



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
AGRÍCOLA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE
RECOMBINANTE CONTRA A PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA**

FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

PELOTAS
RIO GRANDE DO SUL – BRASIL
MAIO DE 2005

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE
RECOMBINANTE CONTRA A PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA**

FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO
Médico Veterinário

Orientador: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

PELOTAS
RIO GRANDE DO SUL – BRASIL
MAIO DE 2005

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

C744p Conceição, Fabricio Rochedo

Produção e avaliação de uma vacina de subunidade recombinante contra a pneumonia enzoótica suína / Fabricio Rochedo Conceição ; orientador Odir Antônio Dellagostin. – Pelotas, 2005. – 69f. : il. color – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

1.Biotecnologia. 2. *Mycoplasma hyopneumoniae*.
3.Pneumonia enzoótica suína. 4.Vacinas recombinantes.
5.Suínos. 6.rLTBR1. 7.P97. 8.LTB I.Dellagostin, Odir Antônio.
II.Título.

CDD: 636.4

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE
RECOMBINANTE CONTRA A PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA**

FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (CenBiot/UFPel)

Prof. Dr. Carlos Gil Turnes (CenBiot/UFPel)

Aprovada em: 23/05/2005

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Arnaldo Zaha

Dr. Itamar Piffer

Prof. Dr. José Antônio Guimarães Aleixo

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em especial ao amigo e orientador Odir Antônio Dellagostin, pela confiança e apoio.

Aos meus pais João Fernando e Marilene, pelo apoio e carinho.

À minha alma gêmea Ângela Nunes Moreira, pelo amor, companheirismo e incentivo.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular André, Marcelo, Gustavo, Fabiana, Sibeles, Daiane, Tessália, Luciano, Valeska, Alan e Michele pela ajuda, companheirismo e paciência durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia.

Aos novos colegas do CNPSA Jalusa, Marni, Vizzoto, Netinho e Djalma.

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

SUMÁRIO	vii
SUMMARY	viii
1 INTRODUÇÃO	1
HIPÓTESE	5
OBJETIVOS	5
2 TRABALHO 1	6
ABSTRACT	7
RESUMO	8
INTRODUÇÃO	8
ETIOPATOGENIA	10
IMUNOPROFILAXIA	18
CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22
3 TRABALHO 2	28
ABSTRACT	29
INTRODUCTION	29
MATERIAL AND METHODS	30
RESULTS	31
BIBLIOGRAPHY	33
4 TRABALHO 3	34
ABSTRACT	35
INTRODUCTION	36
MATERIALS AND METHODS	38
RESULTS	44
DISCUSSION	53
ACKNOWLEDGMENTS	58
REFERENCES	59
5 CONCLUSÕES	65
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

SUMÁRIO

CONCEIÇÃO, FABRICIO ROCHEDO, Universidade Federal de Pelotas, maio de 2005. **Produção e Avaliação de uma Vacina de Subunidade Recombinante Contra a Pneumonia Enzoótica Suína.** Orientador: Odir Antônio Dellagostin. Co-orientador: Carlos Gil Turnes.

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, é a doença respiratória mais importante na suinocultura. As vacinas convencionais utilizadas para controlar esta doença consistem de bacterinas, que apresentam custo de produção elevado e eficiência limitada. O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar uma nova alternativa para controlar a PES, baseada em uma vacina de subunidade recombinante (rLTBR1) composta pela região R1 da adesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* (R1) fusionada a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB). rLTBR1 formou oligômeros funcionais que apresentaram alta afinidade pelo gangliosídeo GM1. Camundongos inoculados com rLTBR1 (I.M. ou I.N.) produziram altos níveis de anticorpos sistêmicos e de mucosa anti-R1, os quais reconheceram a P97 nativa. Por outro lado, os camundongos inoculados com a bacterina comercial não produziram anticorpos anti-R1. A rota de administração influenciou a modulação da resposta imune pela LTB, demonstrando que a rLTBR1 I.M. induziu uma resposta do tipo Th2 e a rLTBR1 I.N. do tipo Th1. rLTBR1 I.N. também induziu a secreção de IFN- γ por linfócitos. A rLTB demonstrou ser um potente adjuvante da imunidade de mucosa, estimulando a produção de IgA anti-R1 na traquéia e brônquios de camundongos inoculados com rLTBR1 através de rota parenteral (I.M.). A rLTBR1 pode constituir uma nova ferramenta para prevenir a infecção por *M. hyopneumoniae*, sendo que a estratégia utilizada pode ser aplicada no desenvolvimento de vacinas contra outras doenças infecciosas. Atualmente, a eficácia da rLTBR1 está sendo avaliada em suínos livres de patógenos específicos.

Palavras-chave: Pneumonia Enzoótica Suína; *Mycoplasma hyopneumoniae*; rLTBR1; P97; LTB.

SUMMARY

CONCEIÇÃO, FABRICIO ROCHEDO, Universidade Federal de Pelotas, may 2005. **Production and Evaluation of Recombinant Subunit Vaccine Against Swine Enzootic Pneumonia.** Advisor: Odir Antônio Dellagostin. Co-Advisor: Carlos Gil Turnes.

Swine Enzootic Pneumonia (SEP), caused by bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*, is the most important respiratory disease in swine breeding. The commonly used vaccines to control this disease consist of bacterins, whose production cost is high and the efficiency is limited. The objective of this study was to develop and to evaluate a new alternative for controlling SEP, based on a recombinant subunit vaccine (rLTBR1) containing the R1 region of P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* (R1) fused to the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* (LTB). rLTBR1 formed functional oligomers that presented high affinity to GM1 ganglioside. Mice inoculated with rLTBR1 (IN or IM) produced high levels of anti-R1 systemic and mucosal (sIgA) antibodies, which recognized the native P97. On the other hand, mice inoculated with the commercial bacterin did not produce anti-R1 antibodies. The administration route influenced the modulation of the immune response by LTB, showing that IM rLTBR1 induced Th2-biased immune responses and IN rLTBR1 induced Th1-biased immune responses. IN rLTBR1 also induced IFN- γ secretion by lymphocytes. The rLTB showed to be a powerful mucosal adjuvant, stimulating the production of anti-R1 IgA in trachea and bronchi from mice inoculated with rLTBR1 by parenteral route (IM). rLTBR1 may constitute a new strategy for preventing infection by *Mycoplasma hyopneumoniae* and may have potential for developing vaccines against other infectious diseases as well. Now a day, the efficacy of this vaccine is being evaluated in specific pathogen free swine.

Key words: Swine Enzootic Pneumonia; *Mycoplasma hyopneumoniae*; rLTBR1; P97; LTB.

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura vem, ao longo dos tempos, desenvolvendo-se e buscando um mercado cada vez mais especializado. Isto ocorre devido à grande demanda da carne suína, que por ser a mais consumida no mundo (USDA, 2005), tem um papel fundamental no crescimento acelerado da população mundial. Hoje, o mundo possui uma população de mais de seis bilhões de pessoas, podendo dobrar nos próximos 100 anos. Para atender a crescente necessidade da população mundial no que se refere a proteína animal de alta qualidade, a suinocultura é a principal atividade a ser considerada. A suinocultura no Brasil é uma atividade extremamente organizada, presente em aproximadamente 50% das propriedades rurais existentes no país. O rebanho suíno brasileiro, estimado em 36,5 milhões de cabeças, tem a sua maior representação numérica, econômica e tecnológica na Região Sul, a qual abriga mais de 42% do rebanho nacional (IBGE, 2005).

O plano diretor do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves - CNPSA (PDU, EMBRAPA, 2000) destacou como a principal demanda na pesquisa o desenvolvimento de insumos biológicos para utilização no diagnóstico e na imunoprofilaxia de doenças importantes na suinocultura. O impacto das doenças respiratórias na suinocultura levou o Ministério da Ciência e Tecnologia a criar o Programa Sul de Análise de Genomas e Biologia Estrutural (Projeto Genoma Sul; <http://www.genesul.Incc.br>), cujo principal objetivo é o seqüenciamento do genoma dos principais agentes etiológicos de doenças respiratórias (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Bordetella bronchiseptica*), visando à identificação de antígenos com potencial diagnóstico ou imunoprolático. Este projeto possibilitará a utilização da engenharia genética para o desenvolvimento de novas vacinas contra estes patógenos. Trabalhos pioneiros, utilizando essa estratégia para o desenvolvimento de vacinas, foram descritos recentemente para *Neisseria meningitidis* (Pizza, et al., 2000; Tettelin et al., 2000), demonstrando a exequibilidade deste enfoque.

A Pneumonia Micoplásmica ou Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pela bactéria fastidiosa *Mycoplasma hyopneumoniae*, é a doença

respiratória mais importante dos suínos. *M. hyopneumoniae* coloniza e destrói o principal mecanismo inespecífico de defesa do trato respiratório, o elevador mucociliar (Debey & Ross, 1994), predispondo os suínos a patógenos secundários (Ciprian et al., 1988; Debey & Ross, 1994; Thaker et al., 1999), por isso é o alvo central de um programa sanitário para doenças respiratórias de suínos. A PES é uma doença infecciosa crônica, muito contagiosa, caracterizada por uma broncopneumonia catarral que geralmente cursa com complicações broncopulmonares purulentas e que se manifesta por tosse seca e atraso no crescimento. A enfermidade possui alta morbidade e baixa mortalidade e as perdas econômicas são decorrentes de quedas na produtividade que podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso, dependendo da gravidade das lesões e das infecções secundárias (Sobestiansky et al., 1999). Um estudo realizado pelo CNPSA, onde foram avaliados 3.788 suínos de granjas da região sul do país, revelou que as perdas estimadas de peso devido a lesões pneumônicas, desde o nascimento ao abate, foram de 2,52 kg/suíno abatido (Sobestiansky et al., 2001), o que leva a uma estimativa de perda de aproximadamente 80 milhões de reais por ano. Um levantamento realizado em granjas comerciais localizadas na região sul do país constatou que 55% dos suínos de abate tinham lesões sugestivas de PES e 100% dos rebanhos examinados estavam afetados (Sobestiansky et al., 1999).

Os micoplasmas são os menores organismos autoreplicantes conhecidos, possuem genomas pequenos (580 a 1350 kb) e são desprovidos de parede celular. São de difícil cultivo “in vitro”, sendo que a maioria das espécies nunca foi cultivada (Razin et al., 1998). *M. hyopneumoniae*, por outro lado, é cultivável “in vitro”, porém exige meio enriquecido. Este fato, somado ao seu crescimento pobre e lento (Ross, 1999; Sobestiansky et al., 1999; Walker, 2003), encarece excessivamente a produção de vacinas preparadas com bactérias inteiras inativadas (bacterinas), que são as mais utilizadas no controle da PES (Ross, 1999; Fagan et al., 1997; Chen et al., 2001). As bacterinas utilizadas no controle da PES constituem o medicamento mais oneroso no custo de produção de suínos, representando aproximadamente um centavo de real/Kg de peso vivo (<http://www.suíno.com.br/estatisticas/>).

A vacinação parece ser a forma mais efetiva de controlar a PES (Kavanagh, 1994; Lin et al., 2003), porém, como mencionado anteriormente, a produção de bacterinas contra esta enfermidade é muito dispendiosa. Além disso, este tipo de vacina não impede a colonização nem o estabelecimento de suínos portadores, uma vez que são praticamente incapazes de estimular uma adequada imunidade de mucosa, caracterizada pela produção de IgA secretora (IgAs). Nesse contexto, novas alternativas para o controle da PES são necessárias. Uma das alternativas mais promissoras é a produção de vacinas através da tecnologia do DNA recombinante. A primeira etapa no desenvolvimento de uma vacina recombinante é a seleção de antígenos com potencial de estimular uma imunidade protetora.

O passo inicial de qualquer patógeno que invade o hospedeiro através das mucosas é a sua colonização. Zhang et al. (1995) identificaram e caracterizaram uma adesina de *M. hyopneumoniae* responsável pela ligação à receptores presentes nos cílios das células epiteliais da traquéia, brônquios e bronquíolos dos suínos. Esta adesina foi designada P97 e é um dos antígenos imunodominantes de *M. hyopneumoniae* (Zhang et al., 1995). Mais tarde, Hsu & Minion (1998) identificaram o epítipo da P97 responsável pela ligação ao cílio suíno, uma seqüência repetitiva de cinco aminoácidos (AAKPV/E) que é altamente imunogênica e que está localizada na porção C terminal da proteína, designada região R1. Soro suíno em fase convalescente reconheceu a região R1 (Minion et al., 2000), demonstrando o potencial imunogênico deste antígeno. O anticorpo monoclonal (MAb) F1B6 reconheceu a região R1 da P97 em um Western blot (Hsu et al., 1997) e foi capaz de bloquear a aderência de *M. hyopneumoniae* ao cílio suíno em um teste de inibição da aderência “in vitro” (Zhang et al., 1995), sugerindo que esta região da adesina possui papel fundamental na patogenia da PES, tornando-a uma forte candidata a antígeno vacinal. Em adição, o gene que codifica a P97 já foi clonado e seqüenciado (Hsu et al., 1997).

Uma vez selecionado o antígeno de interesse para a produção de uma vacina de subunidade recombinante contra a PES (região R1 da adesina P97), torna-se indispensável também a seleção de um adjuvante imunológico, uma vez que este tipo de vacina normalmente apresenta pobre imunogenicidade.

Além disso, vacinas de subunidade geralmente não estimulam uma adequada imunidade de mucosa (Rigano, et al., 2003). Thaker et al. (2000) e Lin et al. (2003) sugeriram que anticorpos de mucosa são importantes para o controle da PES. Devido à maioria das infecções começarem pelas mucosas, a imunização via mucosa é uma estratégia atrativa para o bloqueio dos patógenos no ponto de entrada. Já está bem estabelecido que o sucesso da imunização de mucosa requer que o antígeno seja administrado via mucosa, entretanto antígenos administrados por esta via são freqüentemente não imunogênicos e podem induzir tolerância imunológica (Kang et al., 2003). Uma alternativa para os problemas mencionados acima é a utilização de adjuvantes de mucosa.

Uma nova classe de adjuvantes vem ganhando destaque na produção de vacinas de subunidade. Esta classe é representada pela subunidade B da enterotoxina termolábil de *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* (CTB e LTB, respectivamente). Estas subunidades atóxicas são potentes adjuvantes de mucosa, estimulando uma forte resposta sistêmica e secretória (IgAs) de anticorpos contra antígenos coadministrados ou acoplados (Verweij et al., 1998). Um estudo com CTB e LTB recombinante demonstrou o potencial imunomodulador desses peptídeos, sendo que a LTB apresentou efeito adjuvante de mucosa mais potente que a CTB (Millar et al., 2001).

Antígenos podem ser conjugados a LTB através de fusão genética ou conjugação química. LTB recombinante (rLTB), fusionada com antígenos recombinantes, pode representar uma nova alternativa no desenvolvimento de vacinas contra patógenos que invadem o hospedeiro através das mucosas. Imunidade protetora em camundongos, contra o vírus sincicial respiratório (Oien et al., 1994), herpes vírus tipo 1 (Richards et al., 2001), *Streptococcus* do grupo A (Dale et al., 1995) e *Helicobacter pylori* (Weltzin et al., 2001) foi reportada utilizando rLTB ou rCTB como adjuvante de mucosa.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar uma vacina de subunidade recombinante (rLTBR1) contra a PES, composta pela região R1 da adesina P97 de *M. hyopneumoniae* (R1) fusionada à subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB).

HIPÓTESE

A rLTBR1 induz uma resposta imune anti-R1 em camundongos, especialmente a produção de IgA secretora na mucosa respiratória.

OBJETIVOS

- Produzir e caracterizar a rLTBR1.
- Avaliar a resposta imune de camundongos BALB/c inoculados com rLTBR1.

2 TRABALHO 1

Etiopatogenia e imunoprofilaxia da Pneumonia Enzoótica Suína

Etiopathogenesis and immunoprofilaxis of Swine Enzootic Pneumonia

Fabricio Rochedo Conceição¹, Odir Antônio Dellagostin²

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ABSTRACT

Swine Enzootic Pneumonia (SEP), caused by the fastidious bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*, is the most important respiratory disease of swine, responsible for high losses to Brazilian and worldwide swine breeding. The high prevalence and the fact that it predisposes the swine to secondary pathogens make this disease the central target for a sanitary program of respiratory diseases. Knowledge of the characteristics and pathogenicity factors of the etiologic agent could help in the development of new strategies to control PES. The aim of this review is to discuss some aspects of the etiopathogenesis of the PES that have implications in the immunoprofilaxis of the disease and the main results obtained with new generation vaccines evaluated experimentally.

INDEX TERMS: Swine Enzootic Pneumonia, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pathogenesis, immunoprofilaxis.

¹ Médico Veterinário, Mestre em Ciências, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010-900, Pelotas, Brasil, (53) 275-7587, frochedo@ufpel.tche.br. Autor para correspondência.

² Médico Veterinário, PhD pela Universidade de Surrey – Inglaterra, Professor do Instituto de Biologia e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

RESUMO

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pela bactéria fastidiosa *Mycoplasma hyopneumoniae*, é a doença respiratória mais importante dos suínos, responsável por enormes prejuízos à suinocultura brasileira e mundial. A elevada prevalência e o fato de predispor os suínos a patógenos oportunistas torna esta doença o alvo central de um programa sanitário para doenças respiratórias. O conhecimento das características do agente etiológico bem como dos seus fatores de patogenicidade pode ajudar na elaboração de novas estratégias de controle da PES. O objetivo desta revisão foi discutir alguns aspectos da etiopatogenia da PES que têm implicação na imunoprofilaxia da doença e os principais resultados obtidos com vacinas de última geração avaliadas experimentalmente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Pneumonia Enzoótica Suína, *Mycoplasma hyopneumoniae*, patogenia, imunoprofilaxia.

INTRODUÇÃO

A suinocultura vem, ao longo dos tempos, desenvolvendo-se e buscando um mercado cada vez mais especializado. Isto ocorre devido à grande demanda da carne suína, que por ser a mais consumida no mundo (USDA 2005), tem um papel fundamental no crescimento acelerado da população mundial. Hoje, o planeta possui uma população de mais de seis bilhões de pessoas, podendo dobrar nos próximos cem anos. Para atender a crescente necessidade da população mundial no que se refere a proteína animal de alta qualidade, a suinocultura é a principal atividade a ser considerada. A suinocultura no Brasil é uma atividade extremamente organizada, presente em aproximadamente 50% das propriedades rurais existentes no país. O rebanho suíno brasileiro, estimado em 36,5 milhões de cabeças, tem a sua maior representação numérica, econômica e tecnológica na Região Sul, a qual abriga mais de 42% do rebanho nacional (IBGE 2005).

As doenças respiratórias são enfermidades economicamente devastadoras que afetam a produção suína em todo o mundo. A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) ou Pneumonia Micoplásmica, causada pela bactéria fastidiosa *Mycoplasma hyopneumoniae*, é a doença respiratória mais importante dos suínos (Ross 1999). *M. hyopneumoniae* destrói o principal mecanismo de defesa inespecífico do trato respiratório, o elevador mucociliar (Debey & Ross 1994), predispondo os suínos a patógenos secundários (Ciprian et al. 1994, Debey & Ross 1994, Thaker et al. 1999), por isso é o alvo central de um programa sanitário para doenças respiratórias. O impacto das doenças respiratórias na suinocultura levou o Ministério da Ciência e Tecnologia a criar o Programa Sul de Análise de Genomas e Biologia Estrutural (Projeto Genoma Sul, <http://www.genesul.Incc.br>), cujo principal objetivo é o seqüenciamento do genoma dos principais agentes etiológicos de doenças de suínos. Visando à identificação de antígenos com potencial diagnóstico ou imunoprolático, o primeiro genoma a ser seqüenciado por este projeto foi o de *M. hyopneumoniae*, possibilitando a utilização da engenharia genética para o desenvolvimento de novas vacinas contra este patógeno. Trabalhos pioneiros, utilizando essa estratégia para o desenvolvimento de vacinas, foram descritos recentemente para *Neisseria meningitidis* (Tettelin et al. 2000), demonstrando a exeqüibilidade deste enfoque.

A PES é uma doença infecciosa crônica e muito contagiosa, caracterizada por uma broncopneumonia catarral que geralmente cursa com complicações broncopulmonares purulentas e que se manifesta por tosse seca e atraso no crescimento (Sobestiansky et al. 1999a). Afeta suínos de todas as idades, porém a forma clínica da doença é mais comum nos animais da fase de crescimento e terminação. A transmissão ocorre por contato direto, indireto (utensílios) e através de aerossóis eliminados durante os acessos de tosse. Variáveis ambientais e de manejo favorecem a sua ocorrência e severidade, por isso é considerada uma doença multifatorial. Animais que se recuperam da doença geralmente tornam-se portadores. A PES possui alta morbidade e baixa mortalidade e as perdas econômicas são decorrentes de quedas na produtividade que podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso, dependendo da gravidade das lesões e das infecções

secundárias (Sobestiansky et al. 1999a). Um estudo realizado pelo Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA – EMBRAPA, Concórdia, SC, Brasil), onde foram avaliados 3.788 suínos de granjas da região sul do país, revelou que as perdas estimadas de peso devido a lesões pneumônicas, desde o nascimento ao abate, foram de 2,52 kg/suíno abatido (Sobestiansky et al. 2001), o que leva a uma estimativa de perda de aproximadamente 80 milhões de reais por ano. Um levantamento realizado em granjas comerciais localizadas na região sul do país, a qual representa cerca de 80% do abate nacional, constatou que 55% dos suínos de abate tinham lesões sugestivas de PES e 100% dos rebanhos examinados estavam afetados (Sobestiansky et al. 1999b).

A vacinação parece ser a forma mais efetiva de controlar a PES (Kavanagh 1994, Lin et al. 2003). Atualmente, as vacinas contra a PES disponíveis no mercado apresentam um elevado custo de produção e conferem uma proteção parcial, não impedindo o estabelecimento da infecção nem a presença de suínos portadores. O conhecimento das características e dos fatores de patogenicidade da bactéria *M. hyopneumoniae* pode ajudar no desenvolvimento de novas estratégias de controle da PES, principalmente na imunoprevenção. O objetivo desta revisão foi discutir alguns aspectos da etiopatogenia da PES que têm implicação na imunoprevenção da doença e também os principais resultados obtidos com vacinas de última geração avaliadas experimentalmente.

ETIOPATOGENIA

Os micoplasmas são diferenciados fenotipicamente de outras bactérias pelo diminuto tamanho e ausência de parede celular. Pertencem à classe *Mollicutes* (*mollis*, mole; *cutis*, pele, em Latim), composta pelos gêneros *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*a, *Asteroplasm*a, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* e *Ureaplasma*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* e gênero *Mycoplasma* (Walker 2003). A maioria dos membros desta classe é patogênica e coloniza uma grande variedade de hospedeiros, incluindo animais, plantas e insetos. Somente os membros do gênero *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são

importantes na medicina veterinária. Os micoplasmas são os menores organismos autoreplicantes conhecidos, possuem genomas pequenos (580 a 1.350 kb) com baixo conteúdo de G + C (23-40%) e são filogeneticamente relacionados aos gêneros *Clostridium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Maniloff 1992). A morfologia dos micoplasmas é bastante pleomórfica em função da ausência da parede celular. A célula pode ser esférica, em forma de pêra, em forma de espiral ou filamentosa. O diâmetro da forma esférica varia de 0,3 a 0,8 μm . Coram-se de forma insatisfatória pelo método de Gram, sendo recomendado as colorações Giemsa, Castañeda, Dienes e novo azul de metileno. Possuem uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana. Os micoplasmas crescem lentamente em meio de cultivo após incubação de 3 a 20 dias, a uma temperatura ótima de 37°C, pH em torno de 7,5, atmosfera de 5 a 10% de CO₂ e leve agitação (Walker 2003).

A ausência da parede celular torna os micoplasmas resistentes aos antimicrobianos que afetam a sua síntese, como penicilinas, cefalosporinas, bacitracina, entre outros e também favorece a passagem destes microorganismos por membranas de 0,22 μm . *M. hyopneumoniae* é inativado em 48 horas por dessecação, porém pode persistir por 17 dias em água de chuva entre 2 a 7°C e de 3 a 7 dias no tecido pulmonar entre 17 a 25°C (Sobestiansky et al. 1999a).

Micoplasmas são de difícil cultivo “in vitro”, sendo que a maioria das espécies nunca foi cultivada (Razin et al. 1998). *M. hyopneumoniae*, por outro lado, é cultivável “in vitro”, porém exige meio enriquecido. Este fato, somado ao seu crescimento pobre e lento (Ross 1999, Sobestiansky et al. 1999a, Walker 2003), encarece a produção de vacinas preparadas com bactérias inteiras inativadas (bacterinas), que são as mais utilizadas no controle da PES (Fagan et al. 1997, Ross 1999, Chen et al. 2001). *M. hyopneumoniae* geralmente é cultivado em meio Friis (Friis 1975), o meio de cultivo mais utilizado para micoplasmas. No cultivo primário, o crescimento produz uma turbidez discreta e uma coloração ácida em 3 a 20 dias. Após a adaptação em caldo (no mínimo quatro passagens), o cultivo é transferido para meio sólido e incubado em

estufa a 37°C com atmosfera de 5 a 10% de CO₂. As colônias tornam-se visíveis após 2 a 3 dias de incubação, porém o mais comum é observá-las após 10 dias, onde estão com aproximadamente 0,25 a 1 mm de diâmetro (Ross 1999). A necessidade de enriquecer o meio Friis com soro suíno livre de anticorpos anti - *M. hyopneumoniae* encarece mais ainda o cultivo deste patógeno. Para cada litro de meio Friis são necessários 200 ml de soro de suíno SPF (specific pathogen free), cujo custo é de aproximadamente U\$ 50 (SIGMA, 2005).

Ao contrário de micoplasmas patogênicos para o homem (*M. genitalium* e *M. pneumoniae*), que são intracelulares, *M. hyopneumoniae* é um microorganismo de vida livre. Porém, o isolamento deste microorganismo é complicado devido a sua natureza fastidiosa e também pela freqüente presença no trato respiratório suíno de *M. hyorhinis*, causador de poliserosites e artrites e *M. flocculare*, espécie não patogênica que apresenta semelhanças ao *M. hyopneumoniae* em relação à morfologia, crescimento e antigenicidade (Ross 1999).

Os recentes projetos genomas encontraram explicações genéticas para os problemas mencionados acima, demonstrando uma notável escassez em micoplasmas de genes envolvidos em rotas biosintéticas. Por exemplo, *M. genitalium* e *M. pneumoniae* não possuem os genes envolvidos na biosíntese de aminoácidos (Fraser et al. 1995, Himmelreich et al. 1996), tornando-os totalmente dependentes de suplemento exógeno. Além disso, todos os micoplasmas necessitam de colesterol para o seu crescimento (Razin et al. 1998). De um total de 692 prováveis seqüências codificadoras de proteínas, identificadas após o seqüenciamento da cepa 232 de *M. hyopneumoniae* (Minion et al. 2004), foram identificadas apenas 16 seqüências (2,2%) envolvidas na biosíntese de moléculas: três para a biosíntese de aminoácidos, oito para cofatores, grupos prostéticos ou carreadores, duas para poliaminas e três para açúcares, sugerindo que este microorganismo também apresenta uma limitada capacidade de biosíntese.

Recentemente, a seqüência do genoma da cepa patogênica 232 de *M. hyopneumoniae* foi publicada (Minion et al. 2004), destacando-se as seguintes características gerais: o genoma consiste de 892.758 pb; o conteúdo total de G

+ C é 28,6%; das 692 prováveis seqüências codificadoras de proteínas, funções foram assinaladas para 304 (44%), enquanto 261 (38%) seqüências são de proteínas hipotéticas conservadas e 127 (18%) codificam proteínas hipotéticas exclusivas deste patógeno; o genoma contém um operon para rRNA 16S-23S, uma seqüência codificadora para rRNA 5S e trinta seqüências codificadoras para tRNA. Um padrão incomum de códon preferencial foi encontrado, sugerindo uma possível aquisição de genes por transferência horizontal. Processamento incompleto de lipoproteínas, incapacidade de modificar fosfolipídeos, sistema simplificado de secreção de proteínas de membrana, ausência de um gene para a RNase H (responsável pela remoção dos fragmentos de Okasaki), ausência das proteínas GroEL e GroES (proteínas altamente conservadas em eubactérias), sistema primitivo de resposta ao estresse e reparo de DNA, presença de um único fator sigma e de seis parálogos do gene para a adesina ciliar P97 são outras características relevantes do genoma de *M. hyopneumoniae* que ajudam a compreender um pouco mais sobre a fisiologia e evolução deste importante patógeno. Filogeneticamente, entre as outras nove espécies de micoplasmas já seqüenciadas, *M. hyopneumoniae* está mais relacionado à *M. pulmonis*, um patógeno de roedores (Minion et al. 2004).

Assim como a maioria dos membros da ordem *Mycoplasmatales*, *M. hyopneumoniae* infecta uma única espécie, a suína, porém os mecanismos de especificidade pelo hospedeiro ainda são desconhecidos. Uma notável característica da PES é a cronicidade, porém igualmente importante é a habilidade que *M. hyopneumoniae* possui de alterar ou desviar a resposta imune e predispor o suíno a infecções secundárias (Ciprian et al. 1994, Debey & Ross 1994, Thaker et al. 1999).

Uma característica muito importante de micoplasmas, com potencial patogênico e implicações no controle, é a notável capacidade de alterar os seus antígenos de superfície. Com isso, estes microorganismos conseguem evadir a resposta imune montada pelo hospedeiro e estabelecer uma infecção crônica. Algumas espécies de micoplasmas patogênicos, como *M. hyorhinis*, *M. bovis* e *M. gallisepticum* possuem uma sofisticada maquinaria genética para alterar os seus antígenos de superfície através de mecanismos como variação

de fase, variação de tamanho e mascaramento/desmascaramento de epítomos de proteínas de superfície (Razin et al. 1998). A variação antigênica em micoplasmas geralmente está relacionada à presença de seqüências de DNA repetitivas nos genes. Provavelmente, durante o processo de replicação do DNA, é que ocorre a mudança no número de unidades repetitivas responsáveis pela variação antigênica (Djordjevic et al. 2004). Curiosamente, ao contrário de outros micoplasmas, *M. hyopneumoniae* contém poucos genes com seqüências repetitivas que poderiam estar envolvidas na variação antigênica (Minion et al. 2004). Desta forma, ainda não está claro como este microorganismo evade o sistema imune e estabelece uma infecção crônica. Recentemente, Djordjevic et al. (2004) demonstraram que a adesina P97 de *M. hyopneumoniae* é seletivamente clivada após a sua tradução, gerando subprodutos com diferentes tamanhos. A habilidade de *M. hyopneumoniae* clivar seletivamente as suas proteínas secretadas sugere que este microorganismo também possui uma notável capacidade de alterar a sua arquitetura de superfície.

Heterogeneidade entre cepas de *M. hyopneumoniae* foi observada através de teste de inibição do metabolismo, digestão com enzimas de restrição, PCR, perfil total de proteínas e perfil de glicoproteínas (Desrosiers 2001). Vicca et al. (2003) encontraram uma alta variação na virulência de cepas de *M. hyopneumoniae* isoladas em diferentes rebanhos. As cepas de moderada ou alta virulência apresentaram uma banda de 5.000 pb, determinada através de *randomly amplified polymorphic* DNA (RAPD), que estava ausente nas cepas de baixa virulência. A caracterização antigênica de cepas de determinados patógenos é essencial para a seleção de antígenos vacinais adequados e deve ser realizada periodicamente, tendo em vista a constante mudança no perfil antigênico das cepas prevalentes (Conceição & Turnes 2003, Conceição et al. 2003). Trabalhos visando à caracterização antigênica de cepas de *M. hyopneumoniae* são escassos e dificultados pela natureza fastidiosa do microorganismo. Recentemente, foi proposta a análise comparativa dos genomas de diferentes isolados de *M. hyopneumoniae*, visando buscar através da genômica a detecção de uma possível diversidade antigênica existente entre estes isolados (Zaha 2004 – comunicação pessoal).

Micoplasmas patogênicos utilizam um mecanismo de patogenicidade bastante complexo; este envolve a adesão/colonização, citotoxicidade, competição por substratos, evasão e ou modulação da resposta imune do hospedeiro, efeito clastogênico e oncogênico (Razin et al. 1998, Ross 1999). Entretanto, a base molecular da patogenicidade de alguns micoplasmas ainda permanece obscura. Infecções em humanos e animais causadas por micoplasmas sugerem que o dano provocado nesses hospedeiros ocorre devido à resposta imune e inflamatória montada ao invés do efeito tóxico direto causado pelos componentes celulares destes microorganismos (Razin et al. 1998). Após o seqüenciamento da cepa patogênica 232 de *M. hyopneumoniae* (Minion et al. 2004), foram identificados 8 genes para proteases, 53 genes para lipoproteínas (8,5% do genoma) e 6 genes homólogos ao da adesina P97 que poderiam contribuir para a persistência e virulência do agente. Proteases estão ligadas à virulência de bactérias Gram positivas e Gram negativas (Tortora et al. 2002), sendo que uma ou mais delas poderiam estar envolvidas no processamento pós-traducional da adesina P97 (Djordjevic et al. 2004), um fator de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* bem caracterizado. Lipoproteínas, que são os principais componentes de membrana de micoplasmas, compreendem aproximadamente 2/3 da massa total da membrana (Razin et al. 1998) e são elas que normalmente sofrem uma variação antigênica frente à resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, a função dos genes homólogos ao da adesina P97 é desconhecida e provavelmente não está relacionada com a adesão, uma vez que apenas um deles possui o domínio repetitivo R1 responsável pela ligação ao receptor ciliar (Minion et al. 2000, Minion et al. 2004).

Cepas de *M. hyopneumoniae* com baixa capacidade de aderência ao cílio suíno não são patogênicas (Zielinski & Ross 1993). Com a exceção da adesina ciliar P97, fatores de patogenicidade não têm sido claramente estabelecidos em *M. hyopneumoniae*. O evento inicial na patogenia da PES é a adesão/colonização de *M. hyopneumoniae* no trato respiratório suíno. A adesina P97 identificada por Zhang et al. (1995) reconhece receptores glicolipídicos sulfatados presentes nos cílios das células epiteliais do trato respiratório suíno (Zhang et al. 1994). Hsu & Minion (1998) identificaram o

epítopo da P97 que é responsável pela ligação ao receptor ciliar, uma seqüência repetitiva de cinco aminoácidos (AAKPV/E) que é altamente imunogênica e que está localizada na porção C terminal da proteína, designada região R1. Cepas de *M. hyopneumoniae* com variação no número de repetições da região R1 (8 a 15) foram identificadas (Wilton et al. 1998), sugerindo que esta variação poderia influenciar a capacidade de ligação ao cílio suíno. Porém, Minion et al. (2000), utilizando fusões de β -galactosidase com diferentes números de repetições R1, concluíram que no mínimo oito repetições são requeridas para a ligação ao cílio suíno e três para o reconhecimento dos MAbs F1B6 e F2G5. Estes MAbs bloquearam a aderência de *M. hyopneumoniae* ao cílio suíno em um teste de inibição da aderência “in vitro” (Zhang et al. 1995), sugerindo que a região R1 da adesina P97 possui papel fundamental na patogenia da PES, tornando-a uma forte candidata a antígeno vacinal. O gene que codifica a adesina P97 (*p97*) foi clonado e seqüenciado (Hsu et al. 1997). A análise deste gene revelou uma ORF (*open reading frame*) que codifica para uma proteína de 125 kDa, a qual apresenta um domínio transmembrana hidrofóbico e um peptídeo sinal. A clivagem pós-traducional do peptídeo sinal produz uma proteína de aproximadamente 102,3 kDa, que migra em SDS-PAGE até 97 kDa, por isso foi designada P97 (Zhang et al. 1995). O gene *p97* encontra-se em um operon juntamente com outro gene que codifica para uma proteína de 102 kDa, cuja função é desconhecida (Minion et al. 2004). Provavelmente, devido à localização, esta proteína participe direta ou indiretamente da adesão.

A expressão da P97 e a presença de um número adequado de repetições R1 não são suficientes para conferir capacidade de aderência, uma vez que a cepa J de *M. hyopneumoniae*, uma cepa pouco aderente e não patogênica, expressou uma adesina funcional com nove repetições R1, sugerindo que fatores ou proteínas adicionais também são requeridos para a aderência ao cílio suíno (Hsu & Minion 1998). Estes fatores poderiam participar da modificação pós-traducional da P97, da sua translocação ou da sua substituição na membrana. Chen et al. (1998) identificaram uma glicoproteína de 110 kDa que também apresentou capacidade de ligação ao cílio suíno. Enfim, o processo de adesão/colonização utilizado por *M. hyopneumoniae* é

complexo e a sua elucidação poderia ajudar no desenvolvimento de novas alternativas de controle da PES.

Após aderir aos cílios da traquéia, brônquios e bronquíolos, *M. hyopneumoniae* inicialmente paralisa e depois destrói estas estruturas (Debey & Ross 1994), predispondo os suínos a infecções secundárias. *M. hyopneumoniae* interage com macrófagos alveolares e linfócitos, estimulando-os a produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) responsáveis pelas lesões pulmonares e pela hiperplasia linfóide perivascular e peribrônquica (Rodríguez et al. 2004) características da PES, sugerindo o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das lesões. Além disso, micoplasmas são capazes de ativar a mitose de linfócitos B e T (Razin et al. 1998), o que também poderia auxiliar na evolução da hiperplasia linfóide. O avanço da hiperplasia resulta na obstrução das vias aéreas levando a formação de lesões atelectásicas nos pulmões, as quais apresentam aspecto de consolidação e coloração que varia do roxo ao cinza, localizadas principalmente na região cranioventral dos lobos apicais e cardíacos (Sobestiansky et al. 1999a).

Além da adesão/colonização e interação com o sistema imune, outros aspectos da patogenia da PES vem sendo identificados. Recentemente, Schmidt et al. (2004) identificaram em *M. hyopneumoniae* uma lipoproteína de superfície imunodominante (P65) que é especificamente reconhecida durante a infecção. A P65 pertence à família de enzimas lipolíticas GDSL e embora a sua função fisiológica e ou patogênica ainda não tenha sido elucidada, ela pode desempenhar uma importante função nutricional, sendo responsável pela aquisição de ácidos graxos de cadeia longa e também pode reduzir a função de surfactantes pulmonares, favorecendo a atelectasia dos alvéolos. Soro de coelho anti-P65 inibiu o crescimento “in vitro” de *M. hyopneumoniae*, sugerindo que este antígeno possui potencial imunoprolático. Superóxido dismutase Cu/Zn (SODCu/Zn) é uma enzima chave na defesa contra os reativos intermediários de oxigênio. Esta enzima é encontrada em eucariotos e várias espécies de bactérias Gram negativas. Chen et al. (2000) identificaram em *M. hyopneumoniae* uma proteína de aproximadamente 17 kDa, com atividade de SODCu/Zn, que poderia minimizar os efeitos da resposta inflamatória sobre o

patógeno. No Projeto Genoma Sul foram seqüenciadas as cepas 7448 (patogênica) e J (não patogênica) de *M. hyopneumoniae*. A análise comparativa dos genomas revelou a existência de um provável elemento conjugativo integrativo (ECI) presente apenas na cepa patogênica. Uma hipótese, a qual necessita ainda ser confirmada, é que este ECI seja responsável pela transferência de moléculas efetoras de *M. hyopneumoniae* para as células epiteliais do trato respiratório (Zaha, 2004 – comunicação pessoal). Uma análise proteômica destas cepas também poderia ajudar na compreensão dos fatores de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* e por conseguinte no desenvolvimento de medidas de controle mais eficientes.

IMUNOPROFILAXIA

As únicas vacinas contra a PES disponíveis no mercado são as bacterinas. Elas conferem proteção aos suínos, caracterizada pela redução das lesões e melhora dos índices de produtividade (ganho de peso e conversão alimentar), porém não impedem a colonização de *M. hyopneumoniae* nem o estabelecimento de suínos portadores, uma vez que este tipo de vacina não estimula uma adequada imunidade de mucosa (Mcghee 1992), caracterizada pela produção de IgA secretora (IgAs). Apesar disso, reduzem de forma significativa o impacto econômico da PES (Maes et al. 1999, Moreau et al. 2004).

As bacterinas contra a PES apresentam um elevado custo de produção (Fagan et al. 1997, Chen et al. 2001) devido às dificuldades no cultivo de *M. hyopneumoniae*, por isso o desenvolvimento de novas vacinas contra esta doença torna-se atrativo e necessário. Esta bactéria constitui o medicamento mais oneroso no custo de produção de suínos, representando aproximadamente um centavo de real/kg de peso vivo (<http://www.suíno.com.br/estatisticas/>, acessado em 03/2005). Nesse contexto, a produção de vacinas através da tecnologia do DNA recombinante destaca-se, uma vez que o cultivo do agente em larga escala não é necessário. Porém, a expressão de genes de micoplasmas em outros organismos (*E. coli*, outros vetores bacterianos, leveduras, plantas e células eucarióticas) é dificultada pelo

fato de que micoplasmas utilizam o códon UGA para codificar triptofano, enquanto que nos outros organismos este códon é reconhecido como um “stop” códon. Assim sendo, nestes organismos, a tradução de um mRNA de um gene de micoplasma vai ser interrompida em locais onde deveria ser incorporado um triptofano, resultando em proteínas truncadas (Razin et al. 1998). A produção de mutações sítio específicas no sentido de alterar os códons TGA por TGG, um códon padrão para triptofano em outros organismos, tem sido a estratégia utilizada para contornar este problema (Chung et al. 2000, Rosati et al. 2000, Noh et al. 2002).

Algumas vacinas de última geração contra a PES foram desenvolvidas e avaliadas experimentalmente. Uma discussão dos principais resultados obtidos com estas vacinas será descrita a seguir. Uma vacina produzida a partir de sobrenadante de cultura de *M. hyopneumoniae* reduziu significativamente as lesões pulmonares de suínos vacinados/desafiados (Okada et al. 2000), contribuindo para a redução da produção de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória envolvida no desenvolvimento das lesões características da PES. Contudo, este tipo de vacina também apresenta elevado custo de produção, uma vez que o cultivo de *M. hyopneumoniae* é necessário. Fagan et al. (1996) avaliaram por via intramuscular (IM) uma vacina de subunidade recombinante composta por um fragmento da subunidade R2 da ribonucleotídeo redutase de *M. hyopneumoniae* (NrdF) fusionada a β -galactosidase. Esta vacina reduziu significativamente as lesões pulmonares de suínos vacinados/desafiados, porém não impediu o estabelecimento da infecção. Por outro lado, uma vacina de subunidade recombinante composta pela adesina P97 não conferiu proteção contra a PES (King et al. 1997). Nós acreditamos que a possível falha na proteção ocorreu devido à via de administração utilizada (IM), uma vez que a administração parenteral de imunógenos não induz uma adequada imunidade de mucosa (Mcghee et al. 1992). Thaker et al. (2000) e Lin et al. (2003) sugeriram que anticorpos de mucosa (IgA) são importantes para o controle da PES. Lin et al. (2003) testaram por via oral uma bacterina de *M. hyopneumoniae* microencapsulada, que conferiu uma proteção efetiva contra a PES. A administração oral de antígenos encapsulados com microesferas evita a degradação no estômago e possibilita a estimulação do sistema imune da

mucosa intestinal (Placas de Peyer). Após a estimulação, as células imunocompetentes migram para outros sítios do organismo, como as mucosas respiratória e urogenital e glândulas mamária, lacrimal e salivar.

Fagan et al. (2001) avaliaram uma vacina composta por uma *Salmonella typhimurium* atenuada (*aroA*) expressando um fragmento da NrdF de *M. hyopneumoniae*. A imunização oral de suínos com esta vacina estimulou significativamente a produção de IgA secretora anti-NrdF no trato respiratório suíno e reduziu as lesões pulmonares de suínos vacinados/desafiados. Shimoji et al. (2003) avaliaram a eficácia de uma vacina composta por uma cepa atenuada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* (YS-19) expressando a região C terminal da adesina P97 de *M. hyopneumoniae*. Suínos imunizados com YS-19 por via intranasal (IN) apresentaram uma redução significativa das lesões pulmonares após o desafio, porém anticorpos séricos anti-P97 e imunidade celular não foram detectados, indicando um mecanismo de proteção desconhecido. Nós acreditamos que a proteção conferida por esta vacina resultou de uma competição entre a cepa YS-19 e *M. hyopneumoniae* pelos receptores ciliares do trato respiratório suíno, uma vez que a cepa YS-19 expressa na sua superfície a região C terminal da P97, que possui o epítipo de ligação ao cílio suíno (região R1). Em outro trabalho do mesmo grupo (Shimoji et al. 2002), não foi detectada uma produção significativa de IgA anti-P97 no trato respiratório de suínos imunizados com a cepa YS-19.

O soro de camundongos imunizados com uma vacina de DNA composta pelo plasmídeo pcDNA3 carreando o gene da proteína de choque térmico P42 inibiu o crescimento “in vitro” de *M. hyopneumoniae*, sugerindo que a vacinação genética constitui uma nova estratégia contra a PES (Chen et al. 2003). Chen et al. (2001) fusionaram a região R1 da adesina P97 de *M. hyopneumoniae* com a exotoxina A, domínio III deletado, de *Pseudomonas* [PE(Δ III)]. Camundongos e suínos imunizados com a PE(Δ III)-R1 apresentaram uma elevada produção de IgG sérica anti-R1, entretanto, a resposta imune de mucosa (IgAs) contra este antígeno, a qual acredita-se ser protetora, não foi determinada. Conceição et al. (2003) desenvolveram uma vacina de subunidade recombinante (rLTB-R1) composta pela região R1 da adesina P97 de *M. hyopneumoniae* (R1) fusionada a subunidade B da enterotoxina

termolábil de *E. coli* (LTB), um potente adjuvante de mucosa (Simmons et al. 2001). Camundongos imunizados com rLTB-R1 por via IM ou IN produziram altos níveis de IgA anti-R1 no trato respiratório (Conceição, 2004 – comunicação pessoal), demonstrando o potencial desta vacina. Nós acreditamos que altos níveis de IgA anti-R1 no trato respiratório suíno possam bloquear a colonização de *M. hyopneumoniae*. Brevemente a eficácia desta vacina será avaliada em suínos SPF.

CONCLUSÃO

A PES continua sendo uma doença economicamente importante na suinocultura. Os recentes projetos genomas de *M. hyopneumoniae* identificaram novas proteínas com potencial imunoprolático e também ajudaram a compreender um pouco mais sobre a fisiologia e patogenia deste microorganismo. Atualmente, as bacterinas contra a PES disponíveis no mercado não protegem suficientemente contra a infecção. Novas vacinas contra esta doença vêm sendo desenvolvidas, destacando-se aquelas que estimulam a produção de IgA na mucosa respiratória suína.

Conceição F.R. – comunicação pessoal. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. Fone: (53) 3275-7587. E-mail: frochedo@ufpel.tche.br

Zaha A. – comunicação pessoal. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, C.P. 15005 – 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: (51) 316-6054. E-mail: zaha@dna.cbiot.ufrgs.br - Informação obtida durante uma palestra proferida no Curso de Seqüenciamento e Análise de Genomas II, realizado no CenBiot – UFRGS em novembro de 2004.

REFERÊNCIAS

- Chen J.R., Jyhs H.L., Chung N.W. & Shiow S.L. 1998. Identification of a novel adhesion-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 62:97-110.
- Chen J.R., Chung N.W., Tin Y.H., Ivan C.C. & Shiow S.L. 2000. Identification of the copper-zinc superoxide dismutase activity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 73:301-310.
- Chen J.R., Chao W.L., Simon J.T.M. & Chung N.W. 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. Vet. Microbiol. 80:347-357.
- Chen Y.L., Wang S.N., Yang W.J., Chen Y.J., Lin H.H. & Shiuan D. 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. Infec. Immun. 71:1155-1160.
- Chung T., Farh L., Chen Y.L. & Shiuan D. 2000. Molecular Cloning and Characterization of a Unique 60 kDa/72 kDa Antigen Gene Encoding Enzyme I of the Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System (PTS) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Biochem. 128:261-269.
- Conceição F.R. & Turnes C.G. 2003. *Moraxella bovis*: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. Ciência Rural. 33:778-787.
- Conceição F.R., Cobo A.L., Paolichi F. & Turnes C.G. 2003. Antigenic relationships of *Moraxella bovis* strains recovered from outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil and Uruguay between 1983 and 2000. Can. J. Vet. Res. 67:315-318.
- Conceição F.R., Michelon M., Michelon, A., Cerqueira G. & Dellagostin O.A. 2003. LTB-R1: an alternative to swine mycoplasmal pneumonia control. Braz. J. Microbiol. 34:79-81.
- Ciprian A., Cruz T.A. & de la Garza M. 1994. *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. Arch. Med. Res. 25:235-239.

- Debey M.C. & Ross R.F. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 62:5312-5318.
- Desrosiers R. 2001. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *J. Swine Health Prod.* 9:233-237.
- Djordjevic S.P., Stuart J.C., Michael A.D., Wilton J. & Minion F.C. 2004. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect. Immun.* 72:2791-2802.
- 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. *Infect. Immun.* 64:1060-1064.
- 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). *Infect. Immun.* 65:2502-2507.
- 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. *Microb. Pathog.* 30:101-110.
- Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., Bult C.J., Kerlavage A.R., Sutton G. & Kelley J.M. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science.* 270:397-403.
- Friis N.F. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. *Nord. Vet. Med.* 27:337-339.
- Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkel E., Li B.C. & Herrmann R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24:4420-4449.

- Hsu T. & Minion F.C. 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect. Immun.* 66:4762-4766.
- Hsu T., Artiushin S. & Minion F.C. 1997. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Bacteriol.* 179:1317-1323.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. On line, Acessado em 02/2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
- Kang S.M., Yao Q., Guo L. & Compans R.W. 2003. Mucosal immunization with virus-like particles of Simian Immunodeficiency Virus Conjugated with cholera toxin subunit B. *J. Virol.* 77:9823-9830.
- Kavanagh N.T. 1994. The effect of pulse medication with combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia. *Int. Vet. J.* 47:58-61.
- King K.W., Faulds H.F., Everett E.L., Yancey J.Y. 1997. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine.* 15:25-35.
- Lin J.H., Weng C.N., Liao C.W., Yeh K.S. & Pan M.J. 2003. Protective effects of oral microencapsuled *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. *J. Vet. Med. Sci.* 65:69-74.
- Maes D., Deluyker H., Verdonck M., Castryck F., Miry C., Vrijens B., Verbeke W., Viaene J. & Kruif A. 1999. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine.* 17:1024-1034.
- Maniloff J. 1992. Phylogeny of mycoplasmas. In: *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.549-559.
- Mcghee J.R., Mestecky J., Dertzbaugh M.T., Eldridge J.H., Hirasawa M. & Kiyono H. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine.* 10:75-88.
- Minion F.C., Adams C. & Hsu T. 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect. Immun.* 68:3056-3060.
- 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. J. Bacteriol. 186:7123-7133.
- Moreau I.A., Miller G.Y. & Bahnson P.B. 2004. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vaccine. 22:2328-2333.
- Noh E.J., Kang S.W., Shin Y.J., Kim D.C., Park I.S., Kim M.Y., Chun B.G. & Min B.H. 2002. Characterization of mycoplasma arginine deiminase expressed in *E. coli* and its inhibitory regulation of nitric oxide synthesis. Mol. Cells. 13:137-143.
- Okada M., Asai T., Ono M., Sakano T. & Sato S. 2000. Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernatant. Vaccine. 18:2825-2831.
- Razin, S., Yogev D. & Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1094-1156.
- Rodríguez F., Ramirez G.A., Sarradell J., Andrada M. & Lorenzo H. 2004. Immunohistochemical Labelling of Cytokines in Lung Lesions of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Comp. Path. 130:306-312.
- Rosati S., Robino P., Fadda M., Pozzi S., Mannelli A. & Pittau M. 2000. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. Vet. Microbiol. 71:201-210.
- Ross R.F. 1999. Mycoplasmal diseases. In: Diseases of Swine. Ed. 8^o, Iowa State University Press, Ames, Iowa. p.495-510.
- Schmidt J.A., Browning G.F. & Markham P.F. 2004. *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 Surface Lipoprotein Is a Lipolytic Enzyme with a Preference for Shorter-Chain Fatty Acids. J. Bacteriol. 186:5790-5798.
- Shimoji Y., Oishi E., Kitajima T., Muneta Y., Shimizu S. & Mori Y. 2002. *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. Infec. Immun. 70:226-232.

- 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*. 21:532-537.
- SIGMA. 2005. Capturado em 16 fev. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.sigma-aldrich.com>
- Simmons C.P., Ghaem-Magami M., Petrovska L., Lopes L., Chain B.M., Williams N.A. & Dougan G. 2001. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scand. J. Immunol.* 53:218-226.
- Sobestiansky J., Barcellos D., Mores N., Carvalho L.F. & Oliveira S. 1999a. Pneumonia enzoótica. In: *Clínica e Patologia Suína*. 2ª ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás. p.359.
- Sobestiansky J., Costa O.D., Mores N., Barioni W., Piffer I. & Pedroso D. 1999b. Estudos ecopatológicos nas fases de crescimento e terminação: prevalência de rinite atrófica e de pneumonia nas fases de crescimento e terminação na região sul do Brasil. *Anais IX ABRAVES*, Belo Horizonte. p.171- 172.
- Sobestiansky J., Costa O.A.D. & Mores N. 2001. Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias dos suínos: Prevalência e impacto econômico em sistemas de produção dos estados de SC, RS e PR. EMBRAPA-CNPSA, p.6, 2001 (EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico 287).
- Tettelin H., Saunders N.J., Heidelberg J., Jeffries A.C., Nelson K.E., Eisen J.A., Ketchum K.A., Hood D.W., Peden J.F., Dodson R.J., Nelson W.C., Gwinn M.L., DeBoy R., Peterson J.D., Hickey E.K., Haft D.H., Salzberg S.L., White O., Fleischmann R.D., Dougherty B.A., Mason T., Ciecko A., Parksey D.S., Blair E., Cittone H., Clark E.B., Cotton M.D., Utterback T.R., Khouri H., Qin H., Vamathevan J., Gill J., Scarlato V., Massignani V., Pizza M., Grandi G., Sun L., Smith H.O., Fraser C.M., Moxon E.R., Rappuoli R. & Venter J.C. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*. 287:1809-1815.
- 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. J. Clin. Microbiol. 37:620-627.
- 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. Am. J. Vet. Res. 61:1384-1389.
- Tortora G.J., Funke B.R. & Case C.L. 2000. Mecanismos microbianos de patogenicidade. In: Microbiologia. 6^a ed., Artmed, Porto Alegre/RS. p.421-440.
- USDA – United States Department of Agriculture. 2005. Capturado em 15 mar. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.usda.gov/>
- Vicca J., Stakenborg T., Maes D., Butaye P., Peeters J., de Kruif A., Haesebrouck F. 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Vet. Microbiol. 97:177-190.
- Walker R.L. 2003. *Mollicutes*. In: Hirsh D.C. & Zee Y.C. Microbiologia Veterinária, 1^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. p.155-162.
- Wilton J.L., Scarman A.L., Walker M.J. & Djordjevic S.P. 1998. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesion gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Microbiology. 144:1931-1943.
- Zhang Q., Young T.F. & Ross R.F. 1994. Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. Infec. Immun. 62:1013-1019.
- Zhang Q., Young T.F. & Ross R.F. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infec. Immun. 63:1013-1019.
- Zielinski G.C. & Ross F.R. 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am. J. Vet. Res. 54:1262-1269.

3 TRABALHO 2

LTB-R1: AN ALTERNATIVE TO SWINE MYCOPLASMAL PNEUMONIA CONTROL

Conceição, F.R.^{1,*}; Michelon, A.^{1,2}; Michelon, M.¹; Cerqueira, G.M.¹; Dellagostin, O.A.¹

¹Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Pelotas, RS, Brasil;

²Programa de Pós-Graduação em Veterinária/UFPel; *E-mail: frochedo@ufpel.tche.br

Abstract

Mycoplasmal pneumonia is the main respiratory disease in swine. The most efficient way to control it is through the use of vaccines (bacterins), whose production cost is high. The objective of this work was to develop a new alternative for controlling Swine Mycoplasmal Pneumonia, based on a recombinant subunit vaccine containing the R1 region of P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* fused to the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* (rLTB-R1). In this work we report the amplification of the genes, genetic fusion between LTB and R1 coding sequences, cloning, construction of the expression vector, as well as expression and purification of rLTB-R1 in *E. coli*.

Introduction

Swine Mycoplasmal Pneumonia (SMP), caused by *Mycoplasma hyopneumoniae*, is the most important respiratory disease in swine breeding. Economic losses, as a result of lower productivity can represent around 20% in lower food conversion and 30% in weight loss, depending on the severity of lesions and secondary infections (2).

The commonly used vaccines to SMP control consist of killed bacterial cells (bacterins). However, growth of *M. hyopneumoniae* "in vitro" requires a

rich media, and it is a time consuming process, which makes the final cost of this vaccine very expensive (1). As a result, vaccines developed using recombinant DNA technology become a viable alternative. In order to induce local protective immunity, this vaccine candidates need a good adjuvant. Heat-labile enterotoxin B subunit from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* (CTB and LT_B) have been evaluated as molecular adjuvants. These non-toxic subunits are potent mucosal adjuvants, stimulating a strong systemic response and a secretory response of antibodies against co-administrated antigens (3).

The goal of this project was to construct an expression plasmid encoding the R1 region of P97 antigen, an adhesin from *M. hyopneumoniae*, fused to the heat-labile enterotoxin B subunit from *E. coli*. This fusion protein was expressed, purified and further characterized, remaining to be evaluated as a recombinant subunit vaccine in animal models.

Material and Methods

The *r1* gene sequence which is found within the *p97* gene and the gene encoding the LT-B subunit were both amplified by PCR using Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). Primers for *lt-b* and *r1* amplification were designed based on GenBank™ sequences, found under access numbers M17873 and U50901, respectively. The *lt-b* reverse primer and the *r1* forward primer were modified allowing a *Bam*HI restriction site insertion for the correct reading frame fusion of the 3' end of *lt-b* with the 5' end of *r1*. This approach allowed direct fusion of the genes after restriction digestion and ligation of the PCR products. The *lt-b* forward primer had a CACC sequence at the 5' end, which directs the cloning the fragment within pENTR/SD cloning plasmid (Gateway system - Invitrogen). After PCR amplification, both products were purified from agarose gel using GFX Gel band purification system (Amersham Biosciences), digested using *Bam*HI restriction endonuclease, purified using phenol-chloroform procedure, precipitated and fused using T4 DNA ligase enzyme (Invitrogen). A new PCR reaction using *Pfx* DNA polymerase enzyme was performed. This reaction used the *lt-b* forward and *r1* reverse primers for

amplification of the fused *ltb-r1* fragments. After *ltb-r1* cloning in pENTR/SD, a site-specific recombination reaction was performed using the LR-ClonaseTM enzyme (Invitrogen). This reaction transferred the insert from the pENTR/SD cloning vector to the pDEST42TM expression vector. *E. coli* DH5 α competent cells were transformed with the expression plasmid containing the *ltb-r1* insert to generate expression clones. The transformation was plated on LB containing 100 μ g/ml ampicillin. The construct pDEST42-LTB-R1 was extracted and used to transform BL21 SI competent *E. coli* cells, which were inoculated in 2YT-ON media and incubated in a shaker (30°C/250 rpm) until reaching log phase peak when expression of the recombinant protein was induced using NaCl 300 mM and IPTG 1 mM. At 4 h after induction the culture was centrifuged at 6000xg, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended and sonicated. The purification procedure was performed following QIAEXPRESS system (Qiagen) instructions. The recombinant protein rLTB-R1 was characterized by Western blot using anti-IgG antibody against choleric toxin from immunized rabbits (Sigma).

Results

The PCR amplification of *r1* sequence (280 bp) and *ltb* gene (320 bp) is shown in Figure 1. The PCR amplification of the fused genes *ltb-r1* resulted in a 600 bp fragment (Figure 1). The fused genes were cloned in pENTR/SD cloning vector and transferred to pDEST42 expression vector. The recombinant protein rLTB-R1 (25 kDa) was detected by Western blot using IgG antibody from rabbit immunized with choleric toxin. Two distinct bands appeared on the blot (Figure 2). The rLTB-R1 purification was performed following the QIAEXPRESS system instructions, which provided a good purification, enough to remove all BL21 (DE3) SI *E. coli* proteins (Figure 3).

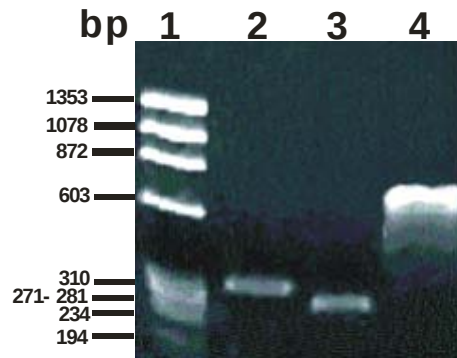


Figure 1 – 1.5% agarose gel containing the PCR products, amplified by Pfx DNA polymerase enzyme 1- ϕ X-174 molecular mass ladder; 2- *ltb*; 3- *r1*; 4- *ltb-r1*.

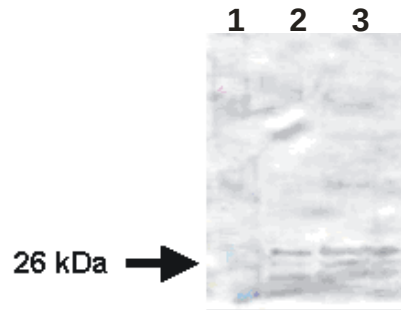


Figure 2 - Western blot demonstrating that proteins are recognized by IgG antibody from rabbit immunized with choleric toxin 1 - Prestained Ladder (Invitrogen); 2 - choleric toxin (5 μ g); 3 - rLTB-R1.

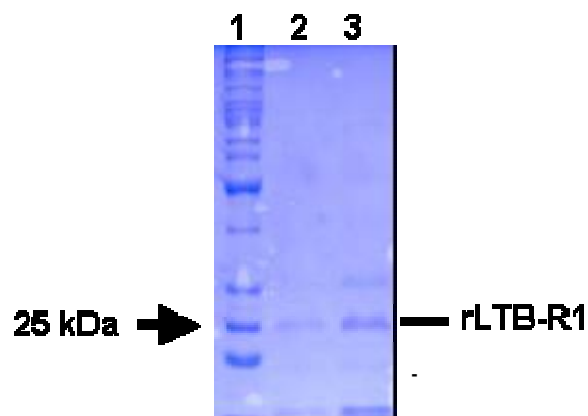


Figure 3 - 12% SDS-PAGE demonstrating the recombinant rLTB-R1 protein purification by affinity chromatography column (QIAExpress-Qiagen). 1- Protein Ladder (Invitrogen); 2- rLTB-R1 1st elution; 3- rLTB-R1 2nd elution.

Discussion

pDEST42-LTB-R1 plasmid expressed the conjugated recombinant protein fused to a 6xHistidine tag allowing affinity chromatography column purification. Western blot and SDS-PAGE revealed 2 bands, a lower band around 25 kDa, corresponding to rLTB-R1 protein and a higher band around 30 kDa. This second and higher band is thought to be protein polymerization, once heat-labile enterotoxin B subunit shows a pentameric polymerization property. Gateway system made easy and fast the expression vector construction by avoiding steps usually taken such as digestion, dephosphorylation and ligation. Moreover, inserts were always found in the correct orientation. We have described here the amplification by PCR, gene fusion, cloning and expression of rLTB-R1, a recombinant subunit vaccine that will be evaluated regarding its capacity to induce protective immunity in swine.

Bibliography

1. CHEN, J.R.; LIAO, C.W.; MAO, C.N.W; et al. A recombinant chimere 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, 347-357, 2001.
2. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; et al. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2^a ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359, 1999.
3. VERWEIJ, W.R.; HAAN, L.; HOLTROP, M.; et al. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: Induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. **Vaccine**, 16, 3476-3482, 1998.

4 TRABALHO 3

**CONSTRUCTION, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE
IMMUNOGENICITY OF rLTBR1: A RECOMBINANT CHIMERA COMPOSED
OF R1 REPEAT REGION OF *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 ADHESIN
WITH *Escherichia coli* HEAT-LABILE ENTEROTOXIN B SUBUNIT**

Fabricio Rochedo Conceição^{1, 2}; Ângela Nunes Moreira^{1, 2}; André Michelin^{1, 3};
Odir Antônio Dellagostin^{1, 4, *}

¹Centro de Biotecnologia, ²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, ³Programa de Pós-Graduação em Veterinária–Faculdade de Veterinária, ⁴Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010-900, Pelotas, Brasil. *Corresponding author. Mailing address: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010-900, Pelotas, Brasil. Phone: +55 53 275 7350. Fax: +55 53 275 7551. E-mail: odirad@terra.com.br

ABSTRACT

Swine Mycoplasmal Pneumonia (SMP), caused by fastidious bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*, is the most important respiratory disease in swine breeding. The commonly used vaccines to control this disease consist of bacterins, whose production cost is high and the efficiency is limited. The objective of this study was to develop and to evaluate in BALB/c mice a new alternative for controlling SMP, based on a recombinant subunit vaccine (rLTBR1) containing the R1 region of P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* (R1) fused to the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* (LTB). rLTBR1 formed functional oligomers that presented high affinity to GM1 ganglioside. Mice inoculated with rLTBR1 (IN or IM) produced high levels of anti-R1 systemic and mucosal (sIgA) antibodies, which recognized the native P97. On the other hand, mice inoculated with the commercial bacterin did not produce anti-R1 antibodies. The administration route influenced the modulation of the immune response by LTB, showing that IM rLTBR1 induced Th2-biased immune responses and IN rLTBR1 induced

Th1-biased immune responses. IN rLTBR1 also induced IFN- γ secretion by lymphocytes. The rLTB showed to be a powerful mucosal adjuvant, stimulating the production of anti-R1 IgA in trachea and bronchi from mice inoculated with rLTBR1 by parenteral route (IM). rLTBR1 may constitute a new strategy for preventing infection by *Mycoplasma hyopneumoniae* and may have potential for developing vaccines against other infectious diseases as well.

INTRODUCTION

Swine Mycoplasmal Pneumonia (SMP), caused by fastidious bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*, is present in all countries of the world where a significant swine industry exists. The very high prevalence, coupled with associated losses, makes this respiratory disease the most important in swine breeding. Pigs with primary mycoplasmal infection are predisposed to potentially fatal secondary invaders such as *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, resulting in poor food conversion, retarded growth and even higher mortality (37). This disease is responsible for estimated losses to the swine industry of more than \$200 million per year.

Vaccination appears to be a more effective means of either eradicating or controlling the infection than antibiotics (21, 27). The commonly used vaccines to SMP control consist of killed bacterial cells (bacterins). However, growth of *M. hyopneumoniae* in vitro requires a rich medium, and it is a time consuming process, which makes the final cost of this vaccine very expensive (7, 17). Moreover, efforts to develop effective and safe vaccines against mycoplasmas have been partially successful (8). As a result, vaccines developed using recombinant DNA technology become a viable alternative. Following the discovery of bacterial adhesins, the development of a bacterial adhesin vaccine through recombinant techniques has been considered (7, 22). Adherence of *M. hyopneumoniae* to the swine cilia is mediated by R1 repeat region (AAKPV-E) of the P97 adhesin (32), which is recognized by monoclonal antibody (MAb) F1B6 (19). This MAb blocked *M. hyopneumoniae* adherence to porcine cilia in the in vitro adherence assay (52), suggesting the importance of the P97 in disease pathogenesis. P97 adhesin is an immunodominant antigen able to

trigger early specific antibody responses in pigs following initial infection with *M. hyopneumoniae* (24, 53). Moreover, it was reported that the convalescent-phase swine sera also recognize the R1 repeat structure (32). Cilium adhesion is a critical component of the *M. hyopneumoniae* virulence repertoire (15).

M. hyopneumoniae initiate disease following interaction with the mucosal surface lining the respiratory tract. The primary defense of this tissue is the mucosal immune system. Mucosal immune responses are characterized by the production of secretory immunoglobulin type A (sIgA). This immunoglobulin prevents the interaction of the pathogens with receptors on the mucosal cell surface. The induction of peripheral immune responses by parenteral immunization does not result in significant mucosal immunity (sIgA); however, mucosal immunization is capable of inducing protective immunity in both external secretions and peripheral immune compartments (29). Heat-labile enterotoxin B subunit from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* (CTB and LTB, respectively) have been evaluated as molecular adjuvants (41). These non-toxic subunits are potent mucosal adjuvants (41, 46, 51), stimulating a strong systemic response and a secretory response of antibodies against coadministered or coupled antigens. LTB is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the CTB (31, 50). LTB forms a pentamer arranged in a cylinder-like structure, with a central cavity that exposes five symmetrical cavities that are responsible for binding to the cell-surface receptor, the GM1 ganglioside (42). Adjuvanticity of LTB was found to be directly related to GM1 ganglioside-binding activity (12, 13). Recombinant LTB fused with recombinant antigens may represent an alternative in development of mucosal vaccines. Protective immunity in mice against respiratory syncytial virus (35), ocular herpes simplex virus type-1 (36), group A *Streptococcus* (9) and *Helicobacter pylori* (48), was reported using recombinant LTB or CTB as mucosal adjuvant. If high anti-R1 IgA levels could be produced at the swine respiratory surface, protection against colonization of the *M. hyopneumoniae* might be possible.

The objective of this study was to develop and to evaluate a new alternative for controlling SMP, based on a recombinant subunit vaccine (rLTBR1) containing the R1 repeat region of P97 adhesin of *M. hyopneumoniae*

(R1) fused to the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *E. coli* (LTB). The local, systemic and cellular immunity of mice inoculated with rLTBR1 was estimated.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

The MAb F1B6 (anti-R1) was obtained from Dr. Eileen Thacker (Iowa State University, Ames, IA, USA) and has been previously characterized (53). Swine serum positive for *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 strain was obtained from Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA - EMBRAPA, Concórdia, Brasil). Mouse monoclonal antibody isotyping reagents, bovine ganglioside GM1, LPS of *E. coli*, cholera toxin, rabbit IgG anti-cholera toxin, goat IgG anti-rabbit IgG peroxidase conjugated, rabbit IgG anti-goat IgG peroxidase conjugated, MAb anti-6XHis alkaline phosphatase conjugated, goat IgG anti-mouse Igs peroxidase, rabbit IgG anti-swine Igs peroxidase conjugated and rabbit IgG anti-mouse IgA peroxidase conjugated were obtained from Sigma (USA). Reagents for sequencing were obtained from Amersham Biosciences (USA) and the BD OptEIA™ Mouse IL-4 and IFN- γ ELISA Kit from BD Biosciences Pharmingen (USA).

Strains and DNA extraction

The genomic DNA from *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 strain, isolated from swine with mycoplasmal pneumonia and gently provided by CNPISA, was prepared according to the method of Sambrook and Russel (38). This strain had the entire genome sequenced by Genoma Sul project (www.genesul.Incc.br). Enterotoxigenic *E. coli* (EEC) strain, isolated from swine with diarrhea, was obtained from Centro de Biotecnologia, UFPel (Pelotas, Brasil). Genomic DNA was obtained from an EEC suspension cultured in Luria-Bertani (LB) medium during overnight incubation in shaker (37°C, 250 rpm). After incubation, the bacterial suspension was heated at 100°C for 5 min, centrifuged at 14,000 x g for 1 min and the supernatant was collected and stored at -20°C.

PCR, *ltbr1* fusion and cloning of the *ltbr1* and *r1* in pENTR/SD vector

The R1 sequence of *p97* gene (*r1*) and *E. coli* heat-labile enterotoxin subunit B gene (*eltb*) were amplified by PCR using Perkin-Elmer 2400 thermocycler, with the following program: 95°C/5 min followed by 30 cycles of 95°C/30 sec, 50°C/30 sec and 68°C/30 sec, with a final extension of 68°C/7 min. The reactions were performed in final volume of 25 µl containing 2.5 µl of 10x buffer, 0.5 µl of 10 mM dNTP, 150 ng of each primer, 0.5 µl (1 unit) of Platinum® *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen), 0.5 µl of 50 mM MgSO₄, 18 µl of Milli-Q water and 2 µl of template DNA. Primers for *ltb* and *r1* amplification were designed based on GenBank™ sequences, found under access numbers M17873 and U50901, respectively. The following primers were used in this study: R1 forward 5' CACCATGGGGATCCCTACAAAAGAAG; R1 Reverse 5' GCCAAGCTTAGTAGCAACTGGT; LTB Forward 5' CACCATGGCTCCCCAGACTATTACA and LTB reverse 5' CTGGATCCCCATACTGATTGC. The LTB reverse primer and the R1 forward primer were modified allowing a *Bam*HI restriction site insertion for the correct reading frame fusion of the 3' end of *ltb* with the 5' end of *r1*. This approach allowed direct fusion of the genes after restriction digestion and ligation of the PCR products. The LTB and R1 forward primers had a CACC sequence at the 5' end, which directs the cloning of the fragment within pENTR/SD cloning plasmid (Gateway system - Invitrogen). After PCR amplification, both products were purified from agarose gel using GFX Gel band purification system (Amershan Biosciences), digested using *Bam*HI restriction endonuclease, purified using phenol-chloroform procedure, precipitated and fused using T4 DNA ligase enzyme (Invitrogen). A new PCR reaction using *Pfx* DNA polymerase was performed. This reaction used the LTB forward and R1 reverse primers for amplification of the fused *ltbr1* fragments. The *ltbr1* and *r1* genes were cloned in pENTR/SD vector following the manufacturer's instructions (Gateway system, Invitrogen). *E. coli* TOP 10 competent cells were transformed by electroporation with the ligation product and the recombinant clones were selected in LB medium containing 50 µg/ml of kanamycin. pENTR/SD-*ltbr1* and pENTR/SD-*r1* plasmids were extracted by alkaline lyses and characterized by

PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing using the M13 universal primer.

Expression and purification of the rLTBR1 and rR1 proteins

After *ltbr1* and *r1* cloning in pENTR/SD, a site-specific recombination reaction was performed using the LR-ClonaseTM enzyme, following manufacturer's instructions (Gateway System, Invitrogen). This reaction transferred the inserts from the pENTR/SD cloning vector to the pETDEST42TM expression vector (Invitrogen). *E. coli* DH5 α competent cells were transformed with the expression plasmids containing the *ltbr1* and *r1* inserts to generate expression clones. The transformation was plated on LB containing 100 μ g/ml ampicillin. pETDEST42-*ltbr1* and pETDEST42-*r1* were extracted and characterized by PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing. *E. coli* BL21(DE3)SI competent cells were transformed by heat shock with the expression plasmids. One recombinant clone of each plasmid was used to inoculate 50 ml of 2YT-ON medium containing 100 μ g/ml ampicillin and overnight cultured in shaker (37°C, 250 rpm). About 25 ml of this culture were used to inoculate 1 L of 2YT-ON medium containing 100 μ g/ml ampicillin, which was incubated in shaker (37°C, 250 rpm) until DO₆₀₀=0.6. At this moment, the expression of the recombinant proteins was induced with 300 mM of NaCl plus 1 mM of isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) for 3 h. After this period, the culture was centrifuged at 4,000 x g for 20 min. The pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 15 mM imidazole and 1 mg/ml of lysozyme) and sonicated. RNase (10 μ g/ml) and DNase I (5 μ g/ml) were added to the lysate, which was incubated in ice for 30 min. After centrifugation at 10,000 x g for 30 min, the supernatant was collected and mixed with Ni-NTA 50% for 1 h. rLTBR1 and rR1 were purified by Ni-NTA affinity chromatography following manufacturer's instructions of the QIAExpress kit (QIAGEN). The purity of the recombinant proteins was assessed by SDS-PAGE according to the method of Laemmli (24) and the concentration was measured by the Bradford method.

Characterization of the rLTBR1 and rR1 proteins by Western blot analysis

After 12% SDS-PAGE of the rLTBR1 (5 µg), rR1 (5 µg) and negative controls, the characterization was performed by Western blot with F1B6 MAb, anti-6XHis alkaline phosphatase conjugated MAb, rabbit IgG anti-cholera toxin and swine serum positive for the *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 pathogenic strain. rLTBR1 non-heated was also characterized to investigate a possible polymerization of this protein. Following blocking with 5% nonfat dry milk, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with 1:4000 F1B6 MAb, 1:3000 rabbit IgG anti-cholera toxin or 1:10 swine serum. After three PBS-T (0.05% Tween 20) washes, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with 1:2000 goat IgG anti-mouse Igs peroxidase conjugated, 1:1000 MAb anti-6XHis alkaline phosphatase conjugated, 1:3000 goat IgG anti-rabbit IgG peroxidase conjugated or 1:2000 rabbit IgG anti-swine Igs peroxidase conjugated. The reactions with peroxidase and alkaline phosphatase were revealed with 3-4-cloronaftol and CDP-star detection reagent, respectively (Amersham Biosciences), after five PBS-T washes. BenchmarkTM Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen) was used as molecular mass standard.

GM1- ELISA

The affinity of the rLTBR1 for GM1 ganglioside was determined by ELISA (26). Briefly, polystyrene plate (Poly-Sorp, Nunc) was coated overnight at 4°C with 400 ng/well of bovine GM1 diluted in carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6. Following blocking in 5% nonfat dry milk, 200 ng/well of rLTBR1 or CT were incubated for 1 h at room temperature. After three PBS-T washes, the plate was incubated for 1 h at room temperature with 1:3000 F1B6 MAb or 1:4000 rabbit IgG anti-cholera toxin. After three PBS-T washes, the plate was incubated for 1 h at room temperature with 1:2000 goat IgG anti-mouse Igs peroxidase conjugated or 1:4000 goat IgG anti-rabbit IgG peroxidase conjugated. The reactions were revealed with o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) and hydrogen peroxide, after five PBS-T washes. OD₄₅₀ was measured in a Dynatech MR 700 ELISA reader (Dynatech Labs. Inc., Chantilly, VA, USA) 10 min later. Wells without GM1 or rLTBR1 were used as control.

Immunization and sampling

Six to eight week-old (day 0) BALB/c female mice were individually identified and segregated in six groups of four animals. Group one was intranasally (IN) inoculated with 20 µg of rLTBR1 at days 0, 15 and 30, totalizing 60 µg of rLTBR1. Group two was IN inoculated with 9 µg of rR1 at days 0, 15 and 30, totalizing 27 µg of rR1 (quantity of rR1 present in 60 µg of rLTBR1). Group three was intramuscularly (IM) inoculated with 1/20 of the swine dose of a commercial bacterin against SMP at days 0 and 15. Group four was IN inoculated with 9 µg of CT at days 0, 15 and 30, totalizing 27 µg of CT (quantity of rLTB present in 60 µg of rLTBR1). Group five was IN inoculated with 30 µl of PBS at days 0, 15 and 30. Group six was IM inoculated with 20 µg of rLTBR1 at days 0, 15 and 30, totalizing 60 µg of rLTBR1. The IN inoculation was performed without anesthesia, with a volume of 15 µl/nare, totalizing 30 µl/animal, using a micropipette. Blood samples were collected from the retro-orbital sinus at 0, 15, 30, 45 and 60 days post inoculation (DPI). The sera were processed and stored at -20°C. At day 60, the mice were euthanized and submitted to a tracheobronchic washing following De Haan et al. (11), for the detection of anti-rR1 IgA, and splenectomy following Bastos et al. (2), for the quantification of IL-4 and IFN-γ. The tracheobronchic washes and the supernatants of the stimulated splenocytes were stored at -20°C. This vaccine assay was repeated twice in different occasions.

Systemic and local humoral immunity

Seroconversions of systemic antibodies and the detection of anti-R1 IgA in trachea and bronchi, as well as the seroconversions of anti-LTB systemic antibodies were determined by ELISA. Briefly, polystyrene plates (Maxi-Sorp, Nunc) were coated overnight at 4°C with 400 ng/well of rR1 or CT diluted in carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6. After three PBS-T washes, 50 µl of the sera 1:20 diluted or 50 µl of the tracheobronchic washes, in triplicate, were incubated at 37°C for 1 h. 1:2000 Goat IgG anti-mouse IgG peroxidase conjugated or 1:1000 rabbit IgG anti-mouse IgA peroxidase conjugated were incubated at 37°C for 1 h, after three PBS-T washes. The reactions were

revealed with o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma) and hydrogen peroxide, after five PBS-T washes. OD₄₅₀ were measured in a Dynatech MR 700 ELISA reader (Dynatech Labs. Inc., Chantilly, VA, USA) 10 min later. To avoid plate differences, the actual absorbances were transformed into seroconversions dividing them by that of day 0 of the serum from the same animal.

Anti-R1 IgG1 and IgG2a seroconversions from mice inoculated with IM or IN rLTBR1 were determined by ELISA using plates coated overnight at 4°C with 400 ng/well of rR1 diluted in carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 and sera pool diluted 1:10. Isotype was determined using the mouse monoclonal antibody isotyping reagents (Sigma), following manufacturer's instructions. IgG1/IgG2a mean ratio at 15, 30, 45 and 60 days was determined.

Pool of sera at 0 and 45 DPI of mice inoculated with IM rLTBR1, commercial bacterin and PBS was analyzed by Western blot. Whole cells of *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 strain or CT were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to PVDF membrane (Amersham Biosciences). Following blocking in 5% nonfat dry milk, the pool of sera diluted 1:25 was incubated at room temperature for 1 h. After five PBS-T washes, the membrane was incubated at room temperature for 1 h with 1:2000 goat IgG anti-mouse Igs peroxidase conjugated. The reaction was revealed with 3-4-chloronaphtol after five PBS-T washes. BenchmarkTM Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen) was used as molecular mass standard.

Cellular immunity

For evaluation of cellular immunity, splenocytes from mice inoculated with rLTBR1, PBS or CT were isolated and assayed by ELISA to detect production of IL-4 and IFN- γ . Mice were euthanized at day 60 and their spleens were aseptically removed. Splenocytes were processed and plated following Bastos et al. (2). The stimulation was performed with 10 or 20 μ g/ml of rR1 or 10 μ g/ml of LPS (Sigma) for 72 h. After incubation, supernatants were collected and the production of IL-4 and IFN- γ was determined using a commercial ELISA kit following manufacturer's instructions (Pharmingen).

Statistical analysis

Means of seroconversions (systemic immunity), means of absorbances (local immunity and GM1-ELISA) and means of concentrations of IL-4 and IFN- γ of each group were subjected to analysis of variance. The Student's *t* test was used to determine significant differences ($p < 0.05$) among the means of each group through the Statistix software.

RESULTS

PCR and sequencing of *Itbr1* and *r1* genes

PCR amplification of *r1* sequence (280 bp), *eltb* gene (320 bp) and *Itbr1* fused gene (600 bp) is shown in Figure 1. The *r1* sequence was inserted downstream of *eltb* gene. pETDEST42-*Itbr1* and pETDEST42-*r1* expression plasmids were sequenced and the *r1* was found to contain 10 copies of the 5-amino acid tandem repeats (AAKPV-E). Sequencing of the *Itbr1* gene showed 100% of identity with *eltb* gene and *r1* region of the *p97* gene.

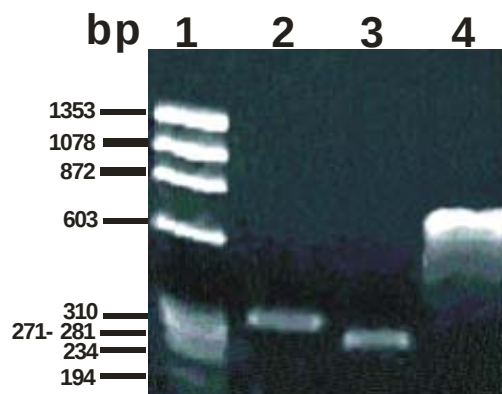


Figure 1. 1.5% agarose gel containing the PCR products amplified by Pfx DNA polymerase enzyme. 1, ϕ X-174 molecular mass ladder (Invitrogen); 2, *Itb*; 3, *r1*; 4, *Itbr1* fusion gene.

Expression and purification of the rLTBR1 and rR1

E. coli BL21(DE3)SI transformed with the expression plasmid pETDEST42-*Itbr1* expressed recombinant proteins of approximately 25 and 30 kDa. *E. coli* BL21(DE3)SI transformed with the expression plasmid pETDEST42-*r1* expressed recombinant proteins of approximately 14, 16, 18

and 19 kDa. Molecular mass for the rLTBR1 and rR1 estimated by Vector NTI 8 software was, respectively, 25 and 14 kDa. Production of rLTBR1 and rR1 was approximately 10 mg per liter of medium. When *E. coli* BL21(DE3)SI transformed with the expression plasmids was induced with 300 mM of NaCl, plus 1 mM of IPTG, expression of the recombinant proteins was higher than when induced only with 300 mM of NaCl (data not shown). pDEST42 has the Lac operator downstream of the T7 promoter. The expression of the rLTBR1 and rR1 in *E. coli* BL21(DE3)pLysS was low (data not shown). There was no basal expression of the recombinant proteins in the non-induced cultures.

rLTBR1 and rR1 were purified by Ni-NTA affinity chromatography. A high degree of purity of these recombinant proteins was obtained, as shown in Figure 2. In this figure we can see the bands of 25 and 30 kDa corresponding to rLTBR1 (lane 3), as well as their oligomers when non-heated (lane 2) and the bands of 14, 16, 18 and 19 kDa corresponding to rR1 (lane 5). The same pattern of bands was obtained in different experiments, suggesting a posttranslational modification.

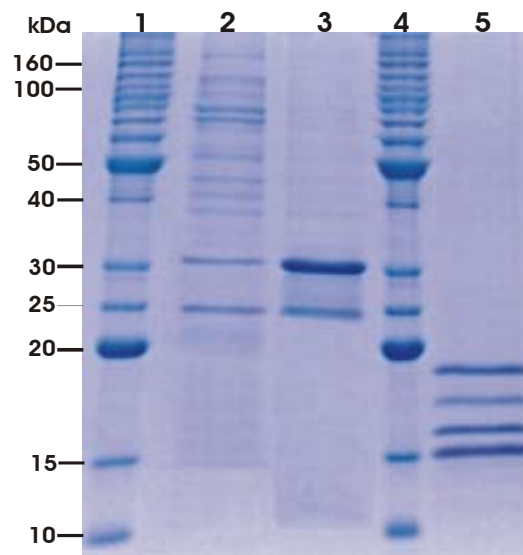


Figure 2. 12% SDS-PAGE of the purification of rLTBR1 and R1 by Ni-NTA affinity chromatography. 1 and 4, Benchmark protein ladder; 2 rLTBR1 non-heated; 3, rLTBR1 heated (95°C/10 min); 5, rR1.

Characterization of the rLTBR1 and rR1 by Western blot analysis

rLTBR1 and rR1 were recognized by different antibodies in Western blot analysis (Figure 3), showing their antigenicity. Interestingly, the hypothetical posttranslational modification of the rLTBR1 and rR1 was also confirmed by Western blot analysis. Bands of 25 and 30 kDa corresponding to rLTBR1 and bands of 14, 16, 18 and 19 kDa corresponding to rR1 were detected with different antibodies. rLTBR1 was recognized by MAb anti-6XHis (data not shown), rabbit IgG anti-cholera toxin (Fig. 3A, lane 3), MAb F1B6 (Fig. 3B, lane 2) and swine serum positive for *M. hyopneumoniae* 7448 strain (Fig. 3C, lane 3), showing that the fusion of the proteins and of the His-tag did not change the epitopes recognized by these antibodies. An important result was the recognition of the rLTBR1 by swine serum, indicating that there was no modification in the conformation of the R1 antigen when expressed in *E. coli*. The same antibodies detected bands higher than 30 kDa in the non-heated rLTBR1 (black arrows in Fig. 3A, lane 2, Fig. 3B, lane 3 and Fig. 3C, lane 4), suggesting that the fusion of the R1 in the C terminal of the LTB did not impair the formation of oligomers of rLTBR1. rR1 was recognized by MAb anti-6XHis (data not shown), MAb F1B6 (Fig. 3B, lane 6) and swine serum (data not shown), but it was not recognized by rabbit IgG anti-cholera toxin (Fig. 3A, lane 4). CT was not recognized by F1B6 (Fig. 3B, lane 4). *E. coli* BL21(DE3)SI extract was not recognized by any antibody (Fig. 3A, lane 5, Fig. 3B, lane 5 and Fig. 3C, lane 5).

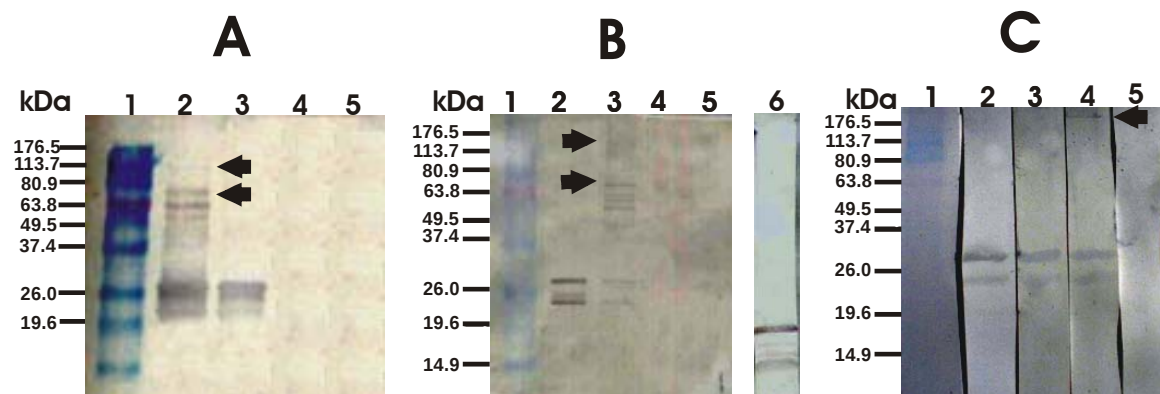


Figure 3. Western blot analysis of rLTBR1 and rR1 purified by Ni-NTA affinity chromatography. (A) rabbit IgG anti-cholera toxin. 1, Benchmarker pre-stained ladder (Invitrogen); 2, non-heated rLTBR1; 3, heated rLTBR1; 4, rR1; 5, *E. coli* BL21(DE3)SI extract. (B) F1B6 MAb (anti-R1). 1,

Benchmark pre-stained ladder; 2, heated rLTBR1; 3, non-heated rLTBR1; 4, CT; 5, *E. coli* BL21(DE3)SI extract; 6, rR1. (C) swine serum positive for *Mycoplasma hyopneumoniae* 7448 pathogenic strain. 1, Benchmark pre-stained ladder; 2, rLTBR1 with F1B6; 3, heated rLTBR1; 4, non-heated rLTBR1; 5, *E. coli* BL21(DE3)SI extract. Black arrows indicate the oligomers of rLTBR1.

GM1-ELISA

Purified rLTBR1 produced in *E. coli* was also tested for its biological activity by studies on its ability to bind to GM1 ganglioside in ELISA experiments. rLTBR1 revealed GM1 ganglioside binding capacity comparable to that of commercially available cholera toxin (Figure 4). Mean absorbance of the rLTBR1 with GM1 was 3 times higher than without GM1 ($p < 0.01$), showing that the fusion of the R1 in the C terminal of the LTB did not impair the biological activity of this ligand. These results also suggest that the rLTBR1 formed active pentamers. Mean absorbance of the CT with GM1 was 5 times higher than without GM1 ($p < 0.01$). Note that the reagents used to study binding of the rLTBR1 and CT to GM1 were different.

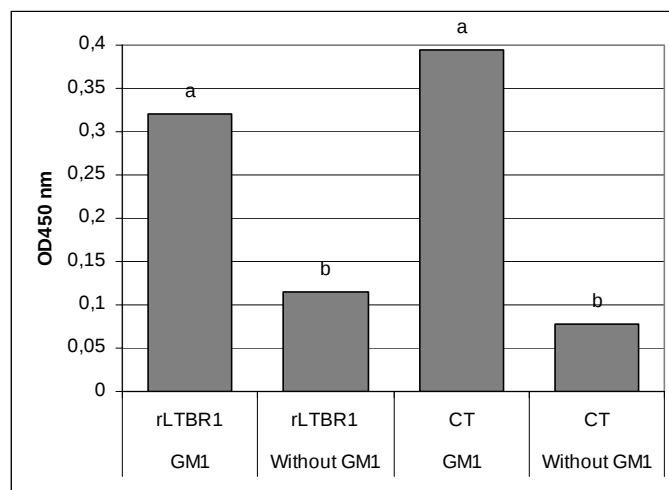


Figure 4. Binding of the rLTBR1 by ganglioside GM1 determined by ELISA. Plate was coated with GM1 and blocked with 5% nonfat dry milk. Wells without GM1 were used as negative controls. After incubation of 200 ng of rLTBR1 or cholera toxin (CT), the reactions were performed with MAb F1B6 or IgG rabbit anti-CT. Goat IgG anti-mouse Igs peroxidase conjugated or goat IgG anti-rabbit IgG peroxidase conjugated were added and the reactions were revealed with OPD. Different letters indicate significant statistical difference ($p < 0.05$).

Systemic humoral immunity

Figure 5 shows the seroconversions of anti-R1 systemic antibodies of the experimental groups. Both groups inoculated with rLTBR1 (IN and IM) produced antibodies against the R1 region of the P97 adhesin of *M. hyopneumoniae* ($p < 0.05$ compared with other groups), showing the rLTBR1 was immunogenic for mice. Group inoculated with IM rLTBR1 produced a seroconversion of almost 12 times at days 30, 45 and 60 ($p < 0.05$). Group inoculated with IN rLTBR1 produced a seroconversion of 5.2 times at day 45 and 4.7 times at day 60 ($p < 0.05$). At day 45 the group inoculated with IM rLTBR1 produced a seroconversion 2.4 times higher than the group inoculated with IN rLTBR1. To the IM rLTBR1 group, two doses of rLTBR1 (40 μg) were enough for the mice to achieve the peak of anti-R1 antibodies, while IN rLTBR1 group had a significant increase in antibody production after three doses (60 μg). Production of anti-R1 systemic antibodies by mice inoculated with IN rLTBR1 highlights the potential of the rLTB as a mucosal adjuvant. Anti-R1 antibodies were not detected in the groups inoculated with commercial bacterin, rR1, CT or PBS.

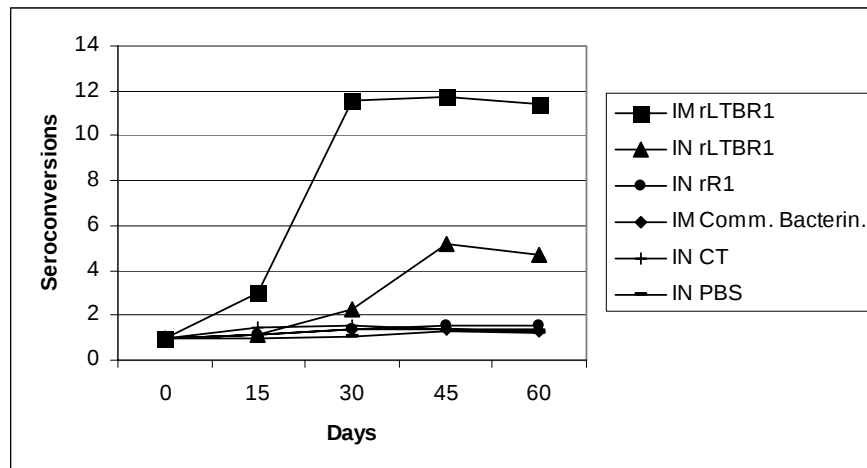


Figure 5. Seroconversions of anti-R1 systemic antibodies determined by ELISA from mice inoculated with IM rLTBR1, IN rLTBR1, IN rR1, IM commercial bacterin, IN CT or IN PBS. Plates were coated overnight at 4°C with 400 ng/well of rR1. Fifty microliters of the sera 1:20 diluted, in triplicate, were incubated at 37°C for 1 h. Goat IgG anti-mouse Igs peroxidase

conjugated was added and the reactions were revealed with OPD. Mice were inoculated at 0, 15 and 30 days, exception to commercial bacterin group (0 and 15 days).

Figure 6 shows the seroconversions of anti-R1 IgG1 and IgG2a by mice inoculated with IM or IN rLTBR1. IgG1/IgG2a mean ratio for the IM group was 1.2, compared with 0.64 for the IN group. These results suggest that IM rLTBR1 induced Th2-biased immune responses and IN rLTBR1 induced Th1-biased immune responses. The administration route influenced the modulation of the immune response by LTB.

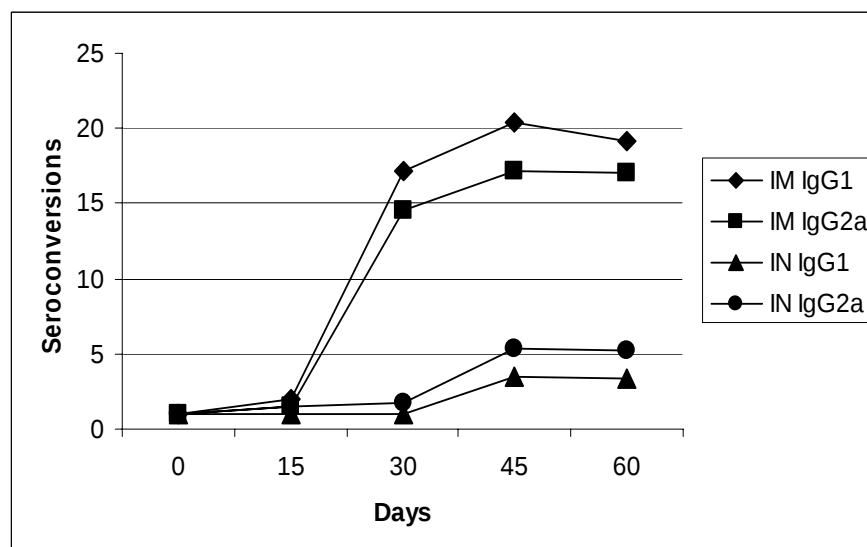


Figure 6. Isotyping of anti-R1 systemic antibodies determined by ELISA from mice inoculated with IM rLTBR1 or IN rLTBR1. Plate was coated overnight at 4°C with 400 ng/well of rR1. Fifty microliters of the pool sera diluted 1:10, in duplicate, were incubated at 37°C for 1 h. Goat IgG anti-mouse isotypes were added. After incubation of rabbit IgG anti-goat IgG peroxidase conjugated, the reactions were revealed with OPD.

Western blot analysis (Figure 7) showed that the pooled sera (at day 45) from mice inoculated with IM rLTBR1 (lane 3) recognized the P97 adhesin of the *M. hyopneumoniae* 7448 pathogenic strain and the products derived from its proteolytic processing (15). The same pooled sera also recognized the rLTBR1 and rR1 in Western blot analysis, showing similar band pattern to that found with the MAbs F1B6 and anti-6XHis (Fig. 3), with bands of 25 and 30 kDa for

rLTBR1 and 14, 16, 18 and 19 kDa for rR1 (data not shown). Sera from mice (at day 45) inoculated with commercial bacterin recognized several antigens of the 7448 strain, but did not recognize the P97 adhesin (lane 5). Sera from mice inoculated with PBS did not recognize any antigen of the 7448 strain (lanes 6 and 7). MAb F1B6 also recognized the P97 adhesin of the *M. hyopneumoniae* 7448 pathogenic strain and the products derived from its proteolytic processing (lane 8). The results from ELISA and Western blot indicate that the commercial bacterin did not induce detectable levels of anti-P97 systemic antibodies.

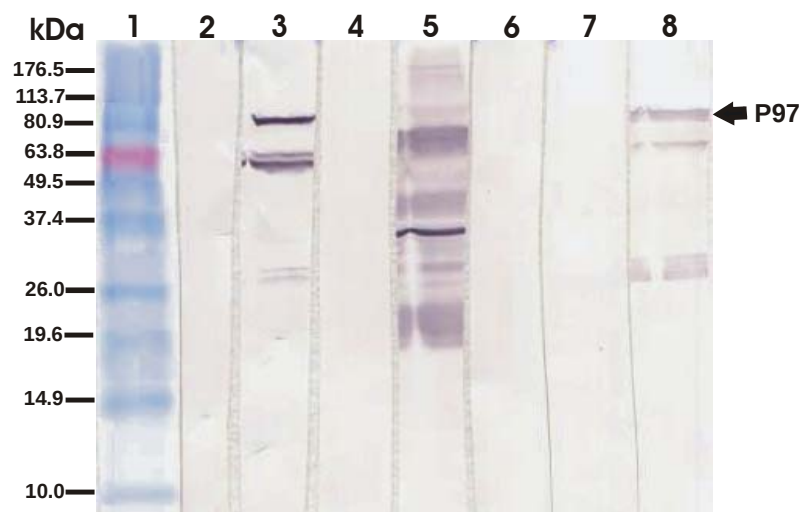


Figure 7. Western blot analysis of the pool sera from mice inoculated with IM rLTBR1, commercial bacterin and PBS against total antigens of *M. hyopneumoniae* 7448 pathogenic strain. 1, Benchmarker pre-stained ladder; 2, pooled sera at day 0 from mice inoculated with IM rLTBR1; 3, pooled sera at day 45 from mice inoculated with IM rLTBR1; 4, pooled sera at day 0 from mice inoculated with commercial bacterin; 5, pooled sera at day 45 from mice inoculated with commercial bacterin; 6, pooled sera at day 0 from mice inoculated with PBS; 7, pooled sera at day 45 from mice inoculated with PBS; 8, MAb F1B6.

Figure 8 shows the seroconversions of anti-LTB systemic antibodies of mice inoculated with IM rLTBR1, IN rLTBR1 or IN PBS. Both groups inoculated with rLTBR1 produced significant levels of anti-LTB systemic antibodies at 30, 45 and 60 days compared to the PBS group ($p < 0.05$). The group inoculated with IN rLTBR1 produced a seroconversion of 1.85 at day 45 (peak) and the group inoculated with IM rLTBR1 produced a seroconversion of 2.2. This result showed that the fusion of the R1 at the C terminal of the LTBR1 did not impair the

antigenicity and immunogenicity of the LTB. Only the sera from mice inoculated at day 45 with rLTBR1 recognized the B subunit of the CT (11.6 kDa) in Western blot (data not shown).

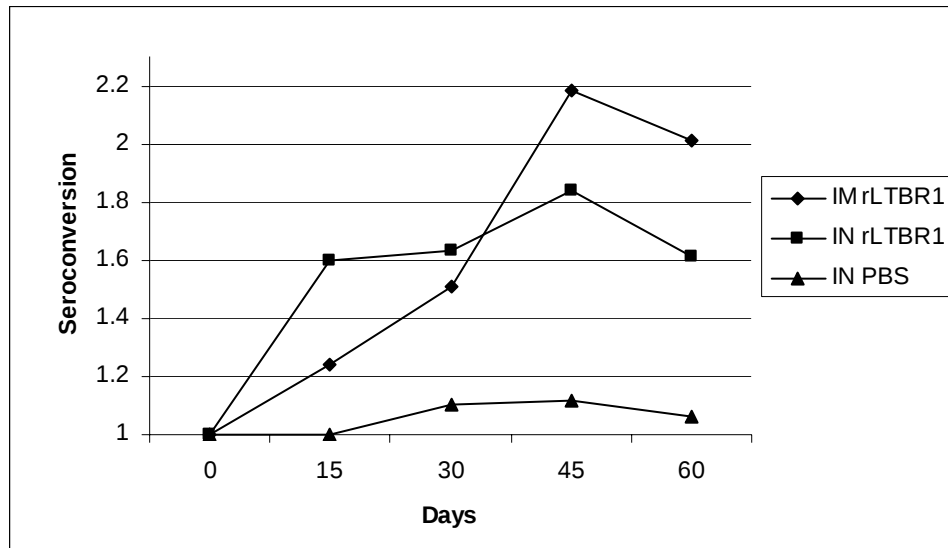


Figure 8. Seroconversions of anti-LTB systemic antibodies determined by ELISA from mice inoculated with IN rLTBR1, IM rLTBR1 or PBS. Plates were coated overnight at 4°C with 400 ng/well of CT. Fifty microliters of the sera diluted 1:20, in triplicate, were incubated at 37°C for 1 h. Goat IgG anti-mouse Igs peroxidase conjugated was added and the reactions were revealed with OPD. Mice were inoculated at 0, 15 and 30 days.

Local humoral immunity

Concentrations of anti-R1 IgA in the tracheobronchic washes of mice are shown in Figure 9. Both groups inoculated with rLTBR1 (IN and IM) produced anti-R1 IgA ($p < 0.01$ compared to other groups), showing that rLTB is a potent mucosal adjuvant, even when it was administered by the IM route. Anti-R1 IgA was not detected in the groups inoculated with commercial bacterin, rR1, CT or PBS.

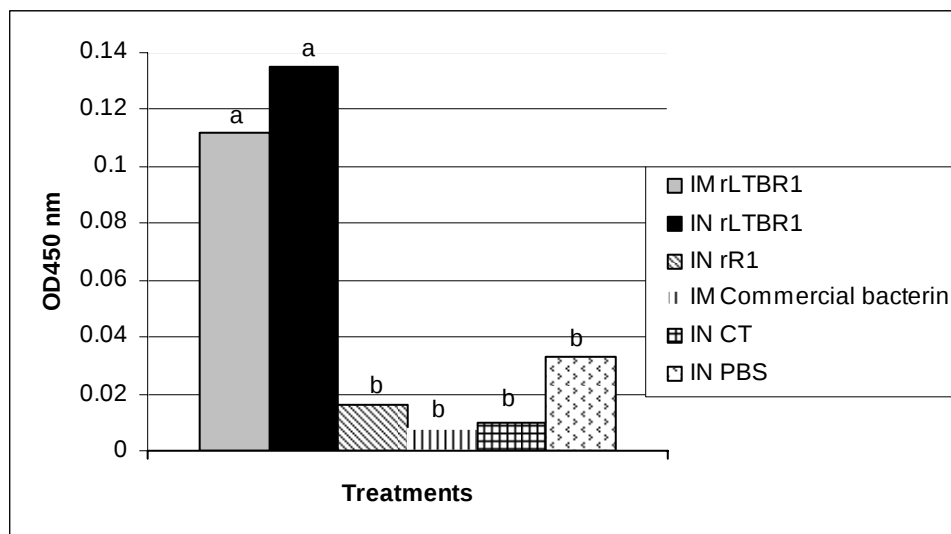


Figure 9. Detection of anti-R1 IgA in trachea and bronchi from mice inoculated with IM rLTBR1, IN rLTBR1, IN rR1, IM commercial bacterin, IN CT and IN PBS. Mice were euthanized at day 60 and tracheobronchic washes were performed. Plates were coated overnight at 4°C with 400 ng/well of rR1. Fifty microliters of tracheobronchic washes, in triplicate, were incubated at 37°C for 1 h. Rabbit IgG anti-mouse IgA peroxidase conjugated was added and the reactions were revealed with OPD. Mice were inoculated at 0, 15 and 30 days, exception to commercial bacterin group (0 and 15 days).

Cellular immunity

Figure 10 shows the quantification of IFN- γ in the supernatant of splenocytes from mice inoculated with rLTBR1, PBS and CT upon in vitro stimulation with rR1 or LPS. Only the group inoculated with IN rLTBR1 produced IFN- γ when stimulated with rR1. The concentration of the stimulant was directly proportional the IFN- γ concentration, since the splenocytes stimulated with 20 μ g/ml of rR1 produced approximately 160 pg/ml of IFN- γ , while those stimulated with 10 μ g/ml of rR1 90 pg/ml. These results show that the local administration of rLTBR1 induced cellular immunity in mice. IFN- γ production was not detected in the IM rLTBR1, PBS and CT groups when the splenocytes were stimulated with rR1, however those splenocytes produced around 78 pg/ml of IFN- γ when stimulated with 10 μ g/ml of LPS. IL-4 production was not detected in rLTBR1, PBS and CT groups neither in the controls (LPS), suggesting a failure of the quantification kit.

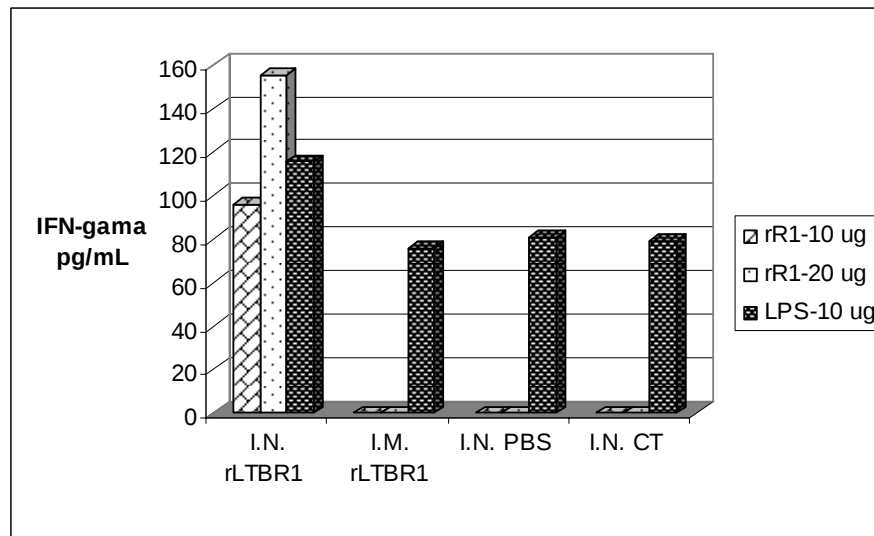


Figure 10. Quantification of IFN- γ in mice inoculated with rLTBR1, PBS or CT. Splenocytes were isolated at day 60, processed, stimulated with 10 or 20 μ g/ml of rR1 or 10 μ g/ml of LPS (Sigma) for 72 h and the supernatant assayed by ELISA.

DISCUSSION

The initial event in *M. hyopneumoniae* colonization of swine is its adherence to the cilia of the respiratory tract epithelial cells, which is mediated by R1 repeat region of the P97 adhesin (32). This is followed by an extensive loss of cilia from the epithelial cells of the trachea, bronchi and bronchioles (10), predisposing the swine to secondary infections. A previous report indicated that some *M. hyopneumoniae* commercial vaccines (bacterins) can provide protection for pigs against experimental *M. hyopneumoniae* challenge, but cannot completely eliminate pneumonia or significantly reduce the colonization of the microorganism (44). Moreover, the final cost of these vaccines is very expensive (7, 17). Bacterins are efficacious in the prevention of infectious diseases controlled by systemic antibodies. However, these vaccines are incapable of inducing a suitable mucosal immunity (30).

In the present study, we evaluated the immune response of mice inoculated with the recombinant chimera rLTBR1, a new vaccine candidate for controlling SMP, composed by R1 repeat region of the P97 adhesin of *M. hyopneumoniae* with *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. This vaccine

stimulated the production of high levels of anti-R1 IgA in trachea and bronchi of mice, as well as anti-R1 systemic antibodies and cellular immunity. Moreover, anti-LTB antibodies were also detected, suggesting that rLTBR1 can help in the control of diarrhea by enterotoxigenic *E. coli*, since the antitoxin immune response is essentially directed against the B subunit (18). This vaccine assay was performed twice and presented very similar results.

The *ltbr1* fusion gene was obtained by using two PCRs and the nucleotide sequence of the gene showed to be absolutely the same as the corresponding genes. This data indicated that the method used for constructing the fusion gene was highly efficient and of high fidelity. Yan et al. (51) used three PCRs to obtain the *ltb-ureB* fusion gene and also obtained success, but the fusion method used (primer linking) was more laborious.

In our study, an approximately 5 kDa increase was observed in rR1 and rLTBR1 before and after their purification, suggesting a posttranslational modification. Maybe, expression time used (3 h) was not enough to modify all the molecules, leading to the banding pattern (ladder) observed in Figure 2. We are currently investigating a possible glycosylation or non-enzymatic glycosylation (glycation) through a kit for deglycosylation of purified proteins (Boehringer Mannheim). In most cases, glycosylated proteins exhibit an aberrant migration on SDS-PAGE gels (3), what could account for the pattern observed in our experiments. Glycosylation of proteins in prokaryotes was until recently regarded as uncommon. However, this has now changed and protein glycosylation in prokaryotes is an accepted fact (3, 33, 39). An adhesin-like glycoprotein from *M. hyopneumoniae* was identified (6), and deglycosylation produced a reduction of 8.5 kDa in its molecular mass. In fact, the hypothetical posttranslational modification of the rLTBR1 did not impair its immunogenicity, since the serum from mice inoculated with rLTBR1 recognized the native P97 as well as the serum from swine infected with the 7448 pathogenic strain recognized the rLTBR1, nor impair the adjuvant activity of the LTB (GM1 binding).

The commercial bacterin tested did not stimulate the production of anti-R1 IgA in the trachea and bronchi of mice. Curiously, this bacterin did not stimulate the production of anti-R1 systemic antibodies either, suggesting that

the vaccine strain did not express the P97 adhesin. This fact was later corroborated by using the vaccine strain in Western blot analysis with MAb F1B6 (anti-R1), which did not recognize any antigen of the vaccine strain (data not shown). The absence of this important antigen could compromise the efficiency of the vaccine, as it appears to be a major antigenic determinant of *M. hyopneumoniae* (7, 53).

King et al. (23) observed that recombinant P97 did not protect swine from becoming infected with *M. hyopneumoniae*, nor reduced the severity of the disease as measured by lung lesions. We believe that the possible failure in the protection was due to the route of vaccination used (IM), since parenteral administration of immunogens does not induce an adequate mucosal immunity (30). In this situation, how could the colonization of the *M. hyopneumoniae* be blocked? We believe that high anti-R1 IgA levels at the swine respiratory surface can protect against colonization of *M. hyopneumoniae*. Thaker et al. (45) and Lin et al. (27) suggested that mucosal antibodies are important to control SMP.

Shimoji et al. (40) developed a system in which the C terminal region of the P97 adhesin of *M. hyopneumoniae* (R1 and R2 regions) is expressed and exposed on the surface of an attenuated strain of *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1. Swines immunized by IN route with this vaccine did not produce significant levels of anti-R1 IgA in the respiratory tract, suggesting that this strategy was not efficient in the induction of a mucosal immune response against the P97 adhesin of *M. hyopneumoniae*. On the other hand, Fagan et al. (17), using the attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *aroA* expressing a recombinant *M. hyopneumoniae* NrdF, and our rLTBR1 were able to elicit significant sIgA against those antigens (NrdF and R1) in the respiratory tract of mice, what may provide a cost-effective alternative to the present control strategies for SMP.

Chen et al. (7) fused the R1 repeat region of the P97 adhesin of *M. hyopneumoniae* with *Pseudomonas* exotoxin A domain III deleted [PE(Δ III)]. PE(Δ III)-RR1 stimulated a remarkable IgG response against R1 in mice and pigs, however the mucosal immune response (sIgA) against this antigen was not determined. In the same study, the amount of rR1 protein expressed in *E.*

coli BL21(DE3)pLysS using pET vector (T7 promoter) was 450 µg/liter of medium. Using the same vector and strain, our production of rR1 was also low, however when we expressed this antigen in *E. coli* BL21(DE3)SI (induced with NaCl plus IPTG) we achieved approximately 10 mg of rR1 and rLTBR1 per liter of medium. The PE(ΔIII)-RR1 was constructed to increase the production of rR1 (7), however a simple test with other expression strains could have given a much better result.

Because most infections begin at mucosal sites, immunization via mucosal routes is an attractive strategy for blocking of pathogens at the entry point. It is widely believed that successful mucosal immunization requires mucosal antigen administration, however mucosally administered antigens are frequently not immunogenic and may induce immune tolerance. This fact was suggested in this study. Mice inoculated with IN rR1 did not produce anti-R1 systemic or mucosal antibodies. An alternative to this problem is the utilization of mucosal adjuvants. rLTB has shown to be a potent mucosal adjuvant (41, 46, 51), stimulating a strong systemic response and a secretory response of antibodies against co-administrated or coupled antigens. Thus, the immune response against R1, described in this study, corroborates the potential of the rLTB as mucosal adjuvant, contrary to some reports that demonstrated that rLTB or rCTB lacked the capacity to stimulate systemic and mucosal antibody responses towards the co-administered antigen, and that the adjuvant effects of LT and CT are therefore directly linked to the enzymatic (ADP-ribosylation) activity of these molecules (28, 43). A study demonstrated that CTB and LTB can induce immunological tolerance when linked to or co-administered with antigens (1). We found no evidence of a toleragenic response in mice injected with rLTBR1, although we did not measure other outcomes, such as delayed-type hypersensitivity activity, which might have shown such an effect. Other reports indicate that the immunogenicity of protein antigens can be enhanced when they are conjugated to CTB rather than simply mixed with it (4, 14, 20). We are currently investigating this phenomenon using mice inoculated with rLTBR1 or rR1 plus rLTB.

Our results showed that both groups of mice inoculated with rLTBR1 (IN and IM) produced anti-R1 IgA in the respiratory tract. The fact that the IM

rLTBR1 group produced similar levels of anti-R1 IgA when compared with the IN rLTBR1 group surprised us, once the majority of the reports describe the mucosal adjuvant activity of the LTB or CTB when they are applied with other immunogens by the mucosal route (9, 14, 20, 31, 35, 41, 46, 50). These results suggest that rLTB can stimulate mucosal immunity to a certain extent even if not delivered by a mucosal route. Weltzin et al. (48) had similar results, demonstrating that parenteral immunization using rLTB as adjuvant induced IgA to the urease of *Helicobacter pylori* in the saliva of some mice. Our results appear to conflict with those of Yamamoto et al. (49), who found that rCTB had no adjuvant activity when delivered subcutaneously with ovalbumin. It is possible that for parenteral immunization, as with intranasal immunization (16), rLTB has a greater adjuvant effect than rCTB or that activity varies with different antigens. Adjuvanticity of LTB was found to be directly related to GM1 binding activity (12, 13). Interestingly, this finding is valid when a mucosal route is used (carrier function of LTB), but it is not valid for the parenteral route, once immunogens administered by this route do not need to be absorbed (uptaken). This suggests other adjuvanticity mechanisms to LTB, such as cytokines induction that promotes the production of systemic and mucosal antibodies or activation of antigen-presenting cells (APCs). Yamamoto et al. (50) observed that both LT and CT induce B7-2 expression on APCs for subsequent co-stimulatory signaling to CD4⁺ T cells. Even when the adjuvanticity mechanism of LTB is not known, rLTBR1 revealed GM1 ganglioside binding capacity comparable to that of commercially available cholera toxin (Fig. 4). These results showed that the fusion of the R1 in the C terminal of the LTB did not impair the biological activity of this ligand nor the formation of functional oligomers. At least two B subunits are required for binding to GM1 gangliosides (42). Liljeqvist et al. (26) and Arakawa et al. (1) had similar results, showing that fusion of antigens in the C terminal of the CTB or LTB did not impair the pentamerization and ligation to GM1 (1, 26).

It is commonly accepted that Th1 cells are preferentially involved in cell-mediated immunity, while Th2 cells are more effective in the regulation and support of B-cell responses (34). It is noteworthy that the immune response to heterologous antigens co-administered with LTB is strongly Th2 associated

(36). Here, we have shown that, after parenteral immunization with rLTBR1 (IM), there is a clear predominance of anti-R1 IgG1 (Th2-biased immune responses), while IgG2a antibodies (Th1-biased immune responses) are produced upon mucosal administration (IN), indicating the importance of the route of immunization for the type of the immune response induced. Moreover, the production of IFN- γ induced by rLTBR1 suggests that LTB coupled with R1 antigen, administered by the mucosal route (IN), induced Th1 or Th1/Th2-like responses. Our results appear to conflict with those of Wagner et al. (46), who demonstrated that IN co-application of rLTB and the allergen Hev b 3 enhanced the production of allergen-specific Th2 responses at the humoral and cellular level. The immunostimulating effects of a mucosal adjuvant are also influenced by the nature of the co-administered antigen (5, 29). The ability of the rLTBR1 to induce IFN- γ secretion by lymphocytes is an important finding. Thacker et al. (45) suggested that activated T-cells producing IFN- γ may be important in the resolution of *M. hyopneumoniae* infection.

The present study demonstrated that the rLTBR1 may induce both humoral and cellular immune responses, especially mucosal immunity against the R1 repeat region of the P97 adhesin, suggesting that this strategy represent a potentially new approach to design a vaccine against *M. hyopneumoniae* and other infectious diseases as well. Certainly, the immune responses of mice should not be extrapolated, and the potential of the rLTBR1 for the control of SMP requires further studies in pigs. We are currently investigating the efficacy of rLTBR1 as a vaccine against *M. hyopneumoniae* in specific pathogen free swine.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from CNPq (479488/03-7). F.R.C was supported by a scholarship from CAPES.

REFERENCES

1. **Arakawa, T., J. Yu, and D. K. Chang.** 1998. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nat. Biotechnol.* **16**:934-938.
2. **Bastos, R. G., O. A. Dellagostin, R. A. Barletta, A. R. Doster, E. Nelson, and F. A. Osório.** 2002. Construction and immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *Vaccine.* **3407**:21-29.
3. **Benz, I., and A. M. Schmidt.** 2002. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **45**:267-276.
4. **Bergquist, C., T. Lagergard, M. Lindblad, and J. Holmgren.** 1995. Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates. *Infect. Immun.* **63**:2021-2025.
5. **Bourguin, I., T. Chardes, and D. Bout.** 1993. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* **61**:2082-2092.
6. **Chen, J.R., J. H. Lin, C. N. Weng, and S. S. Lai.** 1998. Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **62**:97-110.
7. **Chen, J.R., C. W. Liao, C. N. W. Mao, and C. N. Weng.** 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. *Vet. Microbiol.* **80**:347-357.
8. **Chen, Y.L., S. N. Wang, W. J. Yang, Y. J. Chen, H. H. Lin, and D. Shiuan.** 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect. Immun.* **71**:1155-1160.
9. **Dale, J. B., and E. C. Chiang.** 1995. Intranasal immunization with recombinant group a streptococcal M protein fragment fused to the B subunit of *Escherichia coli* labile toxin protects mice against systemic challenge infections. *J. Infect. Dis.* **171**:1038-1041.

10. **Debey, M. C., and R. F. Ross.** 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. Infect. Immun. **62**:5312-5318.
11. **De Haan, A., H. J. Geerligs, J. P. Hochshorn, G. J. van Scharrenburg, A. M. Palache, and J. Wilschut.** 1995. Mucosal immunoadjuvant activity of liposomes: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with an influenza subunit vaccine and coadministered liposomes. Vaccine. **13**:155-162.
12. **De Haan, L., M. Holtrop, W. R. Verweij, E. Agsteribbe, and J. Wilschut.** 1996. Mucosal immunogenicity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: role of the A subunit. Vaccine. **14**:260-266.
13. **De Haan, L., W. R. Verwig, I. K. Feil, M. Holtrop, W. G. J. Hol, E. Agsteribbe, and J. Wilschut.** 1998. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. Immunology. **94**:424-430.
14. **Dertzbaugh, M. T. and C. O. Elson** 1993. Comparative effectiveness of the cholera toxin B subunit and alkaline phosphatase as carriers for oral vaccines. Infect. Immun. **61**:48-55.
15. **Djordjevic, S. P., S. J. Corwell, M. A. Djordjevic, J. Wilton, and F. C. Minion.** 2004. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. Infect. Immun. **72**:2791-2802.
16. **Douce, G., M. Fontana, M. Pizza, R. Rappuoli, and G. Dougan.** 1997. Intranasal immunogenicity and adjuvant activity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. Infect. Immun. **65**:2821-2828.
17. **Fagan, P. K., S. P. Djordjevic, J. Chin, G. J. Eamens, and M. J. Walker.** 1997. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). Infect. Immun. **65**:2502-2507.
18. **Holmgren, J.** 1981. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. Nature. **292**:413-417.
19. **Hsu, T., and F. C. Minion.** 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Infect. Immun. **66**:4762-4766.

20. **Kang, S. M., Q. Yao, L. Guo, and R. W. Compans.** 2003. Mucosal immunization with virus-like particles of Simian Immunodeficiency Virus Conjugated with cholera toxin subunit B. *J. Virol.* **77**:9823-9830.
21. **Kavanagh, N. T.** 1994. The effect of pulse medication with combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia. *Int. Vet. J.* **47**:58-61.
22. **Keil, D. J., F. H. Burns, W. R. Kisker, D. Bemis, and B. Fenwick.** 1999. Cloning and immunologic characterization of a truncated *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin fusion protein. *Vaccine.* **18**:860-867.
23. **King, K. W., H. F. Faulds, E. L. Everett, and R. J. Y. Yancey.** 1997. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine.* **15**:25-35.
24. **Klinkert, M. Q., R. Herrmann, and H. Schaller.** 1985. Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expressed plasmid library. *Infect. Immun.* **49**:329-335.
25. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
26. **Liljeqvist, S., S. Stahl, C. Andréoni, H. Binz, M. Uhlen, and M. Murby.** 1997. Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding. *J. Immunol. Methods.* **210**:125-135.
27. **Lin, J. H., C. N. Weng, C. W. Liao, K. S. Yeh, and M. J. Pan.** 2003. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. *J. Vet. Med. Sci.* **65**:69-74.
28. **Lycke, N., T. Tsuji, and J. Holmgren.** 1992. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur. J. Immunol.* **22**:2227-2238.
29. **Marinaro, M., H. F. Staats, T. Hiroi, R. J. Jackson, M. Coste, P. N. Boyaka, N. Okahashi, M. Yamamoto, H. Kiyono, and H. Bluethmann.** 1995. Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J. Immunol.* **155**:4621-4632.

30. **McGhee, J. R., J. Mestecky, M. T. Dertzbaugh, J. H. Eldridge, M. Hirasawa, and H. Kiyono.** 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*. **10**:75-88.
31. **Millar, D. G., T. R. Hirst, and D. P. Snider.** 2001. *Escherichia coli* heat labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* **69**:3476-3482.
32. **Minion, F. C., C. Adams, and T. Hsu.** 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect. Immun.* **68**:3056-3060.
33. **Moens, S., and J. Vanderlleyden.** 1997. Glycoproteins in Prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **168**:169-175.
34. **Mosmann, T. R., and R. I. Coffman.** 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**:145-173.
35. **Oien, N. L., R. J. Brideau, E. E. Walsh, and M. W. Wathen.** 1994. Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. *Vaccine*. **12**:731-735.
36. **Richards, C. M., A. T. Amon, T. R. Hirst, T. J. Hill, and N. A. Williams.** 2001. Protective immunity to ocular herpes simplex virus type-1 infection in mice using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Virol.* **75**:1664-1671.
37. **Ross, R.F.** 1999. Mycoplasmal diseases. In: *Diseases of Swine*. p.495-510. Ed. 8^o, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
38. **Sambrook, J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular cloning*. p. 9.16-9.17. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
39. **Schmidt, M. A., L. W. Riley, and I. Benz.** 2003. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* **11**:554-561.
40. **Shimoji, Y., E. Oishi, T. Kitajima, Y. Muneta, S. Shimizu, and Y. Mori.** 2002. *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. *Infect. Immun.* **70**:226-232.

41. **Simmons, C. P., M. Ghaem-Magami, L. Petrovska, L. Lopes, B. M. Chain, N. A. Williams, and G. Dougan.** 2001. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scand. J. Immunol.* **53**:218-226.
42. **Sixma, T. K., S. E. Pronk, and K. H. Kalk.** 1991. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature.* **7**:351-371.
43. **Tamura, S., H. Asanuma, T. Tomita, K. Komase, K. Kawahara, H. Danbara, N. Hattori, K. Watanabe, Y. Susuki, and T. Nagamine.** 1994. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit supplemented with a trace amount of the holotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine.* **12**:1083-1095.
44. **Thacker, E. L., B. J. Thacker, T. B. Boettcher, and H. Jayappa.** 1998. Comparison of Antibody Production, Lymphocyte Stimulation, and Production Induced by Four Commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* Bacterins. *J. Swine Health Product.* **6**:107-112.
45. **Thacker, E. L., B. J. Thacker, M. Kuhn, P. A. Hawkins, and W. R. Waters.** 2000. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Am. J. Vet. Res.* **61**:1384-1389.
46. **Verweij, W. R., L. Haan, M. Holtrop, E. Agsteribbe, R. Brandst, G. J. M. van Scharrenburg, and J. Wilschut.** 1998. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: Induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. *Vaccine.* **16**:3476-3482.
47. **Wagner, B., K. Hufnagl, C. Radauer, S. Wagner, K. Baier, O. Scheiner, U. Wiedermann, and H. Breiteneder.** 2004. Expression of B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in tobacco masaic virus-infected *Nicotiana benthamiana* plants and its characterization as mucosal immunogen and adjuvant. *J. Immunol. Methods.* **287**:203-215.
48. **Weltzin, R., B. Guy, W. D. Thomas, P. J. Giannasca, and T. P. Monath.** 2000. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.* **68**:2775-2782.

49. **Yamamoto, S., Y. Takeda, M. Yamamoto, H. Kurazono, K. Imaoka, M. K. Yamamoto, K. M. Fujihashi, M. H. Noda, H. Kiyono, and J. R. McGhee.** 1997. Mutants in the ADP-ribosyltransferase cleft of cholera toxin lack diarrheagenicity but retain adjuvanticity. *J. Exp. Med.* **185**:1203-1210.
50. **Yamamoto, M., J. R. McGhee, Y. Hagiwara, S. Otake, and H. Kiyono.** 2001. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* **53**:211-217.
51. **Yan, J., Y. Wang, Y. F. Shao, Y. F. Mao, H. W. Li, and Y. H. Luo.** 2004. Construction of prokaryotic expression system of *LtB-ureB* fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvancity. *World J. Gastroenterol.* **10**:2675-2679.
52. **Zhang, Q., T. F. Young, and R. F. Ross.** 1994. Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect. Immun.* **62**:1616-1622.
53. **Zhang, Q., T. F. Young, and R. F. Ross.** 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumonia* adhesin. *Infect. Immun.* **63**:1013-1019.

5 CONCLUSÕES

- A rLTBR1 foi imunogênica para os camundongos.
- A estratégia utilizada na imunização foi capaz de induzir a produção de IgA anti-R1 na mucosa respiratória dos camundongos.
- A fusão da R1 na região C terminal da LTB não prejudicou a sua propriedade de adjuvante de mucosa.
- A via de administração influenciou a amplitude e a modulação da resposta imune induzida pela rLTBR1.
- A bactéria comercial não induziu níveis detectáveis de anticorpos anti-R1.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Fusão dos antígenos P42, P65 e NrdF de *M. hyopneumoniae* com a rLTBR1, visando a produção e avaliação de uma vacina de subunidade recombinante polivalente.
- Avaliação de *Mycobacterium bovis* rBCG expressando a rR1 e rLTBR1.
- Expressão da rLTBR1 em *Pichia pastoris*.
- Avaliação da resposta imune anti-R1 de animais suplementados com *P. pastoris* recombinante expressando a rLTBR1.
- Expressão da rLTBR1 em tabaco.
- Fusão de antígenos de outros patógenos com a LTB e avaliação destas quimeras como vacina de subunidade recombinante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, J.R., LIAO, C.W., MAO, C.N.W. 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, p.347-357, 2001.
- CIPRIAN, A., PIJOAN, C., CRUZ, T., CAMACHO, J., TORTORA, G., COLMENARES, G., LOPEZ, R.R., DE LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 52, p.434-438, 1988.
- DALE, J.B., CHIANG, E.C. Intranasal immunization with recombinant group A streptococcal M protein fragment fused to the B subunit of Escherichia coli labile toxin protects mice against systemic challenge infections. **Journal Infectious Diseases**, 171, p.1038-1041, 1995.
- DEBEY, M.C., ROSS, R.F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection and Immunity**, 62, p.5312-5318, 1994.
- FAGAN, P.K., DJORDJEVIC, S.P., CHIN, J., EAMENS, G.J., WALKER, M.J. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). **Infection and Immunity**, 65, p.2502-2507, 1997.
- HSU, T., MINION, F.C. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. **Infection and Immunity**, 66, p.4762-4766, 1998.
- HSU, T., ARTIUSHIN, S., MINION, F.C. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, 179, p.1317-1323, 1997.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. On line, Acessado em 02/2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
- KANG, S.M., YAO, Q., GUO, L., COMPANS, R.W. Mucosal immunization with virus-like particles of Simian Immunodeficiency Virus Conjugated with cholera toxin subunit B. **Journal of Virology**, 77, p.9823-9830, 2003.

- KAVANAGH, N. T. The effect of pulse medication with combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia. **International Veterinary Journal**, 47, p.58-61, 1994.
- LIN, J.H., WENG, C.N., LIAO, C.W., YEH, K.S., PAN, M.J. Protective effects of oral microencapsuled *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **Journal of Veterinary Medicine Science**, 65, p.69-74, 2003.
- MILLAR, D.G., HURST, T.R., SNIDER, D.P. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. **Infection and Immunity**, 69, p.3476-3482, 2001.
- MINION, F.C., ADAMS, C., HSU, T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. **Infection and Immunity**, 68, p.3056-3060, 2000.
- OIEN, N.L., BRIDEAU, R.J., WALSH, E.E., WATHEN, M.W.. Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. **Vaccine**, 12, p.731-735, 1994.
- PIZZA, M., SCARLATO, V., MASIGNANI, V., GIULIANI, M.M., ARICO, B., COMANDUCCI, M., JENNINGS, G.T., BALDI, L., BARTOLINI, E., CAPECCHI, B., GALEOTTI, C.L., LUZZI, E., MANETTI, R., MARCHETTI, E., MORA, M., NUTI, S., RATTI, G., SANTINI, L., SAVINO, S., SCARSELLI, M., STORNI, E., ZUO, P., BROEKER, M., HUNDT, E., KNAPP, B., BLAIR, E., MASON, T., TETTELIN, H., HOOD, D.W., JEFFRIES, A.C., SAUNDERS, N.J., GRANOFF, D.M., VENTER, J.C., MOXON, E.R., GRANDI, G., RAPPUOLI, R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, 287, p.1816-1820, 2000.
- RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62, p.1094-1156, 1998.

- RICHARDS, C.M., AMON, A.T., HIRST, T.R., HILL, T.J., WILLIAMS, N.A. Protective immunity to ocular herpes simplex virus type-1 infection in mice using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Journal of Virology**, 75, p.1664-1671, 2001.
- RIGANO, M.M., SALA, F., ARNTZEN, C.J., WALMSLEY, A.M. Targeting of plant-derived vaccine antigens to immunoresponsive mucosal sites. **Vaccine**, 21, p.809-811, 2003.
- ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: **Diseases of Swine**. Ed. 8^o, Iowa State University Press, Ames, Iowa, p.495-510, 1999.
- SOBESTIANSKY, J., PIFFER, I.A., FREITAS, A.R. Impacto de doenças respiratórias dos suínos nos sistemas de produção de Santa Catarina. Concórdia, SC: EMBRAPA - CNPSA, 1987, p.5 (EMBRAPA - CNPSA. **Comunicado Técnico 123**).
- SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D., MORES, N., et al. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2^a ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359, 1999.
- SOBESTIANSKY, J., COSTA, O.A.D., MORÉS, N., et al. Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias dos suínos: Prevalência e impacto econômico em sistemas de produção dos estados de SC, RS e PR. EMBRAPA-CNPSA, 2001. p.6 (EMBRAPA-CNPSA. **Comunicado Técnico 287**).
- TETTELIN, H., SAUNDERS, N.J., HEIDELBERG, J., JEFFRIES, A.C., NELSON, K.E., EISEN, J.A., KETCHUM, K.A., HOOD, D.W., PEDEN, J.F., DODSON, R.J., NELSON, W.C., GWINN, M.L., DEBOY, R., PETERSON, J.D., HICKEY, E.K., HAFT, D.H., SALZBERG, S.L., WHITE, O., FLEISCHMANN, R.D., DOUGHERTY, B.A., MASON, T., CIECKO, A., PARKSEY, D.S., BLAIR, E., CITTONE, H., CLARK, E.B., COTTON, M.D., UTTERBACK, T.R., KHOURI, H., QIN, H., VAMATHEVAN, J., GILL, J., SCARLATO, V., MASIGNANI, V., PIZZA, M., GRANDI, G., SUN, L., SMITH, H.O., FRASER, C.M., MOXON, E.R., RAPPUOLI, R., VENTER, J.C. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. **Science**, 287, p.1809-1815, 2000.

- THACKER, E.L., HALBUR, P.G., ROSS, R.F., THANAWONGNUWECH, R., THACKER, B.J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **Journal Clinical of Microbiology**, 37, p.620-627, 1999.
- THACKER, E.L., THACKER, B.J., KUHN, M., HAWKINS, P.A., WATERS, W.R. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of Veterinary Research**, 61, p.1384-1389, 2000.
- USDA – United States Department of Agriculture. 2005. Capturado em 15 mar. 2005. Online. Disponível na Internet <http://www.usda.gov/>
- VERWEIJ, W.R., HAAN, L., HOLTROP, M., et al. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: Induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. **Vaccine**, 16, p.3476-3482, 1998.
- WALKER, R.L. Mollicutes. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**, 1^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p.155-162, 2003.
- WELTZIN, R., GUY, B., THOMAS, W.D., GIANNASCA, P.J., MONATH, T.P. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against *Helicobacter pylori* infection. **Infection and Immunity**, 68, p.2775-2782, 2000.
- ZHANG, Q., YOUNG, T.F., ROSS, R.F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. **Infection and Immunity**, 63, p.1013-1019, 1995.