

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Pneumonia Enzoótica Suína: Isolamento do agente e
expressão de antígeno recombinante em *Pichia
pastoris***

Charles Klazer Gomes

Pelotas, 2014

CHARLES KLAZER GOMES

**Pneumonia Enzoótica Suína: Isolamento do agente e expressão de antígeno
recombinante em *Pichia pastoris***

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

Orientador: Odir Antônio Dellagostin
Coorientadora: Silvana Beutinger Marchioro

Pelotas, 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G633p Gomes, Charles Klazer

Pneumonia enzoótica suína: isolamento do agente e expressão de antígeno recombinante em *pichia pastoris* / Charles Klazer Gomes; Odir Antonio Dellagostin, orientador ; Silvana Beutinger Marchioro, co-orientadora - Pelotas, 2014.

58 p.

Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014.

1. Biotecnologia. 2. Vacinas. 3. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 4. PES . 5. Quimera sintética. 6. *Pichia pastoris*. 7. Isolamento. I. Dellagostin, Odir Antonio, orient. II. Marchioro, Silvana Beutinger, co-orient. III. Título.

CDD: 636.40896

Catalogação na Fonte: Leda Lopes CRB 10/ 2064

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Leonardo Garcia Monte (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr^a. Silvana Beutinger Marchioro (Universidade Federal da Grande Dourados)

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador)

Agradecimentos

A Deus pela vida, por me guiar nas minhas escolhas e pelo amparo.

Ao meu pai Carlos, minha mãe Fátima e minha irmã Caroline, por serem minha base, por me apoiarem e por terem me proporcionado tudo para que eu conseguisse seguir minha trajetória e estar aqui, devo tudo a eles.

A minha companheira, Elsa Klumb, por estar ao meu lado, me apoiar, confiar em mim, por participar dos melhores momentos e por me suportar nos piores.

Ao meu orientador, Odir Antônio Dellagostin, pela oportunidade, pelo exemplo profissional, pelos momentos de orientação, e por confiar no meu trabalho.

A minha coorientadora, Silvana Marchioro, pela ajuda, e por todo o tempo dedicado a mim.

Ao grupo Micoplasma, aqueles que já fizeram parte e aqueles que ainda fazem, por tudo que aprendi, pelo conhecimento trocado, pela experiência.

As queridas estagiárias, Ana e Natasha, pela disponibilidade, pela competência, pela responsabilidade, pelo companheirismo e amizade, foram essenciais.

A Natasha, em especial, por ter acompanhado a trajetória do início ao fim, e por ter construído esse trabalho junto comigo.

Aos meus queridos amigos e também colegas, Andressa, Karen, Sergio, Ivânia, Natasha, Ana, Carol, Andrea, Silvana, pela amizade, pelo aprendizado, pelo apoio, incentivo e pelos momentos de descontração.

A Michele por todo apoio que sempre deu a mim e a todo o pessoal do laboratório.

A Paula Finger e Michele Pepe por me aguentarem nesses últimos dias, por todos os ensinamentos e pela eterna boa vontade.

Aos prof. Fabricio Conceição e Fábio Leite, pela orientação nos momentos que precisei, pelas dicas e por fazerem parte da minha comissão de acompanhamento.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Vacinologia, pelo convívio, pelos aprendizados, pela agradável companhia diária.

A todos os integrantes dos demais laboratórios da Biotecnologia que sempre me ajudaram nesses dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à Universidade Federal de Pelotas pelos conhecimentos adquiridos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que não foram mencionados aqui, mas que de alguma forma foram importantes e contribuíram para a concretização desta tão importante etapa.

Muito obrigado por tudo!

Resumo

GOMES, Charles. **Pneumonia Enzoótica Suína: Isolamento do agente e expressão de antígeno recombinante em *Pichia pastoris*** 2014. 58f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das principais doenças respiratórias dos suínos. A PES é uma doença que afeta suínos no mundo todo, causando grandes perdas econômicas para a indústria suinícola. A vacinação é o método mais eficaz para o controle da PES. As vacinas comerciais disponíveis no mercado são bacterinas, produzidas a partir da bactéria inteira inativada e conferem apenas proteção parcial aos suínos. Além das bacterinas, proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* produzidas em *Escherichia coli* vem sendo testadas como potenciais alvos vacinais. Este trabalho teve dois objetivos principais: (1) a obtenção de isolados de *M. hyopneumoniae* a partir de amostras de pulmão coletadas em frigorífico, visando conhecer a diversidade genética das cepas circulantes no RS; e (2) a expressão de uma quimera, compostas por três antígenos de *M. hyopneumoniae* (P42, R1 e NrdF) fusionados a um adjuvante de mucosa, na levedura *Pichia pastoris*, visando a obtenção de uma proteína expressa em grande quantidade e com um dobramento diferenciado da proteína expressa em *E. coli*. Para o isolamento, 62 amostras de pulmão foram coletadas, processadas e cultivadas. Os isolados de *M. hyopneumoniae* obtidos apresentaram contaminação com outros *Mycoplasma* spp. Não foi possível obter isolados puros para proceder com o estudo de diversidade genética. Para a expressão da quimera em *Pichia pastoris*, o gene sintético da quimera foi eficientemente clonado na cepa KM71H, e a expressão dessa proteína foi observada por *Western blot*. Tanto o isolamento do agente quanto a expressão de antígenos recombinante são passos importantes para o desenvolvimento de uma vacina mais efetiva para o controle da PES.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, isolamento, vacinas, PES, quimera sintética, *Pichia pastoris*.

Abstract

GOMES, Charles. **Enzootic Pneumonia: Isolation of the agent and expression of recombinant antigen in *Pichia pastoris*** 2014. 58f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of Enzootic Pneumonia (EP), one of the main respiratory diseases in pigs. The EP is a disease that affects pigs worldwide, causing major economic losses to the pig industry. Vaccination is the most effective method to control the EP. Commercial vaccines available on the market are bacterins, produced from whole-cell inactivated bacteria, and confer only partial protection for the pigs. In addition to the bacterins, recombinant *M. hyopneumoniae* proteins produced in *E. coli* have been tested as potential vaccine targets. This study had two main objectives: (1) obtaining isolates of *M. hyopneumoniae* from lung samples collected from an abattoir, aiming at assessing the genetic diversity of strains circulating in the RS, and (2) the expression of a chimera composed by three *M. hyopneumoniae* antigens (P42, R1 and NrdF) fused with a mucosal adjuvant, in the yeast *Pichia pastoris* in order to obtain the antigen in a large amount and with a different folding to the protein expressed in *E. coli*. For isolation, 62 lung samples were collected, processed and cultured. *M. hyopneumoniae* isolates obtained were contaminated with other *Mycoplasma* spp. It was not possible to obtain a pure isolated to proceed with the study of genetic diversity. For expression of a chimera in *Pichia pastoris*, the chimera synthetic gene was efficiently cloned in KM71H strain, and expression of the protein was observed by Western blot. Both, the isolation of the agent, as well as the expression of recombinant antigens, are important steps for the development of an effective vaccine for the control of EP.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, isolation, vaccines, EP, synthetic chimera, *Pichia pastoris*.

Lista de Figuras

Capítulo 3: Isolamento do *Mycoplasma hyopneumoniae*

Figura 1. Gel de agarose corado com Blue-Green de algumas amostras positivas na PCR para o gênero *Mycoplasma*. 32

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto da reação de PCR a partir de amostras de BALF, utilizando primer para *M. hyopneumoniae*. 34

Capítulo 4: Expressão de uma quimera de antígenos recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Pichia pastoris*

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a digestão do plasmídeo. 41

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto da reação de PCR a partir de DNA de colônias, utilizando primer para a proteína P42. 42

Figura 3. *Dot blot* utilizando MAb anti-histidina, evidenciando as colônias transformadas de *Pichia pastoris* que apresentaram uma maior reatividade. 42

Figura 4. *Western blot* de clones *P. pastoris* expressando a quimera. 43

Lista de Tabelas

Capítulo 3: Isolamento do *Mycoplasma hyopneumoniae*

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na reação de PCR para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare* e o tamanho do fragmento amplificado em cada espécie. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2. PCR para o gênero *Mycoplasma* a partir de amostras obtidas no isolamento. 32

Tabela 3. Panorama geral acerca dos resultados de *score* de lesão pulmonar, isolamentos, e diagnóstico a partir de amostras de BALF 34

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AFLP- Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)
- BALF- Lavado broncoalveolar (*Bronchoalveolar Lavage Fluid*)
- DAB- 3,3'-diaminobenzidine
- DNA- Ácido desoxirribonucleico (*Desoxyribonucleic acid*)
- LTB- Subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*
- MAb- Anticorpo monoclonal (*Monoclonal Antibody*)
- MLVA- *Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*
- PCR- Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- PES- Pneumonia Enzoótica Suína
- PFGE- Eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)
- PRDC- Complexo da Doença Respiratória dos Suínos (*Porcine Respiratory Disease Complex*)
- PRRSV- Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória de Suínos (*Porcine reproductive and respiratory syndrome vírus*)
- RAPD- DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (*Random Amplified Polymorphic DNA*)
- RFPL- Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)
- RNA- Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
- SIV- Vírus da Influenza Suína (*Swine Influenza Virus*)
- VNTR- Repetições em tandem de número variável (*Variable Number Tandem Repeat*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Pneumonia Enzoótica Suína	14
1.2 O agente <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	15
1.3 Diversidade genética.....	17
1.4 Testes diagnósticos	19
1.5 Formas de controle	19
1.6 Vacinas	21
1.6.1 Sistemas de Expressão	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos gerais	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 ISOLAMENTO DO <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	28
3.1 Introdução	28
3.2 Material e métodos.....	29
3.2.1 Coleta e score de lesões pulmonares.....	29
3.2.2 Cultivo.....	29
3.2.3 Extração de DNA e caracterização das amostras por PCR.....	30
3.2.4 Diagnóstico por PCR a partir das amostras de BALF.....	30
3.3 Resultados e discussão	30
3.4. Conclusão	35
4 EXPRESSÃO DE UMA QUIMÉRA DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> EM <i>Pichia pastoris</i>	37
4.1 Introdução	37

4.2 Material e métodos.....	38
4.2.1 Clonagem em vetores de <i>P. pastoris</i>	38
4.2.2 Seleção dos recombinantes.....	39
4.2.3 PCR de colônia para confirmação da clonagem.....	39
4.2.4 Caracterização por Western blot.....	39
4.3 Resultados e discussão	40
4.4 Conclusão	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
5.1 Isolamento do <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	46
5.2 Expressão de uma quimera de antígenos recombinantes de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> em <i>Pichia pastoris</i>	46
7 REFERÊNCIAS.....	48

Capítulo 1: Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Pneumonia Enzoótica Suína

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*, é uma das principais doenças respiratórias dos suínos. O *M. hyopneumoniae* destrói o principal mecanismo de defesa inespecífico do trato respiratório, o elevador mucociliar (DeBey & Ross, 1994), pré-dispondo os suínos a patógenos secundários (Thacker & Minion, 2010). A PES é uma doença contagiosa caracterizada por uma broncopneumonia catarral que, clinicamente manifesta-se por tosse seca crônica, atraso no ganho de peso, alta morbidade e baixa mortalidade (Sobestiansky, Barcellos, et al., 1999). O *M. hyopneumoniae* também está intimamente envolvido no complexo da doença respiratória dos suínos (PRDC) (Pósa et al., 2013). Este complexo respiratório inclui tanto agentes bacterianos quanto virais. A presença de *M. hyopneumoniae* em um rebanho é um importante fator de risco para o desenvolvimento da PRDC (Sibila et al., 2009).

A PES afeta suínos de todas as idades, porém a forma clínica da doença é mais comum nos animais da fase de crescimento e terminação. A transmissão ocorre por contato direto, indireto e através de aerossóis eliminados durante os acessos de tosse (Desrosiers, 2011). Variáveis ambientais e de manejo favorecem a sua ocorrência e severidade, por isso é considerada uma doença multifatorial. As perdas econômicas são decorrentes de quedas na produtividade que podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso, dependendo da gravidade das lesões e das infecções secundárias (Sobestiansky, Barcellos, et al., 1999). Na região Sul do Brasil, que representa cerca de 80% do abate nacional, constatou-se que 55% dos suínos de abate apresentavam lesões sugestivas de PES e 100% dos rebanhos examinados estavam afetados (Sobestiansky, Costa, et al.,

1999). Estima-se que a PES possa atingir até 100% de prevalência nos rebanhos em todo o mundo (Maes et al., 2008; Thacker & Minion, 2010).

A avaliação da doença respiratória dentro de um rebanho suíno pelo score de lesão pulmonar, feita no momento do abate, é frequentemente utilizada para estimar a incidência de PES e o seu impacto no preço de mercado da carcaça (Davies et al., 1995). No entanto lesões PES não são patognomônicas como em outros organismos, o vírus da influenza suína (SIV) pode produzir lesões semelhantes (Thacker et al., 2001). Devido à subjetividade envolvida na estimativa visual da proporção de pulmão lesionada e a falta de especificidade do diagnóstico destas lesões, faz com que seja necessária a utilização dos métodos de confirmação adicional, como cultura bacteriológica, diagnóstico sorológico, diagnóstico por PCR, imunofluorescência e imunohistoquímica (Thacker, 2004; Sibila et al., 2009; Simionatto et al., 2013).

1.2 O agente *Mycoplasma hyopneumoniae*

Mycoplasma hyopneumoniae é parte do filo Firmicutes, classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae, gênero *Mycoplasma*. Devido ao fato de pertencerem à classe Mollicutes diferem fenotipicamente de outras bactérias por seu tamanho diminuto (0,2 a 0,5 μm) e ausência de parede celular (Razin et al., 1998). Apesar das diferenças fundamentais entre micoplasmas e outras bactérias, muitos aspectos da biologia molecular dos micoplasmas são semelhantes aos de bactérias gram-positivas (Thacker & Minion, 2010). Os micoplasmas são os menores microrganismos auto-replicantes de vida livre conhecidos. Eles também têm genomas pequenos e circulares (580 -1350 kb) com um alto teor de A + T (cerca de 70%). Os micoplasmas são parasitas espécie-específicos, encontrados na mucosa, que em função de não possuírem parede celular, apresentam algumas características como: polimorfismo, sensibilidade a várias condições ambientais, tais como a pressão osmótica, detergentes e resistência aos antibióticos que interferem na síntese da parede celular (Maes et al., 1996). Como a maioria dos membros da classe mollicutes, o *M. hyopneumoniae* traduz o códon UGA em triptofano em vez de reconhecê-lo como um códon de parada. Isto cria uma barreira para a expressão de proteínas recombinantes (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005).

M. hyopneumoniae é um organismo fastidioso e embora ele cresça melhor sob condições aeróbicas, é capaz de crescer sob condições anaeróbicas e, conseqüentemente, deve ser considerado como uma bactéria anaeróbia facultativa. O colesterol é necessário para o crescimento (como para todos os micoplasmas) e arginina inibe o crescimento de *M. hyopneumoniae* (Stemke & Robertson, 1990). O organismo requer um meio de crescimento rico e elaborado (Hwang et al., 2010) e não cresce em meio de ágar após o isolamento primário (Razin & Freundt, 1984). Para o isolamento, uma passagem em caldo é necessária em primeiro lugar (Friis, 1975).

Uma mudança no pH ácido, sem turvação, caracteriza o crescimento do *Mycoplasma*. O *M. hyorhinis* cresce mais rápido do que o *M. hyopneumoniae* e vai sobrepor-se facilmente ao crescimento do *M. hyopneumoniae* quando ambos estão presentes na amostra. A alteração do pH nos primeiros dias de incubação é geralmente causada por *M. hyorhinis*, que ao contrário do *M. hyopneumoniae*, provoca uma mudança no pH mais demorada, 5-6 dias pós incubação, mas até 14 dias podem ser necessários para a mudança de pH de ocorrer. Após a alteração do pH, a cultura é repicada em meio ágar e incubada durante 1-3 semanas, até que as colônias possam ser observadas (Friis, 1975). As colônias desenvolvidas em meio sólido são muito pequenas, de até 0,5 mm de diâmetro. A aparência típica "ovo frito" (parte central da colônia cavando no meio com ágar) da maioria das colônias de micoplasma, porém não é típico de *M. hyopneumoniae* (Friis, 1975).

O processo de isolamento dessa bactéria requer muitos passos e pode durar meses antes de um isolado purificado ser obtido. Devido ao seu crescimento lento, culturas de *M. hyopneumoniae* podem ser facilmente contaminadas por outros micoplasmas, bactérias ou fungos, em qualquer passo do isolamento devido ao fato do meio ser muito rico e conter uma grande quantidade de soro (10% de soro equino e 10% de soro de suíno). É, portanto, extremamente importante que o trabalho seja feito de forma asséptica, para evitar qualquer possível contaminação. A composição do meio de crescimento também é muito importante, mínimas alterações podem influenciar no crescimento deste microrganismo (Calus et al., 2010).

Dois outros micoplasmas patogênicos são frequentemente encontrados em suínos: *M. hyorhinis*, que é responsável pela poliserosite em suínos jovens e *M. hyosynoviae*, que está associado com artrite em suínos em fase de crescimento e terminação (Friis & Feenstra, 1994; Feenstra et al., 1994; Kobisch & Marois, 2008). Além disso, recentes estudos mostraram que o mesmo rebanho, ou o mesmo animal,

pode estar infectado por mais de uma cepa de *M. hyopneumoniae* simultaneamente (Nathues et al., 2011; Vranckx et al., 2011).

1.3 Diversidade genética

Alta heterogeneidade genética tem sido demonstrada entre isolados de *M. hyopneumoniae* em todo mundo usando várias técnicas de caracterização, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Artiushin & Minion, 1996), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Kokotovic et al., 1999) e PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Stakenborg et al., 2005). No entanto, a técnica de RAPD tem demonstrado taxas de reprodutibilidade fracas entre diferentes laboratórios, e as técnicas de AFLP e PFGE são consideradas laboriosas. Assim, novas técnicas têm sido desenvolvidas nos últimos anos. A técnica de MLVA (*Multiple-Locus Variable number tandem repeat* (VNTR)) e a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) são dois métodos que podem ser facilmente realizados, são reprodutíveis e têm um alto poder discriminatório (Stakenborg et al., 2006; Vranckx et al., 2011; Marois-Crehan et al., 2012). O ensaio MLVA foi descrito como uma ferramenta para diferenciar cepas *M. hyopneumoniae* em amostras coletadas do trato respiratório sem necessidade de um cultivo prévio (Vranckx et al., 2011), métodos de caracterização que requerem o cultivo dos organismos são menos interessantes para o *M. hyopneumoniae*, em função do cultivo ser muito demorado, trabalhoso e nem sempre bem sucedido. Estudos anteriores mostraram existir heterogeneidade genética entre isolados provenientes de diferentes granjas (Stakenborg et al., 2005; Mayor et al., 2007; Nathues et al., 2011). No entanto, outros relatos demonstraram encontrar ambas, heterogeneidade e homogeneidade genética entre isolados de um mesmo rebanho (Maes et al., 2008; Marois-Crehan et al., 2012). Isolados de campo de *M. hyopneumoniae* também tem mostrado variabilidade com relação à virulência (Vicca et al., 2003). A maioria dos micoplasmas, incluindo *M. hyopneumoniae*, são parasitos obrigatórios e não podem se multiplicar fora do hospedeiro. Para sobreviver e se adaptar a mudança em um ambiente e no hospedeiro, a diversidade é, portanto, essencial nestes organismos (Vranckx et al., 2011).

O *M. hyopneumoniae* se adere à superfície da mucosa do epitélio pulmonar. Isto é conseguido através das adesinas, que são proteínas, que se ligam a mucina

(Jenkins et al., 2006; Wilton et al., 2009). Uma vez no trato respiratório, a bactéria atravessa a camada de muco e se adere ao epitélio ciliado, iniciando a colonização. Embora o mecanismo exato pelo qual o *M. hyopneumoniae* se adere aos cílios respiratórios não seja bem conhecido, sabe-se que proteínas de superfície estão envolvidas neste processo (Adams et al., 2005). *M. hyopneumoniae* expressa em sua superfície um número significativo de adesinas multifuncionais, cuja função principal é a aderência ao cílio respiratório (Robinson et al., 2013). O recrutamento exógeno de mucina irá ajudar a bactéria a penetrar através da camada de muco no sentido dos cílios (Jenkins et al., 2006; Wilton et al., 2009). A adesão aos cílios é iniciada por interações hidrofóbicas não específicas, seguidas por interações específicas entre as adesinas da célula do micoplasma com receptores na membrana dos cílios (Minion et al., 1984). Muitas dessas adesinas ou supostas adesinas contêm uma ou mais regiões variáveis de repetições em tandem (VNTR). Para a região R1 da adesina P97 foi demonstrado que o número de repetições influencia a capacidade de adesão (Minion et al., 2000).

Técnicas moleculares tem demonstrado que o *M. hyopneumoniae* apresenta uma grande diversidade genômica (Stakenborg et al., 2006; Madsen et al., 2007; Mayor et al., 2008) proteômica (Calus et al., 2007), fenotípica (Frey et al., 1992; Vicca et al., 2003) e também de virulência (Vicca et al., 2003). Alguns isolados de *M. hyopneumoniae* foram classificadas como de baixa, moderada e alta virulência com base no resultado de infecções experimentais em suínos (Vicca et al., 2003). Villarreal et al. (2011) demonstraram que infecção com isolados de *M. hyopneumoniae* de baixa virulência não impediu a infecção e doença contra uma subsequente infecção com um isolado altamente virulento. No entanto, pesquisas ainda são necessárias para investigar a importância clínica destas diferenças entre os isolados. Diferenças na aderência (de Castro et al., 2006) e de transmissão (Meyns et al., 2004; Marois et al., 2007), tem sido sugeridas, mas não claramente demonstradas. Do ponto de vista epidemiológico, a caracterização de isolados de *M. hyopneumoniae* iria facilitar a compreensão da transmissão do *M. hyopneumoniae* e compreender características das cepas infectantes dentro do mesmo rebanho e entre rebanhos diferentes. Do ponto de vista vacinal, as variações observadas na eficácia da vacina em condições de campo podem ser devido, entre outros fatores, das diferenças antigênicas entre as cepas circulantes em rebanhos suínos da cepa vacinal, em função da grande diversidade genética entre as cepas de *M. hyopneumoniae*.

1.4 Testes diagnósticos

Várias metodologias são usadas para diagnosticar infecções causada por *M. hyopneumoniae*. Sinais clínicos e lesões patológicas podem levar a uma tentativa de diagnóstico presuntivo (Maes et al., 2008; Nathues et al., 2012), mas o teste laboratorial é necessário para um diagnóstico conclusivo (Thacker, 2004). O isolamento de *M. hyopneumoniae* dos pulmões afetados, pela cultura bacteriológica, é considerado a técnica "padrão ouro" para diagnóstico (Thacker, 2006), porém não é utilizado como rotina. O organismo pode ser detectado por testes de imunofluorescência, mas este teste tem sensibilidade limitada. Testes sorológicos podem ser utilizados para detectar efetivamente a presença do organismo pelo fato de apresentarem uma alta especificidade (Thacker, 2004), porém apresentam uma baixa sensibilidade, não sendo adequados para o diagnóstico individual (Sørensen et al., 1997). O *Nested* PCR é visto como a ferramenta mais sensível para detectar a infecção (Calsamiglia, 1999). O PCR em tempo real e suas variações também têm sido utilizados para o diagnóstico e quantificação da infecção (Marois et al., 2010; Li et al., 2013). Métodos de PCR são mais rápidos do que a cultura bacteriológica, são relativamente baratos e vem sendo amplamente utilizados (Calsamiglia, 1999). As melhores amostras para detectar *M. hyopneumoniae* por PCR são *swabs* traqueobrônquicos ou lavados broncoalveolares (BALF) (Sibila et al., 2009). A utilização do PCR para detectar *M. hyopneumoniae* a partir do tecido pulmonar produziu resultados variáveis. Moorkamp et al. (2008) sugeriu que as amostras de pulmão são mais adequadas do que as de BALF em casos de PES moderada e grave, enquanto Kurth et al. (2002) acreditam que as amostras de tecido pulmonar não confiáveis, e que a utilização de amostras de BALF é mais adequada.

1.5 Formas de controle

Para controlar e tratar as doenças respiratórias em suínos, incluindo infecções por *M. hyopneumoniae*, em situações onde a doença já está estabelecida, a antibioticoterapia pode ser realizada (Ciprián et al., 2012; Thongkamkoon et al., 2013),

antibióticos como as tetraciclina e os macrolídeos são frequentemente utilizados. Além disso, outros antimicrobianos potencialmente ativos contra *M. hyopneumoniae* incluindo lincosamidas, pleuromutilinas, fluoroquinolonas, florfenicol, aminoglicosídeos e aminoclitóis também podem ser indicados. Fluoroquinolonas e aminoglicosídeos têm efeitos micoplasmicidas. Uma vez que o organismo não apresenta parede celular, é insensível a β -lactâmicos e outros antibióticos, tais como penicilinas e cefalosporinas. Embora a resistência antimicrobiana adquirida de *M. hyopneumoniae* tenha sido reportada às tetraciclina (Inamoto et al., 1994), mais recentemente, também foi atribuída para os macrolídeos, lincosamidas e fluoroquinolonas (Vicca et al., 2004). Suínos tratados com antibióticos eficazes têm sinais clínicos e lesões pulmonares menos severas, e um menor número de infecções secundárias (Vicca et al., 2005; Ciprián et al., 2012).

A vacinação é considerada a prática mais eficaz para controlar esta infecção (Mateusen et al., 2002). Vacinas comerciais são compostas por bactérias inteiras inativadas e com adjuvante, sendo amplamente utilizadas em todo o mundo (Del Pozo Sacristán et al., 2014). Em muitos países a vacinação para controlar infecções por *M. hyopneumoniae* é aplicada em (Maes et al., 2008). As principais vantagens da vacinação incluem a melhoria no ganho de peso diário (2-8%), conversão alimentar (2-5%) e, por vezes, redução na taxa de mortalidade (Maes et al., 2008). Além de um menor tempo para atingir o peso de abate, reduzido sinais clínicos, lesões pulmonares e redução dos custos de tratamento são observados (Maes et al., 1998, 1999). Embora a proteção contra a pneumonia clínica possa ser incompleta, pois as vacinas não previnem colonização (Thacker, 1998), alguns estudos indicam que as vacinas atualmente utilizadas podem reduzir o número de microrganismos no trato respiratório (Meyns et al., 2006) e podem diminuir a infecção em um rebanho (Meyns et al., 2006; Sibila et al., 2007). Os esforços para desenvolver uma forma mais eficaz da vacina contra micoplasmas vêm sendo propostos, e vacinas desenvolvidas utilizando a tecnologia do DNA recombinante representam uma alternativa viável (Simionatto et al., 2013).

1.6 Vacinas

A vacinação com bacterinas comerciais tem sido uma ferramenta importante para controlar a infecção por *M. hyopneumoniae* em todo o mundo. Apesar dos efeitos benéficos, estas bacterinas fornecem apenas proteção parcial e não impedem a colonização do *M. hyopneumoniae* sobre as células epiteliais (Thacker et al., 2000). Alguns estudos indicam que as vacinas comerciais atualmente disponíveis podem reduzir o número de organismos no trato respiratório (Meyns et al., 2006; Kathleen Vranckx et al., 2012), conseqüentemente, o nível de infecção nos animais, e, por extensão, a infecção a nível de rebanho (Sibila et al., 2007) reduzindo assim as perdas econômicas (Del Pozo Sacristán et al., 2014). Embora a vacinação reduza significativamente os sinais clínicos e lesões pulmonares, apenas uma limitada redução ocorre na transmissão do *M. hyopneumoniae* (Meyns et al., 2006; Villarreal et al., 2011). As vacinas comerciais induzem a produção de anticorpos específicos no soro, embora a resposta de anticorpos possa ser diferente entre as vacinas (Thacker, 1998), a taxa de soroconversão entre animais pode variar entre de 30 - 100% (Sibila et al., 2004). A correlação entre a indução de anticorpos específicos e a proteção contra a pneumonia ainda não é clara.

As vacinas comerciais usadas para controlar a PES são baseadas principalmente na cepa J, que foi originalmente isolada de um rebanho de suínos no Reino Unido (Goodwin & Whittlestone, 1963). Variações na eficácia da vacina em condições de campo pode ter se dado devido, entre outros fatores, a diferenças antigênicas entre as cepas circulantes em rebanhos suínos da cepa vacinal. Inúmeras tentativas para desenvolver uma vacina que confira melhor proteção contra infecções por *M. hyopneumoniae* vem sendo realizadas. Diversos estudos avaliaram proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*, em várias formas de administração e formulações. Algumas delas foram avaliadas individualmente (Galli et al., 2012; Simionatto et al., 2012), associadas com vetores virais ou bactérias atenuadas (Fagan et al., 2001; Chen et al., 2001; Shimoji et al., 2003; Chen et al., 2006a; Chen et al., 2006b; Okamba et al., 2007; Zou et al., 2011) fusionadas com adjuvantes da mucosa (Conceição & Dellagostin, 2006) e também avaliadas como *pool* de antígenos (Chen et al., 2008). A maior parte destas proteínas recombinantes foram avaliada apenas em camundongos.

A identificação e caracterização de proteínas imunogênicas de *M. hyopneumoniae* é um passo importante para o desenvolvimento de vacinas melhoradas (Razin et al., 1998), porém o desenvolvimento de novas vacinas de subunidades recombinantes é frequentemente prejudicado pelo fato do *Mycoplasma* não utilizar o código genético padrão. Para expressar as proteínas de *M. hyopneumoniae* em sistemas heterólogos, os *códons* TGA que codificam para o aminoácido triptofano, em genes de *M. hyopneumoniae*, precisam ser substituído pelo *códon* TGG. Apesar das diferenças existentes nos *códons* de micoplasmas relacionadas, a clonagem e expressão de um número elevado de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* em *E. coli* tem sido realizada com êxito (Simionatto et al., 2009, 2010). Foram analisadas as propriedades antigênicas e imunogênicas de inúmeras proteínas. Algumas delas foram avaliadas em camundongos e mostraram um grande potencial para utilização como antígenos vacinais contra *M. hyopneumoniae*. Embora a resposta imune de camundongos não possa ser extrapolada para outras espécies, os resultados justificam uma posterior investigação destas proteínas recombinantes como vacinas de subunidade em experimentos de desafio em suínos (Simionatto et al., 2012).

1.6.1 Sistemas de Expressão

Ao longo das últimas três décadas, a *E. coli* foi extensivamente utilizada como um hospedeiro celular para a expressão de proteínas. A expressão bem sucedida de proteínas recombinante em *E. coli* é, portanto, muito dependente das características primárias, secundárias, terciárias e funcionais da proteína de interesse. A bactéria *E. coli*, por ser um organismo procariótico, é incapaz de dobrar corretamente a proteína exógena e realizar modificações pós-traducionais que ocorreriam se fossem expressas em organismos eucarióticos (Daly & Hearn, 2005). Essas proteínas normalmente são obtidas na forma insolúvel, há formação corpos de inclusão, a solubilização dos corpos de inclusão e posterior redobrimento são passos necessários, porém há perdas no rendimento e na eficácia da proteína purificada (Marston, 1986; Makrides, 1996; Daly & Hearn, 2005).

Uma grande variedade de proteínas que não puderam ser expressas em *E. coli* no nível correto de maturação pós-traducional, subsequentemente foram produzidas

na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (Monsalve et al., 1999; Hartwig et al., 2013). As desvantagens da formação de corpos de inclusão e a expressão de proteínas na forma insolúvel podem ser contornadas através da expressão utilizando o sistema de expressão em *P. pastoris*. Segundo Lueking et al. (2000), a partir dos 29 diferentes clones de cDNA, em *P. pastoris*, que estavam em fase de leitura correta, todos foram encontrados produzindo proteínas solúveis. Com o sistema de expressão de *E. coli*, por outro lado, apenas nove clones resultaram em proteínas solúveis, 15 foram detectadas em corpos de inclusão e cinco não foram expressas. Este resultado é, sem dúvida, em função das diferenças no dobramento das proteínas e devido à incapacidade da *E. coli* realizar modificações pós-traducionais.

A produção de proteína recombinante em cepas da levedura *Pichia pastoris* tem várias vantagens sobre outros sistemas de expressão, eucarióticos e procarióticos, tais como: crescimento rápido com uma alta facilidade de fermentação de alta densidade celular; altos níveis de produtividade em um meio quase livre de proteína; eliminação de contaminação por endotoxinas e por bacteriófago; facilidade da manipulação genética com o uso de vetores de expressão bem caracterizados; não patogênica para humanos; custo de produção relativamente baixo; diversas modificações pós-traducionais que incluem dobramento correto da proteína, glicosilação, metilação, acetilação, ajuste proteolítico, direcionamento para compartimentos subcelulares, e a capacidade para secretar proteínas que podem ser purificados de forma mais fácil (Daly & Hearn, 2005; Gellissen et al., 2005; Li et al., 2007; Rabert et al., 2013). Recentes estudos também sugerem que a N-glicosilação, uma das mais comuns modificações pós-traducionais, pode conferir também as proteínas expressas em *P. pastoris* uma maior estabilidade térmica (Han et al., 2014).

Devido a todas estas vantagens *P. pastoris* tem sido cada vez mais utilizada como sistema de expressão eucarioto (Colao et al., 2006) contando com mais de 550 proteínas já expressas (Lin-Cereghino et al., 2006). Os sistemas de expressão de levedura têm sido utilizados com sucesso há mais de 20 anos em pesquisa básica e na biotecnologia industrial para a produção e secreção de proteínas recombinantes, entre elas proteínas recombinantes bacterianas (Demain & Vaishnav, 2009). Em muitos casos, elas têm sido utilizadas para produzir proteínas heterólogas que não estão biodisponíveis a partir de fontes tradicionais (*in vivo*), seja porque não podem ser isoladas em quantidades suficientes ou porque elas são especialmente projetadas, não sendo encontradas na natureza. Isso também permitiu estudos estruturais e

funcionais de proteínas relevantes para medicamentos e fármacos (Damasceno et al., 2012).

Capítulo 2: Objetivos do Trabalho

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- ✓ Conhecer a diversidade genética das cepas de *M. hyopneumoniae* prevalentes nas granjas de criação de suínos do Sul do país.
- ✓ Expressar uma proteína quimérica composta por diferentes antígenos de *M. hyopneumoniae* na levedura metilotrófica *P. pastoris*, visando a sua avaliação como antígeno vacinal.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Coletar amostras clínicas de pulmões suínos provenientes de granjas da região Sul do Brasil;
- ✓ Cultivar e isolar cepas de *M. hyopneumoniae* a partir das lesões pulmonares obtidas;
- ✓ Caracterizar isolados de *M. hyopneumoniae* por PCR;
- ✓ Clonar o gene de uma quimera de antígenos de *M. hyopneumoniae* em vetores de expressão em *P. pastoris*;
- ✓ Avaliar a expressão da quimera recombinante em *P. pastoris*;
- ✓ Caracterizar a quimera por *Western blot*.

Capítulo 3: Isolamento do *Mycoplasma hyopneumoniae*

3 ISOLAMENTO DO *Mycoplasma hyopneumoniae*

3.1 Introdução

A cultura e isolamento de *M. hyopneumoniae* são laboriosos, demorados e frequentemente não bem sucedidos, de modo que o isolamento não é o método de rotina utilizado para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae*. Além disso, existe a contaminação frequente com outros micoplasmas, tais como *M. hyorhinis* e *M. flocculare* (Thacker & Minion, 2010). Os micoplasmas crescem lentamente em meio de cultivo, a uma temperatura ótima de 37 °C, pH em torno de 7.5, atmosfera de 5 a 10% de CO₂ e leve agitação (Walker et al., 2003). Seu crescimento pobre e lento (ROSS, 1999; Sobestiansky, Barcellos, et al., 1999; Walker et al., 2003) encarece excessivamente a produção de vacinas preparadas com bactérias inteiras inativadas (bacterinas) (Fagan et al., 1997; ROSS, 1999; Chen et al., 2001).

As vacinas comerciais usadas para controlar a PES são baseadas principalmente na cepa J, que foi originalmente isolada de um rebanho de suínos no Reino Unido (Goodwin & Whittlestone, 1963). Variações na eficácia da vacina em condições de campo se dão, entre outros fatores, a diferenças antigênicas entre as cepas circulantes em rebanhos suínos e a cepa vacinal. Cepas de *M. hyopneumoniae* isoladas de diferentes rebanhos demonstraram diferenças proteômicas (Calus et al., 2007), genômicas (Madsen et al., 2007) e na virulência (Vicca et al., 2003). Estudos demonstraram existir heterogeneidade genética entre isolados provenientes de diferentes rebanhos (Stakenborg et al., 2005; Mayor et al., 2007; Nathues et al., 2011) outros estudos demonstraram encontrar ambas, heterogeneidade e homogeneidade genética entre isolados do mesmo rebanho (Maes et al., 2008; Charlebois et al., 2014).

Para obtenção de uma vacina com maior especificidade e efetividade, o isolamento e caracterização antigênica de cepas infectantes torna-se uma estratégia importante no controle da PES. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo o isolamento de cepas de *M. hyopneumoniae* a partir do cultivo de amostras de pulmões de suínos provenientes de diferentes granjas do estado do Rio Grande do Sul, coletadas em um frigorífico na cidade de Pelotas, RS, para posterior caracterização molecular da diversidade genética dos isolados presentes nestas granjas.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta e score de lesões pulmonares. Amostras de pulmão, com lesões características de PES, foram coletadas em um frigorífico de inspeção estadual, o qual recebe suínos provenientes de granjas de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. Foram realizadas 5 coletas em diferentes dias, obtendo um total de 62 amostras. Áreas do tecido pulmonar adjacentes as lesões foram cortadas e processadas. O score das lesões foi pontuado de acordo com o método descrito por Hannan et al. (1982).

3.2.2 Cultivo. As amostras processadas foram maceradas com 5 ml de meio NHS20 (Meio Friis suplementado com 10% soro suíno e 10% soro equino). Alíquotas filtradas (com filtro 0,45 µm) e não filtradas do macerado pulmonar foram cultivadas em placas de 96 cavidades em meio de cultivo NHS25 (suplementado com 12,5% soro suíno e 12,5% soro equino). Um volume de 20 µl destas alíquotas foram adicionados em 180 µl de meio em cada poço e diluídos até 10^{-4} . As placas foram incubadas em estufa a 37 °C até ser observado o crescimento de micoplasma pela acidificação do meio. Estas amostras foram então repicadas em micro tubos com 500 µl de meio NHS20 e incubados novamente em estufa a 37 °C (Lin et al., 2006). Nas amostras onde foi possível observar a acidificação do meio, 10 e 50 µl de cada amostra foram transferidas para uma placa com meio NHS20 sólido. Essas placas foram incubadas em anaerobiose a 37 °C até ser possível observar novamente a acidificação do meio. As colônias isoladas foram transferidas para um micro tubo com 500 µl de meio NHS20 até ser obtido um novo crescimento para posterior armazenamento da cepa e extração de DNA.

3.2.3 Extração de DNA e caracterização das amostras por PCR. O DNA dos cultivos foi extraído utilizando o kit *illustra™ Bacteria genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare). *Primers* de uma região conservada do gene 16S rDNA foram selecionados para a identificação das três espécies de micoplasma frequentemente encontradas no trato respiratório de suínos (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*) (Tabela 1). Para a reação de PCR foram utilizados 30 ciclos (30 s a 94 °C; 15 s a 54,6 °C; e 1 min a 68 °C). As amostras foram amplificadas em um termociclador utilizando 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 x *Taq buffer*, 75 nmol MgCl₂, 10 nmol de cada dNTP, 8 pmol de cada *primer forward* e 12 pmol do *primer reverse*.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na reação de PCR para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare* e o tamanho do fragmento amplificado em cada espécie.

Nome do <i>primer</i>	Sequência	<i>Amplicon</i> (pb)
M HYOP FOR	5'TTCAAAGGAGCCTTCAAGCTTC3'	1000
M FLOC FOR	5'GGGAAGAAAAAATTAGGTAGGG3'	754
M HYOR FOR	5'CGGGATGTAGCAATACATTCAG3'	1128
M REV	5'AGAGGCATGATGATTTGACGTC3'	

3.2.4 Diagnóstico por PCR a partir das amostras de BALF. Uma alíquota de 1 ml do fluido broncoalveolar (BALF) obtido das amostras de pulmão foi utilizado para a extração de DNA com o kit DNAeasy blood and tissue (Quiagen). A reação de PCR, bem como a síntese dos *primers* foram realizadas segundo Stakenborg et al. (2006).

3.3 Resultados e discussão

A vacinação tem sido uma importante ferramenta preventiva no controle da infecção por *M. hyopneumoniae*, porém a eficácia de imunização varia de rebanho pra rebanho (Reynolds et al., 2009). As vacinas disponíveis comercialmente conferem apenas uma proteção parcial ao suínos (Haesebrouck et al., 2004). As bacterinas

disponíveis no mercado são produzidas através da inativação de uma cepa não virulenta de *M. hyopneumoniae* (cepa J), essa cepa, isolada no Reino Unido, é amplamente utilizada para imunização de suínos no mundo todo. Devido à diversidade genômica, proteômica, transcriptômica e de virulência entre cepas encontradas em diferentes rebanho ou até mesmo no mesmo rebanho (Charlebois et al., 2014), a proteção conferida por essas bacterinas é variável. O isolamento, para posterior análise da diversidade genética entre cepas infectantes encontradas em suínos provenientes de diferentes regiões do estado, pode vir a contribuir no desenvolvimento de formulações vacinais mais eficientes contra a PES. Pesquisas com novas abordagens vacinais vêm sendo propostas, buscando o desenvolvimento de vacinas mais eficientes no controle da PES. O sequenciamento dos genomas completos de diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005; Liu et al., 2011) tem permitido a aplicação dos conceitos de vacinologia reversa (Rappuoli, 2001) na seleção racional de antígenos promissores para a construção de novas vacinas através da tecnologia do DNA recombinante. Utilizando desta abordagem, praticamente qualquer proteína de um organismo pode ser expressa em um sistema heterólogo, permitindo a utilização de proteínas recombinantes purificadas como vacinas de subunidade e de vacinas de DNA ou vetorizadas que permitem a expressão da proteína recombinante após a vacinação (Simionatto et al., 2010).

No presente estudo, em 62 amostras de pulmões coletados em frigorífico de inspeção estadual, que apresentaram lesões características de *M. hyopneumoniae* e que foram cultivadas, pôde ser observada a acidificação do meio em 11 amostras, das quais 7 foram PCR positivas para o gênero *Mycoplasma*, algumas dessas amostras amplificadas podem ser observadas na Figura 1. Destas sete, seis foram positivas para uma ou mais espécies de micoplasma (Tabela 2). Apenas uma amostra foi positiva somente para *M. hyopneumoniae*. O *M. hyorhinis* se fez presente em 80% das amostras que foram também positivas para *M. hyopneumoniae*. O *M. hyorhinis* se sobrepõe ao crescimento de outros micoplasmas em meio de cultivo (Thacker & Minion, 2010), o que dificulta o isolamento de uma única espécie, corroborando com os achados de Friis (1975).

A amostra positiva somente para *M. hyopneumoniae* em diagnóstico por PCR, após um maior número de passagens em meio de cultivo sólido, apresentou um diagnóstico positivo também para *M. hyorhinis*. Este resultado possivelmente tenha ocorrido por contaminação ou devido à baixa sensibilidade da técnica para a detecção

de uma pequena carga de *M. hyorhinis* no cultivo inicial. Isso evidencia a sobreposição do *M. hyorhinis* ao *M. hyopneumoniae*, mesmo quando em concentrações iniciais baixas, insuficientes para um diagnóstico positivo por PCR.

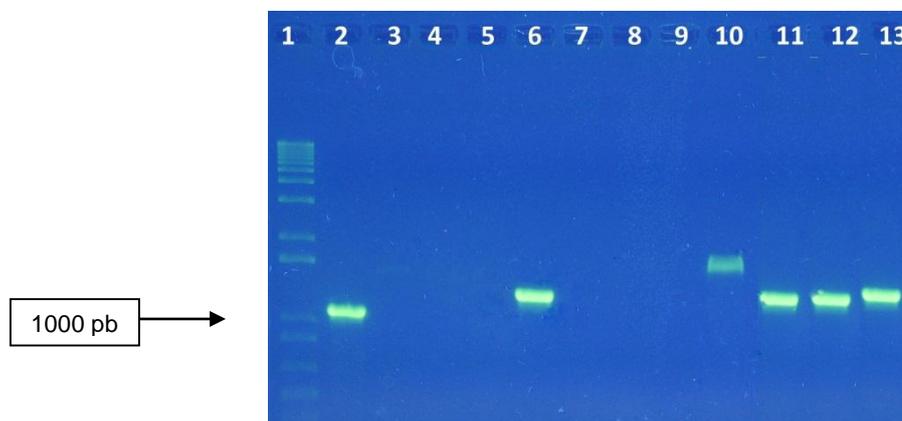


Figura 1. Gel de agarose corado com Blue-Green de algumas amostras positivas na PCR para o gênero *Mycoplasma*. 1, Marcador de peso molecular 1 kb; 2, 5, 8 e 11, amostras com *primer* para *M. flocculare*; 3, 6, 9 e 12, amostras com *primer* para *M. hyopneumoniae*; 4, 7, 10 e 13, amostras com *primer* para *M. hyorhinis*.

Tabela 2. PCR para o gênero *Mycoplasma* a partir de amostras obtidas no isolamento.

Nº de amostras	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. flocculare</i>
3	+	+	-
1	-	-	+
1	+	-	-
1	-	+	-
1	+	+	+
Total	3	3	2

O diagnóstico por PCR através de amostras de lavado broncoalveolar (BALF) apresentou 40 amostras positivas dentre 62 coletadas (Figura 2), demonstrando uma alta incidência de PES em granjas do RS. O diagnóstico a partir de amostras de BALF se mostrou eficiente, apresentando uma sensibilidade alta, levando em consideração

as limitações da técnica pela metodologia de coleta (Moorkamp et al., 2008; Vranckx et al., 2011, 2012). Segundo Kurth et al. (2002) e Marois et al. (2007) as melhores amostras para detectar *M. hyopneumoniae* por PCR são *swabs* traqueobrônquicos ou lavados BALF, ambos são igualmente preditivos para detecção tanto em animais vivos quanto em animais mortos, já utilização de PCR para detectar *M. hyopneumoniae* no tecido pulmonar produziu resultados variáveis, corroborando com os resultados do presente estudo. Moorkamp et al. (2008) sugeriram que as amostras de pulmão são mais adequadas do que as de BALF em casos de PES moderada e grave, enquanto Kurth et al. (2002) acreditam que as amostras de tecido pulmonar não são confiáveis, neste contexto.

Não foi possível observar correlação existente entre o *score* de lesão pulmonar, o diagnóstico a partir do cultivo e o diagnóstico por amostras de BALF. O cultivo a partir das lesões pulmonares apresentou 5 amostras positivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, que não coincidiram, em sua totalidade, com o diagnóstico a partir das amostras de BALF. Não houve relação entre um maior ou menor *score* de lesão pulmonar e o diagnóstico positivo através do cultivo ou a partir de amostras de BALF, tampouco com relação a uma maior efetividade no cultivo desse microrganismo (Tabela 3). Estudos anteriores relataram a grande dificuldade no cultivo e isolamento dessa bactéria, o que também pode ser observado neste trabalho (Friis, 1975; Vranckx et al., 2011; Charlebois et al., 2014). Não foi possível o cultivo do *M. hyopneumoniae* a partir de algumas amostras de pulmão, mesmo essas amostras apresentando um diagnóstico positivo por PCR utilizando o DNA extraído de amostras de BALF. O resultado positivo no PCR confirma a infecção e a presença da bactéria da bactéria no animal, porém, não é suficiente para garantir o sucesso no cultivo dessa fastidiosa bactéria.

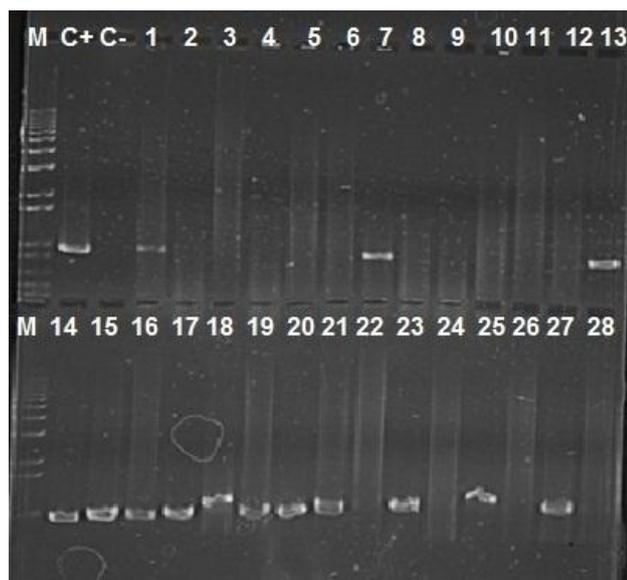


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto da reação de PCR a partir de amostras de BALF, utilizando primer para *M. hyopneumoniae*. 1, Marcador de peso molecular 1 kb; 2, Controle positivo: DNA de *M. hyopneumoniae* cepa 7448; 3, Controle negativo; 1, 7 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 27, amostras positivas para *M. hyopneumoniae*.

Tabela 3. Panorama geral acerca dos resultados de score de lesão pulmonar, isolamentos, e diagnóstico a partir de amostras de BALF.

AMOSTRAS	SCORE*	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. flocculare</i>	PCR BALF
1	8,31				+
2	3,15				-
3	19,52				-
4	11,27	+	+	-	-
5	13,94				-
6	19,40				-
7	19,60				+
8	3,52				-
9	11,24				-
10	2,10				-
11	6,57				-
12	9,68	+	+	+	-
13	7,00				+
14	15,97				+
15	18,46				+
16	20,42				+
17	10,45	+	+	-	+
18	5,35	-	-	-	+
19	18,28	+	+	-	+
20	13,20				+
21	8,03	-	-	-	+
22	12,5				-
23	5,16	-	+	-	+
24	11,05				-
25	11,87	-	-	-	+
26	11,96				+
27	13,60	-	-	-	+
28	7,76				-
29	17,67	-	-	+	-
30	4,60				-
31	4,91				-
32	4,6				+
33	11,2				+
34	3,93				-
35	13,21				+
36	5,01				-
37	13,03				+
38	8,38				+
39	4,28				+
40	22,10				+

**Capítulo 4: Expressão de uma
quimera de antígenos
recombinantes de *Mycoplasma
hyopneumoniae* em *Pichia
pastoris***

4 EXPRESSÃO DE UMA QUIMERA DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM *Pichia pastoris*

4.1 Introdução

A vacinação parece ser a forma mais efetiva de controlar a PES (Lin et al., 2003). Novas vacinas melhoradas utilizando proteínas expressas de forma recombinante vêm sendo utilizadas e demonstrando um grande potencial para utilização como antígenos vacinais (Razin et al., 1998; Simionatto et al., 2012). Grande parte das proteínas recombinantes são produzidas em *E. coli*. Porém a *E. coli*, por ser um organismo procariótico, é incapaz de dobrar corretamente a proteína exógena e realizar outras modificações pós-traducionais que ocorreriam se fossem expressas em organismos eucarióticos (Daly & Hearn, 2005).

Essas proteínas expressas em *E. coli* normalmente são obtidas na forma insolúvel, e a solubilização dos corpos de inclusão e posterior redobramento da proteína são passos necessários, porém acabam resultando em um baixo rendimento e eficácia da proteína purificada (Marston, 1986; Makrides, 1996; Daly & Hearn, 2005). Em comparação com a *E. coli*, a levedura metilotrófica *P. pastoris* tem muitas vantagens como hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas recombinantes, tais como: alta densidade celular, níveis elevados de produtividade, a facilidade de manipulação genética, a capacidade de realizar modificações pós-traducionais (Daly & Hearn, 2005).

Os sistemas de expressão em levedura têm sido utilizados com sucesso há mais de 20 anos na pesquisa básica e na biotecnologia industrial para a produção e secreção de proteínas recombinantes (Demain & Vaishnav, 2009). Estes sistemas de expressão têm como objetivo produzir proteínas heterólogas que não estão biodisponíveis a partir de fontes tradicionais (*in vivo*) seja porque não podem ser

isoladas em quantidades suficientes ou porque foram proteínas especialmente projetadas, não sendo encontradas na natureza (Damasceno et al., 2012).

Através do uso da vacinologia reversa pode-se observar que vários antígenos de *M. hyopneumoniae* podem ser potenciais candidatos a serem incluídos em vacinas de subunidades (Fagan et al., 2001; Shimoji et al., 2003; Okamba et al., 2007; Ogawa et al., 2009; Okamba et al., 2010; Marchioro et al., 2012; Simionatto et al., 2012). Alguns destes antígenos incluem adesina P97 e a sua região C-terminal (P97R1), que desempenha um papel na adesão do agente patogênico para o trato respiratório do hospedeiro. Outros candidatos potenciais incluem a ribonucleotídeo redutase (NrdF) e a proteína de choque térmico P42. A P97 (Shimoji et al., 2003), P97R1 (Okamba et al., 2007; Ogawa et al., 2009) e NrdF (Fagan et al., 2001) têm sido investigadas como antígenos individuais em diferentes formulações vacinais. Algumas dessas formulações (P97 e NrdF) não foram capazes de induzir uma resposta imune protetora em suínos (Fagan et al., 2001; Shimoji et al., 2003), e sim apenas uma proteção parcial contra lesões pulmonares causadas pela infecção por *M. hyopneumoniae*, o que pode estar relacionado ao fato de as formulações vacinais testadas serem monovalentes (apenas um antígeno) (Marchioro et al., 2012). A administração de uma vacina multivalente, composta por mais de um antígeno de *M. hyopneumoniae*, pode elevar os índices de proteção (Chen et al., 2008; Okamba et al., 2010).

Esse trabalho teve como objetivo a obtenção de um clone recombinante de *P. pastoris* que expresse uma proteína quimérica composta pelos antígenos de *M. hyopneumoniae* R1 (P97), P42 e NrdF, os quais conferiram proteção parcial aos suínos quando avaliados individualmente (Fagan et al., 1997; Chen et al., 2003; Shimoji et al., 2003), fusionados à subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), um potente adjuvante da imunidade de mucosa.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Clonagem em vetores de *P. pastoris*. O gene de 1500 pb que codifica para expressão da proteína quimérica (LTB-R1-P42-NrdF) contendo os três antígenos de *M. hyopneumoniae* (R1, P42 e NrdF) e um adjuvante de mucosa (LTB) foi construído *in silico* e clonado no vetor pUC18 pela empresa Epoch Biolabs® (USA) (Marchioro et al., 2014 - manuscrito submetido). O vetor pUC18 e os vetores de expressão em *P. pastoris*, pPICZ α B e pPICZB (Invitrogen), foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e

EcoRI. A confirmação da eficiência da digestão foi feita em de gel de agarose 0,8%. O gene da quimera liberado do vetor pUC18 foi extraído com o kit *ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O gene foi ligado aos vetores de expressão em *P. pastoris* com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). Os plasmídeos ligados foram linearizados com a enzima *PmeI* (New England Bio Labs, EUA). A enzima foi inativada a 65 °C e o DNA precipitado. As células de *P. pastoris* KM71H competentes foram transformadas por eletroporação (25 uF, 200 Ω, 2 kV), com 10 µg de DNA do plasmídeo linear, conforme o protocolo EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) e semeadas em meio YPDS contendo 100 µg/ml de zeocina.

4.2.2 Seleção dos recombinantes. Os clones recombinantes foram selecionados em meio YPDS, após incubação durante quatro dias em estufa a 28 °C. As colônias foram repicadas em placas de cultivo de microrganismos de 96 cavidades com 800 µl de meio BMGY e incubadas em um agitador orbital (200 RPM, 28 °C) até atingirem $DO_{600}=4$. Nesse momento, as culturas foram centrifugadas e o *pellet* ressuspenso em 200 µl de BMMY contendo 0,5% de metanol. A cada 24 h, 0,5% de metanol foi adicionado, visando induzir a expressão da proteína recombinante. Amostras do sobrenadante foram coletadas a cada 24 h e os níveis de expressão analisados por *Dot blot* utilizando MAb anti-histidina (Sigma-Aldrich). Os clones com expressão positiva foram utilizados na expressão em larga escala, realizada nas mesmas condições descritas acima.

4.2.3 PCR de colônia para confirmação da clonagem. Para confirmação da inserção do gene nos vetores de *P. pastoris*, as colônias positivas no *Dot blot* foram selecionadas. Estas foram fervidas com 100 µl de água a 100 °C por 10 min. Foram utilizados *primers* que amplificam a sequência que codifica para da proteína P42, P42_F (5'-TAGGATCCATGGCGCTTACAAGAC) e P42_R (5'-CGGGGTACCTTAATCCTGCTTG). Para a reação de PCR foram utilizados 30 ciclos (30 s a 94 °C; 15 s a 56 °C; e 1 min a 72 °C).

4.2.4 Caracterização por Western blot. Para a caracterização, os sobrenadantes, provenientes da lise dos *pellets* de 5 diferentes clones, foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%. O gel contendo as proteínas foi colocado em contato direto com uma membrana de nitrocelulose em uma estrutura de sanduiche,

recebendo de ambos os lados uma camada de papel filtro e outra de espuma. Este sanduiche foi colocado em uma cuba contento tampão de transferência e submetido a corrente elétrica a 100v, *overnight* a 4 °C. A membrana foi bloqueada com leite em pó 5% por 1 h. Após bloqueio foi adicionado o MAb anti-histidina (Sigma-Aldrich) diluído 1:6000 por 1 h e em seguida colocado o segundo anticorpo conjugado com peroxidase anti-mouse (Sigma-Aldrich) diluído 1:6000 por mais 1 h. A revelação foi realizada com solução de revelação (9 ml tampão TRIS-HCl 50 mM pH 7,6, 1 ml solução de níquel 0,3%, 10 µl peróxido de hidrogênio, e 6 mg 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich).

4.3 Resultados e discussão

A vacinação é considerada a prática mais eficaz para o controle da PES (Mateusen et al., 2002; Lin et al., 2003), a associação de vários antígenos vacinais tem demonstrado seu potencial em aumentar os níveis de proteção quando comparado com a vacinação utilizando apenas um antígeno (Chen et al., 2008; Okamba et al., 2010). A expressão de proteínas recombinantes tem demonstrado um grande potencial para o desenvolvimento de vacinas (Simionatto et al., 2012). Muitas das proteínas heterólogas purificadas e avaliadas são produzidas em *E. coli*, no entanto, este sistema de expressão bacteriano frequentemente expressa proteínas não ativas devido a um dobramento incorreto ou pela formação de corpúsculos de inclusão, resultando em baixo rendimento e eficácia da proteína purificada (Daly & Hearn, 2005).

Nos últimos anos, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* emergiu como um poderoso e barato sistema de expressão heteróloga para a produção de níveis altos de proteínas recombinantes (Cereghino & Cregg, 2000). Este sistema de expressão é único, pois combina as vantagens dos sistemas de expressão de procariotos (expressão em altos níveis, fácil aumento de escala e meios de crescimento baratos) e de eucariotos (capacidade de realizar modificações pós-traducionais) (Cereghino & Cregg, 2000). O sistema de expressão heterólogo de proteínas baseado na levedura metilotrófica *P. pastoris* tem obtido importante aceitação. A crescente utilização desse sistema pode ser atribuída a diversas vantagens quando comparada com *E. coli*, tais como custo, modificações pós-traducionais, possibilidade de produção em escala industrial e a secreção da proteína alvo no sobrenadante do meio de cultivo

(Cereghino & Cregg, 2000). Não comprometendo desta maneira o dobramento da proteína, mantendo sua conformação nativa e não alterando a sua função (Daly & Hearn, 2005). Outra vantagem do sistema de expressão em *P. pastoris* é possibilidade da otimização níveis de expressão, através da seleção de multímeros (múltiplas cópias do gene inseridas no vetor), que pode ser realizada a partir da inserção de grandes quantidades de zeocina no meio de cultivo (100, 500, 1000 e 2000 µg/ml) (Daly & Hearn, 2005; Peng et al., 2014).

Neste estudo clones de *P. pastoris* contendo nosso gene de interesse foram construídos. O gene sintético, construído com códons preferenciais para clonagem em *P. pastoris*, que codifica para a proteína quimérica, composta pela fusão dos antígenos de *M. hyopneumoniae* R1 (P97), P42, NrdF e LTB, foi eficientemente clonado nos vetores de expressão citoplasmática pPICZB e no vetor de secreção pPICZαB (que apresenta um sinal de secreção de *S. cerevisiae*, o fator-α). A digestão dos clones recombinantes, com as enzimas de restrição *EcoRI* e *KpnI* resultou na liberação de um fragmento no tamanho esperado de 1500 pb, o que corresponde ao tamanho do gene (Figura 1).

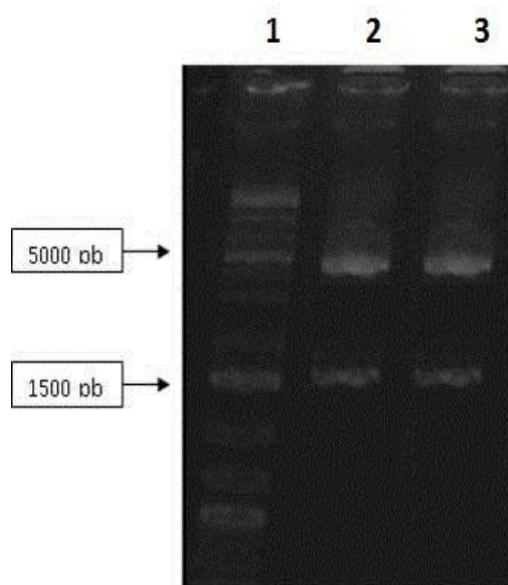


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a digestão do plasmídeo. (1) marcador de peso molecular, (2) produto de digestão do gene sintético fusionado com o vetor pPICZalpha B, (3) produto de digestão do gene sintético fusionado com o vector pPICZ B.

As colônias de *P. pastoris* transformadas e crescidas em meio YPDS com zeocina foram selecionadas para a confirmação da eficiência da clonagem através da identificação do inserto por PCR. Foram utilizados *primers* para amplificar a região

que codifica para um dos antígenos presentes na quimera, a proteína de choque térmico P42. A eficiência da clonagem foi confirmada pela obtenção de amplicons no tamanho esperado (Figura 2).

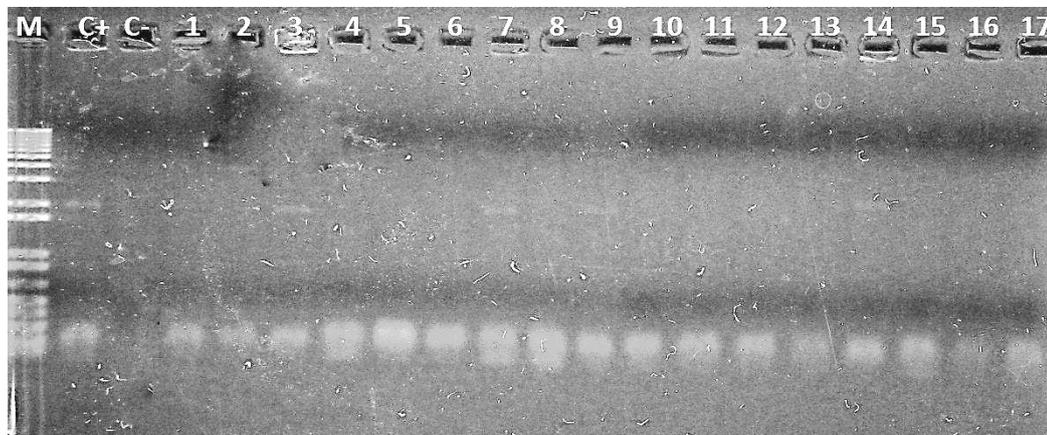


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto da reação de PCR a partir de DNA de colônias, utilizando primer para a proteína P42. 1, Marcador de peso molecular 1 kb; 2, Controle positivo; 3, Controle negativo; 1-17, Amostras positivas para presença do gene que codifica para a proteína P42.

O *pellet* e o sobrenadante do cultivo de inúmeros clones foram submetidos a teste de expressão através de *Dot blot*, destes foram selecionados 5 clones que apresentaram uma maior expressão (Figura 3). Os 5 clones selecionados são clones do vetor pPICZ α B que apesar de ser um vetor de secreção proteica apresentou expressão da proteína quimérica internalizada no citoplasma, fazendo com que a purificação se dê de forma mais trabalhosa. A ausência de secreção da proteína pode ter ocorrido devida a perda da sequência sinal (fator- α) responsável pelo direcionamento da proteína para as vias de secreção (Daly & Hearn, 2005).

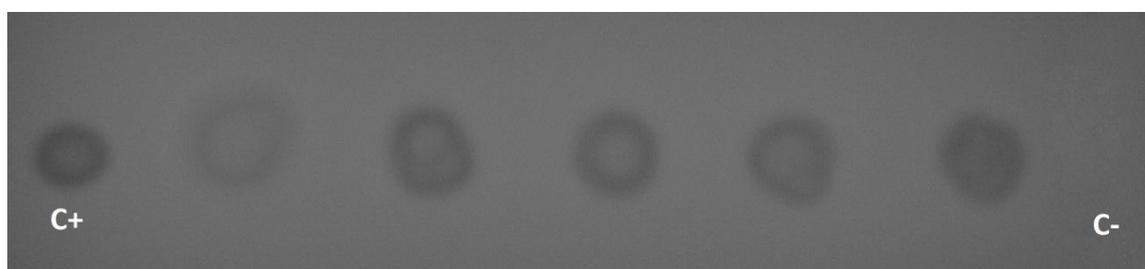


Figura 3. *Dot blot* utilizando MAb anti-histidina, evidenciando as 5 colônias transformadas de *Pichia pastoris* que apresentaram uma maior reatividade e seus respectivos controles, negativo (C-) e positivo (C+). Observa-se a expressão da proteína nas 5 colônias.

Os clones que apresentaram uma maior expressão observada através da técnica de *Dot blot* e que foram positivos através do PCR, foram utilizados para

caracterização das proteínas expressas por *Western blot* (Figura 4). Foi possível observar a eficiência da clonagem e expressão da quimera recombinante em 4 das 5 colônias testadas. Uma variação entre o tamanho da proteína expressa em *P. pastoris* comparada com a proteína expressa em *E. coli* já pode ser observada ao comparar as 4 colônias positivas com o controle. Isso é uma possível evidência de que esta proteína tenha sofrido glicosilação (Daly & Hearn, 2005; Hartwig et al., 2010).

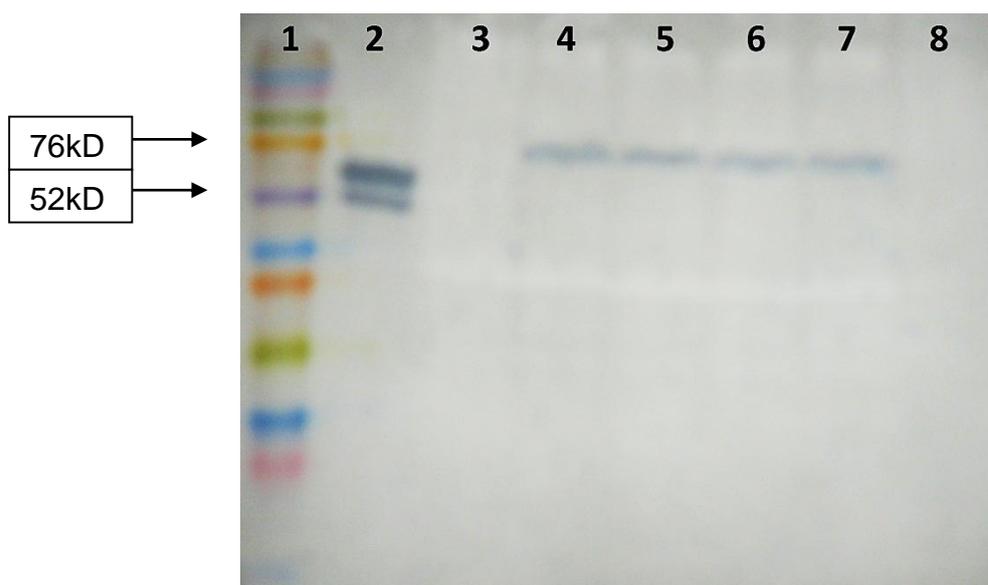


Figura 4. *Western blot* de clones *P. pastoris* expressando a quimera, previamente selecionados por *Dot blot*. 1, Marcador de peso molecular; 2, Controle positivo (quimera expressa em *E. coli*); 3-7, clones de *P. pastoris*; 8, Controle negativo (cepa KM71H).

Neste trabalho foram construídos os vetores de expressão pPICZB e pPICZαB, ligados ao gene que codifica para a proteína quimérica, para inserção na levedura *P. pastoris*. Os plasmídeos recombinantes foram caracterizados e induzidos em *P. pastoris* com a finalidade de se avaliar a expressão da quimera. A expressão dessa proteína apresentou um tamanho semelhante àquele apresentado pela mesma proteína quando expressa em *E. coli*. O tamanho um pouco maior da proteína expressa em *P. pastoris* sugere que essa possa ter sido glicosilada. Além disso, sua expressão foi direcionada para o meio intracelular, o que dificultará uma futura purificação desta proteína. Até o momento, não há relato de expressão de proteínas de *M. hyopneumoniae* em *P. pastoris*. O sistema de expressão mais utilizado nestes casos é *E. coli*, pela fácil manipulação. Este é um organismo unicelular e sua simplicidade faz dele barato e fácil de trabalhar. Entretanto, esta bactéria também

possui algumas desvantagens: *E. coli* não apresenta a maioria das organelas encontradas em eucariotos, nas quais as proteínas são modificadas após a sua síntese. Algumas destas modificações pós-traducionais podem envolver diferentes formas de glicosilação. Várias proteínas podem ser produzidas em grande quantidade em *E. coli*. Porém, por não sofrerem as modificações pós-traducionais, permanecem não-funcionais. Esta bactéria também pode gerar um dobramento incorreto da proteína, acarretando ausência de epítopos conformacionais requeridos na produção de anticorpos neutralizantes e protetores no hospedeiro (Swartz, 2001).

Essa quimera expressa em *E. coli* foi previamente testada em camundongos e suínos, como sendo uma alternativa de abordagem multivalente como vacina contra a PES, apresentando resultados promissores tanto em camundongos quanto em suínos (Marchioro et al., 2014 - manuscrito submetido). A avaliação dessa quimera expressa a partir dos clones originados nesse trabalho, com as prováveis variações no *fold*ing e no padrão de glicosilação, podem vir a ser uma contribuição efetiva como forma de controle da PES. Estudos adicionais envolvendo a purificação e a avaliação dessa proteína são necessários.

4.4 Conclusão

O gene da proteína quimérica, composta pela fusão dos antígenos de *M. hyopneumoniae* R1 (P97), P42, NrdF, fusionados a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) foi eficientemente clonado nos vetores de expressão em *P. pastoris* pPICZB e pPICZαB. A proteína quimérica foi eficientemente expressa em *P. pastoris*, permitindo que novos estudos sejam conduzidos para otimizar as condições de expressão e purificação. Esta proteína quimérica poderá ser avaliada quanto à capacidade de indução de resposta imune protetora quando utilizada para imunizar suínos.

Capítulo 5: Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Isolamento do *Mycoplasma hyopneumoniae*

- ✓ O baixo sucesso no cultivo e no isolamento do *M. hyopneumoniae* pode ter ocorrido devido à dificuldade na seleção das amostras de pulmão, onde outras lesões podem ser confundidas com lesões causadas por *M. hyopneumoniae* em função dessas lesões não apresentarem patognomonicidade.
- ✓ Outro fator limitante foi a ocorrência de co-infecções com outros micoplasmas e com diferentes microrganismos, aumentando as chances de contaminação do meio de cultivo e impedindo o crescimento desta fastidiosa bactéria, fazendo com seja difícil a obtenção de uma amostra isolada pura de *M. hyopneumoniae*.

5.2 Expressão de uma quimera de antígenos recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Pichia pastoris*

- ✓ O gene da proteína quimérica, composta pela fusão dos antígenos de *M. hyopneumoniae* R1 (P97), P42, NrdF fusionados a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) foi eficientemente clonado nos vetores de expressão em *P. pastoris* pPICZB e pPICZαB.
- ✓ A proteína foi eficientemente expressa e caracterizada. Novos testes necessitam ser desenvolvidos com relação a purificação e otimização na expressão da proteína para que posteriormente possa ser dado início aos testes de vacinação em animais.

Capítulo 6: Referências

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, C., PITZER, J. & MINION, F.C. (2005). In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and immunity*. 73(11). p. 7784–7.
- ARTIUSHIN, S. & MINION, F.C. (1996). Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. *International journal of systematic bacteriology*. 46(1). p. 324–8.
- CALSAMIGLIA, M. (1999). Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. *Journal of Swine Health and Production*. 7(6). p. 263 – 268.
- CALUS, D., BAELE, M., MEYNS, T., BUTAYE, P. & MAES, D. (2007). Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Veterinary microbiology*. 120. p. 284–291.
- CALUS, D., MAES, D., VRANCKX, K., VILLAREAL, I., PASMANS, F. & HAESEBROUCK, F. (2010). Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. *Journal of microbiological methods*. 83(3). p. 335–40.
- DE CASTRO, L.A., RODRIGUES, T.P., KUCHIISHI, S.S., RAMENZONI, M., KICH, J.D., ZAHA, A., HENNING, M. V & BUNSELMAYER, H.F. (2006). Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Veterinary microbiology*. 116(4). p. 258–69.
- CEREGHINO, J.L. & CREGG, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*. 24(1). p. 45–66.
- CHARLEBOIS, A., MAROIS-CRÉHAN, C., HÉLIE, P., GAGNON, C., GOTTSCHALK, M. & ARCHAMBAULT, M. (2014). Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates of abattoir pigs. *Veterinary microbiology*. 168(2-4). p. 348–56.
- CHEN, A.Y., FRY, S.R., DAGGARD, G.E. & MUKKUR, T.K.S. (2008). Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine*. 26(34). p. 4372–8.

- CHEN, A.Y., FRY, S.R., FORBES-FAULKNER, J., DAGGARD, G. & MUKKUR, T.K.S. (2006a). Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different expression systems delivered orally via attenuated *S. typhimurium* aroA in mice. *Veterinary microbiology*. 114(3-4). p. 252–9.
- CHEN, A.Y., FRY, S.R., FORBES-FAULKNER, J., DAGGARD, G. & MUKKUR, T.K.S. (2006b). Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *Journal of medical microbiology*. 55(Pt 7). p. 923–9.
- CHEN, J.R., LIAO, C.W., MAO, S.J. & WENG, C.N. (2001). A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. *Veterinary microbiology*. 80(4). p. 347–57.
- CHEN, Y.L., WANG, S.N., YANG, W.J., CHEN, Y.J., LIN, H.H. & SHIUAN, D. (2003). Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infection and Immunity*. p. 1155–60.
- CIPRIÁN, A., PALACIOS, J.M., QUINTANAR, D., BATISTA, L., COLMENARES, G., CRUZ, T., ROMERO, A., SCHNITZLEIN, W. & MENDOZA, S. (2012). Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in swine in México. *Research in veterinary science*. 92(2). p. 191–6.
- COLAO, M.C., LUPINO, S., GARZILLO, A.M., BUONOCORE, V. & RUZZI, M. (2006). Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial cell factories*. 5. p. 31.
- CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2006). Etiopatogenia e imunoprofilaxia da pneumonia enzoótica suína. *Ciência Rural*. 36(3). p. 1034–1042.
- DALY, R. & HEARN, M.T.W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition : JMR*. 18(2). p. 119–38.
- DAMASCENO, L.M., HUANG, C.-J. & BATT, C. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(1). p. 31–39.
- DAVIES, P.R., BAHNSON, P.B., GRASS, J.J., MARSH, W.E. & DIAL, G.D. (1995). Comparison of methods for measurement of enzootic pneumonia lesions in pigs. *American journal of veterinary research*. 56(6). p. 09–14.
- DEBEY, M.C. & ROSS, R.F. (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and immunity*. 62(12). p. 5312–8.
- DEMAIN, A.L. & VAISHNAV, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*. 27(3). p. 297–306.

- DESROSIERS, R. (2011). Transmission of swine pathogens: different means, different needs. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 12(1). p. 1–13.
- FAGAN, P.K., DJORDJEVIC, S.P., CHIN, J., EAMENS, G.J. & WALKER, M.J. (1997). Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). *Infection and immunity*. 65(6). p. 2502–7.
- FAGAN, P.K., WALKER, M.J., CHIN, J., EAMENS, G.J. & DJORDJEVIC, S.P. (2001). Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microbial pathogenesis*. 30(2). p. 101–10.
- FEENSTRA, A.A., SORENSEN, V., FRIIS, N.F., JENSEN, N.E. & BILLE-HANSEN, V. (1994). Experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. In E. by Prachak & P. & P. Ingkaninum (eds.). *Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress*. Bangkok, p. 187.
- FREY, J., HALDIMANN, A. & NICOLET, J. (1992). Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 42. p. 275–280.
- FRIIS, N.F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk veterinærmedicin*. 27(6). p. 337–9.
- FRIIS, N.F. & FEENSTRA, A.A. (1994). *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. *Acta veterinaria Scandinavica*. 35(1). p. 93–8.
- GALLI, V., SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., FISCH, A., GOMES, C.K., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2012). Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine*. 31(1). p. 135–40.
- GELLISSSEN, G., KUNZE, G., GAILLARDIN, C., CREGG, J.M., BERARDI, E., VEENHUIS, M. & VAN DER KLEI, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS yeast research*. 5(11). p. 1079–96.
- GOODWIN, R.F. & WHITTLESTONE, P. (1963). Production of enzootic pneumonia in pigs with an agent grown in tissue culture from the natural disease. *British journal of experimental pathology*. 44. p. 291–9.
- HAESEBROUCK, F., PASMANS, F., CHIERS, K., MAES, D., DUCATELLE, R. & DECOSTERE, A. (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary microbiology*. 100(3-4). p. 255–68.

- HAN, M., WANG, X., YAN, G., WANG, W., TAO, Y., LIU, X., CAO, H. & YU, X. (2014). Modification of recombinant elastase expressed in *Pichia pastoris* by introduction of N-glycosylation sites. *Journal of biotechnology*. 171. p. 3–7.
- HANNAN, P.C., BHOGAL, B.S. & FISH, J.P. (1982). Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Research in veterinary science*. 33(1). p. 76–88.
- HARTWIG, D.D., BACELO, K.L., DE OLIVEIRA, P.D., OLIVEIRA, T.L., SEIXAS, F.K., AMARAL, M.G., HARTLEBEN, C.P., MCBRIDE, A.J.A. & DELLAGOSTIN, O.A. (2013). Mannosylated LigANI Produced in *Pichia pastoris* Protects Hamsters Against Leptospirosis. *Current microbiology*. 68(4). p. 524–30.
- HARTWIG, D.D., OLIVEIRA, T.L., SEIXAS, F.K., FORSTER, K.M., RIZZI, C., HARTLEBEN, C.P., MCBRIDE, A.J.A. & DELLAGOSTIN, O.A. (2010). High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories*. 9. p. 98.
- HWANG, M., DAMTE, D., CHO, M., KIM, Y. & PARK, S. (2010). Optimization of culture media of pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* by a response surface methodology. *Journal of veterinary science*. 11(4). p. 327–32.
- INAMOTO, T., TAKAHASHI, H., YAMAMOTO, K., NAKAI, Y. & OGIMOTO, K. (1994). Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 56(2). p. 393–4.
- JENKINS, C., WILTON, J.L., MINION, F.C., FALCONER, L., WALKER, M.J. & DJORDJEVIC, S.P. (2006). Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infection and immunity*. 74(1). p. 481–7.
- KOBISCH, M. & MAROIS, C. (2008). Les Mycoplasmoses. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*. (1). p. 179–184.
- KOKOTOVIC, B., FRIIS, N.F., JENSEN, J.S. & AHRENS, P. (1999). Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *Journal of clinical microbiology*. 37(10). p. 3300–7.
- KURTH, K.T., HSU, T., SNOOK, E.R., THACKER, E.L., THACKER, B.J. & MINION, F.C. (2002). Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 14(6). p. 463–9.
- LI, J., MINION, F.C., PETERSEN, A.C., JIANG, F., YANG, S., GUO, P., LI, J. & WU, W. (2013). Loop-mediated isothermal amplification for rapid and convenient detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *World journal of microbiology & biotechnology*. 29(4). p. 607–16.

- LI, P., ANUMANTHAN, A., GAO, X.G., ILANGO VAN, K., SUZARA, V., DÜZGÜNES, N. & RENUGOPALAKRISHNAN, V. (2007). Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (142). p. 105–124.
- LIN, J.H., CHEN, S.P., YEH, K.S. & WENG, C.N. (2006). *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Veterinary microbiology*. 115(1-3). p. 111–6.
- LIN, J.H., WENG, C.N., LIAO, C.W., YEH, K.S. & PAN, M.J. (2003). Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 65(1). p. 69–74.
- LIN-CEREGHINO, G.P., GODFREY, L., DE LA CRUZ, B.J., JOHNSON, S., KHUONGSATHIENE, S., TOLSTORUKOV, I., YAN, M., LIN-CEREGHINO, J., VEENHUIS, M., SUBRAMANI, S. & CREGG, J.M. (2006). Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Molecular and cellular biology*. 26(3). p. 883–97.
- LIU, W., FENG, Z., FANG, L., ZHOU, Z., LI, Q., LI, S., LUO, R., WANG, L., CHEN, H., SHAO, G. & XIAO, S. (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *Journal of bacteriology*. 193(4). p. 1016–7.
- LUEKING, A., HOLZ, C., GOTTHOLD, C., LEHRACH, H. & CAHILL, D. (2000). A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 20(3). p. 372–8.
- MADSEN, M.L., ONEAL, M.J., GARDNER, S.W., STRAIT, E.L., NETTLETON, D., THACKER, E.L. & MINION, F.C. (2007). Array-based genomic comparative hybridization analysis of field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of bacteriology*. 189(22). p. 7977–82.
- MAES, D., DELUYKER, H., VERDONCK, M., CASTRYCK, F., MIRY, C., LEIN, A., VRIJENS, B. & DE KRUIF, A. (1998). The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*. 45(8). p. 495–505.
- MAES, D., DELUYKER, H., VERDONCK, M., CASTRYCK, F., MIRY, C., VRIJENS, B., VERBEKE, W., VIAENE, J. & DE KRUIF, A. (1999). Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine*. 17(9-10). p. 1024–34.
- MAES, D., SEGALÉS, J., MEYNS, T., SIBILA, M., PIETERS, M. & HAESEBROUCK, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary microbiology*. 126(4). p. 297–309.
- MAES, D., VERDONCK, M., DELUYKER, H. & DE KRUIF, A. (1996). Enzootic pneumonia in pigs. *The Veterinary quarterly*. 18(3). p. 104–109.

- MAKRIDES, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*. 60(3). p. 512–38.
- MARCHIORO, S.B., SIMIONATTO, S., GALLI, V., CONCEIÇÃO, F.R., BRUM, C.B., FISCH, A., GOMES, C.K. & DELLAGOSTIN, O.A. (2012). Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary microbiology*. 155(1). p. 44–52.
- MAROIS, C., LE CARROU, J., KOBISCH, M. & GAUTIER-BOUCHARDON, A. V (2007). Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Veterinary microbiology*. 120(1-2). p. 96–104.
- MAROIS, C., DORY, D., FABLET, C., MADEC, F. & KOBISCH, M. (2010). Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *Journal of applied microbiology*. 108(5). p. 1523–33.
- MAROIS-CRE´HAN, C., FABLET, C., DEVENDEC, L.L., POE´ZE´VARA, T., TOCQUEVILLE, V., GAUTIER-BOUCHARDON, A. V, MADEC, F. & KOBISCH, M. (2012). Molecular typing of 241 *Mycoplasma hyopneumoniae* strains isolated in France by real-time TaqMan PCR assay, pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. No Title. In Toulouse, France.: 19th Congress of the International Organisation of Mycoplasmaology.
- MARSTON, F.A. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*. 240(1). p. 1–12.
- MATEUSEN, B., MAES, D., VAN GOUBERGEN, M., VERDONCK, M. & DE KRUIF, A. (2002). Effectiveness of treatment with lincomycin hydrochloride and/or vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* for controlling chronic respiratory disease in a herd of pigs. *The Veterinary record*. 151(5). p. 135–40.
- MAYOR, D., JORES, J., KORCZAK, B.M. & KUHNERT, P. (2008). Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. *Veterinary microbiology*. 127(1-2). p. 63–72.
- MAYOR, D., ZEEH, F., FREY, J. & KUHNERT, P. (2007). Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Veterinary Research*. 38(3). p. 391–398.
- MEYNS, T., DEWULF, J., DE KRUIF, A., CALUS, D., HAESEBROUCK, F. & MAES, D. (2006). Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine*. 24(49-50). p. 7081–6.
- MEYNS, T., MAES, D., DEWULF, J., VICCA, J., HAESEBROUCK, F. & DE KRUIF, A. (2004). Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. *Preventive veterinary medicine*. 66(1-4). p. 265–75.

- MINION, F.C., ADAMS, C. & HSU, T. (2000). R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infection and immunity*. 68(5). p. 3056–60.
- MINION, F.C., CASSELL, G.H., PNINI, S. & KAHANE, I. (1984). Multiphasic interactions of *Mycoplasma pulmonis* with erythrocytes defined by adherence and hemagglutination. *Infection and immunity*. 44(2). p. 394–400.
- MINION, F.C., LEFKOWITZ, E.J., MADSEN, M.L., CLEARY, B.J., SWARTZELL, S.M. & MAHAIRAS, G.G. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of bacteriology*. 186(21). p. 7123–33.
- MONSALVE, R.I., LU, G. & KING, T.P. (1999). Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein expression and purification*. 16(3). p. 410–6.
- MOORKAMP, L., NATHUES, H., SPERGSER, J., TEGELER, R. & GROSSE, E.B. (2008). Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 175(2). p. 273–5.
- NATHUES, H., GROSSE, E.B., KREIENBROCK, L., ROSENGARTEN, R. & SPERGSER, J. (2011). RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Veterinary microbiology*. 152(3-4). p. 338–45.
- NATHUES, H., SPERGSER, J., ROSENGARTEN, R., KREIENBROCK, L. & GROSSE, E.B. (2012). Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 193(2). p. 443–7.
- OGAWA, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., SANO, A., HIKONO, H., SHIBAHARA, T., YAGI, Y. & SHIMOJI, Y. (2009). Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine*. 27(33). p. 4543–50.
- OKAMBA, F.R., ARELLA, M., MUSIC, N., JIA, J.J., GOTTSCHALK, M. & GAGNON, C.A. (2010). Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *Vaccine*. 28(30). p. 4802–9.
- OKAMBA, F.R., MOREAU, E., CHEIKH SAAD BOUH, K., GAGNON, C.A., MASSIE, B. & ARELLA, M. (2007). Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 14(6). p. 767–74.
- PENG, Z., WANG, A., FENG, Q., WANG, Z., IVANOVA, I. V., HE, X., ZHANG, B. & SONG, W. (2014). High-level expression, purification and characterisation of porcine β -defensin 2 in *Pichia pastoris* and its potential as a cost-efficient growth promoter in porcine feed. *Applied microbiology and biotechnology*.

- PÓSA, R., MAGYAR, T., STOEVI, S.D., GLÁVITS, R., DONKÓ, T., REPA, I. & KOVÁCS, M. (2013). Use of computed tomography and histopathologic review for lung lesions produced by the interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisin mycotoxins in pigs. *Veterinary pathology*. 50(6). p. 971–9.
- DEL POZO SACRISTÁN, R., SIERENS, A., MARCHIORO, S.B., VANGROENWEGHE, F., JOURQUIN, J., LABARQUE, G., HAESBROUCK, F. & MAES, D. (2014). Efficacy of early *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination against mixed respiratory disease in older fattening pigs. *The Veterinary record*.
- RABERT, C., WEINACKER, D., PESSOA, A. & FARIÁS, J.G. (2013). Recombinant proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 44(2). p. 351–6.
- RAPPUOLI, R. (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 19(17-19). p. 2688–91.
- RAZIN, S. & FREUNDT, E.A. (1984). *The mycoplasmas* J. G. Krieg, N.R., Holt (ed.), Baltimore/London: Bergey's manual of systematic bacteriology William & Wilkins.
- RAZIN, S., YOGEV, D. & NAOT, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 62(4). p. 1094–156.
- REYNOLDS, S.C., ST AUBIN, L.B., SABBADINI, L.G., KULA, J., VOGELAAR, J., RUNNELS, P. & PETERS, A.R. (2009). Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at approximately 1 week of age. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 181(3). p. 312–20.
- ROBINSON, M.W., BUCHTMANN, K.A., JENKINS, C., TACCHI, J.L., RAYMOND, B.B.A., TO, J., ROY, P.C., WOOLLEY, L.K., LABBATE, M., TURNBULL, L., WHITCHURCH, C.B., PADULA, M.P. & DJORDJEVIC, S.P. (2013). MHJ_0125 is an M42 glutamyl aminopeptidase that moonlights as a multifunctional adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open biology*. 3(4). p. 130017.
- ROSS, R. (1999). *Mycoplasmal diseases* 8th ed., Iowa State University Press: Ames: Diseases of Swine.
- SHIMOJI, Y., OISHI, E., MUNETA, Y., NOSAKA, H. & MORI, Y. (2003). Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine*. 21(5-6). p. 532–7.
- SIBILA, M., CALSAMIGLIA, M., VIDAL, D., BADIELLA, L., ALDAZ, A. & JENSEN, J.C. (2004). Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*. 68(1). p. 12–8.

- SIBILA, M., NOFRARIAS, M., LÓPEZ-SORIA, S., SEGALÉS, J., VALERO, O., ESPINAL, A. & CALSAMIGLIA, M. (2007). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Veterinary microbiology*. 122(1-2). p. 97–107.
- SIBILA, M., PIETERS, M., MOLITOR, T., MAES, D., HAESBROUCK, F. & SEGALÉS, J. (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 181(3). p. 221–31.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., GALLI, V., BRUM, C.B., KLEIN, C.S., REBELATTO, R., SILVA, E.F., BORSUK, S., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2012). Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 35(2). p. 209–16.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., GALLI, V., HARTWIG, D.D., CARLESSI, R.M., MUNARI, F.M., LAURINO, J.P., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2010). Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 69(2). p. 132–6.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., GALLI, V., LUERCE, T.D., HARTWIG, D.D., MOREIRA, A.N. & DELLAGOSTIN, O.A. (2009). Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing *Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*. 79(1). p. 101–5.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S.B., MAES, D. & DELLAGOSTIN, O.A. (2013). *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Veterinary microbiology*. 165(3-4). p. 234–42.
- SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D. & MORES, N. (1999). Pneumonia enzoótica. In Goiania, Goiás: Clínica e Patologia Suína, p. 359–359.
- SOBESTIANSKY, J., COSTA, O.D. & MORES, N. (1999). Estudos ecopatológicos nas fases de crescimento e terminação: prevalência de rinite atrófica e de pneumonia nas fases de crescimento e terminação na região sul do Brasil. In IX ABRAVES. Belo Horizonte, p. 171– 172.
- SØRENSEN, V., AHRENS, P., BARFOD, K., FEENSTRA, A.A., FELD, N.C., FRIIS, N.F., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, N.E. & PEDERSEN, M.W. (1997). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary microbiology*. 54(1). p. 23–34.
- STAKENBORG, T., VICCA, J., BUTAYE, P., MAES, D., PEETERS, J., DE KRUIF, A. & HAESBROUCK, F. (2005). The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary microbiology*. 109(1-2). p. 29–36.
- STAKENBORG, T., VICCA, J., MAES, D., PEETERS, J., DE KRUIF, A., HAESBROUCK, F. & BUTAYE, P. (2006). Comparison of molecular techniques for the typing of

- Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Journal of microbiological methods*. 66(2). p. 263–75.
- STEMKE, G.W. & ROBERTSON, J.A. (1990). The growth response of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* based upon ATP-dependent luminometry. *Veterinary microbiology*. 24(2). p. 135–42.
- SWARTZ, J.R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current opinion in biotechnology*. 12(2). p. 195–201.
- THACKER, E.L. (1998). Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Journal of Swine Health and Production*. 6(3). p. 107 – 112.
- THACKER, E.L. (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 5(2). p. 317–20.
- THACKER, E.L. (2006). Lung inflammatory responses. *Veterinary research*. 37(3). p. 469–86.
- THACKER, E.L. & MINION, F.C. (2010). *Mycoplasmosis*, Iowa State University Press: Ames: Disease of Swine.
- THACKER, E.L., THACKER, B.J. & JANKE, B.H. (2001). Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *Journal of clinical microbiology*. 39(7). p. 2525–30.
- THACKER, E.L., THACKER, B.J., KUHN, M., HAWKINS, P.A. & WATERS, W.R. (2000). Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *American journal of veterinary research*. 61(11). p. 1384–9.
- THONGKAMKON, P., NARONGSAK, W., KOBAYASHI, H., PATHANASOPHON, P., KISHIMA, M. & YAMAMOTO, K. (2013). In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates and occurrence of fluoroquinolone, macrolides and lincomycin resistance. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 75(8). p. 1067–70.
- VASCONCELOS, A.T.R., FERREIRA, H.B., BIZARRO, C. V, BONATTO, S.L., CARVALHO, M.O., PINTO, P.M., ALMEIDA, D.F., ALMEIDA, L.G.P., ALMEIDA, R., ALVES-FILHO, L., ASSUNÇÃO, E.N., AZEVEDO, V.A.C., BOGO, M.R., BRIGIDO, M.M., BROCCHI, M., BURITY, H.A., CAMARGO, A.A., CAMARGO, S.S., CAREPO, M.S., ET AL. (2005). Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of bacteriology*. 187(16). p. 5568–77.
- VICCA, J., MAES, D., JONKER, L., DE KRUIF, A. & HAESBROUCK, F. (2005). Efficacy of in-feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *The Veterinary record*. 156(19). p. 606–10.

- VICCA, J., STAKENBORG, T., MAES, D., BUTAYE, P., PEETERS, J., DE KRUIF, A. & HAESEBROUCK, F. (2003). Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology*. 97. p. 177–190.
- VICCA, J., STAKENBORG, T., MAES, D., BUTAYE, P., PEETERS, J., DE KRUIF, A. & HAESEBROUCK, F. (2004). In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 48(11). p. 4470–2.
- VILLARREAL, I., MAES, D., VRANCKX, K., CALUS, D., PASMANS, F. & HAESEBROUCK, F. (2011). Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine*. 29(9). p. 1731–5.
- VRANCKX, K., MAES, D., CALUS, D., VILLARREAL, I., PASMANS, F. & HAESEBROUCK, F. (2011). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. *Journal of clinical microbiology*. 49(5). p. 2020–3.
- VRANCKX, K., MAES, D., MARCHIORO, S.B., VILLARREAL, I., CHIERS, K., PASMANS, F. & HAESEBROUCK, F. (2012). Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC veterinary research*. 8. p. 24.
- VRANCKX, K., MAES, D., DEL POZO SACRISTÁN, R., PASMANS, F. & HAESEBROUCK, F. (2012). A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. *Veterinary Microbiology*. 156(3-4). p. 315–321.
- WALKER, R.L., HIRSH, D.C. & ZEE, Y.C. (2003). *Mollicutes*, Rio de Janeiro: Guanabara: Microbiologia veterinária.
- WILTON, J., JENKINS, C., CORDWELL, S.J., FALCONER, L., MINION, F.C., ONEAL, D.C., DJORDJEVIC, M.A., CONNOLLY, A., BARCHIA, I., WALKER, M.J. & DJORDJEVIC, S.P. (2009). Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Molecular microbiology*. 71(3). p. 566–82.
- ZOU, H.-Y., LIU, X.-J., MA, F.-Y., CHEN, P., ZHOU, R. & HE, Q.-G. (2011). Attenuated *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a bacterial vector for expression of *Mycoplasma hyopneumoniae* P36 gene. *The journal of gene medicine*. 13(4). p. 221–9.