conjuntivite é, inicialmente, acompanhada por corrimento ocular seroso que tende a tornar-se mucopurulento (Campbell *et al.*, 1973; Greene & Chalker, 2012). Os gatos infetados por *M.felis* podem, também, apresentar hiperemia conjuntival, blefarospasmo, epífora e quemose (Haesebrouck *et al.*, 1991; Whitley, 2000; Crispin, 2002; Martin, 2010; Greene & Chalker, 2012). Em casos mais graves, a conjuntiva pode apresentar-se pálida (Rand, 2006; Martin, 2010; Greene & Chalker, 2012). São, também, frequentes sinais de doença do trato respiratório superior, como corrimento nasal e espirros (Rand, 2006; Sykes, 2013).

Embora menos comum, gatos imunocomprometidos infetados por *M.felis* podem apresentar poliartrite (Hooper *et al.*, 1985).

1.7.3. Diagnóstico

As principais técnicas de diagnóstico para *C.felis* são a citologia conjuntival, a cultura e isolamento e a PCR (Lee-Fowler, 2014).

A citologia conjuntival providencia informação sobre o tipo e fase de inflamação presente; porém, apresenta uma fraca sensibilidade e especificidade (Rand, 2006; Lee-Fowler, 2014).

A cultura celular, embora útil, mostra-se demasiado morosa. As colónias não são passíveis de ser vistas a olho nu. Ao microscópio, têm uma aparência de “ovo estrelado” (Lee-Fowler, 2014).

A PCR é considerada a técnica mais indicada para o diagnóstico de *C.felis*. As amostras podem ser recolhidas a partir de *flush* nasal, zaragatoas nasais, orofaríngeas e conjuntivais ou por biópsia (Johnson *et al.*, 2004; Low *et al.*, 2007; Veir *et al.*, 2008).

1.7.4. Prevenção

De momento, ainda não existem protocolos vacinais para *M. felis*. A prevenção passa por tentar prevenir infeções concomitantes, evitando sobrelotação, assim como situações de *stress* e o melhoramento das condições de higiene. Idealmente, os animais com sinais de infeção deveriam ser isolados; porém, isto pode tornar-se difícil de cumprir num abrigo. Assim, devem lavar-se as mãos frequentemente, utilizar desinfetantes adequados para limpar as jaulas e os objetos dos animais e utilizar luvas e batas descartáveis sempre que se está em contacto com animais com sinais de infeção (Lee-Fowler, 2014).

1.7.5. Tratamento

Este agente é, regra geral, sensível a tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrolidos (os mais utilizados) mas, também, a lincosamidas, cloranfenicol e aminoglicosídeos (Greene & Chalker, 2012). Num estudo foi demonstrada uma maior eficácia por parte da doxiciclina e da associação amoxicilina- ácido clavulânico, relativamente à cefovecina, em animais com DTRS (Litster *et al.*, 2012).

Outros autores demonstraram, com base em diagnóstico por PCR, que a administração de doxiciclina, durante um período entre sete e 28 dias, apresenta boa eficácia (Hartmann *et al.*, 2008; Greene & Chalker, 2012; Kompare *et al.*, 2013).

A fluoroquinolona mais aconselhada é a pradofloxacina, pois demonstrou ser segura e eficaz, quando administrada durante 20 dias. Por outro lado, o uso de enrofloxacina como primeira escolha, encontra-se desaconselhado, uma vez que demonstra riscos de toxicidade ocular (Hartmann *et al.*, 2008; Spindel *et al.*, 2008; Lees & Toutain, 2013).

Sendo as infeções concomitantes frequentes, e, dado o frequente papel secundário da infeção por *M.felis* na doença do trato respiratório superior, é de extrema importância o tratamento da causa primária (Lee-Fowler, 2014).

1.7.6. Potencial zoonótico

As infeções causadas por *M.felis* não aparentam apresentar risco para a saúde pública. Existe, apenas, um caso zoonótico descrito, no Canadá, que data de 1994. Tratava-se de uma senhora, de 49 anos que se apresentava imunocomprometida, a fazer corticoterapia e com hipoglobulinemia. A senhora trabalhava num abrigo para animais e foi mordida por um gato um mês antes de dar entrada no hospital, onde lhe foi diagnosticada artrite séptica na articulação coxo-femoral esquerda e no joelho direito (Bonilla *et al.*, 1997).

1.8. Co-infeções

Agentes causadores de conjuntivite infecciosa felina, como o calicivirus e *M.felis*, encontram-se, frequentemente, associados aos dois principais microorganismos causadores da doença, o FHV-1 e a *Chlamydomphila* (Turner, 2010a).

Fernandez *et al.*, 2017, num estudo realizado em Espanha, testaram 358 gatos para FHV-1, Calicivirus felino, *C.felis* e *M.felis*. A população era composta por 98 gatos saudáveis e 260 gatos com DTRS, conjuntivite e/ou gengivoestomatite. Este estudo mostrou que as co-infeções são muito comuns em gatos com sinais de DTRS, conjuntivite e/ou gengivoestomatite, ocorrendo em 28,2% dos animais testados, tendo 47,0% dos animais sido positivos para, pelo menos, um agente. Nos animais sintomáticos, a percentagem de co-infeção foi de 35,4%. Metade dos animais sintomáticos e infetados (50,8%), estavam co-infetados. Este estudo mostrou, também, que as co-infeções são mais frequentes em animais com as três condições clínicas (71% estavam co-infetados), do que em animais com apenas duas (onde 35% dos animais se apresentavam co-infetados). Apenas 28% dos gatos que apresentavam uma das três condições clínicas, estavam co-infetados.

Um estudo realizado na Grã-Bretanha, mostrou que 7,9% de 429 animais com infeção por *C.felis*, estavam, simultaneamente, infetados por FHV-1 ou por FCV. (Wills *et al.*, 1988). Outro estudo realizado na Suíça, revelou que 64% de 25 gatos positivos para *C.felis*, apresentavam, também, DNA de FHV-1 (Von Bomhard *et al.*, 2003). Esta co-infeção é pouco comum em gatos que apresentam conjuntivite crónica (Nasisse *et al.*, 1993).

Co-infeções com o vírus da imunodeficiência felina e *C.felis*, prolongam a duração da conjuntivite e o tempo de excreção de *C.felis* forma considerável. Gatos infetados com FIV excretam *C.felis* durante um período que pode ir até 270 dias, o que contrasta com os 70 dias de excreção em animais não infetados com FIV (O'Dair *et al.*, 1994).

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a frequência de infeção por FHV-1, *C.felis* e *M.felis*, numa população de 29 gatos com sinais de conjuntivite e/ou DTRS, através da amplificação, por PCR, de DNA dos agentes. Foram, também, objetivos realizar o diagnóstico da infeção por observação de citologia conjuntival e comparar os resultados dos diagnósticos molecular e citológico.

O presente trabalho teve, ainda, como objetivos, caracterizar a população em estudo em função dos agentes causadores de doença e respectivos sinais clínicos.

2. Material e Métodos

2.1. Descrição da população em estudo

No presente trabalho foram estudados 29 gatos com sinais clínicos indicativos de conjuntivite e/ou sinais de doença do trato respiratório superior. Foram considerados animais com conjuntivite, todos aqueles que apresentaram corrimento ocular, hiperemia e/ou quemose e com doença do trato respiratório superior, todos aqueles que apresentavam tosse, espirros e secreção oronasal/nasal.

A recolha das amostras decorreu entre os meses de janeiro e maio de 2018, em dois Hospitais Veterinários: o Hospital Veterinário de Leiria e o Hospital Veterinário da FMV-ULHT.

Para cada animal foi atribuído um número e foi preenchido um questionário (apêndice II), onde se registaram informações como o número de identificação, nome do animal, idade, data e local da colheita, motivo da consulta, raça, sexo, protocolo de vacinação, tipo de habitação, existência de coabitantes e se estes apresentavam sinais clínicos indicativos de conjuntivite. Registaram-se, também, quais os sinais clínicos presentes (anorexia, prostração, pirexia, sialorreia, icterícia, úlceras nasais, linguais ou no palato, edemas da face, membros e/ou nas articulações, espirros, tosse, classificação do corrimento oronasal/nasal, classificação do corrimento ocular, hiperemia, quemose e simbléfaro), a data do primeiro episódio de conjuntivite, evolução terapêutica e historial clínico do animal.

2.2. Recolha de amostras

A cada gato foram feitas duas recolhas distintas, uma com zaragatoa estéril, para realização da PCR, e outra com uma escova de citologia, para a avaliação citológica. Sempre que possível, a recolha de amostras foi realizada em ambos os olhos. No total, foram recolhidas 56 amostras com zaragatoa estéril, para análise molecular, e 56 amostras com escova citológica.

Antes da recolha da amostra, procedeu-se à adequada contenção do animal, para garantir uma recolha segura e eficaz. Após calçar luvas, expôs-se a superfície conjuntiva palpebral inferior e fez-se deslizar uma zaragatoa estéril nessa mesma superfície. Colocou-se a zaragatoa num microtubo de 1,5 mL, devidamente identificado, e armazenou-se a uma temperatura de – 20°C.

De seguida, colocou-se uma gota de anestésico tópico (Oxibuprocaína, Anestocil®) em cada olho. Realizou-se a exposição da membrana do saco conjuntival inferior e rolou-se

a escova de citologia estéril sobre a conjuntiva. Transferiu-se o material colhido para uma lâmina de vidro e deixou-se secar ao ar e à temperatura ambiente.

Previamente à colheita das amostras, os tutores assinaram uma autorização e foram informados sobre os riscos da colheita, procedimento e finalidade da mesma.

2.3. Avaliação citológica

Tanto o processo de coloração como a avaliação microscópica das lâminas, foram realizadas no Laboratório do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Para a coloração utilizou-se o método de May Grunwald-Giemsa:

- 1 – As lâminas foram mergulhadas cinco vezes na solução de fixação (Metanol).
- 2 – As lâminas foram mergulhadas cinco vezes na solução de Eosina.
- 3 – As lâminas foram mergulhadas cinco vezes numa solução de Tiazina.
- 4 – Por fim, lavaram-se as lâminas em água corrente e deixaram-se secar à temperatura ambiente.

Após coradas e secas, as lâminas foram fixadas com uma lamela e Entellan[®].

A avaliação microscópica das citologias, foi realizada com o auxílio da Médica Veterinária responsável pelo laboratório do Hospital Escolar da FMV-ULHT, Dr^a. Joana Fonseca. A observação foi feita num microscópio (Micros MCX50), com as objetivas de 100x, 400x e 1000x. As amostras foram analisadas e classificadas quanto ao tipo de inflamação e à presença/ausência de inclusões citoplasmáticas. Este processo foi realizado sem qualquer conhecimento quer da história, sinais clínicos ou qualquer outra informação sobre os gatos.

2.4. Detecção molecular dos agentes em estudo

2.4.1. Extração de DNA

O DNA das amostras em estudo foi extraído a partir de zaragatoas conjuntivais previamente recolhidas e armazenadas a –20°C. Para este efeito, foi utilizado um Kit de extração RTP[®] Bacteria DNA Mini Kit (Stratec Molecular), de acordo com as indicações do fabricante, com algumas modificações.

Para cada amostra realizou-se o seguinte protocolo:

- 1 – Adicionaram-se 400 µL de Resuspension Buffer R num *Extraction Tube*.
- 2 – Homogeneizou-se o conteúdo, num vortex (Labnet mixer).

- 3 – Realizou-se um *short spin* numa centrífuga VWR Galaxy 14D e, de seguida pipetou-se todo o conteúdo presente no *Extraction Tube* para o microtubo que continha a zaragatoa.
- 4 – Incubou-se o microtubo com a zaragatoa a 65°C, durante 10 minutos, agitando-o a cada 2 minutos.
- 5 – De seguida, voltou a incubar-se o microtubo, durante 10 minutos mas, desta vez, a 95°C, agitando, também, a cada 2 minutos.
- 6 – Realizou-se um novo *short spin* e, posteriormente, removeu-se a zaragatoa.
- 7 – Adicionaram-se 400 µL de *Binding Buffer B6* e homogeneizou-se o conteúdo no vortex.
- 8 – Após novo *short spin* em centrífuga, passou-se o conteúdo para o *RTA Spin Filter* e incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente.
- 9 – Centrifugou-se a 11.000 x g, durante 2 minutos.
- 10 – Descartou-se o filtrado e colocou-se, de novo, o *RTA Spin Filter* no *RTA Receiver Tube*.
- 11 – Adicionaram-se 500 µL de *Wash Buffer I* e centrifugou-se a 11.000 x g durante 1 minuto.
- 12 – Descartou-se o filtrado e o *RTA Receiver Tube*.
- 13 – Colocou-se o *RTA Spin Filter* num novo *RTA Receiver Tube* e adicionaram-se 600 µL de *Wash Buffer II*.
- 14 – Centrifugou-se a 11.000 x g durante 1 minuto e, de seguida, descartou-se o filtrado.
- 15 – Colocou-se o *RTA Spin Filter*, de novo, no *RTA Receiver Tube* e voltou-se a centrifugar, desta feita por 4 minutos, à velocidade máxima, de modo a remover completamente o etanol.
- 16 – Colocou-se o *RTA Spin Filter* num 1,5 mL *Receiver Tube* novo, devidamente identificado e adicionaram-se 70 µL de água desionizada estéril, incubando, de seguida, durante 1 minuto à temperatura ambiente.
- 17 – Por fim, centrifugou-se durante 1 minuto a 11.000 x g, descartou-se o *RTA Spin Filter* e armazenou-se o 1,5 mL *Receiver Tube*, contendo o DNA eluído a -20°C.

2.4.2. Amplificação por PCR de um fragmento do gene *fGUSB*

O laboratório onde o estudo foi realizado tem uma bancada destinada unicamente à preparação da mistura reacional da reação de PCR, de modo a tentar minimizar a possibilidade de contaminações cruzadas. Com o mesmo fim, tanto as bancadas de trabalho como o material utilizado (micropipetas, pontas, suportes e microtubos) são previamente limpos com lixívia a 10%, sendo, posteriormente, o mesmo material exposto a luz UV, durante um período de 20 minutos, numa câmara de fluxo laminar Bio48M (Faster®).

Com a finalidade de avaliar a existência de inibidores da DNA polimerase, amplificou-se, para cada amostra, um fragmento de 177 bp do gene beta-glucoronidase felino (*fGUSB*, do inglês “feline beta-glucoronidase”).

De forma a amplificar o fragmento em estudo, foi realizada uma PCR convencional contendo 10 µL de DNA de cada amostra num volume total de 25 µL de mistura reacional. A mistura continha, além do DNA, 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 1 U de MyTaq DNA Polymerase (Bioline®), 10 pmol de cada *primer* (tabela 1) e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Em cada reacção de PCR foram utilizados um controlo positivo e dois controlos negativos.

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene *fGUSB*.

Primers	Sequência (5'→3')
<i>fGUSB Fw</i>	GCGTTCCTTTTGCGAGAGAG
<i>fGUSB Rev</i>	GCTGTGGAAGTTGCCCTTA

A reação de PCR foi efetuada num termociclador Rotor Gene-Q (Qiagen®), nas condições descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Condições da reação de PCR na amplificação do gene *fGUSB*.

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
95°C	1 min	---
95°C	20 seg	30
55°C	20 seg	
72°C	20 seg	
72°C	5 min	---
25° C	5 min	---

2.4.2.1. Visualização dos produtos e PCR por electroforese em gel de agarose

Para visualizar os produtos de PCR, procedeu-se à sua electroforese, num gel de agarose a 1,5 % (m/V).

- 1 – Num erlenmeyer, pesou-se a quantidade necessária de agarose (Seakem[®] LE Agarose, Lonza[®]).
- 2 – No mesmo erlenmeyer adicionou-se o tampão Tris-Borato (90 mM)-EDTA (2 mM), pH 8,3 (TBE) 1x.
- 3 – Preparou-se o suporte de electroforese, colocando os pentes que servem de molde aos poços do gel.
- 4 – Aqueceu-se a mistura num micro-ondas, a 600 Watt, agitando o erlenmeyer sempre que necessário, até que esta tivesse um aspecto uniforme e translúcido (isto é, até que a fusão da agarose estivesse completa).
- 5 – Arrefeceu-se a mistura, passando água corrente no exterior do erlenmeyer, agitando-o continuamente. Posteriormente, adicionou-se o GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium[®]), numa proporção de 0,32 µL para cada 75 mL de gel.
- 6 – De seguida, colocou-se o gel no suporte e aguardou-se a sua polimerização.
- 7 – Transferiu-se o gel já solidificado para a tina de electroforese e adicionou-se tampão TBE 1x até que o gel estivesse completamente submerso pelo mesmo.
- 8 – Numa microplaca de 96 poços, prepararam-se as amostras que iriam ser aplicadas no gel, adicionando 1,5 µL de *loading buffer* [glicerol 30% (m/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v)] e 10 µL do produto de PCR de cada amostra.
- 9 – Após homogeneização, aplicaram-se as amostras nos poços do gel (incluindo os controlos negativo e positivo), assim como o marcador de pesos moleculares Hyperladder 1Kb (Bioline[®]).
- 10 – Deu-se início à electroforese ligando a fonte de alimentação (Pharmacia LKB-GPS 200/400), numa voltagem de 100 Volts, durante um período, de aproximadamente, 60 minutos.
- 11 – Por fim, observaram-se os resultados num transiluminador UV Alfa Gene, por emissão de fluorescência do GelRed.

2.4.3. PCR convencional para detecção de DNA de FHV-1

Com o intuito de verificar a existência de DNA de Herpesvírus felino tipo 1 nas amostras recolhidas, realizou-se uma PCR convencional, de modo a amplificar um

fragmento de 95 pb, do gene *28S rDNA*. Para a reação utilizou-se um volume de 25 µL de mistura reacional, que continha 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 1 U MyTaq DNA Polymerase (Bioline®), 10 pmol de cada *primer* (tabela 3), 10 µL de DNA de cada amostra e água desionizada estéril de forma perfazer o volume pretendido. Incluiu-se, também, para cada reação, um controlo positivo e dois controlos negativos (que continham água desionizada estéril ao invés de DNA). A reação decorreu de acordo com as condições indicadas na tabela 4, utilizando, para o efeito, um termociclador Rotor Gene-Q (QIAGEN®).

Tabela 3 – Sequência de *primers* utilizados para a amplificação de FHV-1 (Helps *et al.*, 2003).

Primers	Sequência (5'→3')
<i>FHV Fw</i>	GGACAGCATAAAAGCGATTG
<i>FHV Rev</i>	AACGTGAACAACGACGCAG

Tabela 4 – Condições da reação de PCR na amplificação de DNA de FHV-1.

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
95°C	5 min	---
95°C	45 seg	30
51°C	30 seg	
72°C	20 seg	
72°C	5 min	---
25 °C	5 min	---

Posteriormente, de modo a visualizar os resultados da reação, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 2,8% (m/V). Esta foi preparada e decorreu segundo o descrito em 2.4.2.1.

2.4.4. PCR convencional para deteção de DNA de *Mycoplasma felis*

Para verificar a presença de *Mycoplasma felis* nas amostras, foi realizada uma PCR convencional tendo como alvo um fragmento de 238pb, do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA.

A mistura reacional da reação de PCR preparada, num volume final de 25 µL, continha, além de 10 µL DNA, 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 1 U de MyTaq DNA Polymerase (Bioline®), 10 pmol de cada *primer* (tabela 5) e água destilada estéril até perfazer o volume final. A reação de PCR decorreu de acordo com as condições descritas na tabela 6.

Incluiu-se em cada reação um controlo positivo e dois controlos negativos. A reação foi realizada num termociclador Rotor Gene-Q series (QIAGEN®).

Tabela 5 – Sequência de *primers* utilizados para a amplificação de *Mycoplasma felis* (Chalker *et al.*, 2004).

Primers	Sequência (5'→3')
Forward Myc1	CACCGCCCGTCACACCA
Reverse Myc2	GGACTATTATCAAAAGCACATAAC

Tabela 6 – Condições da reação de PCR na amplificação de DNA de *Mycoplasma felis*.

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
95°C	5 min	---
95°C	45 seg	30
52°C	30 seg	
72°C	20 seg	
72°C	5 min	---
25 °C	5 min	---

Os produtos da reação de PCR, foram visualizadas após electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/V), conforme descrito em 2.4.2.1.

2.4.5. PCR em tempo real para detecção de DNA de *Chlamydomophila felis*

Com o intuito de verificar a presença de DNA de *Chlamydomophila felis*, realizaram-se duas técnicas de PCR distintas: PCR em tempo real e PCR convencional.

A PCR em tempo real foi realizada para amplificar um fragmento de 77pb. Para a reação utilizou-se um volume de 20 µL de mistura reacional, que continha 5 µL do DNA em estudo, 10µL de 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix (Bioline®), 4,0 µL de água desionizada estéril e 0,5µL de cada *primer* (tabela 7).

Tabela 7 – Sequência de *primers* utilizados para a amplificação em tempo real de DNA de *Chlamydophila felis* (Helps *et al.*, 2003).

Primers	Sequência (5'→3')
<i>C. felis Fw</i>	GAAGTCAAGCAACACCACTG
<i>C. felis Rev</i>	CCATTCGGCATCTTGAAGATG

Cada amostra, foi realizada em duplicado ou triplicado. Foram, também, adicionados, em cada reação, dois controlos positivos e dois controlos negativos. A reação decorreu de acordo com as condições indicadas na tabela 8, utilizando, para o efeito, um termociclador Rotor Gene-Q (QIAGEN®). As amostras com um valor de C_T inferior ou igual a 37 foram consideradas negativas.

Tabela 8 – Condições da reação de PCR em tempo real na amplificação de DNA de *Chlamydophila felis*.

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
95°C	3 min	---
95°C	5 seg	40
62°C	10 seg	
72°C	8 seg	

Para confirmar a especificidade da amplificação com SYBR® Green, realizou-se, imediatamente após a reação de PCR, uma curva de *melting*, fazendo variar a temperatura entre 55°C e 94°C, com incrementos de 1°C em cada ciclo. Os resultados foram analisados com recurso ao *software* Rotor-Gene Q – Pure Detection V 2.1.0.

Porque nas curvas de *melting* se observaram alguns picos, embora de menor intensidade que o pico principal, foi realizada, em algumas amostras, uma PCR convencional, seguida de restrição enzimática, para confirmar a presença de DNA de *Chlamydophila felis*. Esta PCR amplifica um fragmento de 269 pb do gene *16S rDNA* nos organismos pertencentes à família Chlamydiaceae. Para a reação, foram utilizados 25 µL de

mistura reaccional, contendo 1 x MyTaq Reaction Buffer (Bioline[®]), 1 U de MyTaq DNA polimerase (Bioline[®]), 10 pmol de cada *primer* (tabela 9), 10 µL de DNA de cada amostra e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Cada amostra, foi realizada em duplicado ou triplicado. Foram, também, adicionados, em cada reacção, dois controlos positivos e dois controlos negativos.

Tabela 9 – Sequência de *primers* utilizados para a amplificação de *Chlamydophila* spp. (Ossewaarde & Meijer, 1999).

Primers	Sequência (5'→3')
16S rDNA Fw	CGTGGATGAGGCATGCAAGTCGA
16S rDNA Rev	ATCTCTCAATCCGCCTAGACGTCA

A reacção decorreu de acordo com as condições indicadas na tabela 10 utilizando, para o efeito, um termociclador Rotor Gene-Q (QIAGEN[®]).

Tabela 10 – Condições da reacção de PCR na amplificação de DNA de *Chlamydophila* spp.

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
94°C	2 min	---
94°C	30 seg	10
56°C	30 seg	
72°C	30 seg	
94°C	30 seg	10
52°C	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	5 min	---

Os produtos amplificados por PCR convencional foram submetidos a hidrólise com a enzima de restrição *Hinf-1*, com o intuito de identificar a espécie de *Chlamydophila* responsável pela infecção. Quando a espécie presente é *C.felis*, a hidrólise com *Hinf-1* origina três fragmentos com 145, 73 e 51 pares de bases.

A reacção de hidrólise efectuou-se de acordo com as instruções do fabricante, numa mistura reaccional contendo 10 µL de produto de PCR, 2 µL de tampão 10x Buffer R (Thermo Scientific), 2 µL de enzima *Hinf I* (Thermo Scientific) e 18 µL de água desionizada estéril. Após agitação suave, a mistura reaccional foi incubada a 37°C, durante a noite. Os

produtos de hidrólise foram visualizados após electroforese em gel de agarose a 3% (m/V), como descrito em 2.4.2.1.

3. Resultados

3.1. Caracterização da população em estudo

Para o presente estudo foram recolhidas amostras de gatos que foram apresentados à consulta em dois Hospitais Veterinários distintos: nove gatos no Hospital Veterinário de Leiria (HVL) e 20 gatos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Lisboa.

A população em estudo foi composta por 29 gatos, dos quais 27,6% (8/29) eram fêmeas inteiras, 27,6% (8/29) eram fêmeas ovariectomizadas, 20,7% (6/29) eram machos inteiros e 24,1% (7/29) eram machos castrados (figura 5).

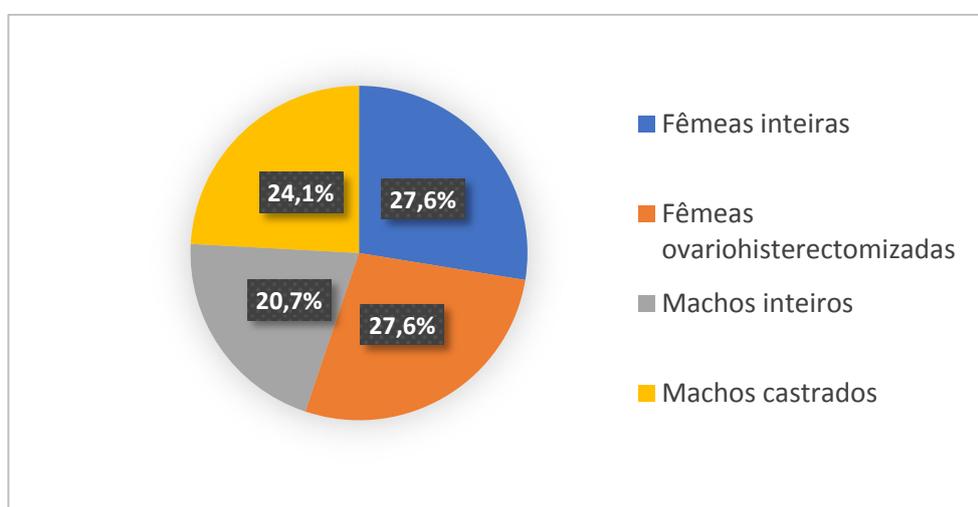


Figura 5 – Distribuição dos gatos em estudo em função do sexo e estado reprodutivo.

A grande maioria dos gatos presentes neste estudo, 89,7% (26/29), não tinham raça definida. Apenas 6,9% (2/29) pertenciam à raça Persa e 3,4% (1/29) à raça Bosques da Noruega.

A média de idade dos animais em estudo foi de 47,5 meses, o que corresponde a cerca de 3 anos e 11 meses. O animal mais novo tinha 5 meses e o mais velho 12 anos.

Os animais foram agrupados em seis grupos: idade inferior a 8 semanas (0,0%), idade entre 8 semanas e 6 meses (3,45%, 1/29), idade entre 6 e 12 meses (6,90%, 2/29), idade entre 12 meses e 5 anos (51,79%, 15/29), idade entre 5 e 10 anos (27,59%, 8/29) e idade superior a 10 anos (10,34%, 3/29) (figura 6).

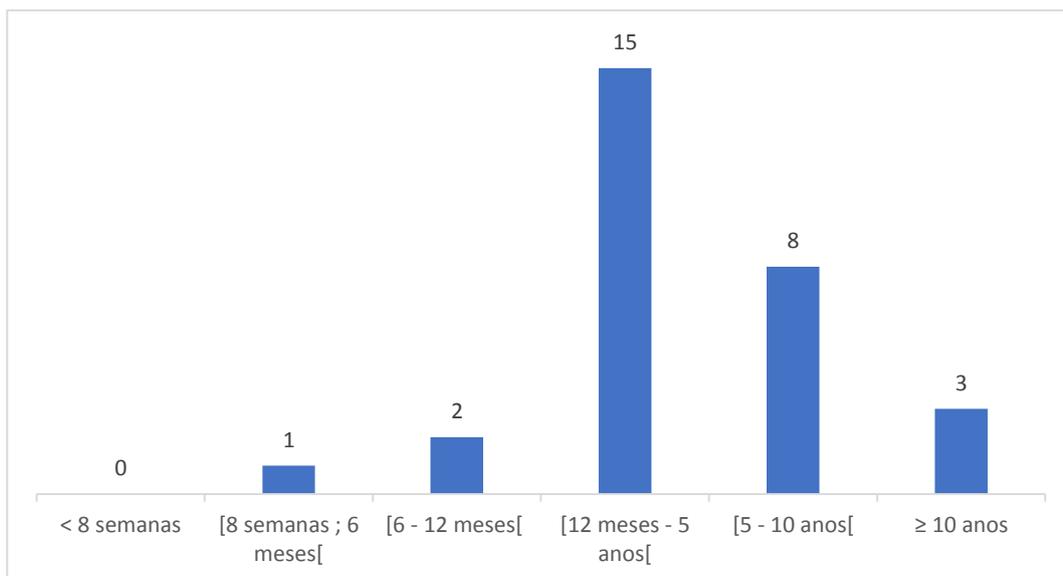


Figura 6 – Distribuição dos animais em estudo em função da idade.

Dos 29 gatos incluídos no estudo, apenas três apresentavam como motivo primário da consulta conjuntivite e outros três doença do trato respiratório superior. Os motivos de consulta apresentados com maior frequência neste estudo foram as consultas de profilaxia (vacinação e desparasitação) e a realização de ovariectomias/castrações, ambas representadas por sete animais. Os restantes nove animais, apresentaram-se nos hospitais por motivos variados, nomeadamente, dor lombar, anorexia, diarreia, lavagem broncoalveolar, reavaliação de abcesso, reavaliação de pododermatite, fratura de membro torácico, tratamento de ferida abdominal e sessão de acupuntura (figura 7).

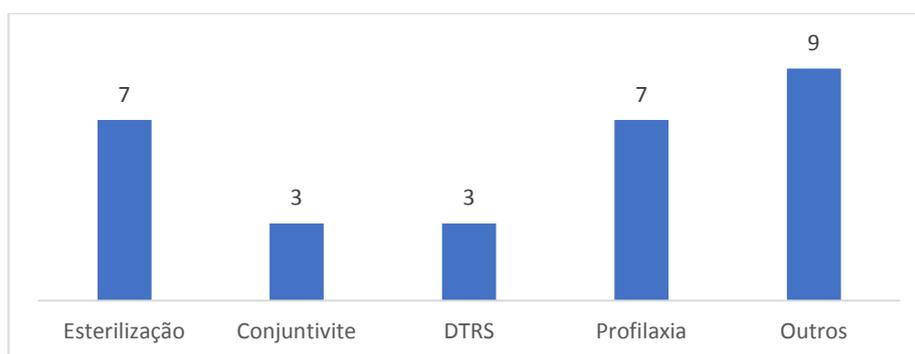


Figura 7 – Distribuição dos gatos em estudo em função do motivo da consulta.

De entre os animais estudados, 51,7% (15/29) não haviam realizado qualquer protocolo de desparasitação e 24,1% (7/29) tinham feito protocolos que abrangiam quer a

componente interna, quer a externa. Os restantes animais dividiam-se entre os 17,2% (5/29) e 6,9% (2/29) que apenas realizavam desparasitação interna e externa, respetivamente (figura 8).

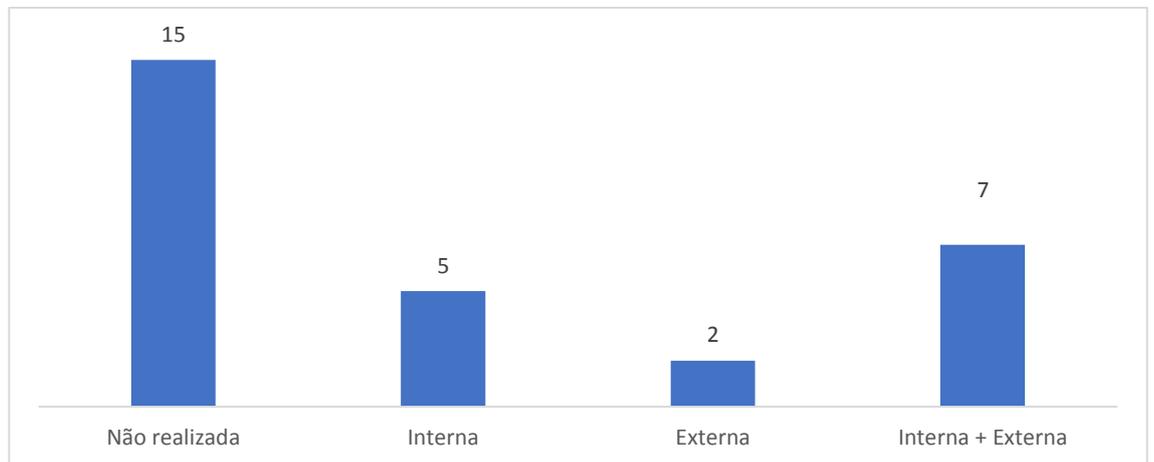


Figura 8 – Distribuição dos gatos em estudo em função dos protocolos de desparasitação.

Quanto ao estado de vacinação, 51,7% (15/29) dos animais não se encontravam vacinados e 6,9% (2/29) tinham iniciado o protocolo vacinal trivalente, não tendo, ainda, realizado qualquer reforço. Em 24,1% (7/29) dos animais tinha sido seguido o protocolo vacinal trivalente, que lhes confere imunidade contra a rinotraqueíte viral felina, a panleucopenia felina e a calicivirose felina. Em 13,8% (4/29), tinha sido seguido o protocolo vacinal RCPC_h, que acrescenta ao protocolo trivalente a imunidade contra a clamidiose felina. Por fim, apenas um animal (3,5%), seguia o protocolo pentavalente, que adiciona a imunidade contra a leucemia felina às restantes já mencionadas (figura 9).

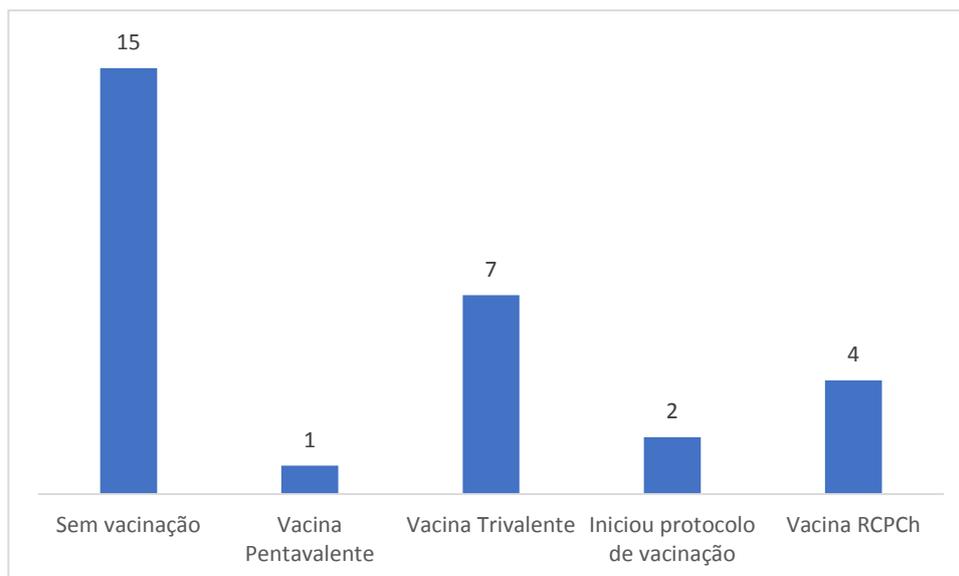


Figura 9 – Distribuição dos gatos em estudo em função dos protocolos de vacinação.

Quanto ao tipo de habitação, 24,1% (7/29) viviam, exclusivamente, na rua e 48,3% (14/29) no interior das habitações dos tutores. Os restantes 27,6% (8/29) viviam em regime misto, isto é, com acesso tanto ao exterior, como ao interior.

Dos animais em estudo, apenas 21% (6/29) não coabitavam com outros gatos. Dos restantes 23 gatos, 13 coabitavam com animais com sinais clínicos compatíveis com conjuntivite/DTRS.

O sinal clínico apresentado com maior frequência foi o corrimento ocular seroso, estando presente em 55,2% (16/29) da população em estudo, seguido por hiperemia conjuntival, em 48,3% (14/29). Os restantes sinais clínicos apresentados foram: espirros (34,5%, 10/29), corrimento ocular mucopurulento (24,1%, 7/29), prostração (20,7%, 6/29), anorexia (17,2%, 5/29), corrimento oronasal seroso e quemose (ambos com 13,8%, 4/29), pirexia e tosse (ambos com 10,3%, 3/29), sialorreia e icterícia (ambos com 6,9%, 2/29) e úlceras linguais, corrimento oronasal mucopurulento e simbléfaro (todos com 3,4%, 1/29) (tabela 11). Importa, também, referir que nenhum dos animais apresentou corrimento oronasal e/ou ocular sanguinolento, úlceras nasais e/ou do palato, edemas da face, membros e/ou articulações.

Salienta-se, ainda, que, dos 16 animais que apresentaram corrimento ocular seroso, 68,8% (11/16) apresentavam corrimento bilateral e, apenas, 31,2% (5/16) corrimento unilateral. Dos sete animais que apresentavam corrimento ocular mucopurulento, 71,4% (5/7) apresentavam corrimento bilateral e, apenas, 28,6% (2/7) apresentavam corrimento

unilateral. Em 64,3% dos 14 animais que apresentavam hiperemia, esta estava presente de forma bilateral; apenas 35,7% desses animais apresentavam hiperemia em apenas um olho. Dos quatro animais que apresentavam quemose, apenas um (25%) tinha apresentação unilateral, sendo que os restantes 75% tinham apresentação bilateral. O único caso de simbléfaro no presente estudo, tinha apresentação bilateral.

Tabela 11 – Distribuição dos gatos em estudo em função dos sinais clínicos presentes.

Sinais Clínicos	Frequência (n=29)	
	Absoluta	Relativa
Corrimento ocular seroso	16	55,2%
Hiperemia	14	48,3%
Espirros	10	34,5%
Corrimento ocular mucopurulento	7	24,1%
Prostração	6	20,7%
Anorexia	5	17,2%
Corrimento oronasal seroso	4	13,8%
Quemose	4	13,8%
Tosse	3	10,3%
Pirexia	3	10,3%
Sialorreia	2	6,9%
Icterícia	2	6,9%
Corrimento oronasal mucopurulento	1	3,4%
Simbléfaro	1	3,4%
Úlceras linguais	1	3,4%

Dos animais presentes no estudo, 6,9% (2/29) não apresentavam sinais de conjuntivite, aquando da recolha das amostras. De entre os restantes, 29,6% (8/29) apresentava conjuntivite em apenas um dos olhos e 70,4% (19/29) exibia apresentação bilateral (figura 10).

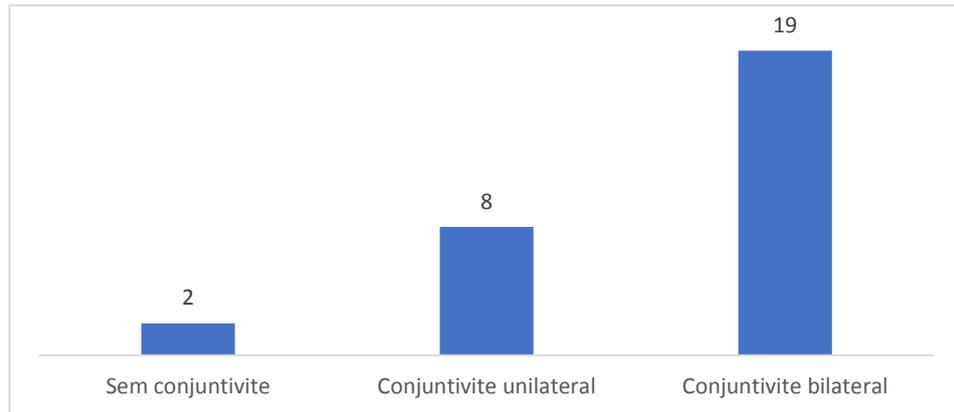


Figura 10 – Distribuição dos gatos em estudo em função da presença de sinais de conjuntivite.

De entre os animais em estudo, 20,7% (6/29) não apresentavam história pregressa de conjuntivite e 37,9% (11/29) já tinham historial clínico de conjuntivite. Sobre os restantes 41,4% dos animais, não foi possível obter essa informação, por se tratarem de animais de rua e/ou recém adotados.

3.2. Análise molecular e citológica

3.2.1 Amplificação de um fragmento do gene *fGUSB*

O gene *fGUSB* foi amplificado com sucesso em todas as amostras (figura 11), com exceção de quatro, referentes a três animais (dois olhos de um mesmo animal e os restantes pertencentes a dois animais). Esta amplificação indica a ausência de inibidores nas amostras em estudo que, podem assim, ser submetidas a PCR para amplificação dos agentes em estudo.

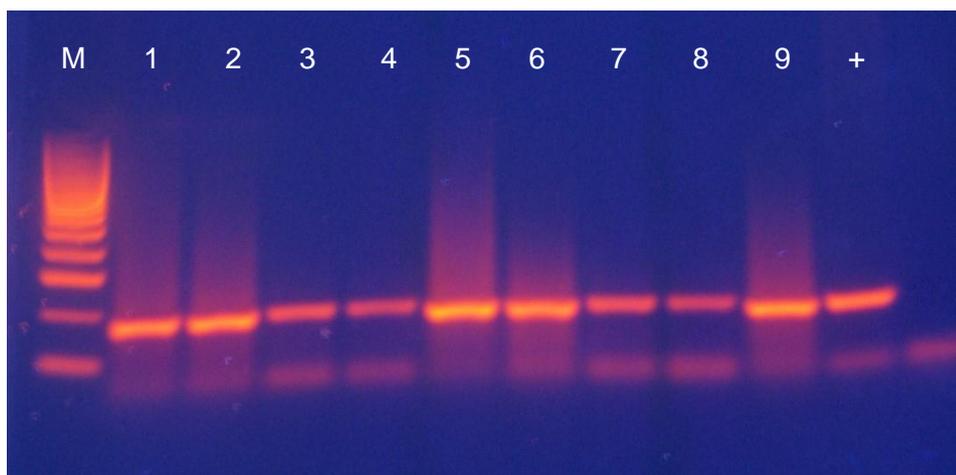


Figura 11 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de um fragmento do gene *fGUSB*. M: marcador de peso molecular (Hyperladder 1Kb, Bioline®); 1-9: amostras em estudo; +: controlo positivo; -: controlo negativo.

3.2.2. PCR convencional para deteção de DNA de FHV-1

Em 58,6% (17/29) dos gatos em estudo foi possível amplificar DNA de FHV-1. Não foram visualizados quaisquer sinais de amplificação nos controlos negativos (figura 12).

Desses 17 animais, 52,9% (9/17) apresentaram resultado positivo em ambos os olhos e os restantes 47,1% (8/17) em apenas um dos olhos (figura 13). Um dos animais positivos tinha apenas um olho, pois o outro havia sido retirado por enucleação, há 6 anos, como consequência de uveíte com prolapso da íris. Este animal foi inserido nos animais com resultado positivo em apenas um dos olhos.

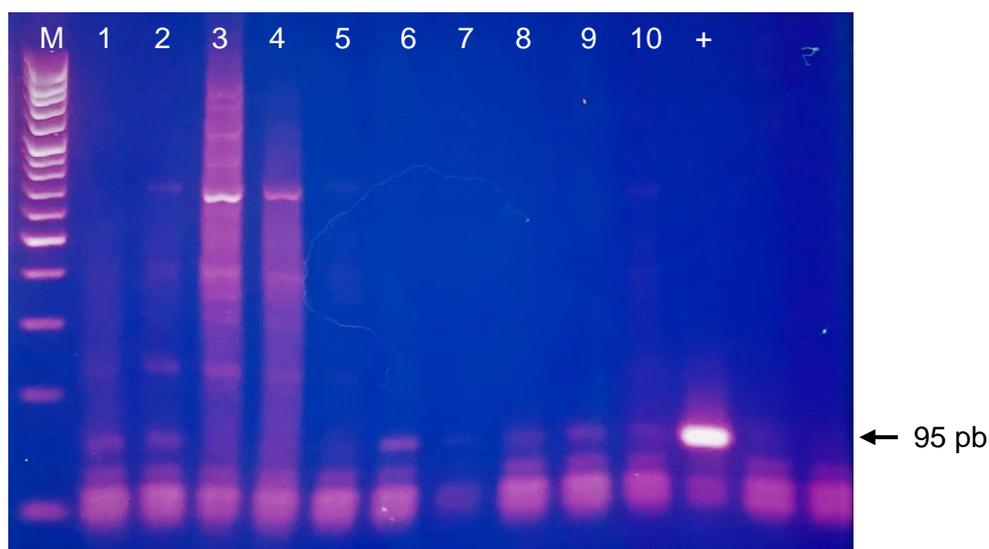


Figura 12 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do DNA de FHV-1. M: marcador de peso molecular (Hyperladder 1Kb, Bioline®); 1-10: amostras em estudo; +: controlo positivo; -: controlo negativo.

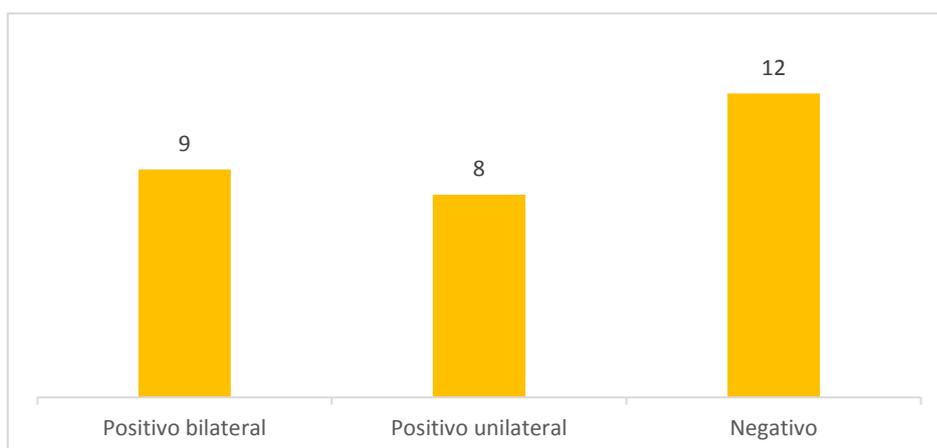


Figura 13 – Resumo dos resultados da PCR para detecção de FHV-1.

Quanto ao sexo, quatro machos inteiros, quatro machos castrados e quatro fêmeas castradas apresentaram resultado positivo para FHV-1. Os restantes cinco animais correspondiam a fêmeas inteiras.

De entre os gatos positivos para FHV-1, 41,2% (7/17) não se encontravam vacinados, 23,5% (4/17) estavam vacinados com a vacina trivalente, 17,7% (3/17) estavam vacinados com RCPCh, 11,8% (2/17) tinham iniciado o protocolo vacinal e, apenas, 5,9% (1/17) estava vacinado com a vacina pentavalente (figura 14).

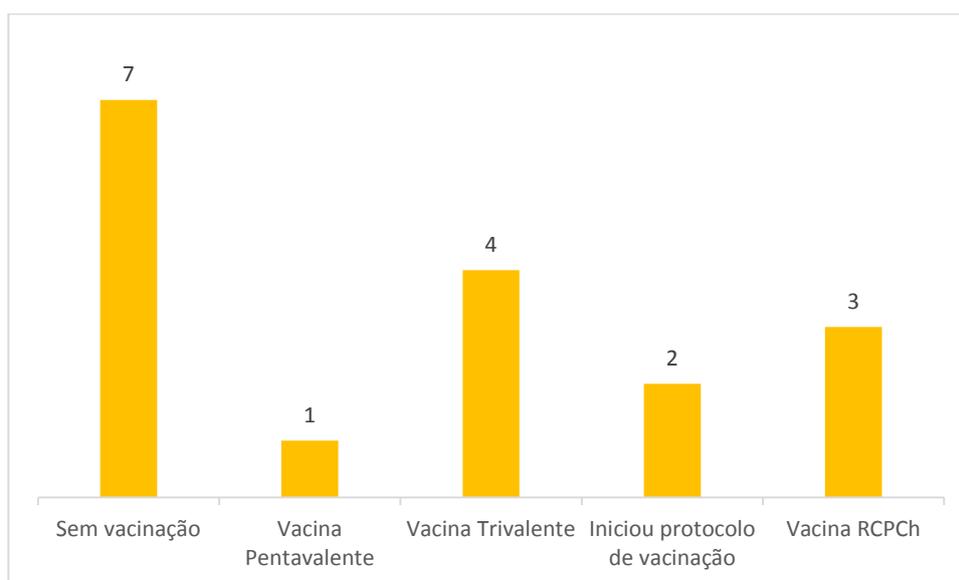


Figura 14 – Distribuição dos gatos positivos para FHV-1 em função dos protocolos de vacinação.

No que diz respeito ao protocolo de desparasitação adotado, 23,5% (4/17) tinham realizado um protocolo que abrangia as vertentes interna e externa, 23,5% (4/17) apenas realizaram desparasitação interna, 5,9% (1/17) havia efetuado desparasitação externa e 47,1% (8/17) não havia realizado qualquer tipo de desparasitação (figura 15).

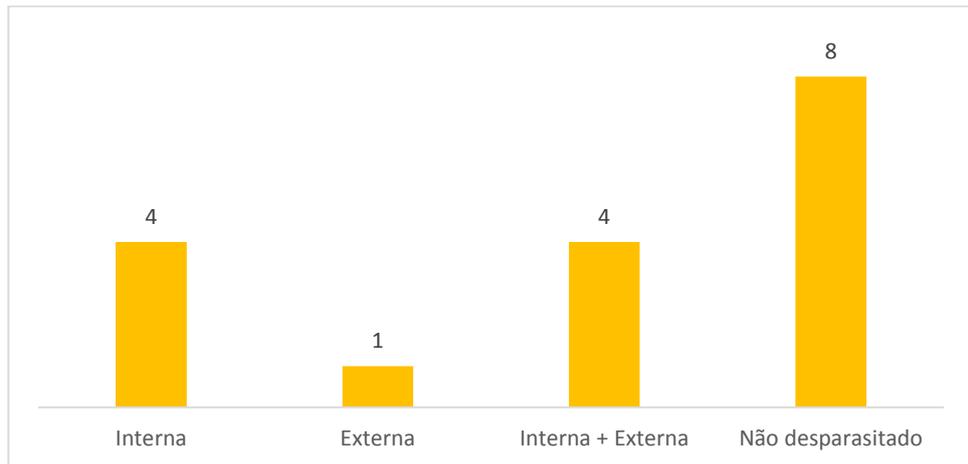


Figura 15 – Distribuição dos gatos positivos para FHV-1 em função dos protocolos de desparasitação.

Quanto ao tipo de habitação destes animais, 53,0% (9/17) viviam exclusivamente *indoor*, 23,5% (4/17) viviam exclusivamente *outdoor* e os restantes 23,5% (4/17) viviam dentro de casa, mas com acesso diário ao exterior (habitação mista) (figura 16).

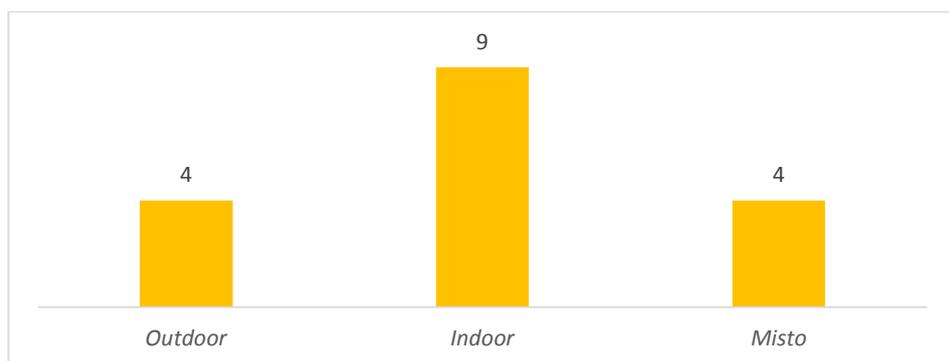


Figura 16 – Distribuição dos gatos positivos para FHV-1 em função do tipo de habitação.

No que concerne à coabitação, 64,7% (11/17) coabitavam com gatos com sinais clínicos de conjuntivite/DTRS, 17,7% (3/17) coabitavam com outros gatos sem sinais clínicos de conjuntivite/DTRS e os restantes viviam sem coabitantes (figura 17).

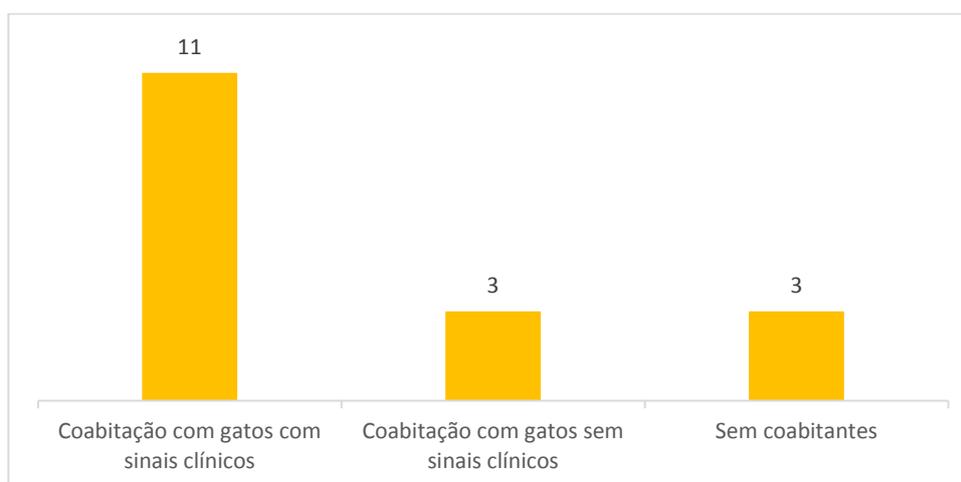


Figura 17 – Distribuição dos gatos positivos para FHV-1 em função da existência de coabitantes e do seu estado clínico.

A média de idades dos gatos com infecção por FHV-1 foi cerca de 49 meses, tendo a média de idades dos animais com infecção unilateral sido 52 meses. A média de idades dos animais com infecção bilateral foi de 46 meses.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais positivos encontram-se listados na tabela 12, assim como a respetiva frequência, sendo que os presentes com maior frequência em gatos infetados por FHV-1 foram espirros, corrimento ocular seroso e hiperemia bilateral.

Tabela 12 – Sinais clínicos apresentados pelos 17 animais positivos para FHV-1.

Sinais Clínicos	Frequência (n=17)	
	Absoluta	Relativa
Sinais clínicos não específicos de conjuntivite:		
Espirros	7	41,2%
Prostração	4	23,5%
Anorexia	4	23,5%
Corrimento oronasal seroso	4	23,5%
Pirexia	3	17,7%
Tosse	2	11,8%
Corrimento oronasal mucopurulento	1	5,9%
Icterícia	1	5,9%
Simbléfaro	1	5,9%
Úlceras linguais	1	5,9%

Sinais clínicos específicos de conjuntivite:		
Corrimento ocular seroso bilateral	6	35,3%
Hiperemia bilateral	5	29,4%
Corrimento ocular mucopurulento bilateral	4	23,5%
Hiperemia unilateral	3	17,7%
Corrimento ocular seroso unilateral	1	5,9%
Quemose bilateral	1	5,9%
Quemose unilateral	1	5,9%
Hiperemia + Quemose bilateral	1	5,9%
Sinais clínicos de conjuntivite bilateral		
	11	64,7%
Sinais clínicos de conjuntivite unilateral		
	4	23,5%

Importa, ainda, referir que 35,3% (6/17) dos animais positivos para FHV-1, não apresentavam corrimento ocular.

Por fim, dos 17 animais positivos para FHV-1, apenas 11,8% (2/17) não apresentavam sinais de conjuntivite, sendo que, dos restantes 15 animais, 23,5% (4/17) apresentavam conjuntivite unilateral e 64,7% (11/17) sinais de conjuntivite bilateral.

3.2.3. Citologia ocular para diagnóstico de FHV-1

Na citologia ocular não foram visualizadas inclusões virais suspeitas de infeção por FHV-1.

Em sete dos 17 animais positivos ao diagnóstico molecular (41,2%), não se visualizaram células inflamatórias. Nos restantes, foram detetadas, inflamação neutrofílica e linfocítica bilateral, inflamação neutrofílica unilateral e inflamação linfocítica unilateral, com uma frequência de dois animais (11,8%) por cada uma das inflamações. Com a frequência de um animal (5,9%) foram detetadas as seguintes inflamações: neutrofílica bilateral, linfocítica bilateral, e neutrofílica e linfocítica unilateral (figura 18). Por fim, um animal (5,9%) apresentava inflamação supurativa séptica (figura 19).

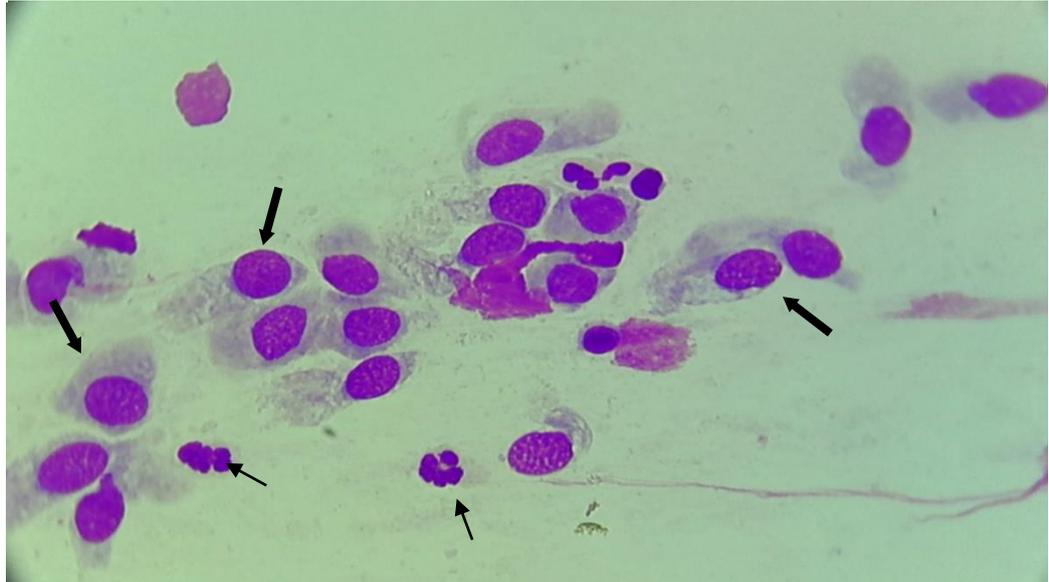


Figura 18 – Citologia conjuntival corada com May Grunwald-Giemsa QUICK STAIN onde se observam linfócitos (setas largas) e neutrófilos (setas finas) (objetiva de 400x) (original da autora).

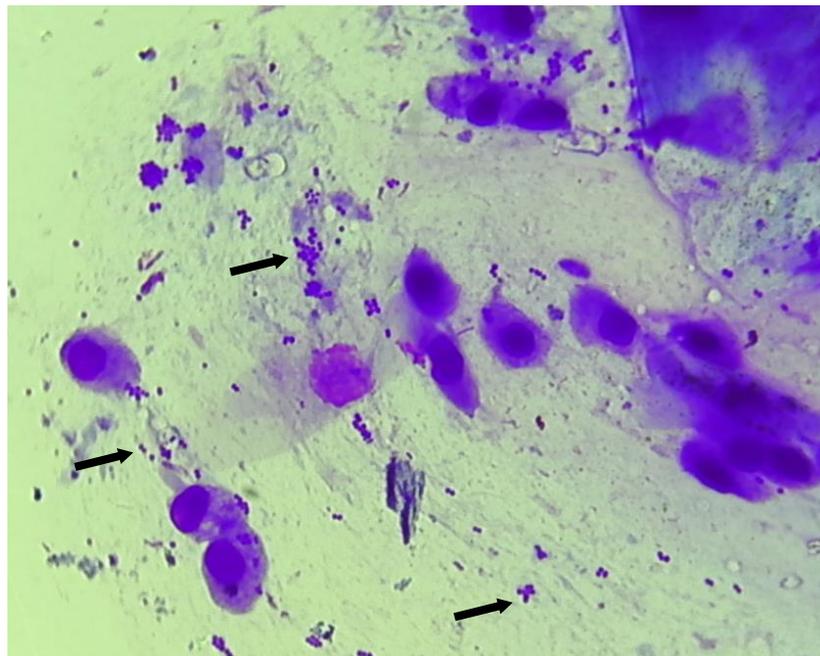


Figura 19 – Citologia conjuntival corada com May Grunwald-Giemsa QUICK STAIN onde se observam cocos livres (setas) (objetiva de 1000x) (original da autora).

3.2.4. Amplificação por PCR convencional de DNA de *M. felis*

Na reação de PCR convencional não foi amplificado DNA de *M.felis* em nenhuma das amostras, tendo estas sido consideradas negativas. Todas as reacções de PCR foram consideradas válidas por amplificação bem sucedida do DNA do controlo positivo.

3.2.5. Citologia ocular para diagnóstico de *M.felis*

Não foram visualizadas inclusões intracitoplasmáticas suspeitas de infecção por *M.felis* em nenhum dos animais estudados.

3.2.6. Resultados da PCR em tempo real para detecção de DNA de *C.felis*

Através da PCR em tempo real foi possível identificar *C. felis* em nove dos 29 (31,0%) gatos em estudo. Em todas as amostras consideradas positivas e no controlo positivo, a análise da curva de *melting* evidenciou um pico de grande intensidade, com uma temperatura de dissociação entre 82,3 °C e 82,5 °C, e alguns picos de menor intensidade (figura 20). Os picos de menor intensidade podem ser devidos à presença de dímeros de *primers* e/ou produtos de amplificação inespecífica.

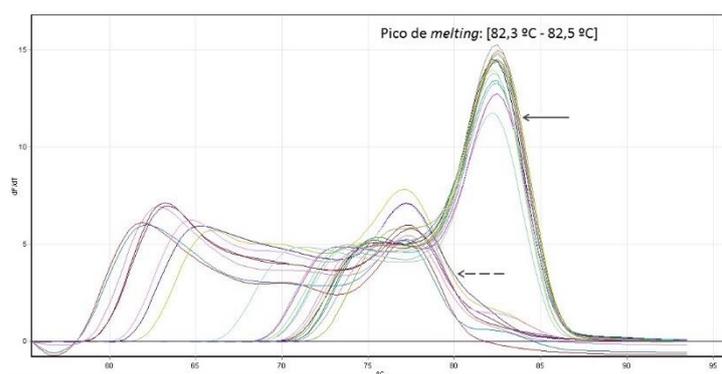


Figura 20 – Curva de *melting* de algumas das amostras em estudo. A seta contínua aponta para o controlo positivo e as amostras consideradas positivas. A seta interrompida aponta para o controlo negativo e as amostras consideradas negativas.

Nas amostras em que foi realizada a PCR convencional seguida de restrição com a enzima *Hinf I*, os resultados confirmaram a presença de DNA de *Chlamydomphila felis*.

De entre os nove gatos infetados com *C. felis*, 3 (33,3%) tinham uma apresentação unilateral e os restantes seis (66,7%) bilateral (figura 21). De referir que um dos animais positivos tinha, apenas, um olho, desconhecendo-se a história progressiva. Esse animal foi inserido no grupo de animais positivos em apenas um dos olhos.

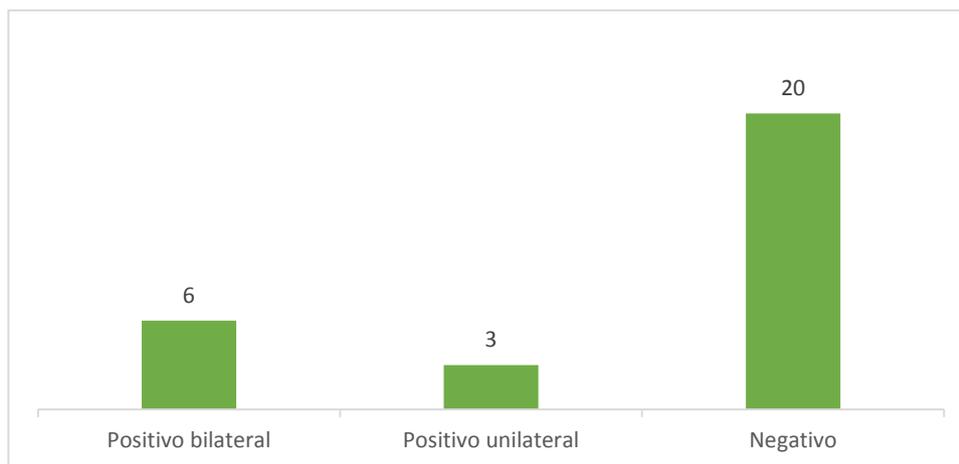


Figura 21 – Resultado da PCR para *Chlamydomphila felis*.

Os machos inteiros, foram os mais afectados, com quatro animais positivos (44,4%). Tanto machos como fêmeas castrados, apresentaram uma frequência de dois animais (22,2%). Apenas uma das fêmeas inteiras do estudo (11,1%) foi positiva para este agente.

Quatro dos gatos positivos (44,4%) não se encontravam vacinados e outros quatro (44,4%) estavam vacinados com a vacina trivalente. Apenas um gato (11,1%) estava vacinado com a vacina pentavalente (figura 22).

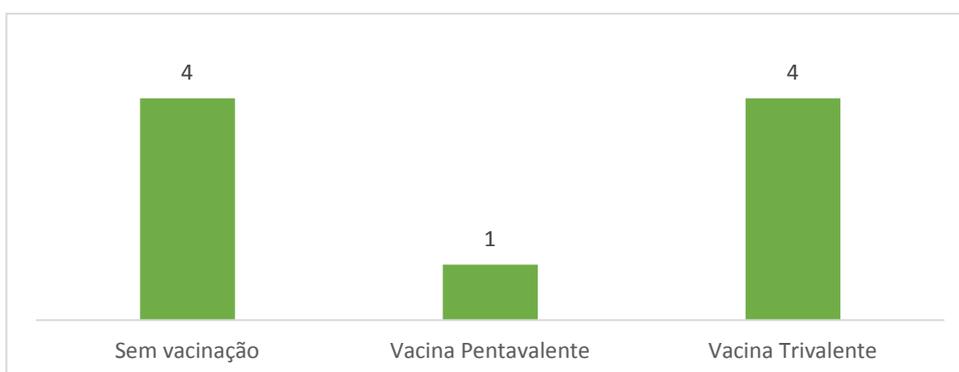


Figura 22 – Distribuição dos gatos positivos para *C.felis* em função dos protocolos de vacinação.

No que diz respeito ao protocolo de desparasitação adotado, 22,2% (2/9) dos gatos realizavam um protocolo que abrangia as vertentes interna e externa, 33,3% (3/9) apenas haviam sido submetidos a desparasitação interna, 11,1% (1/9) apenas a desparasitação externa e 33,3% (3/9) não tinham realizado qualquer tipo de desparasitação (figura 23).

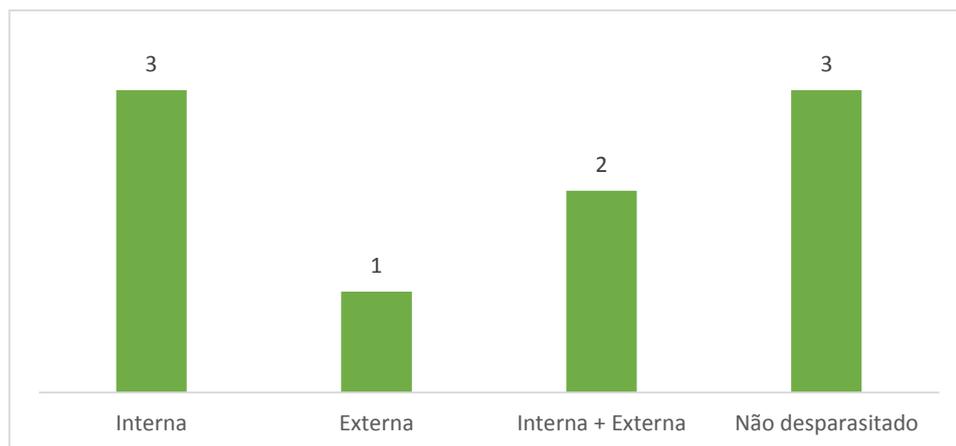


Figura 23 – Distribuição dos gatos positivos para *C.felis* em função dos protocolos de desparasitação.

Os tipos de habitação *indoor*, *outdoor* e mista apresentaram a mesma frequência de positivos, com três animais em cada categoria (33,3%).

De entre os gatos positivos para *C.felis*, 33,3% (3/9) coabitavam com gatos com sinais clínicos de conjuntivite/DTRS, 44,4% (4/9) com outros gatos sem sinais clínicos de conjuntivite/DTRS e os restantes, viviam sem contacto com outros gatos (figura 24).

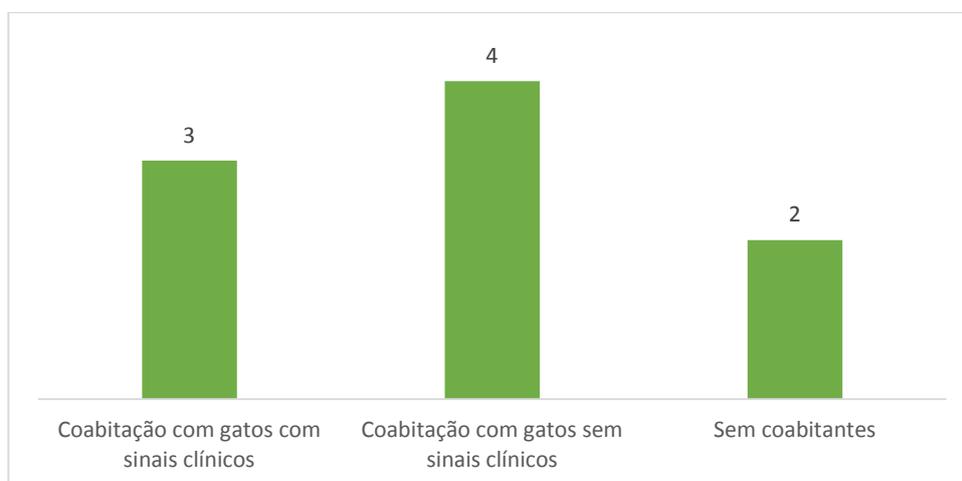


Figura 24 – Distribuição dos gatos positivos para *C.felis* em função da existência de coabitantes e do seu estado clínico.

A média de idades destes animais foi de 38 meses, sendo a média de idades dos animais positivos em apenas um dos olhos, superior à média das idades dos animais positivos para ambos os olhos (51 meses *versus* 32 meses, respetivamente).

Todos os animais apresentavam sinais de conjuntivite, quer unilateral (33,3%), quer bilateral (66,7%). Os sinais clínicos apresentados pelos animais positivos encontram-se listados na tabela 13, assim como a respetiva frequência.

Tabela 13 – Sinais clínicos apresentados pelos animais positivos para *C.felis*.

Sinais Clínicos	Frequência (n=9)	
	Absoluta	Relativa
Sinais clínicos não específicos de conjuntivite:		
Espirros	3	33,3%
Prostração	3	33,3%
Anorexia	2	22,2%
Pirexia	2	22,2%
Icterícia	1	11,1%
Corrimento oronasal seroso	1	11,1%
Sinais clínicos específicos de conjuntivite:		
Hiperemia bilateral	6	66,7%
Corrimento ocular mucopurulento bilateral	3	33,3%
Quemose bilateral	3	33,3%
Hiperemia unilateral	2	22,2%
Corrimento ocular seroso unilateral	1	11,1%
Corrimento ocular seroso bilateral	1	11,1%
Corrimento ocular mucopurulento unilateral	1	11,1%
Corrimento ocular mucopurulento + seroso	1	11,1%
Hiperemia + Quemose bilateral	1	11,1%
Sinais clínicos de cojuntivite bilateral	6	66,6%
Sinais clínicos de cojuntivite unilateral	3	33,3%

3.2.7. Citologia ocular para diagnóstico de *C.felis*

Em seis gatos positivos por PCR, foram visualizadas, em pelo menos um dos olhos, inclusões intracitoplasmáticas suspeitas de infecção por *C.felis* (figura 25). Estas foram detetadas, apenas, em um animal, de modo bilateral (figura 26). Não foram detetadas inclusões intracitoplasmáticas suspeitas de infecção por *C.felis* em nenhum dos animais negativos na PCR.

Em três dos nove animais positivos ao diagnóstico molecular (33,3%), não se visualizaram células inflamatórias. Nos restantes, foram detetadas, com igual frequência

(22,2%, 2/9), inflamação neutrofílica e linfocítica bilateral, inflamação neutrofílica e linfocítica unilateral e inflamação neutrofílica bilateral.

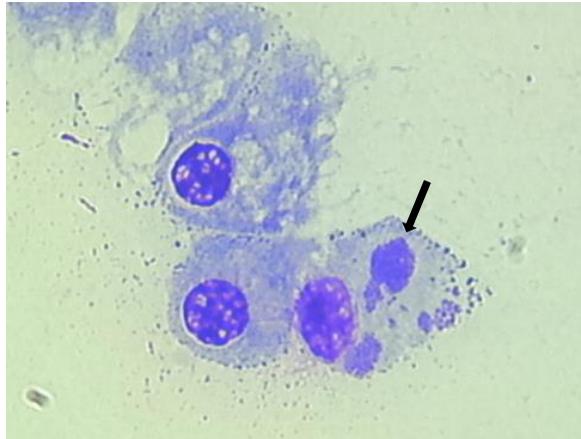


Figura 25 – Citologia conjuntival corada com May Grunwald-Giemsa QUICK STAIN, onde se observa inclusão intracitoplasmática de *C.felis* (seta) (objetiva de 1000x) (Original da autora).

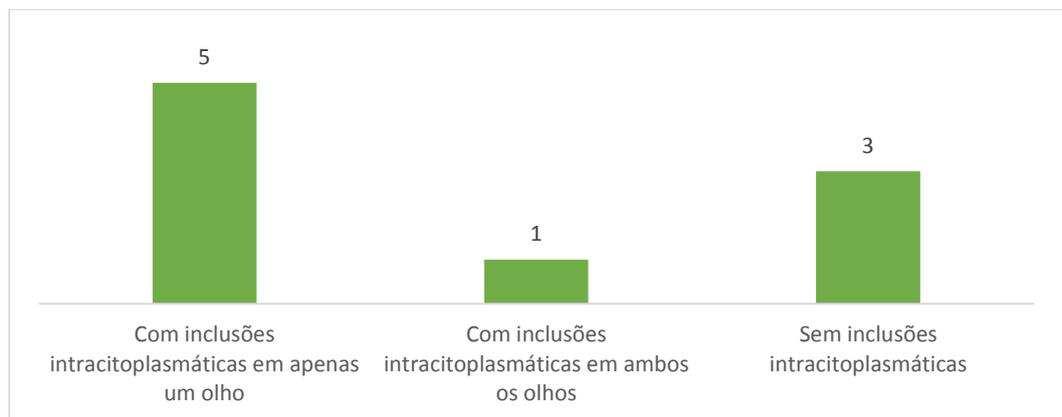


Figura 26 – Distribuição dos gatos positivos por PCR para *C.felis* em função da existência de inclusões intracitoplasmáticas.

3.2.8. Presença de co-infecções

Em 17,2% (5/29) dos gatos em estudo foi possível amplificar DNA de FHV-1 e de *C.felis*, isto é, 29,4% (5/17) (figura 27) dos animais infetados por FHV-1 e 55,5% (5/9) (figura 28) dos animais infetados por *C.felis*, estavam co-infetados (tabela 14).

Importa também realçar que tinha sido diagnosticada infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) a dois dos gatos infetados por *C.felis*.

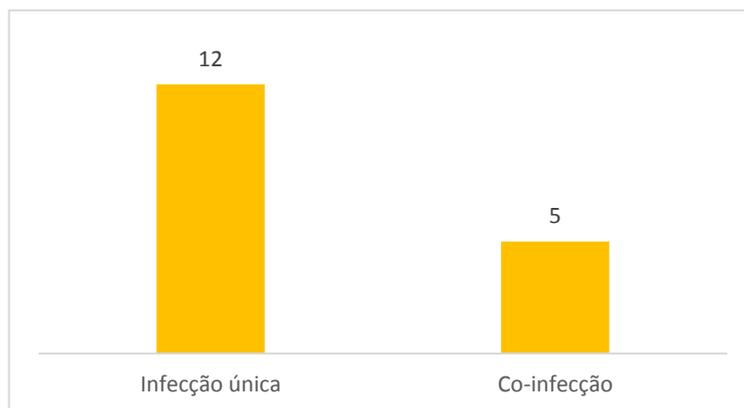


Figura 27 – Frequência dos gatos infectados por FHV-1 em infecção única e co-infecção.

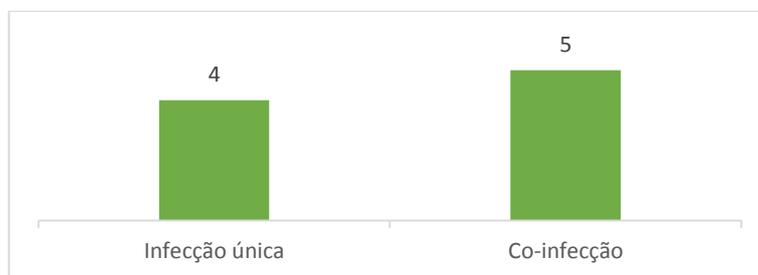


Figura 28 – Frequência dos gatos infectados por *C.felis* em infecção única e co-infecção.

Tabela 14 – Frequências dos diferentes agentes em estudo, em infecção única e em co-infecção.

Agentes em estudo	Frequência (n=29)	
	Absoluta	Relativa
FHV-1 (Co + IU)	17	58,6%
<i>C.felis</i> (Co + IU)	9	31,0%
FHV-1 + <i>C.felis</i>	5	17,2%
FHV-1 (IU)	12	41,3%
<i>C.felis</i> (IU)	4	13,8%

Co – co-infecção; IU – infecção única

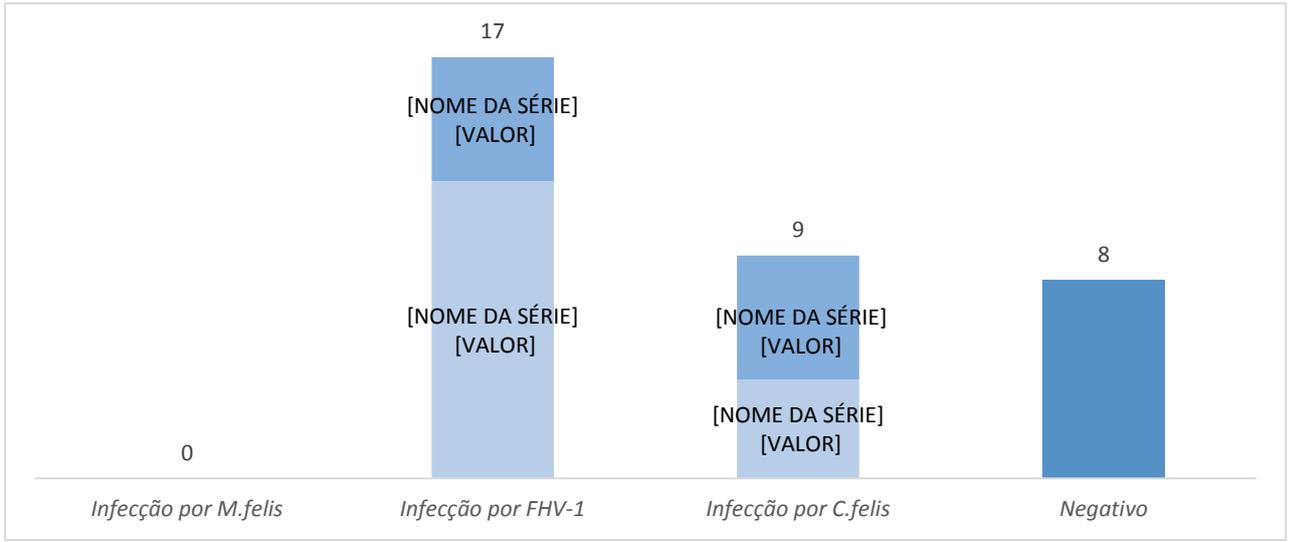


Figura 29 – Resumo dos resultados do diagnóstico molecular com a distribuição dos agentes em estudo (n=29).

4. Discussão de Resultados

A doença do trato respiratório superior e a conjuntivite são muito comuns em gatos, apesar de nem sempre lhes ser dada a devida importância, quer por parte de Médicos Veterinários, quer por parte dos tutores. O presente trabalho teve, assim, o objetivo de identificar, em gatos com sinais clínicos de DTRS/conjuntivite, a presença de *C.felis*, FHV-1 e *M.felis*.

Não se encontra descrita nenhuma predisposição de sexo para a infeção por *C.felis* (Sykes, 2005); porém, no presente estudo, 44,4% dos animais positivos para *C.felis* eram machos que se encontravam castrados. Estudos conduzidos por diversos autores apontam para uma predisposição três vezes superior por parte de machos inteiros para infeção por FHV-1 e para DTRS. Embora não exista uma explicação para esta predisposição, crê-se que possa ter origem em questões comportamentais, uma vez que gatos inteiros tendem a passar mais tempo no exterior e, conseqüentemente, a estarem mais expostos a agentes infecciosos (Binns *et al.*, 2000; Dinnage *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2017). No presente estudo, não se verificou nenhuma predisposição de sexo para a infeção por FHV-1, uma vez que tanto machos como fêmeas, castrados ou inteiros, apresentavam frequências semelhantes.

Sendo as causas infecciosas as mais comuns para conjuntivite, é compreensível que não tenham sido obtidos resultados positivos em gatos com idade inferior a oito semanas, visto que até esta idade os animais se encontram protegidos pelos anticorpos maternos (Wills, 1986; Stiles, 2003; Gould, 2011).

A média de idades dos animais em estudo foi 47 meses (figura 6). De entre os animais com PCR positivo para *C.felis* e FHV-1, a média de idades foi, respetivamente, 38 meses e 49 meses. Estas médias apresentam-se semelhantes entre si, porém um pouco elevadas em comparação ao descrito na literatura (Wills *et al.*, 1988; Sykes *et al.*, 1999a; Sykes, 2005; Turner 2010b; Fernandez *et al.*, 2017). Estas idades sugerem que, na maior parte dos gatos, não se tratasse de uma infeção primária. Contudo, esta hipótese deve ser colocada com cautela, dada a idade média dos animais em estudo ser relativamente elevada (47 meses) e devido ao facto de existir, apenas, um animal com idade inferior a 6 meses (idade até à qual as infeções primárias por FHV-1 são mais prováveis). Por outro lado, a mesma hipótese pode ser suportada pelo facto de, apenas, 23,5% de animais com PCR positivo para FHV-1 (tabela 12) e 33,3% dos positivos para *C.felis* (tabela 13), apresentarem conjuntivite unilateral, o que remete para a presença de uma infeção crónica (Nassise *et al.*, 1989b; Stiles, 2003; Sykes, 2005; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009; Turner 2010b;

Gould, 2011). À semelhança do que parece acontecer no presente estudo, também no estudo de Fernandez e colaboradores (2017), não se encontrou relação entre a idade jovem e estas infeções.

Os motivos que mais frequentemente levaram os animais à consulta foram a profilaxia e a realização de ovariohisterectomias/castrações. Embora todos os gatos em estudo apresentassem sinais clínicos de conjuntivite e/ou de DRTS, apenas 20,7% se apresentaram à consulta por esses motivos (figura 7). Estes dados provam que, embora a doença do trato respiratório superior seja frequente, é muitas das vezes negligenciada por parte dos tutores. Esta situação encontra-se, também, descrita na literatura (Lee-Fowler, 2014; Lister *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2018). Muitos tutores afirmam que não atribuem relevância, devido à cronicidade dos sinais clínicos e, na opinião dos mesmos, por não interferirem diretamente com a qualidade de vida dos animais, uma vez que não notam sinais de dor ou desconforto.

Nos gatos infetados por FHV-1 não existiu uma discrepância relevante entre animais desparasitados (9/17) e animais não desparasitados (8/17) (figura 15), ao invés dos resultados obtidos para *C.felis*, onde apenas um terço dos animais (3/9) não tinha efectuado qualquer tipo de protocolo de desparasitação (figura 23). A percentagem de animais com resultado negativo para todos os agentes foi superior em gatos não desparasitados. Não foi encontrada na literatura nenhuma relação entre a desparasitação dos animais e a infeção pelos agentes em estudo. Porém, seria expectável que um animal parasitado pudesse apresentar alguma imunossupressão e, por isso, encontrar-se mais vulnerável a qualquer uma das infeções ou, no caso de já estar infetado por FHV-1, acontecer uma reativação da infeção. Note-se, no entanto, que 51,7% dos animais em estudo, não estavam desparasitados (figura 8), o que poderá justificar esta observação.

Apenas quatro animais estavam vacinados com um protocolo que confere imunidade contra a clamidiose felina (figura 9), o que é justificável por não se tratar de uma vacina *core*, contrariamente à vacina trivalente (Gruffydd-Jones, 2009; Fernandez *et al.*, 2017). A vacina RCP+Ch mostrou-se competente para *C.felis*, pois nenhum destes animais apresentou resultado positivo para este agente (figura 22).

De entre os 12 animais vacinados com protocolos que conferem imunidade contra FHV-1 (trivalente, pentavalente e RCP+Ch), oito apresentaram resultado positivo para FHV-1, sendo que quatro estavam vacinados com a vacina trivalente, três estavam vacinados com RCP+Ch, dois tinham iniciado o protocolo vacinal e, apenas, um gato estava vacinado

com a vacina pentavalente (figura 14). Estes resultados comprovam o descrito na literatura, onde se relata a importância da verificação do estado de vacinação dos animais infetados (incluindo a mãe, quando se trata de animais jovens) (Gould, 2011). Porém, animais vacinados também podem desenvolver a infeção por FHV-1, ainda que geralmente de forma muito mais leve, uma vez que as vacinas apenas reduzem a gravidade dos sinais clínicos, não prevenindo nem a infeção, nem a reativação do vírus latente (Stiles, 2003; Turner, 2010b). Por outro lado, alguns dos animais em estudo provinham de Associações que recolhem animais errantes, tendo estes sido vacinados já em adultos, não se conhecendo o seu historial clínico, nem se já estariam infetados aquando da vacinação, encontrando-se vírus na sua fase de latência.

Relativamente ao tipo de habitação dos animais em estudo, seria expectável que a maioria dos gatos infetados tivesse acesso ao exterior, uma vez que a probabilidade de infeção é superior, devido ao contacto com animais infetados ou fómite (Halanova *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2017; Lobova *et al.*, 2019). Contudo, tal facto nem sempre se verificou. Embora mais de metade dos animais em estudo tivesse acesso ao exterior, 53,0% dos positivos para FHV-1 viviam exclusivamente *indoor* (figura 16). Relativamente aos gatos positivos para *C.felis*, 66,7% tinham acesso ao exterior, embora metade deles em regime misto.

Apenas três animais positivos a FHV-1 e dois animais positivos para *C.felis* não coabitavam com outros gatos. De entre os animais com infeção por FHV-1, 64,7% coabitavam com gatos com sinais clínicos de DTRS/conjuntivite, o mesmo acontecendo a 33,3% dos gatos positivos para *C.felis* (figuras 17 e 24, respetivamente). Esta situação torna mais provável a sua infeção, conforme descrito por diversos autores (Hanselaer *et al.*, 1989; Yan *et al.*, 2000; Turner, 2010b; Halanova *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2017). É, também, importante referir que a maior parte dos gatos em estudo foram resgatados da rua e, por isso, a probabilidade de terem coabitado com animais com sinais clínicos é superior.

No que respeita aos sinais clínicos, dos animais em estudo, 20,7% não apresentavam historial clínico progresso de conjuntivite, o que leva a crer tratarem-se de infeções agudas. Por outro lado, 37,9% já tinham historial de conjuntivite, o que remete para a presença de infeção crónica. Sobre os restantes 41,4% dos animais, não foi possível obter essa informação, por se tratarem de animais de rua e/ou recém adotados.

O sinal clínico não específico de conjuntivite mais frequente nos gatos infectados foram os espirros, com 41,2% nos positivos para FHV-1 e 33,3% nos positivos para *C.felis*

(tabelas 12 e 13). Estes resultados corroboram o descrito por Sykes *et al.* (1999a), que descrevem que animais que apresentam espirros estão mais frequentemente infetados por FHV-1 do que por *C.felis*. Prostração e anorexia foram, também, sinais clínicos comuns, com uma frequência de 23,5% cada, para animais positivos a FHV-1 e 33,3% e 22,2%, respetivamente, para animais positivos para *C.felis* (Helps *et al.*, 2005; Dinnage *et al.*, 2009) (tabelas 12 e 13).

O sinal de conjuntivite apresentado com maior frequência na população em estudo foi o corrimento ocular seroso, observado em 55,2% dos gatos, seguido de hiperemia conjuntival, com 48,3% (tabela 11). Estes foram, também, os sinais clínicos mais frequentemente representados nas infeções por FHV-1, contrariamente ao que se verificou nos animais infetados por *C.felis*, onde a hiperemia foi o sinal mais frequente, seguido de quemose e corrimento ocular mucopurulento (tabelas 12 e 13). Segundo a literatura consultada, estes são os sinais clínicos mais comuns em gatos infetados tanto por FHV-1 como por *C.felis*, à semelhança do encontrado no presente estudo. Era, também, expectável que o tipo de corrimento ocular mais frequente fosse o corrimento ocular seroso, pois é o mais comum em infeções pelos agentes em estudo e porque antecede os restantes tipos de corrimento (Hoover *et al.*, 1978; Wills & Gaskell, 1985; Nasisse *et al.*, 1989b; Morgan 1994; Morgan *et al.*, 1996; Stiles, 1995; Nasisse *et al.*, 1998; Ramsey, 2000; Allgoewer *et al.*, 2001; Stiles, 2003; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009; Turner, 2010b; Gould, 2011; Stiles, 2013).

Os sinais clínicos de conjuntivite observados nos gatos com infeção, apresentaram-se, mais frequentemente, de modo bilateral, em particular nos infectados por *C.felis* (figura 13 e 21), indo ao encontro da hipótese de que a maioria das infeções diagnosticadas, são infeções secundárias ou que estiveram em período de latência (Sykes, 2005; Gruffydd-Jones *et al.*, 2009).

Dois dos animais positivos para FHV-1, não apresentavam quaisquer sinais de conjuntivite no momento da recolha. Embora possível, a hipótese de se tratarem de falsos positivos é remota, apontando para uma infeção em fase de latência (Turner, 2010b).

No presente estudo, FHV-1 foi o agente etiológico detetado em maior número de gatos (n=17) (tabela 14, figura 29), tal como esperado, pois este encontra-se descrito como sendo a maior causa de conjuntivite crónica e aguda nesta espécie (Nasisse *et al.*, 1993). A taxa de infeção detetada para agente foi de 58,6% (tabela 14). Este valor foi superior ao já descrito por Hartmann e colaboradores (2010), onde foi determinada uma prevalência de 27% (11/41), utilizando a mesma técnica e tendo o mesmo gene como alvo. Porém, o resultado obtido encontra-se dentro dos valores descritos por vários autores, entre 1% e 88,9%, utilizando diversos métodos de diagnóstico (Hara *et al.* 1996; Stiles *et al.*, 1997a;

Stiles *et al.*, 1997b; Burgesser *et al.*, 1999; Maggs *et al.*, 1999b; Sykes *et al.*, 1999a; Sykes *et al.*, 2001; Helps *et al.*, 2003; Maggs & Clarke, 2005; Volopich *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018).

Ao exame citológico, não foram visualizadas quaisquer inclusões virais, sugestivas de infecção por FHV-1. Este resultado comprova a baixa sensibilidade do diagnóstico citológico face ao diagnóstico molecular, como descrito na literatura consultada, onde se relata que a visualização destas inclusões é pouco frequente (Volopich *et al.*, 2005; Amor, 2014, p.60; Hillstrom *et al.*, 2012). De entre os animais positivos para FHV-1 através da PCR, 41,2% não apresentavam inflamação em nenhum dos olhos. Hillstrom e colaboradores (2012), descrevem uma prevalência de 44% de animais positivos para FHV-1 por PCR que não apresentavam inflamação ou com inflamação ligeira. Contrariamente ao descrito por estes autores, onde nenhum dos animais positivos para FHV-1 na PCR apresentou inflamação linfocítica nem bacteriana, no presente estudo um gato apresentava inflamação bacteriana e três inflamação linfocítica. Esta diferença de resultados pode dever-se ao baixo número de amostras do estudo de Hillstrom e colaboradores (2012) face ao presente (8 animais *versus* 17 animais). Por outro lado, a infecção bacteriana pode não ter sido a etiologia primária de conjuntivite, não estando, por isso, diretamente associada à infecção por FHV-1. Possivelmente, a presença dessa infecção bacteriana poderá dever-se a uma infecção de carácter oportunista por parte da própria microbiota bacteriana da conjuntiva face à conjuntivite (Souza *et al.*, 2010).

Outra justificação para esta discrepância entre resultados das duas técnicas utilizadas prende-se com a possibilidade de ocorrência de falsos positivos no diagnóstico por PCR e falsos negativos no diagnóstico citológico. Os resultados falso-positivos poderão dever-se a contaminações com DNA exógeno, enquanto que os falso-negativos poderão relacionar-se com a baixa celularidade de algumas das amostras. No presente trabalho, porque nos controlos negativos realizados em todos os PCR, não ocorreu amplificação de DNA, a hipótese da ocorrência de resultados falso positivos parece remota.

A taxa de infecção por *C.felis* no presente estudo foi de 31,0% (tabela 14). Este valor encontra-se próximo dos valores descritos na literatura. Diversos estudos epidemiológicos mostram prevalências entre 3,12% e 30% em animais que apresentam conjuntivite (Shewen *et al.*, 1980; Wills *et al.*, 1988; Hanselaer *et al.*, 1989; Gruffydd-Jones *et al.*, 1995; Iwamoto *et al.*, 2001; Rampazzo *et al.*, 2003; Low *et al.*, 2007; Baumworcel *et al.*, 2017; Fernandez *et al.*, 2017). Schulz e colaboradores (2015) obtiveram, por PCR, uma frequência de 35,6% (37/104) para *C.felis* em animais com DTRS, quando estudadas quatro amostras de diferentes locais (faringe, língua, nariz e conjuntiva) para cada animal.

Considerando, apenas, os animais positivos em amostras retiradas da conjuntiva (tal como acontece no presente estudo), a frequência foi de, apenas, 24,0%. O valor obtido no presente estudo poderia, também, ser superior se tivessem sido analisadas amostras de outras localizações.

De entre os animais com PCR positivo para *C.felis*, 66,6% apresentaram inclusões intracitoplasmáticas suspeitas de infecção por este agente (figura 25). As prevalências encontradas na literatura variam entre 20% e 100%, para animais positivos por PCR (Hillstrom *et al.*, 2012; Amor, 2014, p.61; Anderlini *et al.*, 2018). As inclusões intracitoplasmáticas diagnósticas de *C.felis* são visualizadas com maior probabilidade entre os 7 e os 14 dias após a infecção, o que pode contribuir para a existência de resultados falso negativos, caso a citologia seja realizada fora deste intervalo de tempo (Ramsey, 2000; Rand, 2006; Hillstrom *et al.*, 2012).

No presente trabalho, em 33,3% dos gatos positivos para *C.felis*, não foram visualizadas células inflamatórias. As inflamações neutrofílica bilateral, mista bilateral e mista unilateral apresentaram-se com a mesma frequência (22,2%). No estudo de Hillstrom e colaboradores (2012), todos os animais apresentavam inflamação, sendo que 37% dos mesmos apresentavam inflamação neutrofílica, 37% inflamação linfocítica e 25% inflamação mista. Estes resultados podem servir como referência; porém, não podem ser tidos como comparação direta, pois os autores apenas retiraram uma amostra ao olho afetado com maior gravidade, ao passo que, no presente trabalho, existe uma dinâmica uni/bilateral.

No presente trabalho não foram identificados gatos infectados com *M.felis*. Embora os organismos do género *Mycoplasma* sejam, frequentemente, encontrados, quer em gatos sintomáticos, quer em gatos assintomáticos, o seu papel como agente etiológico primário nas conjuntivites e na DTRS carece, ainda, de certezas, existindo estudos contraditórios (Campbell *et al.*, 1973; Tan, 1974; Haesebrouck *et al.*, 1991; Low *et al.*, 2007; Sjö Dahl-Essén *et al.*, 2008; Veir *et al.*, 2008; Holst *et al.*, 2010; Hillström *et al.*, 2012; Gourkow *et al.*, 2013; Stiles, 2013; Fernandez *et al.*, 2017). À semelhança dos resultados aqui obtidos, a ausência de infecção também foi descrita noutros estudos semelhantes (Sjö Dahl-Essén *et al.*, 2008; Amor, 2014).

Embora a citologia conjuntival não seja tida como o método de diagnóstico mais eficaz para este agente, no presente estudo não foram encontrados organismos compatíveis com a infecção por *M.felis*, em nenhuma das amostras observadas, o que vai ao encontro dos resultados obtidos através da PCR.

Dos 29 gatos em estudo, apenas cinco (17,2%) foram positivos tanto para FHV-1 como para *C.felis* (tabela 14). Este valor está um pouco abaixo do descrito por Fernandez e colaboradores (2017), onde 35,4% (92/260) dos animais que apresentavam sintomatologia clínica, estavam co-infetados. De notar que este estudo incluía não só um maior número de animais, como animais com sintomatologia de conjuntivite, DTRS e/ou gengivoestomatite, não especificando quantos animais co-infetados apresentavam sintomatologia de gengivoestomatite, pelo que, as duas populações não são comparáveis. Outro fator que pode justificar a discrepância entre resultados é o facto de o estudo de Fernandez e colaboradores (2017) incluir, também, o diagnóstico de Calicivírus felino. Num estudo levado a cabo por Loba e colaboradores (2019), foi obtido um valor de 17,4% (38/218) para animais co-infetados. Este valor é semelhante ao obtido no presente estudo; porém, além dos agentes estudados no presente trabalho, os autores estudaram, também, Calicivírus felino e *Bordetella bronchiseptica*, pelo que os valores devem ser comparados com cautela. Acresce, ainda, que o estudo de Loba e colaboradores (2019) engloba, quer animais com sintomatologia clínica de DTRS, quer animais clinicamente saudáveis, isto é, a população em estudo é distinta da do presente estudo.

O único gato que, no presente estudo, apresentava, simultaneamente, hiperemia e quemose, de forma bilateral, encontrava-se infetado tanto por FHV-1 como por *C.felis*. Todos os animais co-infetados apresentavam conjuntivite com hiperemia.

Dos animais infetados por *C.felis*, 55,5% estavam co-infetados com FHV-1 (tabela 14). Este valor está dentro dos valores descritos na literatura, que variam entre os 8% e os 64% (Wills *et al.*, 1988; Von Bomhard *et al.*, 2003).

Dois animais estavam infetados, simultaneamente, com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e *C.felis*. Esta co-infecção prolonga a duração da conjuntivite e o tempo de excreção de *C.felis* forma considerável (O'Dair *et al.*, 1994; Loba *et al.*, 2019). Gatos infetados com FIV excretam o vírus durante um período que pode ir até 270 dias, o que contrasta com os 70 dias de excreção em animais não infetados com FIV (O'Dair *et al.*, 1994). Os gatos do presente estudo tinham sido resgatados da rua recentemente, não se sabendo, por isso, a data do início dos sinais clínicos.

Oito dos animais inseridos no estudo, não apresentaram resultado positivo para nenhum dos agentes estudados. Embora a hipótese de se tratarem de falsos-negativos devido, por exemplo, a recolha insuficiente da amostra e/ou à fase de latência característica de algumas destas infeções, não possa ser colocada de parte, existem outras etiologias que podem explicar os sinais clínicos por estes apresentados, nomeadamente, infecção por calicivírus, conjuntivite bacteriana, conjuntivite alérgica, corpo estranho/trauma,

queratoconjuntivite seca, queratoconjuntivite eosinofílica ou neoplasia (ex: linfoma). A conjuntivite pode, ainda, ser secundária a outra doença ocular como entrópio, uveíte, glaucoma ou, ainda, à presença de uma massa na região orbital (que, por sua vez, pode obstruir a drenagem venosa, causando hiperemia e quemose) (Maggs, 2008; Turner, 2010a; Hartley, 2014).

No presente estudo, podemos apontar como principal limitação, o número de amostras, que se desejava maior, e a falta de seguimento clínicos dos casos, uma vez que os animais provinham, maioritariamente, de Associações ou Abrigos de animais retirados da rua. Seria, também, oportuno continuar este estudo, porém, com maior número de amostras, recolhidas de outras localizações, como a língua, faringe e nariz.

Apesar das limitações acima referidas, este estudo contribuiu para reafirmar a técnica de PCR como a técnica de eleição, comparativamente à citologia conjuntival, para o diagnóstico de FHV-1 e *C.felis* e confirmar FHV-1 como um importante agente responsável por conjuntivites associadas a DTRS. Sendo escassos os estudos desta natureza em Portugal, o presente estudo é, também, importante para conhecer melhor a realidade nacional no que toca à prevalência destes agentes.

5. Conclusões

A conjuntivite e a DTRS são doenças encontradas, com muita frequência, na prática clínica de pequenos animais, o que, por si só, torna crucial o seu estudo.

Com o presente trabalho foi possível, não só comprovar a origem infecciosa de grande parte das conjuntivites associadas à doença do trato respiratório superior, como conhecer melhor os seus agentes etiológicos e a abordagem ao seu diagnóstico.

Tal como esperado, as etiologias não infecciosas mostraram-se pouco frequentes, dando ênfase ao papel dos agentes infecciosos nas conjuntivites associadas à DTRS.

Tal como descrito na literatura, o FHV-1 foi o agente diagnosticado com mais frequência (58,6%), seguido de *Chlamydomphila felis* (31,0%).

Este trabalho vem acentuar a dúvida relativa ao papel de *Mycoplasma felis* como agente primário nas conjuntivites associadas à DTRS, uma vez que este agente não foi diagnosticado em nenhum dos animais em estudo.

Os sinais clínicos apresentados não permitiram, por si só, diferenciar qual/quais o(s) agente(s) etiológico(s) presente(s), acentuando a necessidade de métodos diagnósticos complementares distintos para um correto diagnóstico. Este diagnóstico é importante para que a terapêutica implementada seja a adequada.

A PCR mostrou-se o método de diagnóstico mais indicado para os agentes em estudo. Embora mais eficaz do que a citologia conjuntival, apresenta a desvantagem de ser uma técnica mais dispendiosa, o que a torna menos comum na prática clínica. Assim sendo, na impossibilidade de realizar PCR, a citologia conjuntival mostra-se uma boa alternativa, principalmente para o diagnóstico de *C.felis*. Embora possa não permitir um diagnóstico definitivo, a citologia conjuntival permite uma orientação diagnóstica, rápida, não dispendiosa, passível de ser realizada em qualquer clínica e que pode ser muito útil.

Por fim, o presente trabalho foi, também, particularmente útil na sensibilização dos tutores quanto à presença de conjuntivites nos seus animais, uma vez que estas se mostram, frequentemente, subvalorizadas, não sendo com frequência, motivo de apresentação do animal à consulta.

6. Referências Bibliográficas

- Allgoewer, I., Schaffer, E.H., Stockhaus, C., Vogtlin, A. (2001). Feline eosinophilic conjunctivitis. *Vet Ophthalmol*, 4(1), 69-74.
- Amor, D. (2014). *Etiologia das conjuntivites felinas e abordagem ao seu diagnóstico* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Lisboa.
- Amstey, M.S., Metcalf, S. (1975). Effect of povidone-iodine on herpesvirus type 2, in vitro. *Obstet Gynecol*, 46(5), 528-529.
- Anderlini, G. P.O., Neto, J. E., Anderlini, G. A., Omena, P. N.M, Souza, E.H.L.S., da Silva, J. K. A., Barbosa, S.M.V, *et al.* (2018). Estudo clínico-oftálmico e citológico de felinos domésticos com conjuntivite e mantidos em adensamento populacional. *PubVet*, 12(8), 1-8.
- Azuma, Y., Hirakawa, H., Yamashita, A., Cai, Y., Rahman, A., Suzuki, H., *et al.* (2006). Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydophila felis*. *DNA Res*, 13(1), 15-23.
- Baker, J.A. (1944). A virus causing pneumonia in cats and producing elementary bodies. *J Exp Med*, 79(2), 159-171.
- Ballin, A.C., Schulz, B., Helps, C., Sauter-Louis, C., Mueller, R.S., Hartmann, K. (2014). Limited efficacy of topical recombinant feline interferon-omega for treatment of cats with acute upper respiratory viral disease. *Vet J*, 202(3), 466–470.
- Bannasch, M.J., Foley, J.E. (2005). Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *J Feline Med Surg*, 7(2), 109–119.
- Barnett, K. (2006). Conjunctiva, Limbus, Sclera. In: K. Barnett (Ed.) *Diagnostic Atlas of Veterinary Ophthalmology* (2ª Ed., pp. 35-45). London, United Kingdom: Mosby, Elsevier.
- Barrs, V.R., Allan, G.S., Martin, P., Beatty, J.A., Malik, R. (2005). Feline pyothorax: a retrospective study of 27 cases in Australia. *J Feline Med Surg*, 7(4), 211–222.
- Bauer, G.A., Spiess, B.M., Lutz, H. (1996). Exfoliative cytology of conjunctiva and cornea in domestic animals: a comparison of four collecting techniques. *Vet Comp Ophthalmol*, 6(3), 181-186.
- Baumworcel, N., Soares, A.N.M., Silva, S.B., Almeida, N.K.O, Castro, T.X. (2017). Correlation between clinical signs of feline conjunctivitis and molecular detection of felid herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydophila felis* and *Mycoplasma felis* in cats from shelters in Rio de Janeiro. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 54(1), 18-26.
- Beaumont, S.L., Maggs, D.J., Clarke, H.E. (2003). Effects of bovine lactoferrin on in vitro replication of feline herpesvirus. *Vet Ophthalmol*, 6(3), 245–250.
- Bemis, D.A. (1992). *Bordetella* and *Mycoplasma* respiratory infections in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 22(5), 1173–1186.

Binns, S.H., Dawson, S., Speakman, A.J., Cuevas, L.E., Hart, C.A., Gaskell, C.J., Morgan, K.L., *et al.* (2000). A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *J Feline Med Surg*, 2(3), 123–133.

Bistner, S.I., Carlson, J.H., Shively, J.N., Scott, F.W. (1971). Ocular manifestations of feline herpesvirus infection. *J Am Vet Med Assoc*, 159(10), 1223-1237.

Blackmore, D.K., Hill, A.(1973). The experimental transmission of various mycoplasmas of feline origin to domestic cats (*Felis catus*). *J Small Anim Pract*, 14(1), 7–13.

Bongrand, Y., Blais, M.C., Alexander, K. (2012). Atypical pneumonia associated with a *Mycoplasma* isolate in a kitten. *Can Vet J*, 53(10), 1109–1113.

Bonilla, H.F., Chenoweth, C.E., Tully, J.G., Blythe, L.K., Robertson, V.M., Ognenovski, V.M., Kauffman, C.A. (1997). *Mycoplasma felis* septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinaemia. *Clin Infect Diseases*, 24(2), 222–225.

Bolzan, A.A., Brunelli, A.T.J., Castro, M.B., Souza, M.A., Souza, J.L. (2005). Conjunctival impression cytology in dogs. *Vet Ophthalmol*, 8(6), 401-405.

Bracklein, T., Theise, S., Metzler, A., Spiess, B.M., Richter, M. (2006). Activity of feline interferon-omega after ocular or oral administration in cats as indicated by Mx protein expression in conjunctival and white blood cells. *Am J Vet Res*, 67(6),1025–1032.

Brandão C.V.S., Minto B.W., Rocha N.S., Ranzani J.J.T. (2002). Citologia conjuntival por impressão em gatos (*Felis domestica*). *Revta Educ. Cont. CRMV-SP*, 5(1), 41-47.

Burgesser, K.M., Hotaling, S., Schiebel, A., Ashbaugh, S.E., Roberts, S.M., Collins, J.K.. (1999). Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. *J Vet Diagn Invest*, 11(2), 122–126.

Cai, Y., Fukushi, H., Koyasu, S., Kuroda, E., Yamaguchi, T., Hirai, K. (2002). An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *J Vet Med Sci.*, 64(3), 215-219.

Campbell, L.H., Snyder, S.B., Reed, C., Fox, J.G. (1973). *Mycoplasma felis*-associated conjunctivitis in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 163(8), 991–995.

Cantell, K., Pyhala, L. (1973). Circulating interferon in rabbits after administration of human interferon by various routes. *J Gen Virol*, 20(1), 97-104.

Cave, N.J., Dennis, K., Gopakumar, G., Dunowska, M. (2014). Effects of physiologic concentrations of L-lysine on in vitro replication of feline herpesvirus 1. *Am J Vet Res*, 75(6), 572–580.

Cerruti, R.L., Connell, E.V., Trown, P.W., Sim, I.S. (1985). Synergistic interaction between interferon-alpha and acyclovir in the treatment of herpes simplex virus type 1 infection in mice. *Antiviral Res*, 5(1), 217–223.

Chalker, V.J., Owen, W.M., Paterson, C.J., Brownlie, J. (2004). Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats. *Vet Microbiol*, 100(1-2), 77–82.

Chin, G.N. (1978). Treatment of herpes simplex keratitis with idoxuridine and vidarabine: a double-blind study. *Ann Ophthalmol*, 10(9), 1171–1174.

Cocker, F.M., Howard, P.E., Harbour, D.A. (1987). Effect of human alpha-hybrid interferon on the course of feline viral rhinotracheitis. *Vet Rec*, 120(16), 391–393.

Crispin, S. (2002). The conjunctiva. In: S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.), *BSAVA manual of small animal ophthalmology*. (2^a Ed., pp.124-133). England: BSAVA.

Dawson, C.R. (1975). Lids, conjunctiva, and lacrimal apparatus: eye infections with Chlamydia. *Arch Ophthalmol*, 93(9), 854–862.

Dewhurst, E., Carter, J., Scurrall, E. (2012). Laboratory investigation of ophthalmic disease. In: D. Gould & G. McLellan. (Eds.) *BSAVA Manual of Canine and Feline Ophthalmology* (3^a Ed., pp. 51-60). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association

Déan, R., Harley, R., Helps, C., Caney, S., Gruffydd-Jones, T. (2005). Use of quantitative real-time PCR to monitor the response of *Chlamydia felis* infection to doxycycline treatment. *J Clin Microbiol*, 43(4), 1858-1864.

Di Francesco, A., Piva, S., Baldelliw, R. (2004). Prevalence of *Chlamydia felis* by PCR among healthy pet cats in Italy. *New Microbiol*, 27(2), 199-202.

Dickie, C.W., Sniff, E.S. (1980). *Chlamydia* infection associated with peritonitis in a cat. *J Am Vet Med Assoc*, 176(11),1256-1259.

Dinnage, J.D., Scarlett, J.M., Richards, J.R. (2009). Descriptive epidemiology of feline upper respiratory tract disease in an animal shelter. *J Feline Med Surg*, 11(10), 816-825.

Drazenovich, T.L., Fascetti, A.J., Westermeyer, H.D., Sykes, J.E., Bannasch, M.J., Kass, P.H., *et al.* (2009). Effects of dietary lysine supplementation on upper respiratory and ocular disease and detection of infectious organisms in cats within an animal shelter. *Am J Vet Res*, 70(11), 1391–1400.

Edwards, D.S., Coyne, K., Dawson, S., Gaskell, R.M., Henley, W.E., Rogers, K., Wood, J.L. (2008). Risk factors for time to diagnosis of feline upper respiratory tract disease in UK animal adoption shelters. *Prev Vet Med*, 87(3-4), 327-339.

Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A. (1999). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each

containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol*, 49(2), 415–440.

Fascetti, A.J., Maggs, D.J., Kanchuk, M.L., Clarke, H.E., Rogers, Q.R. (2004). Excess dietary lysine does not cause lysine-arginine antagonism in adult cats. *J Nutr*, 134(8), 2042S–2045S.

Featherstone, H.J. & Heinrich, C.L. (2013). Ophthalmic examination and diagnosis. Part 1: The eye examination and diagnostic procedures. In: K.N. Gelatt, B.C. Gilger & T.J. Kern (Eds.), *Veterinary ophthalmology*. (5^a Ed., pp. 533-613). Iowa: Wiley-Blackwell.

Fenimore, A., Carter, K., Fankhauser, J., Hawley, J.R., Lappin, M.R. (2016). Evaluation of intranasal vaccine administration and high-dose interferon- α 2b therapy for treatment of chronic upper respiratory tract infections in shelter cats. *J Feline Med Surg*, 18(8), 603-611.

Fernandez, M., Manzanilla, E.G., Lloret, A., León, M., Thibault, J.C. (2017). Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydomphila felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. *J Feline Med Surg*, 19(4), 461-469.

Fontenelle, J.P., Powell, C.C., Veir, J.K., Radecki, S.V., Lappin, M.R. (2008). Effect of topical ophthalmic application of cidofovir on experimentally induced primary ocular feline herpesvirus-1 infection in cats. *Am J Vet Res*, 69(2), 289–293.

Foster, S.F., Barrs, V.R., Martin, P., Malik, R. (1998). Pneumonia associated with *Mycoplasma* spp in three cats. *Aus Vet J*, 76 (7), 460-464.

Foster, S.F., Martin, P., Allan, G.S., Barrs, V.R., Malik, R. (2004) Lower respiratory tract infections in cats: 21 cases (1995–2000). *J Feline Med Surg*, 6(3), 167–180.

Fulton, R.W., Cho, D.Y., Downing, M., Pearson, N.J., Cane, R.H. (1980). Isolation of feline herpesvirus 1 from a young kitten. *Vet Rec*, 106(23), 479-481.

Gaillard, E.T., Hargis, A.M., Prieur, D.J., Evermann, J.F., Dhillon, A.S. (1984). Pathogenesis of feline gastric chlamydial infection. *Am J Vet Res*, 45(11), 2314–2321.

Galle, L.E. (2004). Antiviral therapy for ocular viral disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 34(3), 639–653.

Gaskell, R.M, Dawson, S, Radford, A. (2012). Feline respiratory disease. In: C.E. Greene (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*.(4^a Ed., pp. 319-325). Missouri: Saunders-Elsevier.

Gaskell, R.M., Bennett, M. (1996). Feline *Chlamydia psittaci* infection. In: R.M. Gaskell, M. Bennett. (Eds). *Feline and Canine Infectious Diseases*.(1^a Ed., pp. 21-25). Oxford: Blackwell Science.

- Gaskell, R.M., Dennis, P.E., Goddard L.E., Cocker, F.M., Willis, J.M. (1985). Isolation of feline herpesvirus 1 from the trigeminal ganglia of latently infected cats. *J Gen Virol*, 66(2), 391-394.
- Gaskell, R.M., Povey, R.C. (1977). Experimental induction of feline viral rhinotracheitis virus re-excretion in FVR-recovered cats. *Vet Rec*, 100(7), 128-133.
- Gaskell, R.M., Povey, R.C. (1979). Feline viral rhinotracheitis: sites of virus replication and persistence in acutely and persistently infected cats. *Res Vet Sci*, 27(2), 167-174.
- Gerhardt, N., Schulz, B.S., Werckenthin, C., Hartmann, K. (2006). Pharmacokinetics of enrofloxacin and its efficacy in comparison with doxycycline in the treatment of *Chlamydia felis* infection in cats with conjunctivitis. *Vet Rec*, 159(18), 591-594.
- Gil, S., Leal, R.O., Duarte, A., McGahie, D., Sepúlveda, N., Siborro, I., *et al.* (2013). Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. *Res Vet Sci*, 94(3), 753–763.
- Goldschmidt, P., Rostane, H., Sain-Jean, C., Batellier, L., Alouch, C., Zito, E., *et al.* (2006) Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of herpesviruses and *Acanthamoeba keratitis*. *Br J Ophthalmol*, 90(11), 1354-1356.
- Gordon, Y.J., Romanowski, E.G., Araullo-Cruz, T. (1994). Topical HPMPD inhibits adenovirus type 5 in the New Zealand rabbit ocular replication model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(12), 4135–4143.
- Gould, D. (2011). Feline herpesvirus-1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options. *J Feline Med Surg*, 13(5), 333-346.
- Gourkow, N., Lawson, J.H., Hamon, S.C., Phillips, C.J. (2013). Descriptive epidemiology of upper respiratory disease and associated risk factors in cats in an animal shelter in coastal western Canada. *Can Vet J*, 54(2), 132–138.
- Greene, C.E. & Chalker, V.J. (2012). Nonhemotropic mycoplasmal, ureaplasma, and L-form infections. In: C.E. Greene (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. (4^a Ed., pp. 319-325). Missouri: Saunders-Elsevier.
- Groth, A.D., Contreras, M.T., Kado-Fong, H.K., Nguyen, K.Q., Thomasy, S.M., Maggs, D.J. (2014). In vitro cytotoxicity and antiviral efficacy against feline herpesvirus type 1 of famciclovir and its metabolites. *Vet Ophthalmol*, 17(4), 268–274.
- Gruffydd-Jones, T.J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., *et al.* (2009). *Chlamydia felis* infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*, 11(7), 605-609.

Gruffydd-Jones, T.J., Jones, B.R., Hodge, H., Rice, M., Gething, M.A. (1995). Chlamydia infection in cats in New Zealand. *NZ Vet J*, 43(5), 201–203.

Gunn-Moore, D.A., Werrett, G., Harbour, D.A., Fielden, H., Gruffydd-Jones, T.J. (1995): Prevalence of *Chlamydia psittaci* antibodies in healthy pet cats in Britain. *Vet Rec*, 136(14), 366-367.

Haesebrouck, F., Devriese, L.A., van Rijssen, B., Cox, E. (1991). Incidence and significance of isolation of *Mycoplasma felis* from conjunctival swabs of cats. *Vet Microbiol*, 26(1-2), 95–101

Haid, C., Kaps, S., Gonczi, E., Hassig, M., Metzler, A., Spiess, B.M., *et al.* (2007). Pretreatment with feline interferon omega and the course of subsequent infection with feline herpesvirus in cats. *Vet Ophthalmol*, 10(5), 278–284.

Halanova, M., Sulinova, Z., Cislakova, L., Trbolová, A., Páleník, L., Weissová, T., *et al.* (2011): *Chlamydomphila felis* in cats—are the stray cats dangerous source of infection? *Zoonoses Public Health*, 58(7), 519-522.

Hanselaer, J.A., Derore, A., Boucherie, P., Mattheeuws, D. (1989). Demonstration of *Chlamydia psittaci* in feline conjunctivitis cases in Belgium. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*, 58(5), 165–168.

Hara, M., Fukuyama, M., Suzuki, Y., Kisikawa, S., Ikeda, T., Kiuchi, A., *et al.* (1996) Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 48(3-4), 345-352.

Hargis, A.M., Ginn, P.E., Mansell, J.E.K.L, Garber, R.L. (1999). Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Vet Dermatol*, 10(4), 267-274.

Hartley, C. (2010). Treatment of corneal ulcers. What are the medical options? *J Feline Med Surg*, 12(5), 383–397.

Hartley, C. (2014). The conjunctiva and third eyelid. *In*: D. Gould & G. McLellan (Eds), *BSAVA Manual of Canine and Feline Ophthalmology* (3^a Ed., pp.182-199). Gloucester: BSAVA.

Hartley, J.C., Stevenson, S., Robinson, A.J., Littlewood, J.D., Carder, C., Cartledge, J, *et al.* (2001). Conjunctivitis due to *Chlamydomphila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: Case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *J Infect*, 43(1), 7–11.

Hartmann, A.D., Hawley, J., Werckenthin, C., Lappin, M.R., Hartmann, K. (2010). Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg*, 12(10), 775–782.

Hartmann, A.D., Helps, C.R., Lappin, M.R., Werckenthin, C., Hartmann, K. (2008). Efficacy of pradofloxacin in cats with feline upper respiratory tract disease due to *Chlamydia felis* or *Mycoplasma* infections. *J Vet Intern Med*, 22(1), 44-52.

Hartmann, K. (2012). Antiviral and Immunomodulatory Chemotherapy. In: C.E. Green (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4^aEd., pp. 10-24).

Helps, C., Reeves, N., Egan, K., Howard, P., Harbour, D. (2003). Detection of *Chlamydia felis* and feline herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. *J Clin Microbiol*, 41(6), 2734-2736.

Helps, C.R., Lait, P., Damhuis, A., Bjornehammar, U., Bolta, D., Brovida, C., Chabanne, L., et al. (2005). Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydia felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: Experience from 218 European catteries. *Vet Rec*, 156(21), 669–673.

Hillstrom, A., Tvedten, H., Kallberg, M., Hanas, S., Lindhe, A., Holst, B.S. (2012). Evaluation of cytologic findings in feline conjunctivitis. *Vet Clin Pathol*, 41(2), 283-290.

Holst, B.S., Hanas, S., Berndtsson, L.T., Hansson, I., Söderlund, R., Aspán, A., et al. (2010). Infectious causes for feline upper respiratory tract disease – a case-control study. *J Feline Med Surg*, 12(10), 783–789.

Honsho, C.S., Santos, F.A., Dias, F.G.G, Momo, C., Souza, F.F. (2012). Avaliação comparativa de dois métodos de citologia conjuntival em felinos. *Encicl Biosf*, 8(15), 2616-2627.

Hooper, P.T., Ireland, L.A., Carter, A. (1985). Mycoplasma polyarthritis in a cat with probable severe immune deficiency. *Aust. Vet J*, 62(10), 352

Hoover, E.A, Kahn, D.E., Langloss, J.M. (1978). Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). *Am J Vet Res*, 39(4), 541–547.

Hoover, E.A. (1980). Feline pneumonitis. In: R.W. Kirk (Ed), *Current Veterinary Therapy VII. Small Animal Practice*. (1^a Ed., pp 1299-1302). Philadelphia, WB Saunders.

Hussein, I.T., Field, H.J. (2008). Development of a quantitative real-time TaqMan PCR assay for testing the susceptibility of feline herpesvirus-1 to antiviral compounds. *J Virol Methods*, 152(1-2), 85–90.

Hussein, I.T., Menashy, R.V., Field, H.J. (2008a). Penciclovir is a potent inhibitor of feline herpesvirus-1 with susceptibility determined at the level of virus-encoded thymidine kinase. *Antiviral Res*, 78(3), 268–274.

Hussein, I.T., Miguel, R.N., Tiley, L.S., Field, H.J. (2008b). Substrate specificity and molecular modelling of the feline herpesvirus-1 thymidine kinase. *Arch Virol*, 153(3), 495–505

Iwamoto, K., Masubuchi, K., Nosaka, H., Kokubu, T., Nishida, K., Toshida, T., *et al.* (2001). Isolation of *Chlamydia psittaci* from domestic cats with oculonasal discharge in Japan. *J Vet Med Sci*, 63(8), 937–938.

Jégou, J. P. & Liotet, S. (1991). The benefit of conjunctival scraping cytology in the biological diagnosis of conjunctivitis in the dog and cat. *Eur J Companion Anim Pract*, 3(1), 83-97.

Johnson, L.R., Drazenovich, N.L., Foley, J.E. (2004). A comparison of routine culture with polymerase chain reaction technology for the detection of *Mycoplasma* species in feline nasal samples. *J Vet Diagn Invest*, 16 (4), 347-351.

Johnson, L.R., Foley, J.E., de Cock, H.E., Clarke, H.E., Maggs, D.J. (2005). Assessment of infectious organisms associated with chronic rhinosinusitis in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 227(4), 579–585.

Jones, C. (1998). Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv Virus Res*, 51, 81-133.

Jongh O. (2004a). A cat with a relapse of herpetic keratitis treated with feline omega interferon. In: K. de Mari (ed), *Veterinary interferon handbook*. (pp.143-477). Carros: Virbac,

Jongh, O. (2004b). A cat with herpetic keratitis (primary stage of infection) treated with feline omega interferon. In: K. de Mari (ed), *Veterinary interferon handbook* (pp. 138-147). Carros: Virbac.

Katze, M.G., He, Y., Gale, M. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol*, 2(9), 675-687.

Kaufman, H.E. (1980). Antimetabolite drug therapy in herpes simplex. *Ophthalmology*, 87(2), 135–139.

Knight, D.A., Hejmanowski, A.Q., Dierksheide, J.E., Williams, J.W., Chong, A.S., Waldman, W.J. (2001). Inhibition of herpes simplex virus type 1 by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation*, 71(1), 170–174.

Koech, D.K., Obel, A.O. (1990). Efficacy of Kemron (low dose oral natural human interferon alpha) in the management of HIV-1 infection and acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *East Afr Med J*, 67(7 Suppl 2), 64-70.

Kompare, B., Litster, A.L., Leutenegger, C.M., Weng, H.Y. (2013). Randomized masked controlled clinical trial to compare 7-day and 14-day course length of doxycycline in the treatment of *Mycoplasma felis* infection in shelter cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(2), 129–135.

Lang, G.H. (1992): Prevalence of antibodies to *Coxiella* and *Chlamydia* spp. in cats in Ontario. *Can Vet J*, 33(2), 134.

- Lauter, C.B., Bailey, E.J., Lerner, A.M. (1976). Microbiologic assays and neurological toxicity during use of adenine arabinoside in humans. *J Infect Dis*, 134(1), 75–79.
- Lavach, J.D., Thrall, M.A., Benjamin, M.M., Severin, G.A. (1977). Cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 170(7), 722-727
- Lee-Fowler, T. (2014). Feline respiratory disease: what is the role of *Mycoplasma* species?. *J Feline Med Surg*. 16(7), 563-571.
- Lees, P., Toutain, P.L. (2013). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, toxicology and residues of phenylbutazone in humans and horses. *Vet J*, 196(3), 294–303.
- Litster, A.L., Wu, C.C., Constable, P.D. (2012). Comparison of the efficacy of amoxicillin/clavulanic acid, cefovecin, and doxycycline in the treatment of upper respiratory tract disease in cats housed in an animal shelter. *J Am Vet Med Assoc*, 241(2), 218–226.
- Litster, A.L., Wu, C.C., Leutenegger, C.M. (2015). Detection of feline upper respiratory tract disease pathogens using a commercially available real-time PCR test. *Vet J*, 206(2), 149-153.
- Lobova, D., Kleinova, V., Konvalinova, J., Cerna, P., Molinkova, D. (2019). Laboratory diagnostics of selected feline respiratory pathogens and their prevalence in the Czech Republic. *Vet Med (Praha)*, 64(1), 25-32.
- Low, H.C., Powell, C.C., Veir, J.K., Hawley, J.R., Lappin, M.R. (2007). Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydomphila felis* and *Mycoplasma* spp DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. *Am J Vet Res*, 68(6), 643–648.
- Macías, P & Navarro, C. (2018). Molecular detection of feline herpesvirus by means polymerase chain reaction. *Dairy and Vet Sci J*, 8(3), 555-736.
- Maggs, D.J. (2001). Update on the diagnosis and management of feline herpesvirus-1 infection. In: J.R. August (ed). *Consultations in feline internal medicine*. (Vol 4., pp. 51-61). Philadelphia: WB Saunders.
- Maggs, D.J., Clarke, H.E. (2004). In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirus type 1. *Am J Vet Res*, 65(4), 399–403.
- Maggs, D.J., Clarke, H.E. (2005) Relative sensitivity of polymerase chain reaction assays used for detection of feline herpes-virus type 1 DNA in clinical samples and commercial vaccines. *Am J Vet Res*, 66(9), 1550-1555.
- Maggs, D.J., Collins, B.K., Thorne, J.G., Nasisse, M.P. (2000). Effects of L-lysine and L-arginine on in vitro replication of feline herpesvirus type-1. *Am J Vet Res*, 61(12), 1474–1478.

Maggs, D.J., Lappin, M.R., Nasisse, M.P. (1999a). Detection of feline herpesvirus-specific antibodies and DNA in aqueous humour from cats with or without uveitis. *Am J Vet Res*, 60(8), 932-936.

Maggs, D.J., Lappin, M.R., Reif, J.S., Collins, J.K., Carman, J., Dawson, D.A., *et al.* (1999b). Evaluation of serologic and viral detection methods for diagnosing feline herpesvirus-1 infection in cats with acute respiratory tract or chronic ocular disease. *J Am Vet Med Assoc.*, 214(4), 502-507.

Maggs, D.J., Nasisse, M.P., Kass, P.H. (2003). Efficacy of oral supplementation with L-lysine in cats latently infected with feline herpesvirus. *Am J Vet Res*, 64(1), 37–42.

Maggs, D.J., Sykes, J.E., Clarke, H.E., Yoo, S.H., Kass, P.H., Lappin, M.R., *et al.* (2007). Effects of dietary lysine supplementation in cats with enzootic upper respiratory disease. *J Feline Med Surg*, 9(2), 97–108.

Maggs, D.J. (2008). Conjunctiva. *In*: D.J. Maggs, P.E. Miller, R. Ofri (Eds.), *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology*. (4th Ed., pp. 135-150). Missouri:Saunders Elsevier

Malik, R., Lessels, N.S., Webb, S., Meek, M., Graham, P.G., Vitale, C., *et al.* (2009). Treatment of feline herpesvirus-1 associated disease in cats with famciclovir and related drugs. *J Feline Med Surg*, 11(1), 40–48.

Martin, C.L. (2010). Conjunctiva and third eyelid. *In*: C.L. Martin (Ed.), *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*. (pp. 183-218). London: Manson Publishing

Masubuchi, K., Nosaka, H., Iwamoto, K., Kokubu, T., Yamanaka, M., Shimizu, Y. (2002). Experimental infection of cats with *Chlamydia felis*. *J Vet Med Sci*, 64(12), 1165–1168.

McDonald, M., Willett, B.J., Jarrett, O., Addie, D.D. (1998). A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats. *Vet Rec*, 143(4), 97–101

Morgan, R.V. (1994). Feline corneal sequestration: a retrospective study of 42 cases (1987-1991). *J Am Anim Hosp Assoc*, 30(1), 24-28.

Morgan, R.V., Abrams, K.L., Kern, T.J. (1996). Feline eosinophilic keratitis: a retrospective study of 54 cases (1989-1994). *Vet Comp Ophthalmol*, 6(2), 131-134.

Murph J.M. (1988). Exfoliative cytology examination as an aid in diagnosing ocular diseases in the dog and cat. *Semin. Vet. Med. Surg., Small Anim.*, 3(1), 10-14.

Nasisse, M. P., Guy, J.S., Davidson M.G., Sussman, W., De Clercq, E. (1989 a). In vitro susceptibility of feline herpesvirus-1 to vidarabine, idoxuridine, trifluridine, acyclovir, or bromovinyldeoxyuridine. *Am J Vet Res*, 50(1), 158-160.

Nasisse, M.P., Glover, T.L., Moore, C.P., Weigler, B.J. (1998). Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration. *Am J Vet Res*, 59(7), 856-858.

Nasisse, M.P., Dorman, D.C., Jamison, K.C., Weigler, B.J., Hawkins, E.C., Stevens, J.B. (1997). Effects of valacyclovir in cats infected with feline herpesvirus 1. *Am J Vet Res*, 58(10), 1141–1144.

Nasisse, M.P., English, R.V., Tompkins, M.B., Guy, J.S., Sussman, W. (1995). Immunologic, histologic, and virologic features of herpesvirus induced stromal keratitis in cats. *Am J Vet Res*, 56(1), 51-55.

Nasisse, M.P., Guy, J.S., Davidson, M.G., Sussman, W.A., Fairley, N.M. (1989 b). Experimental ocular herpesvirus infection in the cat. Sites of virus replication, clinical features and effects of corticosteroid administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30(8), 1758-1768.

Nasisse, M.P., Guy, J.S., Stevens, J.B., English, R.V., Davidson, M.G. (1993). Clinical and laboratory findings in chronic conjunctivitis in cats: 91 cases (1983-1991). *J Am Vet Med Assoc*, 203(6), 834-837.

Nasisse, M.P., Halenda, R.M., Luo, H. (1996). Efficacy of low dose oral, natural human interferon alpha in acute feline herpesvirus-1 (FHV-1) infection: a preliminary dose determination trial. *Trans Am Coll Vet Ophthalmol*, 27(1), 79.

Nesburn, A.B., Robinson, C., Dickinson, R. (1974). Adenine arabinoside effect on experimental idoxuridine-resistant herpes simplex infection. *Invest Ophthalmol*, 13(4), 302–304.

Nguyen, D., Barrs, V.R., Kelman, M., Ward, M.P. (2018). Feline upper respiratory tract infection and disease in Austrália. *J Feline Med Surg*, DOI: 10.1177/1098612X18813248.

O'Brien, W.J., Edelhauser, H.F. (1977) The corneal penetration of trifluorothymidine, adenine arabinoside, and idoxuridine: a comparative study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16(12), 1093–1103.

O'Dair, H.A., Hopper, C.D., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A., Waters, L. (1994). Clinical aspects of *Chlamydia psittaci* infection in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Rec*, 134(15), 365–368.

Ollivier, F., Plummer, C., Barrie, K. (2007). Ophthalmic Examination and diagnostic. In: K. N. Gellat (Ed.), *Veterinary Ophthalmology* (4^a Ed., Vol. I, pp. 445-447). EUA: Blackwell Publishing.

Ossewaarde, J.M., Meijer, A. (1999). Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. *Microbiology*, 145 (2), 411-417.

- Owen, W.M., Sturgess, C.P., Harbour, D.A., Egan, K., Gruffydd-Jones, T.J. (2003). Efficacy of azithromycin for the treatment of feline chlamydophilosis. *J Feline Med Surg*, 5(6), 305-311.
- Owens, J.G., Nasisse, M.P., Tadepalli, S.M., Dorman, D.C. (1996). Pharmacokinetics of acyclovir in the cat. *J Vet Pharmacol Ther*, 19(6), 488–490.
- Padrid, P.A., Feldman, B.F., Funk, K., Samitz, E.M., Reil, D., Cross, C.E. (1991). Cytologic, microbiologic, and biochemical analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained from 24 healthy cats. *Am J Vet Res*, 52(8), 1300–1307.
- Petersen, N. (1988). Chlamydiosis. In: C.A. Goleta (Ed). *Feline Infectious Diseases*. (1^a Ed., pp 231-236). Santa Barbara: American Veterinary Publications.
- Ploneczka-Janeczko, K., Kielbowicz, Z., Bania, J., Bednarek, K. (2011). Real-time PCR detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats suffering from chronic conjunctivitis (Poland). *Pol J Vet Sci*, 14(4), 679-681.
- Plunkett, S.J. (2000). Anaphylaxis to ophthalmic medication in a cat. *J Vet Emerg Crit Care*, 10(3), 169-171.
- Pointon, A.M., Nicholls, J.M., Neville, S., *et al* (1991). *Chlamydia* infection among breeding catteries in South Australia. *Aust Vet Practit*, 21, 58-63.
- Prasse, K. W. & Young, K. (2010). The Eyes and associated structures. In R. L. Cowell, R. D. Tyler, J. H. Meinkoth, D. B. DeNicola (Eds), *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (3^a Ed., pp. 151-155). USA: Mosby Elsevier.
- Rampazzo, A., Appino, S., Pregel, P., Tarducci, A., Zini, E., Biolatti, B. (2003). Prevalence of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus 1 in cats with conjunctivitis in northern Italy. *J Vet Intern Med*, 17(6), 799–807.
- Ramsey, D.T. (2000). Feline Chlamydia and Calicivirus infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 30(5), 1015-1028.
- Rand, J. (2006). The cat with acute sneezing or nasal discharge. In: J. Rand (Ed.), *Problem-based feline medicine* (1^a Ed., pp. 5-18). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Randolph, J.F., Moise, N.S., Scarlett, J.M., Shin, S.J., Blue, J.T., Corbett, J.R. (1993). Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens, in cats with or without pulmonary disease. *Am J Vet Res*, 54(6), 897–900.
- Raskin, R.E. (2016). Eyes and Adnexa. In: R.E. Raskin & D. J. Meyer (Eds.), *Canine and Feline Cytology. A color atlas and interpretation guide* (3^a Ed., pp. 406-429). Riverport Lane: Elsevier.

Reed, N., Simpson, K., Ayling, R., Nicholas, R., Gunn-Moore, D. (2012). Mycoplasma species in cats with lower airway disease: improved detection and species identification using a polymerase chain reaction assay. *J Feline Med Surg*, 14(12), 833-840.

Rees, T.M., Lubinski, J.L. (2008). Oral supplementation with L-lysine did not prevent upper respiratory infection in a shelter population of cats. *J Feline Med Surg*, 10(5), 510–513.

Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D. (2009) Recent developments in the diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol*, 135(1-2), 2-21.

Sandmeyer, L.S., Keller, C.B., Bienzle, D. (2005a). Effects of cidofovir on cell death and replication of feline herpesvirus-1 in cultured feline corneal epithelial cells. *Am J Vet Res*, 66(2), 217–222.

Sandmeyer, L.S., Keller, C.B., Bienzle, D. (2005b). Effects of interferon-alpha on cytopathic changes and titers for feline herpesvirus-1 in primary cultures of feline corneal epithelial cells. *Am J Vet Res*, 66(2), 210–216.

Schachter, J., Ostler, H.B., Meyer, K.F. (1969). Human infection with the agent of feline pneumonitis. *Lancet*, 1(7605), 1063–1065.

Schulz, C., Hartmann, K., Mueller, R.S., Helps, C., Schulz, B.S. (2015). Sampling sites for detection of feline herpesvirus-1, feline calicivirus and *Chlamydia felis* in cats with feline upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg*, 17(12), 1012-1019.

Sebbag, L., Thomasy, S.M., Woodward, A.P., Knych, H.K., Maggs, D.J. (2016). Pharmacokinetic modeling of penciclovir and BRL42359 in plasma and tears so as to optimize oral famciclovir dosing recommendation in cats. *Am J Vet Res*, 77(8), 833-845.

Segarra, S., Papasouliotis, K., Helps, C. (2011). The in vitro effects of proxymetacaine, fluorescein, and fusidic acid on real-time PCR assays used for the diagnosis of Feline herpesvirus 1 and *Chlamydomphila felis* infections. *Vet Ophthalmol*, 14 Suppl 1(s1), 5-8

Sherman, M.D., Feldman, K.A., Farahmand, S.M., Margolis, T.P. (2002). Treatment of conjunctival squamous cell carcinoma with topical cidofovir. *Am J Ophthalmol*, 134(3), 432–433.

Shewen, P.E., Povey, R.C., Wilson, M.R. (1980). A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis. *Can Vet J*, 21(8), 231–233.

Sibitz, C., Rudnay, E.C., Wabnegger, L., Spergser, J., Apfalter, P., Nell, B. (2011). Detection of *Chlamydomphila pneumoniae* in cats with conjunctivitis. *Vet Ophthalmol*, 14(1), 67-74.

Siebeck, N., Hurley, D.J., Garcia, M., Greene, C.E., Kostlin, R.G., Moore, P.A., *et al.* (2006). Effects of human recombinant alpha-2b interferon and feline recombinant omega interferon on in vitro replication of feline herpesvirus- 1. *Am J Vet Res*, 67(8), 1406– 1411.

Slack, J.M., Stiles, J., Leutenegger, C.M., Moore, G.E., Pogranichniy, R.M. (2013). Effects of topical ocular administration of high doses of human recombinant interferon alpha-2b and feline recombinant interferon omega on naturally occurring viral keratoconjunctivitis in cats. *Am J Vet Res*, 74(2), 281–289.

Sjödahl-Essén, T., Tidholm, A., Thorén, P., Persson-Wadman, A., Bölske, G., Aspán, A., Berndtsson, L. T. (2008). Evaluation of different sampling methods and results of real-time PCR for detection of feline herpes virus-1, *Chlamydophila felis* and *Mycoplasma felis* in cats. *Vet Ophthalmol*, 11(6), 375-80.

Souza, J. O. T., Angêlo, F. F., Homem, L. A. S. (2010). Microbiota bacteriana conjuntival de felinos domésticos (*Felis S. catus*, Linnaeus, 1758) sadios da cidade de juiz de fora – MG. *Resvista científica eletrônica de medicina veterinária*, Ano VIII, 15. Acedido em 14 de Janeiro de 2019 em http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/lqLq42Smj1ovle0_2013-6-25-15-23-52.pdf.

Sparkes, A.H., Caney, S.M.A., Sturgess, C.P., Gruffydd-Jones, T.J. (1999): The clinical efficacy of topical and systemic therapy for the treatment of feline ocular chlamydiosis. *J Feline Med Surg*, 1(1), 31-35.

Spindel, M.E., Veir, J.K., Radecki, S.V., Lappin, M.R. (2008). Evaluation of pradofloxacin for the treatment of feline rhinitis. *J Feline Med Surg*, 10(5), 472–479.

Stiles, J. (1995). Treatment of cats with ocular disease attributable to herpesvirus infection: 17 cases (1983–1993). *J Am Vet Med Assoc*, 207(5), 599–603.

Stiles, J. (2000). Feline herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Prat*, 30(5), 1001-1014.

Stiles, J. (2003). Feline Herpesvirus. *Clin Tech Small Anim Pract*, 18(3), 178-185.

Stiles, J. (2013). Feline ophthalmology. *In*: K.N. Gelatt, B.C. Gilger & T.J. Kern (Eds.), *Veterinary Ophthalmology*, (5^a Ed., 1477-1559). Oxford: Wiley-Blackwell.

Stiles, J., McDermott, M., Bigsby, D., Willis, M., Martin, C., Roberts, W., *et al.* (1997b). Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis. *Am J Vet Res*, 58(4), 338-342.

Stiles, J., McDermott, M., Willis, M., Roberts, W., Greene, C. (1997a). Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis. *Am J Vet Res*, 58(8), 804-807.

Stiles, J., Townsend, W.M., Rogers, Q.R., Krohne, S.G. (2002). Effect of oral administration of L-lysine on conjunctivitis caused by feline herpesvirus in cats. *Am J Vet Res*, 63(1), 99–103.

Storey, E.S., Gerding, P.A., Scherba, G., Schaeffer, D.J. (2002). Survival of equine herpesvirus-4, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in multidose ophthalmic solutions. *Vet Ophthalmol*, 5(4), 263-267.

Streeten, B.W., Streeten, E.A. (1985). “Blue body” epithelial cell inclusions in conjunctivitis. *Ophthalmology*, 92(4), 575–579

Sturgess, C.P., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A., Jones, R.L. (2001): Controlled study of the efficacy of clavulanic acid-potentiated amoxicillin in the treatment of *Chlamydia psittaci* in cats. *Vet Rec*, 149(3), 73-76.

Sykes, J.E. (2005). Feline *chlamydiosis*. *Clin Tech Small Anim Pract*, 20(2), 129-134.

Sykes, J.E. (2004). Chlamydial infections. In: E.A. Chandler, C.J. Gaskell, R.M. Gaskell (Eds.), *Feline medicine and therapeutics*. (3rd Ed., pp 651-658). Oxford: Blackwell Publishing.

Sykes, J.E. (2013). Mycoplasma infections. In: J.E. Sykes (Ed.), *Canine and feline infectious diseases*. (pp. 382-389). Missouri: Elsevier Saunders

Sykes, J.E., Anderson, G.A., Studdert, V.P., Browning, G.F. (1999a) Prevalence of feline *Chlamydia psittaci* and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. *J Vet Intern Med*, 13(3), 153–162.

Sykes, J.E., Studdert, V.P., Browning, G.F. (1999b). Comparison of the polymerase chain reaction and culture for the detection of feline *Chlamydia psittaci* in untreated and doxycycline-treated experimentally infected cats. *J Vet Intern Med*, 13(3), 146–152.

Sykes, J.E., Allen, J.L., Studdert, V.P., Browning, G.F. (2001). Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. *Vet Microbiol*, 81(2), 95–108.

Tan, R.J. (1974). Susceptibility of kittens to *Mycoplasma felis* infection. *Jpn J Exp Med*, 44(3), 235–240.

TerWee, J., Lauritzen, A.Y., Sabara, M., Dreier, K.J., Kokjohn, K. (1997). Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotrophic or a ‘limping’ strain of feline calicivirus. *Vet Microbiol*, 56(1-2), 33-45.

TerWee, J., Sabara, M., Kokjohn, K., Sandbulte, J., Frenchick, P., Dreier, K.J. (1998). Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. *Vet Microbiol*, 59(4), 259–281.

Thiry, E., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., *et al.* (2009). Feline herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*, 11(7), 547–555.

Thomasy, S. M. & Maggs, D. J. (2016). A review of antiviral drugs and other compounds with activity against feline herpesvirus type 1. *Vet Ophthalmol*, 19(1), 119-130.

Thomasy, S.M., Covert, J.C., Stanley, S.D., Maggs, D.J. (2012b). Pharmacokinetics of famciclovir and penciclovir in tears following oral administration of famciclovir to cats: a pilot study. *Vet Ophthalmol*, 15(5), 299–306.

Thomasy, S.M., Lim, C.C., Reilly, C.M., Kass, P.H., Lappin M.R., Maggs, D.J. (2011). Evaluation of orally administered famciclovir in cats experimentally infected with feline herpesvirus type-1. *Am J Vet Res*, 72(1), 85–95.

Thomasy, S.M., Maggs, D.J., Moulin, N.K., Stanley, S.D. (2007). Pharmacokinetics and safety of penciclovir following oral administration of famciclovir to cats. *Am J Vet Res*, 68(11), 1252–1258.

Thomasy, S.M., Shull, O., Outerbridge, C.A., Lim, C.C., Freeman, K.S., Strom, A.R., *et al.* (2016). Oral administration of famciclovir for treatment of spontaneous ocular, respiratory or dermatologic disease attributed to feline herpesvirus type-1: a retrospective review in 59 client-owned cats. *J Am Vet Medl Assoc*, 249(5), 526-538.

Thomasy, S.M., Whitem, T., Bales, J.L., Ferrone, M., Stanley, S.D., Maggs, D.J. (2012a). Pharmacokinetics of penciclovir in healthy cats following oral administration of famciclovir or intravenous infusion of penciclovir. *Am J Vet Res*, 73(7), 1092–1099.

Townsend, W.M., Stiles, J., Guptill-Yoran, L., Krohne, S.G. (2004). Development of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to detect feline herpesvirus-1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia and corneas of cats that did not have clinical signs of ocular disease. *Am J Vet Res*, 65(3), 314-319.

Trow, A.V., Rozanski, E.A., Tidwell, A.S. (2008). Primary mycoplasma pneumonia associated with reversible respiratory failure in a cat. *J Feline Med Surg*, 10(4), 398–402.

Turner, S.M. (2010a). Conjuntiva: introducción. *In: F. Nind (Ed.), Oftalmología de Pequeños Animales* (1ªEd., pp. 61-62). Barcelona, España: Elsevier España.

Turner, S.M. (2010b). Conjuntivitis felina. *In: F. Nind (Ed.), Oftalmología de Pequeños Animales* (1ªEd., pp. 68-73). Barcelona, España: Elsevier España.

Van der Meulen, K., Garre, B., Croubels, S., Nauwynck, H. (2006). In vitro comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. *BMC Vet Res*, 2(1), 13.

Veir, J.K., Ruch-Gallie, R., Spindel, M.E., Lappin, M.R. (2008). Prevalence of selected infectious organisms and comparison of two anatomic sampling sites in shelter cats with upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg*, 10(6), 551–557.

Venancio, S.A.S, Vieira, A.B., Alencar, N.X., Soares, A.M.B. (2012). Evaluation of the exfoliative cytology technique using cytobrush in healthy cats: Comparison between palpebral surface of nictitating membrane and palpebral conjunctiva. *Pesq Vet Bras*, 32(11), 1199-1204.

Volopich, S., Benetka, V., Schwendenwein, I., Mostl, K., Sommerfeld-Stur, I., Nell B. (2005). Cytological findings, and feline herpesvirus DNA and *Chlamydomphila felis* antigen detection rates in normal cats and cats with conjunctival and corneal lesions. *Vet Ophthalmol*, 8(1), 25-32.

von Bomhard, W., Polkinghorne, A., Lu, Z.H., Vaughan, L., Vogtlin, A., Zimmermann, D.R., *et al.* (2003). Detection of novel Chlamydiae in cats with ocular disease. *Am J Vet Res*, 64(11), 1421–1428.

Wagner, D.C., Kass, P.H., Hurley, K.F. Cage size, movement in and out of housing during daily care, and other environmental and population health risk factors for feline upper respiratory disease in nine North American animal shelters. *PLoS One*, 13(1), e0190140.

Weigler, B.J., Guy, J.S., Nasisse, M.P., Hancock, S.I., Sherry, B. (1997). Effect of a live attenuated intranasal vaccine on latency and shedding of feline herpesvirus 1 in domestic cats. *Arch Virol*, 142(12), 2389–2400.

Weiss, R.C. (1989). Synergistic antiviral activities of acyclovir and recombinant human leukocyte (alpha) interferon on feline herpesvirus replication. *Am J Vet Res*, 50(10), 1672–1677.

White, C.N., Jones, G., Baker, S., Dean, R.S., Brennan, M.L. (2018). Variation in the Reported Management of Canine Prolapsed Nictitans Gland and Feline Herpetic Keratitis. *Vet Sci*, 5(2), E54.

Whitley, R.D. (2000). Canine and feline primary ocular bacterial infection. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 30 (5), 1151-1167.

Whitley, R.D., Whitley, E.M., McLaughlin, S.A. (1993). Diagnosing and treating disorders of the feline conjunctiva and cornea. *Vet Med*, 88(12), 1138-1149.

Wilkes, R.P. & Hartmann, K. (2016). Update on Antiviral Therapies. *In*: S.E. Little (Eds.), *August's Consultations in Feline Internal Medicine, Volume 7*, (1^aEd, pp 84-96). Ottawa: Elsevier.

Williams, C.R., Sykes, J.E., Mehl, M., MacLeod, J.S., Lindsay, L.L., Poland, A.M., *et al.* (2007). In vitro effects of the active metabolite of leflunomide, A77 1726, on feline herpesvirus-1. *Am J Vet Res*, 68(9), 1010–1015.

Williams, D.L., Fitzmaurice, T., Lay, L., Forster, K., Hefford, J., Budge, C., *et al.* (2004). Efficacy of antiviral agents in feline herpetic keratitis: results of an in vitro study. *Curr Eye Res*, 29(2-3), 215–218.

Williams, D.L., Robinson, J.C., Lay, E., Field, H. (2005). Efficacy of topical aciclovir for the treatment of feline herpetic keratitis: results of a prospective clinical trial and data from in vitro investigations. *Vet Rec*, 157(9), 254–257.

Willis, M., Bounous, D.I., Hirsch, S. (1997). Conjunctival brush cytology: Evaluation of a new cytological collection technique in dogs and cats with a comparison to conjunctival scraping. *Vet. Comp. Ophthalmol*, 7(2), 74-81.

Wills, J.M. & Gaskell, R.M. (1985). Feline chlamydial infection (feline pneumonitis). In: E.A. Chandler, C.J. Gaskell, A.D.R. Hilbery (Eds.), *Feline Medicine and Therapeutics* (1^a Ed., pp. 304-308). London: Blackwell Scientific Publication.

Wills, J.M. (1986). *Chlamydial infection in the cat*. (Tese de Doutorado). University of Bristol.

Wills, J.M., Gruffydd-Jones, T.J., Richmond, S.J. (1984). Isolation of *Chlamydia psittaci* from cases of conjunctivitis in a colony of cats. *Vet Rec*, 114(14), 344-346.

Wills, J.M., Gruffydd-Jones, T.J., Richmond, S.J., Gaskell, R.M., Bourne, F.J. (1987). Effect of vaccination on feline *Chlamydia psittaci* infection. *Infect Immun*, 55(11), 2653-2657.

Wills, J.M., Howard, P.E., Gruffydd-Jones, T.J., Wathes, C.M. (1988). Prevalence of *Chlamydia psittaci* in different cat populations in Britain. *J Small Anim Pract*, 29(6), 337-339.

Wong, W.T., Kelman, M., Ward, M.P. (2013). Surveillance of upper respiratory tract disease in owned cats in Australia, 2009–2012. *Prev Vet Med*, 112(1-2), 150–155.

Wu, S.M., Huang, S.Y., Xu, M.J., Zhou, D.H, Song, H.Q., Zhu, X.Q. (2013). *Chlamydia felis* exposure in companion dogs and cats in Lanzhou, China: a public health concern. *BMC Vet Res*, 9, 104.

Yan, C., Fukushi, H., Matsudate, H., Ishihara, K., Yasuda, K., Kitagawa, H., *et al.* (2000). Seroepidemiological investigation of feline chlamydiosis in cats and humans in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 44(3), 155–160.

Young, K. (2014). Eyes and Associated Structures. In: R.L. Cowell & A. C. Valenciano (Eds.). *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat* (4^a Ed., pp 150-170). Riverport Lane: Elsevier.

Apêndice I

Tabela 15 – Fármacos utilizados na terapêutica de FHV-1.

Medicamento	Classe	Administração	Eficácia <i>in vitro</i>	Eficácia <i>in vivo</i>	Estudos de controlo publicados <i>in vivo</i>	Comentários	Referências
Trifluridina	Análogo de nucleósido	Tópico a 1%: Administrar a cada 4-6 horas, durante 21 dias	Excelente	Não determinada	Não	Tratamento tópico de primeira escolha. Maior penetração no epitélio da córnea, comparativamente à idoxuridina e à vidarabina. Tóxico quando administrado sistemicamente. Pode causar irritação ocular em gatos.	O'Brien & Edelhauser, 1977 Chin, 1978 Nasisse <i>et al.</i> , 1989 Stiles, 1995 Maggs, 2001 Galle, 2004 Thiry <i>et al.</i> , 2009 Gould, 2011 Thomasy & Maggs, 2016
Idoxuridina	Análogo de nucleósido	Tópico a 0,1% A cada 4-6 horas, durante 21 dias	Excelente	Não determinada	Não	Tóxico se administrado sistemicamente.	Kaufman, 1980 Stiles, 1995 Maggs, 2001 Thiry <i>et al.</i> , 2009 Thomasy & Maggs, 2016
Ganciclovir	Análogo de nucleósido	Tópico Gel a 0,15%, a cada 4-6 horas, durante 21 dias	Excelente	Não determinada	Não	É aproximadamente dez vezes mais eficaz <i>in vitro</i> que o aciclovir	Maggs & Clarke, 2004 Van der Meulen, 2006 Thiry <i>et al.</i> , 2009 Gould, 2011 Thomasy & Maggs, 2016
Aciclovir	Análogo de nucleósido	Tópico a 0,5% , 5 vezes ao dia, durante 10 dias	Fraca	Moderada	Sim	Sinergia quando combinado com a administração de IFN- α humano. Pode levar à supressão da	Nasisse <i>et al.</i> , 1989 Weiss, 1989 Owens <i>et al.</i> , 1996 Maggs, 2001

						medula óssea se administrado sistemicamente (são necessárias doses muito elevadas).	Maggs & Clarke, 2004 Williams <i>et al.</i> , 2004 Williams <i>et al.</i> , 2005 Van der Meulen, 2006 Hussein <i>et al.</i> , 2008a Hussein <i>et al.</i> , 2008b Thiry <i>et al.</i> , 2009 Hartley, 2010 Gould, 2011 Thomasy & Maggs, 2016
Vidarabina	Análogo de nucleósido	Tópico. Pomada a 3% a cada 4-6 horas, durante 21 dias	Sim	Não determinada	Não	Tóxico se administrado sistemicamente.	Nesburn <i>et al.</i> , 1974 Lauter <i>et al.</i> , 1976 Chin, 1978 Stiles, 1995 Thiry <i>et al.</i> , 2009 Thomasy & Maggs, 2016
Cidofovir	Análogo de nucleósido	Tópico a 0,5%. A cada 12 horas, durante 21 dias	Sim	Sim	Sim	Pode causa estenose do canal nasolacrimal.	Gordon <i>et al.</i> , 1994 Sherman <i>et al.</i> , 2002 Maggs & Clarke, 2004 Sandmeyer <i>et al.</i> , 2005a Fontenelle <i>et al.</i> , 2008 Gould, 2011 Thomasy & Maggs, 2016
Famciclovir/ Penciclovir	Análogo de nucleósido	Oral: 90 mg/kg, a cada 12 horas, durante 21 dias	Sim	Sim	Sim	Famcinclovir é um pró-fármaco altamente biodisponível do penciclovir. Metabolização hepática e excreção renal exigem monitorização destes órgãos. Mais seguro do que o aciclovir e valaciclovir.	Gould, 2011 Groth <i>et al.</i> , 2014 Hussein <i>et al.</i> , 2008a Hussein & Field, 2008 Maggs & Clark, 2004 Thomasy & Maggs, 2016 Malik <i>et al.</i> , 2009 Nasisse <i>et al.</i> , 1997 Owens <i>et al.</i> , 1996

							Sebbag <i>et al.</i> , 2016 Thomasy <i>et al.</i> , 2007 Thomasy <i>et al.</i> , 2011 Thomasy <i>et al.</i> , 2012a Thomasy <i>et al.</i> , 2012b Thomasy <i>et al.</i> , 2016 Williams <i>et al.</i> , 2004
IFN-ω Felino	Interferão	Sistêmico: 1 MU/Kg SC SID ou QUOD. Oral: 50 000- 100 000 UI/dia, 90 dias. Tópico: diluir 10MU em 19ml de NaCl a 0,9% e utilizar como colírio. Duas gotas em cada olho, 5 vezes/dia, 10 dias.	Sim	Não determinada	Sim, porém limitados e contraditórios	Uso seguro em gatos. Utilizar juntamente com lisina em infecções crônicas.	Weiss, 1988 Jongh, 2004a Jongh, 2004b Sandmeyer <i>et al.</i> , 2005b Bracklein <i>et al.</i> , 2006 Siebeck <i>et al.</i> , 2006 Haid <i>et al.</i> , 2007 Thiry <i>et al.</i> , 2009 Gould, 2011 Gil <i>et al.</i> , 2013 Slack <i>et al.</i> , 2013 Ballin <i>et al.</i> , 2014 Fenimore <i>et al.</i> , 2015 Thomasy & Maggs, 2016 Wilkes & Hatmann, 2016
IFN-α Humano	Interferão	Sistêmico: SC – doses altas. 10^4 - 10^6 IU/kg SC, a cada 24 horas. PO – doses baixas 5-35 UI/dia.	Sim	Sim	Sim, porém alguns contraditórios	Menos bioativo que o interferão felino. Reduz os sinais clínicos, mas não a excreção viral. Utilizar juntamente com lisina em infecções crônicas.	Cerruti <i>et al.</i> , 1985 Cocker <i>et al.</i> , 1987 Weiss, 1989 Nasisse <i>et al.</i> , 1996 Gould, 2011 Sandmeyer <i>et al.</i> , 2005b Siebeck <i>et al.</i> , 2006 Thiry <i>et al.</i> , 2009 Slack <i>et al.</i> , 2013 Thomasy & Maggs, 2016 Wilkes & Hatmann, 2016
Lisina	Aminoácido	Oral: 250 mg BID ou 400mg SID	Sim	Não determinada	Sim, porém contraditórios	Segura. Pode levar a distúrbios	Maggs <i>et al.</i> , 2000 Maggs, 2001 Stiles

		(bólus)				gastrointestinais leves. Quando administrada em bólus, pode reduzir a excreção viral em gatos infetados de forma latente e, também, os sinais clínicos em gatos expostos pela primeira vez ao vírus. Actua competindo com a arginina que é necessária para a replicação viral. Pode ser utilizada como medida profilática, em situações de <i>stress</i> .	<i>et al.</i> , 2002 Maggs <i>et al.</i> , 2003 Fascetti <i>et al.</i> , 2004 Maggs <i>et al.</i> , 2007 Rees & Lubinski, 2008 Drazenovich <i>et al.</i> , 2009 Thiry <i>et al.</i> , 2009 Gould, 2011 Cave <i>et al.</i> , 2014 Thomasy & Maggs, 2016 White <i>et al.</i> , 2018
Leflunomida	Imunossupressor	Não determinado (em estudo)	Sim	Não determinada	Não	Observou-se citotoxicidade com concentrações elevadas.	Knight <i>et al.</i> , 2001 Williams <i>et al.</i> , 2007 Thomasy & Maggs, 2016
Lactoferrina	Glicoproteína	Não determinado (em estudo)	Sim	Não determinada	Não	Atua inibindo a adsorção/penetração do vírus na célula	Beaumont <i>et al.</i> , 2003 Thomasy & Maggs, 2016

Apêndice II



Nr. de Registo

Nome Tutor: _____

Nome Animal: _____

Idade: _____

Nº de Ficha/Processo: _____

Data da Colheita: _____

Local da Colheita: HVL HV FMV-ULHT

Motivo da consulta: _____

Raça: _____

Género: MI MC FI FC

Vacinado: Não FeLV RCP Outra _____

Desparasitação: Interna Externa Não

Habitação: Indoor Outdoor Misto

Cohabitantes: Cães Gatos Outros

Se sim, com sinais clínicos? _____

Sinais Clínicos presentes:

Anorexia Prostração Pirexia
Sialorreia Icterícia

Úlceras: Nasais Linguais Palato
Edemas: Face Membros Articulações
Espirros Tosse

**Corrimento oronasal/
nasal**

Seroso
Mucopurulento
Sanguinolento

Corrimento ocular

Seroso
Mucopurulento
Sanguinolento

OE	OD

Hiperemia

OE

OD

Quemose

Simblefaro

Historial clínico:

Data 1º episódio:

Evolução:
