

CULTIVO DE *CHLAMYDIA* EM DIFERENTES SISTEMAS CELULARES UM ESTUDO COMPARATIVO¹

PHYLLIS CATHARINA ROMIJN e MÁIRA HALFEN TEIXEIRA LIBERAL²

RESUMO - Tentou-se o cultivo de *Chlamydia* sp. através de três métodos, utilizando mace-
rados de pulmões e traquéia de animais necropsiados suspeitos. Suspensões foram inoculadas
em ovos embrionados, em camundongos e em cultivo celular. A técnica do cultivo celular em
monocamada se apresentou como a mais satisfatória, principalmente pela maior rapidez no
diagnóstico.

Termos para indexação: clamidiose, bovinos, pneumonia, camundongos, ovo embrionado,
monocamada de células McCoy, diagnóstico.

CULTIVATION OF *CHLAMYDIA* IN DIFFERENT CELL SYSTEMS: A COMPARATIVE STUDY

ABSTRACT - The culture of *Chlamydia* sp. was tried by three cultivation methods,
tritulating the lungs and trachea of necropsied animals, and inoculating this suspension in
embryonated eggs, mice and cell culture. The technique in which monolayers of cell culture
were utilized presented the best results, being most practical and swift in diagnosing the
disease.

Index terms: chlamydiosis, bovines, pneumonia, mice, embryonated eggs, McCoy cell
monolayers.

INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas com material de bovinos (ór-
gãos diversos) necropsiados no estado do Rio de Ja-
neiro durante o período de 1977 a 1984 pelo Labo-
ratório de Biologia Animal (LBA) permitiram eluci-
dar diversos problemas zoossanitários com que os
criadores vinham se defrontando. Dentre eles, cha-
mou a atenção a existência de broncopneumonias em
animais jovens (de até um ano de idade), que leva-
vam à morte por outras causas que não as provoca-
das por agentes bacterianos e/ou parasitários. Os
exames anatomopatológicos sugeriram a presença de
outros microorganismos, como *Chlamydiaceae*, no
caso da identificação de lesões pulmonares típicas ou
indicativas (Lennette & Schmidt (1979) e Shewen
(1980).

Baseando-se nesses achados, foi elaborado um
projeto de pesquisa visando o isolamento de *Chlamy-
dia* sp. o que, como trabalho pioneiro em bovinos no
Brasil, exigiu que fossem testadas as diversas formas
de cultivo possíveis (World Health Organization

1975), a fim de se eleger a mais adequada às condi-
ções existentes no LBA.

O presente trabalho tem como objetivo apresen-
tar técnicas de cultivo de *Chlamydia* sp. utilizadas
em nosso Laboratório de Biologia Animal da
PESAGRO-Rio, assim como as dificuldades e solu-
ções encontradas durante o processo de utilização
delas para o diagnóstico do microorganismo, deta-
lhando o método que melhor se adequou à rotina de
trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado para exame consistiu princi-
palmente de pulmões e traquéias de bezerros de até
um ano de idade, necropsiados no município de
Cantagalo, RJ, e remetidos ao laboratório para veri-
ficação da **causa mortis**.

As amostras foram transportadas em recipientes
com temperatura entre - 4°C e 0°C, por período
nunca superior a 24 horas. Assim que chegavam ao
laboratório, as amostras eram imediatamente pro-
cessadas.

O material era triturado e homogeneizado em
meio-de-Earle ou caldo-infusão-coração (BHI)

¹ Aceito para publicação em 28 de março de 1989.

² Méd.-Vet., PESAGRO-Rio, Lab. de Biol. Animal,
Alameda São Boaventura, 770, Fonseca, CEP 24123
Niterói, RJ.

(Lennette & Schmidt 1979), e conservado a - 20°C até ser inoculado.

Para o preparo do inóculo, utilizou-se o homogeneizado, já preparado, a 20% em meio-de-Earle. O inóculo era centrifugado três vezes, após adição de antibióticos, retirando-se sempre o sobrenadante para nova centrifugação. Do sobrenadante final era retirada a quantidade necessária para inoculação nos sistemas celulares estudados.

Ovos embrionados

As aves poedeiras receberam ração isenta de antibióticos, preparada especialmente para o trabalho. Foram utilizados somente os ovos de casca clara, íntegra e lisa.

Do sobrenadante já descrito eram inoculados 0,2 ml no saco da gema, em um mínimo de três ovos com embriões de seis dias. Os ovos eram incubados a 36,5°C e virados diariamente. Embriões cuja morte ocorria dentro de quatro dias após a inoculação eram dispensados, só se utilizando aqueles cuja morte ocorria após esse período. Logo que era verificada a morte do embrião ou perda de sua motilidade, os ovos eram abertos asépticamente. A gema era removida para uma placa-de-Petri, onde o seu excesso era retirado da membrana com salina esterilizada. Através de esfregaços e impressões, eram feitas lâminas da membrana do saco da gema para identificação de partículas de inclusão características de *Chlamydia* sp. em microscópio ótico com lente de imersão 100x e objetiva 10x.

Os embriões que sobreviviam após doze dias de inoculação eram sacrificados, e lâminas eram feitas da membrana do saco da gema, da mesma forma descrita anteriormente.

De todos os materiais de primeira passagem negativos, isto é, em cujas lâminas não foram verificadas inclusões semelhantes às características para *Chlamydia* sp., eram feitas duas subpassagens, após as quais eram considerados negativos se suas lâminas não apresentassem as referidas inclusões.

As subpassagens (estoque de material para referências futuras) eram realizadas a partir da membrana restante.

Esta membrana era macerada em volume igual de meio-de-Earle. Em centrifuga refrigerada (0°C), o material era diferenciado por 30 a 60 minutos, a 500 r.p.m.. Sua esterilidade era testada em seguida, semeando-se em meio semi-sólido (Tioglicolato). O inóculo constituía o sobrenadante do centrifugado.

Camundongos

Camundongos albinos, da criação do próprio laboratório e sem linhagem definida, foram controlados anteriormente ao experimento, verificando-se se não eram portadores do agente em estudo. Animais geneticamente resistentes à infecção (Lennette & Schmidt 1979) por *Chlamydia* sp. eram detectados e eliminados do plantel.

A verificação de existência de animais resistentes à infecção ou portadores de *Chlamydia* sp. realizou-se através da inoculação de suspensões de pulmões e baços de camundongos do plantel, infectados ou não, em monocamadas de células McCoy, conforme descrito mais adiante.

A presença de infecção latente era verificada periodicamente por três a cinco passagens cegas de suspensões dos pulmões e baço de camundongos, tomados ao acaso, de várias faixas etárias, da linhagem a ser utilizada. Dessa suspensão, 0,025 ml eram inoculados, por instilação nasal, em camundongos de três semanas de idade, sob narcose de éter. Os camundongos inoculados eram mantidos em quarentena e sacrificados após sete dias de observação. Do último lote de camundongos, a suspensão pulmonar era inoculada no saco vífelino de ovos embrionados de seis dias.

A ração recebida pelos animais em experimento era isenta de antibióticos que inibissem o crescimento do microorganismo, sendo fornecida sempre fresca. A água era abundante e renovada a cada dia.

A maravalha utilizada como cama era nova e seca, sem resina, e renovada no mínimo três vezes na semana.

A. Camundongos recém-natos: inoculação intracerebral

Quantidades entre 20 e 30 µl de uma suspensão a 10% do homogeneizado de pulmões e traquéia, preparadas conforme já descrito, eram inoculadas em camundongos recém-natos, em qualquer área do hemisfério esquerdo do cérebro, utilizando-se seringa de 100 µl e agulha hipodérmica 13 x 3,8.

Animais cuja morte ocorria dentro das primeiras 24 horas eram dispensados. Sintomas como sonolência e paralisia, considerados indicativos, geralmente se desenvolviam em 48 horas, com morte em três a cinco dias. Destes animais, era retirada a dura-máter asépticamente, sendo feitas impressões em lâminas, as quais eram observadas de forma idêntica à des-

crita para a membrana da gema de ovos embrionados.

Nos casos negativos, o pulmão e o baço do animal eram retirados, macerados, centrifugados e reinoculados em outra série de camundongos recém-natos. Essas passagens cegas eram realizadas de 15 em 15 dias aproximadamente, por quatro vezes, findo o que, os materiais eram considerados negativos, de acordo com os resultados das impressões das lâminas.

B. Camundongos jovens: inoculação intra-peritonial

Esta técnica consistiu na introdução de 0,5 ml de suspensão (já descrita) na cavidade peritonial de camundongos de três a cinco semanas de idade, num total de cinco animais por amostra.

No trabalho de pesquisa realizado, os animais eram observados durante 21 dias, dispensando-se aqueles cuja morte ocorria dentro de 48 horas. Os animais que apresentavam sintomas indicativos ou não morriam dentro de 21 dias eram sacrificados e necropsiados; suas vísceras eram expostas assepticamente, e, após verificada a presença de lesões, o baço, os rins e o fígado eram retirados e com eles feitos esfregaços, que, após corados e fixados, eram observados ao microscópio ótico, com objetiva de imersão, para verificar a presença dos corpúsculos característicos.

Eram feitas três passagens cegas antes de se considerar as amostras negativas, fazendo-se uma suspensão a 20% com caldo nutriente estéril a partir do macerado de órgãos, e injetando-se 0,5 ml deste, intraperitonialmente, em outro grupo de camundongos.

Isolamento em cultivo celular

Células de linhagem contínua em monocamada McCoy, tratadas com Iodo-desoxi-uridina, foram utilizadas como terceiro sistema para isolamento de *Chlamydia* sp. a partir de material suspeito.

As células eram cultivadas e passadas em garrafas tipo xarope, sendo utilizados pequenos tubos de fundo chato, preparadas para este cultivo, para exames do material suspeito, vedados com rolha de borracha, sendo as células (125.000/tubo) cultivados em lâmina redonda, que permanecia no fundo do tubo. Após 48 horas, as células confluentes já podiam ser inoculadas com o material suspeito a partir da suspensão já descrita, diluída a 10^{-1} . O meio para diluição

do material era o mesmo utilizado para o cultivo celular, adicionado de glicose (0,54 g/ml solução), fungizon (250 mg/ml solução) e vancomicina (10 mg/ml solução). Dessa forma, a inoculação das células era realizada dispensando-se o meio velho e colocando-se 1 ml do material diluído nos tubos com monocamadas de células confluentes, utilizando-se dois tubos para cada material. Os tubos eram então centrifugados a $3.000 \times g$, a 30°C , por uma hora, para melhor associação microrganismo - célula, e em seguida incubados a 37°C , por 48 horas. Ao final, as células nas lâminulas eram fixadas e coradas no próprio tubo, deixando um tubo de cada material para controle. A observação ao microscópio ótico para identificação de inclusões era realizada montando-se a lâmina, com a camada celular para baixo, em lâmina com uma gota de glicerol, e utilizando-se objetiva de imersão.

Materiais negativos eram dispensados, os positivos ou suspeitos eram novamente inoculados em novas células e, caso confirmada a sua positividade, estocados para pesquisas futuras.

A fixação e coloração das lâminas dos três métodos de cultivo foram realizadas pela técnica de Giemsa.

RESULTADOS

Dentre as técnicas realizadas, o cultivo celular em monocamada apresentou-se como sendo a melhor para ser utilizada em nosso laboratório, por sua rapidez e especificidade, detectando 100% dos animais sabidamente infectados.

As outras técnicas, além de serem mais trabalhosas, forneciam resultados duvidosos nas leituras das lâminas preparadas, ou causavam a morte, por infecção inespecífica, dos sistemas inoculados.

DISCUSSÃO

O cultivo celular permite resultados rápidos, em 48 horas, desde que haja toda a infra-estrutura montada. O espaço físico requerido é pequeno, devendo-se contar apenas com uma capela de fluxo laminar e ambiente onde preparar e filtrar os meios. Uma das poucas desvantagens reside na dificuldade de aquisição de material de consumo de boa qualidade, e a preços acessíveis.

Quando os exames a serem realizados são em pequeno número, ou enviados ao laboratório com grandes intervalos de tempo, a célula McCoy pode ser congelada em pequenas alíquotas em N líquido, e utilizada rapidamente. A inoculação de dois tubos

com cultivo celular para cada material suspeito permite manter a amostra continuamente, ou utilizá-la como controle, bastando, para tanto, inocular a monocamada infectada, em nova passagem, em outro tubo com células.

A utilização de camundongos como substrato celular foi a técnica mais laboriosa, requerendo uma infra-estrutura mais sofisticada, sendo, porém, a mais acurada por permitir a reprodução de um quadro clínico e histopatológico característico, mesmo quando o agente infeccioso se encontra em quantidades mínimas na suspensão utilizada como inóculo.

Devido à manipulação da *Chlamydia* sp. em área vizinha à da criação dos animais, o risco de contaminação através de roupas, instrumental e outros não pode ser desprezado. Um biotério de criação dos animais é necessário para eliminar esta possibilidade.

A inoculação do material suspeito é um processo relativamente rápido, quer seja intraperitoneal ou intracerebral, porém o período de observação, de até 21 dias para cada grupo de animais por material, requer espaço físico razoável e um acompanhamento diário. Como alguns materiais são ressemeados até três vezes, deve-se calcular um período de 90 dias para cada exame. Tal período é excessivamente longo para qualquer diagnóstico de rotina, sendo que os resultados talvez não sejam mais significativos depois de decorrido todo este tempo.

A identificação de *Chlamydia* sp pode ocorrer em qualquer etapa, mesmo sem sintomas clínicos pneumônicos, após a primeira, segunda, ou terceira inoculação, pela detecção dos corpúsculos elementares em esfregaços de alguns pulmões processados. Nas passagens pulmonares, ainda é possível detectar pequenas lesões, áreas de consolidação e hiperemia nos pulmões dos animais necropsiados.

Os camundongos infectados geralmente possuíam o baço aumentado, com fibrina na superfície e líquido ascítico abundante, além de focos de necrose no fígado. Impressões dos órgãos afetados apresentavam-se ricas em corpúsculos elementares.

Durante o experimento utilizando ovos embrionados como substrato celular para o cultivo de *Chlamydia* sp., muitas das dificuldades foram semelhantes às da utilização de camundongos.

Geralmente, apenas 60 a 70% dos ovos são férteis, devendo-se calcular 100% a mais do que a quantidade necessária.

Ovos embrionados são extremamente sensíveis à contaminação, e todos os cuidados foram tomados no sentido de realizar os trabalhos em condições de assepsia.

Para uma correta execução dessa técnica, é imprescindível a disponibilidade de uma incubadeira, de preferência automática, que evite a influência de fatores externos.

A retirada asséptica da membrana da gema para preparo de esfregaço em lâmina e suspensão para novas passagens ou estoque também apresenta dificuldades de assepsia, devendo ser realizada, de preferência, em um ambiente com fluxo laminar.

O preparo de lâminas a partir da membrana da gema requer certa prática, pois poucas células por campo são obtidas, além de apresentarem visualização pouco nítida.

Os pulmões dos embriões de galinha inoculados com a suspensão de pulmão do material de primeira, segunda ou terceira passagem costumavam se apresentar hiperêmicos, congestos, de parede fina, e com as extremidades cianóticas.

CONCLUSÕES

A técnica de cultivo celular em monocamada, como utilizada no presente estudo, é recomendada para o diagnóstico de Chlamidiose em material fecal em laboratórios pequenos e com poucos recursos. Os resultados obtidos foram considerados confiáveis, permitindo estudos epidemiológicos extensivos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marceio Magalhães, da Universidade Federal de Pernambuco, pelas células de monocultivo McCoy cedidas para os testes.

REFERÊNCIAS

- CARTER, G.R. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 3. ed. Springfield, Charles C. Thomas Publisher, 1979. 484p.
- LENETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. 5. ed. Washington, American Public Health Association, 1979. 1138p.
- SHEWEN, P.E. Chlamydial infection in animals. A review. **Can. Vet. J.**, 21(1):2-11, 1980.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva. **Guide to the laboratory diagnosis of trachoma**. Geneva, 1975. 38p.