

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Bacterinas comerciais falharam em induzir resposta
imune humoral em camundongos contra alguns
fatores de patogenicidade de *Mycoplasma
hyopneumoniae***

Andressa Fisch

Pelotas, 2014

ANDRESSA FISCH

Bacterinas comerciais falharam em induzir resposta imune humoral em camundongos contra alguns fatores de patogenicidade de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Área do conhecimento: Biologia Molecular e Imunologia.

Orientador: Fabricio Rochedo Conceição
Co-Orientadora: Silvana Beutinger Marchioro

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F528b Fisch, Andressa

Bacterinas comerciais falharam em induzir resposta imune humoral em camundongos contra alguns fatores de patogenicidade de *Mycoplasma hyopneumoniae* / Andressa Fisch. – 53f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Fabricio Rochedo Conceição ; co-orientador Silvana Beutinger Marchioro.

1.Biotecnologia. 2. Pneumonia enzoótica suína.
3.Adesina. 4.Vacina comercial. 5.Anticorpos. 6.ELISA.
**7.Antígeno recombinante. I.Conceição, Fabricio Rochedo.
II.Marchioro, Silvana Beutinger. III.Título.**

CDD: 636.4.0089

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Geferson Fischer, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição, Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

À minha mãe Roseli por todos os sacrifícios realizados em nome de meus interesses, pelo apoio e confiança incondicionais; por ter tornado possível a finalização de mais esta etapa profissional, e por tantas coisas impossíveis de enumerar, meu agradecimento eterno. Ao meu irmão Aléx, pela presença. Aos meus tios Claurení e Antoninha e aos meus primos André, Fernanda e Vanessa pelas muitas vezes deixaram de lado o seu próprio bem estar em meu benefício, nas mais diversas ocasiões. À minha madrinha Vera, minha avó Lucila, meus primos Emerson e Gabi e meu afilhado Arthur por trazerem luz aos meus dias, tornando-os sempre felizes ao seu lado.

Ao meu companheiro Érico pela presença constante, pelas palavras de calma e incentivo nos momentos de dúvida, por ser o apoio que me manteve em pé nos momentos mais difíceis, pela paciência inabalável; enfim, por tudo aquilo que não precisa ser dito e que é responsável por lembrar-me a cada dia da razão de seguir adiante.

Aos meus orientadores Fabrício Conceição e Odir Dellagostin pela oportunidade de trabalhar em sua equipe e por todo o apoio, confiança e reconhecimento dispensados ao meu trabalho, bem como pelos exemplos profissionais pelos quais me guio durante todos esses anos. Especialmente à minha co-orientadora Silvana pela orientação direta, pelo auxílio e por todo o aprendizado proporcionado desde o início do trabalho.

Aos professores deste programa pelos ensinamentos e pelo apoio profissional. Aos meus colegas de laboratório Charles, Sérgio, Karen, Natasha e Ana por todo o apoio, paciência, dedicação e disponibilidade.

Novamente e especialmente à minha prima Vanessa, por ser irmã, colega, confidente, e nestes anos de laboratório, de forma incansável, professora e orientadora. Enfim, por um sem número de coisas que a ela devo e pelas quais nunca terei palavras suficientes para agradecer.

A todos os demais que não puderam ser citados nestas páginas, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

Resumo

FISCH, Andressa. **Bacterinas comerciais falharam em induzir resposta imune humoral em camundongos contra alguns fatores de patogenicidade de *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, gera importantes perdas econômicas para a indústria suinícola em todo o mundo. As vacinas atualmente disponíveis diminuem as perdas produtivas, mas não impedem a infecção dos rebanhos. O desenvolvimento de novas estratégias vacinais têm se mostrado necessário. Neste trabalho, avaliou-se a resposta imune humoral induzida pela inoculação, em camundongos, de seis bacterinas comerciais contra quinze fatores de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* previamente caracterizados por nosso grupo. A detecção de anticorpos foi realizada através de ELISA indireto. Soroconversão foi utilizada para determinar reatividade biologicamente significativa. O antígeno MHP_0067 foi reconhecido pelo soro de um único grupo inoculado. Os antígenos MHP_0513 e MHP_0580 foram reconhecidos pelos soros de quatro grupos inoculados cada. Para os demais antígenos não houve soroconversão pelos grupos inoculados com as bacterinas comerciais. Identificar antígenos potencialmente protetores ausentes nestas vacinas e associá-los à vacinação convencional pode promover o aumento dos níveis de proteção. Estes antígenos são potenciais alvos para a composição de uma vacina de subunidade recombinante associada à vacina comercial.

Palavras-chave: Pneumonia Enzoótica Suína, vacina comercial, anticorpo, ELISA, antígeno recombinante, adesina.

Abstract

FISCH, Andressa. **Commercial bacterins failed to induce humoral immune response in mice against some *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenicity factors. 2014.** 56f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Enzootic Pneumoniae (EP), caused by *Mycoplasma hyopneumoniae*, generates significant economic losses to the pig industry worldwide. The currently available vaccines confer partial protection against the EP and the development of new vaccine strategies have proven necessary. In this paper, humoral immune response in mice of six commercial bacterins against sixteen recombinant antigens previously characterized of *M. hyopneumoniae* was evaluated by indirect ELISA. Seroconversion was used to determine biologically significant reactivity. The antigen MHP_0067 was recognized by sera from one inoculated group. The antigens MHP_0513 and MHP_0580 were recognized by sera from four inoculated groups each. For other antigens, not seroconversion was detected. Identify potentially protective antigens underexpressed in these vaccines and associate them with conventional vaccination may promote increased levels of protection. These antigens are potential targets for the composition of a recombinant subunit vaccine associated with the commercial vaccine.

Palavras-chave: Enzootic Pneumoniae, commercial vaccine, antibody, ELISA, recombinant antigen, adhesin.

Abreviaturas e Siglas

CEEA – Comitê de Ética e Experimentação Animal
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA – Ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic acid*)
ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
EP – Pneumoniae Enzoótica Suína (*Enzootic Pneumonia*)
FLBA – Fluído de Líquido Brônquio-Alveolar
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IFN- γ – Interferon gama
IL-6 – citocina seis
IL-8 – citocina oito
IL-10 – citocina dez
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)
PES – Pneumonia Enzoótica Suína
PRRSV – Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*)
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Pneumoniae Enzoótica Suína	10
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	17
3.1 Hipótese	17
3.2 Objetivo	17
3.1 Objetivos específicos	17
4 CAPÍTULO I	18
5 CONCLUSÃO GERAL	48
6 REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO GERAL

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), doença de alcance global responsável por grandes perdas econômicas à indústria suinícola (Thacker, 2004). O controle da PES se dá através da implementação de técnicas adequadas de manejo dos rebanhos associada à vacinação. As vacinas comerciais atualmente disponíveis consistem em cultivos inativados de *M. hyopneumoniae* associados a adjuvantes, e apesar de promoverem melhoras nos índices produtivos dos animais vacinados, não são capazes de impedir a disseminação e instalação da doença nos rebanhos (Maes et al., 2008).

O desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra a PES é essencial para o progresso do controle da doença. A proteção limitada apresentada pelas vacinas atualmente disponíveis pode estar relacionada a diversos fatores, como a via de administração e o adjuvante associado, e especialmente à ausência, em sua composição, de antígenos importantes que estimulem resposta imune capaz de interferir no processo de infecção do trato respiratório suíno pelo patógeno. A composição proteômica do cultivo de *M. hyopneumoniae* (e consequentemente da vacina preparada a partir deste) varia de acordo com a cepa utilizada e as condições de cultivo às quais ela é exposta (Adams et al., 2005; Madsen et al., 2006; Pinto et al., 2009). Esta variação é observada especialmente na expressão de proteínas associadas a processos de patogênese da doença. O cultivo *in vitro* do *M. hyopneumoniae* diminui a expressão de proteínas associadas à virulência (Madsen et al., 2008), uma vez que elas não são necessárias neste ambiente. Embora estejam presentes no proteoma de cepas avirulentas, as adesinas são superexpressas em cultivos de cepas patogênicas (Pinto et al., 2009). Acredita-se que a aderência íntima do *M. hyopneumoniae* ao cílio respiratório seja o principal fator de virulência do organismo (Zhang et al., 1994) e, por isso, prevenir a interação

entre o hospedeiro e o agente antes da colonização pode resultar em uma vacinação mais eficaz (Fagan et al., 1996)

Muitos antígenos de *M. hyopneumoniae* têm sido produzidos e avaliados como vacinas recombinantes em camundongos. Porém, há muitas dificuldades em se trabalhar experimentalmente com suínos nas condições necessárias para testes vacinais conclusivos. Não existem modelos experimentais de infecção e doença necessários para o desenvolvimento de estudos com grandes quantidades de alvos vacinais. Por isso, torna-se necessária a escolha criteriosa dos antígenos antes do delineamento de testes em suínos; isso aumenta a chance de sucesso no desenvolvimento de vacinas efetivamente protetoras e diminui o comprometimento de esforços e recursos. Identificar antígenos potencialmente protetores contra os quais as vacinas atualmente disponíveis sejam incapazes de gerar resposta imune é uma estratégia útil que pode ajudar a guiar a escolha destes antígenos para teste de proteção em rebanhos experimentais e a campo. A associação de antígenos selecionados à vacinação com bacterinas representa uma abordagem vacinal realista e racional em busca de níveis de proteção mais satisfatórios do que os atualmente obtidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pneumonia Enzoótica Suína

Etiologia e Epidemiologia

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma enfermidade respiratória crônica que acomete suínos em todo o mundo, podendo atingir até 100% de prevalência nos rebanhos (Thacker & Minion, 2010). *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico primário da doença, sendo também um dos principais envolvidos no desenvolvimento do Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (Bochev, 2007). O desenvolvimento da PES gera perdas econômicas significativas ao diminuir o desempenho produtivo dos animais acometidos devido ao aumento do índice de conversão alimentar e queda no ganho médio diário de peso, e ao elevar os custos de produção devido à necessidade de medicações para o tratamento da enfermidade (Maes et al., 2008).

O *M. hyopneumoniae* é transmitido entre os animais através de secreções respiratórias contaminadas. A transmissão por contato indireto se dá através de aerossóis, e o patógeno é disseminado por grandes distâncias através do ar, permanecendo em condições de infectar rebanhos a até nove quilômetros de distância (Dee et al., 2009; Otake et al., 2010; Desrosiers, 2011). Outros suídeos também são contaminados, permanecendo como reservatórios silvestres do patógeno (Kuhnert et al., 2011), tornando muito difícil a eliminação da infecção do rebanho.

Patogenia

Uma vez no trato respiratório, a bactéria atravessa a camada de muco e se adere ao epitélio ciliado, iniciando a colonização. Embora o mecanismo exato pelo

qual o *M. hyopneumoniae* se adere aos cílios respiratórios não seja bem conhecido, sabe-se que proteínas de superfície estão envolvidas neste processo (Adams et al., 2005). *M. hyopneumoniae* expressa em sua superfície um número significativo de adesinas multifuncionais, cuja função principal é a aderência ao cílio respiratório (Robinson et al., 2013). Estas proteínas sofrem processos de clivagem proteolítica pós-transcricional e os fragmentos gerados se depositam superficialmente na bactéria. Estes fragmentos se ligam a diferentes componentes do tecido do hospedeiro, como os glicosaminoglicanos, heparina, fibronectina e o plasminogênio, facilitando a sua fixação (Bogema et al., 2011). As principais proteínas já identificadas incluem a família P97-P102 e seus parálogos (Minion et al., 2000; Djordjevic et al., 2004; Wilton et al., 2009; Bogema et al., 2011; Robinson et al., 2013).

Após a adesão inicial, o *M. hyopneumoniae* provoca o rompimento da barreira formada pela superfície mucociliar, resultando em ciliostase, perda dos cílios e lesão e morte das células epiteliais respiratórias (Hsu & Minion, 1998; Duensing et al., 1999; Pancholi et al., 2003). Sabe-se que o *M. hyopneumoniae* não penetra na célula hospedeira durante a colonização (Razin et al., 1998), porém são bastante limitadas as informações acerca dos mecanismos que desencadeiam a lesão ciliar. Ela pode se dar pela liberação de produtos tóxicos do metabolismo de *M. hyopneumoniae* sobre as células do hospedeiro (Razin et al., 1998) ou por estímulo direto através do aumento do cálcio intracelular nos cílios (Park et al., 2002). Há uma correlação positiva entre o número de organismos infectantes e a extensão das lesões pulmonares no hospedeiro, sugerindo que um grande número de células infectantes promove o recrutamento de grandes quantidades de células inflamatórias (Vranckx et al., 2012).

Macrófagos e linfócitos alveolares, quando estimulados pelo contato com *M. hyopneumoniae*, secretam citocinas inflamatórias (principalmente IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α), mucinas e mediadores inflamatórios (Choi et al., 2006; Hwang et al., 2011; Kim et al., 2012). A liberação destes compostos promove a atração de mais células de defesa, podendo ser observado, microscopicamente, o desenvolvimento de agregados linfóides com predomínio de macrófagos na região perivascular e peribronquiolar. Estes agregados comprimem as vias respiratórias e promovem atelectasia alveolar; em conjunto com o acúmulo de muco causado pela perda ciliar, estes mecanismos promovem o desenvolvimento de uma tosse crônica e não

produtiva, principal sinal clínico da PES (Kwon et al., 2002; Sarradell et al., 2003; Choi et al., 2006; Lorenzo et al., 2006; Redondo et al., 2009). No entanto, a grande concentração de componentes inflamatórios está relacionada com o desenvolvimento de lesão tecidual e imunossupressão (Thanawongnuwech et al., 2004). A inflamação estimulada após o contato de macrófagos alveolares com lipoproteínas de superfície de *M. hyopneumoniae* estimula a liberação de óxido nítrico e de radicais livres pelas células imunes, levando-as a apoptose (Bai et al., 2013). As lesões pulmonares macroscopicamente observadas consistem em áreas de consolidação pulmonar, de coloração roxa ou acinzentada (Maes et al., 2008), localizadas principalmente nos lobos apicais e cardíacos e na porção cranial dos lobos diafragmáticos, onde as funções respiratórias básicas estão comprometidas. Exsudato catarral pode estar presente (Thacker & Minion, 2010). Embora sugestiva, esta lesão não é patognomônica da infecção por *M. hyopneumoniae*, e outros micro-organismos podem produzir lesões similares.

Diagnóstico

O diagnóstico de PES pode ser realizado através de várias técnicas. O diagnóstico presuntivo se dá através da observação de sinais clínicos e das lesões pulmonares no abate (Maes et al., 2008; Nathues et al., 2012). O isolamento do patógeno em meio de cultivo é considerado “padrão-ouro” para o diagnóstico, não é rotineiramente realizado com sucesso pois apresenta muitas limitações: a bactéria é caracteristicamente fastidiosa em seu crescimento; necessita de meio de cultivo de alto valor nutritivo e de alto custo; o crescimento concomitante de outros micoplasmas é comum e tende a inibir o desenvolvimento do *M. hyopneumoniae* (Friis, 1975; Sibila et al., 2009). Testes sorológicos são rotineiramente realizados para verificar o status sanitário do rebanho, pois apresentam alta especificidade, gerando um número muito baixo de resultados falso-negativos (Thacker, 2004). No entanto, apresentam baixa sensibilidade, sendo pouco úteis no diagnóstico individual (Sørensen et al., 1997). Outros fatores afetam negativamente o diagnóstico através de anticorpos sistêmicos: a baixa exposição do *M. hyopneumoniae* ao sistema imune devido à sua característica de colonização da superfície epitelial torna muito variável a resposta imune humoral individual; as variações antigênicas promovidas pelo organismo em sua superfície também provocam uma resposta humoral bastante diversa; ainda, a ocorrência de infecção concomitante com PRRSV

aumenta os níveis de anticorpos reagentes com *M. hyopneumoniae* (Thacker et al., 1999). Este conjunto de fatores indica que a avaliação sorológica com os antígenos disponíveis até o momento não deve ser utilizada como único método diagnóstico nos rebanhos.

Atualmente, a PCR é a técnica mais sensível para a detecção de *M. hyopneumoniae*. Tecidos pulmonares são os sítios de maior confiabilidade para coleta de material, enquanto amostras coletadas da região nasal apresentam resultados mais variáveis (Sørensen et al., 1997; Kurth et al., 2002). Lavados traqueais também permitem a detecção do patógeno (Verdin et al., 2000). A utilização de Nested PCR é bastante sensível, capaz de detectar a presença do agente em quantidades muito pequenas (Calsamiglia et al., 1999; Fablet et al., 2010). A técnica de PCR em tempo real e suas variações tem sido utilizadas para o diagnóstico e quantificação da infecção (Moorkamp et al., 2008; Silva et al., 2009; Marois et al., 2010; Li et al., 2013). A detecção do organismo em tecidos pulmonares pode ainda ser realizada através de imunofluorescência, imunohistoquímica e hibridização *in-situ* seguida de PCR (Kwon et al., 2002; Madsen et al., 2007).

Profilaxia e Controle

Diversas atividades estão associadas ao controle desta enfermidade nos rebanhos suínos. A otimização das práticas de manejo e das condições de alojamento é o primeiro passo a ser adotado. As medidas recomendadas incluem: adotar o sistema de produção “todos dentro/todos fora” fechado, especialmente para reprodutores; promover o desmame precoce das leitegadas; implantar o sistema de parição segregada; manter uma densidade populacional adequada; minimizar as situações de estresse; e prevenir/tratar outras doenças que causem lesão pulmonar (Maes et al., 2008). Antibioticoterapia pode ser realizada para controle e tratamento da doença já estabelecida (Heinonen et al., 2011; Ciprián et al., 2012; Thongkamkoon et al., 2013) sendo indicadas as combinações que atinjam também patógenos respiratórios comumente associados ao *M. hyopneumoniae* (Maes et al., 2008). Tetraciclina e macrolídeos são frequentemente utilizados. Aminoclitóis, tiamulina, aminoglicosídeos, lincosamidas e florquinolonas também apresentam atividade contra o *M. hyopneumoniae*. Sua utilização melhora os índices produtivos e diminui a ocorrência de lesão pulmonar e de sinais clínicos no rebanho (Vicca et al., 2004). A utilização no período pré-infecção é descrita a fim de minimizar os

efeitos da doença, mas não impede a ocorrência de infecção (Thacker, 2004). A interrupção do tratamento medicamentoso tende a ser seguida de surtos infecciosos (Thacker & Minion, 2010). Além disso, resistência às diversas classes de antimicrobianos tem sido descrita nos últimos anos (Inamoto et al., 1994; Vicca et al., 2003; Thongkamkoon et al., 2013), indicando-se uma avaliação criteriosa dos casos em que esta abordagem é necessária.

A vacinação é prática largamente adotada nas áreas produtoras de suínos em todo o mundo, podendo estar associada ao uso de antimicrobianos (Haesebrouck et al., 2004). As vacinas comercialmente disponíveis são compostas de cultivos celulares inativados (bacterinas) de *M. hyopneumoniae* associados a diferentes adjuvantes (Maes et al., 2008) e diversos estudos têm comprovado a eficácia destas vacinas. A vacinação está associada ao aumento no ganho de peso diário dos animais (2-8%), aumento na taxa de conversão alimentar (2-5%), diminuição do tempo necessário para atingir o peso de abate, redução da prevalência e severidade das lesões pulmonares associadas à pneumonia, menor custo com medicações associada às doenças respiratórias (Thacker et al., 1998; Maes et al., 1999; Reynolds et al., 2009; Wilson et al., 2013) e, em alguns casos, queda da mortalidade no rebanho (Moreau et al., 2004). A vacinação é capaz de reduzir o número de organismos detectáveis no trato respiratório (Baccaro et al., 2006; Meyns et al., 2006; Vranckx et al., 2012), diminuindo assim o nível de infecção e de lesões pulmonares tanto no indivíduo vacinado quanto em seus contactantes e, conseqüentemente, no rebanho como um todo (Meyns et al., 2006; Sibila et al., 2007).

Os mecanismos protetores da vacinação contra a PES ainda estão pouco elucidados, porém sabe-se que as bacterinas são capazes de estimular resposta humoral de mucosa, com detecção de IgA e IgG em fluído bronqui-alveolar de animais vacinados por via parenteral (Marchioro et al., 2013; Martelli et al., 2014). O perfil de soroconversão dos animais vacinados é bastante heterogêneo e o nível de anticorpos séricos parece não estar relacionado com a proteção contra a infecção por *M. hyopneumoniae* (Djordjevic et al., 1997; Thacker et al., 1998; Maes et al., 1999). Suínos vacinados com bacterinas por via parenteral apresentaram menor secreção local da citocina pró-inflamatória TNF- α , aumento do número de células secretoras de IFN- γ no sangue (Thacker et al., 2000), e maior secreção de IFN- γ e IL-10 na mucosa respiratória (Marchioro et al., 2013). O IFN- γ é um potente

estimulador do desenvolvimento de resposta celular (Park & Scott, 2001), enquanto a secreção de IL-10 está associada à prevenção dos efeitos patológicos das citocinas inflamatórias (Conti et al., 2003) e à diminuição do influxo de macrófagos no tecido brônquio-alveolar em suínos vacinados e submetidos à infecção experimental por *M. hyopneumoniae* (Vranckx et al., 2012).

Embora a estratégia ideal possa variar entre rebanhos, a vacinação antes da exposição intensa do animal ao patógeno (que ocorre ainda nas primeiras semanas de vida) é a mais comumente adotada, vacinando-se os as fêmeas gestantes e os leitões com a primeira dose entre uma e três semanas após o nascimento (Vicca et al., 2002; Sibila et al., 2008; Del Pozo Sacristán et al., 2014). A eficácia da vacinação precoce tem sido confirmada por estudos em condições de campo (Kyriakis et al., 2001; Jensen et al., 2002) e deve induzir imunidade no período de desmame, período onde ocorre a mistura de lotes, aumento da ocorrência dos desafios infecciosos e do risco de desenvolvimento de pneumonia severa de causas multifatoriais. A presença de anticorpos maternos não afeta negativamente o desenvolvimento de imunidade nos leitões vacinados aos sete dias de idade e a vacinação nesse período demonstrou ser capaz de induzir imunidade de longa duração e reduzir as lesões pulmonares em suínos expostos a desafio experimental com cepa de alta virulência, além de promover incremento no ganho de peso diário em animais expostos ao desafio natural (Reynolds et al., 2009; Wilson et al., 2013).

Apesar de todos os benefícios, a vacinação com bacterinas confere apenas proteção parcial ao rebanho, pois não altera significativamente a dinâmica de transmissão do *M. hyopneumoniae* entre os animais (Meyns et al., 2006; Villarreal et al., 2011b), exercendo efeito limitado sobre esse fator, e também não é capaz de prevenir a colonização do trato respiratório ciliado. Devido a esses fatores, a vacinação não consegue, sozinha, eliminar o patógeno do rebanho. Para atingir os resultados esperados, ela deve ser combinada com outros fatores de controle da infecção (Haesebrouck et al., 2004). Ainda, o resultado da vacinação varia entre rebanhos de acordo com diversos fatores, entre eles o nível de infecção estabelecido, a idade de infecção, condição sanitária do rebanho no momento da vacinação, adoção de práticas de manejo auxiliares no controle das enfermidades respiratórias e as diferença antigênicas entre as cepas vacinais e as cepas circulantes a campo (Maes et al., 2008).

Vacinas Recombinantes

Pesquisas com novas abordagens vacinais vêm sendo propostas, buscando o desenvolvimento de vacinas mais eficientes no controle da PES. O sequenciamento dos genomas completos de diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005; Liu et al., 2011) tem permitido a aplicação dos conceitos de vacinologia reversa (Rappuoli, 2001) na seleção racional de antígenos promissores para a construção de novas vacinas através da tecnologia do DNA recombinante. Através desta abordagem, praticamente qualquer proteína de um organismo pode ser expressa em um sistema heterólogo, permitindo abordagens vacinais tão diversas quanto à utilização de proteínas recombinantes purificadas como vacinas de subunidade e de vacinas de DNA ou vetorizadas que permitem a expressão da proteína recombinante após a vacinação.

A maior parte das vacinas experimentais contra a PES desenvolvidas até o momento utiliza o fragmento R1 da proteína P97, a mais bem caracterizada adesina de *M. hyopneumoniae*, como antígeno vacinal na forma de vacina de subunidade (King et al., 1997; Conceição et al., 2006) ou de vetor recombinante (Chen et al., 2001, 2006; Okamba et al., 2007, 2010). Mais recentemente, vacinas que combinam fragmentos R1 e R2 desta mesma proteína têm sido desenvolvidas (Shimoji et al., 2003; Ogawa et al., 2009). O fragmento R2 da proteína NrdF também tem sido utilizado como antígeno vacinal na forma de vetor recombinante (Fagan et al., 1997, 2001; Chen et al., 2006b) assim como a proteína de choque térmico P42 na forma de vacina de DNA (Chen et al., 2003). Uma mesma vacina compostas por diferentes proteínas de subunidade foi avaliada por Galli et al. (2013). Protocolo vacinal utilizando doses subsequentes de vacina de DNA e de subunidade recombinante com os antígenos P37, P42, P46 e P95 é descrito por Galli et al. (2012). Simmionatto et al. (2010) descreve a construção e produção de diversas proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*, cuja antigenicidade e imunogenicidade já foram avaliadas (Simionatto et al., 2012), disponibilizando informações acerca de um grande número de potenciais antígenos vacinais contra a PES que devem ser mais profundamente avaliados. A pesquisa contínua de novos alvos vacinais e também de sistemas adjuvantes que estimulem uma resposta mais eficaz é necessária para que níveis mais elevados de proteção contra a PES sejam obtidos, melhorando as condições dos rebanhos e diminuindo as perdas econômicas relacionadas a esta doença.

3 HIPÓTESE E OBJETIVO

3.1 Hipótese

Bacterinas comerciais contra Pneumonia Enzoótica Suína não induzem resposta imune humoral contra os fatores de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* MHP_0067, MHP_0099, MHP_0107, MHP_0223, MHP_0234, MHP_0272, MHP_0332, MHP_0372, MHP_0373, MHP_0390, MHP_0468, MHP_0513, MHP_0580, MHP_0596 e MHP_0663.

3.2 Objetivo

Avaliar a resposta imune humoral em camundongos induzida por bacterinas comerciais contra antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae*.

3.3 Objetivo específico

Avaliar a resposta imune humoral induzida pela inoculação de seis bacterinas comerciais contra as proteínas recombinantes MHP_0067, MHP_0099, MHP_0107, MHP_0223, MHP_0234, MHP_0272, MHP_0332, MHP_0372, MHP_0373, MHP_0390, MHP_0468, MHP_0513, MHP_0580, MHP_0596 e MHP_0663 e extrato de *M. hyopneumoniae* cepa 7448.

4 CAPÍTULO I

4.1 Bacterinas comerciais falharam em induzir resposta imune humoral em camundongos contra fatores de virulência de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Manuscrito que será submetido à revista *Vaccine*

Andressa Fisch^a, Silvana Beutinger Marchioro^a, Charles Klazer Gomes^a, Vanessa Galli^b, Natasha de Oliveira^a, Ana Carolina Peiter^a, Simone Simmionatto^c, Sérgio Jorge^a, Odir Antônio Dellagostin^a, Fabricio Rochedo Conceição^{d*}

^aLaboratório de Biologia Molecular, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil; dessafh@hotmail.com; silmarchioro@hotmail.com; charlesklazer@hotmail.com; oliveira_natasha@hotmail.com; acpeiter@hotmail.com; sergiojorgevet@hotmail.com; odirad@ufpel.edu.br

^bLaboratório de Genoma e População de Plantas, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil; vane.galli@yahoo.com.br

^cFaculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil; s_simmionatto@yahoo.com.br

^dLaboratório de Imunologia Aplicada, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil; fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

*Autor para correspondência:

Fabricio Rochedo Conceição

Laboratório de Imunologia Aplicada, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N; Caixa Postal 354; 96010-900; Pelotas, RS, Brasil; fabricio.rochedo@ufpel.edu.br; 55 53 3275 7350

Resumo

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, gera importantes perdas econômicas para a indústria suinícola em todo o mundo. As vacinas atualmente disponíveis diminuem as perdas produtivas, mas não impedem a infecção dos rebanhos. O desenvolvimento de novas estratégias vacinais têm se mostrado necessário. Neste trabalho, avaliou-se a resposta imune humoral induzida pela inoculação, em camundongos, de seis bacterinas comerciais contra quinze fatores de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* previamente caracterizados por nosso grupo. A detecção de anticorpos foi realizada através de ELISA indireto. Soroconversão foi utilizada para determinar reatividade biologicamente significativa. A O antígeno MHP_0067 foi reconhecido pelo soro de um único grupo inoculado. Os antígenos MHP_0513 e MHP_0580 foram reconhecidos pelos soros de quatro grupos inoculados cada. Para os demais antígenos não houve soroconversão pelos grupos inoculados com as

bacterinas comerciais. Identificar antígenos potencialmente protetores ausentes nestas vacinas e associá-los à vacinação convencional pode promover o aumento dos níveis de proteção. Estes antígenos são potenciais alvos para a composição de uma vacina de subunidade recombinante associada à vacina

Palavras-Chave: Pneumonia Enzoótica Suína, vacinas comerciais, resposta imune humoral, ELISA, antígenos recombinantes, adesinas.

1 Introdução

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma doença de ocorrência mundial que causa importantes perdas econômicas para a indústria suinícola [1]. As vacinas comerciais são produzidas a partir de cultivos inativados (bacterinas) de *M. hyopneumoniae* associados a adjuvantes [2,3]. Elas promovem a redução do percentual de lesões pulmonares, dos sintomas clínicos e da perda de peso, melhorando os índices produtivos dos animais vacinados [4–7]. O mecanismo protetor envolvido ainda é pouco entendido, embora seja comprovado que há indução tanto de imunidade celular quanto humoral sistêmica e de mucosa por ocasião da vacinação [8–10]. No entanto, estas bacterinas não são capazes de prevenir a transmissão do patógeno e a infecção dos suínos vacinados [11,12].

Análises comparativas entre diferentes cepas permitiram a identificação de possíveis fatores de virulência de *M. hyopneumoniae* [13], como proteínas de superfície celular e secretadas, que estão relacionadas com a patogênese da bactéria [14]. A subexpressão de alguns destes fatores já foi verificada em cepas avirulentas, em especial de adesinas [15,16]. Alguns trabalhos demonstraram que vacinas comerciais não induzem anticorpos contra a adesina P97 e a proteína NrdF [17–20],

antígenos de *M. hyopneumoniae* que induziram proteção contra a PES em suínos desafiados experimentalmente [21–24]. A ausência de anticorpos contra proteínas imunogênicas [25] indica que as mesmas estão presentes em quantidades inadequadas ou até mesmo ausentes na vacina comercial, o que pode estar relacionado com a sua eficiência limitada

O desenvolvimento de abordagens vacinais mais efetivas é necessário para que adequados níveis de proteção contra a PES sejam obtidos. No entanto, o alto investimento necessário para o desenvolvimento de experimentos envolvendo testes de vacinas contra a PES em suínos torna necessária a triagem dos antígenos a serem testados, de modo a otimizar a utilização de recursos e aumentar a chance de obtenção de resultados positivos. Até o momento, apenas dois antígenos recombinantes foram testados em suínos, individualmente, e apresentaram resultados parciais de proteção [21–24]. A utilização de uma vacina multivalente, composta por antígenos selecionados de *M. hyopneumoniae*, pode elevar os índices de proteção em relação aos obtidos pelas vacinas recombinantes monovalentes [18,21–24]. Ainda, a vacinação com antígenos recombinantes pode ser associada à administração de um cultivo inativado, que não conta com alguns fatores de virulência em sua composição.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a resposta imune humoral contra antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae* induzida pela inoculação de bacterinas comerciais em camundongos. Os antígenos selecionados são prováveis fatores de virulência de *M. hyopneumoniae*, de alta antigenicidade e imunogenicidade. Os antígenos ausentes nas vacinas comerciais são potenciais alvos vacinais para a utilização em associação à vacinação convencional.

2 Materiais e Métodos

2.1 Vacinas comerciais

Vacinas comerciais contra a PES de seis diferentes marcas foram utilizadas neste estudo. As vacinas selecionadas apresentam particularidades com relação à cepa utilizada na fabricação, volume e número de doses a serem administradas. Os produtos foram obtidos a partir de compra direta ou por contato com distribuidor.

2.2 Seleção dos antígenos recombinantes

Os antígenos recombinantes utilizados neste estudo foram selecionados a partir das proteínas recombinantes previamente caracterizadas por nosso grupo [25,26] e referem-se a proteínas de *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 (GenBank, NC_007332.1). Para determinar quais antígenos seriam ideais para este estudo, foram considerados os seguintes requisitos: 1) reconhecimento como provável fator de virulência a partir de comparação genômica e proteômica [13,15,16]; 2) predição bioinformática de localização em superfície externa, transmembrana ou secretada [26,27]; 3) antigenicidade confirmada, sendo reconhecidos por soros de suínos convalescentes de PES ou experimentalmente infectados por *M. hyopneumoniae* 7448 [25,26]; 4) alta imunogenicidade em camundongos [25,26]; 5) probabilidade significativa de apresentar atividade de adesina, determinada pelo software online Vaxign [28], sendo considerados os valores de probabilidade próximos ou superiores ao predito para a proteína MHP_0198 (P97), de 49,1%. Os antígenos selecionados foram produzidos e purificados conforme Simmionatto et al. [27].

2.3 Soros suínos

Pool de dez soros suínos positivos e dez soros suínos negativos foram utilizados como controles neste trabalho. Os soros positivos foram obtidos de suínos com aproximadamente três meses de idade, não vacinados para PES, com PCR individual positiva para a presença de *M. hyopneumoniae* no trato respiratório (*swab* nasal), sinais clínicos sugestivos de PES e soropositivos mediante ELISA indireto com extrato da cepa 7448. Os soros negativos foram obtidos de suínos de uma granja livre de *M. hyopneumoniae*, monitorada trimestralmente através de sorologia e PCR.

2.4 Inoculação em camundongos

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, com idade entre seis e oito semanas de idade, provenientes e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (RS, Brasil). Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em sete grupos de cinco animais cada. Os grupos foram assim inoculados: 1) Bacterina A; 2) Bacterina B; 3) Bacterina C; 4) Bacterina D; 5) Bacterina E; 6) Bacterina F; 7) solução salina estéril. O número de inoculações e o volume administrado foram determinados de acordo com as indicações dos fabricantes. O volume administrado em camundongos correspondeu a 5% do total determinado para suínos (considerando-se a proporção em peso vivo). Quando aplicável, foi realizado o intervalo de 21 dias entre a primeira e a segunda dose das vacinas. Valores específicos não serão informados para evitar a identificação dos produtos comerciais. As amostras de sangue foram coletadas através de punção do sino retro-orbital nos dias 0 (não imune) e 42 (imune). O soro foi separado por centrifugação e armazenado à -20 °C até sua utilização. O experimento foi repetido

duas vezes, com dois lotes diferentes de animais e em períodos diversos de alojamento. Durante o experimento os animais foram mantidos de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEAA-UFPeL, onde o projeto está registrado sob o número 7722).

2.5 ELISA

A presença de anticorpos específicos nos soros dos animais imunizados com as vacinas comerciais foi avaliada através de ELISA indireto. Os soros dos camundongos foram confrontados com as proteínas recombinantes selecionadas e com extrato celular de *M. hyopneumoniae* 7448 cultivado *in vitro*, este último como controle positivo da inoculação das bacterinas comerciais. Soros suínos positivos e negativos foram confrontados com os antígenos recombinantes, para controle de antigenicidade e qualidade no momento do teste.

Teste-piloto foi realizado para determinar a concentração ótima de antígenos e a diluição do soro dos camundongos inoculados. Foram testadas as concentrações de antígenos de 100 ng, 300 ng, 500 ng, 750 ng e 1 µg por poço. As seguintes diluições dos soros dos camundongos inoculados foram testadas em *pool*, por grupo: 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200. Todas as diluições de soro foram confrontadas com todas as concentrações de cinco antígenos recombinante selecionados aleatoriamente e contra o extrato total de *M. hyopneumoniae* 7448. Foram selecionadas como ideais a maior concentração de antígeno em que houve incremento da resposta detectada, e a menor diluição do soro em que não houve aumento da resposta do grupo negativo, a fim de evitar a detecção de resposta inespecífica.

Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com os antígenos recombinantes na concentração de 500 ng/poço, em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6), a 4 °C por 16 h. Entre cada etapa foram realizadas três lavagens com PBS (pH 7,4) acrescido de 0,05% de Tween 20. Posteriormente as placas foram bloqueadas com solução de leite em pó a 5% a 4 °C por 16 h. O soro dos camundongos inoculados e dos suínos foi utilizado na diluição 1:50, mantido em incubação na placa a 37 °C por 2 h. Foram utilizados anticorpos anti-Ig totais de camundongo (1:4000) ou anticorpos anti-IgG suíno (1:6000) conjugados com peroxidase (Sigma) como anticorpos secundários, incubados na placa a 37 °C por 1,5 h. A reação de cor foi desenvolvida com OPD (Sigma) e peróxido de hidrogênio por 15 min e então parada com a adição de 50 µl de ácido sulfúrico 3%. A densidade óptica foi determinada a 492 nm em leitor ThermoPlate ELX800 (BioTek Instruments). As amostras foram analisadas individualmente em triplicata. Soroconversão foi determinada através da razão entre a média das absorbâncias do soro pós-imune pela média das absorbâncias do soro pré-imune (D.O. dia 42/D.O. dia 0) para cada amostra. Soroconversão com o aumento de quatro vezes na detecção de anticorpos no soro pós-imune em relação ao soro pré-imune foi considerado como significativo.

2.6 Análise Estatística

GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) foi utilizado para realizar as análises estatísticas e para a construção dos gráficos. ANOVA seguido de teste Dunnett foi realizado para determinar diferenças estatísticas significativas entre as soroconversões de cada grupo inoculado com as vacinas comerciais e o grupo controle negativo no dia 42 do experimento. Teste t de Student não-pareado foi

utilizado para verificar diferenças significativas entre a média das absorbâncias obtidas para os soros suínos negativos e positivos. Intervalo de Confiança de 95% foi utilizado, e os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Este trabalho não tem por objetivo comparações entre as vacinas comerciais, por isso nenhuma análise estatística foi realizada neste sentido.

3 Resultados

3.1 Antígenos recombinantes

De acordo com os requisitos estipulados, foram selecionados quinze antígenos recombinantes para este estudo. Sua identificação e caracterização encontram-se descritas na Tabela 1.

Para confirmar a antigenicidade e qualidade dos antígenos recombinantes no momento do teste, os mesmos foram confrontados com os *pools* de soros suínos negativos e positivos quando da realização do teste com os soros dos camundongos inoculados. Todos os antígenos recombinantes foram reconhecidos pelos soros dos suínos positivos (Tabela 2), indicando que os mesmos apresentavam epítomos com conformação reconhecida pelos anticorpos induzidos na infecção natural por *M. hyopneumoniae*.

3.2 Resposta humoral induzida pelas bacterinas comerciais

Com o objetivo de confirmar a validade da inoculação, os soros dos camundongos inoculados com as bacterinas foram confrontados com o extrato celular de *M. hyopneumoniae* 7448. Com exceção da bacterina F, todas as bacterinas apresentaram reatividade frente ao extrato de *M. hyopneumoniae* 7448 (Fig. 1). Embora esse resultado pudesse indicar falha na vacinação com a bacterina F, a

mesma apresentou soroconversão significativa contra um antígeno recombinante, o que determinou que a inoculação foi adequada.

A reatividade dos soros dos grupos inoculados contra os antígenos recombinantes está representada na figura 2. Do total de seis bacterinas testadas, uma foi capaz de induzir soroconversão contra o antígeno MHP_0067 (Fig. 2A), e quatro induziram soroconversão contra os antígenos MHP_0513 (Fig. 2B) e MHP_0580 (Fig. 2C). As bacterinas falharam em induzir soroconversão contra os antígenos MHP_0099, MHP_0107, MHP_0223, MHP_0234, MHP_0272, MHP_0332, MHP_0372, MHP_0373, MHP_0390, MHP_0468, MHP_0596 e MHP_0663 (dados não demonstrados). A bacterina E (Grupo 5) falhou em induzir soroconversão contra todos os antígenos recombinantes testados, embora tenha reagido positivamente com o extrato celular de *M. hyopneumoniae* 7448.

4 Discussão

Este trabalho avaliou a resposta imune humoral contra antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae* induzida pela inoculação de bacterinas comerciais em camundongos, a fim de identificar potenciais alvos vacinais contra os quais estas vacinas não geram anticorpos detectáveis. Uma bacterina induziu resposta contra MHP_0067, e quatro bacterinas induziram resposta contra MHP_0513 e MHP_0580. As condições de cultivo às quais o *M. hyopneumoniae* é submetido alteram fortemente o seu proteoma, e talvez este seja um dos pontos mais importantes relacionados à subexpressão de fatores de virulência. A atenuação de cepas pode ser realizada através de numerosas passagens *in vitro*, em que o crescimento se dá em meio ótimo, sem a exigência da expressão de fatores necessários para a infecção natural. *M. hyopneumoniae* 232 cultivado *in vivo* apresentou alterações

significativas no transcriptoma quando comparado com o cultivo *in vitro* [29], confirmando que as alterações proteômicas são dependentes das condições de cultivo e que a expressão proteica da bactéria é altamente flexível, adaptando-se rapidamente às exigências do meio. A suplementação do cultivo com noraepinefrina induziu a superexpressão de diversos genes por *M. hyopneumoniae* 232, entre eles a adesina P146 [30]. O aumento da temperatura de incubação do cultivo promoveu a superexpressão da chaperona DnaK para a mesma cepa [31]. Ambas as alterações são encontradas no pulmão suíno quando da instalação do *M. hyopneumoniae*, como efeitos da resposta imune. Neste estudo, MHP_0067 (DnaK) apresentou reatividade com uma única bacterina, cuja expressão pode estar sendo induzida pelas condições de crescimento do meio.

A inibição da expressão de fatores de virulência devido ao crescimento em meio ótimo pode ajudar a explicar o grande número de antígenos recombinantes contra os quais não se obteve resposta humoral. Destacam-se a ausência de resposta para proteínas relacionadas com a adesão da bactéria ao epitélio respiratório ou outras atividades biológicas relacionadas à patogênese do micro-organismo, como as proteínas P97 (MHP_0272), P102 (MHP_0107) e P146 (MHP_0663) [32–35]. Estes antígenos correspondem às classes de proteínas que tem a expressão negativamente afetada pelo crescimento *in vitro*, como proteínas de superfície de membrana, lipoproteínas, transportadores plasmáticos e outras, com funções diversas que podem ser importantes para a fixação do *M. hyopneumoniae* e o seu crescimento no hospedeiro.

A proteína P46 (MHP_0513), reconhecida pela maior parte das bacterinas, é um antígeno imunodominante de superfície altamente conservado entre as cepas de *M. hyopneumoniae* [36]. Este antígeno é espécie-específico e utilizada na detecção de

M. hyopneumoniae diretamente no tecido pulmonar e também por ensaio sorológico [37,38]. Análises proteômica através de Western blot verificou a manutenção da expressão da proteína P46 em diversos isolados de campo de *M. hyopneumoniae* com diferentes níveis de virulência [39]. Os resultados obtidos neste trabalho, em conjunto com as informações acerca da localização e alta conservação da proteína entre cepas, indicam que este antígeno pode apresentar função constitutiva importante, porém não é possível excluir a hipótese de que o mesmo esteja envolvido na patogenicidade da bactéria, uma vez que não há estudos nesse sentido. A lipoproteína de membrana MHP_0580 também foi reconhecida por diversas bacterinas, e, a exemplo da P46, também pode apresentar caráter constitutivo. Porém, estudos de caracterização desta proteína são necessários para que tal possibilidade seja ou não confirmada.

Experimentos de análise proteômica após alterações no meio de cultivo de *M. hyopneumoniae* demonstram que mimetizar as condições encontradas *in vivo* para o crescimento *in vitro* de *M. hyopneumoniae* aumenta a expressão de fatores de virulência pelas cepas virulentas [30,31,40], podendo ser uma alternativa para promover a expressão de antígenos potencialmente protetores nas bacterinas. A determinação das condições ideais para o estímulo *in vitro* é dependente de estudos mais aprofundados sobre a patogênese da doença e sobre resultado da interação entre os diversos fatores que passariam a incidir sobre o cultivo *in vitro* da bactéria.

Ainda, não se sabe se efeitos semelhantes seriam obtidos quando cepas vacinais avirulentas fossem submetidas às mesmas condições de cultivo, já que as variações no proteoma podem ser decorrentes de diferenças no genoma destas cepas. As variações de proteoma entre as cepas de *M. hyopneumoniae* parecem não estar relacionadas com a ausência de CDS correspondentes aos fatores de virulência nas

cepas avirulentas. Análise genômica comparativa entre as cepas 7448, 232 e J identificou alta similaridade entre as sequências de aminoácidos preditas das CDS ortólogas de fatores associados à virulência do patógeno [13], incluindo as proteínas selecionadas neste estudo. Alterações no perfil de expressão proteica de *M. hyopneumoniae* têm sido descritas para a mesma cepa conforme o número de passagens e condições de cultivo. Assunção et al. [41] identificaram variação no perfil antigênico de cepas de *M. hyopneumoniae* isoladas em abatedouros conforme o número de passagens *in vitro*. Mais recentemente, Liu et al. [42] promoveram a atenuação da cepa 168 através de grande número de passagens *in vitro*, observando o acúmulo de mutações nas CDS dos fatores de virulência. Isso ajuda a explicar porque a cepa J (e possivelmente outras cepas avirulentas) apresenta um perfil de expressão tão diverso daquele encontrado nas cepas 7448, 7422 e 232 [15,16] mesmo contendo genoma altamente similar e tendo sido originalmente uma cepa virulenta [43]. Estes resultados reforçam a idéia de que o incremento do meio de cultivo *in vitro* não seria suficiente para estimular a expressão de fatores de virulência, uma vez que as mutações podem alterar a expressão destas proteínas. As diferenças antigênicas entre as cepas de *M. hyopneumoniae* circulantes nos rebanhos e aquelas utilizadas para a produção das bacterinas possivelmente sejam responsáveis pela proteção insuficiente oferecida pela vacinação [10], o que pode estar relacionado com a expressão deficiente de antígenos cuja resposta imune oferece proteção [21,22,24]. Esta variação antigênica está refletida nos resultados encontrados em nosso trabalho. Conforme descrito anteriormente, não só a presença ou ausência de uma proteína é determinada por estas condições, mas também o nível de expressão obtido [15,30,31]. Fora das condições ideais de desafio encontradas *in vivo*, a expressão em níveis basais de fatores de virulência

possivelmente gera quantidades de antígeno insuficientes para promover o desenvolvimento de uma resposta imune detectável [15], aqui evidenciada pela ausência de anticorpos específicos contra importantes fatores de virulência da bactéria.

A utilização de alvos vacinais produzidos a partir da tecnologia do DNA recombinante é uma alternativa viável para o desenvolvimento de uma vacina mais completa, uma vez que permite a inserção selecionada e em quantidades adequadas dos antígenos com potencial protetor ausentes na formulação inicial das vacinas comerciais. Como diversos fatores parecem estar relacionados ao processo de patogênese do *M. hyopneumoniae* [13,15,29,41], o desenvolvimento de uma vacina exclusivamente recombinante de alta eficácia depende da seleção de um conjunto de proteínas protetoras, entre as quais possivelmente encontram-se muitas de atividade ainda desconhecida. Assim, espera-se que a abordagem de associação entre vacinas recombinantes e bacterinas seja capaz de trazer produtos com níveis de proteção maiores do que os oferecidos atualmente em um período de desenvolvimento relativamente curto.

Neste estudo, avaliamos o perfil de imunidade humoral gerado por bacterinas comerciais contra antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae*. Apenas três antígenos apresentaram reatividade satisfatória com ao menos uma das bacterinas utilizadas. Os demais antígenos apresentam potencial como candidatos à composição de uma formulação vacinal recombinante em associação à vacinação convencional no combate à PES.

5 Agradecimentos

Bolsas de estudo, materiais de consumo e equipamentos foi foram financiados por Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação CAPES e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6 Referências

- [1] Thacker EL, Minion FC. No Title. In: Zimmerman J, editor. Dis swine, Iowa, USA: Iowa state university press; 2010, p. 779–97.
- [2] Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* 2008;126:297–309.
- [3] Lin JH, Weng CN, Liao CW, Yeh KS, Pan MJ. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. *J Vet Med Sci* 2003;65:69–74.
- [4] Thacker EL, Thacker BJ, Boettcher TB, Jayappa H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins 1998;6:107–12.
- [5] Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Vrijens B, et al. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine* 1999;17:1024–34.
- [6] Reynolds SC, St Aubin LB, Sabbadini LG, Kula J, Vogelaar J, Runnels P, et al. Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at approximately 1 week of age. *Vet J* 2009;181:312–20.
- [7] Wilson S, Van Brussel L, Saunders G, Runnels P, Taylor L, Fredrickson D, et al. Vaccination of piglets up to 1 week of age with a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine induces protective immunity within 2 weeks against virulent challenge in the presence of maternally derived antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20:720–4.
- [8] Kick AR, Tompkins MB, Hammer JM, Routh P a, Almond GW. Evaluation of peripheral lymphocytes after weaning and vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Res Vet Sci* 2011;91:e68–72.

- [9] Vranckx K, Maes D, Marchioro SB, Villarreal I, Chiers K, Pasmans F, et al. Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC Vet Res* 2012;8:24.
- [10] Marchioro SB, Maes D, Flahou B, Pasmans F, Del Pozo Sacristán R, Vranckx K, et al. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine* 2013;31:1305–11.
- [11] Meyns T, Maes D, Dewulf J, Vicca J, Haesebrouck F, de Kruif A. Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. *Prev Vet Med* 2004;66:265–75.
- [12] Meyns T, Dewulf J, de Kruif A, Calus D, Haesebrouck F, Maes D. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 2006;24:7081–6.
- [13] Ferreira HB, Castro LA De. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. *Genet Mol Biol* 2007;30:245–55.
- [14] Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1094–156.
- [15] Pinto PM, Klein CS, Zaha A, Ferreira HB. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci* 2009;7:45.
- [16] Li Y-Z, Ho Y-P, Chen S-T, Chiou T-W, Li Z-S, Shiuan D. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochem* 2009;74:215–20.
- [17] Conceição FR, Moreira AN, Dellagostin OA. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 2006;24:5734–43.
- [18] Chen AY, Fry SR, Daggard GE, Mukkur TKS. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine* 2008;26:4372–8.
- [19] Galli V, Simionatto S, Marchioro SB, Fisch A, Gomes CK, Conceição FR, et al. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine* 2012;31:135–40.
- [20] Galli V, Simionatto S, Marchioro SB, Klabunde GHF, Conceição FR, Dellagostin OA. Recombinant secreted antigens from *Mycoplasma*

- hyopneumoniae delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of mice. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20:1370–6.
- [21] Fagan PK, Walker MJ, Chin J, Eamens GJ, Djordjevic SP. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microb Pathog* 2001;30:101–10.
 - [22] Shimoji Y, Oishi E, Muneta Y, Nosaka H, Mori Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine* 2003;21:532–7.
 - [23] Ogawa Y, Oishi E, Muneta Y, Sano A, Hikono H, Shibahara T, et al. Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine* 2009;27:4543–50.
 - [24] Okamba FR, Arella M, Music N, Jia JJ, Gottschalk M, Gagnon C a. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine* 2010;28:4802–9.
 - [25] Simionatto S, Marchioro SB, Galli V, Brum CB, Klein CS, Rebelatto R, et al. Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012;35:209–16.
 - [26] Marchioro SB, Simionatto S, Galli V, Conceição FR, Brum CB, Fisch A, et al. Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 2012;155:44–52.
 - [27] Simionatto S, Marchioro SB, Galli V, Hartwig DD, Carlessi RM, Munari FM, et al. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2010;69:132–6.
 - [28] He Y, Xiang Z, Mobley HLT. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:297505.
 - [29] Madsen ML, Puttamreddy S, Thacker EL, Carruthers MD, Minion FC. Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infect Immun* 2008;76:658–63.
 - [30] Oneal MJ, Schafer ER, Madsen ML, Minion FC. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to norepinephrine. *Microbiology* 2008;154:2581–8.

- [31] Madsen ML, Nettleton D, Thacker EL, Edwards R, Minion FC. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infect Immun* 2006;74:160–6.
- [32] Minion FC, Adams C, Hsu T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* 2000;68:3056–60.
- [33] Seymour LM, Jenkins C, Deutscher AT, Raymond BB a, Padula MP, Tacchi JL, et al. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell Microbiol* 2012;14:81–94.
- [34] Bogema DR, Deutscher AT, Woolley LK, Seymour LM, Raymond BBA, Tacchi JL, et al. Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography. *MBio* 2012;3:1–11.
- [35] Deutscher AT, Tacchi JL, Minion FC, Padula MP, Crossett B, Bogema DR, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* Surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs. *J Proteome Res* 2012;11:1924–36.
- [36] Futo S, Seto Y, Okada M, Sato S, Suzuki T, Kawai K, et al. Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:680–3.
- [37] Cheikh Saad Bouh K, Shareck F, Dea S. Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:459–68.
- [38] Okada M, Asai T, Futo S, Mori Y, Mukai T, Yazawa S, et al. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 2005;105:251–9.
- [39] Assunção P, De la Fe C, Kokotovic B, González O, Poveda JB. The occurrence of mycoplasmas in the lungs of swine in Gran Canaria (Spain). *Vet Res Commun* 2005;29:453–62.
- [40] Friis NF. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 1975;27:337–9.

- [41] Assunção P, De la Fe C, Ramírez a S, González Llamazares O, Poveda JB. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. *Vet Res Commun* 2005;29:563–74.
- [42] Liu W, Xiao S, Li M, Guo S, Li S, Luo R, et al. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. *BMC Genomics* 2013;14:80.
- [43] Calus D, Baele M, Meyns T, de Kruif A, Butaye P, Decostere A, et al. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Vet Microbiol* 2007;120:284–91.

Tabela1. Identificação e caracterização dos antígenos recombinantes selecionados.

	Anotação	Identificação	Fragmento selecionado (aa)	Massa molecular (kDa)	Antigenicidade ELISA/Western blot	Imunogenicidade em camundongos	Atividade Adesina (%) [†]
1	MHP_0067	Chaperona DnaK	229-601	42	+++ / Rhc	+	18,7
2	MHP_0099	P95	564-911	43	+++ / Rc	+	55,8
3	MHP_0107	P102•	648-948	38	+++ / Rc	+	52,6
4	MHP_0223	NrdF cadeia beta	202-340	14	+++ / NR	±	19,2
5	MHP_0234	Transportador de ribose	12-340	39	+++ / Rhc	+	52,8
6	MHP_0272	P97•	/228-708	59	+++ / Rc	+	43,4
7	MHP_0332	Serina protease•	58-264	25	NA / Rc	+	43,6
8	MHP_0372	Lipoproteína LppT	497-883	44	++++ / Rhc	NA	54,5
9	MHP_0373	Lipoproteína LppS	776-982	27	- / Rh	+	42,6
10	MHP_0390	Proteína hipotética	4-214	26	+++ / Rhc	±	54,2
11	MHP_0468	Proteína hipotética	118-467	42	+++ / NR	+	60,5
12	MHP_0513	P46	102-420	35	++++ / Rc	+	40,3
13	MHP_0580	Lipoproteína de membrana	180-378	25	+++ / Rc	+	57,7
14	MHP_0596	Proteína hipotética	110-379	31	NA	+	21,3
15	MHP_0663	P146	754-1022	30	+++	+	53,1

[†] Probabilidade significativa de apresentar atividade de adesina, determinada pelo software online Vaxign [28], sendo considerados os valores de probabilidade próximos ou superiores ao predito para a proteína MHP_0198 (P97), de 49,1%

- Proteínas parálogas; NA: não avaliado; +++*: níveis muito altos de anticorpos ($P < 0.05$); ++*: níveis altos de anticorpos ($P < 0.05$); +*: níveis moderados de anticorpos ($P < 0.05$); -*: níveis baixos de anticorpos ($P < 0.05$); ++: níveis altos de anticorpos; +: níveis altos de anticorpos; $\pm$: níveis moderados de anticorpos; -: níveis baixos de anticorpos; Rh: reação contra soro suíno hiperimune; Rc: reação contra soro suíno convalescente; Rhc: reação com soro suíno hiperimune e convalescente; NR: não reagente.

Tabela 2. Média e desvio padrão das absorbâncias referentes à reatividade dos soros suínos controles negativos (CS -) e positivos (CS +) com os antígenos recombinantes selecionados e com o extrato de *M. hyopneumoniae* 7448.

Antígenos	CS -	CS +	P
MHP_0067	0,336 ± 0,013	3,269 ± 0,112	< 0.0001
MHP_0099	0,179 ± 0,019	1,366 ± 0,152	0,0003
MHP_0107	0,218 ± 0,021	1,477 ± 0,259	0,0011
MHP_0223	0,313 ± 0,014	1,269 ± 0,114	0,0006
MHP_0234	0,262 ± 0,029	1,161 ± 0,097	0,0001
MHP_0272	0,247 ± 0,015	1,024 ± 0,020	0,0005
MHP_0332	0,291 ± 0,015	1,193 ± 0,279	0,04
MHP_0372	0,415 ± 0,015	2,813 ± 0,148	< 0.0001
MHP_0373	0,260 ± 0,039	1,395 ± 0,404	0,0085
MHP_0390	0,252 ± 0,020	1,586 ± 0,295	0,0015
MHP_0468	0,256 ± 0,026	1,763 ± 0,212	0,0003
MHP_0513	0,428 ± 0,017	2,596 ± 0,429	0,0009
MHP_0580	0,313 ± 0,008	1,291 ± 0,060	< 0.0001
MHP_0596	0,360 ± 0,007	1,456 ± 0,342	0,0052
MHP_0663	0,210 ± 0,022	1,668 ± 0,208	0,0003
<i>M. hyopneumoniae</i> 7448	0,425 ± 0,011	3,232 ± 0,247	< 0.0001

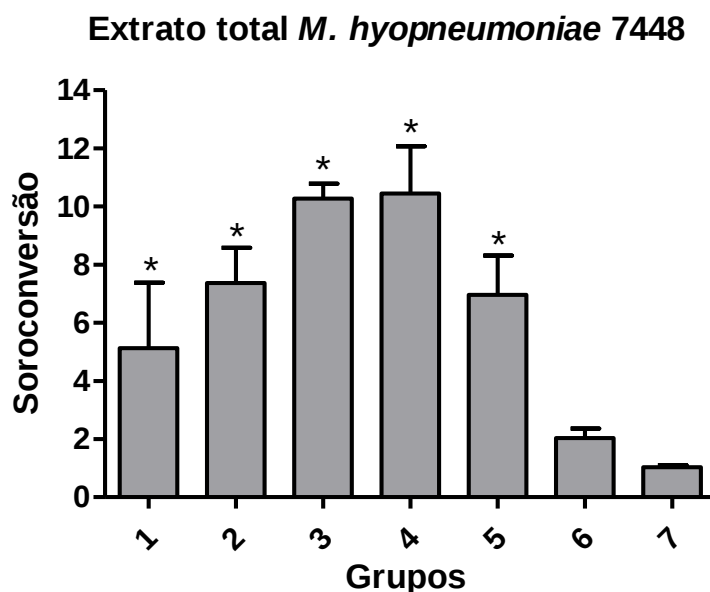


Figura 1. Resposta imune humoral dos camundongos inoculados contra o extrato de *M. hyopneumoniae* 7448. Colunas 1-7: camundongos inoculados com as bacterinas comerciais 1 – bacterina A; 2 – bacterina B; 3 – bacterina C; 4 – bacterina D; 5 – bacterina E; 6 – bacterina F; 7 – solução salina estéril (controle negativo). Os valores correspondem à soroconversão dos grupos, obtida pela razão entre a média das absorbâncias do soro pós-imune pela média das absorbâncias do soro pré-imune (D.O. dia 42/D.O. dia 0). As barras verticais correspondem ao desvio padrão da soroconversão. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre a soroconversão dos camundongos inoculados com as bacterinas e o grupo controle negativo verificados através de ANOVA seguido de teste Dunnett ($p < 0,05$).

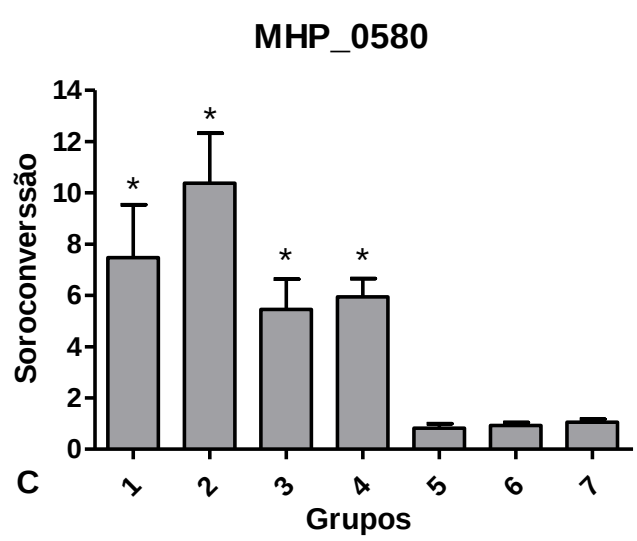
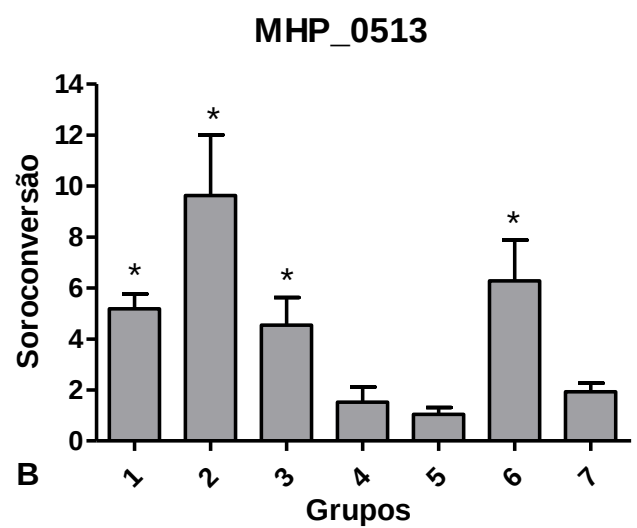
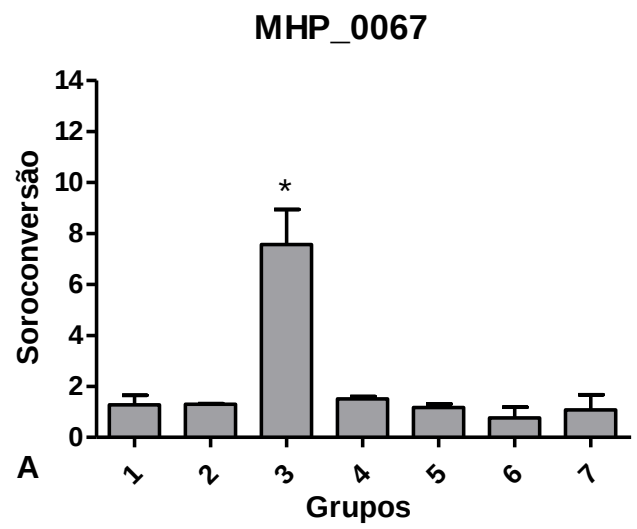


Figura 2. Resposta imune humoral dos camundongos inoculados contra os antígenos recombinantes MHP_0067 (A), MHP_0513 (B) e MHP 0_580 (C). Colunas 1-7: camundongos inoculados com as bacterinas comerciais 1 – bacterina A; 2 – bacterina B. 3 – bacterina C; 4 – bacterina D; 5 – bacterina E; 6 – bacterina F; 7 – solução salina estéril (controle negativo). Os valores correspondem à soroconversão dos grupos, obtida pela razão entre a média das absorbâncias do soro pós-imune pela média das absorbâncias do soro pré-imune (D.O. dia 42/D.O. dia 0). As barras verticais correspondem ao desvio padrão da soroconversão. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre a soroconversão dos camundongos inoculados com as bacterinas e o grupo controle negativo verificados através de ANOVA seguido de teste Dunnett ($p < 0,05$).

5 CONCLUSÃO

- As bacterinas comerciais avaliadas falharam em induzir resposta imune humoral contra importantes fatores de patogenicidade de *M. hyopneumoniae*.
- O antígeno MHP_0067 foi reconhecido pelo soro de um único grupo inoculado.
- Os antígenos MHP_0513 e MHP_0580 foram reconhecidos pelos soros de quatro grupos inoculados cada.
- Para os demais antígenos não houve soroconversão pelos grupos inoculados com as bacterinas comerciais.

6 REFERÊNCIAS

- Adams, C., Pitzer, J. & Minion, F.C. (2005). In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and immunity*. 73 (11). p.pp. 7784–7.
- Baccaro, M.R., Hirose, F., Umehara, O., Gonçalves, L.C.B., Doto, D.S., Paixão, R., Shinya, L.T. & Moreno, A.M. (2006). Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 172 (3). p.pp. 526–31.
- Bai, F., Ni, B., Liu, M., Feng, Z., Xiong, Q., Xiao, S. & Shao, G. (2013). *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation. *Veterinary immunology and immunopathology*. 155 (3). p.pp. 155–61.
- Bochev, I. (2007). Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC): A Review . I . Etiology , Epidemiology , Clinical Forms And Pathoanatomical Features. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 10 (3). p.pp. 131–146.
- Bogema, D.R., Scott, N.E., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Raymond, B.B. a, Jenkins, C., Cordwell, S.J., Minion, F.C., Walker, M.J. & Djordjevic, S.P. (2011). Sequence TTKF ↓ QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Journal of biological chemistry*. 286 (48). p.pp. 41217–29.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C. & Trigo, A. (1999). Application of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay to Detect *Mycoplasma Hyopneumoniae* from Nasal Swabs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11 (3). p.pp. 246–251.
- Chen, A.Y., Fry, S.R., Forbes-Faulkner, J., Daggard, G. & Mukkur, T.K.S. (2006a). Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *Journal of medical microbiology*. 55 (Pt 7). p.pp. 923–9.
- Chen, A.Y., Fry, S.R., Forbes-Faulkner, J., Daggard, G.E. & Mukkur, T.K.S. (2006b). Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different

- expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium aroA* in mice. *Veterinary microbiology*. 114 (3-4). p.pp. 252–9.
- Chen, J.-R., Liao, C.-W., Mao, S.J. & Weng, C.-N. (2001). A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. *Veterinary Microbiology*. 80 (4). p.pp. 347–357.
- Chen, Y.-L.Y.-J.Y.-L.Y.-J., Wang, S.-N.S.-N., Yang, W.-J.W.-J., Lin, H.-H.H.-H. & Shiuan, D. (2003). Expression and Immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* Heat Shock Protein Antigen P42 by DNA Vaccination. *Infection and Immunity*. 71 (3). p.pp. 1155–1160.
- Choi, C., Kwon, D., Jung, K., Ha, Y., Lee, Y.-H., Kim, O., Park, H.-K., Kim, S.-H., Hwang, K.-K. & Chae, C. (2006). Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of comparative pathology*. 134 (1). p.pp. 40–6.
- Ciprián, a, Palacios, J.M., Quintanar, D., Batista, L., Colmenares, G., Cruz, T., Romero, A., Schnitzlein, W. & Mendoza, S. (2012). Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in swine in México. *Research in veterinary science*. 92 (2). p.pp. 191–6.
- Conceição, F.R., Moreira, A.N. & Dellagostin, O.A. (2006). A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine*. 24 (29-30). p.pp. 5734–43.
- Conti, P., Kempuraj, D., Kandere, K., Di Gioacchino, M., Barbacane, R.C., Castellani, M.L., Felaco, M., Boucher, W., Letourneau, R. & Theoharides, T.C. (2003). IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunology letters*. 86 (2). p.pp. 123–9.
- Dee, S., Otake, S., Oliveira, S. & Deen, J. (2009). Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary research*. 40 (4). p.p. 39.
- Desrosiers, R. (2011). Transmission of swine pathogens: different means, different needs. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 12 (1). p.pp. 1–13.
- Djordjevic, S.P., Cordwell, S.J., Djordjevic, M.A., Wilton, J. & Minion, F.C. (2004). Proteolytic Processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* Cilium Adhesin. *Infection and Immunity*. 72 (5). p.pp. 2791–2802.
- Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Romalis, L.F., Nicholls, P.J., Taylor, V. & Chin, J. (1997). Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a

- denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Australian veterinary journal*. 75 (7). p.pp. 504–11.
- Duensing, T.D., Wing, J.S. & van Putten, J.P. (1999). Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis. *Infection and immunity*. 67 (9). p.pp. 4463–8.
- Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F. & Rose, N. (2010). Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Veterinary microbiology*. 143 (2-4). p.pp. 238–45.
- Fagan, P.K., Djordjevic, S.P., Chin, J., Eamens, G.J. & Walker, M.J. (1997). Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). *Infection and immunity*. 65 (6). p.pp. 2502–7.
- Fagan, P.K., Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Chin, J. & Walker, M.J. (1996). Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. *Infection and immunity*. 64 (3). p.pp. 1060–4.
- Fagan, P.K., Walker, M.J., Chin, J., Eamens, G.J. & Djordjevic, S.P. (2001). Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microbial pathogenesis*. 30 (2). p.pp. 101–10.
- Friis, N.F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk veterinærmedicin*. 27 (6). p.pp. 337–9.
- Galli, V., Simionatto, S., Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Conceição, F.R. & Dellagostin, O. a (2012). Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine*. 31 (1). p.pp. 135–40.
- Galli, V., Simionatto, S., Marchioro, S.B., Klabunde, G.H.F., Conceição, F.R. & Dellagostin, O.A. (2013). Recombinant secreted antigens from *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 20 (9). p.pp. 1370–6.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R. & Decostere, A. (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary microbiology*. 100 (3-4). p.pp. 255–68.
- Heinonen, M., Laurila, T., Vidgren, G. & Levonen, K. (2011). Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine finishing herd without total depopulation. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 188 (1). p.pp. 110–4.

- Hsu, T. & Minion, F.C. (1998). Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infection and immunity*. 66 (10). p.pp. 4762–6.
- Hwang, M.-H., Damte, D., Lee, J.-S., Gebru, E., Chang, Z.-Q., Cheng, H., Jung, B.-Y., Rhee, M.-H. & Park, S.-C. (2011). *Mycoplasma hyopneumoniae* induces pro-inflammatory cytokine and nitric oxide production through NFκB and MAPK pathways in RAW264.7 cells. *Veterinary research communications*. 35 (1). p.pp. 21–34.
- Inamoto, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Nakai, Y. & Ogimoto, K. (1994). Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 56 (2). p.pp. 393–4.
- Jensen, C., Ersbøll, A. & Nielsen, J. (2002). A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. *Preventive Veterinary Medicine*. 54 (3). p.pp. 265–278.
- Kim, C.H., Oh, Y., Han, K., Seo, H.W., Kim, D., Park, C., Kang, I. & Chae, C. (2012). Expression of secreted and membrane-bound mucins in the airways of piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 192 (1). p.pp. 120–2.
- King, K.W., Faulds, D.H., Rosey, E.L. & Yancey, R.J. (1997). Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine*. 15 (1). p.pp. 25–35.
- Kuhnert, P., Overesch, G. & Belloy, L. (2011). Genotyping of *Mycoplasma hyopneumoniae* in wild boar lung samples. *Veterinary microbiology*. 152 (1-2). p.pp. 191–5.
- Kurth, K.T., Hsu, T., Snook, E.R., Thacker, E.L., Thacker, B.J. & Minion, F.C. (2002). Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 14 (6). p.pp. 463–9.
- Kwon, D., Choi, C. & Chae, C. (2002). Chronologic localization of *mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Veterinary pathology*. 39 (5). p.pp. 584–7.
- Kyriakis, S.C., Alexopoulos, C., Vlemmas, J., Sarris, K., Lekkas, S., Koutsoviti-Papadopoulou, M. & Saoulidis, K. (2001). Field study on the efficacy of two different vaccination schedules with HYORESP in a *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected commercial pig unit. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. 48 (9). p.pp. 675–84.
- Li, J., Minion, F.C., Petersen, A.C., Jiang, F., Yang, S., Guo, P., Li, J. & Wu, W. (2013). Loop-mediated isothermal amplification for rapid and convenient

- detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *World journal of microbiology & biotechnology*. 29 (4). p.pp. 607–16.
- Liu, W., Feng, Z., Fang, L., Zhou, Z., Li, Q., Li, S., Luo, R., Wang, L., Chen, H., Shao, G. & Xiao, S. (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *Journal of bacteriology*. 193 (4). p.pp. 1016–7.
- Lorenzo, H., Quesada, O., Assunção, P., Castro, A. & Rodríguez, F. (2006). Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary immunology and immunopathology*. 109 (3-4). p.pp. 199–207.
- Madsen, M.L., Nettleton, D., Thacker, E.L. & Minion, F.C. (2006). Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology (Reading, England)*. 152 (Pt 4). p.pp. 937–44.
- Madsen, M.L., Oneal, M.J., Gardner, S.W., Strait, E.L., Nettleton, D., Thacker, E.L. & Minion, F.C. (2007). Array-based genomic comparative hybridization analysis of field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of bacteriology*. 189 (22). p.pp. 7977–82.
- Madsen, M.L., Puttamreddy, S., Thacker, E.L., Carruthers, M.D. & Minion, F.C. (2008). Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infection and immunity*. 76 (2). p.pp. 658–63.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., Verbeke, W., Viaene, J. & de Kruif, A. (1999). Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine*. 17 (9-10). p.pp. 1024–34.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M. & Haesebrouck, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary microbiology*. 126 (4). p.pp. 297–309.
- Marchioro, S.B., Maes, D., Flahou, B., Pasmans, F., Del Pozo Sacristán, R., Vranckx, K., Melkebeek, V., Cox, E., Wuyts, N. & Haesebrouck, F. (2013). Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine*. 31 (9). p.pp. 1305–11.
- Marois, C., Dory, D., Fablet, C., Madec, F. & Kobisch, M. (2010). Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *Journal of applied microbiology*. 108 (5). p.pp. 1523–33.
- Martelli, P., Saleri, R., Cavalli, V., De Angelis, E., Ferrari, L., Benetti, M., Ferrarini, G., Meriardi, G. & Borghetti, P. (2014). Systemic and local immune response in pigs intradermally and intramuscularly injected with inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines. *Veterinary microbiology*. 168 (2-4). p.pp. 357–64.

- Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F. & Maes, D. (2006). Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine*. 24 (49-50). p.pp. 7081–6.
- Minion, F.C., Adams, C. & Hsu, T. (2000). R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infection and immunity*. 68 (5). p.pp. 3056–60.
- Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M. & Mahairas, G.G. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of bacteriology*. 186 (21). p.pp. 7123–33.
- Moorkamp, L., Nathues, H., Spargser, J., Tegeler, R. & Grosse Beilage, E. (2008). Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 175 (2). p.pp. 273–5.
- Moreau, I. a, Miller, G.Y. & Bahnson, P.B. (2004). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally infected with *M. hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*. 22 (17-18). p.pp. 2328–33.
- Nathues, H., Spargser, J., Rosengarten, R., Kreienbrock, L. & Grosse Beilage, E. (2012). Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 193 (2). p.pp. 443–7.
- Ogawa, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Sano, A., Hikono, H., Shibahara, T., Yagi, Y. & Shimoji, Y. (2009). Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine*. 27 (33). p.pp. 4543–50.
- Okamba, F.R., Arella, M., Music, N., Jia, J.J., Gottschalk, M. & Gagnon, C. a (2010). Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine*. 28 (30). p.pp. 4802–9.
- Okamba, F.R., Moreau, E., Cheikh Saad Bouh, K., Gagnon, C. a, Massie, B. & Arella, M. (2007). Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 14 (6). p.pp. 767–74.
- Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S. & Deen, J. (2010). Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Veterinary microbiology*. 145 (3-4). p.pp. 198–208.
- Pancholi, V., Fontan, P. & Jin, H. (2003). Plasminogen-mediated group A streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells. *Microbial pathogenesis*. 35 (6). p.pp. 293–303.

- Park, A.Y. & Scott, P. (2001). IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. *Scandinavian journal of immunology*. 53 (6). p.pp. 529–32.
- Park, S., Yibchok-Anun, S., Cheng, H., Young, T.F., Thacker, E.L., Minion, F.C., Ross, R.F. & Hsu, W.H. (2002). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infection and immunity*. 70 (5). p.pp. 2502–6.
- Pinto, P.M., Klein, C.S., Zaha, A. & Ferreira, H.B. (2009). Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome science*. 7. p.p. 45.
- Del Pozo Sacristán, R., Sierens, A., Marchioro, S.B., Vangroenweghe, F., Jourquin, J., Labarque, G., Haesebrouck, F. & Maes, D. (2014). Efficacy of early *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination against mixed respiratory disease in older fattening pigs. *The Veterinary record*. 2 (V).
- Rappuoli, R. (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 19 (17-19). p.pp. 2688–2691.
- Razin, S., Yogev, D. & Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 62 (4). p.pp. 1094–156.
- Redondo, E., Masot, a J., Fernández, A. & Gázquez, A. (2009). Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of comparative pathology*. 140 (4). p.pp. 260–70.
- Reynolds, S.C., St Aubin, L.B., Sabbadini, L.G., Kula, J., Vogelaar, J., Runnels, P. & Peters, a R. (2009). Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at approximately 1 week of age. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 181 (3). p.pp. 312–20.
- Robinson, M.W., Buchtmann, K. a, Jenkins, C., Tacchi, J.L., Raymond, B.B. a, To, J., Roy Chowdhury, P., Woolley, L.K., Labbate, M., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Padula, M.P. & Djordjevic, S.P. (2013). MHJ_0125 is an M42 glutamyl aminopeptidase that moonlights as a multifunctional adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open biology*. 3 (4). p.p. 130017.
- Sarradell, J., Andrada, M., Ramírez, A.S., Fernández, A., Gómez-Villamandos, J.C., Jover, A., Lorenzo, H., Herráez, P. & Rodríguez, F. (2003). A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary pathology*. 40 (4). p.pp. 395–404.
- Shimoji, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Nosaka, H. & Mori, Y. (2003). Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant

- protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine*. 21 (5-6). p.pp. 532–7.
- Sibila, M., Bernal, R., Torrents, D., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M. & Segalés, J. (2008). Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Veterinary microbiology*. 127 (1-2). p.pp. 165–70.
- Sibila, M., Nofrarías, M., López-Soria, S., Segalés, J., Valero, O., Espinal, A. & Calsamiglia, M. (2007). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Veterinary microbiology*. 122 (1-2). p.pp. 97–107.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F. & Segalés, J. (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 181 (3). p.pp. 221–31.
- Silva, F.M.F., Castro, L.A., Silva Júnior, A., Moraes, M.P., Moreira, M.A.S. & Almeida, M.R. (2009). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swabs of pigs by nested PCR. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61 (1). p.pp. 149–155.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Galli, V., Brum, C.B., Klein, C.S., Rebelatto, R., Silva, E.F., Borsuk, S., Conceição, F.R. & Dellagostin, O. a (2012). Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 35 (2). p.pp. 209–16.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Galli, V., Hartwig, D.D., Carlessi, R.M., Munari, F.M., Laurino, J.P., Conceição, F.R. & Dellagostin, O. a (2010). Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 69 (2). p.pp. 132–6.
- Sørensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, a a, Feld, N.C., Friis, N.F., Bille-Hansen, V., Jensen, N.E. & Pedersen, M.W. (1997). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary microbiology*. 54 (1). p.pp. 23–34.
- Thacker, E.L. (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal Health Research Reviews*. 5 (02). p.pp. 317–320.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R. & Thacker, B.J. (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of clinical microbiology*. 37 (3). p.pp. 620–7.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Boettcher, T.B. & Jayappa, H. (1998). *Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation and protection induced by four commercial Mycoplasma hyopneumoniae bacterins*. 6 (3). p.pp. 107–112.

- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Kuhn, M., Hawkins, P.A. & Waters, W.R. (2000). Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *American journal of veterinary research*. 61 (11). p.pp. 1384–9.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P. & Thacker, E.L. (2004). Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 11 (5). p.pp. 901–8.
- Thongkamkoon, P., Narongsak, W., Kobayashi, H., Pathanasophon, P., Kishima, M. & Yamamoto, K. (2013). In Vitro Susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates and Occurrence of Fluoroquinolone, Macrolides and Lincomycin Resistance. *Journal of Veterinary Medical Science*. 75 (8). p.pp. 1067–1070.
- Vasconcelos, A.T.R., Ferreira, H.B., Bizarro, C. V, Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G.P., Almeida, R., Alves-Filho, L., Assunção, E.N., Azevedo, V.A.C., Bogo, M.R., Brigido, M.M., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Camargo, S.S., Carepo, M.S., Carraro, D.M., de Mattos Cascardo, J.C., Castro, L.A., Cavalcanti, G., Chemale, G., Collevatti, R.G., Cunha, C.W., Dallagiovanna, B., Dambrós, B.P., Dellagostin, O.A., Falcão, C., Fantinatti-Garboggini, F., Felipe, M.S.S., Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas, N.S.A., Frías, D., Grangeiro, T.B., Grisard, E.C., Guimarães, C.T., Hungria, M., Jardim, S.N., Krieger, M.A., Laurino, J.P., Lima, L.F.A., Lopes, M.I., Loreto, E.L.S., Madeira, H.M.F., Manfio, G.P., Maranhão, A.Q., Martinkovics, C.T., Medeiros, S.R.B., Moreira, M.A.M., Neiva, M., Ramalho-Neto, C.E., Nicolás, M.F., Oliveira, S.C., Paixão, R.F.C., Pedrosa, F.O., Pena, S.D.J., Pereira, M., Pereira-Ferrari, L., Piffer, I., Pinto, L.S., Potrich, D.P., Salim, A.C.M., Santos, F.R., Schmitt, R., Schneider, M.P.C., Schrank, A., Schrank, I.S., Schuck, A.F., Seuanez, H.N., Silva, D.W., Silva, R., Silva, S.C., Soares, C.M.A., Souza, K.R.L., Souza, R.C., Staats, C.C., Steffens, M.B.R., Teixeira, S.M.R., Urmenyi, T.P., Vainstein, M.H., Zuccherato, L.W., Simpson, A.J.G. & Zaha, A. (2005). Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of bacteriology*. 187 (16). p.pp. 5568–77.
- Verdin, E., Saillard, C., Labbé, A., Bové, J. & Kobisch, M. (2000). A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Veterinary Microbiology*. 76 (1). p.pp. 31–40.
- Vicca, J., Maes, D., Thermote, L., Peeters, J., Haesebrouck, F. & de Kruif, A. (2002). Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease-course. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. 49 (7). p.pp. 349–53.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A. & Haesebrouck, F. (2003). Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary microbiology*. 97 (3-4). p.pp. 177–90.

- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A. & Haesebrouck, F. (2004). In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 48 (11). p.pp. 4470–2.
- Villarreal, I., Meyns, T., Dewulf, J., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F. & Maes, D. (2011). The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 188 (1). p.pp. 48–52.
- Vranckx, K., Maes, D., Marchioro, S.B., Villarreal, I., Chiers, K., Pasmans, F. & Haesebrouck, F. (2012). Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC veterinary research*. 8 (1). p.p. 24.
- Wilson, S., Van Brussel, L., Saunders, G., Runnels, P., Taylor, L., Fredrickson, D. & Salt, J. (2013). Vaccination of piglets up to 1 week of age with a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine induces protective immunity within 2 weeks against virulent challenge in the presence of maternally derived antibodies. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 20 (5). p.pp. 720–4.
- Wilton, J., Jenkins, C., Cordwell, S.J., Falconer, L., Minion, F.C., Oneal, D.C., Djordjevic, M.A., Connolly, A., Barchia, I., Walker, M.J. & Djordjevic, S.P. (2009). Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Molecular microbiology*. 71 (3). p.pp. 566–82.
- Zhang, Q., Young, T.F. & Ross, R.F. (1994). Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. *Infection and immunity*. 62 (10). p.pp. 4367–73.