

ISOLAMENTO DE *Chlamydia psittaci* EM BÚFALOS ABATIDOS PARA CONSUMO EM BELÉM, PARÁ¹

JOSÉ DE ARIMATÉIA FREITAS² e RAIMUNDO DIOGO MACHADO³

ABSTRACT.- Freitas J.A. & Machado R.D. 1988. [Isolation of *Chlamydia psittaci* from water buffaloes slaughtered for consumption in Belém, Pará.] Isolamento de *Chlamydia psittaci* em búfalos abatidos para consumo em Belém, Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 8(3/4):43-50. Depto Patologia Med. Vet. Preventiva, Fac. Ciênc. Agrárias do Pará, Cx. Postal 917, Belém, PA 60000, e Depto Virologia, Centro Ciênc. Saúde, Univ. Fed. Rio de Janeiro, 21944 Rio de Janeiro, Brazil.

A *Chlamydia* agent was isolated from 14 (70%) samples of organs and carcasses of slaughtered water buffaloes identified as *Chlamydia* by its morphological and staining characteristics, its pathogenic effect on chicken embryos. It was characterized as *Chlamydia psittaci* by the direct immunofluorescence test. In the isolation experiment, the serial passages system of inoculation from organs to the yolk sac of embryonated chicken was used, and 3 passages were made for each sample. The identification and characterization of isolates were made by the observation of typical cytoplasmatic inclusions in smears of the yolk sac membrane of embryos after inoculation and impressions of lesioned organs, stained by Giemsa, Macchiavello and Castañeda methods and by the fluorescence antibodies technique. Twenty samples of organs and carcass of water buffaloes that presented inflammation of the serosa in one or more of the lungs, liver and heart were studied. The lung was the organ with greatest number of isolates (8), followed by brain (6), liver (5) and heart (2). A significant correlation between the macroscopic lesions and the positive fluorescence of the agent in the correspondent inoculum was observed in the lung.

INDEX TERMS: *Chlamydia psittaci*, Chlamydiaosis, poliserositis, water buffaloes.

SINOPSE.- Um agente clamidiano foi isolado de 14 (70%) amostras de órgãos e carcaças de bubalinos abatidos para consumo e identificado como *Chlamydia* através de suas características morfológicas, tintórias e efeito patogênico para o embrião de galinha e caracterizado como *Chlamydia psittaci* no teste de imunofluorescência direta. No isolamento foi utilizado o sistema de passagens seriadas de inóculos de órgãos no saco vitelino de ovos embrionados de galinha tendo sido executadas três passagens para cada amostra. A identificação e caracterização dos microrganismos isolados foi feita através de observação de inclusões citoplasmáticas típicas em esfregaços de membrana vitelina de ovos embrionados pós-inoculação e em impressões de órgãos lesados, corados pelo método de Giemsa, Macchiavello e Castañeda, e através do teste de imunofluorescência para *Chlamydia psittaci*. Foram estudadas 20 amostras de órgãos e carcaça de bubalinos que apresentavam processo de inflamação de serosa em um ou mais dos seguintes órgãos - pulmão, coração e fígado. O pulmão foi o órgão do qual se obteve maior número de isolados 8, seguido do cérebro, 6, fígado, 5 e coração 2. No caso do pulmão observou-se uma significativa correlação entre as lesões

macroscópicas destes órgãos estudados e a imunofluorescência positiva para o agente, nos inóculos correspondentes.

TERMS DE INDEXAÇÃO: *Chlamydia psittaci*, clamidiose, polisserosite, búfalo.

INTRODUÇÃO

Sabe-se que a bubalinocultura é um dos mais importantes setores da economia amazônica, notadamente no Estado do Pará (Nascimento et al. 1979). Embora a espécie seja apontada como uma das mais resistentes às enfermidades que acometem outros animais, verifica-se considerável perda quando, a nível de abate e inspeção higiênico-sanitária nos matadouros de Belém, são condenados e eliminados parte da carcaça e órgãos, por apresentarem alterações que caracterizam um quadro de inflamação de serosas.

As lesões observadas apresentam características anátomo-patológicas compatíveis com aquelas produzidas pela espécie denominada *Chlamydia psittaci*, microrganismo pertencente ao gênero *Chlamydia*, antigamente denominado vírus do grupo psitacose-lymfofagocitoma, venéreo-tracoma (Storz 1971). De acordo com Storz (1968), Storz (1971), Schachter et al. (1973), Pienaar & Schutte (1975) e Foggie (1977) este microrganismo está relacionado com doenças dos animais domésticos, entre os quais

¹ Aceito para publicação em 20 de outubro de 1987.

Parte do trabalho de Tese de Mestrado do 1º autor, submetido à Universidade Federal Fluminense em setembro de 1986.

² Departamento de Patologia e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Cx. Postal 917, Belém, Pará 60000.

³ Departamento de Virologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944.

mamíferos e aves, como pneumonias, enterites, abortos, conjuntivites, encefalites e poliartrites e segundo Morange (1895), citado por Storz (1971), com doença de caráter zoonótico, a psitacose; York & Baker (1951), Bannister et al. (1962) Wilson & Thomson (1968), Harshfield (1970), Moorthi & Spradbrow (1978) incriminaram *C. psittaci* como agente causador de doenças de animais domésticos; por outro lado Pienaar & Schutte (1975) descreveram-na como agente de alterações em diversos órgãos, tecidos e sistemas; entretanto são raros os informes a respeito do papel da clamídia como agente etiológico de doença de bubalinos; os registros da literatura reportam-se mais a ocorrência de anticorpos anti-clamídia no soro destes animais (Schmatz et al. 1978, Hafez & Krauss 1979, Dhingra et al. 1981). Entre bubalinos *C. psittaci* foi demonstrada ser o agente etiológico de doenças como a encefalomielite esporádica conforme Ognyanov et al. (1974), pneumonia segundo Gupta et al. (1976) e de aborto descrito por Abilgasanov (1983).

O primeiro isolamento de clamídia de animais domésticos foi obtido por York & Baker (1951), posteriormente *C. psittaci* foi isolada por Menges et al. (1953), Kolb & Psota (1968), Moorthi & Spradbrow (1978) de animais domésticos em diferentes condições de saúde. Na maioria das vezes os isolamentos obtidos de bubalinos são provenientes de animais abatidos clinicamente normais (Singh & Malik 1969, Gupta et al. 1976, Dhingra et al. 1980). Entretanto Ognyanov et al. (1973, 1974) relataram surtos de encefalomielite esporádica e amostra procedente de um búfalo africano de vida livre foi descrita por Rowe et al. (1978).

O isolamento de clamídia de materiais procedentes de processo infeccioso com alterações macroscópicas de órgãos, envolve a utilização de sistema apropriado de cultivo entre os quais o embrião de galinha, o cobaio, o camundongo e o cultivo celular (Storz 1971, Schachter & Dawson 1979). O embrião tem sido o sistema mais apropriado para o cultivo deste microrganismo, mas segundo Storz (1971) independentemente do sistema utilizado, a identificação do agente clamidioso, requer a observação de inclusões citoplasmáticas típicas, a análise do comportamento do agente no hospedeiro utilizado e a demonstração de antígeno grupo-específico no teste de fixação do complemento; na identificação dos isolados obtidos do teste de anticorpos fluorescentes tem sido, por outro lado, amplamente aceito e empregado, por ser gênero-específico (Ross & Borman 1963, Lewis et al. 1972, Vera & Dumoff 1974, Dvorakova 1979).

A condenação de órgãos de bubalinos abatidos acometidos deste processo inflamatório é preocupante, face aos prejuízos financeiros atribuídos ao produtor. Por outro lado Storz (1971) e Shewen (1980) consideram as clamidioses como importante problema de saúde dos animais domésticos, afetando órgãos e sistemas, causando distúrbios na reprodução. Não havendo registro no País, até a presente data, de ocorrência de doenças produzidas por *Chlamydia psittaci* nem de isolamento do microrga-

nismo de órgãos provenientes de animais domésticos. Objetivou-se apresentar a presente contribuição para o esclarecimento e solução do problema observado entre bubalinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram empregadas para o isolamento amostras de órgãos e carcaças de 20 bubalinos abatidos para consumo em Belém, Estado do Pará. Eram selecionados os animais que apresentassem alteração de serosa nos pulmões, ou no coração ou no fígado. Para o isolamento foram colhidos assepticamente fragmentos dos órgãos referidos e mais do cérebro e medula correspondentes, conservados em temperatura de refrigeração, transportados para o laboratório e mantidos a -20°C (Wilson & Thomson 1968).

Isolamento

Como sistema de isolamento foi feita a inoculação de suspensão de órgãos, no saco vitelino de ovos embrionados de galinha com 6-8 dias de vida embrionária, provenientes de aves saudáveis e que não receberam ração, contendo os antibióticos convencionais (Storz 1971).

A técnica empregada foi aquela descrita por Wilson & Thomson (1968) com algumas modificações, adotando-se ainda as recomendações de Hanna et al. (1974), Schachter & Dowson (1979) e Carter (1979).

Cada fragmento de órgão, isoladamente, era triturado em gral e pistilo estéreis, utilizando-se como diluente, solução salina balanceada de Earle (Rovozzo & Burke 1973, Vera & Dumoff 1974) contendo antibióticos (Moorthi & Spradbrow, 1978, Schachter & Dowson 1979, Dhingra et al. 1980) e era centrifugado 3 vezes a 700 x g (2.200 rpm) durante 30 minutos em centrífuga refrigerada, para a obtenção de suspensão do órgão correspondente e diluições decimais sucessivas de 10⁻² e 10⁻³. A conservação foi feita em geladeira por uma noite, para inoculação no saco vitelino. Para cada material foram inoculados pelo menos três ovos embrionados, em volume de 0,2 ml, sendo os ovos incubados a 35,5 - 36,5°C durante 12 dias e observados diariamente para constatação de motilidade dos embriões.

Com a suspensão obtida dos embriões que permaneceram vivos até o 12º dia pós-inoculação, eram feitas duas inoculações subsequentes, sub-passagens (Hanna et al. 1974, Schachter & Dowson 1979), de acordo com o procedimento anterior, e aqueles que mostraram vitalidade na segunda sub-passage eram considerados negativos. Os embriões mortos nas respectivas passagens eram colhidos, assepticamente, para a execução de esfregaços de membrana de saco vitelino destinados à identificação do agente.

A esterilidade dos inóculos empregados frente a germes contaminantes secundários foi testada, paralelamente ao isolamento, em meio de tioglicolato, bacto-fluid thyoglicolate medium Difco 0256 (Hanna et al. 1974, Schachter & Dowson 1979) agar-Sabouraud com 2% de glucose (Merck, 10.130) acidificado, para a presença de fungos contaminantes.

Identificação morfológica-tintorial

As características morfológicas e tintoriais do agente presuntivo foram identificadas em impressões de órgãos utilizados no isolamento e nos esfregaços de membrana de saco vitelino dos ovos com embriões mortos pós-inoculação nas passagens respectivas e corados por técnicas de Giemsa, Macchiavello & Castañeda (Carter 1979).

Imunofluorescência

Na identificação do agente presuntivo através de pesquisa de anticorpos fluorescentes seguiram-se as disposições recomendadas por Riggs (1979) e escolheu-se o método de imunofluorescência direta por ser o mais simples e o menos sujeito a reações e falso-interpretações (Riggs 1979), empregando-se soro hiperimune cedido pelo "Central Veterinary Laboratory" da Inglaterra, conjugado com isotiocianato de fluorescência e como controle soro negativo para *Chlamydia trachomatis* conjugado com fluoresceína; o contraste para fluorescência inespecífica foi obtido com azul de Evans (Nichols & McComb 1962), Nichols et al. 1963); o exame de esfregaços e de impressões foi feito ao microscópio Zeiss equipado com lâmpada HBO-200W, filtro excitador BG-12, filtro de calor GG-13 e filtro de barragem K-510, objetiva de 10x e 40x e ocular de 10x.

RESULTADOS

Os resultados alcançados no experimento de isolamento e na identificação do agente presuntivo estão resumidos nos Quadros 1 e 2.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram o isolamento da *Chlamydia* em 14 (70%) amostras das 20 utilizadas no experimento (Quadro 1), identificado como sendo a espécie *Chlamydia psittaci* com base nas características morfológico-tintoriais (Quadro 2), teste de imunofluorescência direta (Quadro 2) e na análise da passagem

Quadro 1. Passagem seriada de homogeneados de órgãos em saco vitelino de embriões de galinha (diluição 10^{-3} , volume de 0,2 ml) nos isolamentos positivos de *Chlamydia psittaci* de bubalinos abatidos para consumo em Belém acometidos de polisserosite

Animal nº	Inóculo empregado	Passagem seriada	Nº de embriões mortos	Dias de morte pós-inoculação	Isolamento de <i>C. psittaci</i>
01	Pulmão	Primeira	01	12	+ ^d
	Fígado	Primeira	01	12	+
02	p ^a	P	P	P	
03	P	P	P	P	
04	P	P	P	P	
05	Fígado	Sub-pas ^c 2	01	09	+
06	- ^b	-	-	-	
07	Fígado	Primeira	02	07	+
08	Encéfalo	Sub-pas 2	02	10	+
09	Pulmão	Primeira	02	07	+
	Encéfalo	Primeira	02	07	+
10	Encéfalo	Primeira	01	10	+
11	Pulmão	Primeira	01	11	+
	Coração	Sub-pas 1	01	11	+
12	Encéfalo	Sub-pas 1	01	06	+
13	-	-	-	-	
14	Pulmão	Sub-pas 1	01	04	+
	Coração	Sub-pas 1	01	04	+
15	Pulmão	Primeira	01	11	+
	Pulmão	Sub-pas 2	01	06	
	Encéfalo	Sub-pas 2	02	10	+
16	Pulmão	Primeira	01	12	
	Pulmão	Sub-pas 1	01	07	+
17	-	-	-	-	
18	Encéfalo	Sub-pas 2	01	06	+
19	Pulmão	Primeira	02	08	+
20	Pulmão	Sub-pas 1	02	04, 10	+
	Fígado	Sub-pas 1	01	05	+

^a Isolamento prejudicado;

^b Isolamento negativo;

^c Sub-passagem;

^d Isolamento de *Chlamydia* positivo.

Quadro 2. Identificação de isolados de *Chlamydia psittaci* através coloração de Giemsa e de imunofluorescência direta em esfregaços de membrana de saco vitelino de embriões mortos em passagens seriadas

Animal nº	Passagem seriada	Inóculo de órgão empregado			
		Pulmão	Coração	Fígado	Encéfalo
01	Primeira	+ ^a		+,-	- ^b
02	p ^c	P	P	P	P
03	P	P	P	P	P
04	P	P	P	P	P
05	Primeira	-,-	-	-	-
	Sub-pas ^d 1				
	Sub-pas 2			+	
06	Primeira	L ^e ,-		+	-;-
	Sub-pas 1		L,-	L,-	
	Sub-pas 2		-	-	
07	Primeira	-	-	+,+	-
	Sub-pas 1	L,-	-		-
08	Sub-pas 2	-			
	Sub-pas 2	-	-,-	L,-	L,+
09	Primeira			+	+
	Sub-pas 1	-			
	Sub-pas 2	+		-	
10	Primeira		-		+
11	Primeira	+		-,-	
	Sub-pas 1		+, -		
12	Primeira		-		-
	Sub-pas 1				L,+
13	Primeira	-	-		-
14	Primeira	-	-		-
	Sub-pas 1	L,+	L,+	-	-
15	Primeira	+, -		-	
	Sub-pas 1	-	-		+,+
	Sub-pas 2	+			+,+
16	Primeira	+	-		-
	Sub-pas 1	+	-		
	Sub-pas 2			-,-	
17	Primeira	-	-	-L	
	Sub-pas 1			-,-	
	Sub-pas 2				
18	Primeira			-	L,+
	Sub-pas 1			-	L,-
19	Primeira	+,+	-	-	-L
	Sub-pas 1	-,-	-		
20	Primeira			-	-
	Sub-pas	+,+		+	

^a Identificação positiva;

^b Identificação negativa;

^c Isolamento prejudicado;

^d Sub-passagem;

^e Células lisadas.

seriada (Quadro 1) das suspensões dos órgãos em ovos embrionados; não foi obtido isolamento das amostras 6, 13 e 17, tendo sido prejudicado o isolamento das amostras 2, 3 e 4.

Dos órgãos utilizados no isolamento, o pulmão foi aquele que apresentou o maior número de isolados positivos, 8 seguido do cérebro com 6, o fígado com 5 e coração com 2 (Quadro 1).

Alguns esfregaços de membrana de saco vitelino de ovos com embriões mortos pós-inoculação mostraram células lisadas sem as típicas inclusões citoplasmáticas (Quadro 2) mas com resultados positivos no teste de imunofluorescência direta, enquanto que outras se mostraram também lisadas mas demonstraram típicas inclusões citoplasmáticas na forma de diminutos corpúsculos e resultados positivos no teste de imunofluorescência (Quadro 2), comportamento muito semelhante ao biotipo 5 de *Chla-*

mydia psittaci segundo Spears & Storz (1979) sendo consideradas positivas.

O Quadro 1 é um resumo das passagens seriadas de suspensões dos órgãos utilizados no isolamento e mostra o número de embriões e o número de dias pós-inoculação em que ocorreu a morte de cada embrião em cada amostra e respectivas passagens, nos casos positivos; pelos dados do Quadro concluiu-se que nas primeiras passagens a morte dos embriões ocorreu sempre em período superior a 6 dias e chegando mesmo a 12 dias e que, de um modo geral, nas duas passagens subsequentes, o tempo de morte de embriões pós-inoculação decresceu sensivelmente, tendo ocorrido a morte de embriões em até quatro dias, estando de acordo com o modelo de morte de embriões e o comportamento do microrganismo no hospedeiro utilizado (Storz 1971).

No que se refere à esterilidade das suspensões de órgãos empregados nas três passagens seriadas nem todos os inóculos estavam livres de microrganismos contaminantes secundários, tendo sido observado o crescimento de leveduras e fungos em inóculos de algumas amostras. Os inóculos das amostras 2, 8 e 10 mostraram o crescimento de fungo do gênero *Aspergillus*, enquanto que no inóculo da amostra 8 ocorreu também crescimento típico de bactérias; nas demais amostras não foi observado o crescimento de microrganismos contaminantes.

Identificação morfológico-tintorial

No Quadro 2 estão resumidos os resultados da identificação microscópica dos isolados, com base nas características morfológicas e tintoriais do microrganismo, empregando-se as técnicas de coloração de Giemsa, Macchiavello e Castañeda.

Nos esfregaços de membrana de saco vitelino de ovos com embriões mortos nos casos positivos, foram observadas típicas inclusões citoplasmáticas cocóides, variando desde corpúsculos puntiformes, diminutos, até corpúscu-

los maiores, isolados ou múltiplos, em aglomerados no citoplasma e longe do núcleo (Fig. 1). Nas células lisadas foram observadas, em alguns casos, inclusões puntiformes, diminutas, isoladas e condensadas, típicas de corpúsculos elementares. Os melhores resultados foram observados nas preparações coradas pelo método de Giemsa, nas quais as inclusões coraram-se de azul à púrpura.

Nas impressões de órgãos lesados foi extremamente difícil observarem-se inclusões citoplasmáticas típicas, exceção feita para a impressão de pulmão da amostra 2, que demonstrou típica inclusão madura de *C. psittaci* corada de púrpura pelo método de Giemsa, na forma de meia lua em volta do núcleo de um monócito e que também demonstrou fluorescência positiva.

Teste de imunofluorescência

Os resultados da identificação dos isolados através de imunofluorescência estão resumidos no Quadro 2. De acordo com os dados deste Quadro o teste de imunofluorescência, que é gênero-específico, revelou a presença de antígeno grupo-específico para clamídia (Fig. 2) em inóculos de órgãos de 14 amostras. As impressões de órgãos das amostras 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 11, revelaram-se positivas no teste de imunofluorescência.

O teste de imunofluorescência mostrou ainda resultados positivos em esfregaços contendo células lisadas e cujas inclusões não eram perfeitamente visíveis e distinguíveis e naquelas que mesmo lisadas, mostraram claramente os típicos corpúsculos elementares, corados em azul pelo método de Giemsa.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Historicamente, os microrganismos agora identificados como clamídia foram associados com doenças humanas denominadas linfogranuloma venéreo e tracoma e desde a identificação há mais de 60 anos de inclusões específicas

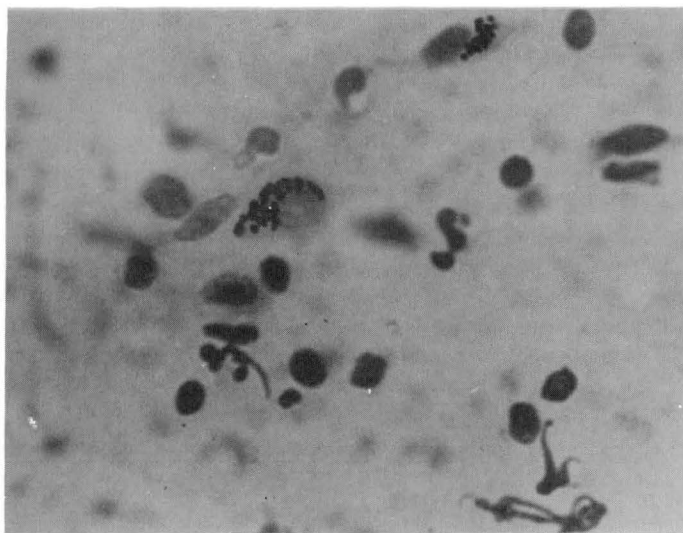


Fig. 1. Esfregaço de membrana de saco vitelino com inclusões citoplasmáticas típicas de *Chlamydia trachomatis* formadas por corpúsculos elementares ao redor dos núcleos. Coloração de Giemsa, obj. 40.

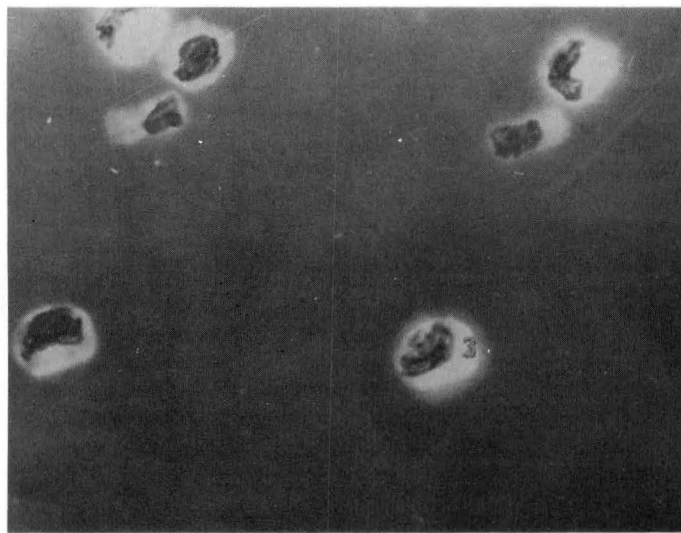


Fig. 2. Imunofluorescência característica de *Chlamydia trachomatis* no citoplasma e ao redor do núcleo de esfregaço de membrana de saco vitelino. Obj. 40.

em raspados de conjuntiva de pacientes portadores de tracoma, os agentes clamidianos foram encontrados infectando naturalmente um grande número de espécies de aves e mamíferos e foram isolados de casos de doenças distintas do homem e de diversas outras espécies de mamíferos e aves (Storz 1971). No presente experimento também foi obtido o isolamento de agente clamidiano em órgãos de bubalinos acometidos de polisserosite, sendo que os isolados obtidos (Quadro 1) apresentaram características morfológicas e tintoriais (Quadro 2) indistinguíveis daquelas do gênero *Chlamydia* e demonstraram antígeno grupo-específico no teste de imunofluorescência.

O microrganismo isolado foi identificado como *Chlamydia psittaci* através de observação de inclusões citoplasmáticas típicas nos esfregaços de saco vitelínico de ovos embrionados de galinha e da prova de imunofluorescência direta, empregando-se inóculos originais e material de sub-passagens em ovos tratados com antibióticos, obedecendo-se, em parte, ao critério recomendado por Storz (1971); foi também considerado o período de 4 a 12 dias pós-inoculação para verificação da viabilidade dos embriões.

Foram obtidos isolamentos do microrganismo na primeira passagem de alguns inóculos de órgãos, enquanto que com outros inóculos a positividade só foi obtida a partir das passagens cegas (Foggie 1977). Os embriões mortos nas passagens seriadas mostraram lesões e alterações bastante típicas, entre as quais pernas e pés cianóticos, vasos sanguíneos dos sacos vitelínos congestos, em alguns casos embriões muito avermelhados, indicadores úteis segundo Storz (1968, 1971) para este sistema de isolamento.

Um grupo de amostras não demonstrou corpúsculos elementares claramente identificáveis nos esfregaços de saco vitelínico mas foi sorologicamente positivo no teste de imunofluorescência direta (Quadro 2), o qual segundo Jones (1974) é mais sensível que a coloração por Giemsa, algumas das inclusões sendo clássicas corpúsculos iniciais dos quais alguns não eram visíveis na coloração pelo método de Giemsa; localizavam-se centralmente em relação ao núcleo ou como formas livres no citoplasma e representavam imunofluorescência específica dos estágios iniciais não suscetíveis de serem reconhecidos pelo método de Giemsa (Nichols et al. 1963).

Alguns esfregaços de membrana de saco vitelínico mostraram células lisadas contendo, às vezes, inclusões pequenas, arredondadas, comportamento muito semelhante ao biotipo 5 de *Chlamydia psittaci* sugerido por Separs & Storz (1979) e apresentando estes esfregaços resultados positivos para antígeno grupo-específico para clamídia no teste de imunofluorescência.

Os isolados obtidos, muito embora não tenham sido analisados, de modo completo, quanto ao modelo de morte do embrião conforme Storz (1971) demonstraram nas passagens seriadas uma diminuição do tempo de sobrevivência do embrião pós-inoculação (Quadro 1), principalmente em relação a certas amostras.

O Quadro 1 apresenta um resumo das passagens seriadas dos inóculos, o número de embriões mortos nas respectivas passagens e o período decorrido para a morte dos mesmos pós-inoculação. Observou-se que para os inóculos de um mesmo órgão, o tempo de morte dos embriões diminuiu, a cada passagem, como consequência da adaptação do organismo no embrião e a riqueza do agente infeccioso no cultivo, comportamento que atende, em parte, à análise do modelo de morte do embrião, um dos testes críticos recomendados por Storz (1971) para a identificação dos isolados de clamídia.

Alguns isolados, não demonstraram claramente uma diminuição do tempo de sobrevivência dos embriões, pois, em certos casos, os microrganismos não desenvolvem um modelo regular de letalidade do embrião e tentativas para isolar amostras originárias de linfogranuloma venéreo (LGV) tornam-se aparentes na parte final da primeira passagem ou no início da segunda passagem, a adaptação sendo vagarosa e normalmente mais de 5 passagens são necessárias (Schachter & Dowson 1979).

O pulmão foi o órgão do qual se obteve o maior número de isolados, seguido do cérebro, fígado e coração (Quadro 1); do mesmo modo, o pulmão foi o órgão que apresentou a maior frequência de lesões macroscópicas e o maior número de resultados positivos no teste de imunofluorescência, resultados coincidentes com aqueles obtidos por Bates et al. (1965) no que se refere à correlação entre as lesões macroscópicas de órgãos e a fluorescência nos esfregaços relativos aos inóculos dos mesmos.

O sistema de isolamento em ovos embrionados de galinha, empregado no caso de tracoma e de amostras procedentes de bovino, ovino, caprino, suíno e cobaio (Storz 1971) e utilizado por Singh & Malik (1969), Ognyanov et al. (1973), Ognyanov et al. (1974), Dhingra et al. (1980) no isolamento deste microrganismo procedente de bubalinos em diferentes situações, apresentou resultados excelentes neste estudo, tendo sido isolado microrganismo clamidiano de 70% das amostras estudadas.

Um agente clamidiano foi isolado em cobaio por Gupta et al. (1976), a partir de pulmão de bezerro bubalino acometido de pneumonia enzoótica e do mesmo modo, um microrganismo semelhante foi isolado por Dhingra et al. (1980) em cobaio e a partir deste, em ovos embrionados de pulmões de búfalos também com processo pneumônico. A identificação foi feita através da observação de inclusões citoplasmáticas típicas e imunofluorescência, com resultado muito semelhante àqueles obtidos neste estudo os quais, entretanto, mostraram-se superiores aos obtidos pelos pesquisadores no segundo estudo que obtiveram apenas 22% de isolamentos de 9 peças pulmonares estudadas. O mesmo agente clamidiano foi isolado por Rowe et al. (1978), em cultura de tecidos, a partir de pulmão de um búfalo africano de vida livre. Nesses casos as condições sanitárias dos animais eram diferentes daquelas observadas no presente estudo.

Agente clamidiano foi também isolado no presente experimento a partir de tecido nervoso (Quadro 1). Convém

assinalar que Ognyanov et al. (1973) também isolaram clamídia de cérebros de bezerros bubalinos em um surto de encefalomielite na Bulgária e *C. psittaci* foi também associada com outro surto de encefalomielite esporádica neste país (Ognyanov et al. 1974) afetando animais jovens e adultos. Os isolados obtidos de amostras de tecido nervoso neste experimento, eram também procedentes de animais jovens e adultos e foram correlacionados com a presença de inclusões citoplasmáticas típicas e antígenos específicos nos esfregaços dos embriões pós-inoculação de homogenados respectivos.

O isolamento de *C. psittaci* de coração e fígado de bubalinos clinicamente normais apresentando alterações de serosas compatíveis com clamidiose não foi, até a presente data, registrado na literatura, sendo os resultados deste estudo o primeiro informe a respeito do assunto; por outro lado, não foi tentado o isolamento de clamídia de outros órgãos além dos referidos neste estudo, visto que o quadro de alterações macroscópicas era muito sugestivo de polisserosite, muito embora Kolb & Psota (1968) tenham isolado em ovo embrionado na quinta passagem, o microrganismo de amostras de rins procedentes de bovinos.

Singh & Malik (1969) no experimento de isolamento de agente clamidiano de homogenados de traquéia e pulmões de búfalos concluíram que houve um progressivo aumento na mortalidade dos embriões e um decréscimo na média de sobrevivência dos mesmos a partir da segunda passagem, resultados que confirmam, ainda que em parte, aqueles obtidos neste experimento, mas deve ser levado em consideração, que os referidos autores inocularam 8 embriões em cada passagem e realizaram 7 passagens seriadas.

Ainda em comparação com o trabalho dos autores referidos acima, foi verificado que a adaptação dos agentes na presente pesquisa foi, no geral, mais rápida pois, em alguns casos positivos o tempo de sobrevivência dos embriões foi de até 7 dias, enquanto que no trabalho de Singh & Malik (1969) somente na quinta passagem é que o tempo de sobrevivência diminuiu para igual período.

No estudo da polisserosite de bubalinos foi observado, em impressão de pulmão da amostra número 2 corada por Giemsa, uma típica inclusão de *C. psittaci* que também se mostrou positiva no teste de imunofluorescência direta, mesmo sendo muito difícil a demonstração de agente, clamidiano em impressão de órgãos principalmente o pulmão (Storz 1968, 1971).

A identificação do agente clamidiano nos diversos isolados através de observação microscópica das inclusões citoplasmáticas típicas foi feita após coloração dos esfregaços de membrana de saco vitelino pelos métodos de Giemsa, Macchiavello e Castañeda, mas os melhores resultados foram aqueles observados nas preparações coradas pelo método de Giemsa. Entretanto algumas preparações coradas por este método apresentaram-se difíceis de conclusão, pois o mesmo apresenta desvantagens que incluem o fato de não revelar inclusões em áreas espessas

das preparações. Outra dificuldade é a distinção entre inclusões e artefatos conforme Nichols et al. (1963), embora ainda segundo estes pesquisadores em 15 de 106 casos, inclusões tenham sido identificadas por este método e cada um desses casos também tenha sido confirmado através de imunofluorescência. Por outro lado, de acordo com Bannister et al. (1962) e Nichols & McComb (1962), respectivamente, os corpúsculos elementares reagiram debilmente à coloração pelo método de Macchiavello e clamídia não foi evidenciada por este método na primeira passagem em nenhuma das tentativas de isolamento, ainda que a imunofluorescência do material desta passagem tivesse revelado de modo inequívoco a presença de antígeno em 10 casos.

Antígenos específicos para o grupo das clamídias foram demonstrados nos isolados através do teste de imunofluorescência (Quadro 2) que é gênero-específico, apresenta sensibilidade comparável ao teste de fixação do complemento (Ross & Borman 1963, Lewis et al. 1972) através do qual anticorpos específicos para clamídia foram demonstrados em soros de bubalinos (Ognyanov et al. 1973, Ognyanov et al. 1974, Schmatz et al. 1978, Hafez & Krauss 1979, Dhingra et al. 1981), além de inúmeras outras vantagens quando comparado com outros métodos de diagnóstico (Bauman 1973, Truzczeszinski & Sadowiski 1973). Do mesmo modo, antígenos específicos para clamídia foram demonstrados através de imunofluorescência em materiais de bubalinos (Rowe et al. 1978), embora o isolamento tivesse sido realizado em sistema diferente do empregado neste trabalho.

A aplicação do teste de imunofluorescência para a identificação de antígenos grupo-específico nos isolados, demonstrou resultados positivos em 14 (70%) amostras, considerados excelentes em relação a Donaldson et al. (1958) citado por Storz (1971) que obtiveram resultados desapontadores na aplicação do teste em esfregaços para o diagnóstico de clamidiose de perus e em relação a Nichols et al. (1963) que classificaram o teste de anticorpos fluorescentes como superior e mais rápido que a coloração pelo método de Giemsa ou isolamento do agente, na pesquisa de clamídia em esfregaços de conjuntiva.

O teste de imunofluorescência forneceu também resultados satisfatórios em impressões de órgãos, estando de acordo com Bates et al. (1965) que observaram uma alta correlação entre as lesões macroscópicas de camundongos e perus infectados por clamídia e a fluorescência nos esfregaços de órgãos dos animais e Bauman (1973) que demonstrou antígenos-específicos para clamídia em 21 de 24 esfregaços de diferentes órgãos de bezerros bovinos, entre os quais o pulmão. Do mesmo modo Dvorakova (1979) demonstrou uma grande quantidade de células especificamente fluorescentes em órgãos de mamíferos domésticos naturalmente infectados por clamídia. Convém assinalar que em nenhum dos trabalhos referentes à ocorrência ou isolamento do agente clamidiano em bubalino (Singh & Malik 1969, Ognyanov et al. 1973, Ognyanov et al. 1974, Gupta et al. 1976, Rowe et al.

1978, Dhingra et al. 1980), o diagnóstico e a confirmação do isolamento não incluíram o teste de imunofluorescência em impressões de órgãos lesados, empregado com relativo sucesso neste experimento.

Anticorpos específicos para clamídia em soro de bubalinos foram demonstrados, através do teste de fixação do complemento, em animais do Egito e na Índia (Schmatz et al. 1978, Hafez & Krauss 1979, Dhingra et al. 1981), porém os animais eram aparentemente normais. Em bubalinos doentes apenas Ognyanov et al. (1973) e Ognyanov et al. (1974) em surtos de encefalomielite ocorridos na Bulgária, demonstraram anticorpos específicos para clamídia.

Rowe et al. (1978) e Dhingra et al. (1980) identificaram a presença de clamídia em materiais provenientes, respectivamente, de animais aparentemente normais e com processo pneumônico empregando o teste de imunofluorescência.

A evidenciação de antígenos clamidianos em material de bubalinos acometidos de alteração patológica foi obtida neste experimento, enquanto que em outros surtos Singh & Malik (1969) isolaram agente clamidiano de homogenizados de pulmão de búfalos aparentemente saudáveis, sem confirmação imunológica dos isolados obtidos; do mesmo modo Gupta et al. (1976) também não confirmaram os achados obtidos de processo pneumônico, exigência enfatizada por Schachter & Dowson (1979), que a recomendaram como necessária para minimizar a possibilidade de resultados falso-positivos e assegurar a presença de microrganismo nas preparações examinadas. Este critério mínimo deve ser adotado ao lado da passagem em ovo embrionado com a identificação dos microrganismos isolados por imunofluorescência.

Os isolados obtidos neste experimento quando submetidos ao teste de imunofluorescência direta apresentaram resultados superiores à observação microscópica dos esfregaços corados pelo método já citados, incluindo as impressões diretas de órgãos lesados, estando isso de acordo com Nichols & McComb (1962) cujos trabalhos desenvolvidos com o agente do tracoma necessitaram, respectivamente na identificação, conforme fosse utilizado a coloração pelo método de Macchiavello ou a imunofluorescência, 3,7 e 2 passagens para confirmar o crescimento do agente citado em ovo embrionado, observando que esta era ainda superior por uma margem 2:1 em relação ao método de Giemsa. Do mesmo modo, os resultados estão de acordo com Truszczinsk & Sadowiski (1973) ao observarem que a técnica de imunofluorescência foi mais apropriada que a microscopia direta para a demonstração do agente em espécimes provenientes de bovinos. Donaldson et al. (1958) citado por Ross & Borman (1963) também usaram a técnica para a detecção da amostra JO de ornitose e concluíram que a mesma é tão eficiente quanto o teste de fixação de complemento para o diagnóstico de ornitose em perus.

No isolamento de *C. psittaci* em ovo embrionado a partir de homogeneizado pulmonares de búfalos abatidos

cl clinicamente normais, Singh & Malik (1969) confirmaram o isolamento através da observação de inclusões citoplasmáticas típicas, demonstrando também a patogenicidade do agente para o cobaio e a diminuição do tempo de sobrevivência do embrião (Storz 1971) porém os microrganismos isolados não foram testados sorologicamente para a confirmação da presença de antígeno grupo-específico.

Os dados colhidos neste estudo permitiram concluir que o microrganismo isolado a partir de material de bubalinos abatidos para consumo e acometidos de alteração de serosa, é um agente patogênico para o embrião de galinha, produz corpúsculos elementares e apresenta propriedades morfológicas, tintoriais, patogênicas e imunológicas que o colocam no grupo *Chlamydia* (Storz 1971) confirmando os achados de autores como York & Baker (1951), Singh & Malik (1969), Ognyanov et al. (1973), Ognyanov et al. (1974), Dhingra et al. (1980), ficando deste modo, caracterizada a ocorrência de *C. psittaci* entre os bubalinos de Belém do Pará, agente ainda não estudado no Brasil nesta espécie.

Agradecimentos.- Nossos agradecimentos às seguintes instituições, entidades e pessoas, sem o apoio das quais este trabalho não teria sido realizado: Dr. J. Bevan do Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Inglaterra, Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA/MA), Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/Pará), Médico Veterinário Airton Nogueira, Dra. Carmem Célia Costa da Conceição, PINDARÉ - Produtos Avícolas, Secretaria de Agricultura do Estado do Pará, Funcionários do LARA/Pará, Setor de Avicultura da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Dr. Edwaldo Loureiro (Fundação SEPS/Belém), funcionários do matadouro Socipe.

REFERÊNCIAS

- Abilgasanov M.M. 1983 Chlamydial abortion in cows, buffaloes and zebu. *Vet. Bull.*53(3):267.
- Bannister G.L., Boulanger P., Gray D.P., Chapman C.H., Avery R.J. & Corner A.H. 1962. Sporadic bovine encephalomyelitis in Canada. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*26:25-32.
- Bates H.A., Pomeroy B.S., Seal U.S. & Jay A.R. 1965. Ornithosis: experimental immunofluorescence studies. *Avian Dis.*9(1):24-30.
- Baumann G. 1973. Fluorescent histological technique for detecting experimental *Bedsonia* infections in the calf. *Arch. Exp. Veterinaermed.*28(6):847-867.
- Cater G.R. 1979. Rickettsia and Chlamydia, p. 233-242, 435-440. In: Charles C. Thomas (ed.) *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*, 3rd ed. Springfield.
- Dhingra P.N., Agarwal L.P., Mahajan V.M., Adlakha S.C. & Baxi K.K. 1981. Chlamydial group antigen: its preparation and use in complement fixation test for measuring Chlamydial group antibodies in animals. *Zentralbl. Veterinaermed.*28:336-340.
- Dhingra P.N., Agarwal L.P., Mahajan V.M. & Adlakha S.C. 1980. Isolation of Chlamydia from pneumonic lungs of buffaloes, cattle and sheep. *Zentralbl. Veterinaermed.*27:680-682.
- Donaldson R., Davis D.E., Watkins J.R. & Sulkin S.E. 1958. The isolation and identification of Ornithosis infection in turkeys by tissue culture and immunocytochemical staining. *Am. J. Vet. Res.*19:950-954.
- Dvorakova D. 1979. Detection of Chlamydia by the immunofluorescence method. *Vet. Med. (Prague)* 24(10):603-614.
- Foggie A. 1979. Chlamydial infections in mammals. *Vet. Rec.* 100:315-317.
- Gupta P.P., Singh B. & Dhingra P.N. 1976. Chlamydial pneumonia in a buffalo calf. *Zentralbl. Veterinaermed.*23:779-781.
- Hafez S.M. & Krauss H. 1979. Detection of antibodies against some

- respiratory pathogens in the sera of domestic animals in Egypt. *Bull. Animal Health and Production in Africa*.27(3):209-214.
- Hanna L., Schachter J. & Jawetz E. 1974. Chlamydiae (psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group), p.795-804. In: Lennette H.E., Spaulding E.H., Truant J.P. (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 2nd ed. American Society Microbiology, Washington.
- Harshfield G.S. 1970. Sporadic bovine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*156(4):466-477.
- Jones B.R. 1974. Laboratory tests for chlamydial infections: their role in epidemiological studies of trachoma and its control. *Br. J. Ophthalmol.*58:438-454.
- Kolb P. von & Psota A. 1968. Myagawanellen-Isolierungsversuche bei Polyarthrit, Pneumonie, Encephalomyelitis und Interstieller Herdnephritis (Fleckniere) der Kaelber. *Wien. Tieraerztl. Monatschr.*55:443-455.
- Lewis, V.J., Thacker, W.L. & Cacciapuoti A.F. 1972. Detection of *Chlamydia psittaci* by immunofluorescence. *Appl. Microbiol.*24(1):8-12.
- Menges R.W., Harshfield G.S. & Wenner H.A. 1953. Sporadic bovine encephalomyelitis: studies on pathogenesis and etiology of the disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 122(910/915):294-299.
- Moorthi A.R.S. & Spradbrow P.B. 1978. *Chlamydia psittaci* infection of horses with respiratory disease. *Equine Vet. J.*10(1):38-42.
- Morange A. 1985. De la psittacose, ou infection spéciale déterminée par des perruches. *Tèse, Paris*.
- Nascimento C.N.B., Carvalho L.O.D. & Lourenço Jr. J.B. 1979. Importância do búfalo para a pecuária brasileira. CPATU, Belém.31p.
- Nichols R.L. & McComb D.E. 1962. Immunofluorescent studies with trachoma and related antigens. *J. Immunology* 89:545-554.
- Nichols R.L., McComb D.E., Haddad N. & Murray E.S. 1963. Studies on trachoma: II. Comparison of fluorescent antibodies, Giemsa and egg isolation methods for detection of trachoma virus in human conjunctival scrapings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*12:223-229.
- Ognyanov D.D., Panova M., Arnaudov, S. & Michev. S. 1973. Neorickettsial encephalomyelitis in buffalo calves. *Veterinarna Sbirka* 70(9):13-15.
- Ognyanov D., Panova M. & Pavlov N. 1974. Sporadic encephalomyelitis in buffalo calves. *Vet. Med. Nauki* 11(1):3-10.
- Pienaar J.G. & Schutte A.P. 1975. The occurrence and pathology of chlamydiosis in domestic and laboratory animals: a review. *Onderstepoort J. Vet. Res.*42(3):77-90.
- Riggs J.L. 1979. Immunofluorescent staining, p.141-151. In: Lennette E.H. & Schmidt N.J. (ed.) *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. American Public Health Association, Washington.
- Ross M.R. & Borman E.K. 1963. Direct and indirect fluorescent antibody technique for the psittacosis-lymphogranuloma groups of agents. *J. Bacteriol.*85:851-858.
- Rovozzo G.G. & Burke C.N. 1973. Preparation of material, equipment and supplies, p.244-247. In: *A manual of basic virological technique*. Proce-Hall, Englewood.
- Rowe L.W.R., Hedger R.S & Smale C. 1978. The isolation of *Chlamydia psittaci*-like agent from a free living african buffalo (*Synceus caffer*). *Vet. Rec.*103:13-14.
- Schachter J. & Dowson C.R. 1979. Psittacosis-lymphogranuloma agents-tric agents, p.1021-59. In: Lennette E.H. & Schmidt, N.J. (ed.) *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. American Public Health Association, Washington.
- Schachter J., Storz, J., Taruzzo M.L. & Bogel K. 1973. Chlamydiae as agent of human and animal diseases. *Bull. WHO.*49:443-449.
- Schmatz H.D., Krauss H. & Viertel 1978. Seroepidemiologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern von Rickettsien und Chlamydien bei Hauswiederkaeuern in Aegypten, Somalia und Jordanien. *Acta Trop.* 35:101-111.
- Shewen P. 1980. Chlamydial infections in animals: a review. *Can. Vet. J.*21:2-11.
- Singh N.B. & Malik B.S. 1969. Isolation of agent resembling psittacosis-lymphogranuloma venerum (PLV) group of viruses. *Indian J. Exp. Biology.* 7:62-64.
- Sprears S. & Storz J. 1979. Biotyping of *Chlamydia psittaci* based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide. *Infect. Immun.*24(1):224-232.
- Storz J. 1968. Psittacosis-lymphogranuloma agents in bovine pneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*152(6):814-819.
- Storz J. 1971. Chlamydia and Chlamydia-induced disease. Charles C. Thomas, Springfield. 358p.
- Truszczyński M. & Sadowiski J.M. 1973. Evaluation of the methods for the identification of Chlamydia (*Myiagawanella*) organisms in bovine materials. *Med. Veter.*29(7):319.
- Vera H.D & Dumoff M. 1974. Culture media, p.881-888. In: Lennette H.E., Spaulding H.E., Truant J.P. (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington.
- Wilson M.R. & Thompson R.G. 1968. Chlamydia pneumonia of calves. *Res. Vet. Sci.*9:467-473.
- York C.J. & Baker J.A. 1951. A new number of the psittacosis-lymphogranuloma group of viruses that causes infection in calves. *J. Exp. Med.*93:587-604.