

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

Produção e caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para uso em imunodiagnóstico e vacinação

Simone Simionatto

Pelotas, 2008

SIMONE SIMIONATTO

**Produção e caracterização de proteínas recombinantes de
Mycoplasma hyopneumoniae com potencial para uso em
imunodiagnóstico e vacinação**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências (Área de
Conhecimento: Biologia Molecular).

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2008

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S589p Simionatto, Simone
Produção e caracterização de proteínas recombinantes de
Mycoplasma hyopneumoniae com potencial para uso em
imunodiagnóstico e vacinação / Simone Simionatto ; orientador
Odir Antônio Dellagostin. – Pelotas, 2008. – 125f. : il. color. –
Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal
de Pelotas. Pelotas, 2008.

1.Biotecnologia. 2.*Mycoplasma hyopneumoniae*.
3.Proteínas recombinantes. 4.Mutagênese sítio-dirigida.
5.Vacinas. I.Dellagostin, Odir Antônio. II.Título.

CDD:

615.372

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Itamar Piffer, Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves

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

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

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador), Universidade Federal de Pelotas

Aos meus queridos e amados pais, sempre presentes,
apesar do tempo e da distância que nos separa.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Odir Antônio Dellagostin pela oportunidade, confiança, orientação e apoio, sem os quais o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

Aos meus pais, Fiorindo e Catarina, pela formação, incentivo, companheirismo e amor... Obrigada pelo carinho e apoio incondicionais!

Aos meus queridos irmãos, Sandra e Sidi, por todo o amor, amizade, companheirismo e acima de tudo, ao incentivo que sempre encontrei em vocês. Obrigada por terem dividido comigo muito mais que as conquistas.... Sem vocês os momentos difíceis e frustrantes desta caminhada talvez não conseguissem ser superados.

A minha Tia Madalena, minha segunda mãe, a você que sempre torceu por mim, meu muitíssimo obrigado.

Ao querido Rochélio pelo amor, carinho, amizade, confiança e apoio incondicional. Obrigada por ter ficado ao meu lado durante esta caminhada e por ter compreendido as horas em que estive ausente.

A toda minha família, por ter compreendido a minha ausência em vários momentos durante esta trajetória. Esta vitória também pertence a vocês!

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular, André, Clarice, Danieli, Daiane, Éverton, Fabiana, Gustavo, Luciano, Marcelo, Michel, Michele, Robson, Ronaldo, Samuel, Sandra, Silvana, Sibebe, Suselaine, Tessália, Vanessa e Vanusa, pelo convívio diário, respeito, auxílio e compreensão. A todos, muito obrigada!

A minha estagiária Vanessa, por toda a dedicação dispensada durante a execução deste trabalho.

Um agradecimento especial à minha querida amiga Sibebe, pela valiosa amizade, companherismo, apoio, confiança e preciosos ensinamentos prestados durante a realização desse trabalho... Obrigado por tudo Loirete!!!

Ao Dr. Everton F. da Silva, querido amigo, muito obrigado pela disposição e imensa contribuição prestada na realização das análises estatísticas.

A minha querida prima Adriana, que mesmo distante se fez presente, apoiando e incentivando durante toda esta trajetória.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo convívio, respeito e amizade. Em especial aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada pela constante troca de idéias sobre Imunologia e pelos auxílios prestados em diversos momentos.

À Embrapa Suínos e Aves pela colaboração e fornecimento do material biológico, em especial às pesquisadoras Cátia, Raquel e Clarissa, pela disponibilidade em ajudar em várias etapas deste trabalho.

Aos professores do Centro de Biotecnologia da UFRGS, Arnaldo, Henrique e Marilene por terem cedido os seus laboratórios e pela oportunidade para que fossem realizados os ensaios de inibição do crescimento. Às alunas Bianca e Desirée pela ajuda prestada.

A todos os professores, funcionários e alunos do Centro de Biotecnologia da UFPel que colaboraram de alguma forma para a execução deste trabalho.

Àqueles que literalmente deram a vida para a realização deste trabalho, os animais!!

A CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

RESUMO

SIMIONATTO, Simone. **Produção e caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para uso em imunodiagnóstico e vacinação**. 2008. 125 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES), uma doença respiratória responsável por significativas perdas econômicas. Vacinas comerciais são mundialmente utilizadas no controle desta doença, porém proporcionam apenas proteção parcial. Além disso, são caras devido ao crescimento fastidioso do *M. hyopneumoniae in vitro*. Desta forma, o desenvolvimento de alternativas para a profilaxia da PES é fundamental para a melhoria da sanidade dos suínos. A tecnologia do DNA recombinante pode ser usada para superar problemas com as vacinas convencionais. No entanto, pela utilização de códons TGA e não TGG para codificar o amino ácido triptofano, a tradução de genes de micoplasmas termina prematuramente quando clonados e expressos em outras bactérias, como *Escherichia coli*. Devido a isso, o número de proteínas antigênicas de *M. hyopneumoniae* caracterizadas e testadas como vacinas ou em testes de imunodiagnóstico ainda é restrito. Neste trabalho, 63 fragmentos gênicos foram selecionados, os quais correspondem a 48 seqüências codificadoras (CDS) de *M. hyopneumoniae*. Num primeiro momento, foi padronizado um método de PCR de sobreposição para mutagênese sítio-dirigida de genes de *M. hyopneumoniae*, objetivando a substituição do códon TGA por TGG, na seqüência do DNA. Com esse método, a mutagênese sítio-dirigida foi realizada com sucesso em 14 genes de *M. hyopneumoniae*. Os demais genes selecionados foram amplificados por PCR e clonados no vetor Champion™ pET200D/TOPO®. No total, 59 fragmentos gênicos foram clonados eficientemente. Destes, 49 tiveram suas proteínas expressas em *E. coli* e 35 foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose (HisTrap™). As propriedades antigênicas e imunogênicas destas proteínas foram analisadas. Para isso, as proteínas foram testadas contra soro de suínos convalescentes e soro hiperimune através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e *Western blot*. Dezenove proteínas recombinantes foram

reconhecidas especificamente por soro de suínos convalescentes, indicando que elas são expressas durante a infecção. Resposta imune humoral contra as proteínas recombinantes foi avaliada em camundongos BALB/c através de ELISA. Os resultados demonstraram que os antígenos induzem um nível variável de anticorpos, o que nos permite inferir quanto à capacidade imunogênica de cada antígeno. O soro dos camundongos inoculados com 20 proteínas foi capaz de reconhecer as proteínas nativas através de ELISA. Este estudo permitiu identificar e caracterizar novas proteínas imunogênicas de acordo com o seu potencial para uso em testes de diagnóstico e/ou vacina. Estes dados representam uma importante contribuição para o desenvolvimento de testes sorológicos mais eficientes e vacinas de subunidade para o controle da infecção causada por *M. hyopneumoniae* em suínos.

Palavras chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, mutagênese sítio-dirigida, proteínas recombinantes, vacinas.

ABSTRACT

SIMIONATTO, Simone. **Production and characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins with potential for use in immunodiagnosis and vaccination.** 2008. 125 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia (EP), a respiratory disease responsible for significant economic losses. Commercial vaccines are widely used in the control of this disease, however, they provide only partial protection. Besides, their preparation is expensive because of fastidiously growth of *M. hyopneumoniae* in vitro. Therefore, the development of alternatives for EP prophylaxis is important for improving health conditions of pigs. Recombinant DNA technology can be used to overcome problems with conventional vaccines. Nevertheless, because of the use of TGA and not TGG to code for tryptophan, translation of mycoplasmal genes terminates prematurely when cloned in other bacteria, such as *Escherichia coli*. Because of this, the number of antigenic proteins characterized to date in vaccine formulations or immunodiagnostic tests is still restricted. In this work, 63 genetic fragments were selected, which correspond to 48 sequences coding (CDS) of *M. hyopneumoniae*. First, an overlap extension-PCR method for site-directed mutagenesis of *M. hyopneumoniae* genes was standardized, aiming at substituting TGA codon by TGG. With this improved method, site-directed mutagenesis was successfully achieved in 14 *M. hyopneumoniae* genes. Other selected genes were amplified by PCR and cloned into Champion™ pET200D/TOPO®. A total of 59 genetic fragments were efficiently cloned. From these, 49 had their proteins expressed in *E. coli* and 35 were purified by affinity chromatography using Ni-Sepharose columns (HisTrap™). Immunogenic and antigenic properties of these proteins were analyzed. For this, the proteins were tested against sera from hyperimmune and from convalescent pigs through ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and Western blot. Nineteen recombinant proteins were specifically recognized by convalescent pig sera indicates they are expressed during infection. Immune humoral response against recombinant proteins was evaluated in BALB/c mice by ELISA. The results showed that antigens induce variable levels of

antibodies, which allows inferring the immunogenicity of each antigen. Sera from inoculated mice with twenty recombinant proteins were able to recognize the native protein by ELISA. This study allowed identifying and characterizing new immunogenic proteins according to their potential for use in diagnostic tests and/or vaccine. These data represent an important contribution for the development of more efficient serological tests and a subunit vaccine for controlling *M. hyopneumoniae* infections in pigs.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, site-directed mutagenesis, recombinant proteins, vaccines.

SUMÁRIO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> COM POTENCIAL PARA USO EM IMUNODIAGNÓSTICO E VACINAÇÃO.....	1
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 ARTIGO 1	17
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> : DO GENOMA AO DESENVOLVIMENTO DE VACINA.....	17
3 ARTIGO 2	49
EFFICIENT SITE DIRECTED MUTAGENESIS USING AN OVERLAP EXTENSION-PCR METHOD FOR CLONING AND EXPRESSION OF <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> GENES IN <i>Escherichia coli</i>	49
ABSTRACT.....	51
1 INTRODUCTION	52
2 MATERIAL AND METHODS	53
3 RESULTS	56
4 DISCUSSION	58
5 ACKNOWLEDGEMENTS	60
6 REFERENCES	60
4 ARTIGO 3	Erro! Indicador não definido.
CLONING AND PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS OF <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> EXPRESSED IN <i>Escherichia coli</i>	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT.....	Erro! Indicador não definido.
1 INTRODUCTION	Erro! Indicador não definido.
2 MATERIAL AND METHODS	Erro! Indicador não definido.
3 RESULTS	Erro! Indicador não definido.
4 DISCUSSION	Erro! Indicador não definido.
5 ACKNOWLEDGEMENTS	Erro! Indicador não definido.
6 REFERENCES	Erro! Indicador não definido.
5 ARTIGO 4	Erro! Indicador não definido.

IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	
RECOMBINANT PROTEINS	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT.....	Erro! Indicador não definido.
1 INTRODUCTION	Erro! Indicador não definido.
2 MATERIAL AND METHODS	Erro! Indicador não definido.
3 RESULTS	Erro! Indicador não definido.
4 DISCUSSION	Erro! Indicador não definido.
5 ACKNOWLEDGEMENTS	Erro! Indicador não definido.
6 REFERENCES	Erro! Indicador não definido.
6 CONCLUSÕES	Erro! Indicador não definido.
7 REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, a suinocultura brasileira vem desenvolvendo-se e buscando um mercado cada vez mais especializado, consolidando-se como uma das atividades mais dinâmicas dentro do complexo agroindustrial do país. Esta atividade propicia ótimas oportunidades para investimentos e também, a possibilidade de transformar matéria-prima bruta em produtos de maior valor agregado, como carne e derivados industrializados. O setor suinícola tem apresentado uma tendência de concentração e especialização, caracterizando-se pela produção cada vez mais eficiente, praticada por um número cada vez menor de produtores. A Região Sul do Brasil representa mais de 45% do rebanho nacional de suínos, sendo que o Rio Grande do Sul é o segundo estado maior produtor de carne suína (IBGE, 2008).

As doenças respiratórias constituem um fator limitante da produção suína e afetam animais em todas as fases de crescimento, provocando atraso no desenvolvimento e até a morte dos animais. Um dos mais importantes problemas de saúde, associados à produção suína é a pneumonia enzoótica suína (PES), uma doença respiratória crônica, causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* (ROSS, 1999). Este agente etiológico é responsável por significativas perdas econômicas na produção suína, uma vez que a infecção é altamente prevalente em quase todas as áreas produtivas (ROSS, 1999; SIBILA et al., 2008). Além de causar a PES, o *M. hyopneumoniae* é considerado também um dos agentes primários envolvidos no complexo de doenças respiratórias de suínos (PRDC) (THACKER, 2006).

O *M. hyopneumoniae* coloniza o trato respiratório superior de suínos causando danos aos cílios das vias respiratórias, comprometendo a principal barreira mecânica contra infecção por outros patógenos, debilitando o sistema imune e favorecendo o estabelecimento de infecções secundárias (RAZIN et al., 1998). A transmissão ocorre por contato direto com secreções do aparelho respiratório e através de aerossóis, eliminados durante os acessos de tosse. A PES manifesta-se clinicamente por tosse crônica seca, atraso no ganho de peso, alta morbidade e baixa mortalidade. Suínos em todas as idades são susceptíveis a infecção sendo que, a forma clínica da doença é mais comum em animais em fase de crescimento e terminação (ROSS, 1999).

1 Sinais clínicos e lesões pulmonares podem ser usados para um diagnóstico
2 presuntivo, porém testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo
3 da PES (THACKER, 2004). O cultivo do *M. hyopneumoniae* é descrito como o padrão
4 ouro, porém ele não é usado como rotina no diagnóstico devido ao crescimento
5 extremamente lento deste agente e a interferência com o crescimento de outros
6 micoplasmas. Várias metodologias são usadas para monitorar esta infecção como,
7 por exemplo, imunofluorescência, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e
8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No entanto, estas apresentam limitações
9 quanto à sensibilidade e/ ou especificidade (SIBILA et al., 2008). Em virtude disso,
10 testes de diagnóstico mais eficientes se fazem necessários.

11 A vacinação parece ser a forma mais eficaz no controle das infecções
12 causadas pelo *M. hyopneumoniae*. As vacinas disponíveis comercialmente são
13 compostas por células inteiras inativadas de *M. hyopneumoniae*. O principal efeito da
14 vacinação inclui diminuição dos sintomas clínicos, redução no tamanho das lesões
15 pulmonares e melhoria no desempenho dos suínos (ganho de peso diário e taxa de
16 conversão alimentar) (MAES et al., 1999). No entanto, as bacterinas fornecem
17 apenas uma proteção parcial, pois não conseguem controlar eficientemente a PES
18 (THACKER et al., 1998, 2000a). Além disso, apresentam elevado custo de produção
19 devido ao crescimento extremamente fastidioso *in vitro* deste agente (KOBISCH &
20 FRIIS 1996).

21 Devido às limitações das vacinas comerciais, pesquisas com novas
22 abordagens vacinais vêm sendo propostas, buscando o desenvolvimento de vacinas
23 mais eficientes no controle da PES (CHEN et al., 2001, 2003, 2006, 2008; FAGAN et
24 al., 2001; LIN et al., 2003; SHIMOJI et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2006; OKAMBA
25 et al., 2007). Porém, apesar do genoma de três cepas de *M. hyopneumoniae* terem sido
26 seqüenciados (MINION et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005), poucos
27 antígenos recombinantes foram avaliados como candidatos a vacinas (FAGAN et al.,
28 2000; CHEN et al., 2003, 2008). O genoma pequeno deste agente, bem como o
29 número limitado de proteínas secretadas ou de superfície, favorece o uso da
30 abordagem denominada vacinologia reversa (RAPPUOLI, 2001; CAPECCHI et al.,
31 2004). Porém, o *M. hyopneumoniae* utiliza o código genético não usual (RAZIN et al.,
32 1998). Essa característica tem implicações práticas quando genes do micoplasma
33 são clonados e expressos em sistemas heterólogos. A clonagem de genes de *M.*
34 *hyopneumoniae* expressando o códon UGA para estudos da função destas proteínas

1 normalmente é evitada devido à falta de uma metodologia eficiente e bem
2 estabelecida para substituição dos códons TGA por TGG.

3 Dada a importância da PES no cenário mundial de produção de suínos,
4 especialmente no que diz respeito às perdas econômicas decorrentes de infecções e
5 co-infecções com outros patógenos, torna-se cada vez mais relevante e necessária
6 à implementação de medidas de controle mais efetivas. A caracterização de um
7 maior número de proteínas antigênicas deste agente permitirá a geração de dados
8 fundamentais para a elaboração de estratégias de controle. O diagnóstico mais
9 eficiente da doença, somado a uma vacina que possa controlar a infecção são
10 alternativas promissoras para obter rebanhos com PES controlada.

11 Este trabalho foi delineado visando contribuir para a elaboração de estratégias
12 de controle mais eficientes para a PES. Com esse intuito, foram estabelecidas as
13 seguintes hipóteses: antígenos recombinantes possibilitarão o desenvolvimento de
14 uma vacina recombinante capaz de reduzir a colonização pelo *M. hyopneumoniae* e,
15 portanto, com capacidade superior às bacterinas comerciais; antígenos
16 recombinantes permitirão o desenvolvimento de um diagnóstico mais eficiente da
17 PES. Neste contexto, foram traçados os seguintes objetivos: (1) Seleção de regiões
18 codificadoras (CDS) de proteínas de *M. hyopneumoniae* com poucos códons TGA,
19 seqüências hidropáticas e possivelmente envolvidas na patogênese deste agente;
20 (2) Padronização e avaliação da eficiência de um método de mutagênese sítio-
21 dirigida para substituição de códons TGA para códons TGG, visando à expressão de
22 novos antígenos de *M. hyopneumoniae* em sistemas heterólogos; (3) Clonagem dos
23 genes, mutados e não-mutados em vetores de expressão em *Escherichia coli*,
24 expressão e purificação das proteínas recombinantes através de cromatografia
25 líquida de afinidade; (4) Avaliação da imunogenicidade e da antigenicidade das
26 proteínas recombinantes através da associação de diferentes técnicas imunológicas,
27 buscando selecionar alvos com potencial para uso como vacina de subunidade e/ou
28 imunodiagnóstico.

29 Inicialmente é apresentada uma revisão bibliográfica sobre *M. hyopneumoniae*,
30 objeto de estudo dessa Tese de Doutorado (artigo 1). Nesta revisão foram
31 abordados aspectos gerais deste agente, especialmente quanto à biologia e
32 patogenia, as implicações quanto à infecção causada por este patógeno, os
33 métodos de detecção e as medidas profiláticas usadas no controle desta doença.

1 Discutimos também as novas abordagens vacinais que estão sendo desenvolvidas
2 para o controle da PES. O artigo será submetido ao periódico **Ciência Rural**.

3 O artigo 2 descreve a otimização de uma técnica de mutagênese sítio-dirigida
4 para a substituição de códons TGA por TGG, visando à expressão de genes de *M.*
5 *hyopneumoniae* em *E. coli*. Quatorze genes tiveram pelo menos um códon TGA
6 substituído eficientemente por TGG, permitindo a expressão das proteínas
7 codificadas por estes genes em *E. coli*. Este trabalho foi submetido no periódico
8 **Applied Microbiology and Biotechnology**.

9 Sessenta e três fragmentos gênicos de *M. hyopneumoniae* que codificam para
10 proteínas com potencial para uso como vacina de subunidade ou antígenos para uso
11 em testes de diagnóstico foram selecionados, amplificados por PCR e clonados em
12 vetores de expressão em *E. coli*. Trinta e cinco proteínas recombinantes foram
13 purificadas por cromatografia líquida de afinidade. Estes resultados estão descritos
14 no artigo 3, o qual será submetido no periódico **Protein Expression and**
15 **Purification**.

16 O artigo 4 descreve a caracterização imunológica de 34 proteínas
17 recombinantes de *M. hyopneumoniae*. Com a utilização de diferentes técnicas
18 antigênicas e imunogênicas foi possível selecionar as proteínas recombinantes de
19 acordo com o seu potencial para uso como vacina recombinante e/ou teste de
20 imunodiagnóstico. Este artigo será submetido no periódico **Veterinary**
21 **Microbiology**. Os artigos estão compilados na formatação exigida por cada um dos
22 periódicos científicos em que serão publicados.

23

24

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9

2 ARTIGO 1

***Mycoplasma hyopneumoniae*: DO GENOMA AO DESENVOLVIMENTO DE VACINA**

(Revisão a ser submetida ao periódico Ciência Rural)

1 *Mycoplasma hyopneumoniae*: do genoma ao desenvolvimento de vacina

2

3 *Mycoplasma hyopneumoniae*: from the genome to vaccine development

4

5 Simone Simionatto¹, Silvana Beutinger Marchioro¹, Odir Antônio Dellagostin^{1*}

6

7

8 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

9

10 RESUMO

11 *Mycoplasma hyopneumoniae*, o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína
12 (PES), é um importante patógeno na produção mundial de suínos. A vacinação é uma
13 estratégia efetiva para o controle e prevenção desta doença. Apesar dos esforços para
14 controlar a infecção do *M. hyopneumoniae*, perdas econômicas significativas na produção
15 mundial de suínos devido a PES continuam. Os resultados de pesquisas baseada no genoma
16 podem ajudar no entendimento da biologia e da patogenia do *M. hyopneumoniae*, colaborando
17 para o desenvolvimento de vacinas e testes sorológicos mais eficazes. Investigação dos
18 mecanismos de patogenicidade, bem como dos métodos de detecção atuais para o *M.*
19 *hyopneumoniae* foram examinados nessa revisão. Também foram discutidas as novas vacinas
20 contra a PES em desenvolvimento usando a tecnologia denominada vacinologia reversa.

21

22 **Palavras-chave:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, genoma, vacinas

¹ Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus universitário S/N; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas - RS; Brasil. Autor para correspondência: odir@ufpel.edu.br

1 ABSTRACT

2 *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of Swine Enzootic Pneumonia
3 (EP), is an important pathogen in the swine production worldwide. Vaccination is one cost-
4 effective strategy for controlling and prevention of this disease. Despite the efforts to control
5 *M. hyopneumoniae* infection, significant economic losses in pig production worldwide due to
6 EP continue. The results of genome-based research could help in the understanding of the
7 biology and pathogenesis of *M. hyopneumoniae*, contributing for the development of more
8 effective vaccines and serological tests. Investigations on pathogenicity mechanisms as well
9 as current detection methods for the *M. hyopneumoniae* were examined in this review. Also,
10 the new vaccines against EP under development using the reverse vaccinology technology
11 were discussed.

12
13 **Key words:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, genome, vaccine

14 15 INTRODUÇÃO

16 A suinocultura brasileira ingressou em uma fase de expansão, resultante da
17 incorporação de um avançado aporte tecnológico no que se refere à sanidade, genética,
18 nutrição e manejo, consolidando-se como uma das atividades mais dinâmicas dentro do
19 complexo agroindustrial do país. Esse crescimento é notado quando se analisam vários
20 indicadores econômicos e sociais, como volume de exportações, participação no mercado
21 mundial, e número de empregos diretos e indiretos, os quais impulsionam o desenvolvimento
22 interno do país. A Região Sul do Brasil possui mais de 45% do rebanho nacional e o Rio
23 Grande do Sul é o segundo estado maior produtor de carne suína, perdendo apenas para o
24 estado de Santa Catarina (IBGE, 2008).

1 As doenças respiratórias constituem um dos mais importantes problemas de saúde
2 associados à produção suína. O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente primário da
3 Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma doença respiratória crônica em suínos. Esta infecção
4 é altamente prevalente em quase todas as áreas produtivas e causa significativas perdas
5 econômicas (ROSS, 1999). O *M. hyopneumoniae* é considerado também um dos agentes
6 primários envolvidos no complexo de doenças respiratórias de suínos (PRDC) (THACKER,
7 2006).

8 O isolamento do *M. hyopneumoniae* é extremamente difícil devido ao crescimento
9 lento e a interferência de outros micoplasmas. Este patógeno compromete a integridade dos
10 cílios do epitélio respiratório dos suínos, destruindo o principal mecanismo de defesa
11 inespecífico desses animais, predispondo-os às infecções secundárias e oportunistas (ROSS,
12 1999). Danos nas células epiteliais podem ser causados também pela toxicidade dos produtos
13 do metabolismo do micoplasma, como o peróxido de hidrogênio e radicais de superóxido
14 (RAZIN et al., 1998). O principal sinal clínico da PES é tosse crônica e não produtiva que
15 normalmente aparece entre 10 a 16 dias após a infecção experimental. Porém, esse período
16 pode variar em condições de campo. Lesões macroscópicas são observadas de 12 a 14
17 semanas após a infecção e consistem em áreas de cor púrpura a cinza no pulmão (ROSS,
18 1999).

19 Sinais clínicos e lesões podem ser usados para um diagnóstico presuntivo, porém
20 testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo da doença (THACKER,
21 2004). Embora cultura do *M. hyopneumoniae* é descrita como o padrão ouro, ela não é usada
22 como rotina de diagnóstico. Este agente pode ser detectado direto ou indiretamente através de
23 imunofluorescência, sorologia e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MAES et al.,
24 2007).

1 A vacinação é um componente importante no controle das infecções causadas pelo *M.*
2 *hyopneumoniae*. No entanto, as vacinas disponíveis no mercado são bacterinas cujo principal
3 efeito está relacionado com a diminuição das lesões pulmonares e melhora nas taxas de
4 conversão alimentar (MAES et al., 1999), porém não conseguem controlar o estabelecimento
5 da PES (THACKER et al., 1998). Além disso, apresentam elevado custo de produção devido
6 ao crescimento extremamente fastidioso *in vitro* deste agente (KOBISH & FRIIS, 1996).
7 Neste trabalho de revisão iremos discutir características do *M. hyopneumoniae* relacionados à
8 infecção, dando ênfase às estratégias de vacinação que vem sendo propostas na era pós-
9 genômica e que buscam o controle mais eficaz da doença.

10

11 **1. Etiologia**

12 *M. hyopneumoniae* é o agente etiológico da PES, uma doença respiratória crônica
13 muito freqüente entre os plantéis de suínos (ROSS, 1999). O *M. hyopneumoniae* pertencem à
14 Classe *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* e gênero
15 *Mycoplasma*. A nomenclatura é relacionada à ausência de parede celular e do peptidoglicano
16 (WALKER, 2003). A ausência da parede celular proporciona um pleomorfismo às células do
17 micoplasma, podendo variar de esférico a bacilar, de filamentoso a helicoidal. O diâmetro da
18 forma esférica varia de 0,3 a 0,8 μm e possui uma membrana trilaminar simples composta de
19 proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, este último responsável
20 pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana. A ausência de parede celular favorece
21 também a passagem desses microrganismos por membranas com porosidade de até 0,22 μm .
22 A maioria dos micoplasmas cresce lentamente em meio de cultivo e as colônias tornam-se
23 visíveis após 2 a 3 dias de incubação, aumentando de 0,25 a 1 mm de diâmetro em
24 aproximadamente 10 dias. As células do micoplasma coram-se pelas técnicas de Giemsa,
25 Casteñeda, Dienes e azul de metileno. As condições ideais de cultivo *in vitro* são: temperatura

1 de 37 °C, pH 7,5, atmosfera com 5 a 10% de CO₂ (ROSS, 1999). Os micoplasmas possuem
2 alta sensibilidade a detergentes e alterações osmóticas. Por outro lado, são naturalmente
3 resistentes a antimicrobianos que interferem na síntese da parede celular, como por exemplo,
4 o grupo das penicilinas (RAZIN et al., 1998). Apesar de existir diferenças fundamentais entre
5 os micoplasmas e outras bactérias, sinais de regulação da expressão de genes e muitos outros
6 aspectos da biologia molecular dos micoplasmas são similares ao das bactérias Gram
7 positivas. Os micoplasmas evoluíram de bactérias Gram positivas, especialmente no que diz
8 respeito àquelas bactérias com DNA contendo baixo conteúdo G+C. Os micoplasmas
9 compartilham um ancestral comum com *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus*,
10 *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Filogeneticamente a classe *Mollicutes* é
11 relacionada aos gêneros *Clostridium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (DYBVG & VOELKER,
12 1996).

13 Os micoplasmas são os menores microrganismos autoreplicantes de vida livre
14 conhecidos, possuem genomas pequenos (580 a 1350 kb) e com alto conteúdo de A+T
15 (aproximadamente 70%). O *M. hyopneumoniae* possui 72% de A+T na composição de seus
16 genes. Em função do reduzido genoma, apresentam metabolismo e vias biosintéticas
17 limitadas. Por exemplo, os micoplasmas não possuem as rotas de produção de parede celular e
18 de biosíntese de purinas, do ciclo do ácido tricarboxílico, do sistema de transporte de elétrons
19 mediado por citocromos (DYBVG & VOELKER, 1996). Consequentemente, o seu cultivo *in*
20 *vitro* torna-se bastante fastidioso, sendo que a maioria das espécies nunca foi cultivada
21 (RAZIN et al., 1998). O *M. hyopneumoniae* é cultivável *in vitro*, porém exige meio
22 enriquecido com soro de suíno e geralmente é cultivado em meio Friis (FRIIS, 1975). No
23 entanto, seu cultivo e isolamento são fastidiosos, consumindo tempo, e frequentemente não
24 são bem sucedidos (THACKER, 2006). Além da sua característica fastidiosa, seu isolamento
25 torna-se difícil devido a freqüente contaminação de outros micoplasmas como o *Mycoplasma*

1 *hyorhinis* (presente no trato respiratório dos suínos), *Mycoplasma flocculare* (espécie não-
2 patogênica que apresenta semelhanças em relação à morfologia, crescimento e antigenicidade
3 ao *M. hyopneumoniae*). Este fato, somado ao seu crescimento pobre, encarece excessivamente
4 a produção de vacinas preparadas com bactérias inteiras inativadas (bacterinas), que são as
5 utilizadas no controle da PES (ROSS, 1999).

6 A natureza fastidiosa dos micoplasmas e a falta de sistemas genéticos para conhecer as
7 suas estruturas e funções, têm dificultado os processos para entender a sua biologia. No
8 entanto, os micoplasmas têm complexos sistemas de recombinação capazes de gerar uma alta
9 taxa de diversidade antigênica (DYBVIG & VOELKER, 1996). A heterogeneidade genética
10 entre as cepas de *M. hyopneumoniae* já foi demonstrada através de técnicas como teste de
11 inibição do metabolismo, digestão com enzimas de restrição e PCR (DESROSIERS, 2001).
12 VICCA et al. (2003), descreveram que há diferença no perfil de bandas entre cepas de
13 moderada e alta virulência quando comparadas a cepas de baixa virulência. A existência de
14 variabilidade proteômica entre isolados de *M. hyopneumoniae* de diferentes rebanhos também
15 já foi descrita (CALUS et al., 2007). A análise de 22 VNTARs (*variable number of tandem*
16 *aminoacid repeats*), provenientes de 12 CDSs (seqüências codificadoras) de cinco cepas *M.*
17 *hyopneumoniae*, foi capaz de determinar variações antigênicas e estruturais destas proteínas,
18 com implicações em aspectos funcionais e associados à patogenicidade do *M. hyopneumoniae*
19 (CASTRO et al., 2006).

20 Outro aspecto marcante do *Mycoplasma* sp é a utilização do código genético não usual
21 (RAZIN et al., 1998). O aminoácido triptofano não é codificado pelo TGG como na maioria
22 dos organismos vivos, mas por TGA, o qual é um códon de terminação em outros organismos.
23 Essa diferença no código genético tem implicações práticas quando genes do micoplasma são
24 clonados e expressos em sistemas heterólogos. Na presença de códon TGA, a tradução de
25 proteínas do micoplasma termina prematuramente quando genes clonados são expressos em

1 outras bactérias, como a *Escherichia coli*. Conseqüentemente, a clonagem de genes de *M.*
2 *hyopneumoniae* expressando o códon UGA para estudos da função destas proteínas,
3 normalmente é evitada.

4

5 **2. Epidemiologia**

6 A PES é uma doença multifatorial caracterizada por baixa mortalidade, porém alta
7 morbidade, causando significativas perdas econômicas devido ao aumento no uso de
8 medicamentos e ao decréscimo do desempenho dos suínos (ROSS, 1999). As perdas
9 econômicas decorrentes podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o
10 ganho de peso (SOBESTIANSKY et al., 1999). Embora animais de todas as idades sejam
11 susceptíveis a infecção por *M. hyopneumoniae*, a doença é comumente observada em animais
12 na fase de crescimento e terminação, sendo pouco freqüente em animais com menos de 6
13 semanas de idade (SIBILA et al., 2008). No entanto, em rebanhos com baixa imunidade, a
14 doença pode afetar leitões com duas semanas de idade, bem como animais em fase de
15 reprodução (STÄRK, 2000).

16 O *M. hyopneumoniae* pode ser introduzido no rebanho de duas formas: pela
17 transmissão direta através do contato com secreções do trato respiratório de suínos infectados
18 e, indireta principalmente através de aerossóis e utensílios contaminados. Uma vez no
19 rebanho, o agente é transmitido entre os animais através de gotículas geradas por tosse ou
20 espirro, ou se propagar através de contato direto. A infecção disseminada de forma direta
21 pode ocorrer horizontalmente (de um animal infectado para um não infectado) e também
22 verticalmente (das porcas para seus leitões) (SIBILA et al., 2008). As matrizes de primeira
23 cria ou com número reduzido de partos, possuem baixos níveis de anticorpos e excretam mais
24 micoplasmas do que as matrizes com maior número de gestações (MAES et al., 1996). O
25 contato direto é considerado a principal forma de transmissão, no entanto a disseminação

1 através de aerossóis vem sendo considerada uma via potencial de contaminação dentro do
2 plantel e entre plantéis diferentes (BARGEN, 2004).

3 As características de transmissão, associadas às variáveis ambientais e de manejo,
4 favorecem a ocorrência e severidade da PES. A infecção causada por *M. hyopneumoniae* tem
5 ampla distribuição geográfica. Estudos realizados em diferentes países indicam que as lesões
6 sugestivas da PES ocorrem de 30% a 80% dos suínos abatidos. Na região Sul do Brasil, que
7 representa cerca de 80% do abate nacional, constatou-se que 55% dos suínos ao abate
8 apresentavam lesões sugestivas de PES e 100% dos rebanhos examinados estavam afetados
9 (SOBESTIANSKY, 1999). Dados semelhantes foram descritos por MAES et al. (1999) que
10 relataram ter mais de 90% dos rebanhos belgas infectados por *M. hyopneumoniae*. VICCA
11 (2002) avaliou o modelo das infecções causadas por *M. hyopneumoniae* em cinco rebanhos
12 com infecção subclínica e inadequadas condições de manejo, cinco clinicamente infectados e
13 adequadas condições de manejo. Este trabalho revelou que a porcentagem de suínos
14 soropositivos nas infecções clínicas aumentou de 8% em animais com nove semanas, para
15 52% em animais com 18 semanas. Nos rebanhos com infecção subclínica a porcentagem de
16 animais positivos aumentou de 2 para 24%, na mesma faixa etária. Este estudo demonstrou
17 que a soroprevalência foi maior em rebanhos com infecção clínica e que a maioria dos
18 animais se infecta quando jovens. Sugerem também que, fatores adicionais às condições de
19 alojamento e manejo, como diferenças entre as cepas de *M. hyopneumoniae* circulantes,
20 podem determinar o modelo da infecção e o curso clínico da infecção.

21

22 **3. Patogenia**

23 O *M. hyopneumoniae* apresenta estreita especificidade quanto ao hospedeiro,
24 infectando uma única espécie, a suína. O período de incubação varia de 10 a 16 dias, sob
25 condições experimentais. Ao colonizar as células epiteliais respiratórias causam redução da

1 atividade ciliar do epitélio respiratório, ciliostase e perda dos cílios (ROSS, 1999),
2 predispondo os animais a infecções secundárias e oportunistas. Danos nas células epiteliais
3 podem ser causados também por toxicidade moderada de produtos do metabolismo, como o
4 peróxido de hidrogênio e radicais de superóxido (RAZIN et al., 1998). Embora o *M.*
5 *hyopneumoniae* é considerado patógeno respiratório, estudos recentes reportaram o
6 isolamento deste agente de órgãos de suínos infectados experimentalmente como fígado, baço
7 e rim (MAROIS et al., 2007). Este resultado sugere que a infecção causada pelo *M.*
8 *hyopneumoniae* não é restrita ao aparelho respiratório e merece estudos futuros.

9 Micoplasmas patogênicos utilizam um mecanismo de patogenicidade complexo,
10 envolvendo adesão e colonização, citotoxicidade, competição por substratos, evasão e
11 modulação da resposta imune do hospedeiro. Esses processos não são medidos através de um
12 único efeito, mas pela expressão de múltiplos produtos gênicos (adesinas, receptores para
13 nutrientes, mitógenos, intermediários metabólicos) (ROSS, 1999). A patogenia das cepas de
14 *M. hyopneumoniae* está relacionada à capacidade de adesão aos cílios do epitélio respiratório
15 de suínos (ZIELINSKI & ROSS, 1993). A adesina P97 do *M. hyopneumoniae* reconhece
16 receptores presentes nos cílios das células epiteliais respiratórias dos suínos, sendo
17 considerada um fator de patogenicidade (ZHAN et al., 1995). A porção C-terminal da P97,
18 identificada como R1, é responsável pela ligação aos cílios. Porém, outros fatores ou
19 proteínas adicionais são também necessários para a aderência aos cílios (HSU & MINION,
20 1998). A proteína P102 faz parte do mesmo operon da P97 e embora a sua expressão pareça
21 não estar associada à ligação do patógeno aos cílios, estudos sugerem que a P102 pode ter
22 uma importante função na virulência uma vez que é expressa “in vivo” durante a infecção
23 (ADAMS et al., 2005).

24 Outro evento importante da patogênese do *M. hyopneumoniae* são fatores mitogênicos
25 para linfócitos, os quais alteram a função dos macrófagos alveolares e causam

1 imunossupressão (ROSS, 1999). Entretanto, os macrófagos alveolares e linfócitos,
2 estimulados pelo *M. hyopneumoniae*, produzem citocinas pró-inflamatórias responsáveis
3 pelas lesões pulmonares e pela hiperplasia linfóide (RODRIGUEZ et al., 2004). Esta
4 característica sugere o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das lesões, ao
5 invés do efeito tóxico direto causado pelos componentes celulares deste microrganismo. Os
6 micoplasmas são capazes de ativar a mitose de linfócitos B e T, escapando das defesas
7 naturais do hospedeiro fixando-se firmemente à mucosa respiratória. Sua localização no
8 lúmen pode explicar a dificuldade de eliminação do agente. Algumas espécies patogênicas
9 utilizam a maquinaria genética para alterar antígenos de superfície através da variação de fase,
10 da variação do tamanho e do mascaramento de epitopos de proteínas de superfície. Dessa
11 forma, estes microrganismos conseguem desviar a resposta imune do hospedeiro e estabelecer
12 a infecção crônica (RAZIN et al., 1998).

13 Com o seqüenciamento da cepa patogênica 232 de *M. hyopneumoniae*, foram
14 identificados genes para proteases, para lipoproteínas (8,5% do genoma) e para adesinas, os
15 quais provavelmente contribuem na patogenia do agente (MINION et al., 2004). As
16 lipoproteínas são os principais componentes de membrana dos micoplasmas e normalmente
17 sofrem uma variação antigênica frente à resposta imune do hospedeiro (RAZIN et al., 1998).
18 Os dados gerados com o seqüenciamento e a análise comparativa de duas cepas de *M.*
19 *hyopneumoniae*, uma patogênica (7448) e outra não-patogênica (J), permitiram a identificação
20 de regiões cepa-específica que podem estar relacionadas com a patogenicidade
21 (VASCONCELOS et al., 2005). Proteínas especificamente reconhecidas durante a infecção
22 por *M. hyopneumoniae* têm sido descritas (CHEN et al., 2003, 2008; SCHMIDT et al., 2004;
23 MEENS et al., 2006) e podem desempenhar uma importante função fisiológica e/ou
24 patogênica. Porém, estudos adicionais são necessários para elucidar o papel destes antígenos

1 durante a infecção, bem como dos mecanismos envolvidos na patogenia do *M.*
2 *hyopneumoniae*.

3 A análise minuciosa do genoma de três cepas (7448, J e 232) de *M. hyopneumoniae*
4 (MINION et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005), revelou a presença de um provável
5 elemento integrativo conjugativo (EIC) presente nas duas cepas patogênicas (7448 e 232) e
6 ausente na cepa não patogênica (J). Os resultados sugerem que o EIC é um DNA móvel e
7 provavelmente envolvido em eventos de recombinação genética e na patogenicidade deste
8 patógeno (PINTO et al., 2007).

9

10 **4. Sinais clínicos e lesões**

11 O sinal clínico característico da PES é tosse seca não produtiva, principalmente em
12 suínos em estágio final do ciclo produtivo. Sintomas como febre, anorexia e dificuldade na
13 respiração podem ocorrer na presença de co-infecção com outros patógenos. O ataque de
14 tosse, embora gradual, pode ser inconsistente e com intensidade variável dependendo da dose
15 infectiva do *M. hyopneumoniae*. Para identificar suínos com tosse não produtiva, estes são
16 observados por um longo período de tempo e encorajados ao movimento (VICCA et al., 2003;
17 MAROIS et al., 2007).

18 Muitos animais não manifestam sinais clínicos aparentes, porém podem apresentar
19 retardo no crescimento (KOBISCH, 1996). Em propriedades nas quais os animais são
20 acometidos pela doença é comum observar grandes disparidades no desenvolvimento entre
21 leitões da mesma faixa etária (PIFFER, 1983). No pulmão, as lesões macroscópicas da PES
22 são constituídas por zonas de consolidação. Na maioria dos suínos, as lesões afetam apenas
23 porções dos lobos craniais e acessórios, mas em suínos mais intensamente afetados, as lesões
24 podem envolver 50% ou mais das porções crânio ventrais do pulmão. Os pulmões afetados
25 nos estágios iniciais são vermelho-escuros e nos estágios mais crônicos da doença têm um

1 aspecto cinza-pálido homogêneo. Nos estágios iniciais e medianos da doença existe
2 geralmente um exsudato catarral nas vias aéreas (CARLTON et al., 1998).

3 Microscopicamente, nos estágios iniciais da doença, observa-se perda de cílios,
4 esfoliação e discreto acúmulo de neutrófilos ao redor das vias aéreas e dos alvéolos. Com a
5 evolução da doença, há um aumento de número de linfócitos nos tecidos peribrônquiais,
6 perivasculares e na lamina própria das vias aéreas. No estágio crônico da doença, há
7 hiperplasia linfóide, acúmulo de células mononucleares e inflamatórias e conseqüentemente,
8 espessamento dos septos interalveolares. Por outro lado, colapso alveolar, enfisema alveolar e
9 nódulos linfóides podem ser observados em lesões em resolução (ROSS, 1999). Essas lesões
10 não são totalmente específicas da PES, porém são extremamente sugestivas da doença e, nos
11 casos em que há complicações bacterianas, a exsudação neutrofílica é abundante no interior
12 dos alvéolos, dos bronquíolos e dos brônquios (SOBESTIANSKY et al., 1999).

13

14 **5. Diagnóstico**

15 Várias metodologias são usadas para monitorar a infecção causada pelo *M.*
16 *hyopneumoniae*. Sinais clínicos e a presença de lesões são utilizados como diagnóstico
17 presuntivo da PES, no entanto testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico
18 conclusivo. Embora a cultura do *M. hyopneumoniae* seja descrita como padrão ouro, a mesma
19 não é utilizada como rotina de diagnóstico (SIBILA et al., 2008). O isolamento em meio Friis
20 é difícil devido à baixa taxa de crescimento deste patógeno (FRIIS, 1975). Além disso, a
21 presença de outros micoplasmas ou de outras bactérias pode impedir o crescimento do *M.*
22 *hyopneumoniae*, tornando ainda mais difícil o isolamento em culturas puras, provenientes de
23 amostras de campo. Dessa forma, o insucesso no isolamento do *M. hyopneumoniae* sob
24 condições de campo, não é um critério que pode ser usado para confirmar ou negar a presença
25 deste agente no rebanho (THACKER, 2004).

1 Testes sorológicos são comumente utilizados para monitorar o “status” sanitário dos
2 rebanhos. A detecção de anticorpos de *M. hyopneumoniae* pode ser realizada através de
3 ELISA, um método automatizado rápido que fornece informações úteis quanto à presença de
4 anticorpos derivados matematicamente ou adquiridos (SIBILA et al., 2008). Atualmente os mais
5 utilizados são ELISA de bloqueio (IDEI, *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA kit, Oxoid) e dois
6 tipos de ELISA indireto (HerdCheck, IDEXX e Tween 20-ELISA). Estudos comparativos
7 reportaram divergências quanto à sensibilidade e especificidade destes kits (SORENSEN et
8 al., 1997; STRAIT et al., 2004; ERLANDSON et al., 2005). A associação de outros testes,
9 como *Western blot*, pode ser usada para confirmar os resultados divergentes obtidos no
10 ELISA (AMERI et al., 2006). No entanto, além da variação nos resultados do ELISA
11 dependendo do protocolo utilizado (ERLANDSON et al., 2005) outras desvantagens dos
12 testes sorológicos já foram descritas: incapacidade de diferenciar a infecção natural da
13 vacinação; variação na detecção de anticorpos induzidos por diferentes cepas de *M.*
14 *hyopneumoniae* (STRAIT et al., 2004); significativa variabilidade no tempo que os animais
15 levam para soroconverter (SORENSEN et al., 1997). SORENSEN et al. (1997) e
16 ERLANDSON et al. (2005) relataram que os kits comerciais de ELISA têm alta
17 especificidade, porém uma baixa sensibilidade o que pode resultar num alto número de falsos
18 negativos dentro do rebanho, além de dificultar o diagnóstico individual dos animais.
19 Portanto, é necessário cuidado quando se usa somente a sorologia para determinar a ausência
20 deste agente no rebanho. Estes dados justificam a necessidade do desenvolvimento de
21 métodos de diagnóstico mais eficiente que possam superar estas dificuldades.

22 OKADA et al. (2005) utilizou um anticorpo monoclonal anti-P46 e a proteína
23 recombinante P46 em um ELISA duplo-sanduíche. O teste foi específico para *M.*
24 *hyopneumoniae*. Porém é necessário avaliar se o teste é capaz de diferenciar anticorpos
25 induzidos pela vacina de animais infectados naturalmente. Um ELISA indireto utilizando

1 como antígeno a região N-terminal e C-terminal da P97 foi proposto. No entanto, somente a
2 região C-terminal foi considerada adequada para uso como sorodiagnóstico (JAN & KIM,
3 2007). Apesar da importante contribuição destes estudos, é fundamental que outros antígenos
4 de *M. hyopneumoniae* também sejam testados, buscando o desenvolvimento de testes
5 diagnósticos mais sensíveis e específicos para o controle mais efetivo da PES.

6 PCR tem sido descrito como a técnica mais sensível para detecção de infecções
7 causadas pelo *M. hyopneumoniae* (CALSAMIGLIA et al., 1999). Diferentes variações da
8 técnica, bem como a utilização de diferentes alvos já foram descritos (VERDIN et al., 2000;
9 CARON et al., 2000; KURTH et al., 2002; DUBOSSON et al., 2004; STAKENBORG et al.,
10 2006; CAI et al., 2007; STRAIT et al., 2008). O uso de PCR para o diagnóstico da infecção
11 natural a partir de swab nasal foi descrito como o mais promissor, uma vez que houve
12 correlação entre a detecção do DNA do *M. hyopneumoniae* e a presença de lesões da PES
13 (SIBILA et al., 2004; 2007b). O teste ideal seria aquele rápido, com baixo custo, capaz de
14 detectar o patógeno durante o curso da doença, bem como animais portadores e, portanto apto
15 a fornecer dados para uso na implementação de medidas de controle.

16

17 **6. Medidas de controle da PES**

18 A infecção causada pelo *M. hyopneumoniae* pode ser controlada através da soma de
19 vários fatores como a otimização de práticas de manejo e de condições de alojamento, uso de
20 antimicrobianos e vacinação. A melhoria nas práticas de manejo é primordial para o controle
21 da infecção causada pelo *M. hyopneumoniae* e a primeira medida que deve ser tomada. O
22 sistema de produção *all-in, all-out* (AIAO) é o mais indicado para o controle da PES porque
23 ele interrompe o ciclo de transmissão do patógeno para outros suínos jovens (MAES et al.,
24 1999). Além disso, a mistura de suínos é fonte de estresse para os animais o que aumenta a
25 probabilidade de transmissão de doenças. Rebanhos com sistemas de produção fechados

1 apresentam imunidade mais estável. O risco de desestabilização da imunidade dos rebanhos
2 aumenta na compra de animais, especialmente quando estes são provenientes de diferentes
3 fontes. Além disso, é fundamental conhecer o status sanitário do rebanho de onde os animais
4 são provenientes (AMASS & BAYSINGER, 2006).

5 A redução na densidade de suínos nos diferentes estágios da produção tem reduzido os
6 números de doenças respiratórias. Uma superlotação de suínos pode aumentar a transmissão
7 de patógenos respiratórios e de estresse, deixando os animais mais susceptíveis a doenças
8 infecciosas. Porém, numa criação intensiva a baixa densidade de suínos é economicamente
9 inviável. Portanto, é recomendável encontrar a densidade apropriada para o status sanitário do
10 lote capaz de maximizar o retorno financeiro (MAES et al., 2007).

11 A prevenção de outras doenças como as do complexo de doenças respiratórias de
12 suínos (PRDC) contribuem para o controle da infecção causada pelo *M. hyopneumoniae*.
13 Estudos demonstraram que a infecção simultânea por PRDC aumenta significativamente os
14 níveis de anticorpos em resposta ao *M. hyopneumoniae*, enquanto diminui a eficácia das
15 vacinas (THACKER et al., 1999). Outras medidas como de biosegurança (BATISTA et al.,
16 2004) e melhoria nas condições de alojamento (GONYOU et al., 2006), são fatores
17 importantes a serem observados para obter rebanhos mais saudáveis.

18 Antimicrobianos como tetraciclina e macrolídeos são frequentemente usados no
19 tratamento de doenças respiratórias como a PES. Antimicrobianos ou a combinação destes são
20 ativos também contra bactérias secundárias que frequentemente complicam a infecção
21 causada pelo *M. hyopneumoniae* (VICCA et al., 2004). Suínos tratados com alguns
22 antimicrobianos tiveram um melhor desempenho e redução nos sintomas clínicos e lesões no
23 pulmão (VICCA et al., 2005). Porém, os sintomas da doença podem aparecer quando o
24 tratamento for interrompido. A medicação contínua ou por longos períodos, durante um ou
25 mais estágios de produção, aumentam o risco de desenvolvimento de resistência do *M.*

1 *hyopneumoniae* além de haver um possível risco de resíduos de antimicrobianos nas carcaças
2 de suínos ao abate (LE GRAND E KOBISCH, 1996). Apesar dos benefícios com o uso de
3 antimicrobianos no controle das infecções causadas pelo *M. hyopneumoniae* (THACKER et
4 al., 2004), essa prática parece não ser a mais eficiente para obter rebanhos livres ou com PES
5 controlada.

6

7 **7. Vacinas**

8 Nem a medicação preventiva e nem a vacinação podem impedir a aderência do *M.*
9 *hyopneumoniae* às células ciliadas do trato respiratório (THACKER et al., 1998, 2000a;
10 MAES et al., 1999; MOREAU et al., 2004). O uso e a eficiência da vacinação como medida
11 de controle e erradicação da PES é frequentemente discutida. O efeito da vacinação em suínos
12 jovens é demorado, ao contrário dos antimicrobianos cujo efeito é imediato. Outras infecções
13 bacterianas secundárias, normalmente causadas por *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus*
14 *pleuropneumoniae*, ou lesões de pulmão causadas por esses patógenos, são frequentemente
15 encontrados depois da vacinação contra o *M. hyopneumoniae* (MEYNS et al., 2006). No
16 entanto, a vacinação é considerada umas das práticas mais efetivas no controle da infecção
17 causada pelo *M. hyopneumoniae* (MATEUSEN et al., 2002; MEYNS et al., 2006).

18 As vacinas disponíveis comercialmente são compostas por células inteiras inativadas
19 de *M. hyopneumoniae* administradas com adjuvantes. Estas preparações são mundialmente
20 utilizadas no controle das infecções causadas por este patógeno. O principal efeito da
21 vacinação inclui diminuição dos sintomas clínicos, redução no tamanho das lesões
22 pulmonares e melhoria no desempenho dos suínos (ganho de peso diário e taxa de conversão
23 alimentar) (MAES et al., 1999). No entanto, as bacterinas fornecem apenas uma proteção
24 parcial e não previnem a colonização do organismo (THACKER et al., 1998, 2000a). As
25 vacinas comerciais usadas atualmente podem reduzir o número de organismos no trato

1 respiratório (MEYNS et al., 2006) e conseqüentemente, o nível de infecção nos rebanhos
2 (SIBILA et al., 2007a). Os efeitos benéficos máximos da vacinação são atingidos vários
3 meses depois da administração (HAESEBROUCK et al., 2004). Embora esta prática diminua
4 significativamente os sintomas clínicos e as lesões pulmonares nos suínos, foi obtida apenas
5 uma redução limitada e não significativa na transmissão deste agente (MEYNS et al., 2006).
6 Estes achados reforçam a idéia de que só a vacinação não é suficiente para eliminar o *M.*
7 *hyopneumoniae* de rebanhos de suínos infectados.

8 O mecanismo exato de proteção conferido por estas bacterinas não está totalmente
9 esclarecido, entretanto estudos sugerem que os anticorpos de mucosa e resposta imune
10 sistêmica mediada por células são importantes no controle da doença (THACKER et al.,
11 2000a). Porém, a correlação entre a produção de anticorpos locais específicos e a proteção
12 contra a pneumonia ainda não foi esclarecida. Experimentos de desafio em suínos
13 demonstraram que a concentração de anticorpos no trato respiratório de suínos não esteve
14 relacionada à proteção contra a pneumonia (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al.,
15 1998).

16 As vacinas comerciais também induzem anticorpos específicos no soro, no entanto a
17 resposta sorológica pode ser diferente entre as vacinas (THACKER et al., 1998) e a taxa de
18 soroconversão entre os animais pode variar de 30 até 100% (SIBILA et al., 2004). A presença
19 de anticorpos no soro também não foi correlacionada à proteção contra a infecção causada
20 pelo *M. hyopneumoniae* (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al., 1998). Dessa forma, a
21 presença e a concentração de anticorpos locais ou no soro não é a forma mais apropriada para
22 avaliar a imunidade protetora. Embora a vacinação confira efeitos benéficos em lotes de
23 suínos infectados, estes efeitos costumam variar entre os rebanhos. A redução na eficiência da
24 vacinação pode ser resultado da variabilidade entre diferentes isolados de *M. hyopneumoniae*
25 (CALUS et al., 2007).

1

2 **8. Desenvolvimento de novas vacinas**

3 Além da limitada proteção conferida pelas bacterinas, estas apresentam elevado custo
4 de produção devido à dificuldade no cultivo do *M. hyopneumoniae* (KOBISCH & FRIIS,
5 1996). Dessa forma, há necessidade do desenvolvimento de uma vacina mais eficiente contra
6 a PES e com baixo custo. A tecnologia do DNA recombinante pode ser usada para superar
7 problemas encontrados com as vacinas convencionais. Apesar do genoma de três cepas de *M.*
8 *hyopneumoniae* terem sido seqüenciados (MINION et al., 2004; VASCONCELOS et al.,
9 2005), poucos antígenos recombinantes, foram avaliados como candidatos a vacinas (KING et
10 al., 1996; FAGAN et al., 2001; CHEN et al., 2003, 2008). O genoma pequeno deste agente
11 bem como, o número limitado de proteínas secretadas ou de superfície, favorece o uso da
12 abordagem denominada vacinologia reversa (RAPPUOLI, 2001; CAPECCHI et al., 2004).
13 Porém, o *M. hyopneumoniae* não utiliza o código genético universal (RAZIN et al., 1998).
14 Esta diferença tem dificultado à expressão de genes de *M. hyopneumoniae* contendo códons
15 TGA em *E. coli*, a espécie normalmente usada para expressar genes heterólogos em
16 laboratório (NUC & NUC, 2006). Mutações pontuais capazes de substituir o TGA por TGG
17 tem sido a estratégia utilizada para contornar este problema. Para tanto, várias metodologias,
18 incluindo kits comerciais, já foram utilizadas, mas somente 5 genes de *M. hyopneumoniae*
19 haviam sido mutados até o ano de 2007. SIMIONATTO et al. (2008) descreveram a
20 otimização de um protocolo de PCR para a mutação sítio dirigida no códon TGA de genes de
21 *M. hyopneumoniae*. Utilizando esse protocolo, 14 genes tiveram o TGA substituído
22 eficientemente por TGG, o que possibilitou a clonagem e expressão destes genes em *E. coli*.

23 Pesquisas com novas abordagens vacinais vêm sendo propostas, buscando o
24 desenvolvimento de vacinas mais eficientes no controle da PES, incluindo desde formulações
25 com alimento até vacinas de subunidade e de DNA (CHEN et al., 2001, 2003, 2006a, 2006b,

1 2008; FAGAN et al., 2001; LIN et al., 2003; SHIMOJI et al., 2003; CONCEIÇÃO et al.,
2 2006; OKAMBA et al., 2007). A adesina P97 de *M. hyopneumoniae* é o antígeno mais
3 estudado e vários trabalhos utilizando diferentes abordagens já foram descritos. KING et al.
4 (1996) descreveram que uma vacina de subunidade recombinante baseada na adesina P97 de
5 *M. hyopneumoniae* induziu proteção, porém não significativa em suínos desafiados. Quando a
6 região C-terminal da P97 (R1) foi fusionada a toxina A de *Pseudomonas*, camundongos e
7 suínos imunizados com essa vacina de subunidade produziram resposta imune específica
8 composta por IgG contra a R1 (CHEN et al., 2001). SHIMOJI et al. (2003) descreveram que a
9 cepa YS-19 atenuada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* expressando a região a R1 da P97 foi
10 capaz de reduzir as lesões da pneumonia no pulmão de suínos imunizados por via intranasal
11 (IN), quando estes foram desafiados. Porém, não foi observada resposta imune humoral ou
12 mediada por células. Camundongos imunizados oralmente com *Salmonella typhimurium* aroA
13 CS332 codificando a R1 da P97 (CHEN et al., 2006a) e a subunidade R2 da ribonucleotídeo
14 redutase (NRDF) de *M. hyopneumoniae* (CHEN et al., 2006b), produziram resposta imune
15 baseada em Th1, mas não foram capazes de induzir resposta imune humoral ou de mucosa.
16 Porém, quando a NRDF foi expressa em *S. typhimurium* aroASL3261 somente resposta
17 imune de mucosa foi observada em camundongos (FAGAN et al., 1997). Essa construção foi
18 avaliada em suínos e foi capaz de reduzir as lesões pulmonares causadas pela PES (FAGAN
19 et al., 2001). CONCEIÇÃO et al., (2006) descreveram que uma vacina de subunidade
20 recombinante contendo a região R1 da P97 fusionada à subunidade B da enterotoxina
21 termolábil de *E. coli* (rLTBR1), induziu em camundongos, anticorpos sistêmicos anti-R1 e de
22 mucosa (IgA). Quando a imunização foi IN a resposta imune induzida foi preferencialmente
23 Th1 e quando a via foi intra-muscular (IM) houve indução de resposta Th2 e de mucosa. Um
24 estudo mais recente demonstrou que camundongos imunizados IN com um adenovírus
25 defeituoso expressando a região C-terminal da P97 induziu resposta imune sistêmica

1 Th1/Th2, bem como imunidade local (OKAMBA et al., 2007). A diferença no tipo de
2 imunidade induzida por estes antígenos pode ser influenciada pela diferença na construção
3 vacinal, pela rota de imunização, pelo dobramento correto e/ou outra modificação pós
4 traducional que pode contribuir na habilidade de gerar anticorpos pelo antígeno (PINTO et al.,
5 2007).

6 Vários experimentos com vacinas de DNA foram desenvolvidos e a resposta imune
7 testada em camundongos (CHEN et al., 2003; CHEN et al., 2006b; CHEN et al., 2008).
8 Resposta imune significativa com vacina de DNA baseada na expressão da proteína de
9 choque térmico P42 (CHEN et al., 2003) e com a NRDF (CHEN et al., 2006b) foi obtida em
10 camundongos. Cinco antígenos imunogênicos de *M. hyopneumoniae* (P97, P97R1, NRDF,
11 P36 e P46), foram avaliados em camundongos como vacinas de DNA e de subunidade
12 recombinante (CHEN et al., 2008). A análise no soro de camundongos imunizados com
13 coquetel destes antígenos administrados como vacina de DNA, revelou que somente os
14 antígenos P97 e P36 induziram IgG específico no soro. Quando estas proteínas foram
15 confrontadas com soros de camundongos imunizados com a bacterina comercial, somente a
16 P36 e P46 foram reconhecidas por anticorpos presentes neste soro. Estes antígenos podem ser
17 expressos constitutivamente pelo *M. hyopneumoniae*, o que explicaria este resultado. Estes
18 achados merecem maiores investigações, pois se a hipótese se confirmar, estes alvos podem
19 ser essenciais à sobrevivência do patógeno e conseqüentemente, alvos potencialmente
20 protetores para o uso no desenvolvimento de vacinas. Ainda nesse estudo, a imunização IM
21 com coquetel de antígenos como vacina de DNA induziu resposta imune Th1 e, a resposta
22 imune humoral pareceu ser antígeno dependente. A imunização subcutânea com o mesmo
23 coquetel de antígenos, mas como vacina de subunidade recombinante induziu a resposta
24 imune humoral e Th1. Quando foi usada a combinação de vacina de DNA e de subunidade,
25 ambas as respostas Th1 e humoral foram obtidas (CHEN et al., 2008).

1 Os estudos sugerem que estas abordagens vacinais podem representar novas e
2 promissoras estratégias para o controle da infecção causada pelo *M. hyopneumoniae*. No
3 entanto, precisam ser avaliadas em suínos sob condições experimentais e de campo. Destas
4 formulações, somente duas foram avaliadas em experimentos de desafio em suínos com *M.*
5 *hyopneumoniae* (FAGAN et al., 2001; SHIMOJI et al., 2003), porém nenhuma delas foi mais
6 eficiente do que as bacterinas comerciais no controle da PES. Somente reduziram a
7 severidade das lesões pulmonares. A identificação e caracterização de novos antígenos
8 imunogênicos do *M. hyopneumoniae* irá contribuir para o desenvolvimento de novas vacinas
9 realmente efetivas no controle desta doença, bem como de testes sorológicos mais eficientes.

10

11 **CONCLUSÃO**

12 O controle da PES pode ser obtido através da soma de vários fatores como a
13 otimização de práticas de manejo e de condições de alojamento, o uso de antimicrobianos e
14 vacinação. Embora estas medidas contribuam para a melhoria das condições sanitárias do
15 lote, elas não garantem a ausência da infecção causada pelo *M. hyopneumoniae*. O
16 seqüenciamento do genoma de *M. hyopneumoniae* tem despertado interesse em buscar
17 metodologias mais eficientes para o monitoramento e controle desta doença. No entanto, para
18 o desenvolvimento de vacinas mais efetivas é fundamental que novos antígenos
19 imunogênicos, capazes de induzir imunidade protetora, sejam identificados.

20

21 **AGRADECIMENTOS**

22 Este trabalho teve apoio financeiro da FAPERGS e do CNPq. S. S. e S. B. M.
23 receberam bolsa de doutorado da CAPES.

24

25 **REFERÊNCIAS**

- 1 ADAMS, C. et al. In Vivo Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of
2 *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.73, p.7784-7787, 2005.
- 3 AMASS, S.; BAYSINGER A. Swine disease transmission and prevention. In: STRAW, B.E.;
4 ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**, 9th edition,
5 Blacwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2006. Cap. 68, p.1075-1098.
- 6 AMERI, M. et al. Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-
7 *Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. **Journal of Veterinary Diagnostic**
8 **Investigation**, v.18, p.198–201, 2006.
- 9 BATISTA, L. et al. Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by
10 personnel. **Journal Swine Health and Production**, v.12, p.75-77, 2004.
- 11 BARGEN, L. E. A system response to an outbreak of enzootic pneumonia in grow/finish pigs.
12 **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p.856-859, 2004.
- 13 CAI, H.Y. et al. Application and field validation of a PCR assay for the detection of
14 *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. **Journal of Veterinary**
15 **Diagnostic Investigation**, v.19, p.91–95, 2007.
- 16 CALSAMIGLIA, M. et al. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect
17 *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic**
18 **Investigation**, v.11, p.246–251, 1999.
- 19 CALUS, D. et al. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates.
20 **Veterinary Microbiology**, v.120, p.284–291, 2007.
- 21 CAPECCHI, B. et al. The genome revolution in vaccine research. **Current Issues in**
22 **Molecular Biology**, v.6, p.17-27, 2004.
- 23 CARLTON, W. W.; MCGRAVIN. **Patologia Veterinária Especial de Thompson**. Artemed,
24 2ªed. 1998, p.173.

- 1 CARON, J. et al. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and
2 *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes.
3 **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1390–1396, 2000.
- 4 CASTRO, L.A. et al. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS
5 products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.258-
6 269, 2006.
- 7 CHEN, J.R. et al. A recombinant chimere composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma*
8 *hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: *in vivo* evaluation of specific IgG
9 response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 80, p.347-357, 2001.
- 10 CHEN, Y.L. et al. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat
11 shock protein antigen P42 by DNA vaccination. **Infection and Immunity**, v.71, p.1155–1160,
12 2003.
- 13 CHEN, A.Y. et al. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma*
14 *hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.
15 923–929, 2006a.
- 16 CHEN, A.Y. et al. Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in
17 different expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice.
18 **Veterinary Microbiology**, v.114, p.252–259, 2006b.
- 19 CHEN, A.Y. et al. Evaluation of immune response to recombinant potential protective
20 antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant
21 protein vaccines in mice. **Vaccine**, v.26, p.4372-4378, 2008.
- 22 CONCEIÇÃO, F.R. et al. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of
23 *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B
24 subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v.24, p.5734–5743, 2006.

- 1 DESROSIERS, R. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of
2 *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **Journal Swine Health and Production**, v.9, p.233-
3 237, 2001.
- 4 DJORDJEVIC, S. et al. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs
5 vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured
6 membrane antigen pool and adjuvant. **Australian veterinary journal**, v.75, p.504–511, 1997.
- 7 DUBOSSON, C.R. et al. Development of two real-time PCR assays for the detection of
8 *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v.102, p.55–65,
9 2004.
- 10 DYBVIG, K.; VOELKER, L.L. Molecular Biology of Mycoplasmas. **Annual review of**
11 **microbiology**, v.50, p.25–57, 1996.
- 12 ERLANDSON, K.R. et al. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent
13 assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal Swine Health and Production**, v.13,
14 p.198–203, 2005.
- 15 FAGAN, P.K. et al. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium*
16 *aroA* expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). **Infection and**
17 **Immunity**, v.65, p.2502-2507, 1997.
- 18 FAGAN, P. et al. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella Typhimurium aroA*
19 SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the
20 immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microbial**
21 **pathogenesis**, v.30, p.101–110, 2001.
- 22 FRIIS, N.F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma*
23 *hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. **Nord Veterinary Medicine**, v.27,
24 p.337-339, 1975.

- 1 GONYOU, H. et al. Effects of the environment on productivity and disease. In: STRAW,
2 B.E. et al. **Diseases of Swine**. Blacwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2006. Cap 64, p.1027-
3 1038.
- 4 HAESEBROUCK, F. et al. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can
5 we expect? **Veterinary Microbiology**, v.100, p.255–268, 2004.
- 6 HSU, T.; MINION, F.C. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma*
7 *hyopneumoniae* P97 adhesin. **Infection and Immunity**, v.66, p.4762-4766, 1998.
- 8 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2008. Acessado em 24 de agosto 2008.
9 On line. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>
- 10 JANG, E.J.; KIM, T.J. In vitro expression of the 50-kDa and 30-kDa fragments of the P97
11 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* and their use for serodiagnosis.
12 **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.278–282, 2007.
- 13 KING, K. et al. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma*
14 *hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. **Vaccine**, v.15, p.25-35, 1996.
- 15 KOBISCH, M.; FRIIS, N.F. Swine mycoplasmoses. **Review Scientific and Technical of the**
16 **Office International des Epizooties**, v.15, p.1569–1605, 1996.
- 17 KURTH, K.T. et al. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction
18 test to determine the optimal sampling sites in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic**
19 **Investigation**, v.14, p.463–469, 2002.
- 20 LE GRAND, A.; KOBISCH, M. Comparison del'utilisation d'un vaccin et d'un traitement
21 antibiotique séquentiel dans un élevage infecté par *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary**
22 **Research**, v.27, p.241–253, 1996.

- 1 LIN, J. et al. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae*
2 vaccine prepared by co-spray drying method. **The Journal of Veterinary Medical Science**,
3 v.65, p.69–74, 2003.
- 4 MAES, D. et al. Enzootic pneumonia in pigs. **Veterinary Quarterly**, v.18, p.104-109, 1996.
- 5 MAES, D. et al. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with
6 an all-in/all-out production system. **Vaccine**, v.17, p.1024–1034, 1999.
- 7 MAES, D. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary**
8 **Microbiology**, v.126, p.297-309, 2007.
- 9 MAROIS, C. et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in
10 experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.96–104,
11 2007.
- 12 MATEUSEN, B. et al. Effectiveness of treatment with lincomycin hydrochloride and/or
13 vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* for controlling chronic respiratory disease in
14 a herd of pigs. **The Veterinary Record**, v.151, p.135-140, 2002.
- 15 MEENS, J. et al. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma*
16 *hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.85–
17 95, 2006.
- 18 MEYNS, T. et al. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated
19 and non-vaccinated populations. **Vaccine**, v.24, p.7081–7086, 2006.
- 20 MINION, F.C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the
21 agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.7123–7133, 2004.

- 1 MOREAU, I.A. et al. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally
2 infected with *M. hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
3 **Vaccine**, v.22, p.2328-2333, 2004.
- 4 NUC, P.; NUC K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Postepy Biochemi**, v.
5 52, p.448-456, 2006.
- 6 OKADA, M. et al. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-
7 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant
8 antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.251-259,
9 2005.
- 10 OKAMBA, F. et al. Immune responses induced by replication-defective adenovirus
11 expressing the C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*-P97 adhesin. **Clinical and**
12 **Vaccine Immunology**, v.14, p.767–774, 2007.
- 13 PIFFER, I.A. **Pneumonia Enzoótica dos Suínos**. EMBRAPA – CNPSA, 1983. 23 p.
14 (Circular Técnica).
- 15 PINTO, P.M. et al. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain
16 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins.
17 **Veterinary Microbiology**, v.121, p.83–93, 2007.
- 18 RAPPUOLI R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development.
19 **Vaccine**, v.19, p.2688-2691, 2001.
- 20 RAZIN, S. et al. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and**
21 **Molecular Biology Reviews**, v. 62, p.1094–1156, 1998.
- 22 RODRÍGUEZ, F. et al. Immunohistochemical Labelling of Cytokines in Lung Lesions of Pigs
23 Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**,
24 v.130, p.306-312, 2004.

- 1 ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E. et al. **Diseases of Swine**. Iowa State
2 University Press, Ames, 1999. Cap.36, p. 495–505.
- 3 SCHMIDT, J.A. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 Surface Lipoprotein Is a Lipolytic
4 Enzyme with a Preference for Shorter-Chain Fatty Acids. **Journal of Bacteriology**, v.186,
5 n.17, p.5790-5798, 2004.
- 6 SHIMOJI, Y. et al. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19
7 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against
8 mycoplasmal pneumonia of swine. **Vaccine**, v.21, p.532–537, 2003.
- 9 SIBILA, M. et al. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in twelve farms with
10 different production systems. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.68, p.12–18,
11 2004.
- 12 SIBILA, M. et al. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in
13 suckling pigs. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.352–356, 2007a.
- 14 SIBILA, M. et al. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection,
15 seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs.
16 **Veterinary Microbiology**, v.122, p.97–107, 2007b.
- 17 SIBILA, M. et al. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma*
18 *hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020.
19 2008.
- 20 SIMIONATTO, S. et al. Efficient site directed mutagenesis using an overlap extension-PCR
21 method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. **Applied**
22 **Microbiology and Biotechnology**, unpublished 2008.
- 23 SOBESTIANSKY, J. et al. Pneumonia Enzoótica. **Clinica e Patologia Suína**. p. 361, 1999.

- 1 SØRENSEN, V. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease
2 and evaluation of four diagnostic assays. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p.23–34, 1997.
- 3 STAKENBORG, T. et al. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma*
4 *hyopneumoniae* isolates. **Journal Microbiology Methods**, v. 66, p.263–275, 2006.
- 5 STÄRK, K.D.C. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors
6 on respiratory diseases in swine - A literature review. **Veterinary Journal**, v.159, p.37-56,
7 2000.
- 8 STRAIT, E.L. et al. Analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. In: American
9 Association of Swine Veterinarians Annual Meeting, 2004, Des Moines, Iowa, p. 95.
- 10 STRAIT, E. L. et al. Real-time PCR assays to address genetic diversity in *Mycoplasma*
11 *hyopneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2491-2498, 2008.
- 12 STÄRK, K. D. C. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors
13 on respiratory diseases in swine – A literature review. **Veterinary Journal**, v.159, p.37-56,
14 2000.
- 15 THACKER, E. et al. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and
16 protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. **Journal**
17 **Swine Health and Production**, v. 6, p.107–112, 1998.
- 18 THACKER, E.L. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive and
19 Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37,
20 p.620-627, 1999.
- 21 THACKER, E. et al. Evaluation of local and systemic immune responses induced by
22 intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal**
23 **of Veterinary Research**, v.61, p.1384–1389, 2000a.

- 1 THACKER, E.L et al. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and
2 respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*.
3 **Vaccine**, v.18, p.1244–1252, 2000b.
- 4 THACKER, E. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal Health Research**
5 **Reviews**, v.5, p.317–320, 2004.
- 6 THACKER, E. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E. et al. **Diseases of Swine**. Blacwell
7 Publishing Ltd., Oxford, UK, 2006. Cap.42, p.701–717.
- 8 VASCONCELOS, A.T. et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences
9 of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal**
10 **of Bacteriology**, v. 187, p.5568–5577, 2005.
- 11 VERDIN, E. et al. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in
12 tracheobronchiolar washing from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.31–40, 2000.
- 13 VICCA, J. et al. Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infections in Belgian Farrow-to-
14 Finish Pig Herds with Diverging Disease-Course. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.49,
15 p.349–353, 2002.
- 16 VICCA, J. et al. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates.
17 **Veterinary Microbiology**, v.97, p.177–190, 2003.
- 18 VICCA, J. et al. In Vitro Susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates.
19 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p.4470-4472, 2004.
- 20 VICCA, J. et al. Efficacy of in-feed medication with tylosin for the treatment and control of
21 *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **The Veterinary Record**, v.156, p.606-610, 2005.
- 22 WALKER, R.L. *Mollicutes*. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de
23 Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. p.155-162,.

- 1 ZHANG, Q. et al. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae*
- 2 adhesin, **Infection and Immunity**, v.63, p.1013–1019, 1995.
- 3 ZIELINSKI, C., ROSS, F.R. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated
- 4 respiratory tract cells. **American Journal Veterinary Research**, v.54, p.1262- 1269, 1993.
- 5

3 ARTIGO 2

1
2
3
4
5 **EFFICIENT SITE DIRECTED MUTAGENESIS USING AN OVERLAP EXTENSION-**
6 **PCR METHOD FOR CLONING AND EXPRESSION OF *Mycoplasma***
7 ***hyopneumoniae* GENES IN *Escherichia coli***

8
9
10 (Artigo submetido ao periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*)
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 **Efficient site directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for**
2 **expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli***

3

4 Simone Simionatto, Silvana B. Marchioro, Daiane D. Hartwig, Vanessa Galli, Tessália D.
5 Luerce, Ângela N. Moreira, Odir A. Dellagostin*

6

7 Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de
8 Pelotas, RS, Brazil

9

10 Running title: Site-directed mutagenesis of *M. hyopneumoniae* genes

11

12

13 *Corresponding author:

14 Odir Antônio Dellagostin

15 Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia,

16 Universidade Federal de Pelotas,

17 Campus universitário S/N; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas - RS; Brazil.

18 odir@ufpel.edu.br

19

1 **ABSTRACT**

2 *Mycoplasma hyopneumoniae*, the causative agent of porcine enzootic pneumonia,
3 causes significant economic losses to swine production worldwide. Vaccination is the most
4 cost-effective strategy for controlling and prevention of this disease. The development of new
5 recombinant subunit vaccines is hampered by the unusual codon usage of this bacterium. To
6 express *M. hyopneumoniae* proteins in heterologous cells, mycoplasmal TGA codons
7 (tryptophan) need to be replaced with the universal TGG codon. In this study we evaluated an
8 overlap extension-PCR method for site-directed mutagenesis of *M. hyopneumoniae* genes.
9 Primers carrying the appropriate TGA for TGG substitution were used in a three round PCR.
10 The mutated genes were cloned into expression vectors and sequenced to confirm the
11 mutation. Using this method, we have successfully obtained fourteen genes of *M.*
12 *hyopneumoniae* mutated with up to three TGA to TGG substitutions simultaneously.
13 Expression of the mutated genes in *Escherichia coli* was achieved. The method was rapid,
14 simple and 100% efficient in introducing the desired mutations in the A+T rich *M.*
15 *hyopneumoniae* genes.

16

17 Key words: *Mycoplasma*, mutagenesis, overlap extension-PCR

18

1 1 INTRODUCTION

2 *Mycoplasma hyopneumoniae* is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia
3 (EP), one of the most economically significant diseases in the swine industry worldwide. The
4 disease is characterized by chronic nonproductive cough, retarded growth rate, and inefficient
5 food conversion (Ross 1999). Commonly used vaccines for EP control consist of inactivated
6 whole cells (bacterins). These vaccines are efficacious against *M. hyopneumoniae* challenge
7 (Djordjevic et al. 1997; Thacker et al. 2000), but do not prevent colonization by the pathogen
8 or completely eliminate pneumonia (Haesebrouck et al. 2004). In addition, their preparation is
9 expensive because the growth of *M. hyopneumoniae* in vitro requires a rich culture medium
10 and it is time consuming (Kobisch and Friis 1996).

11 A new and improved vaccine against EP is urgently needed. Recombinant DNA
12 technology could be used to overcome problems found in conventional vaccines, however
13 only a few recombinant antigens have been evaluated as vaccine candidates (Fagan et al.
14 2000; Chen et al. 2003; Conceição et al. 2006; Meens et al. 2006), despite the fact that the
15 genome of three *M. hyopneumoniae* strains has been sequenced (Minion et al. 2004;
16 Vasconcelos et al. 2005). The small genome size and the limited number of secreted and
17 surface exposed proteins favor the use of the reverse vaccinology approach (Rappuoli 2001;
18 Capecchi et al. 2004). However, *Mycoplasma* sp. does not use the standard genetic code. The
19 amino acid tryptophan is not coded by TGG as in most living organisms, but by TGA, which
20 is a stop codon in other organisms (Razin et al. 1998). This difference prevents the expression
21 of *M. hyopneumoniae* genes containing tryptophan codons in *E. coli*, the species normally
22 used to express foreign genes in the laboratory (Nuc & Nuc, 2006).

23 Site-specific mutagenesis is a very important tool in genetic engineering. Deletion,
24 insertion and point mutations can be constructed in vitro by oligonucleotide-directed site-
25 specific mutagenesis (Plapp 1995; Peracchi 2001). Overlap extension is a powerful method

1 for site-directed mutagenesis because it is fast, simple and efficient in the generation of
2 mutant products. The mutant DNA fragments are generated with overlapping ends and
3 combined in a subsequent fusion reaction in which the overlapping ends anneal, allowing the
4 3' overlap of each strand to serve as primer for the 3' extension of the complementary strand
5 (Ho et al. 1989; Ito et al. 1991). The purpose of the present study was to use an overlap
6 extension-PCR method for site-directed mutagenesis of multiple *M. hyopneumoniae* genes.
7 The method was successfully used to replace TGA by TGG codons, allowing expression of
8 the mutated genes in *E. coli*.

9

10 **2 MATERIAL AND METHODS**

11 **Materials**

12 Chemicals, Platinum® *Pfx* DNA polymerase, T4 DNA ligase, 1kb DNA Marker
13 Ladder, restriction endonucleases, isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG), Champion
14 pET200D/TOPO, cloning strain *E. coli* TOP10 and expression strain *E. coli* BL21(DE3)
15 Codon Plus RIL were purchased from Invitrogen. *Taq* DNA polymerase was obtained from
16 CENBIOT-ENZIMAS/UFRGS (Brazil). Primers were synthesized by MWG-Biotech (USA).
17 The GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GFX Genomic Blood DNA Purification
18 Kit and DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit were obtained from GE
19 Healthcare.

20 **Gene selection**

21 Coding sequences (CDS) identified from *M. hyopneumoniae* strain 7448 genome
22 sequence were analyzed by bioinformatics software (SignalP, Vector NTI 10). CDS that
23 coded for secreted or transmembrane proteins and presented one, two or three tryptophan
24 codons were selected for this study.

25

1 **Primer design**

2 Primers were designed based on the *M. hyopneumoniae* 7448 sequence (GenBank[®]
3 accession NC_007332), with the aid of Vector NTI 10 software (Invitrogen). The mutagenesis
4 procedure requires four oligonucleotides: two flanking primers, which are upstream (U) and
5 downstream (D) of mutation site; two mutagenic primers, Forward (FM) and Reverse
6 mutagenic (RM) with at least 15 bp overlap between adjacent fragments. The mutation should
7 be located in the middle of the mutagenic primer. Forward flanking primer contained *CACC*
8 corresponding to recognition sites for directional cloning in Champion pET200D/TOPO His-
9 tag expression vector. Flanking primers containing restriction sites for cloning in pAE vector
10 (Ramos et al, 2004) were also evaluated. The primer sequences used in this study are shown
11 in Table 1.

12 **The mutagenesis method**

13 Genomic DNA extraction of *M. hyopneumoniae* was performed with GFX Genomic
14 Blood DNA Purification Kit. Site-direct mutagenesis was performed by three-step PCR
15 procedure in order to replace TGA by TGG codons using an overlap extension-PCR method
16 (Ho et al. 1989). Briefly, in the first step, two simultaneous PCR reactions were performed.
17 One reaction was performed with a primer pair that included the forward flanking primer and
18 the reverse mutagenic primer and the other reaction contained the reverse flanking primer and
19 the forward mutagenic primer. The PCR reactions were carried out with 50 ng of *M.*
20 *hyopneumoniae* genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer, 2
21 units of *Taq* DNA polymerase and 1x reaction buffer in a 25- μ l reaction volume. For
22 amplification, a Mastercycler Gradient (Eppendorf) was used with the following settings: 7
23 min at 95 °C followed by 30 cycles of 60 sec at 95 °C, 60 sec at 50 °C and 60 sec at 72 °C
24 and then a final extension of 7 min at 72 °C. The PCR products were submitted to a 1%
25 agarose gel electrophoresis and recovered by using the GFX PCR DNA and gel band

1 purification kit, according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). To obtain the
2 full length mutated fragment, the two DNA fragments obtained from the first PCR were
3 mixed in equimolar concentrations (approximately 0.4 – 0.8 pmol) and used as templates in
4 the second PCR reaction. The second PCR reaction was performed under the same conditions
5 as the first one, but without additional primers. The product of this overlap extension was the
6 full-length reassembled DNA fragment, which was submitted to agarose gel electrophoresis
7 and the DNA band was recovered from the gel by using the GFX PCR DNA and gel band
8 purification kit. This purified product was used as template for amplification of the entire
9 DNA fragment by PCR with outermost primers, using the same conditions as the first PCR.
10 Platinum® *Pfx* DNA polymerase was used in the third PCR reaction when the mutated
11 product was to be cloned into Champion pET200D/TOPO His-tag expression vector. In this
12 case the extension temperature was 68 °C for the power proofreading.

13 **Cloning and sequencing of mutated genes**

14 The DNA product of the third PCR reaction was ligated into an expression vector.
15 Cloning of the PCR product was achieved either by directional cloning using *CACC*
16 recognition site in Champion pET200D/TOPO His-tag vector or traditional cloning with T4
17 DNA ligase to ligate the digested PCR products into pAE vector. *E. coli* TOP10 electro
18 competent cells were transformed and recombinant clones were identified. After plasmid
19 DNA extraction, the presence of insert was confirmed by restriction enzyme digestion. The
20 clones were further characterized by DNA sequencing using the DYEnamic ET Dye
21 Terminator Cycle Sequencing Kit and a MegaBACE 500 DNA sequencer (GE Healthcare).

22 **Expression of recombinant protein**

23 After confirming the presence of the mutated codons, the recombinant plasmids were
24 transformed into *E. coli* BL21(DE3)-RIL competent cells by heat shock. One recombinant
25 clone of each construct was inoculated into 5 ml of Luria-Bertani (LB) medium containing

1 100 µg/ml ampicillin (pAE) or 100 µg/ml kanamycin (pET200D/TOPO) and incubated in a
2 shaker (37 °C, 250 rpm) until OD₆₀₀=0.6. At this moment, expression of the recombinant
3 proteins was induced with 0.3 mM IPTG for 3 h. A volume of 500 µl of culture growth was
4 centrifuged at 14000 × *g* for 2 min and the pellet was resuspended in 80 µl of 0.1 M
5 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 20 µl of 5x loading buffer (62.5 mM
6 Tris–HCl pH 6.8, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS). After boiling for 10 min, 8
7 µl of the supernatant was submitted to a 12% SDS-PAGE. Expression of recombinant
8 proteins was identified by staining the gel with Coomassie Blue and visualization of an extra
9 protein band of the predicted size.

10

11 **3 RESULTS**

12 **Mutagenesis, cloning and screening**

13 A total of 14 CDS of *M. hyopneumoniae* strain 7448 requiring TGA for TGG mutation
14 for expression in *E. coli* were selected. This group of CDS contained secreted and
15 transmembrane proteins, potential antigens for recombinant subunit vaccine or for diagnostic
16 application. The selected CDS had up to three tryptophan codons. The region of the CDS
17 selected for amplification, cloning and expression represented the largest possible fragment
18 containing bacterial surface exposed domains with few tryptophan codons. The list of selected
19 CDS, the length of amplified fragments and the TGA codon position is shown in Table 2.
20 Fragments ranging from 500 bp to 1257 bp with mutated TGA to TGG codons in different
21 positions were selected.

22 For the site-directed mutagenesis of genes requiring only one mutation, two separate
23 PCR reactions were carried out with the desired mutation inserted into overlapping primer
24 sequences. Both DNA fragments were submitted to agarose gel electrophoresis, purified,
25 mixed and used to perform overlap extension-PCR. The product of reassembled DNA

1 fragment was recovered of from the gel and used as DNA template with flanking primers for
2 amplifying the full mutant fragment. Fig. 1 shows the DNA products from the PCR reactions
3 after first, second and third-step PCR from one of the mutated genes. Twelve CDS required
4 only one TGA to TGG mutation. Three mutations were performed efficiently in one of the
5 CDS (MHP0248), as the tryptophan codons were near one another (aa 619, 621 and 623) and
6 were included in the same primer. One CDS (MHP0496) had two TGA codons mutated. For
7 that, three PCR fragments were produced in separate reactions and then used to carry out
8 overlap extension-PCR prior to the final PCR reaction with the outermost primers.

9 Mutant fragments were cloned into expression vectors. No difference between the two
10 cloning strategy was observed: directional cloning into pET200D/TOPO vector or enzymatic
11 restriction followed by ligation into pAE vector. The mutagenic efficiency of the method was
12 estimated by cloning the mutant fragment and sequencing of the mutated site. All
13 recombinant clones presented the TGA replaced by TGG as expected.

14 **Expression of recombinant proteins**

15 The efficiency of the site directed mutagenesis strategy was confirmed by expression
16 of recombinant proteins in *E. coli*. Expression was achieved after transferring the recombinant
17 plasmids to *E. coli* BL21(DE3)-RIL strain, as the expression of the gene is driven by the T7
18 promoter. SDS-PAGE of the whole-cell extract obtained after IPTG induction revealed bands
19 corresponding to the size of the *M. hyopneumoniae* polypeptide fused to the His-tag (data not
20 shown). Only four constructs failed to express the recombinant protein (MHP0629,
21 MHP0497, MHP0246 and MHP0248). This was not due to the presence of unexpected TGA
22 codons, but to other factors. Expression of these constructs will be evaluated in alternative *E.*
23 *coli* BL21(DE3) strains.

24

1 4 DISCUSSION

2 The identification and characterization of new immunogenic *M. hyopneumoniae*
3 proteins is an important step for the development of diagnostic reagents and vaccine
4 components. Attempts to characterize immunogenic *M. hyopneumoniae* proteins of general
5 interest are hampered by fastidious growth and lack of appropriate tools for genetic
6 manipulation of this organism. In addition, non standard codon usage has made identification
7 of immunogenic antigens by recombinant DNA technology much more difficult (Razin et al.
8 1998). The purpose of the present study was to demonstrate the applicability of a site-directed
9 mutagenesis method to replace TGA by TGG codons in multiple *M. hyopneumoniae* genes,
10 an organism with high AT content. Our intention was to standardize a fast and simple
11 procedure with the aim of achieving high mutagenic efficiency. By using the overlap
12 extension-PCR method originally described by Ho et al. (1989), with only a few
13 modifications, we performed site-directed mutagenesis into fourteen genes with 100%
14 accurate incorporation.

15 Until now, only five *M. hyopneumoniae* recombinant antigens had been described with
16 TGA codons replaced by TGG through in vitro mutagenesis (Futo et al. 1995; Schmidt et al.
17 2004; Meens et al. 2006; Okamba et al. 2007). It is clearly necessary to establish an efficient
18 method for mutagenesis of TGA codons to enable expression of *M. hyopneumoniae* genes in
19 heterologous systems. Despite the high AT content of *M. hyopneumoniae* genome, we
20 demonstrated that the overlap extension-PCR method was efficient to convert TGA codons to
21 TGG in fourteen CDS. The approach allowed cloning and expression of these potentially
22 important antigens in *E. coli*.

23 The design of primers is a critical step to amplify DNA, especially from species with
24 high AT content such as *M. hyopneumoniae*. We designed primers with similar *T_m* and
25 several annealing temperatures were tested. However, for most targets the annealing

1 temperature was not an issue and a PCR product could be obtained regardless of the annealing
2 temperature used (Fig. 1). An overlapping sequence of 15 to 22 bp (with average 18 bp)
3 between the two fragments was adequate. There was no need for longer overlapping sequence
4 as described by other authors (Zheng et al. 2004; An et al. 2005; Peng et al. 2006).

5 To achieve the full-length gene assembling, the use of equimolar concentration of each
6 fragment for the overlap extension-PCR reaction was important. Peng et al. (2006)
7 recommended using up to 2 pmol of each fragment. They reported that when the amount of
8 template was less than 1 pmol, no product could be synthesized. We evaluated concentrations
9 ranging from 0.2 up to 2 pmol of each fragment. With higher concentrations, dispersed bands
10 started to appear. The best results were obtained with concentrations ranging from 0.4 to 0.8
11 pmol.

12 The method used in this work besides being simple and inexpensive allowed cloning
13 of mutated fragments of up to 1257 bp in size. This is an important characteristic when the
14 goal is recombinant protein production for development of subunits vaccine. The mutant
15 fragment was inserted efficiently into pET200D/TOPO and pAE expression vectors and these
16 cloning enabled expressing of ten recombinant proteins in *E. coli*. A possible explanation for
17 the lack of expression of four constructs in *E. coli* may be toxicity of the recombinant protein
18 to the cell. Expression of these proteins will be evaluated in *E. coli* BL21(DE3)-pLysS cells,
19 appropriate for expression of toxic protein.

20 The mutagenesis method we evaluated herein is rapid and highly efficient for
21 introducing specific mutations into a target DNA sequence. This method is simple and cost
22 effective. Mutation at a single site or at multiple sites (up to 3 separate positions) can be
23 obtained in a single day work. In addition, this strategy does not require equipments or
24 consumables that are not readily available in molecular biology laboratories. The method is

1 efficient for mutation of *M. hyopneumoniae* tryptophan codons required for expression in *E.*
2 *coli* or other expression systems.

3

4 **5 ACKNOWLEDGEMENTS**

5 This work was supported by grants from FAPERGS and CNPq (Brazilian
6 Government). We are grateful to Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves
7 (CNPSA/EMBRAPA, Concórdia-SC, Brasil) for providing the *M. hyopneumoniae* 7448 strain
8 and to Michele dos Santos for technical assistance. S. S. and S. M. received a scholarship
9 from CAPES.

10

11 **6 REFERENCES**

12 An Y, Ji J, Wu W, Lv A, Huang R, Wei Y (2005) A rapid and efficient method for multiple-
13 site mutagenesis with a modified overlap extension PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:774–
14 778.

15 Capecchi, B, Serruto, D, Adu-Bobie, J, Rappuoli R, Pizza M (2004) The Genome Revolution
16 in Vaccine Research. *Mol Biol* 6:17-28.

17 Chen, YL, Wang, SN, Yang, W, Chen, YJ, Lin, HH, Shiuan, D (2003). Expression and
18 immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA
19 vaccination. *Infect. Immun.* 71:1155–1160.

20 Conceição, FR, Moreira AN, Dellagostin AO (2006) A recombinant chimera composed of R1
21 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile
22 enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 24:5734–5743.

23 Djordjevic SP, Eamens GJ, Romalis LF, Nicholls PJ, Taylor V, Chin J (1997) Serum and
24 mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma*

- 1 *hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant.
2 Aust Vet J 75:504–511.
- 3 Fagan PK, Walker M, Chiun J, Eamens GJ, Djordjevic SP (2000) Oral immunization of swine
4 with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* SL3261 expressing a recombinant antigen of
5 *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory
6 IgA response in the lungs. Microbial Pathogenesis 30:101-110.
- 7 Futo S, Seto Y, Okada M, Sato S, Suzuki T, Kawai K, Imada Y, Mori, Y (1995) Recombinant
8 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia*
9 *coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-
10 linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 33:680–683.
- 11 Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A (2004) Efficacy of
12 vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet Microbiol 100:255–
13 268.
- 14 Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by
15 overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77:51–59.
- 16 Ito W, Ishiguro H, Kurosawa Y (1991) A general method for introducing a series of mutations
17 into cloned DNA using the polymerase chain reaction. Gene 102:67–70.
- 18 Kobisch M, Friis NF (1996) Swine mycoplasmoses. Res. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15:1569–
19 1605.
- 20 Nuc P, & Nuc K (2006) Recombinant protein production in *Escherichia coli*. Postepy
21 Biochem 52:448-56.
- 22 Meens J, Selke M, Gerlach G-F (2006) Identification and immunological characterization of
23 conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. Vet Microbiol
24 116:85–95.

- 1 Minion, FC, Lefkowitz, EJ., Madsen, ML, Cleary, BJ, Swartzell, SM, Mahairas, GG, (2004)
2 The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine
3 mycoplasmosis. J Bacteriol 186:7123–7133.
- 4 Okamba, FR, Moreau E, Cheikh Saad Bouh K, Gagnon CA, Massie B, Arella M (2007)
5 Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal
6 portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Clinical and Vaccine Immun
7 14:767–774.
- 8 Peng R, Xiong A, Yao Q (2006) A direct and efficient PAGE-mediated overlap extension
9 PCR method for gene multiple-site mutagenesis. Appl Microbiol Biotechnol 73:234–240.
- 10 Plapp BV (1995) Site-directed mutagenesis: a tool for studying enzyme catalysis. Methods
11 Enzymol 249:91–119.
- 12 Peracchi A (2001) Enzyme catalysis: removing chemically “essential” residues by site-
13 directed mutagenesis. Trends Biochem Sci 26:497–503.
- 14 Rappuoli, R (2001) Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development.
15 Vaccine 19:2688–2691.
- 16 Ramos CRR, Abreu PAE, Nascimento ALTO, Ho PL (2004) A high-copy T7 *Escherichia*
17 *coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal
18 His-tagged fusion peptide. Braz Med Biol Res 37:1103-1109.
- 19 Razin S, Yogev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.
20 Microbiol. Mol Biol Rev 62:1094–1156.
- 21 Ross RF. Mycoplasmal diseases. In: Diseases of Swine. 1999:495-510. Ed. 8^o, Iowa State
22 University Press, Ames, Iowa.

- 1 Schmidt JA, Browning GF, Markham PF (2004) *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 lipoprotein
2 is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. J Bacteriol 186:5790-
3 5798.
- 4 Thacker EL, Thacker BJ, Kuhn M, Hawkins PA, Waters WR (2000) Evaluation of local and
5 systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma*
6 *hyopneumoniae* bacterin to pigs. Am J Vet Res 61:1384–1389.
- 7 Vasconcelos AT, Ferreira HB, Bizarro CV, Bonatto SL, Carvalho MO, Pinto PM, Almeida
8 DF, Almeida R, Alves-Filho L, Assunção EN, Azevedo VA., Bogo MR, Brigido MM.,
9 Brocchi M, Helio AB, Camargo AA, Camargo SS, Carepo MS, Carraro DC, de Mattos
10 Cascardo JC, Castro LA, Cavalcanti G, Chemale G, Collevatti RG, Cunha CW,
11 Dallagiovanna B, Dambro's BP, Dellagostin OA, Falcão C, Fantinatti-Garboggini F, Felipe
12 MSS, Fiorentin L, Franco GR, Freitas NSA, Fri'as D, Grangeiro TB, Grisard EC, Guimarães
13 CT, Hungria M, Jardim SN, Krieger MA, Laurino JP, Lima LFA, Lopes MI, Loreto ELS,
14 Madeira HMF, Manfio GP, Maranhão AQ, Martinkovics CT, Medeiros SRB, Moreira MAM,
15 Neiva M, Ramalho-Neto CO, Nicola's MF, Oliveira SC, Paixão RFC, Pedrosa FO, Pena SDJ,
16 Pereira M, Pereira-Ferrari L, Piffer I, Pinto LS, Potrich DP, Salim ACM, Santos FR, Schmitt
17 R, Schneider MPC, Schrank A, Schrank IS, Schuck AF, Seuanez HN, Silva DW, Silva R,
18 Silva SC, Soares CMA, Souza KRL, Souza RC, Staats CC, Steffens MBR, Teixeira SMR,
19 Urmenyi TP, Vainstein MH, Zuccherato LW, Simpson AJH, Zaha A 2005. Swine and poultry
20 pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*
21 and a strain of *Mycoplasma synoviae*. J Bacteriol 187:5568–5577.
- 22 Zheng L, Baumann U, Reymond J-L (2004) An efficient one-step site-directed and site-
23 saturation mutagenesis protocol. Nucleic Acids Res 32:1-5.
- 24
- 25

1 **Table 1.** Mutagenic and flanking primers used for cloning the mutated genes in expression
 2 vectors.
 3

Primers	Sequence (5' to 3')*	Length of overlapping sequence (bases)
MHP0199 For	CGGGATCCAAAGAATTTTCAATGCCTGAAG	
MHP0199 Rev	CCAAGCTTTCATTCTAAAGTAAAGAAATTTGGC	
MHP0199 FM	GACAAGCATTGgACAGCTTTTAAT	
MHP0199 RM	AGCTGTcCAAATGCTTGTCCC	19
MHP0496 For	CGGGATCCCTAGCAAGTATTCCTTTGGTGATTC	
MHP0496 Rev	CCAAGCTTTCATCCCCTAGCAATTTTAGGGG	
MHP0496 FM1	TTTAATGAGGACTGgAGAAATATAGATA	
MHP0496 RM1	ATTTCTcCAGTCCTCATTAAAATAGAA	21
MHP0496 FM2	GGTGTTCCCTGgTCAACCGG	
MHP0496 RM2	GGTTGAcCAGGGAACACCAAT	18
MHP0360 For	CGGGATCCGATCAAAAAGACTGGGAAAAAATT	
MHP0360 Rev	CGGAATTCCTTAGTTAGATTCTGCATAAATCCG	
MHP0360 FM	CATTTGCTTgACTGAAAGCAAA	
MHP0360 RM	GCTTTCAGTcCAAGCAAATGAA	20
MHP0629 For	CACCTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTT	
MHP0629 Rev	TCATTCCTCTGGTTCAACTTGGGA	
MHP0629 FM	ATGGGACTATTTGgCTGTTGGATTA	
MHP0629 RM	CAACAGcCAAATAGTCCCATTTTC	20
MHP0497 For	CACCTTTCAGAAACAAAAACTATCCA	
MHP0497 Rev	TCAACCATGAATTTTTAGAAATTTTC	
MHP0497 FM	CAGGAAGTAATTTGgAGTTTTTCA	
MHP0497 RM	AAAACtCAAATTACTTCCTGAAT	21
MHP0513 For	CACCCTCACTCAGCAAG	
MHP0513 Rev	TTAGGCATCAGGATTATCAACATTAGC	
MHP0513 FM	GTCCAGGATGgAATTATGGAACT	
MHP0513 RM	ATAATTCATCCTGGGACATAAACAG	18
MHP0372 For	CACCTTTGATTTTCTTAATTTTTCAACA	
MHP0372 Rev	TTATTCATATATTCGCTAAGGA	
MHP0372 FM	TCCTTGATTGgCGATCAAATATA	
MHP0372 RM	TGATCGcCAATCAAGGAATAAATC	18
MHP0246 For	CACCTTAGGTGGTCTAAGAAAAAATTTGATA	
MHP0246 Rev	TCAATTGGCCGCTTTGATTACA	
MHP0246 FM	TCAAGATAAATTTTgGAAAGGCTAACAAATA	
MHP0246 RM	CCTTTCcAAAATTTATCTTGATTTT	22
MHP0353 For	CACCGGATCCGAGACTTCAGAAAAAGCACA	
MHP0353 Rev	GGGTACCTCAAATTCGATTTGACTGT	
MHP0353 FM	CAAATTTGgCAATTTGAATC	
MHP0353 RM	AAATTGcCAAATTTGAACCG	15
MHP0620 For	CACCGGATCCACTAGAAAATAATGAAAAAGTTT	
MHP0620 Rev	CCCAAGCTTTTAATTAACCTTAATTTGCG	
MHP0620 FM	CTTGATTGgTCGGGTCTA	
MHP0620 RM	ACCCGAcCAATCAAGGGT	15
MHP0108 For	CACCGGATCCGCAAAAATTAGATGATAATCTT	
MHP0108 Rev	CCCAAGCTTTTATTTGGCTTGTTTATT	
MHP0108 FM	AAAGAATGgAGATTAGATGAG	
MHP0108 RM	TAATCTcATTCTTTAAATTCG	15
MHP0643 For	CACCGGATCCTTTTTATCGGTTTTTTTAT	
MHP0643 Rev	GGGAAGCTTTCAGTTAATCGTTACAATATTG	
MHP0643 FM	CCAGTCTGgAAAGAGAATAATT	
MHP0643 RM	ATTCTTTcCAGACTGGAAT	18
MHP0248 For	CACCGGATCCCTAGGACAGTTTGCAATAATTATTGT	
MHP0248 Rev	CCCAAGCTTTCATTTATCTTTTTTATCATCAATAATTC	
MHP0248 FM	GGATTTTgGAATGgTTTTGgGGCAAATTA	
MHP0248 RM	TTTGCCcAAAACATTcCAAAATCCTTG	27
MHP0021 For	CACCGGATCCTCACTACAGATTTCTGCAAAA	
MHP0021 Rev	CCCAAGCTTTCAACATAAATTTCTTGCAAAAAA	
MHP0021 FM	ATTTCTTgATTGGTAAAAAATT	
MHP0021 RM	ACCAATcCAAGAAATCGACT	15

1 *Nucleotide substitution is showed in boldface and lower case; Underline nucleotide represent cloning
2 site: CACC: directional cloning site; GGATCC, AAGCTT, GGATCC restriction site for *Bam*HI,
3 *Hind*III and *Eco*RI enzymes, respectively.
4

1 **Table 2.** List of *M. hyopneumoniae* CDS submitted to site-directed mutagenesis
2

No	Annotation	Protein name	Region amplified	Size (bp)	Position of the mutated codon
1	MHP0629	Hypothetical protein	1 aa – 320 aa	960	170 aa
2	MHP0199	P102 adhesin	441 aa – 841 aa	1203	604 aa
3	MHP0497	P76 adhesin	215 aa – 633 aa	1257	438 aa
4	MHP0353	P60-like lipoprotein	78 aa – 420 aa	1029	266 aa
5	MHP0620	Hypothetical protein	1 aa – 346 aa	1038	164 aa
6	MHP0108	P97 adhesin like	758 aa – 1053 aa	888	896 aa
7	MHP0496	P216 surface protein	1228 aa – 1544 aa	951	1364 aa/ 1452 aa
8	MHP0372	Conserved hypothetical LppT	497 aa – 883 aa	1161	657 aa
9	MHP0513	P46 surface antigen precursor	102 aa – 420 aa	957	254 aa
10	MHP0360	Methionine aminopeptidase P37 Like	251 aa – 422 aa	511	351 aa
11	MHP0246	P37-like ABC transporter	229 aa – 490 aa	783	346 aa
12	MHP0643	Hemolysin C	131 aa – 345 aa	645	210 aa
13	MHP0248	Hypothetical protein	248 aa – 748 aa	501	619aa/ 621aa/ 623aa
14	MHP0021	ABC Transporter	278 aa – 671 aa	1179	330 aa

3
4

1 **FIGURE LEGENDS**

2

3 **Fig. 1.** Electrophoresis analysis of mutagenesis products on a 1% agarose gel stained with
4 ethidium bromide. In each PCR step four different annealing temperatures were tested: 45°C,
5 50°C, 55°C and 60°C. a: two simultaneous PCR performed to amplify each DNA fragment
6 from the first-step PCR. Lane M, 1 kb DNA ladder standard; lanes 1-4, PCR product obtained
7 with forward flanking primer and a reverse mutagenic primer under different annealing
8 temperatures. Lanes 5–8, PCR product obtained with a reverse flanking primer and a forward
9 mutagenic primer under different annealing temperatures. b: Agarose gel purified fragments
10 submitted to overlap extension PCR. Lanes 10–13, annealing at 45 °C, 50 °C, 55 °C and 60
11 °C, respectively. c: synthesis of the entire mutated DNA fragment with DNA template
12 resulting from the overlap extension PCR and outermost primers. Lanes 15–18, mutated DNA
13 obtained under four different annealing temperatures. Lanes 9, 14 and 19, PCR product
14 resulting from amplification using *M. hyopneumoniae* genomic DNA and the outermost
15 primers used as positive control.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

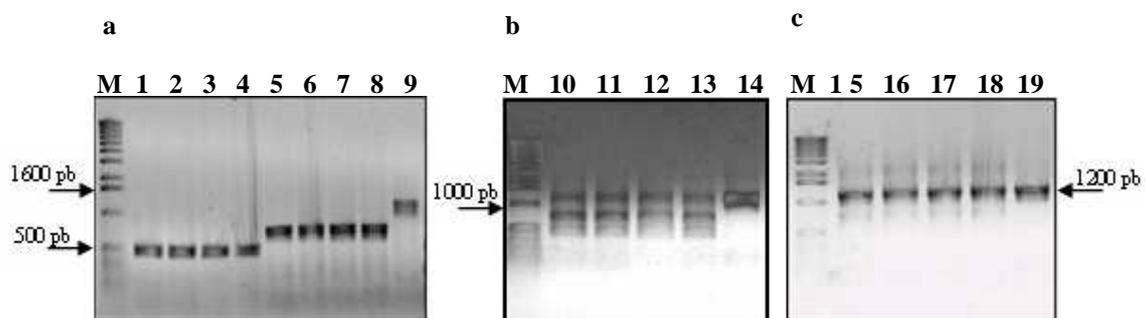
25

26

27

1 **Figure 1.**

2



3

4

5

6

7

