

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Avaliação da resposta imune induzida por uma quimera de antígenos de
Mycoplasma hyopneumoniae

Natasha Rodrigues de Oliveira

Pelotas, 2016

Natasha Rodrigues de Oliveira

**Avaliação da resposta imune induzida por uma quimera de antígenos de
*Mycoplasma hyopneumoniae***

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

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Coorientador: Sérgio Jorge

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O48a Oliveira, Natasha Rodrigues de

Avaliação da resposta imune induzida por uma quimera de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* / Natasha Rodrigues de Oliveira ; Odir Antônio Dellagostin, orientador ; Sérgio Jorge, coorientador. — Pelotas, 2016.

58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 2. Proteína quimérica. 3. Pneumonia enzoótica suína. 4. Vacina recombinante. I. Dellagostin, Odir Antônio, orient. II. Jorge, Sérgio, coorient. III. Título.

CDD : 615.372

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Geferson Fischer (Universidade Federal de Pelotas)

Dr. Rodrigo Casquero Cunha (Universidade Federal de Pelotas)

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

Para minha mãe Isoni e meu pai Carlos Alberto, com amor e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, por todas as conquistas alcançadas e por ter me dado forças nos momentos mais difíceis;

À minha mãe e ao meu pai, por sempre acreditarem na minha capacidade e terem me auxiliado a chegar até aqui;

À Universidade Federal de Pelotas e professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por ofertar um curso de pós-graduação de qualidade;

Ao meu orientador Odir Antônio Dellagostin pela oportunidade, orientação, incentivo e confiança depositada;

Ao coorientador e fiel amigo Sérgio, pelos ensinamentos, dedicação, parceria e pelo carinho dedicado em todos os momentos que convivemos juntos;

Ao amigo e colega de trabalho Charles, pelo auxílio com os animais e pela grande amizade;

Aos demais amigos e colegas do laboratório de Vacinologia, e especialmente a Carol, Michele, Karen, Violetta, Aishe, Schuch e Thaís pela convivência amigável, ajuda e incentivo;

Às funcionárias do Biotério Central da UFPel, pela disponibilidade e carinho e aos animais que deram sua vida para o desenvolvimento deste trabalho;

Às queridas amigas Gilliana e Daniele, cujo apoio, incentivo, compreensão e dedicação foram essenciais ao longo desta jornada. Obrigada por estarem sempre ao meu lado;

A Anderson, obrigada por todo apoio e carinho;

À CAPES, pela concessão da bolsa e demais agências de fomento pelo financiamento do projeto.

Muito obrigada!

“Só quem tem noção do todo torna sua vida significativa.”

Leandro Karnal

Resumo

DE OLIVEIRA, Natasha Rodrigues. **Avaliação da resposta imune induzida por uma quimera de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2016. 58f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, é uma das principais doenças respiratórias e infecciosas que acomete suínos de produção em todo o mundo. A redução da eficiência alimentar e retardo no ganho de peso, associada aos gastos com medicamentos, geram consideráveis perdas econômicas ao setor de produção suinícola. Bacterinas comerciais são mundialmente utilizadas no controle da doença, no entanto sua proteção é frequentemente incompleta. Neste contexto, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da PES. Os dados do sequenciamento de isolados de *M. hyopneumoniae* associados à tecnologia do DNA recombinante permitiram a identificação de diversas proteínas como potenciais alvos vacinais. Embora alguns antígenos recombinantes tenham sido testados em diferentes estratégias vacinais, os mesmos conferiram apenas uma proteção parcial quando avaliados individualmente. Por outro lado, a utilização de diferentes antígenos em uma única formulação tem se mostrado uma abordagem promissora, a fim de aumentar a imunogenicidade e capacidade de proteção destas vacinas. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades imunogênicas de uma proteína quimérica composta pela fusão de quatro proteínas de *M. hyopneumoniae* (P97R1, P46, P95 e P42), que são associadas a patogênese da PES. A antigenicidade da proteína quimérica foi verificada frente a soros de suínos convalescentes e a imunogenicidade avaliada em camundongos utilizando duas formulações vacinais: vacina de subunidade e bacterina recombinante de *Escherichia coli* expressando o antígeno. A proteína quimérica foi especificamente reconhecida pelo soro de suínos convalescentes para PES, indicando que a mesma manteve a exposição de epítomos similares às proteínas quando avaliadas individualmente. No ensaio experimental ambas formulações vacinais avaliadas foram imunogênicas em camundongos e induziram resposta imune caracterizada pela produção de anticorpos IgG1 e IgG2a contra cada um de seus fragmentos. Além disso, as formulações recombinantes induziram anticorpos que reagiram especificamente contra proteínas nativas de *M. hyopneumoniae*. Os resultados obtidos suportam o futuro uso desta nova construção em ensaios de imunoproteção em suínos.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, proteína quimérica, Pneumonia Enzoótica Suína, vacina recombinante.

Abstract

DE OLIVEIRA, Natasha Rodrigues. **Evaluation of the immune response induced by a chimera of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens.** 2016. 58f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Enzootic Pneumonia (EP), caused by the bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae*, is one of the most important infectious and respiratory diseases that affects swine production worldwide. The reduction of feed conversion efficiency and the decrease of weight gain, associated to medication costs, causes considerable economic losses in pig production. Commercial bacterins are used worldwide on disease control, however its protection is often incomplete. In this context, it is necessary to search for new alternative prophylaxis. The sequencing of *M. hyopneumoniae* isolates associated to recombinant DNA technology allowed the identification of several proteins that may be used as potential vaccine targets. Although some recombinant antigens have been tested on different vaccine strategies, they have conferred only limited protection when assessed as single antigens. On the other hand, the use of different antigens in a single vaccine formulation has been shown to be a promising approach to increase their immunogenicity and protective capacity of these vaccines. The aim of this study was to evaluate the immunogenic properties of a chimeric protein consisting of four proteins from *M. hyopneumoniae* (P97R1, P46, P95 and P42) that are associated with disease pathogenesis. The antigenicity of the chimeric protein was assessed against convalescent pig serum and the immunogenicity was evaluated in mice using two vaccine formulations: a subunit vaccine and an *Escherichia coli* recombinant bacterin expressing the antigen. The chimeric protein was specifically recognized by sera from convalescent pigs for EP, indicating that it retained the epitopes exposed, similar to the native proteins when individually evaluated. In the experimental study, both vaccine formulations evaluated were immunogenic in mice and induced immune response characterized by the production of IgG1 and IgG2a antibodies against each subunit. Moreover, both recombinant formulations induced antibodies that reacted specifically against native proteins from *M. hyopneumoniae*. These results warrant further evaluation of this new construct in immune protection assays in pigs.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, chimeric protein, Enzootic Pneumonia, recombinant protein.

Lista de Abreviaturas

- BALF – *Bronchoalveolar lavage fluid* (Fluído de lavado bronco-alveolar)
- BALT – *Bronchial-associated lymphoid tissue* (Tecido linfoide associado aos brônquios)
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)
- EP – *Enzootic Pneumonia* (Pneumonia Enzoótica Suína)
- FAO – *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)
- IgA – Imunoglobulina A
- IgG – Imunoglobulina G
- IFN- γ – Interferon gama
- IL – Interleucina
- LTB – *Heat-labile enterotoxin B subunit from E. coli* (Subunidade B da enterotoxina termolábel de *E. coli*)
- PCV2 – *Porcine circovirus type 2* (Circovírus suíno tipo 2)
- PES – Pneumonia enzoótica suína
- PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
- PRDC – *Porcine respiratory disease complex* (Complexo de doenças respiratórias de suínos)
- PRRSV – *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva de suínos)
- RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
- sIgA – Imunoglobulina A secretora
- SIV – *Swine influenza virus* (Influenza vírus suíno)
- TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	13
2.2 Pneumonia Enzoótica Suína	14
2.3 Patogênese	15
2.4 Epidemiologia e Transmissão	16
2.5 Diagnóstico	17
2.6 Controle	19
2.6.1 Vacinas comerciais	19
2.6.2 Desenvolvimento de vacinas recombinantes.....	21
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	24
3.1 Hipótese.....	24
3.2 Objetivo Geral	24
3.3 Objetivos Específicos.....	24
4 CAPÍTULO 1 – A novel chimeric protein composed of recombinant <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> antigens as a vaccine candidate evaluated in mice	25
5 CONCLUSÃO GERAL.....	51
6 REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Pneuonia Enzoótica Suína (PES), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, é uma doença respiratória amplamente difundida nos rebanhos de produção suinícola em todo mundo (Haesebrouck et al., 2004). A infecção é transmitida principalmente através do contato com secreções respiratórias eliminadas por suínos infectados, das matrizes para os seus leitões ou por via aérea através de aerossóis (Sibila et al., 2009). Após ganhar acesso ao trato respiratório dos suínos, a bactéria se adere a receptores presentes nos cílios das células da traqueia, brônquios e bronquíolos, promovendo ciliostase, perda dos cílios e até morte destas células (DeBey & Ross, 1994). A debilitação desta barreira de defesa imune primária torna os suínos mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções secundárias por outros patógenos, agravando a severidade destas doenças (Maes et al., 2008). A PES apresenta baixa mortalidade, no entanto, a elevada prevalência nos rebanhos produtivos, e o fato de pré-dispor os suínos à patógenos oportunistas tornam esta doença alvo central de programas de saúde de rebanho para controle de infecções respiratórias (Conceição & Dellagostin, 2006).

O principal sinal clínico da doença é a tosse crônica não produtiva (Thacker, 2004). Animais em fase de crescimento e terminação são os mais acometidos pela PES, apresentando redução da eficiência de conversão alimentar, retardo no ganho de peso diário e frequente desenvolvimento de lesões pulmonares sugestivas da doença (Sibila et al., 2007). As quedas nas taxas de produtividade, associadas aos gastos com medicamentos para o controle da PES geram significativas perdas econômicas ao setor suinícola (Maes et al., 2008; Sibila et al., 2007), as quais podem chegar até 400 milhões de dólares por ano (Derald Holtkamp, 2014).

A vacinação é a principal medida de controle da PES. Bacterinas comerciais são mundialmente utilizadas nos rebanhos de produção intensiva, possibilitando a melhoria dos índices produtivos (Haesebrouck et al., 2004). Entretanto, sua proteção é incompleta, justificando a necessidade do desenvolvimento de vacinas mais efetivas. A tecnologia do DNA recombinante é uma abordagem estratégica que permite a seleção de antígenos com elevado potencial imunogênico e elimina o cultivo fastidioso da bactéria. Com o sequenciamento do genoma e análise proteômica de

cinco cepas de *M. hyopneumoniae* (7448, 7422, 232, 168 e J) diversas proteínas recombinantes foram produzidas e caracterizadas. Entre estas, a região C-terminal da adesina P97 (P97R1), as proteínas de membrana externa P46 e P95 e a proteína de choque térmico P42, apresentaram resultados mais promissores em diferentes abordagens vacinais (Chen et al., 2008; Galli et al., 2012; Barate et al., 2014; Marchioro et al., 2014a; Jorge et al., 2014; Virginio et al., 2014). Apesar disto, alguns estudos têm demonstrado que o uso de um único antígeno pode não ser suficiente para conferir proteção contra PES (Shimoji et al., 2003; Okamba et al., 2010; Jorge et al., 2014). A produção de vacinas carreando múltiplos antígenos vem demonstrando potencial em conferir maior proteção em comparação as vacinas compostas por um único alvo (Da Costa et al., 2014; Duthie et al., 2016; Marchioro et al., 2014b; Woolley et al., 2014) e pode ser utilizada como uma abordagem estratégica no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra PES.

Diante deste cenário, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil imunogênico de uma quimera de antígenos recombinantes como potencial alvo vacinal contra a PES. Para o desenvolvimento desta vacina, uma proteína quimérica baseada na fusão de fragmentos de quatro proteínas de *M. hyopneumoniae* (P97R1, P46, P95 e P46), envolvidas na patogênese da doença, foi produzida e sua imunogenicidade foi avaliada em camundongos. Inicialmente é apresentada uma revisão bibliográfica apontando características gerais do microrganismo, incluindo aspectos relacionados à sua patogênese, epidemiologia, diagnóstico e métodos de controle. A seguir os dados experimentais gerados neste trabalho são apresentados na forma de manuscrito científico, aceito para publicação no periódico **Veterinary Microbiology** e compilado na formatação exigida pelo mesmo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*

Mycoplasma hyopneumoniae é um patógeno espécie-específico que acomete suínos causando uma doença respiratória conhecida como Pneumonia Enzoótica Suína (PES). Este patógeno também é um dos principais agentes do Complexo de Doenças Respiratórias de Suínos (PRDC), que envolve bactérias e vírus como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva de Suínos (PRRSV), Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2), vírus da doença de Aujeszky e Influenza Vírus Suíno (SIV). PRDC é clinicamente caracterizado por tosse, retardo no crescimento, ineficiente conversão alimentar, anorexia, febre e dispneia, promovendo consideráveis perdas econômicas no setor de produção suinícola (Chae, 2016).

Filogeneticamente *M. hyopneumoniae* pertence ao gênero *Mycoplasma*, família *Mycoplasmataceae*, ordem *Mycoplasmatales*, classe *Mollicutes*. Os *Mollicutes* são caracterizados pelo tamanho pequeno e ausência de parede celular, tornando-os os menores microrganismos autorreplicantes de vida livre conhecidos (Razin & Yogev, 1998). A ausência de parede celular torna a morfologia destes microrganismos bastante pleomórfica, com diâmetro variando de 0,3 a 0,8 µm na forma esférica (Razin & Yogev, 1998). Os micoplasmas apresentam um genoma compacto (580-1350 kb) com baixo conteúdo citosina-guanina (23-40%) e elevado conteúdo adenina-timina. O genoma pequeno implica em um limitado número de rotas biossintéticas, o que obriga a captação de muitos metabólitos a partir do ambiente/hospedeiro, e consequentemente, torna o microrganismo fastidioso quando cultivado *in vitro* (Razin & Yogev, 1998).

O cultivo *in vitro* de *M. hyopneumoniae* é feito geralmente em meio Friis, um meio complexo enriquecido com soro suíno livre de patógenos-específicos (Friis, 1975). O isolamento de cepas do microrganismo é difícil, pois crescem lentamente em meio de cultivo após incubação de 3 a 20 dias, a uma temperatura ótima de 37 °C, pH em torno de 7,5 e atmosfera de 5 a 10% de CO₂. Além do crescimento lento em cultivo primário, a frequente contaminação com outros micoplasmas, como *M. hyorhinis* e *M. flocculare*, comumente presentes no trato respiratório dos suínos e de

difícil eliminação, torna o isolamento muito difícil, requerendo, por vezes, meios mais seletivos (Friis, 1975; Thacker, 2004).

2.2 Pneumonia Enzoótica Suína

A carne suína é a mais importante fonte de proteína animal produzida e consumida no mundo. Atualmente o Brasil encontra-se em quarto lugar no ranking mundial de produção e exportação de carne suína. No ano de 2015 o Brasil atingiu a produção de 3,643 milhões de toneladas, deste total 555 mil toneladas foram destinadas à exportação para 70 países (ABPA, 2016). A região Sul do país é a principal responsável pela manutenção destes índices, sendo os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná responsáveis por cerca de 80% dos valores exportados no ano de 2015 (Embrapa Suínos e Aves, 2016). O crescimento do setor está diretamente relacionado com a melhoria da qualidade da sanidade animal. No entanto, mesmo com os grandes avanços no controle e prevenção de doenças, a produção suinícola continua a ser afetada por importantes infecções virais, bacterianas e parasitárias (FAO, 2016).

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES), doença causada pela bactéria *M. hyopneumoniae*, é uma das principais infecções respiratórias que acomete suínos de produção em todo mundo, causando significativas perdas econômicas ao setor (Haesebrouck et al., 2004; Maes et al., 2008; Nathues et al., 2013). Suínos de todas as idades podem ser infectados, no entanto os animais em fase de crescimento e terminação são os mais acometidos pela forma clínica da doença (Sibila et al., 2009). A infecção é transmitida principalmente pelo contato com secreções respiratórias de suínos infectados, das matrizes para os seus leitões ou por via aérea por meio de gotículas de aerossol disseminando-se entre os planteis (Sibila et al., 2009).

A evolução clínica da doença caracteriza-se por tosse crônica não produtiva, retardo das taxas de ganho de peso diário e redução da eficiência de conversão alimentar (Thacker, 2004; Sibila et al., 2009). No estágio crônico da infecção é comum o desenvolvimento de lesões pulmonares macroscópicas, caracterizadas por consolidações de coloração púrpura-acinzentada localizadas preferencialmente nos lobos crânio-apicais, cardíacos e intermediários dos pulmões (Haesebrouck et al.,

2004; Maes et al., 2008). Quando a doença é associada com outras co-infecções, sinais clínicos como febre, anorexia e dificuldade respiratória podem ocorrer. A presença de co-infecções com *Pasteurella multocida*, PRRSV e PCV2 também agrava a severidade da doença, tornando as perdas econômicas ainda maiores nos rebanhos produtivos (Sibila et al., 2007).

2.3 Patogênese

Embora o mecanismo de infecção ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que a habilidade de *M. hyopneumoniae* causar patogênese possa estar diretamente relacionada a sua capacidade de aderir aos cílios do epitélio respiratório dos suínos (Thacker, 2004; Ferrarini et al., 2016). Diversas proteínas vêm sendo descritas com possível envolvimento no processo de adesão por apresentarem domínios de ligação aos cílios. Dentre elas destacam-se as adesinas pertencentes as famílias P97/P102, que incluem Mhp0182 (P102), Mhp0183 (P97), Mhp0493 (P159), Mhp0494 (P216), Mhp0683 (P135), Mhp0271, Mhp0107 e Mhp0108 (P116) (Bogema et al., 2011). Algumas destas proteínas sofrem processamentos proteolíticos e os fragmentos gerados ligam-se a moléculas do tecido hospedeiro como glicosaminoglicanos, heparina, fibronectina e plasminogênio, facilitando sua fixação na superfície mucosa (Bogema et al., 2011; Raymond & Djordjevic, 2015).

Após a inalação, a bactéria supera o movimento mucociliar do trato respiratório e adere-se a receptores ciliares presentes nas células epiteliais da traqueia, brônquios e bronquíolos. Esta aderência resulta em perda dos cílios, com eventual morte das células epiteliais e redução da função do aparato mucociliar (DeBey & Ross, 1994; Sarradell et al., 2003; Thacker, 2004). *M. hyopneumoniae* inicia então um persistente processo de estabelecimento no lúmen da superfície mucosa do epitélio respiratório dos suínos (Ruiz et al., 2002). Esta localização permite não só a evasão e modulação da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro como também facilita a indução de uma intensa resposta inflamatória local (Sarradell et al., 2003; Thacker, 2004).

A interação de *M. hyopneumoniae* com a resposta imune do hospedeiro vem sendo proposta como um importante fator na patogênese da PES (Okada et al., 2000; Muneta et al., 2008). Após se estabelecer no pulmão dos suínos, a bactéria ativa macrófagos alveolares estimulando o aumento da produção de citocinas pró

inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (Rodríguez et al., 2004; Lorenzo et al., 2006). A superprodução destas citocinas, por sua vez, induz a infiltração e acúmulo de células inflamatórias no lúmen das vias aéreas e hiperplasia do tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) causando obliteração do lúmen e atelectasia dos alvéolos (Sarradell et al., 2003; Rodríguez et al., 2004; Ahn et al., 2009). Esta intensa resposta inflamatória local possui envolvimento no dano tecidual ao hospedeiro e no desenvolvimento das lesões pulmonares (Sarradell et al., 2003; Choi et al., 2006). A infecção com *M. hyopneumoniae* também parece ser capaz de suprimir a produção de IFN- γ e IL-10, o que pode levar ao aumento de infecções virais secundárias e a superativação de macrófagos alveolares, respectivamente (Muneta et al., 2008). O comprometimento da mucosa respiratória, a qual é considerada uma barreira de defesa primária, também predispõe os suínos a infecções por outros patógenos como *P. multocida*, PRRSV e PCV2, potencializando a severidade das infecções causadas por estes agentes (Thacker et al., 2000; Chae, 2016).

2.4 Epidemiologia e transmissão

Embora constantes esforços sejam feitos para eliminar o *M. hyopneumoniae* dos rebanhos a reinfecção é frequente, ocorrendo em torno de 2,6 a 10% ao ano (Maes et al., 2008). Em rebanhos livres de *M. hyopneumoniae* o agente pode ser introduzido de duas formas: direta via compra de novos animais com infecção subclínica não detectada ou indireta via transmissão aérea (Sibila et al., 2009). A transmissão aérea ocorre via gotículas de aerossol geradas durante os espirros e acessos de tosse dos suínos infectados. Este tipo de transmissão tem sido relatada entre unidades separadas por até 9,2 km quilômetros de distância (Otake et al., 2010) e é considerado um importante fator de risco para a disseminação do agente em granjas vizinhas (Sibila et al., 2009). Após ser introduzido no rebanho, *M. hyopneumoniae* é transmitido para os outros suínos através de contato nasal-nasal ou das porcas para os seus leitões (Maes et al., 1996).

Apesar da infecção acometer suínos de todas as idades, a forma clínica da doença manifesta-se principalmente no período de engorda que antecede o abate. A lenta soroconversão, em torno de três semanas após a exposição ao agente, dificulta

o diagnóstico nos estágios iniciais da infecção (Sibila et al., 2009). Além disso, a ocorrência de infecções subclínicas não diagnosticadas é comum nos rebanhos, permitindo um ciclo contínuo de transmissão (Fano et al., 2005). A prevalência exata da PES é, muitas vezes, difícil de se determinar devido às limitações das técnicas diagnósticas disponíveis e a presença de coinfeções com outros patógenos respiratórios, incluindo *P. multocida*, PRSSV, SIV e PCV2 (Thacker & Minion, 2012). Estima-se que o microrganismo esteja difundido em mais de 90% dos rebanhos mundiais, com presença no abate de lesões pulmonares características de *M. hyopneumoniae* em cerca de 40-50% dos animais (Burch, 2004; Hillen et al., 2014).

O padrão de infecção e a severidade da doença nos rebanhos suínos podem ser influenciados por muitos fatores, como as condições de alojamento, higiene, vacinação e a virulência das cepas circulantes (Vranckx et al., 2011). Estudos com isolados de campo têm demonstrado a existência de grande variabilidade genômica e proteômica entre as cepas dentro de um mesmo rebanho e entre diferentes regiões (Nathues et al., 2011; Charlebois et al., 2014). Isolados de campo e cepas utilizadas para a produção das bacterinas podem diferir em até 45% a nível molecular. Estas diferenças antigênicas entre estas cepas de *M. hyopneumoniae* possivelmente são responsáveis pela proteção insuficiente conferida pela vacinação nos rebanhos suínos (Charlebois et al., 2014; Maes et al., 2008). Além disso, infecções simultâneas ou subsequentes com mais de uma cepa no mesmo animal podem resultar no agravamento das lesões pulmonares da PES (Vranckx et al., 2011).

2.5 Diagnóstico

Embora o isolamento de *M. hyopneumoniae* seja considerado o método “padrão ouro” para detecção do microrganismo, o crescimento fastidioso e a constante presença de outros contaminantes inviabilizam a aplicação da técnica na rotina dos laboratórios de diagnóstico (Thacker, 2004; Strait et al., 2008; Thacker & Minion, 2012). Sinais clínicos e lesões pulmonares podem ser utilizados apenas como diagnóstico presuntivo da doença, uma vez que lesões muito semelhantes podem ser causadas por outros patógenos como SIV, *P. multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Calsamiglia et al., 1999; Sibila et al., 2009).

O monitoramento da PES nos rebanhos é baseado em sorologia com kits comerciais de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) que utilizam como antígeno, proteínas de membrana ou extratos do microrganismo. Embora estes testes sorológicos apresentem alta especificidade, sua sensibilidade é baixa (37% a 49%), tornando-os pouco úteis para o diagnóstico individual (Thacker & Minion, 2012). A presença de anticorpos maternos nas primeiras semanas de vida, a vacinação e a ocorrência de reação cruzada com anticorpos derivados outros micoplasmas podem interferir na interpretação dos resultados (Neto et al., 2014). Além disso, a lenta soroconversão dos animais infectados limita a detecção nos estágios iniciais da doença (Thacker & Minion, 2012). Recentemente, Feng e colaboradores (2014) avaliaram a cinética da resposta de IgG total e de imunoglobulina A secretora (IgA) utilizando soros de suínos experimentalmente infectados frente aos antígenos recombinantes P36, P46 e P97 em um ELISA indireto. Como esperado, a resposta imune sistêmica apresentou soroconversão lenta, no entanto mais duradoura, enquanto que a resposta de mucosa foi detectada nos estágios iniciais da infecção, mas os níveis de anticorpos decaíram rapidamente. A proteína P97 demonstrou-se mais sensível para detecção de ambas imunoglobulinas com resultados superiores ao kit comercial. No entanto, ainda é necessário avaliar se o teste é capaz de diferenciar anticorpos induzidos pela vacina de anticorpos produzidos por animais infectados naturalmente.

M. hyopneumoniae também pode ser detectado por ensaios de imunofluorescência e imunohistoquímica utilizando secções de tecido pulmonar (Bouh et al., 2003). Estes são considerados métodos mais específicos, mas também sofrem com baixa sensibilidade, principalmente em infecções crônicas devido ao pequeno número de micoplasmas presentes nos tecidos e só podem ser realizados em amostras *post-mortem* (Thacker & Minion, 2012).

O diagnóstico utilizando PCR (*polymerase chain reaction*) é considerado o método mais sensível e específico. Diversas variações da técnica já foram descritas visando à detecção da bactéria em amostras de *swab* nasal, lavado bronco-alveolar (BALF) ou pulmão (Sibila et al., 2009; Thacker & Minion, 2012). *Nested* PCR é uma variação da técnica que utiliza dois conjuntos de *primers* para amplificar o gene que codifica para o RNA 16S de *M. hyopneumoniae*, considerada bastante sensível, capaz de detectar DNA do agente em quantidades muito pequenas (Calsamiglia et al., 1999).

Ensaio de PCR em tempo real também têm sido propostos, permitindo a diferenciação de uma ampla gama de isolados (Strait et al., 2008) e a detecção de *M. hyopneumoniae* em amostras clínicas (Dubosson et al., 2004; Marois et al., 2010).

As limitações quanto à sensibilidade e/ou especificidade das metodologias atuais, torna necessária sua combinação a fim de otimizar a acurácia do diagnóstico. Em virtude disto, o desenvolvimento de testes diagnósticos mais eficientes ainda se faz necessário.

2.6 Controle

O controle da PES envolve a otimização das práticas de manejo, melhorias nas condições de alojamento dos animais, o uso de antimicrobianos e vacinação (Maes et al., 2008). A adoção do sistema de produção “*all-in, all-out*” (todos dentro, todos fora) pode reduzir os riscos de disseminação da infecção devido à interrupção do ciclo de transmissão do patógeno entre suínos adultos e jovens, além de reduzir o estresse promovido pela mistura dos animais. Evitar a compra de animais de fontes desconhecidas e a elevada densidade animal por alojamento, bem como promover a aclimação do ambiente, também são práticas importantes para reduzir os fatores de risco associados à PES e outras coinfeções respiratórias (Maes et al., 2008; Nathues et al., 2014). Antimicrobianos como tetraciclina e macrolídeos são frequentemente utilizados no tratamento de doenças respiratórias como a PES. Entretanto, a eficácia dos programas de medicação é variável, eleva os custos de produção, não previne a infecção, além da possibilidade de desenvolvimento de resistência microbiana (Maes et al., 2008; Thacker & Minion, 2012).

2.6.1 Vacinas comerciais

As vacinas comercialmente disponíveis para o controle da PES consistem em preparações de células inteiras inativadas (bacterinas) associadas a adjuvantes, as quais são mundialmente utilizadas nos rebanhos de produção intensiva (Haesebrouck et al., 2004; Maes et al., 2008). Existem diversas bacterinas disponíveis no mercado

que podem ser administradas em uma ou duas doses, conforme recomendações do fabricante e esquema de vacinação adotado por cada granja. O desenvolvimento de uma estratégia de vacinação apropriada pode envolver a vacinação de leitões, porcas ou ambos (Maes et al., 2008).

As vantagens conferidas pela vacinação incluem a redução dos sinais clínicos e do grau de lesão pulmonar, aumento da performance produtiva através da melhoria no ganho de peso diário (2-8%) e da conversão alimentar (2-5%), diminuição do tempo para atingir o peso de abate e redução dos custos com tratamento da doença (Maes et al., 2008). Apesar disto, os efeitos da vacinação são variáveis entre os rebanhos (Hillen et al., 2014) e a mesma é incapaz de reduzir o estabelecimento do patógeno nos pulmões dos suínos e impedir a sua transmissão, oferecendo proteção parcial contra a doença (Haesebrouck et al., 2004; Villarreal et al., 2012). As diferenças genômicas e antigênicas entre as cepas circulantes e as cepas vacinais nos rebanhos afetados pela PES podem estar associadas a variabilidade dos resultados de proteção observados em condições de campo (Villarreal et al., 2012). Além disto, as sucessivas passagens do microrganismo *in vitro* para a produção das bacterinas promove a redução ou ausência de expressão de muitos antígenos possivelmente associados a patogênese da PES, o que pode contribuir para a falha destas vacinas em induzirem proteção completa contra a infecção (Fisch et al., 2016).

O mecanismo pelo qual as bacterinas reduzem o impacto da PES nos animais imunizados permanece pouco conhecido (Martelli et al., 2014). Alguns estudos sugerem que os anticorpos de mucosa e a resposta imune sistêmica mediada por células são importantes para o controle da doença (Thacker et al., 2000a; Marchioro et al., 2013). Suínos vacinados com bacterinas por via parenteral apresentaram menor secreção local da citocina pró-inflamatória TNF- α , aumento do número de células secretoras de IFN- γ no sangue (Thacker et al., 2000; Martelli et al., 2014), e maior secreção de IFN- γ e IL-10 na mucosa respiratória (Marchioro et al., 2013). A produção de IFN- γ é importante para a estimulação da resposta imune celular, enquanto a secreção de IL-10 está associada à prevenção dos efeitos patológicos das citocinas inflamatórias e à diminuição do influxo de macrófagos no tecido brônquio-alveolar (Thacker et al., 2000; Vranckx et al., 2012).

Embora não tenha sido demonstrada correlação direta entre o título de anticorpos e proteção contra PES, a secreção local de IgA no BALF é importante para prevenir a aderência da bactéria no epitélio ciliado, enquanto que IgG pode aumentar a opsonização do antígeno e a fagocitose por macrófagos alveolares (Thacker et al., 2000; Okada et al., 2000; Martelli et al., 2014). Outros ensaios experimentais sugerem que as bacterinas possivelmente atuem através da modulação do sistema imune do hospedeiro reduzindo os efeitos deletérios gerados por uma resposta inflamatória exacerbada (Okada et al., 2000; Vranckx et al., 2012; Marchioro et al., 2013; Martelli et al., 2014).

2.6.2 Desenvolvimento de vacinas recombinantes

As limitações associadas à proteção das bacterinas comerciais reforçam a necessidade do desenvolvimento de vacinas mais efetivas contra a PES. A tecnologia do DNA recombinante é uma abordagem estratégica que permite a seleção de antígenos com elevado potencial imunogênico e elimina o cultivo fastidioso da bactéria. Apesar dos consideráveis avanços obtidos nos últimos anos, poucos fatores de virulência de *M. hyopneumoniae* são conhecidos, fazendo com que os estudos experimentais foquem principalmente em adesinas e proteínas de membrana. O sequenciamento e análise proteômica de algumas cepas de *M. hyopneumoniae* (7448, 7422, 232, 168 e J) têm permitido a identificação e caracterização de diversas proteínas recombinantes com potencial para o desenvolvimento de vacinas (Simionatto et al., 2010; Marchioro et al., 2012; Galli et al., 2013). Estas proteínas têm sido avaliadas em diferentes formulações vacinais, que incluem vacinas de subunidade administradas individualmente (Simionatto et al., 2012; Marchioro et al., 2012; Lee et al., 2014; Jorge et al., 2014), coquetel de antígenos (Chen et al., 2008; Galli et al., 2013; Woolley et al., 2014), proteínas fusionadas a adjuvantes de mucosa (Conceição et al., 2006; Barate et al., 2014), proteínas associadas a vetores virais ou bacterianos (Fagan et al., 2001; Chen et al., 2001; Shimoji et al., 2003; Chen et al., 2006a; Chen et al., 2006b; Ogawa et al., 2009; Okamba et al., 2010) e vacinas de DNA (Chen et al., 2003; Galli et al., 2012; Virginio et al., 2014).

Dos antígenos avaliados nestes ensaios, alguns apresentaram resultados mais promissores. Entre estes destacam-se a região C-terminal da adesina P97 (P97R1), as proteínas de membrana externa P46 e P95 e a proteína de choque térmico P42. A proteína P97 é uma adesina que reconhece receptores específicos presentes nas células ciliadas do epitélio respiratório dos suínos, sendo esta ligação mediada por uma sequência repetitiva de cinco aminoácidos (AAKPV/E) na sua porção C-terminal, conhecida como R1 (Minion et al., 2000). A vacinação de camundongos com a região R1 fusionada à subunidade B da enterotoxina termolábel de *E. coli* (rLTBR1) induziu anticorpos sistêmicos anti-R1 e de mucosa (IgA), estimulando resposta imune preferencialmente do tipo Th1 quando administrada por via intramuscular e Th2 quando por via intranasal (Conceição et al., 2006). A vacinação de suínos com a porção C-terminal da adesina P97 expressa por vetores bacterianos (Shimoji et al., 2003; Ogawa et al., 2009) e virais (Okamba et al., 2010) ou em fusão com a porção N-terminal da toxina III de *A. pleuropneumoniae* (Lee et al., 2014) foi capaz de reduzir a severidade das lesões pulmonares da PES frente a desafio experimental com *M. hyopneumoniae*.

Os antígenos P46 e P95 são proteínas de membrana expostas na superfície do patógeno, consideradas bons alvos vacinais, uma vez que anticorpos têm fácil acesso às mesmas. P46 é uma proteína espécie-específica de *M. hyopneumoniae*, a qual vem sendo avaliada como antígeno diagnóstico em alguns ensaios de ELISA indireto (Futo et al., 1995; Feng et al., 2014) ou através da produção de mAbs anti-P46 para ELISA sanduíche (Bouh et al., 2003; Okada et al., 2005). Esta proteína também é capaz de estimular respostas imune humoral e celular específicas, caracterizadas pela produção de INF- γ e IL-10 quando avaliada como vacina de subunidade e DNA (Galli et al., 2012; Virginio et al., 2014), ou como coquetel vacinal (Chen et al., 2008). O antígeno P95 é fortemente reconhecido por soros de suínos convalescentes para PES e capaz de estimular a produção de anticorpos sistêmicos específicos (Simionatto et al., 2012). Ele também mostrou-se capaz de estimular resposta imune celular em camundongos quando avaliado como vacina de subunidade ou de DNA (Galli et al., 2012).

A proteína P42 é um fragmento de 42 kDa da chaperona molecular P65, pertencente à família HSP70, uma proteína de choque térmico bem expressa em condições de estresse para a célula bacteriana (Chen et al., 2003). Quando testada

como vacina de subunidade, DNA ou coquetel, a P42 induziu tanto resposta humoral como celular em camundongos, especialmente na expressão das citocinas IL-4, IL-10 e INF- γ (Chen et al., 2003; Galli et al., 2012; Virginio et al., 2014). Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a resposta imune humoral e celular estimulada pela proteína rP42 como vacina de subunidade emulsificada com um adjuvante a base de óleo em condições de campo, em uma granja positiva para *M. hyopneumoniae* (Jorge et al., 2014). Neste ensaio, rP42 estimulou significativa produção da citocina anti-inflamatória IL-10, bem como a manutenção de elevados níveis de anticorpos no soro dos suínos imunizados.

Apesar dos constantes esforços para desenvolver uma vacina recombinante, os ensaios realizados até o momento têm demonstrado que vacinas baseadas em um único antígeno não são suficientes para conferir proteção contra a PES (Fagan et al., 2001; Shimoji et al., 2003; Okamba et al., 2010; Jorge et al., 2014). Como alternativa, alguns estudos têm destacado que a fusão de diferentes antígenos em uma única molécula pode ser uma abordagem interessante a fim de aumentar a imunogenicidade de vacinas recombinantes (Da Costa et al., 2014; Lee et al., 2014; Marchioro et al., 2014b; Duthie et al., 2016; Moreira et al., 2016), representando uma estratégia promissora para a produção de vacinas contra a PES.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A fusão de frações antigênicas das proteínas P97R1, P46, P95 e P42 de *M. hyopneumoniae* em uma única molécula retém as propriedades imunogênicas dos alvos individuais e pode contribuir para o futuro desenvolvimento de uma vacina mais efetiva contra a PES.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades imunogênicas de uma quimera composta pela fusão de segmentos antigênicos de quatro proteínas de *M. hyopneumoniae* (P97R1, P46, P95 e P42).

3.3 Objetivos Específicos

- Produzir formulações vacinais da proteína quimérica consistindo em uma vacina de subunidade e uma bacterina recombinante de *E. coli* expressando o antígeno;
- Avaliar a resposta imune induzida em camundongos inoculados com as formulações vacinais.

4 CAPÍTULO 1

4.1 A novel chimeric protein composed of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens as a vaccine candidate evaluated in mice

Manuscrito aceito para publicação na revista *Veterinary Microbiology*

**A novel chimeric protein composed of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens
as a vaccine candidate evaluated in mice**

Running Title: *M. hyopneumoniae* chimeric protein as vaccine candidate

Natasha Rodrigues de Oliveira¹, Sérgio Jorge¹, Charles Klazer Gomes¹, Caroline Rizzi¹,
Violetta Dias Pacce¹, Thais Farias Collares¹, Leonardo Garcia Monte^{1*} and Odir Antônio
Dellagostin^{1#}

¹Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de
Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, CP 354, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

#Address correspondence to Odir A. Dellagostin.

Tel.: +55 53 32757517; fax: +55 53 32757551

Email: odirad@terra.com.br

*Present address: Instituto Federal Farroupilha, Campus Jaguari, Jaguari, Brazil.

ABSTRACT

Enzootic Pneumonia (EP) is caused by the *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic bacteria, and it represents a significant respiratory disease that is responsible for major economic losses within the pig industry throughout the world. The bacterins that are currently commercially available have been proven to offer only partial protection against *M. hyopneumoniae*, and the development of more efficient vaccines is required. Several recombinant antigens have been evaluated via different immunization strategies and have been found to be highly immunogenic. This work describes the construction and immunological characterization of a multi-antigen chimera composed of four *M. hyopneumoniae* antigens: P97R1, P46, P95, and P42. Immunogenic regions of each antigen were selected and combined to encode a single polypeptide. The gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the chimeric protein was recognized by specific antibodies against each subunit, as well as by convalescent pig sera. The immunogenic properties of the chimera were then evaluated in a mice model through two recombinant vaccines that were formulated as follows: (1) purified chimeric protein plus adjuvant or (2) recombinant *Escherichia coli* bacterin. The immune response induced in BALB/c mice immunized with each formulation was characterized in terms of total IgG levels, IgG1, and IgG2a isotypes against each antigen present in the chimera. The results of the study indicated that novel chimeric protein is a potential candidate for the future development of a more effective vaccine against EP.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, Enzootic pneumonia, chimeric protein, recombinant antigens.

499 INTRODUCTION

500 Enzootic pneumonia (EP), which results from *M. hyopneumoniae* infection, is a
 501 respiratory disease that is highly prevalent within the intensive pig farming industry. The
 502 bacteria is typically inhaled into the respiratory tract where it begins the infection process by
 503 binding to the cilia of epithelial cells in the airways, eliciting the dysfunction of cilia and leading
 504 to ciliary clearance (DeBey & Ross, 1994; Thacker et al., 2000). The clinical progression of EP
 505 is mainly characterized by chronic, non-productive cough, reduced rate of average daily weight
 506 gain, and reduced feed conversion efficiency (Maes et al., 2008; Sibila et al., 2009). The
 507 decrease in productivity and the cost of medication used to treat this disease causes significant
 508 economic losses to the swine industry throughout the world (Haesebrouck et al., 2004; Maes et
 509 al., 2008; Sibila et al., 2009).

510 Vaccination represents the most used strategy through which EP can be controlled
 511 (Haesebrouck et al., 2004). The current commercial vaccines consist of inactivated whole-cell
 512 adjuvanted formulations and are used throughout the world (Maes et al., 2008; Sibila et al.,
 513 2009). Although they improve productive performance, these vaccines do not prevent the
 514 pathogen from colonizing the respiratory tract and do not induce sterilizing immunity; as such,
 515 they provide only partial protection against the disease (Haesebrouck et al., 2004; Maes et al.,
 516 2008; Thacker et al., 2000). In order to identify an alternative vaccine that can overcome the
 517 limitations associated with the bacterins that are currently available, a reverse vaccinology
 518 approach has been used. Data generated by sequencing five strains of *M. hyopneumoniae* (232,
 519 J, 7448, 7422, and 168) (Liu et al., 2013; Minion et al., 2004; Siqueira et al., 2013; Vasconcelos
 520 et al., 2005) allowed the identification and characterization of several recombinant antigens
 521 with immunogenic potential for use in more effective vaccines.

522 A few recombinant antigens from *M. hyopneumoniae* have been extensively studied by
 523 several groups. The C-terminal region of adhesin P97 (P97R1), which has been found to be

among the most promising antigens, exhibits an important virulence factor that is involved in the pathogen's adherence to the host respiratory tract (Conceição et al., 2006; Marchioro et al., 2014a). The molecular chaperone DnaK (P42), a heat shock protein that is a member of the HSP70 family, is highly expressed in stress conditions (Galli et al., 2012; Jorge et al., 2014; Marchioro et al., 2014a; Simionatto et al., 2012). The outer membrane protein P95 and the 46-kDa membrane surface protein (P46), which are possibly exposed on the pathogen surface, are strongly recognized by convalescent pig sera (Galli et al., 2012; Simionatto et al., 2012). Different approaches by which the immunogenicity of recombinant vaccines can be enhanced have been evaluated. Constructions based on multi-antigens represent an interesting strategy for combining proteins from one or more pathogens in a single molecule (Chen et al., 2008; Marchioro et al., 2014b).

In this study, we developed a chimeric protein composed of four *M. hyopneumoniae* antigens: P97R1, P46, P95, and P42. The antigenicity of this construction was verified using serum from naturally infected pigs. In addition, the immunogenicity of this chimera was evaluated by testing different vaccine formulations in mice.

MATERIALS AND METHODS

***In silico* selection of coding sequences and gene design**

Coding DNA sequences (CDS) and protein sequences for P97R1 (MHP_0198), P46 (MHP_0513), P95 (MHP_0099), and P42 (MHP_0067) antigens from *M. hyopneumoniae* strain 7448 (NC007332) were used as reference to design the chimeric gene (Table 1). These sequences were analyzed using the following bioinformatics software: SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), IEDB-Antibody Epitope Prediction (<http://tools.iedb.org/bcell/>) and Vector NTI Advance® 11 (Invitrogen™). Regions encoding surface-exposed, predominantly hydrophilic and with a high number of linear epitopes were

selected. Restriction sites for *Bam*HI and *Kpn*I were added flanking the gene, and a flexible linker Gly_{2x}SerGly was inserted between each gene portion to enable the proper folding of protein. The *in silico* protein structure was constructed using the I-TASSER online server (Zhang, 2008) and visualized using UCSF Chimera package software (Pettersen et al., 2004).

Cloning, expression, and purification of recombinant proteins

The *p97r1p46p95p42* gene was chemically synthesized (Epoch Biolabs, Inc., USA) and provided on pBluescript II SK(-) (pBSK) vector. The gene was excised from pBSK plasmid with restriction enzymes and cloned into the pAE vector (Ramos et al., 2004) using *E. coli* Top 10 (Invitrogen) competent cells as previously described (Sambrook & Russell, 2001). The pAE/*p97r1p46p95p42*, pAE/*p97r1*, pET/*p46*, pAE/*p95*, and pAE/*p42* recombinant plasmids were transformed in *E. coli* BL21 (DE3) Star (Invitrogen) cells. The expression and purification of recombinant proteins were performed using a previously described method (Conceição et al., 2006; Marchioro et al., 2012).

Antigenicity assays of chimeric protein

To assess the antigenicity of the chimeric protein, Western blot and ELISA were performed using the previously described method (Simionatto et al., 2012; Jorge et al., 2014). For Western blot, mouse antibodies and dilutions were used as follows: monoclonal anti-6xHis (Sigma-Aldrich), diluted 1:6000; monoclonal anti-P97R1 (F1B6), diluted 1:4000 (Dr. Eileen Thacker–Iowa State University, USA); polyclonal anti-P46, anti-P95, and anti-P42, diluted 1:50 (previously produced) (Galli et al., 2012); and HRP-conjugated goat anti-mouse (Sigma-Aldrich), diluted 1:6000. For indirect ELISA, microtiter plates were coated using 50 ng/well of purified chimeric protein. Sera samples from specific pathogen-free (SPF) (n=32) and convalescent phase (n=105) pigs, diluted at a ratio of 1:50, were obtained from a mycoplasma-negative farm and from three commercial herds that had been chronically affected by EP in Southern Brazil, respectively.

574 **Vaccine formulations and mice vaccination**

575 The purified chimeric protein was diluted in oil-adjuvant AddaVax™ (InvivoGen) at a ratio of
 576 1:1 according to the manufacturer's instructions. Recombinant bacterins were produced in *E.*
 577 *coli* BL21 (DE3) Star as per the method previously described (Moreira et al., 2016). Female
 578 BALB/c mice that were aged eight weeks were allocated to five different experimental groups
 579 (Table 2) with six animals in each group, as follows: (1) rP97R1P46P95P42 + AddaVax™
 580 adjuvant (rCHI Add); (2) Negative control A, PBS + AddaVax™ adjuvant (PBS Add); (3) *E.*
 581 *coli* bacterin expressing rP97R1P46P95P42 (*E. coli* rCHI); (4) Negative control B, *E. coli*
 582 bacterin containing pAE vector (*E. coli* Vec); and (5) Positive control, Sprintvac MH (Merial)
 583 (BACT). Two doses of 50 µg of purified protein or *E. coli* bacterins were administered
 584 intramuscularly (IM) at a 21-day interval. Blood samples were collected from retro-orbital sinus
 585 0, 21, 42, and 63 days after the first inoculation (DAI), and stored at -20 °C before being
 586 processed. All animal experiments were conducted in accordance with the recommendations of
 587 the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas (Permit
 588 number: 2351-2015).

589 **Total IgG antibodies and isotype profile against recombinant proteins**

590 Specific antibodies induced by mice immunization with vaccine formulations were assessed by
 591 ELISA and Western blot using the process previously described (Simionatto et al., 2012), with
 592 some modifications. For ELISA, microtiter plates were coated with chimeric protein (100
 593 ng/well) or each chimeric subunit protein (rP97R1, rP95 and rP42: 100 ng/well; rP46: 50
 594 ng/well). To determine total IgG, proteins were incubated with pooled serum samples from 0,
 595 21, 42, and 63 DAI (diluted 1:100) and IgG anti-mouse antibody conjugated to horseradish
 596 peroxidase (Sigma-Aldrich) (diluted 1:6000). To determine the levels of IgG subclasses (IgG1
 597 and IgG2a), proteins were incubated with pooled serum samples from 0 and 63 DAI (diluted
 598 1:100) and with the antibodies provided in a Mouse Monoclonal Isotyping Kit (Sigma-Aldrich).

All ELISA reactions were assessed in triplicate and absorbance was determined at 492 nm using a TP-Reader plate spectrophotometer (ThermoPlate, Brazil). To confirm the ability of the antibodies of the immunized mice to recognize the chimeric protein and each chimeric subunit, a Western blot was performed using the same antigens described above with pooled serum samples from 0 and 63 DAI.

Indirect ELISA and Western blot with extract of *M. hyopneumoniae* spp.

To verify whether the antibodies induced by mice immunization were able to recognize native proteins from *M. hyopneumoniae*, pooled serum samples from 0 and 63 DAI (diluted 1:100) were evaluated by ELISA and Western blot using the method previously described (Marchioro et al., 2012). For the purposes of the ELISA, microtiter plates were coated with *M. hyopneumoniae* strain 7448, while for the Western blot assay, the *M. hyopneumoniae* strains 7448, 7422, and J whole-cell extracts were used as antigen (obtained from Embrapa Concórdia, Santa Catarina, Brazil). Sera from PBS Add and *E. coli* Vec groups were used as negative controls.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-test were used to determine the significance of any differences that were observed between the groups. Differences were considered significant at a *P* value of < 0.05. The analyses were carried out using GraphPad Prism® Version 6 for Windows (SPSS Inc., Illinois, USA).

RESULTS

Vector construction, expression, and purification

The characteristics of the antigenic sequences selected to construct the chimeric protein are summarized in Table 1. The synthetic gene obtained was cloned in pAE expression vector (Fig.1A). The estimated *in silico* structure of the chimeric protein is shown in Fig.1B. After

cloning, *E. coli* BL 21 (DE3) Star cells expressed a soluble recombinant protein of approximately 62 kDa, which was the molecular weight expected.

Chimeric protein antigenicity

In the Western blot analysis, the chimeric protein was recognized by mAb anti-histidine and specific antibodies reacted against each subunit (Fig 2A). In the ELISA assay, this protein was more significantly recognized by serum from different positive-mycoplasma swineherds than the SPF sera ($P < 0.05$ for herd 3 and $P < 0.0001$ for herds 2 and 4; Fig. 2B).

Systemic humoral immune response

The total specific antibodies (total IgG; IgG1, and IgG2a isotypes) induced by the recombinant vaccines were determined by indirect ELISA. The vaccine formulations containing the chimeric protein (rCHI Add and *E. coli* rCHI groups) induced an antibody response that was statistically higher ($P < 0.05$) at 21 DAI than the negative controls (PBS Add and *E. coli* Vec groups); the antibody levels remained constant during 63 DAI for all antigens tested (Fig. 3). The rCHI Add group induced levels of antibodies against chimeric protein at a statistically higher rate than the *E. coli* rCHI group at 42 e 63 DAI ($P < 0.05$; Fig. 3A). When we evaluated the immune response induced against each subunit of the chimeric protein, the positive control (BACT group) recognized the rP46 antigen on its own (Fig. 3B), but not when it was fused with additional antigens. The levels of anti-P42 and anti-P95 antibodies were statistically higher in sera from the rCHI Add group than those from the *E. coli* rCHI group, at 42 and 63 DAI ($P < 0.05$; Fig. 3C) and 63 DAI (Fig. 3D) respectively. The seroconversions in the rCHI Add and *E. coli* rCHI groups were detected against rP46 and rP97R1 antigens (Fig. 3B and 3E) but did not exhibit significant differences. The Western blot assay that used sera from 63 DAI confirmed the ELISA results for all serum samples (data not shown).

Analysis of IgG isotypes demonstrated that both vaccine formulations (rCHI Add and *E. coli* rCHI groups) stimulated a mixed IgG1/IgG2a (Fig. 4A). However, the humoral immune

response (IgG1) was predominant, exhibiting a statistically significant difference for all recombinant antigens ($P < 0.001$; Fig. 4A-E). The positive control (BACT group) did not react with the chimeric protein (Fig. 4A), stimulating an IgG1 and IgG2a response only against the individual rP46 antigen (Fig. 4B).

Reactivity with native proteins from *M. hyopneumoniae* spp.

ELISA with *M. hyopneumoniae* extract 7448 was performed with the sera from immunized mice to verify whether the antibodies induced were able to recognize native proteins. Mouse sera from rCHI and *E. coli* rCHI groups (63 DAI) significantly recognized native proteins compared to the negative controls ($P < 0.0001$; Fig. 5A). In Western blot, both vaccine formulations (rCHI Add and *E. coli* rCHI groups) induced the production of antibodies that exhibited the ability to react with native proteins from *M. hyopneumoniae* (7448, 7422 and J strains) (Fig. 5B). Bands around 102 kDa and 65 kDa were detected, which are compatible with some variants of the adhesin P97 (Fig. 5Ba) and the DnaK heat shock protein (P42) (Fig. 5Bb), respectively. Bands correlated with P46 and P95 native proteins (around 46 kDa and 132 kDa respectively) were not detected.

DISCUSSION

In the present study, a recombinant chimeric protein was produced, and its antigenic and immunogenic profile was evaluated as a vaccine candidate against EP. The design of the chimeric protein combined four immunogenic antigens from *M. hyopneumoniae*: P97R1, P46, P95, and P42. These proteins are associated with the pathogenesis of the disease, and fragments of each protein were selected by bioinformatics analyses (Table 1). The chimeric protein was able to induce specific IgG antibodies and stimulate a predominant IgG1-type response in a mice model. In addition, all subunits of the chimeric protein were recognized by specific antibodies (Fig. 2A) and were distinctly recognized by serum samples from naturally infected

pigs (Fig. 2B). These results suggest that the chimeric protein maintained the original antigenic epitopes.

Previous studies have demonstrated that one antigen may not be sufficient to induce an ideal immune response against EP (Jorge et al., 2014; Lee et al., 2014; Okamba et al., 2010; Shimoji et al., 2003); therefore, vaccines that are composed by fusing multiple antigens may exhibit increased immunogenicity (Da Costa et al., 2014; Duthie et al., 2016; Marchioro et al., 2014b). This work evaluated the immune response induced in mice against the chimeric protein delivered via a subunit vaccine with the commercial adjuvant AddaVax™, and via an *E. coli* recombinant bacterin. Recent studies performed with recombinant bacterins have demonstrated that the whole-cell preparation exhibits an immunomodulatory effect (Gupta et al., 2012; Lourdault et al., 2014; Moreira et al., 2016). Furthermore, inactivated whole-cell preparations have additional advantages as they are relatively low cost to manufacture on a large scale (solubilization and purification steps are unnecessary) and the bacteria contain factors that stimulate antigen presenting cells (APCs) (Gupta et al., 2012).

Mice from the rCHI Add and *E. coli* rHCI groups produced significant specific IgG antibodies against each of the recombinant antigens evaluated ($P < 0.05$; Fig. 3), indicating that the construction of the chimeric protein retained immunogenic characteristics. The antibody levels against P42 and P95 antigens in the rCHI Add group were statistically higher than those in the *E. coli* rCHI group. The improvement in the seroconversion in the rCHI Add group could be attributed to the immunomodulatory effect of the oil-in-water nanoemulsion adjuvant used in this vaccine formulation (Coffman et al., 2010). These vaccine formulations were able to induce a mixed Th1/Th2 type response, with statically predominant IgG1 production ($P < 0.05$; Fig. 4). The production of specific IgG1 antibodies is related to humoral immune response (Th2), while the induction of the IgG2a antibodies is associated with a cellular immune response (Th1) (Mosmann & Coffman, 1989). Our results corroborated with previous studies

that have tested these recombinant proteins and demonstrated a predominance of IgG1 production (Barate et al., 2014; Conceição et al., 2006; Galli et al., 2012; Marchioro et al., 2014a). Although the exact mechanisms of protection against *M. hyopneumoniae* infection are not fully understood, IgG subclass distribution may be important in controlling EP (Galli et al., 2012; Thacker et al., 2000).

The commercial vaccine tested did not stimulate the production of detectable systemic antibodies against the rP97R1, rP95, and rP42 antigens. This effect may have occurred because the bacterial strain used to produce the commercial vaccine did not express these antigens or only at a low level. These findings are in agreement with the results obtained by our research group in previous studies that employed different commercial bacterins and a few recombinant antigens (Conceição et al., 2006; Fisch et al., 2016; Galli et al., 2012; Simionatto et al., 2012). The absence of these and other important antigens could be related to the low efficiency of commercial vaccines, reinforcing the need for more effective vaccines to be developed (Fisch et al., 2016). Noteworthy, the BACT group recognized the rP46 antigen on its own but did not recognize it when it was inserted in the chimeric protein. Although a linker that consisted of Gly_{2x}SerGly was added between each subunit, it is possible that the conformational epitopes of rP46 in the chimera could not fold properly, and this could hinder the antibody recognition induced by the commercial bacterin.

Furthermore, serum samples from rCHI Add and *E. coli* rCHI immunized groups reacted with the *M. hyopneumoniae* 7448 extract in ELISA (Fig. 5A). Interestingly, the Western blot that employed the 7448, 7422, and J *M. hyopneumoniae* extracts presented bands with a molecular weight that was compatible with the P97 and P42 proteins (Fig. 5B); however, bands compatible with P46 and P95 were not identified. One possible explanation for this could be that these proteins were not expressed by the strains grown *in vitro*.

Here, we demonstrated that the chimeric protein in both presentations of vaccine formulations (subunit vaccine or *E. coli* recombinant bacterin) was immunogenic in mice immunization. Although the induction of immune response in mice against *M. hyopneumoniae* is not correlated with protection, murine responses achieved by experimental immunization are important for the selection of the most promising antigens for vaccine development and can be performed prior to further studies in pigs (Galli et al., 2012; Virginio et al., 2014).

To summarize, this study described the production and immunological characterization of a recombinant chimeric protein that was composed by fusing four important *M. hyopneumoniae* antigens. Our results indicated that this chimeric protein was immunogenic in mice and, as such, it represents a potential vaccine candidate against EP. Although the mouse immune response cannot be extrapolated to swine and no direct correlation has been found between antibody concentrations and protection against *M. hyopneumoniae* (Thacker et al., 2000), the results warrant further investigation in challenge experiments in pigs to determine the level of protection under experimental and field conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

Barate, A.K., Cho, Y., Truong, Q.L., Hahn, T.W., 2014. Immunogenicity of IMS 1113 plus soluble subunit and chimeric proteins containing *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 C-terminal repeat regions. FEMS Microbiol. Lett. 352, 213–220. doi:10.1111/1574-6968.12389

- 746 Chen, A.Y., Fry, S.R., Daggard, G.E., Mukkur, T.K.S., 2008. Evaluation of immune response
747 to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as
748 cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine* 26, 4372–4378.
749 doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.005
- 750 Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to
751 work. *Immunity* 33, 492–503. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002
- 752 Conceição, F.R., Moreira, Â.N., Dellagostin, O.A., 2006. A recombinant chimera composed
753 of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli*
754 heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 24, 5734–
755 5743. doi:10.1016/j.vaccine.2006.04.036
- 756 Da Costa, A.C., Costa, A.D.O., De Oliveira, F.M., Nogueira, S.V., Rosa, J.D., Resende, D.P.,
757 Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A.P., 2014. A new recombinant BCG vaccine induces
758 specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis.
759 *PLoS One* 9, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0112848
- 760 DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma*
761 *hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 62, 5312–5318.
- 762 Duthie, M.S., Favila, M., Hofmeyer, K.A., Tutterrow, Y.L., Reed, S.J., Laurance, J.D.,
763 Picone, A., Guderian, J., Bailor, H.R., Vallur, A.C., Liang, H., Mohamath, R., Vergara,
764 J., Howard, R.F., Coler, R.N., Reed, S.G., 2016. Strategic evaluation of vaccine
765 candidate antigens for the prevention of *Visceral Leishmaniasis*. *Vaccine* 34, 2779–2786.
766 doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.067
- 767 Fisch, A., Marchioro, S.B., Gomes, C.K., Galli, V., De Oliveira, N.R. de, Simionatto, S.,
768 Dellagostin, O.A., Mendonça, M., Moreira, Â.N., Conceição, F.R., 2016. Commercial
769 bacterins did not induce detectable levels of antibodies in mice against *Mycoplasma*
770 *hyopneumoniae* antigens strongly recognized by swine immune system. *Trials Vaccinol.*

- 771 5, 32–37. doi:10.1016/j.trivac.2016.01.001
- 772 Galli, V., Simionatto, S., Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Conceição, F.R.,
 773 Dellagostin, O. a., 2012. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae*
 774 antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines.
 775 Vaccine 31, 135–140. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.088
- 776 Gupta, V.K., Radhakrishnan, G., Harms, J., Splitter, G., 2012. Invasive *Escherichia coli*
 777 vaccines expressing *Brucella melitensis* outer membrane proteins 31 or 16 or periplasmic
 778 protein BP26 confer protection in mice challenged with *B . melitensis*. Vaccine 30,
 779 4017–4022. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.036
- 780 Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A., 2004.
 781 Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? Vet.
 782 Microbiol. 100, 255–268. doi:10.1016/j.vetmic.2004.03.002
- 783 Jorge, S., Oliveira, N.R. de, Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Hartleben, C.P.,
 784 Dellagostin, O.A., 2014. The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock
 785 protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. Comp. Immunol.
 786 Microbiol. Infect. Dis. 37, 229–236. doi:10.1016/j.cimid.2014.07.001
- 787 Lee, S.H., Lee, S., Chae, C., Ryu, D.-Y., 2014. A recombinant chimera comprising the R1 and
 788 R2 repeat regions of *M. hyopneumoniae* P97 and the N-terminal region of *A.*
 789 *pleuropneumoniae* ApxIII elicits immune responses. BMC Vet. Res. 10, 43.
 790 doi:10.1186/1746-6148-10-43
- 791 Liu, W., Xiao, S., Li, M., Guo, S., Li, S., Luo, R., Feng, Z., Li, B., Zhou, Z., Shao, G., Chen,
 792 H., Fang, L., 2013. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae*
 793 pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. BMC Genomics 14, 80.
 794 doi:10.1186/1471-2164-14-80
- 795 Lourdault, K., Wang, L., Vieira, A., Matsunaga, J., Melo, R., Lewis, M.S., Haake, D.A.,

- 796 Gomes-solecki, M., 2014. Oral Immunization with *Escherichia coli* Expressing a
 797 Lipidated Form of LigA Protects Hamsters against Challenge with *Leptospira*
 798 *interrogans* Serovar Copenhageni. Infect. Immun. 82, 893–902. doi:10.1128/IAI.01533-
 799 13
- 800 Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of
 801 *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Vet. Microbiol. 126, 297–309.
 802 doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.008
- 803 Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Jorge, S., Galli, V., Haesebrouck, F., Maes, D.,
 804 Dellagostin, O.A., Conceição, F.R., 2014a. Local and systemic immune responses
 805 induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae*
 806 antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LTb. Vet.
 807 Microbiol. 173, 166–71. doi:10.1016/j.vetmic.2014.07.009
- 808 Marchioro, S.B., Sácristan, R.D.P., Michiels, A., Haesebrouck, F., Conceição, F.R.,
 809 Dellagostin, O.A., Maes, D., 2014b. Immune responses of a chimaeric protein vaccine
 810 containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and LTb against experimental *M.*
 811 *hyopneumoniae* infection in pigs. Vaccine 32, 4689–94.
 812 doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.072
- 813 Marchioro, S.B., Simionatto, S., Galli, V., Conceição, F.R., Brum, C.B., Fisch, A., Gomes,
 814 C.K., Dellagostin, O.A., 2012. Production and characterization of recombinant
 815 transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 155, 44–52.
 816 doi:10.1016/j.vetmic.2011.08.001
- 817 Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., Mahairas, G.G.,
 818 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of
 819 swine mycoplasmosis. J. Bacteriol. 186, 7123–33. doi:10.1128/JB.186.21.7123-
 820 7133.2004

- 821 Moreira, C., da Cunha, C.E.P., Moreira, G.M.S.G., Mendonça, M., Salvarani, F.M., Moreira,
822 Â.N., Conceição, F.R., 2016. Protective potential of recombinant non-purified botulinum
823 neurotoxin serotypes C and D. *Anaerobe* 40, 58–62. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.05.012
- 824 Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. Th1 AND Th2 CELLS: Different Patterns of
825 Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann. Rev. Immunol* 7,
826 145–173. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
- 827 Okamba, F.R., Arella, M., Music, N., Jun, J., Gottschalk, M., Gagnon, C.A., 2010. Potential
828 use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal
829 portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in
830 swine. *Vaccine* 28, 4802–4809. doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.089
- 831 Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C.,
832 Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and
833 analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
- 834 Ramos, C.R.R., Abreu, P.A.E., Nascimento, A.L.T.O., Ho, P.L., 2004. A high-copy T7
835 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a
836 minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37, 1103–
837 1109. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004000800001
- 838 Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2,*
839 *3.pdf. Hum. Mutat.* doi:10.1002/humu.1186.abs
- 840 Shimoji, Y., Oishi, E., Muneta, Y., Nosaka, H., Mori, Y., 2003. Vaccine efficacy of the
841 attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of
842 *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine.
843 *Vaccine* 21, 532–537. doi:S0264-410X(02)00462-0
- 844 Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., 2009. Current perspectives on the diagnosis and
845 epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 181, 221–231.

- 846 doi:10.1016/j.tvjl.2008.02.020
- 847 Simionatto, S., Marchioro, S.B., Galli, V., Brum, C.B., Klein, C.S., Rebelatto, R., Silva, E.F.,
 848 Borsuk, S., Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., 2012. Immunological characterization of
 849 *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. Comp. Immunol. Microbiol. Infect.
 850 Dis. 35, 209–216. doi:10.1016/j.cimid.2012.01.007
- 851 Siqueira, F.M., Thompson, C.E., Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Reolon, L., Almeida, L.G.,
 852 Maria, M., Souza, R. De, Prosdocimi, F., Schrank, I.S., Ferreira, H.B., Tereza, A.,
 853 Vasconcelos, R. De, 2013. New insights on the biology of swine respiratory tract
 854 mycoplasmas from a comparative genome analysis. BMC Genomics 14, 1–17.
 855 doi:10.1186/1471-2164-14-175
- 856 Thacker, E.L., Thacker, B.J., Kuhn, M., Hawkins, P.A., Waters, W.R., 2000. Evaluation of
 857 local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a
 858 *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. Vet. Med. Res. Inst. 61, 1384–1389.
 859 doi:10.2460/ajvr.2000.61.1384
- 860 Vasconcelos, A.T.R., Ferreira, H.B., Bizarro, C. V, Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto,
 861 P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G.P., Almeida, R., Alves-filho, L., Assunc, E.N., Bogo,
 862 R., Brigido, M.M., Brocchi, M., Burity, H.A., Camargo, A.A., Camargo, S.S., Carepo,
 863 M.S., Carraro, D.M., Cascardo, C.D.M., Castro, L.A., Cavalcanti, G., Chemale, G.,
 864 Collevatti, R.G., Cunha, C.W., Dallagiovanna, B., Dambro, B.P., Dellagostin, O.A.,
 865 Falca, C., Fantinatti-garboggini, F., Felipe, M.S.S., Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas,
 866 N.S.A., Fri, D., Guimara, C.T., Madeira, H.M.F., Manfio, G.P., Maranha, A.Q.,
 867 Martinkovics, C.T., Ramalho-neto, C.E., Nicola, M.F., Oliveira, S.C., Paixa, R.F.C.,
 868 Pena, D.J., Pereira, M., Pereira-ferrari, L., Piffer, I., Pinto, L.S., Potrich, D.P., Salim,
 869 A.C.M., Santos, R., Schmitt, R., Schneider, M.P.C., Schrank, A., Schrank, I.S., Schuck,
 870 A.F., Seuanez, H.N., Silva, D.W., Silva, R., Silva, C., Soares, M.A., Souza, K.R.L.,

Souza, R.C., Staats, C.C., Steffens, M.B.R., Teixeira, S.M.R., Urmenyi, T.P., Vainstein, M.H., Zuccherato, L.W., Simpson, A.J.G., Zaha, A., 2005. Swine and Poultry Pathogens : the Complete Genome Sequences of Two Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a Strain of *Mycoplasma synoviae* †. J. Bacteriol. 187, 5568–5577. doi:10.1128/JB.187.16.5568

Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Paes, J.A., Schuck, D.C., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2014.

Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine enzootic pneumonia. Vaccine 32, 5832–5838. doi:10.1016/j.vaccine.2014.08.008 0264-410X/©

Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics 9, 40. doi:10.1186/1471-2105-9-40

Table 1. Characteristics of antigens select in the chimeric protein

Protein name	Annotation genome strain 7448	NCBI accession number	Features/function	Original size (kDa)	Selected fragment (aa)
P97R1	MHP_0198	<u>YP_287595.1</u>	Adhesin P97	122	788 – 915
P46	MHP_0513	<u>YP_287902.1</u>	46K surface antigen precursor	46	323 – 419
P95	MHP_0099	<u>YP_287499.1</u>	Outer membrane protein - P95	132	604 – 750
P42	MHP_0067	<u>YP_287467.1</u>	Molecular chaperone DnaK	65	434 – 600

909 Table 2. Mice vaccination strategies

Group	Formulation	Dose
1- rCHI Add	rP97R1P46P95P42 + AddaVax™ adjuvant	0.1 ml + 50 µg
2- PBS Add	PBS + AddaVax™ adjuvant- negative control A	0.1 ml
3- <i>E. coli</i> rCHI	<i>E. coli</i> bacterin + rP97R1P46P95P42 (~10 ⁸ CFU/ml*)	0.1 ml + 50 µg
4- <i>E. coli</i> Vec	<i>E. coli</i> bacterin + pAE vector-negative control B (~10 ⁸ CFU/ml)	0.1 ml
5- BACT	Sprintvac MH commercial vaccine	0.1 ml

910 *CFU, Colony-forming unit

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

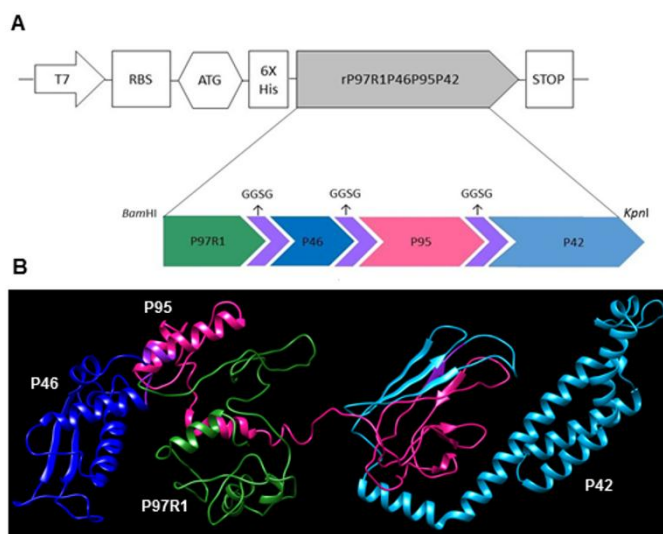


FIG 1. Schematic representation of chimeric protein. (A) Expression cassette representation of pAE/p97r1p46p95p42 construction. The chimeric protein was fused at 6xHistidine-tag of pAE vector at N-terminal region. Each chimeric subunit protein is connected by Gly_{2x}SerGly flexible linker, presented in purple. (B) *In silico* prediction of chimeric protein conformational structure.

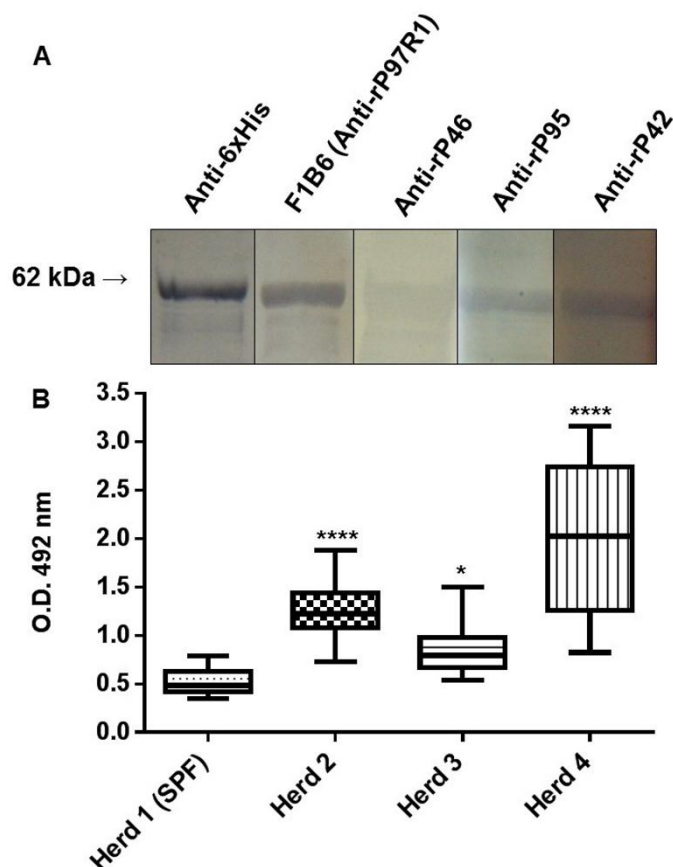


FIG 2. Antigenic analysis of chimeric protein. (A) Characterization by Western blot. The chimeric protein was specifically recognized by mAb anti-6XHis-tag (diluted 1:6000), mAb F1B6 (anti-P97R1) (diluted 1:4000), mouse hyperimmune serum anti-P46, anti-P95, and anti-P42 (diluted 1:50). (B) Characterization by ELISA. The chimeric protein was tested against 32 SPF (Herd 1) and 105 convalescent-phase pig serum samples from different farms in Southern Brazil (Herds 2, 3 and 4). Statistical significance was determined by ANOVA test. * and **** indicate significant differences compared to SPF serum with $P < 0.05$ and $P < 0.0001$, respectively. Boxes represent the interquartile range in the middle 50% of the absorbance values. Whiskers represent the minimum and maximum values.

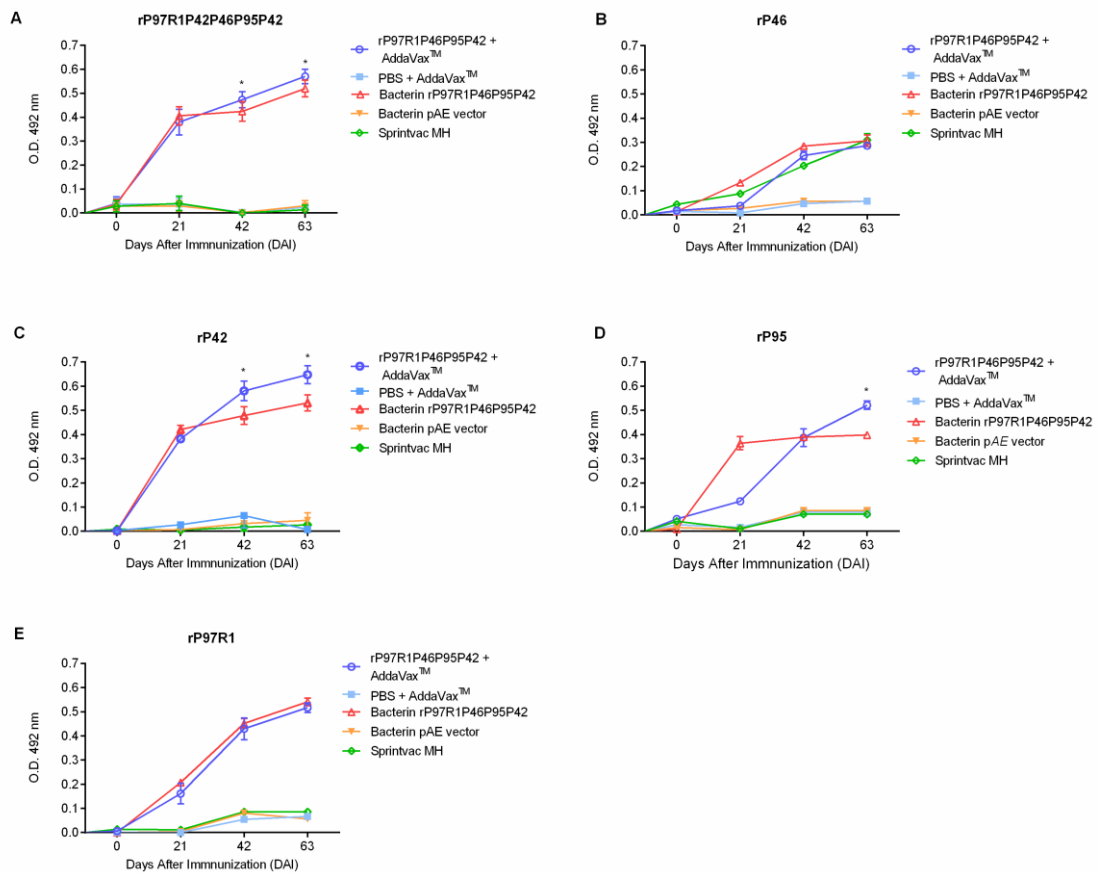


FIG 3. Analysis of IgG response induced by mice immunization determined by ELISA with recombinant proteins (A-E). Numbers represent the mean optical density at 492 nm (OD₄₉₂) of pooled serum samples collected at 0, 21, 42, and 63 DAI in each group. All analyses were performed in triplicate and the error bars demonstrate standard deviations (SD). Statistical significance was determined by ANOVA using Bonferroni test. * $P < 0.05$ indicate significant differences between groups immunized with both formulations containing the chimeric protein.

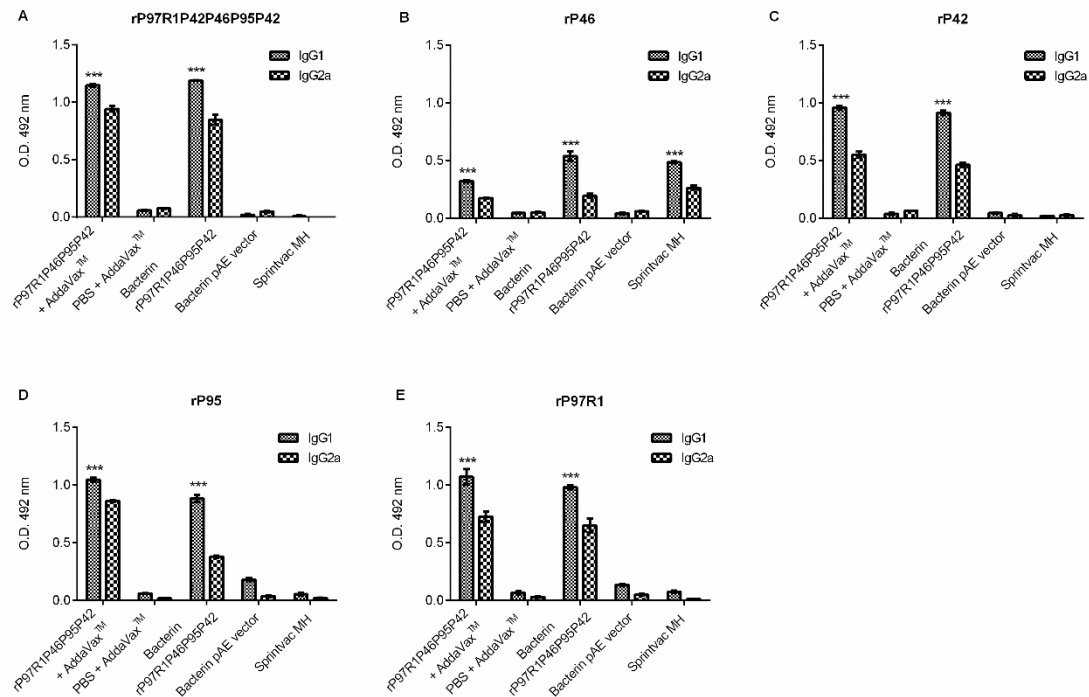


FIG 4. Analysis of IgG1 and IgG2a antibodies induced by mice immunization determined by ELISA with recombinant proteins (A-E). Numbers represent the mean optical density at 492 nm (OD₄₉₂) of pooled serum collected at 63 DAI minus the mean of pooled serum collected at 0 DAI in each group. All analyses were performed in triplicate and errors bars demonstrate standard deviations (SD). Statistical significance was determined by ANOVA using Bonferroni test. *** indicate significant differences between isotypes in each group with *P* values < 0.001.

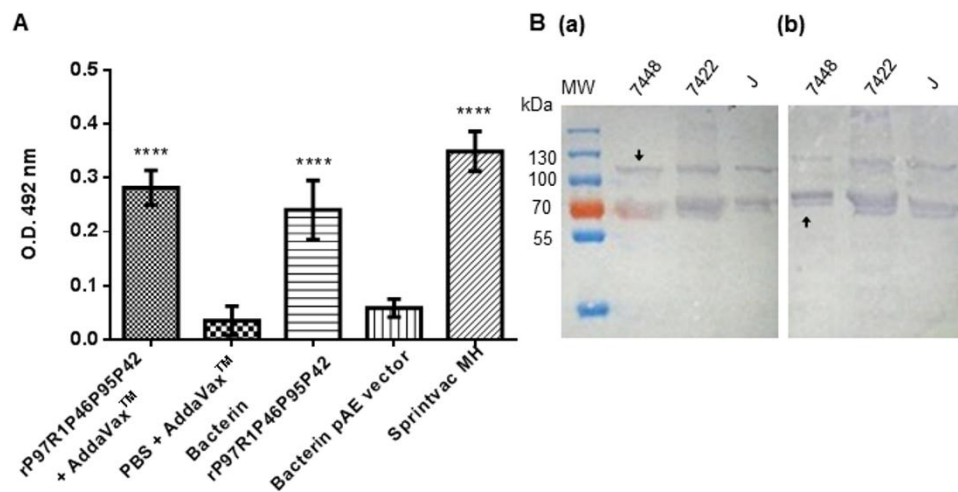


FIG 5. ELISA and Western blot using *M. hyopneumoniae* spp. extracts as antigen. (A) ELISA reactions using *M. hyopneumoniae* 7448 extract. Numbers represent the mean optical density at 492 nm (OD_{492}) of pooled serum collected at 63 DAI minus the mean of pooled serum collected at 0 DAI. All analyses were performed in triplicate and error bars demonstrate standard deviations (SD). Statistical significance was determined by ANOVA using Bonferroni test. **** indicate significant differences compared to negative control groups (PBS Add and *E. coli* Vec) at P values of < 0.0001 . (B) Western blot reactions using *M. hyopneumoniae* 7448, 7422, and J strains antigens against pooled sera from mice vaccinated at 63 DAI. Panel (a) extracts were tested against sera samples from rCHI Add group, the arrow indicates the P97 adhesin. Panel (b), extracts were tested against *E. coli* rCHI group, the arrow indicates P42 heat shock protein. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder was used as molecular marker (MW).

998 5 CONCLUSÃO GERAL

999

1000 - A proteína quimérica é imunogênica em ambas formulações avaliadas em
1001 camundongos (vacina de subunidade e bacterina recombinante) e capaz de estimular
1002 a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra cada uma das subunidades
1003 recombinantes;

1004 - Os anticorpos produzidos pela vacinação são capazes de reconhecer proteína
1005 nativas de *M. hyopneumoniae*;

1006 - Esta nova construção representa uma estratégia promissora para a produção
1007 de vacinas recombinantes contra PES e ensaios futuros são necessários para avaliar
1008 seu o potencial imunoprotetor em suínos.

1009 **6 REFERÊNCIAS**

1010

- 1011 ABPA (2016). Associação Brasileira de Proteína Animal | ABPA. *Relatório Anual ABPA*
 1012 2016. Available at: [http://abpa-](http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/publicacoes/relatorios-anuais)
 1013 [br.com.br/setores/suinocultura/publicacoes/relatorios-anuais](http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/publicacoes/relatorios-anuais) [Accessed January
 1014 9, 2017].
- 1015 AHN, K.K., KWON, D., JUNG, K., HA, Y., SEO, M.J., KIM, S.-H., KIM, M.-Y., CHO, K.-D., LEE,
 1016 B.-H. & CHAE, C. (2009). Identification of interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha,
 1017 and interleukin-6 expression in lungs from pigs naturally infected with *Mycoplasma*
 1018 *hyopneumoniae* by in situ hybridization. *The Journal of veterinary medical*
 1019 *science*. 71(4). p. 441–445.
- 1020 BARATE, A.K., CHO, Y., TRUONG, Q.L. & HAHN, T.W. (2014). Immunogenicity of IMS 1113
 1021 plus soluble subunit and chimeric proteins containing *Mycoplasma*
 1022 *hyopneumoniae* P97 C-terminal repeat regions. *FEMS Microbiology Letters*.
 1023 352(2). p. 213–220.
- 1024 BOGEMA, D.R., SCOTT, N.E., PADULA, M.P., TACCHI, J.L., RAYMOND, B.B. A, JENKINS, C.,
 1025 CORDWELL, S.J., MINION, F.C., WALKER, M.J. & DJORDJEVIC, S.P. (2011). Sequence
 1026 TTKF ↓ QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel
 1027 glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal*
 1028 *of Biological Chemistry*. 286(48). p. 41217–41229.
- 1029 BOUH, K.C.S., SHARECK, F. & DEA, S. (2003). Monoclonal antibodies to Escherichia coli-
 1030 expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of
 1031 *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clinical and diagnostic*
 1032 *laboratory immunology*. 10(3). p. 459–468.
- 1033 BURCH, D.G.S. (2004). The comparative efficacy of antimicrobials for the prevention
 1034 and treatment of Enzootic Pneumonia and some of their
 1035 pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships. *The Pig Journal*. 53. p. 8–27.
- 1036 CALSAMIGLIA, M., PIJOAN, C. & TRIGO, A. (1999). Application of a Nested Polymerase
 1037 Chain Reaction Assay to Detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from Nasal Swabs.
 1038 *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11(3). p. 246–251.
- 1039 CHAE, C. (2016). Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and
 1040 porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus,
 1041 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Veterinary Journal*. 212. p. 1–6.
- 1042 CHARLEBOIS, A., MAROIS-CRÉHAN, C., HÉLIE, P., GAGNON, C. A, GOTTSCHALK, M. &
 1043 ARCHAMBAULT, M. (2014). Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae*
 1044 isolates of abattoir pigs. *Veterinary Microbiology*. 168. p. 348–356.
- 1045 CHEN, A.Y., FRY, S.R., DAGGARD, G.E. & MUKKUR, T.K.S. (2008). Evaluation of immune
 1046 response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma*
 1047 *hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines
 1048 in mice. *Vaccine*. 26. p. 4372–4378.
- 1049 CHEN, A.Y., FRY, S.R., FORBES-FAULKNER, J., DAGGARD, G. & MUKKUR, T.K.S. (2006).
 1050 Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma*
 1051 *hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *Journal of Medical Microbiology*.
 1052 55(7). p. 923–929.

- 1053 CHEN, A.Y., FRY, S.R., FORBES-FAULKNER, J., DAGGARD, G.E. & MUKKUR, T.K.S. (2006).
 1054 Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different
 1055 expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice.
 1056 *Veterinary Microbiology*. 114(3–4). p. 252–259.
- 1057 CHEN, J.R., LIAO, C.W., MAO, S.J.T. & WENG, C.N. (2001). A recombinant chimera
 1058 composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with
 1059 *Pseudomonas* exotoxin: In vivo evaluation of specific IgG response in mice and
 1060 pigs. *Veterinary Microbiology*. 80(4). p. 347–357.
- 1061 CHEN, Y.L., WANG, S.N., YANG, W.J., CHEN, Y.J., LIN, H.H. & SHIUAN, D. (2003).
 1062 Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock
 1063 protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infection and Immunity*. 71(3). p. 1155–
 1064 1160.
- 1065 CHOI, C., KWON, D., JUNG, K., HA, Y., LEE, Y.H., KIM, O., PARK, H.K., KIM, S.H., HWANG,
 1066 K.K. & CHAE, C. (2006). Expression of inflammatory cytokines in pigs
 1067 experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of comparative*
 1068 *pathology*. 134. p. 40–46.
- 1069 CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2006). Etiopatogenia e imunoprofilaxia da
 1070 pneumonia enzoótica suína. *Ciência Rural*. 36(3). p. 1034–1042.
- 1071 CONCEIÇÃO, F.R., MOREIRA, Â.N. & DELLAGOSTIN, O.A. (2006). A recombinant chimera
 1072 composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with
 1073 *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice.
 1074 *Vaccine*. 24(29–30). p. 5734–5743.
- 1075 DA COSTA, A.C., COSTA, A.D.O., DE OLIVEIRA, F.M., NOGUEIRA, S.V., ROSA, J.D.,
 1076 RESENDE, D.P., KIPNIS, A. & JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. (2014). A new recombinant
 1077 BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective
 1078 efficacy against tuberculosis. *PLoS ONE*. 9(11). p. 1–14.
- 1079 DEBEY, M.C. & ROSS, R.F. (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma*
 1080 *hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and Immunity*.
 1081 62(12). p. 5312–5318.
- 1082 DERALD HOLTKAMP (2014). What the experts say : Economic impact of *Mycoplasma*
 1083 *hyopneumoniae* on pig farms - pig333, pig to pork community. Available at:
 1084 [https://www.pig333.com/what_the_experts_say/economic-impact-of-](https://www.pig333.com/what_the_experts_say/economic-impact-of-mycoplasma-hyopneumoniae-on-pig-farms_8936/)
 1085 [mycoplasma-hyopneumoniae-on-pig-farms_8936/](https://www.pig333.com/what_the_experts_say/economic-impact-of-mycoplasma-hyopneumoniae-on-pig-farms_8936/) [Accessed January 13, 2017].
- 1086 DUBOSSON, C.R., CONZELMANN, C., MISEREZ, R., BOERLIN, P., FREY, J., ZIMMERMANN, W.,
 1087 HÄNI, H. & KUHNERT, P. (2004). Development of two real-time PCR assays for the
 1088 detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Veterinary*
 1089 *microbiology*. 102. p. 55–65.
- 1090 DUTHIE, M.S., FAVILA, M., HOFMEYER, K.A., TUTTERROW, Y.L., REED, S.J., LAURANCE,
 1091 J.D., PICONE, A., GUDERIAN, J., BAILOR, H.R., VALLUR, A.C., LIANG, H., MOHAMATH,
 1092 R., VERGARA, J., HOWARD, R.F., COLER, R.N. & REED, S.G. (2016). Strategic
 1093 evaluation of vaccine candidate antigens for the prevention of Visceral
 1094 Leishmaniasis. *Vaccine*. 34(25). p. 2779–2786.
- 1095 EMBRAPA SUÍNOS E AVES (2016). Estatísticas - Portal Embrapa. Available at:
 1096 <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas> [Accessed August 24,
 1097 2016].

- 1098 FAGAN, P.K., WALKER, M.J., CHIN, J., EAMENS, G.J. & DJORDJEVIC, S.P. (2001). Oral
1099 immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aro A SL3261
1100 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes
1101 the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs.
1102 *Microbial pathogenesis*. 30. p. 101–110.
- 1103 FANO, E., PIJOAN, C. & DEE, S. (2005). Dynamics and persistence of *Mycoplasma*
1104 *hyopneumoniae* infection in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 69(3).
1105 p. 223–228.
- 1106 FENG, Z., BAI, Y., YAO, J., PHARR, G.T., WAN, X., XIAO, S., CHI, L., GAN, Y., WANG, H.,
1107 WEI, Y., LIU, M., XIONG, Q., BAI, F., LI, B., WU, X. & SHAO, G. (2014). Use of
1108 serological and mucosal immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae*
1109 antigens P97R1 , P46 and P36 in the diagnosis of infection. *The veterinary*
1110 *Journal*. 202. p. 128–133.
- 1111 FERRARINI, M.G., SIQUEIRA, F.M., MUCHA, S.G., PALAMA, T.L., JOBARD, É., ELENA-
1112 HERRMANN, B., R. VASCONCELOS, A.T., TARDY, F., SCHRANK, I.S., ZAHA, A. & SAGOT,
1113 M.-F. (2016). Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas
1114 through genome-scale metabolic modeling. *BMC Genomics*. 17(1). p. 353.
- 1115 FISCH, A., MARCHIORO, S.B., GOMES, C.K., GALLI, V., DE OLIVEIRA, N.R. DE, SIMIONATTO,
1116 S., DELLAGOSTIN, O.A., MENDONÇA, M., MOREIRA, Â.N. & CONCEIÇÃO, F.R. (2016).
1117 Commercial bacterins did not induce detectable levels of antibodies in mice
1118 against *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens strongly recognized by swine
1119 immune system. *Trials in Vaccinology*. 5. p. 32–37.
- 1120 FRIIS, N.F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of
1121 *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord. Vet.*
1122 *Med.*. 27(6). p. 337–339.
- 1123 FUTO, S., SETO, Y., OKADA, M., SATO, S., SUZUKI, T., KAWAI, K., IMADA, Y. & MORI, Y.
1124 (1995). Recombinant 46-Kilodalton Surface Antigen (P46) of *Mycoplasma*
1125 *hyopneumoniae* Expressed in *Escherichia coli* Can Be Used for Early Specific
1126 Diagnosis of Mycoplasmal Pneumonia of Swine by Enzyme-Linked
1127 Immunosorbent Assay. *Journal of Biotechnology*. 33(3). p. 680–683.
- 1128 GALLI, V., SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., FISCH, A., GOMES, C.K., CONCEIÇÃO, F.R. &
1129 DELLAGOSTIN, O. A. (2012). Immunisation of mice with *Mycoplasma*
1130 *hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant
1131 subunit or DNA vaccines. *Vaccine*. 31(1). p. 135–140.
- 1132 GALLI, V., SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., KLABUNDE, G.H.F., CONCEIÇÃO, F.R. &
1133 DELLAGOSTIN, O.A. (2013). Recombinant secreted antigens from *Mycoplasma*
1134 *hyopneumoniae* delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of
1135 mice. *Clinical and Vaccine Immunology*. 20(9). p. 1370–6.
- 1136 HAESBROUCK, F., PASMANS, F., CHIERS, K., MAES, D., DUCATELLE, R. & DECOSTERE, A.
1137 (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we
1138 expect? *Veterinary Microbiology*. 100(3–4). p. 255–268.
- 1139 HILLEN, S., VON BERG, S., KÖHLER, K., REINACHER, M., WILLEMS, H. & REINER, G. (2014).
1140 Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against
1141 *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. *Preventive Veterinary*
1142 *Medicine*. 113(4). p. 580–588.

- 1143 JORGE, S., OLIVEIRA, N.R. DE, MARCHIORO, S.B., FISCH, A., GOMES, C.K., HARTLEBEN,
1144 C.P. & DELLAGOSTIN, O.A. (2014). The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant
1145 heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field
1146 conditions. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 37.
1147 p. 229–236.
- 1148 LEE, S.H., LEE, S., CHAE, C. & RYU, D.-Y. (2014). A recombinant chimera comprising
1149 the R1 and R2 repeat regions of *M. hyopneumoniae* P97 and the N-terminal region
1150 of *A. pleuropneumoniae* ApxIII elicits immune responses. *BMC veterinary*
1151 *research*. 10(1). p. 43.
- 1152 LORENZO, H., QUESADA, Ó., ASSUNÇÃO, P., CASTRO, A. & RODRÍGUEZ, F. (2006). Cytokine
1153 expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma*
1154 *hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 109. p. 199–207.
- 1155 MAES, D., SEGALÉS, J., MEYNS, T., SIBILA, M., PIETERS, M. & HAESBROUCK, F. (2008).
1156 Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary*
1157 *Microbiology*. 126(4). p. 297–309.
- 1158 MAES, D., VERDONCK, M. & DELUYKER, H. (1996). Enzootic pneumonia in pigs. *The*
1159 *Veterinary quarterly*. 18(3). p. 104–109.
- 1160 MARCHIORO, S.B., FISCH, A., GOMES, C.K., JORGE, S., GALLI, V., HAESBROUCK, F., MAES,
1161 D., DELLAGOSTIN, O.A. & CONCEIÇÃO, F.R. (2014a). Local and systemic immune
1162 responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma*
1163 *hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile
1164 enterotoxin LT_B. *Veterinary microbiology*. 173. p. 166–71.
- 1165 MARCHIORO, S.B., MAES, D., FLAHOUE, B., PASMANS, F., DEL POZO SACRISTÁN, R.,
1166 VRANCKX, K., MELKEBEEK, V., COX, E., WUYTS, N. & HAESBROUCK, F. (2013). Local
1167 and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an
1168 inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine*. 31(9). p. 1305–1311.
- 1169 MARCHIORO, S.B., SACRISTAN, R.D.P., MICHIELS, A., HAESBROUCK, F., CONCEIÇÃO, F.R.,
1170 DELLAGOSTIN, O.A. & MAES, D. (2014b). Immune responses of a chimaeric protein
1171 vaccine containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and LT_B against
1172 experimental *M. hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine*. 32. p. 4689–94.
- 1173 MARCHIORO, S.B., SIMIONATTO, S., GALLI, V., CONCEIÇÃO, F.R., BRUM, C.B., FISCH, A.,
1174 GOMES, C.K. & DELLAGOSTIN, O.A. (2012). Production and characterization of
1175 recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*.
1176 *Veterinary microbiology*. 155(1). p. 44–52.
- 1177 MAROIS, C., DORY, D., FABLET, C., MADEC, F. & KOBISCH, M. (2010). Development of a
1178 quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose
1179 of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF
1180 pigs. *Journal of Applied Microbiology*. 108(5). p. 1523–1533.
- 1181 MARTELLI, P., SALERI, R., CAVALLI, V., ANGELIS, E. DE, FERRARI, L. & BENETTI, M. (2014).
1182 Systemic and local immune response in pigs intradermally and intramuscularly
1183 injected with inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines. *Veterinary*
1184 *Microbiology*. 168(2–4). p. 357–364.
- 1185 MINION, F.C., ADAMS, C. & HSU, T. (2000). R1 Region of P97 Mediates Adherence of
1186 *Mycoplasma hyopneumoniae* to Swine Cilia. *Infection and Immunity*. 68(5). p.
1187 3056–3060.

- 1188 MOREIRA, C., DA CUNHA, C.E.P., MOREIRA, G.M.S.G., MENDONÇA, M., SALVARANI, F.M.,
1189 MOREIRA, Â.N. & CONCEIÇÃO, F.R. (2016). Protective potential of recombinant non-
1190 purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. *Anaerobe*. 40. p. 58–62.
- 1191 MUNETA, Y., MINAGAWA, Y., SHIMOJI, Y., OGAWA, Y. & HIKONO, H. (2008). Immune
1192 Response of Gnotobiotic Piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Vet.*
1193 *Med. Sci.*. 70(10). p. 1065–1070.
- 1194 NATHUES, H., CHANG, Y.M., WIELAND, B., RECHTER, G., SPERGSE, J., ROSENGARTEN, R.
1195 & KREIENBROCK, L. (2014). Herd-Level Risk Factors for the Seropositivity to
1196 *Mycoplasma hyopneumoniae* and the Occurrence of Enzootic Pneumonia Among
1197 Fattening Pigs in Areas of Endemic Infection and High Pig Density.
1198 *Transboundary and Emerging Diseases*. 61. p. 316–328.
- 1199 NATHUES, H., KREIENBROCK, L., ROSENGARTEN, R. & SPERGSE, J. (2011). RAPD and
1200 VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma*
1201 *hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density.
1202 *Veterinary Microbiology*. 152(3–4). p. 338–345.
- 1203 NATHUES, H., WOESTE, H., DOEHRING, S., FAHRION, A.S., DOHERR, M.G. & BEILAGE, E.
1204 (2013). Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in
1205 suckling pigs at the age of weaning. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55(30). p. 1–
1206 13.
- 1207 NETO, J.C.G., STRAIT, E.L., RAYMOND, M., RAMIREZ, A. & MINION, F.C. (2014). Antibody
1208 responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M.*
1209 *hyorhinis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*. *Veterinary Microbiology*. 174(1–2).
1210 p. 163–171.
- 1211 OGAWA, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., SANO, A., HIKONO, H., SHIBAHARA, T., YAGI, Y. &
1212 SHIMOJI, Y. (2009). Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine
1213 using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine*.
1214 27(33). p. 4543–50.
- 1215 OKADA, M., ASAI, T., FUTO, S. & MORI, Y. (2005). Serological diagnosis of enzootic
1216 pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
1217 using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma*
1218 *hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology*. 105. p. 251–259.
- 1219 OKADA, M., ASAI, T., ONO, M., SAKANO, T. & SATO, S. (2000). Cytological and
1220 immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological
1221 observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae*
1222 inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. *Vaccine*. 18. p. 2825–
1223 2831.
- 1224 OKAMBA, F.R., ARELLA, M., MUSIC, N., JUN, J., GOTTSCHALK, M. & GAGNON, C.A. (2010).
1225 Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the
1226 C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma*
1227 *hyopneumoniae* in swine. *Vaccine*. 28. p. 4802–4809.
- 1228 OTAKE, S., DEE, S., CORZO, C., OLIVEIRA, S. & DEEN, J. (2010). Long-distance airborne
1229 transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine
1230 population infected with multiple viral variants. *Veterinary Microbiology*. 145(3–4).
1231 p. 198–208.
- 1232 RAYMOND, B.B.A. & DJORDJEVIC, S. (2015). Exploitation of plasmin(ogen) by bacterial

- 1233 pathogens of veterinary significance. *Veterinary microbiology*. 178(1–2). p. 1–13.
- 1234 RAZIN, S. & YOGEV, D. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.
1235 *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4). p. 1094–1156.
- 1236 RODRÍGUEZ, F., RAMÍREZ, G. A., SARRADELL, J., ANDRADA, M. & LORENZO, H. (2004).
1237 Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally
1238 infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology*.
1239 130(4). p. 306–312.
- 1240 RUIZ, A., GALINA, L. & PIJOAN, C. (2002). *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of
1241 pigs sired by different boars Résumé. *The Canadian Journal of Veterinay*
1242 *Research*. 66. p. 79–85.
- 1243 SARRADELL, J., ANDRADA, M., RAMIREZ, A.S., FERNANDEZ, A., GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.,
1244 JOVER, A., LORENZO, H., HERRAEZ, P. & RODRÍGUEZ, F. (2003). A Morphologic and
1245 Immunohistochemical Study of the Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Pigs
1246 Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Pathology*. 40. p.
1247 395–404.
- 1248 SHIMOJI, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., NOSAKA, H. & MORI, Y. (2003). Vaccine efficacy of
1249 the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant
1250 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal
1251 pneumonia of swine. *Vaccine*. 21. p. 532–537.
- 1252 SIBILA, M., NOFRARÍAS, M., LÓPEZ-SORIA, S., SEGALÉ, J., VALERO, O., ESPINAL, A. &
1253 CALSAMIGLIA, M. (2007). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae*
1254 infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-
1255 vaccinated pigs. *Veterinary Microbiology*. 122. p. 97–107.
- 1256 SIBILA, M., PIETERS, M., MOLITOR, T. & MAES, D. (2009). Current perspectives on the
1257 diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The*
1258 *veterinary Journal*. 181. p. 221–231.
- 1259 SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., GALLI, V., BRUM, C.B., KLEIN, C.S., REBELATTO, R.,
1260 SILVA, E.F., BORSUK, S., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2012).
1261 Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant
1262 proteins. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 35(2).
1263 p. 209–216.
- 1264 SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., GALLI, V., HARTWIG, D.D., CARLESSI, R.M., MUNARI,
1265 F.M., LAURINO, J.P., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2010). Cloning and
1266 purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in
1267 *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 69(2). p. 132–136.
- 1268 STRAIT, E.L., MADSEN, M.L., MINION, F.C., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., DAMMEN, M.,
1269 JONES, K.R. & THACKER, E.L. (2008). Real-time PCR assays to address genetic
1270 diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of clinical*
1271 *microbiology*. 46(8). p. 2491–8.
- 1272 THACKER, E.L. (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal Health*
1273 *Research Reviews*. 5(2). p. 317–320.
- 1274 THACKER, E.L. & MINION, F.C. (2012). *Diseases of Swine* 10th ed. J. J. Zimmerman et
1275 al. (eds.), Iowa State University Press, Ames: John Wiley & Sons, Inc.
- 1276 THACKER, E.L., THACKER, B.J., KUHN, M., HAWKINS, P.A. & WATERS, W.R. (2000).

- 1277 Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular
1278 injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Veterinary Medical*
1279 *Research Institute*. 61(11). p. 1384–1389.
- 1280 VILLARREAL, I., VRANCKX, K., CALUS, D., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F. & MAES, D.
1281 (2012). Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines
1282 containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains.
1283 *BMC Veterinary Research*. 8(2). p. 1–7.
- 1284 VIRGINIO, V.G., GONCHOROSKI, T., PAES, J.A., SCHUCK, D.C., ZAHA, A. & FERREIRA, H.B.
1285 (2014). Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant
1286 antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine
1287 enzootic pneumonia. *Vaccine*. 32. p. 5832–5838.
- 1288 VRANCKX, K., MAES, D., CALUS, D., VILLARREAL, I., PASMANS, F. & HAESEBROUCK, F.
1289 (2011). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool
1290 for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation.
1291 *Journal of Clinical Microbiology*. 49(5). p. 2020–2023.
- 1292 VRANCKX, K., MAES, D., MARCHIORO, S.B., VILLARREAL, I., CHIERS, K., PASMANS, F. &
1293 HAESEBROUCK, F. (2012). Vaccination reduces macrophage infiltration in
1294 bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent
1295 *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC Veterinary Research*. 8(24). p. 1–7.
- 1296 WOOLLEY, L.K., FELL, S.A., GONSALVES, J.R., RAYMOND, B.B.A., COLLINS, D., KUIT, T.A.,
1297 WALKER, M.J., DJORDJEVIC, S.P., EAMENS, G.J. & JENKINS, C. (2014). Evaluation of
1298 recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* P97/P102 paralogs formulated with
1299 selected adjuvants as vaccines against mycoplasmal pneumonia in pigs. *Vaccine*.
1300 32(34). p. 4333–4341.
- 1301