



AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE MICROAGLUTINAÇÃO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Brachyspira pilosicoli*

EVALUATION OF A MICROAGGLUTINATION TEST DETECTING ANTIBODIES AGAINST *Brachyspira pilosicoli*

DAVID EMILIO SANTOS NEVES DE BARCELLOS¹, SANDRA MARIA BOROWSKI² & LUÍS EDUARDO RAZIA¹

RESUMO

A colite espiroquetal, causada pela *Brachyspira pilosicoli*, é uma enfermidade de importância econômica e sanitária para a suinocultura. O diagnóstico inicial, baseado na demonstração da presença de espiroquetas em esfregaços de fezes, costuma apresentar altas taxas de resultados falso-positivos ou falso-negativos, além de não diferenciar as espécies patogênicas das apatogênicas. Embora menos sensíveis e específicas do que os testes moleculares, as provas sorológicas são consideradas alternativas mais eficientes do que as provas fenotípicas. O objetivo deste trabalho foi o de analisar a reação homóloga e heteróloga de soro produzido contra a cepa padrão de *B. pilosicoli*, usando a prova de aglutinação microscópica. Avaliou-se um método de aglutinação microscópica (microaglutinação), usando anticorpos policlonais contra a cepa de referência de *B. pilosicoli* (P43/6/78). Houve reação contra todos os 9 isolados de campo da espécie, o que indicou um grau de sensibilidade satisfatório. O título médio da reação de microaglutinação homóloga entre a cepa P43/6/78 (referência de *B. pilosicoli*) e o soro hiperimune gerado contra a mesma foi de 1:1280. Para amostras de campo isoladas no RS, foi de 1:207 para *B. pilosicoli* e 1:12,5 para *B. hyodysenteriae*. A diferença de títulos presente entre a amostra de referência e os isolamentos de campo de *B. pilosicoli* sugere a existência de sorotipos. A constatação mesmo em baixo de reatividade cruzada entre *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*, sugere a existência de antígenos comuns nas duas espécies.

Descritores: *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira* spp., sorologia, microaglutinação, colite, espiroquetas.

ABSTRACT

Porcine colonic spirochetosis, caused by *Brachyspira pilosicoli*, has an important impact in pig production and health. The disease produces mild pathological lesions, limited to the gross intestine, and can result in impaired growth and decreased feed conversion rate. The primary diagnosis can be reached by demonstration of spirochetes in fecal smears. Phenotypical tests such as this one usually shows high rate of false-positive or false-negative results and is unable to differentiate between pathogenic and non-pathogenic species. In spite of having lower sensitivity and specificity than molecular methods, serological tests are alternatives more efficient than phenotypical methods. The objective of the work was to analyse homologous and heterologous reaction against the *B. pilosicoli* type strain, using microscopic agglutination test, with polyclonal antiserum raised against the reference strain of *B. pilosicoli* (P43/6/78) was evaluated. The serum reacted against all 9 field isolates, indicating a satisfactory sensitivity. Mean titer of homologous microscopic agglutination between P43/6/78 (*B. pilosicoli* reference strain) and hyperimmune homologous serum was 1:1280. For field strains isolated in the State of Rio Grande do Sul, was 1:207 for *B. pilosicoli* and 1:12.5 for *B. hyodysenteriae*. The differences in titers between field isolates of *B. pilosicoli* (SIPV) and against the reference strain of the species (P43/6/78) could represent antigenic variations. It was observed, in low degree, cross reactivity between *B. pilosicoli* and *B. hyodysenteriae*, suggesting the presence of common antigens in both species.

Key words: *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira* spp., serology, microscopic agglutination test, colitis, spirochetes.

INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas intestinais causam prejuízos significativos para a suinocultura em todo o mundo [13]. Avanços recentes na classificação de espiroquetas intestinais humanas e animais levaram ao reconhecimento de que espécies do gênero *Brachyspira* (anteriormente *Serpulina*) podem causar diarreia em suínos nas fases de recria e terminação. A colite causada pela *Brachyspira pilosicoli* tem importância econômica e sanitária para a suinocultura [12], podendo causar crescimento retardado e deficiência da conversão alimentar [7, 23]. O diagnóstico inicial da colite geralmente consta da demonstração de espiroquetas em esfregaços de fezes por microscopia direta ou imunofluorescência, técnicas que costumam apresentar altas taxas de resultados falso-positivos ou falso-negativos, além de não diferenciarem, inequivocamente, as espécies patogênicas (*B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*) e das apatogênicas (*B. murdochii*, *B. innocens* e *B. intermedia*) [1]. A identificação definitiva pode ser obtida pela PCR e análise de restrição dos amplicons obtidos, técnicas onerosas, complexas e que exigem estrutura especializada para sua realização [3,19].

Apesar de menos sensíveis e específicas do que os testes moleculares, as provas sorológicas são mais eficientes do que as provas fenotípicas convencionais para a diferenciação das espiroquetas. Vários anticorpos policlonais [6, 8, 15, 20] ou monoclonais [5, 18, 21, 22] foram usados na identificação de amostras de *Brachyspira* spp. A aglutinação microscópica (microaglutinação) destaca-se por ser uma técnica simples e eficiente, com um alto nível de consistência e sensibilidade para identificar anticorpos contra a *B. hyodysenteriae* [20]. Nesse trabalho, foram analisadas 12 amostras da bactéria e 9 outros tipos de espiroquetas intestinais e a técnica foi comparada com o teste de aglutinação em lâmina. Os dois métodos apresentaram resultados consistentes e foram capazes de diferenciar entre amostras. O mesmo tipo de teste foi usado para avaliar a soroconversão, após a infecção experimental com *B. hyodysenteriae* [16]. Outra prova sorológica [15] que visava detectar anticorpos aglutinantes (teste de

aglutinação por microtitulação), foi considerada sensível e capaz de diferenciar entre diferentes isolados de *Brachyspira* spp. [6] e medir a conversão sorológica de leitões experimentalmente infectados com *B. hyodysenteriae* [9].

Aglutininas, geradas contra diferentes isolados de espiroquetas totais, tendem a apresentar reações cruzadas significativas [1]. As proteínas flagelares das espécies de *Brachyspira* representam aproximadamente 10% do peso bacteriano total e são muito conservadas entre gêneros e espécies de espiroquetas [14]. Anticorpos gerados contra essas estruturas podem apresentar reações cruzadas. Para diminuir as reações inespecíficas, pode-se absorver as amostras de soro na tentativa de remover anticorpos comuns. Uma outra classe de antígenos (oligossacarídeos da membrana externa) pode ser usada para diferenciar espécies e mesmo isolados, por sua diversidade antigênica maior. O uso de soros hiperimunes absorvidos, possibilitou o reconhecimento de 9 sorotipos (A a I) entre vários isolados de *B. hyodysenteriae* [10,11]. Não existem estudos sobre tipificação ou sobre o uso da técnica de microaglutinação para detectar anticorpos contra a *B. pilosicoli*.

O objetivo deste trabalho foi o de analisar a reação homóloga e heteróloga de soro produzido contra a cepa padrão de *Brachyspira pilosicoli*, usando a prova de aglutinação microscópica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação do antígeno

Foram usadas 10 amostras de *Brachyspira pilosicoli* e 4 amostras de *B. hyodysenteriae*. A origem e características dos isolados do Rio Grande do Sul (identificados como SIPV) e a cepa de referência de *B. pilosicoli* foram descritas anteriormente [1, 2]. Os cultivos foram propagados no meio líquido pré-reduzido e esterilizado [17], incubado a 37°C sob agitação, em volume de 5 mL, numa atmosfera de 10% de H₂, 10% de CO₂ e 80% de N₂. Os antígenos constaram de cultivos na fase logarítmica, diluídos para alcançar aproximadamente 100 espiroquetas por campo microscópico.

Preparação do soro hiperimune

Seguindo técnica padrão [4], foram hiperimunizados 4 coelhos com cepa de referência de *B. pilosicoli* (P43/6/78).

Teste de microaglutinação

O teste foi realizado pela observação direta em microscópio de campo escuro numa magnificação de 400X. Foi usada uma mistura de células totais de *Brachyspira* spp. e diluições na base 2 em solução salina tamponada de anticorpos policlonais (soro hiperimune) em placas de microtitulação com fundo chato [20]. Com o uso de uma densidade aproximada de 100 espiroquetas por campo microscópico, a aglutinação de 10 a 50% das espiroquetas foi considerada positiva, 51 a 100% fortemente positiva, enquanto que menos de 10% foi considerada negativa. Os títulos foram expressos como a recíproca da maior diluição do anticorpo capaz de aglutinar o antígeno. O procedimento foi repetido 5 vezes, usando cultivos do mesmo organismo em cada ocasião. Os resultados finais foram expressos como a média entre as repetições.

RESULTADOS

Foi realizada uma avaliação do teste de microaglutinação com relação à sua utilidade para emprego rotineiro na classificação de isolados de *Brachyspira pilosicoli*. Uma tabulação dos resultados e das reações sorológicas contra amostras de campo (SIPV) de *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae* consta da Tabela 1. O título médio da reação de microaglutinação homóloga entre a cepa P43/6/78 (de referência de *B. pilosicoli*) e o soro hiperimune gerado contra a mesma foi de 1:1280. Para amostras de campo isoladas no RS, foi de 1:207 para *B. pilosicoli* e 1:12,5 para *B. hyodysenteriae*. Procurou-se avaliar a validade do uso do teste de microaglutinação para detectar anticorpos contra *B. pilosicoli* e analisar a reação cruzada com *B. hyodysenteriae*. A partir dos resultados dos testes, observou-se um grau de sensibilidade satisfatório. A maior diferença de título entre lotes de antígenos de uma mesma amostra foi de duas vezes (uma diluição).

Tabela 1. Resultado da prova de microaglutinação realizada com amostras de *Brachyspira* spp. isoladas no Rio Grande do Sul e soro hiperimune para a amostra padrão de *B. pilosicoli* (P43/6/78).

Identificação	Espécie	Título médio	Amplitude
P43/6/78	<i>B. pilosicoli</i>	1:1280	1:800/ 1:1600
SIPV 1	<i>B. pilosicoli</i>	1:50	1:50/ 1:50
SIPV 8	<i>B. pilosicoli</i>	1:200	1:200/ 1:200
SIPV 14	<i>B. pilosicoli</i>	1:240	1:200/ 1:400
SIPV 15	<i>B. pilosicoli</i>	1:50	1:50/ 1:50
SIPV 18	<i>B. pilosicoli</i>	1:200	1:200/ 1:200
SIPV 19	<i>B. pilosicoli</i>	1:560	1:400/ 1:800
SIPV 20	<i>B. pilosicoli</i>	1:50	1:50/ 1:50
SIPV 22	<i>B. pilosicoli</i>	1:200	1:200/ 1:200
SIPV 23	<i>B. pilosicoli</i>	1:320	1/200/ 1:400
SIPV 4	<i>B. hyodysenteriae</i>	1:50	1:50/ 1:50
SIPV 10	<i>B. hyodysenteriae</i>	< 1:50	-
SIPV 17	<i>B. hyodysenteriae</i>	< 1:50	-
SIPV30	<i>B. hyodysenteriae</i>	< 1:50	-

DISCUSSÃO

A reação obtida entre a cepa padrão e o antisoro homólogo (1:1280) foi bastante superior à observada contra outras amostras da espécie (1:207). Comparando com a reação para *Brachyspira hyodysenteriae* (1:12,5), nota-se uma maior reatividade dentro da mesma espécie. Isso seria previsível, pois a probabilidade de que sejam compartilhados epítomos comuns no envelope externo é maior entre amostras bacterianas de uma mesma espécie.

Os resultados indicam que isolados de *B. pilosicoli* podem ser facilmente detectados usando anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra a cepa padrão da espécie (P43/6/78). As diferenças de títulos entre isolados de campo de *B. pilosicoli* (SIPV) entre si e com a cepa de referência da espécie (P43/6/78) poderiam representar variações antigênicas, caracterizando diferenças de sorogrupos entre membros da espécie. Para *B. hyodysenteriae*, foi sugerido que reações cruzadas poderiam ser associadas com proteínas da membrana externa ou com antígenos termolábeis, associados com o lipopolissacarídeo (lipooligossacarídeo) da membrana externa [6]. Além disso, anticorpos contra proteínas flagelares poderiam se relacionar com reações sorológicas cruzadas [12, 14]. Entretanto, nas espiroquetas, os flagelos se localizam dentro da célula, ocupando o espaço periplasmático, distribuídos em torno de um cilindro protoplasmático central. Dessa forma, na bactéria íntegra, os anticorpos não entrariam em contato com antígenos flagelares, o que poderia reduzir a importância desse tipo de reatividade cruzada. Para *B. hyodysenteriae*, um esquema de tipagem sorológica foi desenvolvido, com 9 sorogrupos, entre A e I (10, 11). Não existem estudos analisando diferenças antigênicas similares em *B. pilosicoli*. Novos estudos envolvendo a absorção dos soros deverão ser realizados, para tentar estabelecer um sistema de tipagem sorológica para *B. pilosicoli*.

CONCLUSÕES

O teste de microaglutinação microscópica usando soro policlonal produzido contra a amostra padrão de *Brachyspira pilosicoli* reagiu contra todos os 9 isolados de campo da espécie. Foi observada diferença de títulos, sugerindo a existência de sorogrupos. A constatação, mesmo em pequeno grau, de reatividade cruzada entre *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*, sugere a existência de antígenos comuns em ambas espécies.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Dr. Gerald Duhamel, Department of Veterinary Medical Sciences, Lincoln, Nebraska, EUA, pela sessão da cepa de referência *Brachyspira pilosicoli* (P43/6/78).

REFERÊNCIAS

- 1 **Barcellos D.E.S.N. 2000.** Infecção por *Brachyspira* spp. em suínos: epidemiologia e caracterização fenotípica e genotípica das espécies. 163f. Rio de Janeiro, RJ. Tese (Doutorado em Ciências, Microbiologia) - Curso de Pós Graduação do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 2 **Barcellos D.E.S.N., Mathiesen M., Uzeda M., Kader I.T.A. & Duhamel G. 2000.** Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Veterinary Record*. 146: 398-403.
- 3 **Barcellos D.E.S.N., Uzeda M., Ikuta N., Lunge V.R., Fonseca A.S.K., Kader I.T.A. & Duhamel G. 2000.** Rapid identification and typing of porcine intestinal spirochetes by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. *Veterinary Microbiology*. 75: 189-198.
- 4 **Burrows M.R. & Lemke R.M. 1981.** Identification of *Treponema hyodysenteriae* by a rapid slide agglutination test. *Veterinary Record*. 108:187-189.

- 5 Burrows M.R., Lysons R.J., Rowlands G.J. & Lemke R.M. 1984. An enzyme-linked immunosorbent assay for detecting serum antibody to *Treponema hyodysenteriae*. In: *Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society Congress* (Ghent, Belgium). p. 186.
- 6 Diarra A.T., Mittal K.R. & Achacha M. 1994. Evaluation of microagglutination test for differentiation between *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* and *S. innocens* and serotyping of *S. hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 1976-1979.
- 7 Duhamel G.E. 1998. Colonic spirochetosis caused by *Serpulina pilosicoli*. *Large Animal Practice*. 19: 14-20.
- 8 Egan I.T., Harris D.L. & Joens L.A. 1983. Comparison of the microtitre agglutination test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herds affected with Swine Dysentery. *American Journal of Veterinary Research*. 44: 1323-1328.
- 9 Fischer L.F. & Olander H.J. 1981. Shedding of *Treponema hyodysenteriae*, transmission of disease, and agglutinin response of pigs convalescent from swine dysentery. *American Journal of Veterinary Research*. 42: 450-455.
- 10 Hampson D.J. 1990. New serogroups of *Treponema hyodysenteriae* (G, H and I). *Veterinary Record*. 127: 524.
- 11 Hampson D.J., Mhoma J.R.L., Combs B. & Buddle J.R. 1989. Proposed revisions to the serological typing system for *Treponema hyodysenteriae*. *Epidemiology and Infection*. 102: 75-84.
- 12 Hampson D.J. & Trott D.J. 1995. A review - Intestinal spirochetel infections of pigs: an overview with an Australian perspective. In: Hennessy, D.P. & Cranwell, P.D. (Eds). *Manipulating Pig Production V*. Werribee: S.R. Frankland LTD, pp.139-169.
- 13 Holland R.E. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews*. 3: 345-375, 1990
- 14 Jensen N.S. 1997. Detection, identification and sub-specific differentiation of intestinal spirochetes. In: Hampson, D.J. & Stanton, T.B. (Eds). *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. Wallingford: C.A.B International, pp. 323-341.
- 15 Joens L.A., Harris D.L., Kinyon J.M. & Kaeberle L. 1978. Microtitration agglutination for detection of *Treponema hyodysenteriae* antibody. *Journal of Clinical Microbiology*. 8: 293-298.
- 16 Kashiwasaki M., Adachi Y. & Kume T. 1980. Microscopic agglutination test for antibody against *Treponema hyodysenteriae*. *National Institute Animal Health Quarterly*. 20:114-115.
- 17 Kunkle R.A., Harris D.L. & Kinyon J.M. 1986. Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 24: 669-671.
- 18 Lee J.I. & Hampson D.J. 1995. A monoclonal antibody reacting with the cell envelope of spirochetes isolated from cases of intestinal spirochaetosis in pigs and humans. *FEMS Microbiology Letter*. 131: 179-184.
- 19 Leser T.D., Moller K., Jensen T.K. & Jorsal S.E. 1997. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly b-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Molecular and Cellular Probes*. 11: 363-372.
- 20 Lysons R.J. 1991. Microscopic agglutination: a rapid test for identification of *Treponema hyodysenteriae*. *Veterinary Record*. 129: 314-315.
- 21 Mhoma J.R.L., Hampson D.J. & Robertson I.D. 1992. A serological survey to determine the prevalence of infection with *Treponema hyodysenteriae* in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*. 69: 81-84.
- 22 Rayment S.J., Lee B.J., Hampson D.J. & Livesley M.A. 1998. Identification of a gene sequence encoding a putative pyruvate oxidoreductase in *Serpulina pilosicoli*. *FEMS Microbiology Letter*. 166: 121-126.
- 23 Taylor D.J. & Trott D.J. 1997. Porcine Intestinal Spirochaetosis and Spirochaetal Colitis. In: Hampson, D.J. & Stanton, T.B. (Eds). *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. Wallingford: C.A.B International, pp. 211-241.



