

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Identificação e caracterização de
genes e proteínas de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para utilização em
diagnóstico da pneumonia micoplásmica e em tipagem de cepas**

Luiza Amaral de Castro

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores

Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira
Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein

PORTO ALEGRE, 31 DE OUTUBRO DE 2006

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Henrique e Marilene. Ao primeiro por me receber de braços abertos, sem nem mesmo me conhecer, e se tornar tão importante no decorrer deste trabalho; e à Marilene, por desde a graduação ter me guiado até aqui em mãos firmes e carinhosas.

Aos meus colegas do grupo genoma que estão sempre ali para nos ajudar e animar.

Ao Paulo, por ser minha “sombra” predileta, e meu ex-iniciação científica.

Ao Ita pela ajuda e amizade.

Aos colegas que sempre estiveram presentes e hoje seguem os seus caminhos: Valéria, Luciano, Márcia, César, Roberta...

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial ao Sr. Milton e ao Paulo, que tornaram a minha vida mais fácil, sempre prontos a ajudar.

À Eliana e a Larissa por me receberem tão bem quando eu cheguei ao laboratório 204.

À Sílvia e ao Luciano pelo carinho, atenção e disponibilidade.

Ao Sr. Otelo pelas canções matinais.

À professora Irene por todas as sugestões e aconselhamentos.

Ao professor Itabajara pela relatoria desta tese.

A minha comissão de acompanhamento: professores Arnaldo Zaha e Irene Schrank.

Aos membros da banca de avaliação desta tese pelas sugestões e pela discussão: Dr. Antônio José Piantino Ferreira (Faculdade de Veterinária/USP); Dr. Cláudio Wageck Canal (Faculdade de Veterinária/UFRGS) e Profa. Irene Schrank (Centro de Biotecnologia/UFRGS).

Aos órgãos financiadores.

Finalmente, aos amigos e familiares, que muitas vezes abriram mão de estar comigo para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	06
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1. A INSERÇÃO DA SUINOCULTURA NA ECONOMIA	11
1.2. ENFERMIDADES DO TRATO RESPIRATÓRIO DOS SUÍNOS	13
1.3. A PNEUMONIA MICOPLÁSMICA SUÍNA.	16
1.3.1. <i>Epidemiologia (transmissão e fatores de risco).</i>	17
1.3.2. <i>Patogenia.</i>	17
1.3.3. <i>Lesões macro e microscópicas.</i>	19
1.3.4. <i>Diagnóstico.</i>	20
1.3.5. <i>Profilaxia e tratamentos.</i>	21
1.3.6. <i>Vacinação.</i>	22
1.3.7. <i>Aspectos imunológicos.</i>	24
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	26
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	27
3. ESTUDO I – IDENTIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PROVÁVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>M. HYOPNEUMONIAE</i>.	29
4. ESTUDO II – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES <i>M. HYOPNEUMONIAE</i> COM VARIABILIDADE ENTRE CEPAS.....	54
5. ESTUDO III - PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS E ANTI-SOROS E PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE <i>M. HYOPNEUMONIAE</i>.	55
5.1. INTRODUÇÃO.....	55
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	56
5.2.1. <i>Microrganismos e cultivo</i>	56
5.2.2. <i>Plasmídeos.</i>	57
5.2.3. <i>Transformação bacteriana</i>	57
5.2.4. <i>PCR</i>	57
5.2.5. <i>Obtenção de extratos celulares.</i>	58
5.2.6. <i>Expressão, solubilização e purificação das proteínas de fusão com GST.</i>	58
5.2.7. <i>Eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).</i>	60
5.2.8. <i>Quantificação de proteínas.</i>	61
5.2.9. <i>Concentração das amostras.</i>	61
5.2.10. <i>Soros utilizados neste trabalho.</i>	61
5.2.11. <i>Obtenção e caracterização de amostras de soro e tecido de suínos doentes.</i>	63
5.2.12. <i>Imunização de animais e produção de anti-soros.</i>	63
5.2.13. <i>Titulação de anticorpos.</i>	64
5.2.14. <i>Adsorção.</i>	64
5.2.15. <i>ELISA com antígenos recombinantes p36 e NrdF.</i>	65
5.2.16. <i>ELISA extrato total de <i>M. hyopneumoniae</i>.</i>	65
5.2.17. <i>Imuno-histoquímica</i>	66
5.3. RESULTADOS	67
5.3.1. <i>Otimização da expressão das proteínas p36 e NrdF em <i>E. coli</i></i>	67
5.3.2. <i>Purificação das proteínas recombinantes p36 e NrdF</i>	67
5.3.3. <i>Produção de anticorpos policlonais monoespecíficos contra p36 e NrdF.</i>	70
5.3.4. <i>Ensaio de imuno-histoquímica com os soros anti-p36 e anti-NrdF.</i>	71

5.3.5. <i>Caracterização de amostras de tecido e soro de suínos doentes quanto a presença de M. hyopneumoniae</i>	72
6. DISCUSSÃO	75
7. DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (SEÇÕES 1, 2, 6, E 7)	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcento
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
ABIEPCS	Associação Brasileira das Indústrias Produtoras e Exportadoras de Carne Suína
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolilfosfato p-Toluideno
CAPS	3-(Ciclohexalamino)-1-ácido propanosulfônico
CTAB	Hexadeciltrimetilamônio brometo
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i>
g	Grama
g	Força gravitacional
GST	Glutathione S-Transferase
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
Hz	Hertz
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
Km	Quilômetro
L	Litro
M	Molar
MAPA/SIGSIF	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Serviço de Inspeção Federal
MC	Milhões de cabeças
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mt	Milhões de toneladas
NBT	Azul de nitrotetrazólio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OPD	O-fenilenodiamina
p/v	Peso/volume
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio iônico

PIB	Produto Interno Bruto
pmol	Picomol
PMS	Pneumonia Micoplásmica Suína
rDNA	DNA codificando para RNA ribossomal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SECEX	Secretaria de Comércio Exterior
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
TCA	Ácido tri-cloro acético
TMB	3 3'5 5' -Tetrametilbenzidina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
X	Vezes
µg	Micrograma

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Percentual da produção de carne suína no Brasil no ano de 2005, por estados..	12
Figura 2. Exportação de carne suína brasileira no ano de 2005, participação por estados.	12
Figura 3. Aderência do <i>M. hyopneumoniae</i> ao epitélio ciliado do trato respiratório de suíno experimentalmente inoculado.	18
Figura 4. Destruição dos cílios do epitélio ciliado do trato respiratório de suíno experimentalmente inoculado com <i>M. hyopneumoniae</i>	18
Figura 5. Lesão pulmonar característica da PMS nos lóbulos apicais do pulmão de suínos infectados com <i>M. hyopneumoniae</i>	19
Figura 6. Lesões microscópicas causadas por <i>M. hyopneumoniae</i>	20
Figura 7. Análise eletroforética (I) e por imunoblot (II e III) do extrato celular de <i>E. coli</i> expressando as proteínas recombinantes p36 e NrdF de <i>M. hyopneumoniae</i>	68
Figura 8. Solubilização das proteínas de fusão NrdF-GST (A) p36-GST (B).	69
Figura 9. Purificação das proteínas recombinantes p36 (A) e NrdF (B) em coluna de afinidade.....	69
Figura 10. Reatividade do soro anti- p36 contra células de <i>M. hyopneumoniae</i> , no pulmão de suínos doentes.	71
Figura 11. ELISA-ECTMH7448 das amostras de soro de suínos doentes	72

LISTA DE TABELAS.

Tabela 1. Relação dos principais países produtores de carne suína (Mt), seus respectivos rebanhos (no. cabeças), e o peso médio das carcaças produzidas (kg) - 2005.	13
Tabela 2. Relação de soros teste e controle utilizados neste trabalho	62
Tabela 3. Análise por PCR e ELISA-ECTMH7448 das amostras de sangue e tecido coletadas de suínos com sintomas de infecção por <i>M. hyopneumoniae</i>	73

RESUMO

A bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da pneumonia micoplásmica suína (PMS) e tem sido descrita em diversos países como um dos patógenos mais comumente envolvidos em problemas respiratórios dos suínos, causando importantes perdas econômicas. Os métodos de uso corrente para a identificação de *M. hyopneumoniae*, sejam eles baseados em técnicas imunológicas, no cultivo e isolamento do agente etiológico ou em métodos moleculares, apresentam diversas limitações. Além disso, as vacinas para PMS oferecem apenas proteção parcial. A identificação e a caracterização imunológica e funcional de proteínas da bactéria, especialmente aquelas preferencial ou exclusivamente expressas em cepas patogênicas, pode trazer avanços importantes no conhecimento da biologia da bactéria e da interação entre patógeno e hospedeiro. Podem também, trazer melhorias para o imunodiagnóstico da PMS, em termos de aumento da especificidade e da sensibilidade dos testes utilizados, e melhorias no aspecto imunoprotetor das vacinas atualmente disponíveis. Com a disponibilização das seqüências do genoma das cepas 232, J e 7448 de *M. hyopneumoniae* foi possível à realização de uma análise comparativa das seqüências entre a linhagem não-patogênica (J) e os isolados patogênicos (232 e 7448), visando à identificação de genes que codificam proteínas determinantes de patogenicidade e/ou com potencial para utilização em imunodiagnóstico e/ou vacinação. Foram identificadas 118 seqüências codificadores de proteínas (CDSs), entre elas, estão, por exemplo, componentes de membrana com variações evidentes entre as linhagens e prováveis fatores de virulência. Nesta análise, foi também feita a identificação preliminar de 22 repetições nucleotídicas variáveis em tandem (VNTRs) em 12 CDSs correspondentes a lipoproteínas, antígenos, adesinas e outros fatores de virulência das cepas J, 7448 e 232. A análise destas VNTRs no genoma de *M. hyopneumoniae* foi estendida de modo a incluir duas outras cepas de *M. hyopneumoniae* (7422 e PMS). O grau de variabilidade entre cepas, o possível significado biológico destas variações e seu potencial para ser utilizado como base em um ensaio de PCR foram investigados. As VNTRs identificadas codificam para proteínas com variações no número de repetições de aminoácidos (VNTARs) que podem determinar variações estruturais, físico-químicas e antigênicas nas proteínas correspondentes, previstas *in silico*. Um PCR baseado nestas VNTRs foi proposto para identificação de cepas de *M. hyopneumoniae* a campo. Além disso, como parte de uma estratégia para a produção de reagentes imunodiagnósticos da PMS, clones das CDS p36 e NrdF de *M. hyopneumoniae* foram expressos e suas proteínas recombinantes purificadas. Dentre os dois soros policlonais monoespecíficos produzidos em coelhos, o soro anti-p36 apresentou uma menor reação inespecífica em ensaios de imuno-histoquímica do que o soro controle utilizado.

As proteínas recombinantes purificadas, os anti-soros produzidos, juntamente com novos antígenos, dentre os possíveis identificados neste trabalho, além do VNTR-PCR proposto, poderão ser de valia para o monitoramento sanitário de rebanhos suínos quanto à presença assintomática de *M. hyopneumoniae* e a identificação mais precisa deste patógeno.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiologic agent of mycoplasmal pneumonia of swines (MPS) and it is one of the most commonly found pathogens in respiratory tract of swines worldwide, causing important economic losses. The diagnostic methods currently available for *M. hyopneumoniae* identification are based on immunological techniques, culture and isolation of the etiologic agent or molecular methods, all of them presenting peculiar limitations. Regarding control methods, the vaccines currently available for MPS offer only partial protection. The identification and the immunological and functional characterization of mycoplasmal proteins, especially those preferentially expressed in pathogenic strains, can help in the understanding of this bacterium's biology as well as its host-pathogen interaction. Another important outcome of such studies would be increasing the specificity and sensitivity of the immunodiagnostic tests for MPS and improvements in the immune protection of currently available vaccines. The availability of the complete genome sequences of *M. hyopneumoniae* strains 232, J and 7448 became feasible a comparative analysis between the non-pathogenic strain (J) and the pathogenic ones (232 and 7448), focusing at the identification of gene products related to pathogenicity and/or presenting a potential for use in immunodiagnostic and/or vaccination. In this work we report the identification of 118 CDSs encoding putative virulence factors, which were based on specific criteria including predicted cell surface location, variations between strains, previous functional studies showing antigenicity or possible involvement in host-pathogen interaction. Using this analysis it was possible to identify 22 variable number of tandem nucleotides repeats (VNTRs) in 12 CDSs corresponding to lipoproteins, antigens, adhesins and other virulence factors of strains J, 7448 and 232. The analysis of these VNTRs from *M. hyopneumoniae* genome was further extended, including two others *M. hyopneumoniae* strains (7422 and PMS). The degree of variability between strains, the possible biological meaning of these variations and their potential to be used as VNTR-based PCR had been investigated. The identified VNTRs codes for proteins with variations in the number of amino acid repeats (VNTARs) that determine structural, physicochemical and antigenic variations in the corresponding proteins, as predicted *in silico*. As part of a strategy for the production of immunodiagnostic reagents for MPS, recombinant clones of p36 and NrdF CDSs were expressed, the correspondent proteins purified and polyclonal sera were produced in rabbits. The anti-p36 protein sera presented a low background in an immunohistochemistry assay when compared to the control sera. In conclusion, taken together the recombinant proteins and anti-sera that were produced, the new putative antigens that were identified and the development of a VNTR-PCR, could be of value for the sanitary monitoring of swine herds, specially for the identification of asymptomatic carriers of *M. hyopneumoniae* and in the establishment of more efficient, specific and sensitive MPS diagnostic methods.

1. Introdução e revisão da literatura.

1.1. A inserção da suinocultura na economia.

A produção, e o comércio de carne suína são uma importante atividade econômica mundial. Segundo dados preliminares publicados pelo USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2006), só no ano de 2005, a produção mundial de carne suína cresceu 3,2% em relação ao ano anterior. Um estudo da FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação) aponta que até 2010 cerca de 60% da produção de carne suína será realizada em países em desenvolvimento, entre eles o Brasil. Isso porque esses países têm maior disponibilidade de terras e grãos, melhor custo de produção e possibilidade de gestão ambiental (FAO, 2003).

Entre os 84,8 milhões de toneladas de carne suína produzidos em 2005, a China (53%) e a União Européia (23%) destacam-se como os maiores produtores. O Brasil aparece em terceiro lugar (3%). A metade da importação mundial de carne suína em 2005 foi concentrada no Japão (32%) e na Rússia (16%). A exportação mundial cresceu à taxa de 7,2%, sendo que o Brasil é responsável por 15,17% de toda carne suína exportada (USDA, 2006). O Brasil conta com 131 indústrias frigoríficas, responsáveis pelo abate de 28,9 milhões de suínos no ano de 2005, dos quais 22,6 milhões foram realizados sob inspeção federal (MAPA/SIGSIF, 2006). Da produção brasileira, 82% são destinados ao mercado interno, principalmente sob a forma de produtos industrializados; registrando-se, no ano de 2005, um consumo per capita de 12,3 quilos de carne. Ainda em 2005, a exportação brasileira de carne suína alcançou o maior volume já embarcado na história comercial do produto, 625 mil toneladas, rendendo mais de 1 milhão de dólares (SECEX, 2006). Os maiores importadores da carne suína brasileira são a Rússia (56%), Hong Kong (11%), Argentina (4,4%), África do Sul (3,4%) e Ucrânia (4,6%) (ABIPECS, 2006).

A cadeia produtiva da suinocultura brasileira representa 1% do PIB nacional (Antunes, 2001) e é responsável pela renda de 2,7 milhões de pessoas, das quais 733 mil dependem diretamente da atividade (Evolução da suinocultura, 2001). Presente em quase metade das propriedades rurais do país, a suinocultura contribui para a viabilização de pequenos e médios produtores agrícolas, tradicionalmente utilizando mão-de-obra familiar; o que gera empregos e fixa o trabalhador ao campo (Gomes, 1992). Os estados da Região Sul lideram o volume de produção, cuja atividade é desenvolvida, na maioria, por pequenas propriedades que participam de sistemas integrados coordenados por agroindústrias ou cooperativas (Bohrer, 1993). No Rio Grande do Sul, os suínos estão

presentes em 76% dos estabelecimentos rurais, dos quais 16% comercializam os animais; estando a maior parte do rebanho concentrada em propriedades com até 50 hectares (Viola & Bartels, 1993).

As Figuras 1 e 2 apresentam a participação dos Estados brasileiros na produção de suínos e na exportação da carne suína brasileira, com destaque para a Região Sul. Como podemos observar, a Região Sul detém 62% do rebanho suíno brasileiro e responde por 83% de toda carne suína exportada pelo Brasil. Em 2005, só o Estado do Rio Grande do Sul apresentou um incremento de mais de 34% de carne suína exportada em relação ao ano anterior (SECEX, 2006).

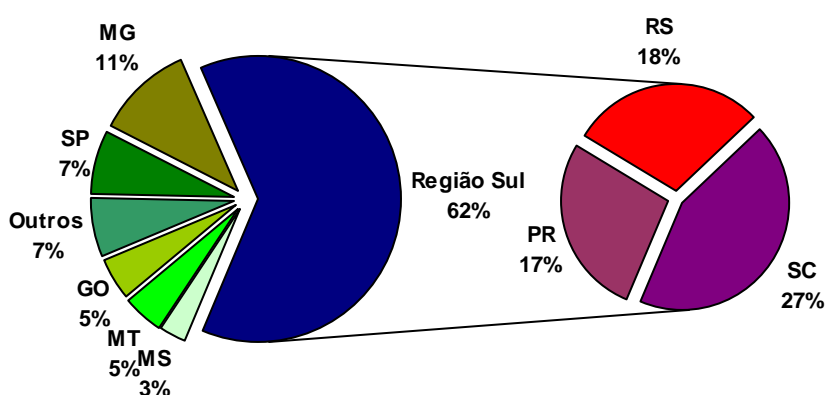


Figura 1. Percentual da produção de carne suína no Brasil no ano de 2005, por estado. (Fonte: ABIPECS, 2006).

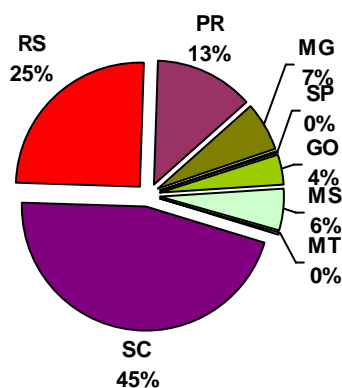


Figura 2. Exportação de carne suína brasileira no ano de 2005, participação por estado. (FONTE: ABIPECS, 2006).

Apesar dos números favoráveis à suinocultura brasileira e do Brasil ser evidenciado pela FAO como um dos 4 países que no futuro deterá a produção animal mundial, o Brasil precisa abrir novos mercados, uma vez que a Rússia, seu principal comprador externo,

pretende tornar-se auto-suficiente na produção de carne suína (Hovenier, 2006). Um dos principais entraves para o crescimento brasileiro é que a produção de carne suína total em relação ao número de cabeças abatidas, ainda está abaixo da que é encontrada em outros países, conforme mostra a Tabela 1. A taxa de desfrute, correspondente à proporção de animais abatidos no rebanho, que em 1975 era de 37%, evoluiu para 61% em 1998 (Martins, 1999), valor este considerado baixo se comparado com os índices dos principais países produtores. Contudo, os números destes países equiparam-se aos registrados pelos estados da Região Sul, especialmente Santa Catarina (Gomes, 1992).

Esta diferença, entre o tamanho dos rebanhos e a quantidade de carne produzida, pode ser devida a um baixo peso dos animais e/ou a condenação de grande parte das carcaças por questões sanitárias, estando ambos os fatores associados à existência de diversas doenças entre os rebanhos suínos.

Tabela 1. Relação dos principais países produtores de carne suína (Mt), seus respectivos rebanhos (no. cabeças), e o peso médio das carcaças produzidas (kg) - 2005.

Países	Animais abatidos/ animais produzidos (MC)	Posição no ranking mundial	Peso médio das carcaças (kg/animal)	Posição no ranking mundial	Produção de carne suína (Mt)	Posição no ranking mundial
China	651,65	1	76,9	42	50,09	1
USA	104	2	90,04	11	9,40	2
Alemanha	47	3	95,9	4	4,51	3
Espanha	39,59	4	83,6	23	3,31	4
BRASIL	38,4	5	81	32	3,11	5
Vietnã	33	6	63,3	75	2,1	7
França	24,88	7	90,7	9	2,25	6
Canadá	23,15	8	84,7	18	1,96	8
Rússia	19,8	11	81,3	29	1,61	11
Japão	16,3	13	76,7	44	1,25	14

Fonte: FAO- Food and Agricultural Organization (2006). Mt - Milhões de toneladas; MC – milhões de cabeças; kg/animal – quilogramas por animal.

1.2. Enfermidades do trato respiratório dos suínos

Embora detentor de números expressivos de rebanho e produção, a indústria suinícola brasileira apresenta fatores que contribuem para torná-la pouco competitiva.

Gomes (1992) destaca a necessidade de mudanças nas políticas de preços, produto e produtividade.

No aspecto sanitário, as enfermidades respiratórias podem ser consideradas um dos principais obstáculos à produção de suínos em todos os países produtores, nos quais se apresentam endêmicas há várias décadas. Devido ao seu caráter enzoótico e as dificuldades práticas encontradas na profilaxia e combate, estas doenças tornam-se relevantes no contexto econômico da suinocultura (Madec, 2001), sendo objeto de diversos estudos que buscam melhorar o quadro observado a campo.

O trato respiratório dos suínos pode ser colonizado por diversos patógenos, entre agentes bacterianos e virais. As lesões decorrentes apresentam-se de diferentes formas, atingindo tanto o trato respiratório superior quanto inferior (Madec, 2001). As doenças bacterianas que são associadas ao surgimento de sinais clínicos e lesões respiratórias não são numerosas, destacando-se a pleuropneumonia (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), a pneumonia micoplásmica (*Mycoplasma hyopneumoniae*) e a rinite atrófica (*Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida*) devido à frequência e intensidade com que atingem os rebanhos (Piffer *et alii*, 1985; Desrosiers, 1998; Plomgaard, 1999). Estas são de caráter enzoótico e estão amplamente distribuídas no Brasil, embora existam rebanhos livres (Sobestiansky *et alii*, 2001). Os agentes bacterianos podem ser classificados da seguinte forma: primários, aqueles que infectam o pulmão pela via respiratória e causam a enfermidade se inoculados intra-traquealmente, como é o caso do *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *B. bronchiseptica*; e agentes secundários, aqueles que não produzem a doença quando inoculados intra-traquealmente, requerendo alteração nos mecanismos de defesa do sistema respiratório para proliferar e causar a doença, como é o caso *P. multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinomyces pyogenes*; e ainda, aqueles agentes que alcançam o pulmão via hematogêna como consequência de septicemias como a *Salmonella choleraesuis*, *Actinobacillus suis* e *A. pyogenes*. As infecções múltiplas são comuns e causam o agravamento do quadro clínico. Fonseca *et alii* (1999) estudando pulmões provenientes de granjas comerciais do Rio Grande do Sul encontraram simultaneamente *M. hyopneumoniae* com *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae* e *Streptococcus sp.*, bem como *H. parasuis* com *A. pleuropneumoniae* e *P. multocida*. Alguns agentes virais que replicam no epitélio ciliado do trato respiratório dos suínos também são responsáveis por enfermidades relevantes, todavia até o momento não há registro da presença da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS) e

coronavírus respiratório suíno no rebanho brasileiro, ocorrendo apenas a doença de Aujeszky de forma esporádica (Kich & Pontes, 2001).

A maioria das espécies bacterianas que causa pneumonia em suínos é habitante normal da nasofaringe e tonsilas, sendo que quase todos os animais são portadores de diversos patógenos potenciais do pulmão. De modo geral, as pneumonias bacterianas desenvolvem-se quando o sistema imunológico dos pulmões está prejudicado (Stevenson, 1998). Segundo Stevenson (1998), todas as granjas de suínos possuem leitões portadores de algum patógeno potencial para o sistema respiratório, sendo que a industrialização do sistema de produção de suínos favorece o surgimento destas, devido ao aumento do contato entre os animais.

Os prejuízos econômicos decorrentes de enfermidades respiratórias advêm não somente da mortalidade causada ao longo das etapas de produção, mas também pela diminuição da taxa de crescimento e conversão alimentar, gastos com medicação e perdas ao abate, onde se consideram a condenação de carcaças ou o aproveitamento condicional destas (Kich & Pontes, 2001). As perdas são evidentes, principalmente no período de crescimento e terminação, quando os animais são expostos à infecção após a perda da imunidade passiva (Plomgaard, 1999). Portanto, as estratégias a serem adotadas durante a ocorrência destas doenças devem considerar a severidade das mesmas e estimar os prejuízos decorrentes. As medidas curativas adotadas nunca devem ultrapassar as perdas estimadas (Piffer *et alii*, 1985).

Os efeitos das enfermidades respiratórias sobre os suínos costumam ser medidos pela avaliação das lesões ao abate (Noyes *et alii*, 1990), devendo-se considerar que alguns animais podem apresentar recuperação sem vestígios de seqüelas, porém demonstrando prejuízo sobre o ganho médio diário de peso (Piffer & Britto, 1993). Ao abate, pulmões, pleura e cornetos nasais são examinados quanto à presença de lesões, determinando a ocorrência, prevalência e eficiência dos métodos de controle, bem como a presença de formas clínicas das enfermidades (Kich & Pontes, 2001).

Sobestianky *et alii* (2001) observaram a prevalência de pneumonias em granjas comerciais da Região Sul do Brasil durante o período de 1995 a 1997; identificando pneumonia em 55% dos animais. No mesmo estudo, pneumonia foi identificada em 100% dos estabelecimentos pesquisados. Levantamento semelhante foi feito por Silva *et alii* (2001) entre os anos de 1999 e 2000, abrangendo os principais estados brasileiros produtores de suínos. Os resultados apontam lesões de pneumonia em 78,1% dos animais, concluindo-se que há um aumento na prevalência desta enfermidade. Levando-se em conta

que o abate de suínos vem aumentando ao longo dos anos, ultrapassando a casa dos 20 milhões de cabeças abatidas, é importante considerarmos que mesmo baixos valores percentuais de condenação por problemas respiratórios, implicam em um alto impacto econômico sobre a produção. Estes autores ainda ressaltam a freqüente ocorrência de enfermidades respiratórias, sugerindo que as medidas profiláticas adotadas, apesar de amplamente pesquisadas e difundidas, não estão atingindo seu objetivo. Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de contemplar esta situação, principalmente no que diz ao desenvolvimento de novas ferramentas para diagnóstico e medidas de prevenção. Contudo, apesar da difusão dos programas de sanidade entre os produtores, a prevalência de doenças respiratórias enzoóticas continua elevada. Em muitos rebanhos, as altas taxas de mortalidade e a manifestação dos sinais clínicos poderiam ser evitadas com o uso de medicação e medidas adequadas de manejo, porém o quadro permanece inalterado (Madec, 2001). Portanto, são necessários esforços não só curativos, mas principalmente preventivos, o que nem sempre vêm sendo observado.

1.3. A pneumonia micoplásmica suína

M. hyopneumoniae é o agente etiológico da já mencionada PMS, doença crônica infecciosa, extremamente contagiosa, encontrada nos rebanhos suínos em todo o mundo e caracterizada por uma alta taxa de morbidade, associada a uma baixa taxa de mortalidade (Goodwin *et alii*, 1965). A presença de tosse seca é o principal sintoma clínico, ocorrendo também retardamento no crescimento dos animais e diminuição da taxa de conversão alimentar, o que resulta em menor ganho de peso (Maes *et alii*, 1996). Tais fatores acarretam consideráveis perdas econômicas. Além disso, este agente predispõe os animais a infecções pulmonares secundárias (Thacker *et alii*, 1999), aumentando, assim, a mortalidade no rebanho e os problemas financeiros associados a tais perdas.

Mesmo em granjas com baixos níveis de contaminação por *M. hyopneumoniae* pode ocorrer um aumento significativo no custo de produção, em razão da piora da conversão alimentar, menor ganho de peso, falta de uniformidade do lote e necessidade de utilização de antibióticos. *M. hyopneumoniae* pode atrasar a saída dos animais para o abate em 6 a 25 dias, acarretando custos adicionais, somados as perdas com a piora da conversão alimentar (Straw *et alii*, 1989). A maioria dos dados sobre perdas econômicas está baseada em avaliações de pulmões no abate.

Segundo Piffer & Britto (1993), há uma perda média de 37,4 g de ganho médio diário de peso para cada 10% de pulmão suíno afetado por *M. hyopneumoniae*. Ainda para

estes autores, a presença de pleurisia e hepatização pulmonar superior a 10% do parênquima são suficientes para o decréscimo do desenvolvimento de suínos, estimando que a associação entre estas lesões possa levar à redução de 14,7% sobre o desenvolvimento dos animais.

1.3.1. Epidemiologia (transmissão e fatores de risco)

Segundo Piffer *et alii* (1985), a PMS é uma enfermidade de origem multifatorial, cujas manifestações resultam tanto da presença do agente etiológico quanto de fatores ambientais. Além do confinamento dos animais, a prevalência é também associada à introdução de animais oriundos de outras granjas; mistura freqüente de lotes de animais, principalmente quando há exposição a grupos de suínos mais velhos (Stevenson, 1998).

Considerando que o agente é transmitido primariamente através de exsudatos respiratórios (Desrosiers, 2001), o sistema convencional de suinocultura, tipicamente intensivo, está associado ao surgimento da enfermidade. Fatores estressantes aos suínos, como transporte, mudanças bruscas de temperatura, alta umidade do ar e ventilação insuficiente contribuem para sua disseminação, predispondo à doença (Nicolet, 1992; Dalla Costa *et alii*, 2000; Sobestiansky *et alii*, 2001).

A principal forma de dispersão de *M. hyopneumoniae* é pelo ar, ocorrendo a transmissão por contato direto entre os animais, o que também é possível através de aerossol a curtas distâncias, existindo, porém, relatos de transmissão da PMS entre granjas com até 3,2 Km de distância (Goodwin, 1985). O agente sobrevive por pouco tempo no ambiente, podendo permanecer viável por alguns dias se estiver protegido por muco ou outro tipo de material orgânico, sugerindo a transmissão através de fômites, veículos e possivelmente moscas; os quais, no entanto, têm importância secundária. Os suínos portadores constituem o meio mais freqüente de disseminação do agente ao serem introduzidos em rebanhos sem exposição prévia à enfermidade (Ross, 1999). O desenvolvimento da doença clínica depende de vários fatores, desde a virulência do agente, o número de organismos presentes no ambiente, a suscetibilidade imunológica dos animais, incluindo as condições do confinamento (Desrosiers, 2001).

1.3.2. Patogenia.

A infecção ocorre por via respiratória e o período de incubação pode variar de um dia a 10 meses, com média de cinco semanas (Sobestiansky, 1999). A patogênese da doença provocada por *M. hyopneumoniae* depende da aderência desses microrganismos ao

epitélio ciliado do pulmão do hospedeiro (Wannemuehler & Galvin, 1994). *M. hyopneumoniae* infecta as células epiteliais da traquéia, brônquios e bronquíolos, aderindo-se aos cílios (Figura 3) e promovendo a ciliostase e a destruição destes cílios (Figura 4).

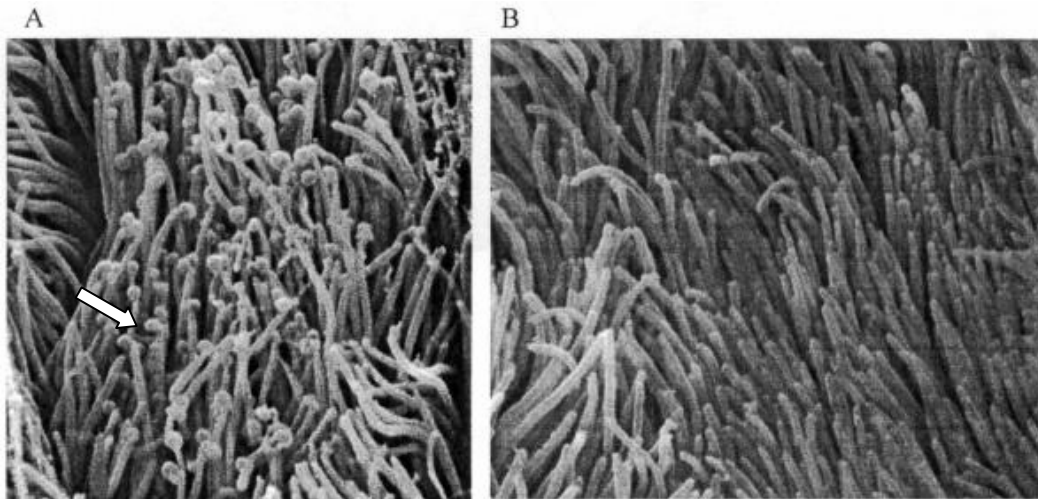


Figura 3. Aderência de *M. hyopneumoniae* ao epitélio ciliado do trato respiratório de suíno experimentalmente inoculado. A) Suíno colonizado após 35 dias de inoculação; B) suíno não inoculado. Seta: célula de *M. hyopneumoniae* aderida ao cílio. Aumento 10.000 X (Fonte: Ruiz *et alii*, 2002).

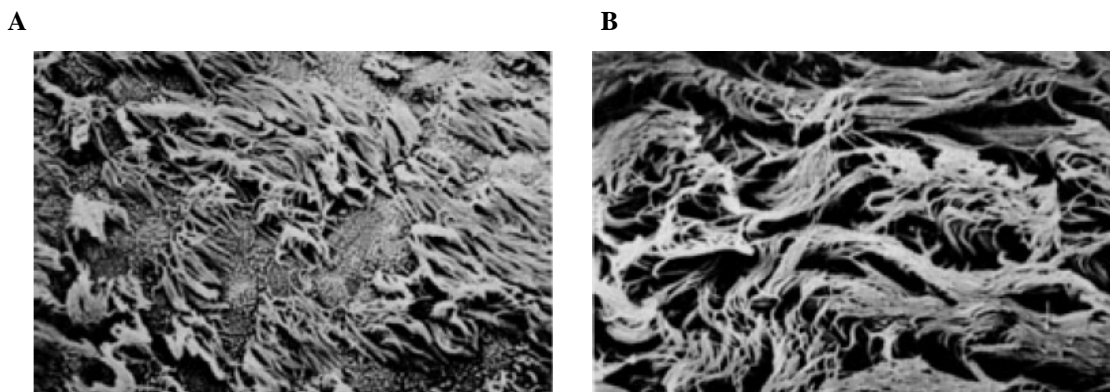


Figura 4. Destruição dos cílios do epitélio ciliado do trato respiratório de suíno experimentalmente inoculado com *M. hyopneumoniae*. A) Suíno afetado; B) suíno não-afetado. Aumento 2.900 X (Fonte: Irigoyen *et alii*, 1998).

A íntima associação entre os micoplasmas e as células do epitélio ciliado faz com que estes patógenos consigam resistir ao movimento muco-ciliar e à fagocitose, contribuindo, assim, para a sua persistência no trato respiratório (Howard & Taylor, 1985). A localização física deste organismo nas paredes superficiais dos cílios e do epitélio o

auxilia a escapar ao sistema imune do hospedeiro e interfere com a eficácia do tratamento antimicrobiano por dificultar sua liberação no sítio de infecção (Schwartz, 2001). Além disso, já há algum tempo foi demonstrado que diversas espécies de *Mycoplasma* possuem atividade citotóxica, podendo causar danos à célula hospedeira (Pijoan, 1974; Geary & Walczak, 1985).

Além das diversas proteínas imunodominantes já caracterizadas para *M. hyopneumoniae*, outras proteínas presentes na membrana e relacionadas à adesão também podem ter um papel relevante. A adesão do micoplasma à superfície das células hospedeiras pode interferir com receptores de membrana ou alterar mecanismos de transporte da célula do hospedeiro (Rottem, 2003). Já está bem definido que a disfunção dos canais de K⁺ do epitélio ciliado por *M. hyopneumoniae* resulta na ciliostase (Debey & Ross, 1994). Embora toxinas não tenham sido associadas com micoplasmas, a produção de metabólitos citotóxicos e a atividade de enzimas citolíticas são conhecidas (Salman & Rottem, 1995).

1.3.3. Lesões macro e microscópicas.

As alterações macroscópicas da PMS são constituídas por áreas de consolidação pulmonar de cor púrpura a cinza, localizadas, principalmente, nos lobos apicais e cardíacos do pulmão (Figura 5). Tais lesões também são chamadas de áreas de hepatização pulmonar, pela semelhança com o aspecto de fígado que adquirem. As áreas pneumônicas são bem delimitadas do tecido pulmonar normal e possuem característica carnosa. Geralmente, há catarro muco-purulento no lúmen dos brônquios e bronquíolos e os linfonodos bronquiais e mediastínicos estão aumentados de volume (Thacker, 2006).

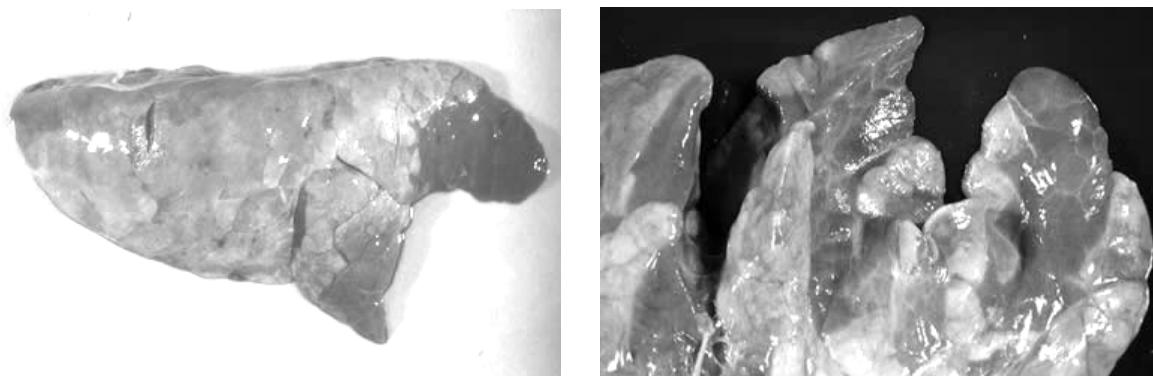


Figura 5. Lesão pulmonar característica da PMS nos lóbulos apicais do pulmão de suínos infectados com *M. hyopneumoniae*. Aumento 1 X e 100 X (Fonte: www.merckvetmanual.com).

Microscopicamente, observa-se a hiperplasia linfo-reticular progressiva ao redor das vias aéreas e dos vasos sanguíneos, exsudação intra-alveolar de macrófagos pulmonares, neutrófilos e edema intra-alveolar (Figura 6).

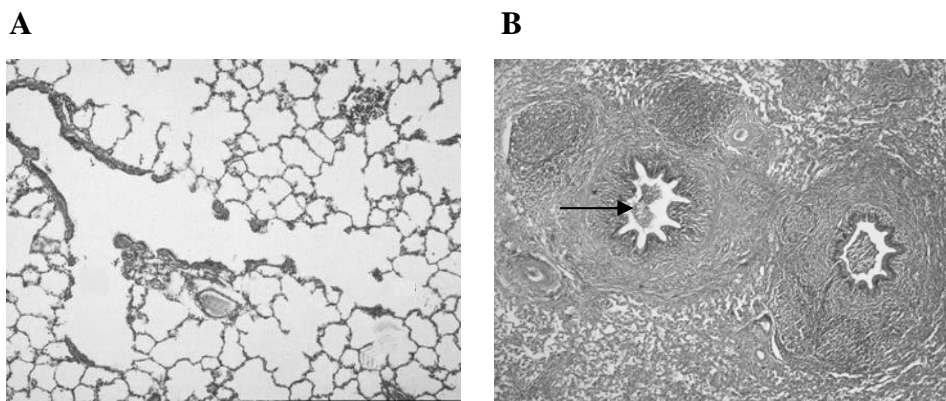


Figura 6. Lesões microscópicas causadas por *M. hyopneumoniae*. A) Pulmão não afetado. B) Pulmão de suíno doente apresentando hiperplasia linfo-reticular ao redor dos brônquios e vasos sanguíneos e infiltração de macrófagos e neutrófilos dentro do lúmen de um brônquio (seta). Lâminas coradas com hematoxilina. Aumento 200 X (A), 100 X (B).

1.3.4. Diagnóstico.

Apesar de o isolamento de *M. hyopneumoniae* ser o “padrão ouro” de diagnóstico, este microrganismo é muito difícil de ser isolado e identificado, pois necessita de meios especiais e pode levar de 4 a 8 semanas para se multiplicar. Além disso, obter culturas puras de *M. hyopneumoniae* pode ser difícil por causa da presença de mycoplasmas comensais com crescimento rápido, tais como *M. hyorhinis* e *M. flocculare*, tornando o diagnóstico via cultivo, as vezes, não exequível (Thacker, 2004). Tentativas para diagnosticar a infecção por *M. hyopneumoniae* em rebanhos utilizando apenas dados coletados em abatedouro têm sido propostas (Noyes *et alii*, 1990), no entanto, em muitos casos, as lesões por micoplasma resultantes de infecção precoce estão consolidadas e não são óbvias ao abate. Portanto, o impacto da infecção por *M. hyopneumoniae* pode ser subestimado se recair apenas sobre análises de abatedouro (Sitjar *et alii*, 1996).

Os testes sorológicos são os mais comumente utilizados para diagnosticar a PMS e incluem a hemaglutinação indireta (IHA), fixação de complemento (CF) e ELISA (Bereiter *et alii*, 1990; Wallgren *et alii*, 1996; Thacker, 2004). *M. hyopneumoniae* também

pode ser detectado por imunofluorescência (Amanfu *et alii*, 1984) e imuno-histoquímica (Doster & Lin, 1988). Existem diversos testes comerciais para o diagnóstico da PMS baseados em ELISA, no entanto, embora estes testes sejam altamente específicos, são pouco sensíveis (Sørensen *et alii*, 1997; Thacker, 2004). No Brasil, o diagnóstico de *M. hyopneumoniae* é, usualmente, feito pelo teste de ELISA padronizado no CNPSA, utilizando antígenos extraídos da superfície do micoplasma com Tween-20 (ELISA-T) (Feld *et alii*, 1992; Piffer *et alii*, 1998) e por imuno-histoquímica (Morés, comunicação pessoal). Assim como a maioria dos métodos imunológicos, o ELISA-T, em relação aos outros testes, não discrimina a presença de *M. hyopneumoniae* daquela de *M. flocculare* (Armstrong *et alii*, 1987; Thacker, 2004). Nos testes de imuno-histoquímica, também podem ocorrer reações cruzadas, dependendo da qualidade da preparação dos antígenos utilizados, além de estes apresentarem a limitação de somente poder ser aplicado *post-mortem*.

Além dos métodos imunológicos, a hibridização *in situ* (Kwon & Chae, 1999) e PCR (Mattson *et alii*, 1995) também são utilizados no diagnóstico da PMS. A técnica de PCR apresenta diversas vantagens sobre os métodos correntes para a detecção e o diagnóstico de *M. hyopneumoniae* devido a sua sensibilidade, especificidade e rapidez (Thacker, 2004). Entretanto, a aplicação da técnica de PCR na detecção de *M. hyopneumoniae* nas amostras coletadas de cavidades nasais foi limitada a um curto período de tempo após a infecção do animal (Blanchard *et alii*, 1996; Piffer *et alii*, 1998), e foi demonstrado que a habilidade do PCR para detectar vários isolados de campo é limitada, o que pode ser atribuído a variabilidade genética entre os isolados (Strait *et alii*, 2004). A utilização de Nested-PCR tem possibilitado detectar *M. hyopneumoniae* em baixos níveis de contaminação (Calsamiglia *et alii*, 1999).

1.3.5. Profilaxia e tratamentos

Vários antibióticos têm sido avaliados quanto à sua efetividade no tratamento e/ou controle da infecção por micoplasma (Burch, 2004). Embora tratamentos com antibióticos possam reduzir a severidade da doença, a infecção muitas vezes não é eliminada. Como espécies de micoplasma não possuem parede celular, elas são resistentes à penicilina e outros antibióticos que interferem com a polimerização de precursores da parede celular (Razin *et alii*, 1998). No entanto, micoplasmas são suscetíveis a antibióticos que atuam na síntese protéica, tais como o cloranfenicol e as tetraciclinas, e macrolídeos (Burch, 2004). Tem sido demonstrado, por exemplo, que as tetraciclinas possuem um impacto variável nas

infecções micoplásmicas (Inamoto *et alii*, 1994; Wu *et alii*, 1997). Embora as tetraciclina não previnam a infecção e lesões tendam a se desenvolver após cessar a terapia (Switzer & Ross, 1975), um estudo indicou que a administração repetida de oxitetraciclina durante as fases de lactação e início da creche pode reduzir a pneumonia induzida por *M. hyopneumoniae* em suínos mais velhos (Scheidt *et alii*, 1990). Muitos antimicrobianos como as pleuromutilinas, os macrolídeos e as fluoroquinolonas, têm sua concentração mínima inibitória relativamente baixa e presumivelmente, menor desenvolvimento de resistência (Burch, 2004). No entanto, a resistência de isolados de campo aos macrolídeos, lincosamidas e fluoroquinolonas já foi relatada (Vicca *et alii*, 2004).

Além do uso de antimicrobianos, tem sido tentado um controle maior da doença através da eliminação de animais infectados e através da imunização dos rebanhos.

1.3.6. Vacinação

A maior vantagem da vacinação contra *M. hyopneumoniae* inclui o aumento do ganho de peso diário (2–8%) e da conversão alimentar (2–5%), a diminuição do tempo para alcançar o peso de abate, a redução dos sinais clínicos e das lesões pulmonares e, ocasionalmente, uma mortalidade menor e uma melhora da qualidade das carcaças (Maes *et alii*, 1998; Maes *et alii*, 1999; Jensen *et alii*, 2002). Para obtenção de resultados aceitáveis, a vacinação deve ser praticada em combinação com outros fatores de manejo, de forma a reduzir a multifatorialidade da doença (Desroisiers, 2001).

Diferentes esquemas de vacinação têm sido adotados, dependendo do tipo de rebanho, sistema de produção e padrão de infecção nas fazendas. A vacinação dupla dos porcos nas unidades de gestação ou creche é freqüentemente praticada, especialmente quando infecções por *M. hyopneumoniae* ocorrem nos estágios iniciais de produção (Haesenbrouck *et alii*, 2004). Existem estudos de vacinação utilizando uma única dose (Dawson *et alii*, 2002) e alguns protocolos já estão inclusive patenteados (ex. United States Patent 6846477).

Segundo alguns estudos, é importante determinar os níveis de anticorpos maternos presentes antes da vacinação, pois estes parecem ser protetores para os leitões jovens, mas, ao mesmo tempo, parecem inibir a formação de uma resposta imune ativa (Thacker *et alii*, 1998; Hodgins *et alii*, 2004). Porém, segundo Martelli *et alii* (2006), a vacinação dos leitões pode ser feita já na primeira semana de vida, independente do nível de imunidade das porcas. É também importante compreender que os anticorpos séricos produzidos pela vacinação contra *M. hyopneumoniae* aumentam de título lentamente. Os títulos séricos

podem não ser mensuráveis por pelo menos duas semanas após a segunda vacinação. Suínos não desafiados podem tornar-se soros-negativos em 4-6 semanas (Thacker *et alii*, 1998). Entretanto, não existe correlação entre o nível de anticorpos séricos e a proteção. Os suínos vacinados que são subseqüentemente desafiados desenvolvem uma forte resposta imune, resultando títulos significativamente maiores do que a vacinação sozinha (Thacker & Thacker, 2000).

A vacinação com bacterinas comerciais tem sido uma importante ferramenta para controle da infecção por *M. hyopneumoniae*. Tais vacinas, consistindo de preparações de células inteiras com adjuvante, induzem proteção parcial contra a pneumonia micoplásmica suína e reduzem a severidade das lesões pulmonares, mas não previnem a colonização bacteriana (Wannemuehler & Galvin, 1994; Haesenbrouck *et alii*, 2004), embora existam estudos que relatem que as vacinas comerciais podem diminuir o número de micoplasmas no trato respiratório (Thacker *et alii*, 2004) e diminuir o nível de infecção de um rebanho (Haesenbrouck *et alii*, 2004). Thacker *et alii* (2000) demonstraram que a vacinação contra *M. hyopneumoniae* estimula a produção de anticorpos IgG e IgA *M. hyopneumoniae*-específicos, e diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias, particularmente o fator de necrose tumoral (TNF), após o desafio; portanto, mesmo considerando que a vacinação não previne a colonização ou infecção, esta parece minimizar os efeitos inflamatórios após à infecção.

Etheridge & Lloyd (1982) reportaram a obtenção de proteção parcial contra a doença induzida por *M. hyopneumoniae* utilizando o organismo vivo atenuado. A proteção parcial contra infecções experimentais de *M. hyopneumoniae* também foi verificada quando suínos foram vacinados via intramuscular ou por instilação endotraqueal, utilizando o microrganismo atenuado (Goodwin & Whittlestone, 1973; Ross *et alii*, 1984). Ross *et alii* (1993) reportaram que, embora a vacina utilizando o microrganismo atenuado tivesse um efeito protetor, em alguns casos havia o aumento da lesão induzida pelo patógeno.

Alguns estudos de vacinas experimentais para a PMS, tais como uma vacina baseada no sobrenadante de cultura de *M. hyopneumoniae* (Okada *et alii*, 2000) e uma vacina composta por *Salmonella typhimurium* atenuada (*aroA*), expressando um fragmento da NrdF (cadeia beta da ribonucleosídeo-difosfato redutase) de *M. hyopneumoniae* (Fagan *et alii*, 2001) demonstraram uma redução significativa das lesões pulmonares de suínos vacinados/desafiados, porém não impediram o estabelecimento da infecção. Uma outra vacina composta por uma cepa atenuada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* (YS-19),

expressando a região C terminal da adesina P97 de *M. hyopneumoniae* não foi capaz de conferir proteção (Shimoji *et alii*, 2003). Existem ainda estudos de vacinas de DNA para PMS, mas estas só foram testadas em camundongos (Chen *et alii*, 2003; Chen *et alii*, 2006).

1.3.7. Aspectos imunológicos

A prolongada sobrevivência dos micoplasmas no hospedeiro está relacionada a certas características únicas e à existência de uma complexa rede de interações entre *M. hyopneumoniae* e o sistema imune do hospedeiro. Estas interações envolvem reações imunes induzidas por essas bactérias de maneira específica ou não-específica (Howard & Taylor, 1985). Ainda, a capacidade deste microrganismo em modular a resposta imune do hospedeiro contribui decisivamente para sua patogenicidade, permitindo que evite ou suprima os mecanismos de defesa do hospedeiro e estabeleça, muitas vezes, uma infecção crônica persistente (Razin *et alii*, 1998).

A resposta mediada por anticorpos diretamente contra imunógenos da membrana de *Mycoplasma* sp. pode ter impacto significativo no curso da doença. A significância desta resposta imune para proteção é geralmente pouco conhecida. Existem vários imunógenos descritos como mediadores da ligação deste patógeno às células epiteliais do hospedeiro (Kahane *et alii*, 1984; Krause *et alii*, 1998). Além da inibição da aderência e da citotoxicidade, anticorpos contra proteínas de membrana de *Mycoplasma* sp. podem bloquear certas atividades metabólicas (Awumbila & Rosenbush, 1991).

Em algumas espécies de *Mycoplasma*, a presença de uma resposta imune sistêmica por parte do hospedeiro nem sempre é detectada (Howard, 1983; Thomas *et alii*, 1982). Nestes casos, a ausência desta resposta imune pode refletir a natureza moderada ou prematura da infecção (Windsor, 1977; Onoviran & Taylor-Robinson, 1979). Além disso, a resposta imune específica encontrada nas secreções respiratórias é diferente daquela encontrada no soro. Diversos estudos indicam que muito da resposta imune específica contra os micoplasmas nas secreções respiratórias, particularmente naquelas coletadas do trato respiratório inferior, consiste de IgG (Howard, 1983; Howard & Taylor, 1985). A IgG é normalmente considerada mais eficiente do que a IgA na promoção da destruição do patógeno por macrófagos e neutrófilos, bem como na ativação do complemento. Estudos em suínos mostram que a infecção superficial do epitélio ciliar por *M. hyopneumoniae* tende a estimular a resposta por IgA, enquanto que a infecção mais invasiva estimula a resposta com IgG (Holmgren, 1974). A secreção de imunoglobulina A (IgA) representa

importante meio de proteção das superfícies mucosas, sendo empregada na defesa da mucosa intestinal. Para o trato respiratório inferior, a IgG, o complemento e a ação de fagócitos, resultam na defesa local. Além disso, o complemento pode estar envolvido tanto nas reações imunes específicas mediadas por imunoglobulinas, quanto nas não-específicas. Como micoplasma não tem parede, eles são particularmente sensíveis à morte pelo complemento. Uma vez ligado na superfície do micoplasma, o complemento pode promover a ligação e a ingestão destes por fagócitos.

A resposta imune celular encontrada contra antígenos de *M. hyopneumoniae* inclui reações de hipersensibilidade, transformação linfocitária e inibição da migração dos macrófagos (Roberts, 1973; Adegboye, 1978; Kristensen *et alii*, 1981). Mecanismos de resposta imune celular são importantes no desenvolvimento das lesões pulmonares durante a infecção por *M. hyopneumoniae* devido aos seus dois maiores efeitos: aumento da atividade fagocitária e citotóxica dos macrófagos e o início de uma resposta inflamatória crônica (Messier *et alii*, 1990; Sarradell *et alii*, 2003). *M. hyopneumoniae*, depois de colonizar o trato respiratório, estimula macrófagos alveolares a secretar citocinas que induzem uma resposta imune e inflamatória (Asai *et alii*, 1994; Thanawongnuwech *et alii*, 2004). Essas citocinas ou um número de proteínas imunogênicas de micoplasmas têm sido implicadas na acumulação intensiva de linfócitos observada ao redor dos brônquios e bronquíolos, na infiltração de células inflamatórias nas vias aéreas e na hiperplasia linfocitária característica das infecções por *M. hyopneumoniae* (Strasser *et alii*, 1992; Sarradell *et alii*, 2003). Citocinas pró-inflamatórias parecem desempenhar um papel importante nas doenças respiratórias de suínos, através da coordenação e ativação da resposta imune adaptativa, que habilita o hospedeiro a eliminar o patógeno (Van Reeth *et alii*, 2002). Entretanto, se o nível de citocinas se torna excessivo, pode ocorrer dano e até mesmo a morte do hospedeiro. Um aumento do nível de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), do fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) já foram relatadas no fluido broncoalveolar de suínos infectados com *M. hyopneumoniae* (Asai *et alii*, 1994; Thacker *et alii*, 2000) e estão associadas com o desenvolvimento das lesões pulmonares (Van Reeth *et alii*, 2002). Além disso, Thanawongnuwech *et alii* (2004) reportaram um aumento das interleucinas IL-8 e IL-10 nos macrófagos alveolares do pulmão de suínos infectados experimentalmente com *M. hyopneumoniae*, sugerindo que estas também teriam um papel no aumento da severidade da pneumonia e na modulação da resposta imune do hospedeiro.

Já há algum tempo, estudos demonstraram que a resposta imune humoral local do suíno desempenha um papel importante na recuperação de infecção por micoplasma e

subseqüente imunidade (Cassell *et alii*, 1974; Howard *et alii*, 1987). Em outro estudo, a caracterização fenotípica de células presentes no pulmão de suínos experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae* revelou um aumento do número de células produzindo imunoglobulinas (Messier *et alii*, 1990). Entre estas células, IgG⁺ e IgA⁺ foram as significativamente mais observadas. Numerosas células IgA⁺ também foram observadas ao redor das glândulas submucosas dos brônquios. Levando-se em consideração estes estudos e o fato de que secreções locais de IgA previnem a adesão de micoplasmas ao epitélio ciliado e que IgG elevam sua fagocitose pelos macrófagos alveolares (Sheldrake *et alii*, 1993; Walker *et alii*, 1996), a resposta imune humoral local parece ter um papel importante na patogênese da infecção e subseqüente imunidade (Messier *et alii*, 1990).

2. Justificativa e objetivo

M. hyopneumoniae possui diversas proteínas imunodominantes já caracterizadas, entre as quais a proteína citosólica p36 (Caron *et alii*, 2000b; Stipkovits *et alii*, 1991; Strasser *et alii*, 1991), as proteínas de membrana p46, p65 e p74 (Cheikh Saad *et alii*, 2003; Kim *et alii*, 1990; Kinklert *et alii*, 1985; Caron *et alii*, 2000a), e a adesina p97 (Zang *et alii*, 1995). A função dessas proteínas ainda não está completamente elucidada, mas, devido a seu caráter imunogênico, elas podem eventualmente ser utilizadas como ferramentas para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae*, principalmente se forem comprovadas como espécie-específicas. Outras proteínas imunogênicas também têm sido identificadas em *M. hyopneumoniae*, mas sua importância no desenvolvimento da imunidade protetora também não está clara (Wise & Kim, 1987; Young *et alii*, 1989; Meens *et alii*, 2006). A identificação, detecção e purificação de componentes específicos de *M. hyopneumoniae*, os quais estejam envolvidos na aderência ou dano celular ao trato respiratório, podem prover uma base para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes.

A estratégia de busca de novos antígenos de diversas bactérias patogênicas, identificados dentre todas as proteínas codificadas pelo genoma, tem sido impulsionada pela facilidade de obtenção dessas seqüências pelo seqüenciamento automatizado. A aplicação da bioinformática na predição de proteínas exportadas e ou expostas na superfície bacteriana torna possível a expressão e purificação de um grande número de antígenos para identificar potenciais proteínas candidatas a vacinas. Utilizando estratégias que combinam a genômica e a proteômica, várias destas proteínas candidatas a novas

vacinas já foram identificadas em patógenos importantes, como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis* (Wizemann *et alii*, 2001; Chakravarti *et alii*, 2000; Jungblut *et alii*, 1999). Neste sentido, a conclusão do seqüenciamento do genoma de *M. hyopneumoniae* (Minion *et alii*, 2004; Vasconcelos *et alii*, 2005) tornou possível que uma estratégia semelhante seja utilizada e que novos antígenos, tanto com valor diagnóstico quanto para serem utilizados como vacinas, sejam obtidos.

2.1. Objetivos gerais

- Estudo dos aspectos possivelmente relacionados à virulência e à patogenicidade de *M. hyopneumoniae*;
- Identificar e caracterizar genes e proteínas de *M. hyopneumoniae* com potencial para utilização no diagnóstico da pneumonia micoplásmica suína;
- Identificar e caracterizar genes de *M. hyopneumoniae* com variabilidade entre cepas.

2.2. Objetivos específicos

Estudo I – Identificação *in silico* de prováveis fatores de virulência de *M. hyopneumoniae*:

- Analisar comparativamente o genoma de três cepas de *M. hyopneumoniae* para identificação de seqüências de DNA codificadoras (CDS) de potenciais fatores de virulência.

Estudo II – Identificação e caracterização de genes de *M. hyopneumoniae* com variabilidade entre cepas:

- Analisar *in silico* CDSs codificadoras de proteínas para identificação daquelas com variação no número de repetições em tandem entre cepas;
- Desenvolver um teste de PCR baseado nas regiões contendo variações no número de aminoácidos, para discriminar cepas de *M. hyopneumoniae*.

Estudo III - Produção de antígenos e anti-soros e padronização de ensaios imunológicos para detecção de *M. hyopneumoniae*:

- Expressar em *E. coli* e purificar os antígenos recombinantes p36 e NrdF de *M. hyopneumoniae*;
- Produzir anti-soros policlonais contra os antígenos recombinantes p36 e NrdF de *M. hyopneumoniae* expressados em *E. coli*;
- Padronizar ensaios de imuno-histoquímica e ELISA baseados nos antígenos recombinantes, para o imunodiagnóstico da pneumonia micoplásmica suína.

3. Estudo I – Identificação *in silico* de prováveis fatores de virulência de *M. hyopneumoniae*.

Como o repertório de proteínas com caráter antigênico ou potencialmente determinante de virulência já descrito para *M. hyopneumoniae* é relativamente restrito, a identificação e a caracterização imunológica e funcional de um número maior de proteínas da bactéria, especialmente aquelas preferencial ou exclusivamente expressas em cepas patogênicas, pode trazer avanços importantes para o imunodiagnóstico da PMS, em termos de aumento da especificidade e da sensibilidade dos testes utilizados, e melhorias no aspecto imunoprotetor das vacinas atualmente disponíveis.

Com o seqüenciamento das cepas 232, J e 7448 de *M. hyopneumoniae* (Minion *et alii*, 2004; Vasconcelos *et alii*, 2005) foi possível a realização de uma análise comparativa das seqüências entre a linhagem não-patogênica (J) e os isolados patogênicos (232 e 7448), visando à identificação de genes que codificam proteínas determinantes de patogenicidade e/ou com potencial para utilização em imunodiagnóstico e/ou vacinação. Dentre estas proteínas, estão, por exemplo, componentes de membrana com variações evidentes entre as linhagens e prováveis fatores de virulência, que, no futuro, poderão servir como alvos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Os resultados desta análise foram reunidos em um manuscrito já aceito para publicação na revista Genetic and Molecular Biology – Mycoplasma *special issue*, e que está apresentado a seguir.

A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis

Henrique Bunselmeyer Ferreira and Luiza Amaral de Castro

Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Cx. Postal 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Henrique Bunselmeyer Ferreira

Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Cx. Postal 15005

91501-970 Porto Alegre, RS

Brazil.

E-mail: henrique@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia (PEP), a major problem for the pig industry. The mechanisms of *M. hyopneumoniae* pathogenicity allow to predict the existence of several classes of virulence factors, whose study has been essentially restricted to the characterization of adhesion-related and major antigenic proteins. The now available complete sequences of the genomes of two pathogenic and one non-pathogenic strain of *M. hyopneumoniae* allowed the use a comparative genomics approach in order to putatively identify virulence genes. In this preliminary survey, we were able to identify 118 CDSs encoding putative virulence factors, based on specific criteria ranging from predicted cell surface location or variation between strains to previous functional studies showing antigenicity or involvement in host-pathogen interaction. This survey is expected to serve as a first step towards the functional characterization of new virulence genes/proteins that will be important not only for a better comprehension of *M. hyopneumoniae* biology, but also for the development of new and improved protocols for PEP vaccination, diagnosis and treatment.

Keywords

Porcine enzootic pneumonia; virulence; host-pathogen interaction; antigen; adhesin

Introduction

Virulence is one of the possible outcomes of host-pathogen interaction and may involve a plethora of components from both partners in this mutual relationship. Pathogen-centered views of virulence consider that pathogens are distinguished from nonpathogens by their expression of virulence factors (Casadevall and Pirofski, 2001), which are encoded by the so called virulence genes. The concept of virulence genes is also rather ample and may vary according to the definition of virulence that is being used (Wassenaar and Gaastra, 2001). Essentially, they can be divided in true virulence genes, virulence-associated genes, and virulence life-style genes. True virulence genes are only those that encode factors directly involved in causing disease. However, true virulence factors may be regulated, activated or may require the activity of virulence-associated genes, and virulence life-style genes may be necessary to enable the pathogen to colonize its host.

The identification of virulence genes is based on different experimental criteria, that range from mere antigenicity analysis of protein products to genetic studies involving inactivation or complementation of specific genes (Wassenaar and Gaastra, 2001). The advent of whole-genome sequencing triggered a new revolution in infectious disease research, as it allowed, in association with the improvement of bioinformatic methods, the extensive identification of candidate virulence genes in several pathogenic organisms (Weinstock, 2000; Allan and Wren, 2003; Chen *et al.*, 2005).

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia (PEP), a major problem for the pig industry. This bacterium is an extracellular pathogen, which colonizes the pig respiratory epithelium and induces PEP by first damaging the ciliated epithelial cells of the trachea, bronchi, and bronchioles (DeBey *et al.*, 1992). However, the mechanisms underlying *M. hyopneumoniae*-induced ciliary damage or loss of cilia are not well understood (Park *et al.*, 2002). Despite of the relatively low exposure of the bacterium to the host immune system, *M. hyopneumoniae* causes a general immunosuppression (Adegboye, 1978) and also induces a localized autoimmune response in infected animals, which is responsible for additional damage to the respiratory epithelium (Suter *et al.*, 1985). The lesions associated to the *M. hyopneumoniae* infection appear to be primarily the result of the induced host immune reaction and inflammatory response, rather than due to the direct toxic effects of molecules produced by the bacterial cells (Razin *et al.*, 1998).

The study of virulence factors in *M. hyopneumoniae* has been centered in the characterization of adhesion mediating molecules, especially the P97 adhesin (see, for example, Zhang *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1998; Hsu and Minion, 1998a 1998b; Djordjevic *et al.*, 2004). However, the mechanisms of *M. hyopneumoniae* pathogenicity allow to predict the existence of several other classes of not yet identified virulence factors, including genes/proteins involved with secretion and/or traffic between host and pathogen cells, or with evasion and/or modulation of the host immune system. The now available complete sequences of the genomes of two pathogenic and one non-pathogenic strain of *M. hyopneumoniae* (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005) allowed the use a comparative genomics approach in order to putatively identify new virulence genes. For that, we have made a preliminary survey of CDSs that can be assigned as virulence genes. Although this survey is not intended, by any means, to be definitive, we expect that it may contribute to the identification of candidate virulence genes for future functional studies. The study of these genes and their corresponding products will be important not only for a better comprehension of host-pathogen interactions, but also for the improvement of PEP vaccines and diagnostic methods, as well as for the development of therapeutic drugs.

Material and Methods

Finished and annotated genome sequences of *M. hyopneumoniae* strains 232, J and 7448 have been recently published (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005). Strains 232, and 7448 were characterized as pathogenic, while strain J is a non-pathogenic one, with reduced capacity to adhere to porcine cilia.

These genomic sequences were used for a systematic search protein encoding sequences (CDSs) corresponding to candidate virulence factors. A CDS was considered as a putative virulence gene when fulfilling one or, preferentially, more of the following criteria: (i) previous description as a *M. hyopneumoniae* virulence gene based on experimental studies; (ii) orthology to previously described virulence genes in related bacteria; (iii) presence in the pathogenic *M. hyopneumoniae* strains and absence from the non-pathogenic one; (iv) demonstration of antigenicity of its product; (v) probable localization of its product in the bacterial surface (vi) sequence variability between strains; (vii) its product is probably associated to one of the known *M. hyopneumoniae* pathogenicity mechanisms; (viii) its product is a component of a possible bacterial pathogenicity-related mechanism.

The systematic search for CDS coding for candidate virulence factors was performed in public databases and using the System for Automated Bacterial Integrated Annotation (SABIA) (Vasconcelos *et al.*, 2005). Comparative sequence analyses were performed using the programs Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997) and Blast (Zhang and Maden, 1997). The definition of orthologous and paralogous sequences was based on a tblastx cutoff E value of $1e^{-5}$, with at least 60% query coverage and 50% identity; in special cases, these criteria were relaxed as indicated, according to peculiarities of specific gene families. The subcellular localization prediction was made using the PSORT program (Rey *et al.*, 2005).

Sequence variability between some corresponding CDSs of *M. hyopneumoniae* strains other than J, 7448 and J was determined by PCR amplification of selected regions and DNA sequencing. DNA sequencing reactions were performed using the DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE) kit and run on MegaBACE 1000 capillary sequencers (Amersham Biosciences). Sequences were assembled using Phred and Staden package (Staden *et al.*, 2003).

Results and Discussion

Table 1 summarizes the CDS encoding putative virulence factors found in the genome sequences from *M. hyopneumoniae* strains J, 7448, and 232. The listed CDS encoded products were assigned as virulence factors based on previously described results with *M. hyopneumoniae*, other mycoplasma species or other related bacterial species. They were divided in adhesins, variable antigens, other antigenic proteins, proteases and chaperones, strain-specific gene clusters, and other possible virulence factors. Each of these classes of putative *M. hyopneumoniae* virulence factors is briefly described and discussed below.

Adhesins

The adherence of *M. hyopneumoniae* to ciliated epithelium is necessary to induce colonization of the swine respiratory tract, and, therefore, the adherence of the bacteria to host cells is an important initial step in the pathogenesis. The adherence process is mainly mediated by receptor-ligand interactions and the *M. hyopneumoniae* proteins (adhesins) possibly involved in these interactions are obvious candidates to be virulence factors. As previously described (Vasconcelos *et al.*, 2005) and shown on Table 1, CDSs corresponding to several previously described mycoplasma adhesins (MgPa, LppS, LppT,

P69, P76, P97, P102, P110, P146, and P216) were identified in the sequenced *M. hyopneumoniae* genomes. The presence of the same adhesin CDSs in all three *M. hyopneumoniae* sequenced genomes and the high degree of overall identity (>94%) between the deduced amino acid sequences of the J, 7448 and 232 ortholog adhesins does not allow any obvious correlation to explain the differential virulence simply based on different adhesin repertoires.

The hypothesis of differences in the expression patterns of these adhesins in distinct strains, however, can not be discarded and remains to be investigated. Regarding this aspect, it is interesting to consider the cases of cythaderence-related operons, from which adhesin CDSs may be coordinately expressed under the control of common regulatory sequences. Cythaderence-related operons were described for *M. genitalium* (Musatovova *et al.*, 2003) and, for *M. hyopneumoniae*, there are at least seven examples of this kind of organization, listed in Table 2. Experimental evidence of polycistronic transcription from P97/P102 operons has been recently provided by Adams *et al.* (2005).

MgPa has been described as one of the protein components of the so-called tip organelle, a multiproteic attachment structure considered to be critical for surface parasitism and successful colonization of mammalian cells in some pathogenic mycoplasmas (e.g. *M. pneumoniae* and *M. genitalium*) (Layh-Schmitt and Harkenthal, 1999; Musatovova *et al.*, 2003). However, in *M. hyopneumoniae*, the other proteins necessary to form a tip organelle are missing (Vasconcelos *et al.*, 2005), indicating that MgPa, as well as its counterpart (MgPa-like) encoded by the same operon, might mediate adhesion in another molecular context.

The P97 adhesin is regarded as an important virulence determinant, being considered responsible, at least in part, for *M. hyopneumoniae* adherence to the swine respiratory cilia. The P97 mediated-adhesion depends on a cilium binding site located in the R1 amino acid repeat sequence of the protein (Hsu and Minion, 1998b), and it was demonstrated that a minimum number of eight R1 repeat units are required for cilium binding (Minion *et al.*, 2000). The P97 CDS of P97/P102 operon I, corresponding to the previously described *M. hyopneumoniae* P97 gene (Hsu and Minion, 1998a), codes for P97 proteins with 10, 9, and 15 R1 repeat units in strains J, 7448 and 232, respectively, all above that minimum number and, therefore, potentially able to mediate adhesion. The fact that the non-pathogenic J strain, with reduced adhesion capacity to porcine cilia (Zhang *et al.*, 1995), has an apparently functional P97 adhesin reinforces the idea of the multifactorial nature of the adhesion process.

Besides, the presence of P97-like proteins in P97/P102 operons II and III, and the recently described P97 post-translational proteolytic processing (Djordjevic *et al.*, 2004) add complexity to the system. It has been recently demonstrated that all P97 paralog CDSs are transcribed during experimental infection with the 232 strain (Adams *et al.*, 2005) and this simultaneous expression, associated with the possible proteolytic processing of the corresponding proteins, would generate a plethora of surface antigenic variants (see below), while keeping the capacity to mediate cell adhesion. It has been recognized, given the importance of the P97 adhesin to virulence, that its posttranslational cleavage may play an important role in the disease process (Djordjevic *et al.*, 2004).

Similarly to their P97 counterparts, the P102 adhesin paralogs encoded by P97/P102 operons I, II or III are only 21-43% identical in each of the sequenced *M. hyopneumoniae* genomes. Unlike P97, however, P102 does not present variable amino acid tandem repeats between strains and, according to Djordjevic *et al.* (2004), no evidence of the above discussed posttranslational proteolytic cleavage was found for this adhesin. Regarding its expression, Adams *et al.* (2005) have demonstrated that, in the 232 strain, P102 paralog CDSs are transcribed during experimental infection, and the protein can be immunologically detected in *M. hyopneumoniae* adhered to epithelium cilia. The 7448 and J strains, but not the 232 one, present an additional frameshifted P102 CDS (see footnotes on Table 2), and it is interesting to note that this frameshift is not in the same position in the two strains, suggesting independent origins.

We have been also able to experimentally demonstrate post-translational modifications that generate alternative forms with different pI for at least 11 *M. hyopneumoniae* proteins, five of which are adhesins (Pinto PM and Ferreira HB, unpublished results; Table 1). These modifications, which include but are not necessarily restricted to phosphorylation, further increase the repertoire of *M. hyopneumoniae* protein variants. Noteworthy, some of them, as in the cases of P76 and P97, occur concomitantly to the proteolytic processing discussed above. It will be important to investigate whether different post-translational processing patterns occur among different *M. hyopneumoniae* strains and are important for virulence, an issue that is being addressed by our group.

Variable antigens

Bacterial virulence factors, particularly surface-located molecules, are frequently antigenic and their antigenic properties are often associated, directly or indirectly, with pathogenesis. For instance, the generation of antigenic variants may be an important way

to evade the host immune response, or the elicited immune response may be itself part of the disease process, as in the case of pathogen-induced autoimmunity.

For *M. hyopneumoniae*, there are some evidences pointing to the occurrence of antigenic variations with possible correlation with virulence. Besides P97 (see above), several other *M. hyopneumoniae* CDSs encode proteins with variably reiterated amino acid repeat regions amongst different strains, including those coding for the P76, P146, and P216 adhesins. Variations in the number of amino acid repeats between J, 7448, and 232 orthologs were also identified for at least seven other CDS products annotated as membrane proteins (Vasconcelos *et al.*, 2005), and this has been also demonstrated for additional CDSs and other *M. hyopneumoniae* strains by PCR amplification and DNA sequencing of repeat regions (data not shown).

The variably reiterated amino acid repeat regions found in *M. hyopneumoniae* encoded adhesins and other putative surface proteins result from variation in the number of tandem nucleotide repeat units within the corresponding CDSs. The occurrence of these repeated nucleotide motifs, however, is not restricted to CDSs, being found also in intergenic regions. In both cases, the variability in the lengths of these repetitive sequences is probably consequence of slippage within them during replication (Henderson *et al.*, 1999). Such slippage has also the potential to generate events of phase variation, but, interestingly, this was not observed for any of the deduced protein variants identified so far in different *M. hyopneumoniae* strains, since the variable number of corresponding nucleotide repeats always determined translationally in frame CDSs. This suggests a strong pressure for the maintenance of integrity of these proteins, although allowing the occurrence of variation in the number of amino acid repeats within them.

Besides leading to the generation of proteins with functional or antigenic variations when occurring within the corresponding CDSs, the presence of tandem nucleotide repeats within regulatory regions may lead also to on-off switching of the associated genes. The presence of variably repeated nucleotide sequences was identified in intergenic upstream flanking regions of at least 41 *M. hyopneumoniae* CDSs of strains J, 7448 and 232 (Vasconcelos *et al.*, 2005). Among them are the CDS coding for the P97 like and LppS adhesins and the P65 antigen (see below). The apparent switch off of P97, at least at the protein level, has been demonstrated for some *M. hyopneumoniae* field strains (Assunção *et al.*, 2005), but the possible corresponding transcriptional inactivation was not yet assessed.

It has been also recently shown (Djordjevic *et al.*, 2004) that P97 and some other high-molecular-weight proteins undergo proteolytic processing and that their cleavage products are translocated to and remain associated with the *M. hyopneumoniae* cell surface during growth, at least *in vitro*. Such processing was regarded as important for the establishment of the *M. hyopneumoniae* cell surface phenotype and this consideration gains in importance when we consider that, for different strains, fragments of several proteins, some of them with different numbers of amino acid repeats, are being presented to the host. This may have roles both to determine different adhesion properties for each *M. hyopneumoniae* strain and to evade or immunomodulate the host immune system.

The specific proteolytic processing of surface proteins must involve an equally specific set of proteases, that remain to be identified among the putative proteases already annotated for *M. hyopneumoniae* J, 7448 and 232 (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005). These surface protein processing proteases could themselves be regarded as virulence factors, assuming that they are responsible for the generation of cell surface phenotypes that are determinants of pathogenicity. *M. hyopneumoniae* proteases with putative roles in pathogenicity are discussed below (see *Proteases and nucleases* section).

Other antigenic proteins

Not all antigens are virulence factors, but virulence gene products are often immunogenic and responsible for acquired immunity that protects against disease (Wassenaar and Gaastra, 2001). Genes for nine previously described mycoplasma proteins not related to adhesins or other virulence factors but with a well established antigenic character and relevance for diagnosis and/or vaccination were also found in the genomes of *M. hyopneumoniae* J, 7448 and 232 strains. These antigens, namely P36, P46, P60, P65, P80, P95, P115, nrdF and napA, are very similar (96-100% identity at the amino acid level) in the three strains, which does not allow any inference of a more obvious role in pathogenesis for any of them. However, the P36 antigen, despite corresponding to a lactate dehydrogenase enzyme, is apparently not expressed in some field strains (Assunção *et al.*, 2005), which suggests that it can not be merely regarded as a constitutive antigenic protein, as could be initially expected. P65 may be also differentially expressed between strains, since, as discussed above, the putative regulatory region of the corresponding CDS present tandem nucleotide repeats associated with transcriptional on-off switching. Since P65 is a major antigenic surface lipoprotein (Schmidt *et al.*, 2004), the occasional switching off of the P65 gene in individuals of a colonizing population of *M. hyopneumoniae* would be of

immunological relevance, and would also be one of the factors contributing to the infection outcome.

Among the prominent surface antigens detected on the cellular membrane of mycoplasmas there are a large number of lipoproteins. In *M. hyopneumoniae* and other mycoplasmas, these membrane lipoproteins are likely to play a role in pathogenicity mechanisms, since they are known to induce pro-inflammatory cytokines (Brenner *et al.*, 1997; Herbelin *et al.*, 1994). Furthermore, membrane lipoproteins are among the most dominant antigens in mollicutes, and many of them are known to be variable amongst different strains, undergoing size and antigenic variations (Razin *et al.*, 1998).

Proteases and chaperones

Proteases are often involved in the virulence of gram-positive pathogens (Minion *et al.*, 2004). In the *M. hyopneumoniae* genome, at least twelve putative protease CDSs have been identified, including those coding for five aminopeptidases and two serine proteases (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005). Five of these proteases have characteristics of membrane or secreted proteins (see Table 1), and, as such, they could be virulence life style factors, involved in the acquisition of metabolic precursors from the host.

One or more members of the *M. hyopneumoniae* protease repertoire are thought to be responsible for the above discussed (see *Variable antigens* section) posttranslational processing of P97 and other surface proteins (Djordjevic *et al.*, 2004), with potential implication in cell adhesion properties and virulence. CDSs coding for signal peptidases I and II were also found in the *M. hyopneumoniae* genome (Vasconcelos *et al.*, 2005) and their products may be related to pathogenicity. Similar signal peptidases have been described as bacterial virulence factors (Mei *et al.*, 1997; Reglier-Poupet *et al.*, 2003), and, in *M. hyopneumoniae*, they could be also important for proteolytic processing and translocation of adhesion related and/or antigenic proteins to the cell surface.

Chaperones can be often considered as virulence-associated proteins or even true virulence factors. For instance, chaperone-mediated protein refolding may be relevant for the posttranslational processing of proteins that are virulence factors, or some chaperones may be strongly immunogenic, eliciting an immune response that is responsible for part of the pathological damage (Scherm *et al.*, 2002; Minion *et al.*, 2004). In the *M. hyopneumoniae* genome, at least ten chaperone related CDSs have been annotated (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005), including those encoding a ClpB homolog, possibly

implicated in the P97 posttranslational processing (Minion *et al.*, 2004), and a hsp70, which is strongly antigenic (our unpublished results).

Strain-specific gene clusters

Strain-specific genomic regions may include genes that are determinants of phenotypes important for virulence, like in the case of pathogenicity islands, already described in several bacterial genomes (Oelschlaeger and Hacker, 2004). In the alignment of the genome sequences of the *M. hyopneumoniae* strains J, 7448, and 232, two relatively large regions came to attention due to their presence exclusively in one or two of these strains (Vasconcelos *et al.*, 2005). One of these regions, similar to a *Mycoplasma fermentans* integrative conjugal element of (ICEF) (Calcutt *et al.*, 2002), was initially described as a 7448 strain-specific genomic segment, with 22.3 kb long and containing 14 CDSs (Vasconcelos *et al.*, 2005). It was considered a probable *M. hyopneumoniae* integrative conjugal element, named ICEH, and its presence was also verified in the pathogenic strain 232 and in another unrelated, pathogenic Brazilian field isolate, but not in the J strain. A more refined *in silico* analysis has extended the 7448 strain ICEH boundaries, so that it now includes around 30 kb and at least 23 CDSs (Pinto *et al.*, unpublished results), some of which, however, are also shared with the ICEH-less strain J. Among the ICEH CDSs, there are at least seven related to conjugative and integrative genes, whose presence is suggestive of the element's mobility. Additional evidences of the ICEH mobile character and activity are the presence of flanking direct repeat sequences, possibly generated by target site duplication, and PCR detection of its circular extrachromosomal forms (Vasconcelos *et al.*, 2005). In the strain 232 genome, there are at least four ICEH-related regions, with 10 kb, 0.4 kb, 6.7 kb and 26.4 kb, including at least 22 CDSs, at least 12 of them orthologous to CDSs of the strain 7448 ICEH (see Table 1).

The verified presence of a potentially mobile element like the ICEH in three *M. hyopneumoniae* pathogenic strains and not in a non-pathogenic one is suggestive of its involvement with virulence. It has recently been shown that in some pathogenic bacteria components of the conjugation machinery are virulence-associated factors, being responsible for intercellular delivery of effector molecules that modify host cell functions in favour of the pathogen (Seubert *et al.*, 2003; Schroder and Dehio, 2005). Whether the putative ICEH-mediated transfer mechanisms are used for the delivery of secretion substrates to host cells and whether this is a determinant of the *M. hyopneumoniae* ability

to colonize and persist in the swine respiratory epithelium, however, are questions that demand future experimental work.

Another *M. hyopneumoniae* strain-specific region is exclusive of the non-pathogenic strain J, and includes some CDSs coding for type III restriction-modification (R-M) system components and putative transposases (Vasconcelos *et al.*, 2005; Brochi *et al.*, unpublished results). Bacterial DNA restriction-modification (R-M) enzymatic systems have been related to protection of bacteria to invasion by phage and foreign DNA or as a cause of genome rearrangements in cases in which the corresponding genes behave like selfish mobile elements (Kobayashi, 2001). These functions are not directly related to virulence, but it has been demonstrated for different bacteria, including *M. pulmonis* (Gumulak-Smith *et al.*, 2001), *Helicobacter pilory* (Salaun *et al.*, 2005), and *Bacteroides fragilis* (Cerdeno-Tarraga *et al.*, 2005), that R-M genes belong to a group of phase-variable genes that may play a role in determining initial fitness for colonization of the host and subsequent niche adaptation, acting, therefore, as virulence life-style genes.

Besides the J strain-exclusive type III R-M CDS set, the genomes of *M. hyopneumoniae* strains J, 7448, and 232 present also additional CDSs related to type I, II or III R-M systems, some of them common to the three strains and others exclusive of one strain or shared by only two of them (Brochi *et al.*, unpublished results; Table 1). It is interesting to note that several of these putative R-M genes present unusual sequence features, such as the presence of nucleotide repeats within their coding or regulatory regions, translational frameshifts, or flanking insertion sequences (Vasconcelos *et al.*, 2005). This suggests that these *M. hyopneumoniae* R-M genes may be targets of genomic rearrangements and nucleotide repeat-related on-off switching or phase variation, which could be associated to virulence. The effective contribution of the observed *M. hyopneumoniae* inter-strain variation in R-M systems for virulence remains to be confirmed. However, it is possible that, as proposed for *M. pulmonis* (Gumulak-Smith *et al.*, 2001), the status of R-M systems is a determinant of differential cell growth rates and its variation could generate cell subpopulations better adapted to colonize the host.

Other possible virulence factors

Hemolysin-mediated hemolysis is another common potential virulence factor among mollicutes (Chambaud *et al.*, 2001) and membrane-associated hemolysin activity has been described for *M. hyopneumoniae* J (Minion and Jarvill-Taylor, 1994). This activity has been commonly associated with the HlyA, HlyC and ACP proteins (Trent *et*

al., 1999), whose genes are simultaneously present in *M. pulmonis*, *U. urealyticum*, and *M. penetrans* (Glass *et al.*, 2000; Chambaud *et al.*, 2001, Sasaki *et al.*, 2002). In *M. hyopneumoniae* J, 7448, and 232 strains, however, CDSs for HlyA and HlyC were found, but no typical ACP or ACP-synthase (the enzyme that catalyzes ACP acylation) CDSs were identified. A CDS for a putative hemolysin ABC exporter (Koronakis *et al.*, 1995) was also found in *M. hyopneumoniae*, as well as in all other mollicute genomes so far characterized.

Membrane or secreted nucleases, as their protease counterparts (see section *Proteases and chaperones*, above) may be important to define the colonizing capacity of mycoplasmas, helping these microorganisms to acquire from the host metabolic precursors they are unable to synthesize (Bendjenatt *et al.*, 1999; Chambaud *et al.*, 2001). Eleven nuclease CDSs have been annotated in the *M. hyopneumoniae* genome, from which four are predicted to be membrane or secreted proteins. Among the *M. hyopneumoniae* nucleases, there is a VACB-like ribonuclease II, whose orthologs have been described as virulence factors in *Shigella flexneri* and *E. coli* (Cheng *et al.*, 1998).

For *M. pulmonis* infections, the production of hydrogen peroxide has been suggested to be a virulence factor (Brennan and Feinstein, 1969; Chochola *et al.*, 1995). In this context, a thiol peroxidase, a thiol dependent antioxidant enzyme, could also be considered a virulence factor, assuming it would help the pathogen to survive in a peroxide-rich environment. Among the characterized mollicute genomes, thiol peroxidase encoding CDSs were found only in *M. hyopneumoniae*, *M. synoviae*, and *M. pulmonis* (Chambaud *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2005), suggesting that this activity is not essential or is supplied by other related enzymes in other mycoplasma species.

Another possible virulence factor which may be related to oxidative stress is the neutrophil-activating protein (*napA*), encoded by an ortholog of a previously described *Helicobacter pylori* virulence gene. *H. pylori napA* induces neutrophils to produce reactive oxygen species and promotes neutrophil adhesion to endothelial cells (Yoshida *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1995). Moreover, by activating neutrophils and inducing a moderate inflammatory reaction leading to alteration of the epithelial tight junctions and basal membranes, *H. pylori napA* possibly promotes the release of nutrients from the mucosa to support bacterial growth (Blaser, 1993; Montecucco and Pappuoli, 2000). Whether *M. hyopneumoniae napA* would be capable of causing one or more of these effects on the swine epithelium remain to be experimentally investigated.

Concluding remarks

Genomic comparisons among pathogenic and non-pathogenic strains of a pathogen are revealing genes whose products are potentially related to virulence, like those described for *M. hyopneumoniae* in this article. Functional studies of these genes and their products are expected to help elucidating molecular mechanisms important for *M. hyopneumoniae* infection of and survival in its host environment. Once elucidated, components of such mechanisms will be natural targets for the development of effective and specific therapeutical agents against PEP.

Furthermore, bacterial virulence factors, particularly surface-located molecules, are often immunogenic and make good vaccine antigens (Allan and Wren, 2003). Considering that virulence factors are required for the pathogen to infect and survive in its host, their use as vaccinal antigens has the potential to generate a vaccine-stimulated immune response that neutralizes infection and offer protection against the disease. Therefore, several of the identified putative *M. hyopneumoniae* virulence factors are natural candidates for cloning and production of recombinant molecules (either DNA or proteins) to be evaluated as components of a possible recombinant vaccine against PEP.

Acknowledgements: We thank Marcos Oliveira de Carvalho, Rangel Celso Souza and Dr. Sérgio Ceroni da Silva for the help with ortholog identification. L.A.C. is a recipient of a CAPES pre-doctoral fellowship. Supported by MCT/CNPq and FAPERGS.

Table 1. List of CDSs encoding virulence factors in *M. hyopneumoniae* strains J, 7448 and 232, and identities between the corresponding orthologous deduced aminoacid sequences of the different strains. The CDSs were classified according to the text and include CDSs encoding both previously described and putative virulence factors. Any additional criterium(a) used to assign a given CDS product as a virulence factor is(are) indicated (superscripted numbers), as well as any additional criterium(a) to establish orthology (superscripted letters). CDS numbers are according to GenBank and SABIA.

CDS product	CDS			Identity (%)		
	J	7448	232	J x 7448	J x 232	7448 x 232
Adhesins						
P29 ¹¹	MHJ_0357	MHP7448_0361	mhp372	100	100	100
P69 ^{1, 11}	MHJ_0358	MHP7448_0362	mhp373	99.30	99.30	99.65
P76 ^{1, 3, 4, 6}	MHJ_0494	MHP7448_0497	mhp494	99.34	95.66	95.78
p97 ^{1, 2, 3, 6, 8, 9}	MHJ_0194 (operon I)	MHP7448_0198	mhp183	92.72	94.45	95.49
	MHJ_0105 (operon II)	MHP7448_0108	mhp271	95.91	96.01	96.67
	MHJ_0264 (operon III)	MHP7448_0272	mhp107	98.34	99.51	98.44
P102 ^{1, 9}	MHJ_0195 (operon I)	MHP7448_0199	mhp182	98.67	97.90	98.23
	MHJ_0104 (operon II)	MHP7448_0107	mhp272	96.42	96.94	97.25
	MHJ_0263 (operon III)	MHP7448_0271	mhp108	97.95	98.99	98.59
	MHJ_0102 ^a	MHP7448_0105 ^a	-	99.00		
P146 ^{1, 3, 6}	MHJ_0663	MHP7448_0663	mhp684	92.46	97.12	94.19
P216 ^{1, 3, 6}	MHJ_0493	MHP7448_0496	mhp493	97.88	97.13	97.35
LppS ^{1, 7, 11}	MHJ_0369	MHP7448_0373	mhp385	97.05	99.19	96.86
LppT ^{1, 3, 7, 11}	MHJ_0368	MHP7448_0372	mhp384	98.22	96.55	97.28
MgPa ^{9, 11}	MHJ_0006	MHP7448_0006	mhp006	99.35	99.38	98.75
	MHJ_0005	MHP7448_0005	mhp005	99.39	100	99.39
Variable antigens						
p95 ^{1, 6, 11}	MHJ_0096	MHP7448_0099	mhp280	97.12	97.99	96.34
Hypothetical protein H1 ^{1, 6}	MHJ_0441	MHP7448_0443	mhp445	96.31	98.22	96.25
Hypothetical protein H2 ⁶	MHJ_0444	MHP7448_0445	mhp447	84.04	88.11	87.14
Hypothetical protein H3 ⁶	MHJ_0350	MHP7448_0355	mhp366	95.68	96.40	95.53
Hypothetical protein H4 ⁶	MHJ_0032	MHP7448_0036	mhp037	94.44	97.91	96.10
Hypothetical protein H5 ⁶	MHJ_0662	MHP7448_0662	mhp683	91.85	94.41	94.49
Hypothetical protein H6 ⁶	MHJ_0442	MHP7448_0444	mhp446	88.54	85.87	86.36
Conserved hypothetical protein CH1 ⁶	MHJ_0089	MHP7448_0092	mhp287	97.80	98.51	98.27

Table 1. List of CDSs encoding virulence factors in *M. hyopneumoniae* strains J, 7448 and 232, and identities between the corresponding orthologous deduced aminoacid sequences of the different strains (continuation).

CDS product	CDS			Identity (%)		
	J	7448	232	J x 7448	J x 232	7448 x 232
Other antigenic proteins						
<i>Previously described antigens</i>						
P36 (L-lactate dehydrogenase, ldh) ^{8,11}	MHJ_0133	MHP7448_0137	mhp245	100	99.68	99.68
P46 ^{1,8,11}	MHJ_0511	MHP7448_0513	mhp511	99.52	100	99.52
P115 (ABC transporter ATP-binding protein P115-like) ^{1,11}	MHJ_0657	MHP7448_0657	mhp678	99.59	99.28	99.28
P60 (p60-like lipoprotein) ¹¹	MHJ_0348	MHP7448_0353	mhp364	98.31	99.25	99.06
P65 (prolipoprotein p65) ^{8,11}	MHJ_0656	MHP7448_0656	mhp677	99.04	99.56	98.88
P80 ^{1,11}	MHJ_0347	MHP7448_0352	mhp363	99.40	99.71	99.43
NnrDF (ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain) ^{1,7,8}	MHJ_0217	MHP7448_0223	mhp156	100	99.71	99.71
Pyruvate dehydrogenase (beta chain) ^{1,3,4}	MHJ_0112	MHP7448_0116	mhp264	100	100	100
Elongation factor EF-tu ⁴	MHJ_0524	MHP7448_0523	mhp540	99.75	99.75	100
<i>Membrane lipoproteins</i>						
Lipoprotein Lp1 ^{1,11}	MHJ_0213	MHP7448_0217	mhp164	95.92	99.44	99.44
Lipoprotein Lp2 ^{1,11}	MHJ_0364	MHP7448_0368	mhp379	98.99	99.66	99.33
Lipoprotein Lp3 ^{1,11}	MHJ_0324	MHP7448_0333	mhp345	99.05	99.05	98.10
Lipoprotein Lp4 ^{1,11}	MHJ_0362	MHP7448_0366	mhp377	99.59	98.91	99.04
Lipoprotein Lp5 ^{1,11}	MHJ_0363	MHP7448_0367	mhp378	100	99.85	99.85
Lipoprotein Lp6 ^{1,11}	MHJ_0364	MHP7448_0368	mhp379	98.99	99.66	99.33
Lipoprotein Lp7 ¹¹	MHJ_0374	MHP7448_0378	mhp390	98.68	98.68	99.34
Lipoprotein Lp8 ¹¹	MHJ_0622	MHP7448_0621	mhp640	99.38	99.12	98.99
Proteases and chaperones						
<i>Proteases</i>						
Signal peptidase I ^{1,7,10}	MHJ_0022	MHP7448_0026	mhp028	98.63	98.63	100
Lipoprotein signal peptidase ^{1,7,10}	MHJ_0027	MHP7448_0031	mhp032	98.10	97.47	98.5
ATP-dependent protease binding protein ⁷	MHJ_0098	MHP7448_0101	mhp278	99.27	99.57	99.71
Heat shock ATP-dependent protease (Lon) ^{7,10}	MHJ_0525	MHP7448_0524	mhp541	99.89	100	99.89
Aminopeptidase ^{3,7,10}	MHJ_0125	MHP7448_0129	mhp252	99.44	100	99.44

Table 1. List of CDSs encoding virulence factors in *M. hyopneumoniae* strains J, 7448 and 232, and identities between the corresponding orthologous deduced aminoacid sequences of the different strains (continuation).

CDS product	CDS			Identity (%)		
	J	7448	232	J x 7448	J x 232	7448 x 232
Subtilisin-like serine protease ^{1,7}	MHJ_0085	MHP7448_0332	mhp292	93.12	92.67	94.83
Methionine aminopeptidase (map) ^{1,7}	MHJ_0169	MHP7448_0173	mhp209	99.20	100	99.2
Leucyl peptidase ⁷	MHJ_0461	MHP7448_0464	mhp462	98.68	99.56	98.68
Proline dipeptidase ⁷	MHJ_0378	MHP7448_0382	mhp394	100	99.40	99.40
Oligoendopeptidase F (pepF) ^{7,10}	MHJ_0522	MHP7448_0521	mhp520	99.19	99.18	98.68
xaa-proaminopeptidase ⁷	MHJ_0659	MHP7448_0659	mhp680	97.97	98.84	98.55
o-syaloglicoprotein endopeptidase ^{1,7}	MHJ_0636	MHP7448_0635	mhp656	100	100	100
<i>Chaperones</i>						
Hsp70 – Chaperone (dnaK) ^{1,4,5,7,10}	MHJ_0063	MHP7448_0067	mhp072	99.83	99.50	99.67
Trigger factor (prolyl isomerase) Tig ^{7,10}	MHJ_0145	MHP7448_0149	mhp233	99.31	99.35	99.54
Heat-shock protein (dnaJ) ^{5,7,10}	MHJ_0064	MHP7448_0068	mhp073	99.73	98.94	98.48
Heat-shock protein (grpE) ^{5,7,10}	MHJ_0011	MHP7448_0011	mhp011	98.80	99.60	99.19
ftsY - cell division protein ⁷	MHJ_0008	MHP7448_0008	mhp008	99.70	99.70	100
ftsH - cell division protein ^{1,7}	MHJ_0202	MHP7448_0206	mhp175	100	99.86	99.86
ftsZ - cell division protein ^{1,7}	MHJ_0406	MHP7448_0393	mhp407	99.38	99.38	99.38
Member of the HSP33 family of disulfide bond chaperones ^{1,7}	MHJ_0144	MHP7448_0148	mhp234	100	100	100
Metal-dependent proteases and putative molecular chaperones ⁷	MHJ_0652	MHP7448_0652	mhp673	96.40	94.80	95.20
Metal-dependent proteases and putative molecular chaperones ⁷	MHJ_0538	MHP7448_0537	mhp554	98.30	98.30	98.86
Strain-specific gene clusters						
<i>ICEH-related</i>						
Hypothetical protein	-	-	mhp131 ^{d,e}			
Translation elongation factor	-	-	mhp430 ^{d,e}			
Putative ICEF product	-	-	mhp521 ^{d,e}			
Hypothetical protein	-	-	mhp525 ^{d,e}			
Hypothetical protein	-	-	mhp528 ^{d,e}			
Hypothetical protein	-	-	mhp529 ^{d,e}			

Table 1. List of CDSs encoding virulence factors in *M. hyopneumoniae* strains J, 7448 and 232, and identities between the corresponding orthologous deduced aminoacid sequences of the different strains (continuation).

CDS product	CDS			Identity (%)		
	J	7448	232	J x 7448	J x 232	7448 x 232
Hypothetical protein	-	-	mhp536 ^{d,c}			
Elongation factor P	-	-	mhp431 ^{d,c}			
TRSE-like ^{1,7,11}	MHJ_0239 ^c	MHP7448_0247 ^{d,12}	mhp133 ^{d,12}	100	99.33	99.33
TRSE-like ^{1,7,11}		MHP7448_0416	-			
TRSE-like ^{1,7,11}	-	-	mhp531 ^{d,c}			
TRSE-like ^{1,7,11}	-	-	mhp532 ^{d,c}			
DNA processing protein SMF	MHJ_0241 ^c	MHP7448_0249 ¹²	mhp130 ¹²	99.78	99.78	98.68
Hypothetical protein	-	MHP7448_0290	mhp535			89.42
Hypothetical protein		MHP7448_0418				
Hypothetical protein	-	MHP7448_0412				
Hypothetical protein		MHP7448_0413	mhp538			73.23
Putative ICEF II ¹¹	-	MHP7448_0414	mhp534 ^b			43.56
Putative ICEF II ¹¹	-	MHP7448_0415	mhp533 ^b			35.75
Hypothetical protein	-	MHP7448_0417	mhp530 ^b			49.35
Hypothetical protein	-	MHP7448_0419	mhp527 ^b			44.16
SSB (single binding protein) ¹¹	-	MHP7448_0420	mhp522 ^b			34.23
Hypothetical protein	-	MHP7448_0422	mhp523 ^b			39.17
TraK putative ICEF-IIA ^{1,7,11}	-	MHP7448_0423	mhp526			50.45
Putative ICEF product ^{1,11}	-	MHP7448_0424	mhp089 ^b			32.04
<i>Restriction-modification enzymes</i>						
Type I specific subunit ^{7,10}	MHJ_0283	-	-			
Type I specificity subunit ^{7,10}	-	MHP7448_0292	-			
Type I specificity subunit ^{7,10}	-	-	mhp303			
Conserved hypothetical (Type II methyltransferase subtype: gamma) ^{7,10}	MHJ_0319	MHP7448_0327	mhp340	98.96	99.58	98.15
Cytosine specific DNA methylase (type II methyltransferase) ⁷	MHJ_0615	MHP7448_0614	mhp633	97.86	98.35	97.86
DNA adenine methylase (DamP) type II restriction enzyme and methyltransferase subtype: alpha ^{7,10}	MHJ_0623	MHP7448_0622	mhp 641	98.93	98.86	99.75

Table 1. List of CDSs encoding virulence factors in *M. hyopneumoniae* strains J, 7448 and 232, and identities between the corresponding orthologous deduced aminoacid sequences of the different strains (continuation).

CDS product	CDS			Identity (%)		
	J	7448	232	J x 7448	J x 232	7448 x 232
Type II restriction enzyme and methyltransferase subtypes: G.gamma ^{1,7,10}	-	MHP7448_0291	-			
Type III methyltransferase subtype: beta ^{7,10}	MHJ_0423	MHP7448_0388	mhp400	53.17	97.75	97.75
Type III methyltransferase subtype: beta ^{7,10}	MHJ_0383 MHJ_0308 MHJ_0382 MHJ_0399	-	-			
Type III methyltransferase subtype: beta ^{7,10}	-	MHP7448_0410 MHP7448_0316	-			
Type III methyltransferase ^{7,10}	-	-	mhp330 mhp427			
Other possible virulence factors						
<i>Hemolysin-related proteins</i>						
<i>afuC</i> (Hemolysin secretion ATP-binding protein, plasmid - Escherichia coli – TCP family) ^{1,7,10}	MHJ_0379	MHP7448_0383	mhp395	99.87	99.61	99.48
HlyA (TlyA) ^{1,7,10}	MHJ_0159	MHP7448_0163	mhp218	99.16	98.73	98.73
HlyC ^{1,7,10}	MHJ_0643	MHP7448_0643	mhp663	100	100	100
Putative hemolysin ABC transporter ^{1,7}	MHJ_0156	MHP7448_0160	mhp222	99.71	99.85	99.56
<i>Nucleases</i>						
Excinuclease ABC subunit C ^{1,7}	MHJ_0062	MHP7448_0066	mhp070	100	98.81	98.81
Excinuclease ABC subunit B ^{1,7}	MHJ_0648	MHP7448_0648	mhp669	99.09	98.48	98.18
Putative 5'-3' exonuclease ^{1,7}	MHJ_0582	MHP7448_0581	mhp548	99.32	100	99.87
Nuclease lipoprotein ⁷	MHJ_0262	MHP7448_0270	mhp109	98.98	98.21	100
VACB-like ribonuclease II (vacB) ^{7,10}	MHJ_0033	MHP7448_0037	mhp038	99.42	99.71	99.41
Membrane nuclease lipoprotein (mnuA) ^{1,7}	MHJ_0581	MHP7448_0580	mhp597	98.35	98.35	98.90
<i>Oxidative stress-related proteins</i>						
Thiol peroxidase ^{5,7,11}	MHJ_0093	MHP7448_0096	mhp283	100	100	100
Neutrophil activating factor (napA) ^{7,10}	MHJ_0454	MHP7448_0457	mhp456	96.53	100	97.22

Additional criteria to define a CDS product as a virulence factor

- ¹ Probable membrane or secreted protein (according to PSORT).
- ² Experimental evidence of proteolytic processing (Djordjevic *et al.*, 2004).
- ³ Experimental evidence of post-translational modification (phosphorylation) (P. M. Pinto and H. B. Ferreira, unpublished results).
- ⁴ Experimental evidence of antigenicity (our unpublished results).
- ⁵ Environmental stress related.
- ⁶ Variable length of tandem aminoacid repeats between strains.
- ⁷ Orthology to previously described virulence factors in related bacteria.
- ⁸ Previous description as a *M. hyopneumoniae* virulence factor based on experimental studies.
- ⁹ Probably associated to one of the known *M. hyopneumoniae* pathogenicity mechanisms.
- ¹⁰ Component of a possible bacterial pathogenicity-related mechanism.
- ¹¹ Previous description as a virulence factor in others mycoplasmas.
- ¹² Not strain specific, but potentially related to conjugative DNA transfer.

Additional orthology criteria

- ^a Frameshifted p102-related CDSs; orthology based on nucleotide homology (deduced aminoacid sequences with homology below the cutoff value established to define CDS orthologs).
- ^b Identity below the established cutoff value (see Material and Methods); orthology based also on CDS position (between ICEH-related inverted repeats), and tblastx, tblastn, and psiblast with an *e* value of at least $1e^{-10}$.
- ^c Orthologous to 7448 and 232 ICEH CDSs (although strain J does not contains an ICEH).
- ^d Assigned as an ICEH-related CDS based on homology to CDSs from integrative and conjugative elements of *Mycoplasma fermentas* or *Spiroplasma* spp.
- ^e Assigned as an ICEH-related CDS based on position between ICEH-related inverted repeats.

- Not found.

Table 2. Putative cythaderence-related operons in the *M. hyopneumoniae* genome.

Operon name	CDS ¹ products
MgPa operon	MgPa and MgPa-like proteins
LppS/T operon ²	LppS and LppT lipoproteins
p97/p102 operon I	p97 and p102 adhesins
p97/p102 operon II ³	p97-like and p102-like proteins
p97/p102 operon III	p97-like and p102-like proteins
p146 operon	p146 adhesin and hypothetical lipoprotein
p216/p76 operon ²	p216 and p76 adhesins

¹ The corresponding CDS numbers in the *M. hyopneumoniae* J, 7448 and 232 genomes are shown on Table 1.

² Adams *et al.* (2005) consider these as additional p97/p102-related operons, but using different (less stringent) criteria to define paralogous genes than the ones used here.

³ Adams *et al.* (2005) consider two adjacent p102-related CDSs as part of this operon in the 232 strain. Vasconcelos *et al.* (2005) considered these two CDSs as a single frameshifted paralog p102 CDS in the 7448 and J strains.

References

- Adams C, Pitzer J and Minion FC (2005) In Vivo Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* 73:7784-7787.
- Adegboye DS (1978) A review of mycoplasma-induced immunosuppression. *Br Vet J* 134:556-560.
- Allan E and Wren BW (2003) Genes to genetic immunization: identification of bacterial vaccine candidates. *Methods* 31:193-198.
- Assunção P, De la Fe C, Ramirez AS, Llamazares OG and Poveda JB (2005) Protein and Antigenic Variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* Strains by SDS-PAGE and Immunoblot. *Vet Res Commun* 29:563-574.
- Bendjennat M, Blanchard A, Loutfi M, Montagnier L and Bahraoui E (1999) Role of *Mycoplasma penetrans* endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. *Infect Immun* 67:4456-4462.
- Blaser MJ (1993) *Helicobacter pylori*: microbiology of a “slow” bacterial infection. *Trends Microbiol* 1:255-259.
- Brennan PC and Feinstein RN (1969) Relationship of hydrogen peroxide production by *Mycoplasma pulmonis* to virulence for catalase-deficient mice. *J Bacteriol* 98:1036-1040.
- Brenner C, Wroblewski H, Le Henaff M, Montagnier L and Blanchard A (1997) Spiralin, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces T-cell-independent B-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. *Infect Immun* 65: 4322-4329.
- Calcutt MJ, Lewis MS and Wise KS (2002) Molecular genetic analysis of ICEF, an integrative conjugal element that is present as a repetitive sequence in the chromosome of *Mycoplasma fermentans* PG18. *J Bacteriol* 184:6929-6941.
- Casadevall A and Pirofski L (2001) Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 184:337-344.
- Cerdeno-Tarraga AM, Patrick S, Crossman LC, Blakely G, Abratt V, Lennard N, Poxton I, Duerden B, Harris B, Quail MA et al. (2005) Extensive DNA inversions in the *B. fragilis* genome control variable gene expression. *Science* 307:1463-1465.
- Chambaud I, Heilig R, Ferris S, Barbe V, Samson D, Galisson F, Moszer I, Dybvig K, Wroblewski H, Viari A et al. (2001) The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res* 29:2145-2153.
- Chen JR, Lin JH, Weng CN and Lai SS (1998) Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 62:97-110.
- Chen T, Abbey K, Deng WJ and Cheng MC (2005) The bioinformatics resource for oral pathogens. *Nucleic Acids Res* 33:W734-740.
- Cheng ZF, Zuo Y, Li Z, Rudd KE and Deutscher MP (1998) The vacB gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem* 273:14077-14080.
- Chochola J, Strosberg AD and Stanislawski M (1995) Release of hydrogen peroxide from human T cell lines and normal lymphocytes co-infected with HIV-1 and mycoplasma. *Free Radic Res* 23:197-212.
- DeBey MC, Jacobson CD and Ross RF (1992) Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 53:1705-1710.

- Djordjevic SP, Cordwell SJ, Djordjevic MA, Wilton J and Minion FC (2004) Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun* 72:2791-2802.
- Evans DJ Jr, Evans DG, Lampert HC and Nakano H (1995) Identification of four new prokaryotic bacterioferritins, from *Helicobacter pylori*, *Anabaena variabilis*, *Bacillus subtilis* and *Treponema pallidum*, by analysis of gene sequences. *Gene* 153:123-127.
- Glass JI, Lefkowitz EJ, Glass JS, Heiner CR, Chen EY and Cassell GH (2000) The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 407:757-762.
- Gumulak-Smith J, Teachman A, Tu AH, Simecka JW, Lindsey JR and Dybvig K (2001) Variations in the surface proteins and restriction enzyme systems of *Mycoplasma pulmonis* in the respiratory tract of infected rats. *Mol Microbiol* 40:1037-1044.
- Henderson IR, Owen P and Nataro JP (1999) Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* 33: 919-932.
- Herbelin A, Ruuth E, Delorme D, Michel-Herbelin C and Praz F (1994) *Mycoplasma arginini* TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Infect Immun* 62:4690-4694.
- Hsu T and Minion FC (1998a) Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Gene* 214:13-23.
- Hsu T and Minion FC (1998b) Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* 66:4762-4766.
- Kobayashi I (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res* 29:3742-3756.
- Koronakis E, Hughes C, Milisav I and Koronakis V (1995) Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol Microbiol* 16:87-96.
- Layh-Schmitt G and Harkenthal M (1999) The 40- and 90-kDa membrane proteins (ORF6 gene product) of *Mycoplasma pneumoniae* are responsible for the tip structure formation and P1 (adhesin) association with the Triton shell. *FEMS Microbiol Lett* 174:143-149.
- Mei JM, Nourbakhsh F, Ford CW and Holden DW (1997) Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol* 26(2):399-407.
- Minion FC and Jarvill-Taylor K (1994) Membrane-associated hemolysin activities in mycoplasmas. *FEMS Microbiol Lett* 116:101-106.
- Minion FC, Adams C and Hsu T (2000) R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* 68:3056-3560.
- Minion FC, Lefkowitz EJ, Madsen ML, Cleary BJ, Swartzell SM and Mahairas GG (2004) The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol* 186:7123-7133.
- Montecucco C and Rappuoli R (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:457-466.
- Musatovova O, Dhandayuthapani S and Baseman JB (2003) Transcriptional starts for cytoadherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol Lett* 229:73-81.
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr and Deerfield DW (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS* 4:14.

- Oelschlaeger TA and Hacker J (2004) Impact of pathogenicity islands in bacterial diagnostics. *APMIS* 112:930-936.
- Park SC, Yibchok-Anun S, Cheng H, Young TF, Thacker EL, Minion FC, Ross RF and Hsu WH (2002) *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infect Immun* 70:2502-2506.
- Razin S, Yogev D and Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1094-1156.
- Reglier-Poupet H, Frehel C, Dubail I, Beretti JL, Berche P, Charbit A and Raynaud C (2003) Maturation of lipoproteins by type II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem* 278:49469-49477.
- Rey S, Acab M, Gardy JL, Laird MR, deFays K, Lambert C and Brinkman FS (2005) PSORTdb: a protein subcellular localization database for bacteria. *Nucleic Acids Res* 33:D164-168.
- Salaun L, Ayraud S and Saunders NJ (2005) Phase variation mediated niche adaptation during prolonged experimental murine infection with *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 151:917-923.
- Sasaki Y, Ishikawa J, Yamashita A, Oshima K, Kenri T, Furuya K, Yoshino C, Horino A, Shiba T, Sasaki T et al. (2002) The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res* 30:5293-5300.
- Scherm B, Gerlach GF and Runge M (2002) Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigations concerning their role in immunity and infection. *Vet Microbiol* 89:141-150.
- Schmidt JA, Browning GF and Markham PF (2004) *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. *J Bacteriol* 186:5790-5798.
- Schroder G and Dehio C (2005) Virulence-associated type IV secretion systems of *Bartonella*. *Trends Microbiol* 13:336-342.
- Seubert A, Hiestand R, de la Cruz F and Dehio C (2003) A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* 49:1253-1266.
- Staden R, Judge DP and James K (2003) Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. *Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach*. Eds. Stephen A. Krawetz and David D. Womble. Human Press Inc, Totawa, NJ 07512.
- Suter M, Kobisch M and Nicolet J (1985) Stimulation of immunoglobulin-containing cells and isotype-specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific-pathogen-free pigs. *Infect Immun* 49:615-620.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882.
- Trent MS, Worsham LM and Ernst-Fonberg ML (1999) HlyC, the internal protein acyltransferase that activates hemolysin toxin: roles of various conserved residues in enzymatic activity as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 38:9541-9548.
- Vasconcelos AT, Ferreira HB, Bizarro CV, Bonatto SL, Carvalho MO, Pinto PM, Almeida DF, Almeida LG, Almeida R, Alves-Filho L et al. (2005) Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol* 187:5568-5577.
- Wassenaar TM and Gaastra W (2001) Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* 9995: 1-7.

Weinstock, GM (2000) Genomics and bacterial pathogenesis. *Emer Infect Dis* 6:496-504.

Yoshida N, Granger DN, Evans DJ Jr, Evans DG, Graham DY, Anderson DC, Wolf RE and Kviety PR (1993) Mechanisms involved in *Helicobacter pylori* induced inflammation. *Gastroenterology* 105:1431-1440.

Zhang J and Madden TL (1997) PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* 7:649-656.

Zhang Q, Young TF and Ross RF (1994) Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. *Infect Immun* 62:4367-4373.

Zhang Q, Young TF and Ross RF (1995) Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* 63:1013-1019.

Internet Resource Citation

Phred software, www.phrap.org/phredphrapconsed.html

4. Estudo II – Identificação e caracterização de genes *M. hyopneumoniae* com variabilidade entre cepas.

A partir da identificação preliminar de repetições nucleotídicas variáveis em CDSs correspondentes a lipoproteínas, antígenos, adesinas e outros fatores de virulência das cepas J, 7448 e 232 (Estudo I), foi feita uma análise estendida destas repetições no genoma de *M. hyopneumoniae*, incluindo duas outras cepas de *M. hyopneumoniae* (7422 e PMS). O grau de variabilidade entre cepas e o possível significado biológico das variações neste número de repetições foram investigados.

Os resultados desta análise foram reunidos em um artigo publicado na Revista *Veterinary Microbiology*, apresentado a seguir.

Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains.

Artigo publicado na revista *Veterinary Microbiology*, 2006 Sep 10;116(4):258-69.

Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains

Luiza Amaral de Castro^a, Thiago Rodrigues Pedroso^a, Suzana Satomi Kuchiishi^c, Marni Ramenzoni^c, Jalusa Deon Kich^c, Arnaldo Zaha^{a,b}, Marilene Henning Vainstein^a, Henrique Bunselmeyer Ferreira^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^c EMBRAPA Suínos e Aves-Concórdia, SC, Brazil

Received 16 February 2006; received in revised form 3 April 2006; accepted 5 April 2006

Abstract

The *Mycoplasma hyopneumoniae* genome contains at least 22 regions with a variable number of tandem nucleotide repeats (VNTRs) within coding DNA sequences (CDSs). In this work, the VNTR-containing CDSs were analysed in order to evaluate their degree of variation, possible correlations with antigenic properties, and their potential to be used as a basis for a strain typing PCR assay. We have analysed the VNTRs in five *M. hyopneumoniae* strains (J, 7448, 7422, PMS, and 232), based on published genomic sequences and on amplified and sequenced DNA segments. These VNTRs are distributed among 12 genes, most of which encode putative surface proteins, including known adhesins. The number of repeat units in any of the VNTRs is highly variable among the analysed strains, but they are, without exception, translationally in frame, and, therefore, code for a variable number of aminoacid repeats (VNTARs). These VNTARs determine putative structural, physicochemical and antigenic variations in the corresponding proteins, with potential implications for aspects associated to *M. hyopneumoniae* pathogenicity, such as cell adhesion and interactions with the host immune system. Considering that the characterized VNTARs are relatively stable, at least in vitro, and their sizes are strain-specific, we have developed a VNTR-based PCR assay for *M. hyopneumoniae* strain identification, useful for enzootic pneumonia (EP) diagnosis, strain typing, and distinction of circulating field isolates from vaccine strains in animals vaccinated against EP.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Aminoacid repeats; VNTR; Adhesins; Interstrain variability; Strain typing; Enzootic pneumonia

1. Introduction

Swine enzootic pneumonia (EP) is a widespread chronic respiratory disease caused by *Mycoplasma hyopneumoniae*. This bacterium adheres to the pig

* Corresponding author at: Av. Bento Gonçalves, 9500 Bloco IV, prédio 43421, sala 210, Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33167768; fax: +55 51 33167309.

E-mail address: henrique@cbiot.ufrgs.br (H.B. Ferreira).

ciliated respiratory epithelium and causes a strong inflammatory response, leading to tissue damage and immunosuppression, and favoring secondary infections by other pathogens (Thacker, 2004). Genetic and/or antigenic heterogeneity among *M. hyopneumoniae* strains have been associated to differences in virulence (Vicca et al., 2003) and to the variable effects of vaccination against EP between herds (Moreau et al., 2004). However, although several putative virulence-related genes with sequence variability have been identified, it was not yet possible to establish a direct correlation between any *M. hyopneumoniae* genetic variant and virulence (Vicca et al., 2003; Ferreira and Castro, unpublished data).

As for many pathogens, *M. hyopneumoniae* genetic variations directly or indirectly determine effects that are more obvious at the antigenic level. *M. hyopneumoniae* antigen variability among strains have been detected (Assunção et al., 2005b), and such variations are thought to help the bacterium to persist in its host by evading the immune response.

The routes of *M. hyopneumoniae* infection are not always clear and the identification of strain-specific genetic or antigenic variations is necessary and important to follow the spreading of individual clones (Maes et al., 2000). Upon clinical suspect of EP, there is an obvious need for diagnosis confirmation and fast identification of the causative strain. Also, for vaccinated herds, the presence of any *M. hyopneumoniae* circulating field isolates must be promptly distinguished from vaccine strains. In these epidemiological issues, with obvious relevance to improve control strategies, PCR based assays may be interesting alternatives for the currently used and time-consuming isolation and immunological typing (Desrosiers, 2001; Thacker, 2004). A specific 16S rDNA-based polymerase chain reaction (PCR) for fast *M. hyopneumoniae* detection (Mattsson et al., 1995) is available, but it does not allow strain discrimination. The recently reported whole genome sequences of three *M. hyopneumoniae* strains (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005) are expected to facilitate the search for genetic markers for typing purposes and the investigation of their correlation with pathogenesis.

In this study, we have analysed 12 previously identified VNTR-containing CDSs in five different *M. hyopneumoniae* strains (J, 7448, 7422, PMS and 232). The aim of this analysis was to determine of the extant

of variation among strains for each VNTR, to establish correlations with possible antigenicity differences among the corresponding proteins, and to develop a VNTR-based PCR assay to specifically discriminate *M. hyopneumoniae* strains in laboratory cultures from clinical isolates.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and growth

M. hyopneumoniae J (ATCC 25934), 7448, 7422 and Perdue Master Seed (PMS) strains, *Mycoplasma hyorhinnis*, *Mycoplasma flocculare*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* were obtained from EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia, SC, Brazil). *M. hyopneumoniae* J is a non-pathogenic strain with reduced capacity to adhere to porcine cilia, while the 7448, 7422 and PMS strains were isolated from EP field cases (Vasconcelos et al., 2005; Piffer, personal communication); the 7448 strain pathogenicity was experimentally confirmed (Vasconcelos et al., 2005). Mycoplasmas were grown according to Friis (1974), with cultures started with $\sim 1.3 \times 10^5$ cells. *M. hyopneumoniae* 7448 serial passages were performed inoculating 0.1 ml of a 6-day culture ($1-2 \times 10^6$ cells/ml) in 0.9 ml of fresh medium; bacteria were cultured for additional 6 days and the procedure was repeated. *A. pleuropneumoniae* was grown in selective blood agar (S-MBA) medium (Van Overbeke et al., 2002), and *P. multocida* was grown according to Garlinghouse et al. (1981).

2.2. PCR and DNA sequencing

Total DNA extracted according to Vasconcelos et al. (2005) from *M. hyopneumoniae* J, 7448, 7422 and PMS, and from *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida* was used as template in PCR analysis. Primers for the amplification of VNTRs from selected CDSs were derived from the corresponding flanking regions of the *M. hyopneumoniae* J genome sequence (Vasconcelos et al., 2005). Table 1 summarizes the selected CDSs and their corresponding products, and Table 2 presents the primers and the annealing temperatures used for the amplifications of the different VNTR-containing regions. In CDSs containing more than one VNTR,

Table 1

VNTR-containing CDSs and their corresponding protein products from *M. hyopneumoniae* strains J, 7448 and 232

CDS product ^a	Strain		
	J	7448	232
Known adhesins			
P97 adhesin (P97)	MHJ0194	MHP0198	mhp183
P76 membrane protein precursor (P76)	MHJ0494	MHP0497	mhp494
P216 surface protein (P216)	MHJ0493	MHP0496	mhp493
P146 adhesin like-protein (P146)	MHJ0663	MHP0663	mhp684
Membrane or putative membrane proteins^b			
P95 outer membrane protein (P95)	MHJ0096	MHP0099	mhp280
Hypothetical protein (H1)	MHJ0441	MHP0443	mhp445
Hypothetical protein (H2)	MHJ0444	MHP0445	mhp447
Hypothetical protein (H3)	MHJ0350	MHP0355	mhp366
Hypothetical protein (H4)	MHJ0032	MHP0036	mhp037
Hypothetical protein (H5)	MHJ0662	MHP0662	mhp683
Hypothetical protein (H6)	MHJ0442	MHP0444	mhp446
Others			
Conserved hypothetical protein (CH1)	MHJ0089	MHP0092	mhp287

CDS numbers are according to Minion et al. (2004) and Vasconcelos et al. (2005).

^a The abbreviation utilized for the CDS in this work is indicated between parentheses.^b The membrane character for hypothetical proteins was established by PSORT (Nakay and Horton, 1999).

each of them was identified by the CDS abbreviation (Table 1) and the letter 'R' followed by a number corresponding to its order in the CDS, oriented from 5' to 3'. PCR reactions were performed in an automated DNA thermal cycler (Eppendorf Mastercycler[®] perso-

nal, Westbury, NY) for 35 cycles. PCR products were resolved on a 1.2% agarose gel in TBE and visualized by ethidium bromide staining.

M. hyopneumoniae colony PCR was performed directly from isolated colonies grown in solid

Table 2

PCR primers used for the amplification and sequencing of VNTR-containing segments of *M. hyopneumoniae* CDSs

VNTR	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Annealing temperature (°C)
H1	5'-ATCTATGGTATAATGCCAGC-3'	5'-ACCAGAATTATCAGATTCTG-3'	52
H2 R1	5'-AGTTTTGAAACTAATTTAAATAAA-3'	5'-GACAAAGACAAATTTGTGG-3'	55
H2 R2	5'-TCAATAACAAAGCACCTTTC-3'	5'-GAGCTATTAATCCAGGCATC-3'	55
H2 R3	5'-ACGTTAACGGCTTCGCTTAC-3'	5'-CGCCATCTCCTTTAATAAG-3'	60
H3	5'-ATTACCGGAAATAAGAAGTG-3'	5'-AGTTAAAAAAGCGGCTTTTC-3'	60
H4	5'-TCGGGATTTTTCTCTTCTTC-3'	5'-AGGATCTTGTGGTTTTAGCG-3'	60
H5R1/R2 ^a	5'-AAGTAAAAAAGACCTCGAAG-3'	5'-CCAAAGAATTAATCCAAGTC-3'	60
H6R1	5'-AAAAACATTTCTCAGCCAGG-3'	5'-GGATCAAGTCCTCAAGGTC-3'	60
H6R2	5'-TCCAGGGGCAAAGTATCAAG-3'	5'-TTCAAGACGAGTTAGGGTTG-3'	60
CH	5'-GGCAAAAAAATGTGAATGTC-3'	5'-GGCTTTTTGGTATATTCAGTTC-3'	60
P76R1/R2 ^a	5'-TCTGCAACTGAATTATGTGACC-3'	5'-TTGATCTGTGAACCTGAGG-3'	60
P97R1/R1A/R2 ^a	5'-AGCATTTTTCCCTAAAGCAG-3'	5'-GCTTTGTTGATTAGAAGCAC-3'	52
P95	5'-ATTTATCCTTTACTTAGCGG-3'	5'-AAGACAAGTGATATTTTGC-3'	60
P146R1	5'-AGTCACAAAAACCTCAAAGTG-3'	5'-AGGAGAGCTTTGAATTTGAG-3'	60
P146R2	5'-AAGACCAAAAAGTAGGACATAC-3'	5'-AACTCAAGCATCTAAAAGTG-3'	60
P146R3	5'-AAAACCCAAAGTAGTGATTC-3'	5'-TGTATCGGTTTCAGAAGAAG-3'	60
P216R1/R2 ^a	5'-GCAAAGCCAAAATGTAAATG-3'	5'-CCAGTCTTCTCTTTTCTAAC-3'	60

^a Due to the relative proximity of different VNTRs within the same CDS, a single pair of primers was used to amplify all of them in a single amplification product.

medium. Briefly, 1–4 four *M. hyopneumoniae* colonies grown for 10 days at 37 °C on culture plates (Friis, 1974) were collected and resuspended in 50 µL of distilled water. After boiling for 10 min, 5 µL samples were used for PCR, performed as described above. Colony PCR sensitivity was determined essentially as described by Mattsson et al. (1995).

For sequencing, PCR products were purified by ethanol precipitation in presence of tRNA (Sambrook and Russel, 2001) and directly sequenced using the same primers used for amplification. DNA sequencing was carried out on a MegaBACE 1000 automated capillary sequencer (Amersham Biosciences). Only sequences with a PHRED score >20 (Ewing et al., 1998) were considered. Nucleotide sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the accession numbers DQ386456–DQ386478.

2.3. Southern blot analysis

Amplification products (around 100 ng) were resolved on 1.0% agarose gels and transferred to a nylon membrane (HybondTM-N+, GE Healthcare, USA) according to Sambrook and Russel (2001). Sequenced amplification products were used as probes, using the AlkPhos DirectTM Labeling and Detection Systems (GE Healthcare, USA) according to the manufacturer instructions. Hybridizations were carried out overnight at 55 °C and detected by 15 min exposure to O-X-mat Kodak Film (Kodak, USA).

2.4. Comparative sequence analyses

The *M. hyopneumoniae* J and 7448 (Vasconcelos et al., 2005), and 232 (Minion et al., 2004) genome sequences were obtained from GenBank and, for the comparisons, the *M. hyopneumoniae* J sequences were chosen as prototypes. Nucleotide and deduced aminoacid sequences were aligned and compared using the programs Clustal X version 1.83 (Thompson et al., 1997) and GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas et al., 1997).

Deduced aminoacid sequences were analysed with ANTHEPROT 2000 version 6.0 release 1.1.22 software (Deléage et al., 2001) to determine their hydrophobicity, solvent accessibility, and antigenicity

profiles, and to predict transmembranous and surface moieties, and secondary structures. An 11 aa window was used as minimum size for all these analyses.

The EMBOSS Package version 2.10.0 Win 0.8 (Rice et al., 2000) applications Antigenic, Fuzztran, Epestfind, Sigcleave and Patmatmotif were used to predict, respectively, antigenic sites (six aa window), post-translational modifications, proteolytic cleavage sites (five aa window), protein signal cleavage sites (scoring weight value of 3.5), and PROSITE motifs.

3. Results

3.1. Identification and comparison of VNTARs in CDSs of different *M. hyopneumoniae* strains

The comparison of the genomic sequences of *M. hyopneumoniae* strains J, 7448 and 232 allowed the identification of 22 VNTRs within 12 CDSs, whose products include known adhesins and putative membrane proteins (Table 1). These VNTRs are translationally in frame and determine VNTARs in the corresponding proteins of the different strains. To extend the analysis of these VNTARs, their coding sequences were amplified from *M. hyopneumoniae* strains J, 7448, 7422 and PMS and the obtained amplicons were sequenced. Along with those derived from the *M. hyopneumoniae* 232 genome sequence (Minion et al., 2004), these VNTARs were aligned and compared, showing a wide range of length variation among strains (Table 3, Fig. 1), despite of the high degree of conservation (96–100%) of the deduced aminoacid sequences of the non-repeated portions of the orthologous CDSs. In the case of P97, a previously undescribed VNTAR (P97R1A) was identified immediately downstream to the P97R1 VNTAR, with one (in the PMS and 232 strains) to five (in the 7448 strain) TN repeats. Seven out of twelve CDS products presented more than one (two or three) VNTARs. The repeat unit lengths varied from 1 to up to 10 aminoacids and single aminoacid repeat units were the more common (9 out of 21). The number of repeats within corresponding VNTARs of different *M. hyopneumoniae* strains varied from as little as 4–5, for the H1 VNTAR, to as much as 4–20 or 18–44, for the H4 and the P146R3 VNTARs, respectively.

Table 3

Number, aminoacid composition and length of VNTARs found in CDS deduced aminoacid sequences from *M. hyopneumoniae* strains J, 7448, 7422, PMS and 232

CDS	Number of VNTARs ^a	VNTAR ID ^b	Repeat unit ^c	Number of repeats (total length of the repeat region)				
				J	7448	7422	PMS	232
H1	1		NQP(Q)	4 (15)	3 (11)	4 (15)	4 (15)	3 (11)
H2	3	H2R1	Q	18 (18)	7 (7)	7 (7)	13 (13)	12 (12)
		H2R2	S	17 (17)	14 (14)	13 (13)	11 (11)	15 (15)
		H2R3	N	9 (9)	6 (6)	9 (9)	9 (9)	9 (9)
H3	1		[KR]TE(N)(N)	3 (11)	5 (16)	3 (10)	3 (10)	4 (13)
H4	1		QTTQ(KD)	9 (54)	11 (65)	4 (24)	20 (120)	10 (60)
H5	2	H5R1	([NA])[STP] [STP]([STP])	6 (14)	10 (27)	12 (32)	12 (32)	3 (8)
		H5R2	([QK])[EQ] [QK](x)	6 (19)	5 (15)	4 (13)	4 (13)	4 (12)
H6	2	H6R1	S	4 (4)	4 (4)	4 (4)	4 (4)	6 (6)
		H6R2	S	5 (5)	7 (7)	5 (5)	7 (7)	6 (6)
CH	1		N	2 (2)	8 (8)	2 (2)	8 (8)	6 (6)
P76	2	P76R1	(S)(S)G(G)S	5 (17)	5 (17)	5 (17)	5 (17)	7 (22)
		P76R2	EKP[KA][AQ]	5 (25)	6 (30)	5 (25)	5 (25)	4 (20)
P97	3	P97R1	AAKP[EV]	9 (43)	10 (48)	12 (59)	15 (73)	13 (63)
		P97R1A	TN	3 (7)	4 (9)	3 (7)	1 (3)	1 (3)
		P97R2	P[NS]QGKK AEG([ATP])	4 (39)	3 (29)	3 (28)	4 (37)	3 (30)
P95	1		QEK	2 (6)	3 (9)	2 (6)	4 (12)	2 (6)
P146	3	P146R1	[QPS]Q(P)	9 (19)	9 (18)	11 (22)	12 (25)	14 (29)
		P146R2	([ST])SP([AS])	10 (27)	10 (25)	8 (22)	8 (22)	10 (27)
		P146R3	S	18 (18)	44 (44)	40 (40)	19 (19)	21 (21)
P216	2	P216R1	Q	10 (10)	15 (15)	12 (12)	15 (15)	15 (15)
		P216R2	Q	9 (9)	12 (12)	11 (11)	15 (15)	4 (4)

Aminoacid(s) between parentheses may be present or not in that position of a given repeat; 'x' indicates that any aminoacid can be present at that position of a given repeat.

^a Number of VNTARs in the CDS product.

^b Individual VNTARs were identified according to the corresponding VNTRs (Table 2).

3.2. *In silico* survey for putative alterations in *M. hyopneumoniae* protein properties determined by VNTARs

Most of the VNTARs, with exception of p97R1 and P97R2, are predominantly composed of hydrophilic aminoacids (70–100%), with a high content of glutamine, serine and/or threonine. Also, cysteine, isoleucine, methionine, phenylalanine, tryptophan, and tyrosine residues are absent from all VNTARs. This biased aminoacid content is likely to determine different properties in the corresponding proteins of different *M. hyopneumoniae* strains. Since these

properties might be related to aspects relevant for virulence, *in silico* analyses were carried out in order to identify possible alterations in protein features as function of the number of tandem aminoacid repeats presented by each of them.

PSORT analysis of all identified VNTR-containing CDS products suggested they are surface-located molecules. Considering that outer membrane proteins are often antigenic and that antigenicity has been already experimentally demonstrated for P97 (Zhang et al., 1995) and P76 (Pinto et al., unpublished data), we have searched for putative variations in structure and antigenicity profiles of

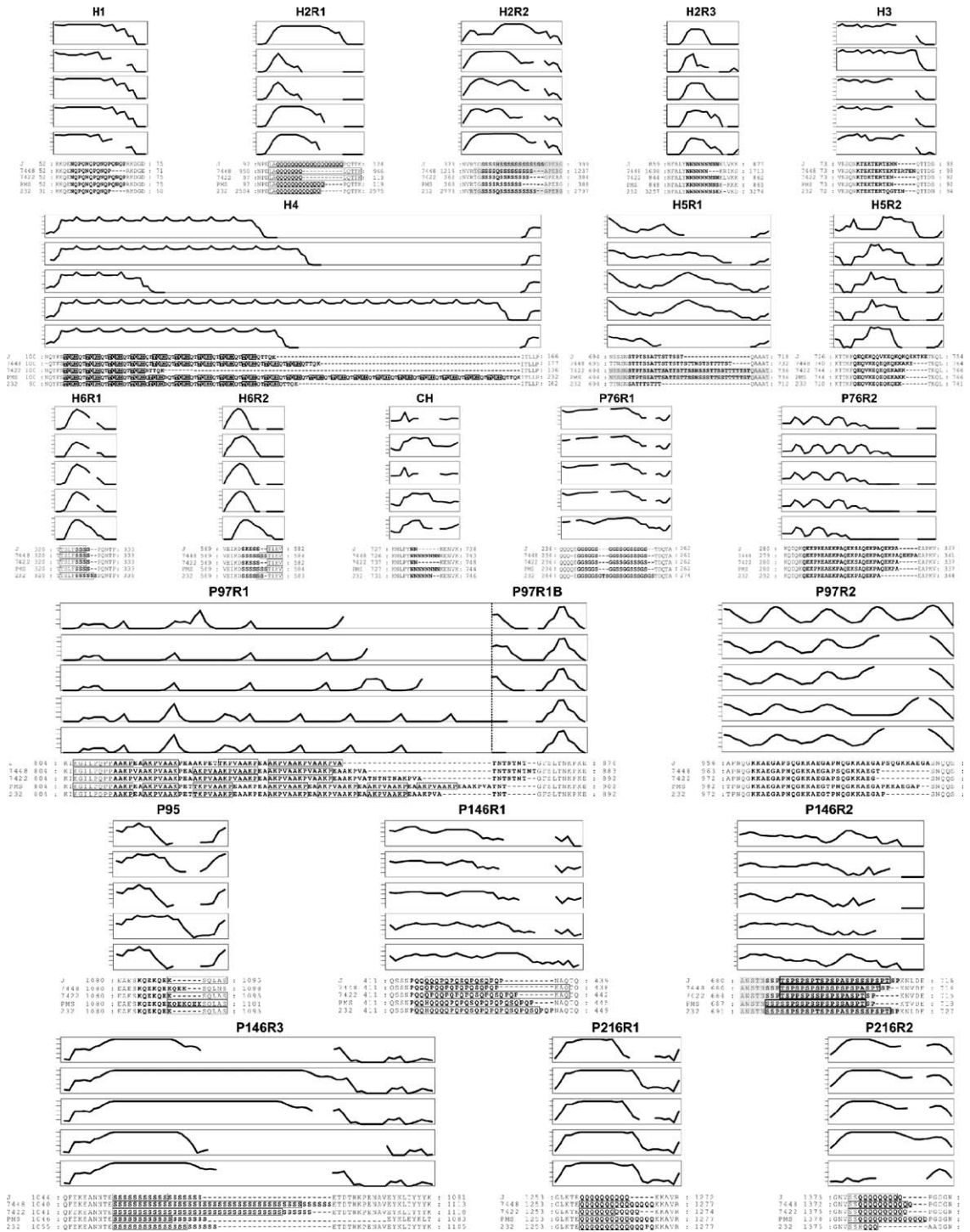


Fig. 1. Comparative antigenicity profiles, antigenic sites, proteolytic cleavage sites, and alignment of sequences of VNTARs of *M. hyopneumoniae* in J, 7448, 7422, PMS, and 232 strains. The graphs and the amino acid sequence alignments correspond only to the VNTARs

the deduced aminoacid sequences of each VNTR-containing CDS. Hydrophobicity and solvent accessibility have been determined, allowing the prediction of secondary structures, and transmembranous and surface moieties. In these analyses, only the VNTAR regions of each CDS product were considered, since no significant variation in any of the analysed parameters was found in the non-variable regions, due to their high degree of conservation among strains.

We have not found significant differences among corresponding VNTARs from different *M. hyopneumoniae* strains regarding predicted transmembrane domains, surface moieties and secondary structures. The hydrophobicity plots, associated with parameters of atomic flexibility and experimental behavior of synthetic peptides, suggest that all the VNTARs constitute antigenic moieties (Fig. 1), which are likely to be exposed in the *M. hyopneumoniae* cell surface. The antigenicity plots of the VNTARs in different *M. hyopneumoniae* strains (Fig. 1) suggest that the presence of additional repeat units within a VNTAR either creates new antigenic peaks or extends the ones present in the shorter VNTAR counterparts. For instance, P97R1 in the PMS strain, P97R2 in the J strain, and the P76R2 in the 7448 strain present at least one additional putative antigenic peak in comparison to the other analysed strains. For H1, H2R1, H2R2, H2R3, H3, H4, H5R1, H5R2, H6R1, H6R2, CH, P76R1, P95, P97R1B, P146R1, P146R2, P146R3, P216R1, and P216R2, the VNTARs comprise a single antigenic peak, which is extended by the presence of additional repeat units in some strains.

The epitope content of each VNTAR was also analysed and the identified epitopes are indicated (boxed) in Fig. 1. Although all 22 analysed VNTARs constitute putatively antigenic moieties, antigenic sites (epitopes) were identified in only 11. In most cases, a single epitope was found within the VNTAR, which was extended by the increased number of repeat units in some strains. This situation was

Table 4

Amplicon sizes for VNTRs found in CDS from *M. hyopneumoniae* strains J, 7448, 7422, and PMS

VNTRs	Amplicon size (bp)			
	J	7448	7422	PMS
H1	409	397	409	409
H2R1	462	429	429	447
H2R2	589	580	577	574
H2R3	738	729	738	737
H3	687	682	679	679
H4	649	685	559	847
H5R1/R2 ^a	436	511	520	520
H6R1	975	975	975	975
H6R2	540	546	540	546
CH	643	652	642	652
P76R1/R2 ^a	331	346	331	331
P97R1/R2 ^a	760	781	808	850
P95	334	343	334	355
P146R1	329	326	335	347
P146R2	500	496	487	487
P146R3	468	549	537	452
P216 R1/R2 ^a	680	695	680	701

^a Due to the relative proximity of different VNTRs within the same CDS, they were amplified in a single amplification product using a single pair of primers (see Table 2).

observed for H2R1, H2R2, H6R1, P95, P146R1, P146R2, P146R3, P216R1, and P216R2. For H2R1, H6R1, and P216R2, the predicted epitopes are in the VNTAR boundaries and also include aminoacids (3–8) of the flanking non-variable region. In the cases of H6R2, and P95, predicted epitopes are mostly within a flanking non-variable region, but include few aminoacids (1–7) of the VNTAR for some of the analysed strains. It is noteworthy that, for P97R1, the repeat unit comprises a full predicted epitope, whose number in the VNTAR is increased with the number of repeat units, and, for H2R2, just one or two aminoacid substitutions within the VNTAR were enough to exclude this region as an epitope in the 7422 and PMS strains.

Another possible significant aspect of the presence of VNTARs would be their possible involvement in the generation of alternative post-translational

(in bold) and 5–10 aminoacids of the flanking non-variable aminoacid regions. Each VNTAR is identified as described in Section 2 above of the related set of graphs and alignments. The graphs show the antigenicity profile of the VNTARs, expressed in percentages according to Parker et al. (1986); scale lines (on the left of each graph) correspond to 20%. Each graph corresponds to one strain, in the same order used and indicated in the alignments. The coordinates of the aligned aminoacid regions in the corresponding protein sequences are showed for all strains. Predicted epitopes are boxed and the putative proteolytic cleavage sites and phosphorylation sites are shaded in gray and black, respectively.

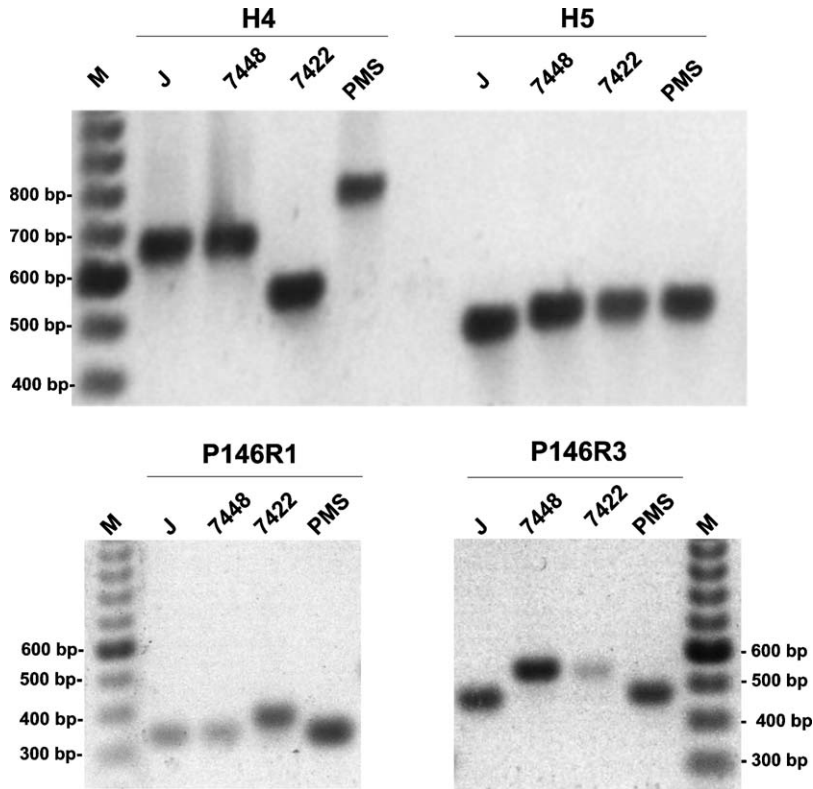


Fig. 2. Electrophoretic analysis of PCR amplification products of P146R1, P146R3, H4 and H5 VNTRs from *M. hyopneumoniae* strains J, 7448, 7422, and PMS. VNTR-containing regions were amplified from genomic DNA of each strain using specific primers (Table 2) and the resulting amplicons were resolved in 1.2% agarose gels. Selected bands from the molecular size marker (100 bp Ladder, Invitrogen) are indicated.

modification sites in different strains, which would result in alternative forms of the corresponding proteins. Therefore, we have performed a search for possible sites for proteolytic cleavage or phosphorylation within *M. hyopneumoniae* VNTRs. As showed in Fig. 1 (shaded in gray), the H2R2, H5R1, and P146R2 VNTRs present putative proteolytic cleavage sites of variable extension in different strains, a feature not found for any of the other VNTRs. Some of the VNTRs, namely H2R2, H5R1, P76R1, and P97R1, may be part of putative signal-peptides, and their variable extension would implicate in alternative signal-peptide cleavage sites (data not shown).

The search for putative phosphorylation sites evidenced their presence only in the H4 VNTR. This VNTR present the consensus phosphorylation site [ST] \times (2)[DE] reiterated 9, 11, 4, 20 and 10 times in strains J, 7448, 7422, PMS and, 232, respectively (Fig. 1, shaded in black).

3.3. Standardization of a VNTR-based PCR test for *M. hyopneumoniae* strain typing

The range of variation of the sizes of amplification products from *M. hyopneumoniae* VNTRs between strains (Table 4) suggested that at least some of them could be resolved by standard agarose gel electrophoresis. Assuming that VNTR lengths would be stable and strain-specific, this would provide an easy way to identify and distinguish *M. hyopneumoniae* isolates and/or strains. Therefore, we selected H4, H5, P146R1, and P146R3 primers to generate PCR amplicons from strains J, 7448, 7422, and PMS.

The generated amplicons, in the size ranges of 559–847 bp, 436–520 bp, 332–362 bp, and 487–500 bp, respectively, were then resolved by electrophoresis in 1.2% agarose gels. As can be seen in Fig. 2, based on the analysis of the amplification products corresponding to two or three of the selected VNTRs, one could

discriminate unambiguously any of these four strains. The 232 strain would also be discriminated, as simulated based on its VNTR sequences (data not shown).

We have tested the stability of H4, H5, P146R1, and P146R3 VNTRs among 100 isolated colonies of *M. hyopneumoniae* 7448 strain after 2, 5, and 10 culture passages. All amplification products were resolved by agarose gel electrophoresis and no detectable size variation was observed (data not shown). The identities of at least 75 independent colony amplification products from each passage were confirmed by Southern blot, using sequenced VNTRs as probes, and the precise number of repeats in the amplicons was determined by sequencing 25 of them. Sequencing analysis (data not shown) indicated that the number of repeats in all four analysed VNTRs remained stable even after 10 culture passages. Regarding sensitivity, the standardized PCR tests were able to generate detectable amplification products from cultures with as little as 4.7×10^2 CCU/ml (data not shown).

We have also performed amplifications using H4, H5, P146R1, and P146R3 primers and DNA samples from *M. hyorhinnis*, *M. flocculare*, *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida*. In the conditions tested, no amplification products were detected in any of these reactions, indicating that the test based on the proposed primers is specific.

4. Discussion

In this study, 22 variable tandem repeat regions in the protein coding regions of 12 *M. hyopneumoniae* putative genes were analysed. The numbers of repeat units in each of these CDSs of five *M. hyopneumoniae* strains were compared, and a high degree of variation was observed. It has been assumed that VNTRs arise as consequence of illegitimate or homologous recombination or DNA polymerase slippage during replication (Rocha and Blanchard, 2002) and their presence, maintenance and variation in the genome of a given species may have important implications. VNTRs in intergenic regions, also observed in *M. hyopneumoniae* (Vasconcelos et al., 2005), may promote recombination events, responsible for genome rearrangements (Rocha and Blanchard, 2002), or

generate variable promoter configurations, responsible for phase variation, such as that of *Mycoplasma gallisepticum* haemagglutinin genes (Liu et al., 2000). On the other hand, when these VNTRs occur within CDSs, they may have significances beyond that of mere recombination hot-spots, as they generate protein variants with a distinct number of aminoacid repeats (VNTARs), whose functional implications remain to be investigated.

In *M. hyopneumoniae*, all the VNTRs within CDSs are translationally in frame in all analysed strains, which is suggestive of selective pressure for both variation and translational integrity of the corresponding proteins. Structurally, the analysed VNTARs present a common hydrophilic character and it is possible that longer repetitive regions of a protein hinder access to some of its binding moieties (Feeney et al., 2003). Considering that such moieties could mediate specific or nonspecific interactions capable of modulating processes from adhesion to host immune response, these VNTARs are expected to mediate important biological functions.

Functional implications of VNTARs are further evidenced by the fact that they predominantly occur in putative surface proteins, including known adhesins. For P97, whose surface location was experimentally confirmed (Zhang et al., 1995), it was shown that a minimal number of seven or eight repeats in the R1 region (here named P97R1) was necessary to mediate *M. hyopneumoniae* adhesion to swine cilia (Hsu and Minion, 1998; Minion et al., 2000). Besides, Jenkins et al. (2006) have demonstrated that both R1 and R2 (here P97R2) are required for the binding ability of this adhesin to heparin, a component of the host respiratory surfaces. However, it has been suggested that P97 is not the sole determinant of adhesion, since even *M. hyopneumoniae* strain J, which has a low adherence activity and is avirulent, present more than eight repeat units in P97R1 (Hsu and Minion, 1998; Vasconcelos et al., 2005). Therefore, other adhesins, along with P97, probably determine the adhesion capacity of a given *M. hyopneumoniae* strain, which must be an important determinant of pathogenicity. In this scenario, the fact that at least three other putative adhesins (P76, P146, and P216) also present VNTARs in different strains further increase the complexity of the adhesion process, whose elucidation will require functional studies of individual adhesins.

VNTARs in *M. hyopneumoniae* surface proteins may also have important immunological significance. At least theoretically, they all comprehend antigenic moieties, whose extension and epitope content change as a function of the number of repeat units present in a given strain, and, of the 60 different theoretical predicted epitopes contained in the analysed VNTARs, at least 27 were experimentally confirmed by Yang et al. (2005) using a phage display approach.

The lack of a cell wall should make mycoplasmas inherently susceptible to complement lysis, as well as to the antibody-mediated immunity (Simmons and Dybvig, 2003). However, mycoplasmas are, in a certain extent, capable of resisting to complement lysis, a capacity that, in the case in *Mycoplasma pulmonis*, is dependent on the number of tandem repeats in a variable surface antigen (Simmons et al., 2004). Mycoplasma resistance to antibody-mediated immunity has also been related, at least to a certain degree, to surface antigen variation (Simmons and Dybvig, 2003). Therefore, for *M. hyopneumoniae*, it is reasonable to hypothesize that antigenic divergence determined by VNTARs could play a role in a possible mechanism of evasion of host immunity. This, as well as a possible effect of modulation of the host immune response (Thanawongnuwech and Thacker, 2003) would contribute to the *M. hyopneumoniae*'s adaptive capability in the swine host.

VNTAR-dependent adhesion or immunological variants could also be potentially determined by post-translational processing involving aminoacids within the repeats. Therefore, we have systematically searched for potential proteolytic cleavage and phosphorylation sites within VNTRS. Proteolytic cleavage sites were found in all of the analysed deduced aminoacid sequences, but in only three cases they are within VNTARs (H2R2, H5R1, and P146R2). For P97, putative proteolytic cleavage sites are not within P97R1, P97R1A or P97R2, suggesting that these VNTARs are not involved in the generation of the previously demonstrated P97 proteolytic products (Djordjevic et al., 2004). In *M. hyopneumoniae* 7448 proteomic analyses (Pinto et al., unpublished data), it was found evidence of a significant degree of chemical modification of aminoacids to generate both pI and molecular weight variants of several proteins. Since phosphorylation is one of the most

common modifications (Klumpp and Kriegelstein, 2002), we have tried to identify putative phosphorylation sites within VNTARs. A series of these sites was found in the H4 VNTR, suggesting that the corresponding protein could be differentially phosphorylated in different strains as a function of the VNTAR. However, the actual functionality of the identified putative phosphorylation sites and the possible significance of the consequent variable H4 phosphorylation state among strains remain to be experimentally verified.

The fact that the characterized VNTARs present significant differences in size among strains allowed the development of a PCR assay for *M. hyopneumoniae* strain identification. In addition to the observed practicability and reproducibility of the experimental procedure, another important aspect to be considered in order to validate this assay is the stability in vivo of the VNTRS used as genetic markers. No variation in size or sequence of the amplification products was detected in any of the individual colonies or passages, suggesting that, at least in culture medium, these VNTRS do not present detectable variations for up to 10 serial passages (Assunção et al., 2005a). However, it is reasonable to assume that in natural infection conditions, under pressure of the host immune response, there would be an increase in the rate of variation. The actual level of VNTR variation in *M. hyopneumoniae* from swine infections will require experimental analysis to be determined and this will possibly provide an interesting insight of a possible selection process of genetic variants in response to host defenses.

From the practical point of view, the standardized assay, using four distinct VNTRS, allowed the discrimination of five *M. hyopneumoniae* strains. For the isolation of new strains, these four VNTRS may not be enough for unambiguous discrimination, which would require the use of others VNTRS from the repertoire of the 22 herein characterized. Considering that the developed PCR assay may be able to detect and type a strain of *M. hyopneumoniae* from a population with as little as 4.7×10^2 CCU/ml, it would be sensitive enough for diagnosis and typing from biopsy material (our unpublished results) or, possibly, from nasal swabs (samples with 10^2 – 10^4 CCU/ml, Otagiri et al., 2005).

5. Conclusion

In conclusion, the analysis of 22 VNTRs from 12 CDSs of five *M. hyopneumoniae* strains suggests that the encoded VNTARs could determine structural and antigenic variations in the corresponding proteins, with potential implications for functional aspects associated to *M. hyopneumoniae* pathogenicity, such as cell adhesion and interactions with the host immune system. Besides, the proposed VNTR-based PCR assay may be a useful tool for *M. hyopneumoniae* strain typing and EP diagnosis.

Acknowledgements

We thank Roberta Campos and Eliana Grimm, for the DNA sequencing, Dr. Irene S. Schrank, for the critical reading of this manuscript, and Bianca Gervini, for technical assistance in *M. hyopneumoniae* cultures. L.A.C. and T.P. are recipients of a CAPES predoctoral fellowship and a CNPq ITI fellowship, respectively. This work was supported by grants from MCT/CNPq and FAPERGS.

References

- Assunção, P., Diaz, R., Comas, J., de Galarreta, C.M., Gonzalez-Llamazares, O.R., Poveda, J.B., 2005a. Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* growth by flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 98 (5), 1047–1054.
- Assunção, P., Fe Cde, L., Ramirez, A.S., Llamazares, O.G., Poveda, J.B., 2005b. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. *Vet. Res. Commun.* 29 (7), 563–574.
- Deléage, G., Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., 2001. ANTHE-PROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput. Biol. Med.* 31 (4), 259–267.
- Desrosiers, R., 2001. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *J. Swine Health Prod.* 9 (5), 233–237.
- Djordjevic, S.P., Cordwell, S.J., Djordjevic, M.A., Wilton, J., Minion, F.C., 2004. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect. Immunol.* 72, 2791–2802.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8 (3), 175–185.
- Feeney, K.A., Wellner, N., Gilbert, S.M., Halford, N.G., Tatham, A.S., Shewry, P.R., Belton, P.S., 2003. Molecular structures and interactions of repetitive peptides based on wheat glutenin subunits depend on chain length. *Biopolymers* 72 (2), 123–131.
- Friis, N.F., 1974. Resistance of porcine mycoplasmas to heat. *Acta Vet. Scand.* 15 (2), 283–285.
- Garlinghouse Jr., L.E., DiGiacomo, R.F., Van Hoosier Jr., G.L., Condon, J., 1981. Selective media for *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica*. *Lab. Anim. Sci.* 31 (1), 39–42.
- Hsu, T., Minion, F.C., 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect. Immunol.* 66 (10), 4762–4766.
- 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. *Infect. Immunol.* 74 (1), 481–487.
- Klumpp, S., Krieglstein, J., 2002. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur. J. Biochem.* 269, 1067–1071.
- Liu, L., Dybvig, K., Panangala, V.S., van Santen, V.L., French, C.T., 2000. GAA trinucleotide repeat region regulates M9/pMGA gene expression in *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immunol.* 68 (2), 871–876.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., de Kruij, A., 2000. Herd factors associated with the seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Vet. Res.* 31 (3), 313–327.
- Mattsson, J.G., Bergstrom, K., Wallgren, P., Johansson, K.E., 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 33 (4), 893–897.
- Minion, F.C., Adams, C., Hsu, T., 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect. Immunol.* 68 (5), 3056–3060.
- Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M., Mahairas, G.G., 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232 the agent of swine mycoplasmosis. *J. Bacteriol.* 186 (21), 7123–7133.
- Moreau, I.A., Miller, G.Y., Bahnson, P.B., 2004. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally infected with *M. hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 22 (17–18), 2328–2333.
- Nakay, K., Horton, P., 1999. PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 24 (1), 34–35.
- Nicholas, K.B., Nicholas Jr., H.B., Deerfield II, D.W., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew News* 4, 14.
- Otagiri, Y., Asai, T., Okada, M., Uto, T., Yazawa, S., Hirai, H., Shibata, I., Sato, S., 2005. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. *J. Vet. Med. Sci.* 67 (8), 801–805.
- Parker, J.M.R., Guo, D., Hodges, R.S., 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25, 5425–5432.

- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A., 2000. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet.* 16 (6), 276–277.
- Rocha, E.P., Blanchard, A., 2002. Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. *Nucleic Acids Res.* 30 (9), 2031–2042.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Simmons, W.L., Denison, A.M., Dybvig, K., 2004. Resistance of *Mycoplasma pulmonis* to complement lysis is dependent on the number of Vsa tandem repeats: shield hypothesis. *Infect. Immunol.* 72 (12), 6846–6851.
- Simmons, W.L., Dybvig, K., 2003. The Vsa proteins modulate susceptibility of *Mycoplasma pulmonis* to complement killing, hemadsorption, and adherence to polystyrene. *Infect. Immunol.* 71 (10), 5733–5738.
- Thacker, E.L., 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Swine Health Prod.* 12 (5), 252–254.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L., 2003. Interleukin-10, interleukin-12, and interferon-gamma levels in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunol.* 16 (3), 357–367.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25 (24), 4876–4882.
- Van Overbeke, I., Chiers, K., Charlier, G., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2002. Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 88 (1), 59–74.
- Vasconcelos, A.T., Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., Bonatto, S.L., Carvalho, M.O., Pinto, P.M., Almeida, D.F., Almeida, L.G., Almeida, R., Alves-Filho, L., et al., 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J. Bacteriol.* 187 (16), 5568–5577.
- Vicca, T.J., Stakenborg, D., Maes, P., Butaye, J., Peeters de Kruijff, A., Haesebrouck, F., 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet. Microbiol.* 97, 177–190.
- Yang, W.J., Lai, J.F., Peng, K.C., Chiang, H.J., Weng, C.N., Shiuan, D., 2005. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *J. Immunol. Methods* 304 (1–2), 15–29.
- Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F., 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect. Immunol.* 63 (3), 1013–1019.

5. Estudo III - Produção de antígenos e anti-soros e padronização de ensaios imunológicos para detecção de *M. hyopneumoniae*.

5.1. Introdução

Estudos das propriedades antigênicas de diversos isolados de campo ou de referência de *M. hyopneumoniae* revelam a presença de diversas proteínas imunodominantes, incluindo uma proteína citosólica com atividade de lactato desidrogenase (p36) (Stipkovits *et alli*, 1991; Haldimann *et alli*, 1993; Frey *et alii*, 1994). Estudos comparativos com outros micoplasmas comumente encontrados em suínos demonstram que a proteína p36 é uma proteína espécie-específica altamente conservada para *M. hyopneumoniae* (Stipkovits *et alli*, 1991). Soros hiperimunes contra a proteína recombinante p36 mostraram não reatividade com outros micoplasmas de suínos, incluindo *M. flocculare*, *M. hyorhinae* e *Acholeplasma laidlawii* (Strasser *et alii*, 1991). Caron *et alii* (2000b), demonstraram que anticorpos monoclonais contra a proteína p36 expressada em *E. coli*, permitiram a identificação de *M. hyopneumoniae* em experimentos de imunofluorescência e ELISA indireto, porém os resultados não possuíam correlação entre suínos experimentalmente e naturalmente infectados. Uma vantagem adicional da proteína p36, é que o gene que a codifica não possui em sua seqüência codificante nenhum códon TGA para triptofano, que em *E. coli* é um códon de terminação, o que poderia interferir na terminação prematura da tradução da proteína (Haldiman *et alii*, 1993).

A proteína NrdF pertence a uma classe de enzimas responsável pela conversão de ribonucleotídeos em deoxiribonucleotídeos para a síntese de DNA (Thealander *et alii*, 1979); podendo também detoxificar a hidroxipuréia, conferindo assim, resistência a este potente inibidor da síntese de DNA (Fagan *et alii*, 1996). Durante uma sondagem imunológica utilizando soro de porcos hiperimunes de um banco para *M. hyopneumoniae*, Fagan *et alii* (1996) encontraram um antígeno de 11 kDa com seqüência de aminoácidos homóloga a subunidade R2 de uma ribonucleotídeo redutase classe I de procariotos. O antígeno foi utilizado como vacina e mostrou-se que este protegia os suínos de formação de lesões no pulmão quando estes eram experimentalmente desafiados com *M. hyopneumoniae*. Além disso, o uso desta proteína para diagnóstico já foi patenteado (*US Patent 6555338*) como antígeno em *S. aureus*, o que reforça o interesse nesta proteína como um antígeno vacinal em potencial.

Neste trabalho, clones recombinantes das proteínas p36 e NrdF de *M. hyopneumoniae* foram expressos, purificados e soros policlonais foram produzidos em coelhos, como parte de uma estratégia para a produção de reagentes imunodiagnósticos da PMS. Adicionalmente, foram realizados estudos preliminares de avaliação da imunoreatividade e especificidade destas proteínas e anti-soros, para posterior padronização de ensaios imunológicos utilizando estes reagentes.

5.2. Materiais e métodos.

5.2.1. Microrganismos e cultivo.

5.2.1.1. *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Neste trabalho foram utilizadas as cepas 7448, J, 7422 e PMS de *M. hyopneumoniae*. As cepas J (ATCC 25934), 7448, 7422 e Perdue Master Seed (PMS) foram obtidas da EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia, SC, Brasil). *M. hyopneumoniae* J é uma cepa não patogênica com reduzida capacidade de aderir aos cílios do epitélio pulmonar de suínos, enquanto as cepas 7448, 7422 e PMS foram isoladas de casos de PMS a campo (Vasconcelos *et alii*, 2005; Piffer, comunicação pessoal); a patogenicidade da cepa 7448 foi experimentalmente confirmada (Vasconcelos *et alii*, 2005). O cultivo das diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* foi realizado no CNPSA/EMBRAPA (Concórdia, SC), utilizando o meio de cultura e o protocolo, descritos por Friis (1974).

5.2.1.2. *Escherichia coli*.

Foram utilizadas as linhagens BL21 e XL1-*blue* de *E. coli* (Sambrook & Russell, 2001). Colônias de *E. coli* foram isoladas em meio LB agar contendo 100 µg/mL de ampicilina e multiplicadas em meio LB líquido contendo 50 µg/mL de ampicilina (Sambrook & Russell, 2001).

5.2.1.3. Outras bactérias.

M. hyorhinitis, *M. flocculare*, *A. pleuropneumoniae* e *P. multocida* foram obtidas do CNPSA/EMBRAPA (Concórdia, SC). Os micoplasmas foram cultivados de acordo com Friis (1974). *A. pleuropneumoniae* foi cultivado em meio agar sangue seletivo (S-MBA) (Van Overbeke *et alii*, 2002) e *P. multocida* foi cultivada de acordo com Garlinghouse *et alii* (1981).

5.2.2. Plasmídeos.

Os plasmídeos recombinantes utilizados foram: pGEX-NrdF e pGEX-p36, que possuem insertos de 1199pb e 1394pb, respectivamente (Costa, comunicação pessoal). Os insertos de NrdF e p36 foram clonados em pGEX-4T1 (Pharmacia Biotech), nos sítios de *Bam*HI e *Xma*I (NrdF) e *Bam*HI e *Eco*RI (p36). A massa molecular estimada das proteínas NRDF e P36 de fusão com GST é de aproximadamente 67 kDa e 65 kDa, respectivamente. Estes plasmídeos foram transformados em células de *E. coli* XL1-*blue* para obtenção de DNA plasmidial, extraído conforme o método de lise alcalina, descrito por Sambrook & Russell (2001).

5.2.3. Transformação bacteriana

Células de *E. coli* BL21 foram transformadas com 5 ng dos plasmídeos recombinantes pGEX-NrdF e pGEX-p36 (separadamente), plaqueadas em meio sólido com ampicilina (item 5.3.1.2) e incubadas a 37°C por 16 horas. Para transformação foi utilizado o método de eletroporação segundo o protocolo de Sambrook & Russell (2001).

5.2.4. PCR

Amostras do lobo apical do pulmão e traquéia de suínos naturalmente infectados foram coletadas *post-mortem*. Uma pequena porção destes tecidos foi congelada e o restante fixado 24-48 h em 10% de formol tamponado. Uma porção destas amostras fixadas em formol foi embebida em parafina de acordo com protocolo padrão, e seccionadas em secções de aproximadamente 30 µM em micrótomo Spencer Lens (American Optical). O DNA de *M. hyopneumoniae* foi extraído separadamente das amostras congeladas, das fixadas e das embebidas em parafina, com um *kit* comercial (UltraClean™ Tissue DNA Kit, MoBio) de acordo com as instruções do fabricante, para cada tipo de amostra. A PCR foi realizada conforme descrito por Castro *et alii* (2006), e foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Stakenborg *et alii* (2004). Como controle positivo da reação de PCR, células de *M. hyopneumoniae* foram adicionadas nas amostras (1×10^2 - 1×10^5 células).

5.2.5. Obtenção de extratos celulares

5.2.5.1. Extrato celular total de *M. hyopneumoniae*

Para obtenção dos extratos celulares totais de *M. hyopneumoniae* 7448 (ECTMH 7448) para imunização e titulação de anti-soros foi utilizado o protocolo desenvolvido por Baumgartner & Nicolet (1984), com algumas modificações. Primeiramente, foi efetuada a lise das células cultivadas conforme o item 5.3.1.1, coletadas por centrifugação (10 min a 10.000 g) e ressuspensas em 1/100 volumes de 25 mM de Tris-Cl (pH 7,2). Esta suspensão foi, então, sonicada doze vezes, em banho de gelo, durante 45 s, com intervalos de 1 min entre cada ciclo, na potência de 40 Hz (Sonicador modelo 250, Brandson). Após sonicação, a amostra/material foi centrifugada durante 5 min a 10.000 g e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foi acrescentado Tween-20 para uma concentração final de 2%. O tubo foi, então, incubado a 37 °C durante 1h30min, sob agitação branda e centrifugado por 15 minutos a 10.000 g. O precipitado foi ressuspendido em 25 mM de Tris-Cl (pH 7,2) em uma proporção de 1/100.

Extratos celulares totais de *M. hyopneumoniae* J, 7422 e PMS foram obtidos com o mesmo protocolo. Para obtenção dos extratos celulares totais de *E. coli*, e das outras bactérias (descritas no item 5.2.1.3), foi utilizado o mesmo método de extração, suprimindo-se apenas a etapa de incubação com Tween-20.

Todos os extratos celulares assim obtidos foram analisados qualitativamente por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS (Laemmli, 1970), e a concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

5.2.6. Expressão, solubilização e purificação das proteínas de fusão com GST

5.2.6.1. Otimização da expressão das proteínas de fusão p36 e NrdF de *M. hyopneumoniae* em *E. coli*

Várias condições de expressão dos clones recombinantes p36-GST e NrdF-GST foram testadas, variando-se a temperatura (25, 30 ou 37 °C), o tempo de indução (3, 5 e 16 horas) e a concentração de indutor (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 5 mM de IPTG) no protocolo descrito abaixo (item 5.2.5.2), onde as condições ideais padronizadas estão apresentadas.

5.2.6.2. Indução da expressão de proteínas recombinantes

Para a indução das proteínas recombinantes foi feito o pré-inóculo de uma colônia transformada com o plasmídeo recombinante em 20 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubado a 37 °C a 200 rpm por 14 h. Após incubação, 2 mL deste pré-inóculo foram transferidos para 200 mL de meio LB sem antibiótico, e incubados a 37 °C, 200 rpm, por 2 h. A indução da expressão das proteínas foi realizada com a adição de 0,2 mM de IPTG (Invitrogen), e as mesmas condições do inóculo foram mantidas por mais 5 h. Antes da indução foi retirada uma amostra de 1 mL da cultura, centrifugada a 10.000 g, por 2 min. e o precipitado foi armazenado a -20 °C, para análise posterior. Após as 5 h de indução, as células foram coletadas a 7.000 g por 5 min e armazenadas a -20 °C.

5.2.6.3. Lise das células e solubilização de proteínas

O precipitado de células obtidas após a indução foi ressuspensão em PBS 1 X gelado, para uma concentração de 8% do volume da cultura. Lisozima, para uma concentração de 100 µg/mL, foi adicionada e as amostras incubadas em gelo por 15 min. Após, foram adicionados 5 mM de DTT e 5 mM de EDTA, e as amostras incubadas sob leve agitação por 2 h.

As amostras foram então sonicadas em banho de gelo, conforme item 5.3.4.1. e diferentes tratamentos para solubilização da proteína recombinante foram testados separadamente: 1% de CTAB; 2-6 M de hidrocloreto de guanidina; 0,1-2% de SDS; 5-10 mM de DTT; 2% de Tween 20; 1-7 M de Uréia; 0,1-1% sarcosil; 10 mM de tampão CAPS/sarcosil. Após adição dos reagentes às amostras sonicadas estas foram incubadas a temperatura ambiente sob leve agitação por pelo menos 45 minutos e centrifugadas a 7.000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante da centrifugação foi coletado em novo tubo e o precipitado ressuspensão em PBS 1 X (8% do volume do inóculo).

5.2.6.4. Purificação de proteínas de fusão usando cromatografia de afinidade.

Para a purificação das proteínas de fusão em cromatografia de afinidade foram seguidas as recomendações do fabricante da resina (Amersham Biosciences). Foram utilizados 1 mL de resina em cada purificação em colunas plásticas descartáveis (BioRad).

5.2.6.5. Hidrólise com trombina.

As proteínas de fusão ligadas nas colunas de purificação foram hidrolisadas com trombina. Foram utilizadas 10 unidades de trombina para cada mg de proteína de fusão ligada à coluna ou 80 unidades para cada mL de resina. A hidrólise foi realizada a temperatura ambiente por 16 horas. Após a hidrólise, as proteínas sem a porção GST foram eluídas da coluna e armazenadas a -20 °C.

5.2.6.6. Diálise

Membranas de diálise com poros de 12 kDa (Sigma Chemical Co.) foram preparadas conforme descrito por Sambrook & Russell (2001).

Alíquotas de 4,3 mL de sobrenadante de NrdF-GST e P36-GST tratados com CAPS (separadamente) foram dialisadas contra 100 volumes de PBS sob agitação em banho de gelo por 12 h, com trocas de tampão a cada 3 h. As amostras foram estocadas a -20 °C.

5.2.7. Eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

5.2.7.1. SDS-PAGE

SDS-PAGE das proteínas extraídas, precipitadas e eluídas foi realizada, segundo o método de Laemmli (1970), utilizando uma cuba de gel vertical (Miniprotean 2, BioRad).

5.2.7.2. Coloração com Coomassie R-250

Após a eletroforese, os géis foram imersos em solução corante de 0,1% de azul de Coomassie R-250; 40% de metanol e 10% de ácido acético, por duas horas e depois imerso em solução descorante de 40% metanol e 10% ácido acético, até o aparecimento das bandas.

5.2.7.3. Coloração com prata.

Após a eletroforese, os géis foram imersos por 40 minutos em solução fixadora (50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,05% de formaldeído) e incubados três vezes de 20 minutos cada, em solução contendo 50% de metanol. Após, os géis foram pré-tratados incubando-os por 1 minuto em solução contendo 1 mM de tiosulfato de sódio, seguido de duas lavagens de 20 segundos/cada com água MilliQ. Os géis foram então corados por imersão em solução de 12 mM de nitrato de prata e 0,077% de formaldeído por 20 minutos a 4 °C, seguido de mais duas lavagens de 20 segundos/cada com água MilliQ gelada.

Finalmente, os géis foram revelados em solução contendo 0,566 M de carbonato de sódio, 0,05% de formaldeído e 0,02 mM de tiosulfato de sódio, até o surgimento das bandas. A reação foi parada com 50% de metanol ou 1% de ácido acético.

5.2.8. Quantificação de proteínas.

O método utilizado foi o microensaio descrito por Bradford (1976). A 160 µL de cada amostra, ou diluição, foram adicionados 60 µL de reagente de Bradford (BioRad), incubado à temperatura ambiente por 15 minutos e a seguir, foi feita a determinação da absorbância a 595 nm.

Albumina sérica bovina (BSA), de 8 µg a 70 µg.mL⁻¹ (p/v), foi utilizada para curva padrão.

5.2.9. Concentração das amostras.

Quando necessário, as amostras eram concentradas por liofilização utilizando-se aparelho CentriVap (Labconco), ou precipitadas com TCA/acetona.

5.2.9.1. Precipitação com TCA/acetona.

As amostras a serem concentradas foram misturadas 1:1 com solução contendo 20% de TCA saturado em acetona, incubadas a 4 °C por 16 h. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 40 minutos e o precipitado lavado três vezes com acetona, e deixado à temperatura ambiente até a evaporação da acetona. O precipitado foi então ressuspendido no volume desejado.

5.2.10. Soros utilizados neste trabalho.

Foi utilizada uma soroteca específica para *M. hyopneumoniae* constituída de soros de suínos doentes (infectados naturalmente) e de soros de suínos infectados experimentalmente por via aéreo-traqueal produzidos na CNPSA-EMBRAPA (CNPSA, dados não publicados).

Em adição, foram feitos experimentos de imunização por inoculação intramuscular em suínos, utilizando extrato celular total de *M. hyopneumoniae* 7448 (ECTMH7448) e, em coelhos, utilizando as proteínas recombinantes produzidas neste trabalho.

Todos os procedimentos de imunização de suínos e a obtenção de soros de alguns animais naturalmente infectados foram efetuados em colaboração com a equipe do CNPSA-EMBRAPA (Concórdia, SC).

Tabela 2. Relação de soros teste e controle, utilizados neste trabalho.

Identificação	Descrição	Animal	Origem
(E+)	Controle positivo ELISA (padrão)	Suíno	CNPSA
(E-)	Controle negativo ELISA (padrão)	Suíno	CNPSA
29 (71/97)	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
2 (60/97)	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
21 (85/97)	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
2 (58/97)	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
68 (58/98)	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
8804	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
11504-12	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
2604-2	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
2604-8	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
2604-18	Soro positivo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
21104	Soro negativo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
82 (48/98)	Soro negativo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
82 (51/98)	Soro negativo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
65 (49/98)	Soro negativo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
65 (48/98)	Soro negativo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
67 (49/98)	Soro negativo no ELISA-T	Suíno	CNPSA
530	Soro hiperimune contra <i>M. hyopneumoniae</i> J	Coelho	CNPSA
MF (06/97)	Soro hiperimune contra <i>M. flocculare</i>	Coelho	CNPSA
MHY	Soro hiperimune contra <i>M. hyorhinis</i>	Coelho	CNPSA
SPF (-)	Soro de suíno <i>specific pathogen free</i> para <i>M. hyopneumoniae</i> (controle negativo)	Suíno	CNPSA
711 (21/08/03)	Soro de suíno imunizado com ECTMH7448	Suíno	CNPSA
714 (21/08/03)	Soro de suíno imunizado com ECTMH7448	Suíno	CNPSA
718 (21/08/03)	Soro de suíno imunizado com ECTMH7448	Suíno	CNPSA
608 T(18/06/03)	Testemunha ¹ experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
788 T(18/06/03)	Testemunha ¹ experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
682 T(18/06/03)	Testemunha ¹ experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
558 C(18/06/03)	Contato ² experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
688 C(18/06/03)	Contato ² experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
689 C(18/06/03)	Contato ² experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
702 C(18/06/03)	Contato ² experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA

Tabela 2. Relação de soros teste e controle, utilizados neste trabalho (continuação).

Identificação	Descrição	Animal	Origem
704 C(18/06/03)	Contato ² experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
618 I(18/06/03)	Inoculado experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
687 I(18/06/03)	Inoculado experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
693 I(18/06/03)	Inoculado experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
695 I(18/06/03)	Inoculado experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
696 I(18/06/03)	Inoculado experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
701 I(18/06/03)	Inoculado experimento de inoculação com <i>M. hyopneumoniae</i> 7448	Suíno	CNPSA
PAb-p36MH	Soro anti-p36 de <i>M. hyopneumoniae</i>	Coelho	Este trab.
PAb-NrdFMH	Soro anti-NrdF de <i>M. hyopneumoniae</i>	Coelho	Este trab.
MAb-GST	Anticorpo monoclonal anti-GST	Camund.	LAGEF

Abreviaturas: LAGEF – Laboratório de Genômica Estrutural e funcional; CNPSA - Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves; ECTMH – Extrato celular total de *M. hyopneumoniae*; Camund. – camundongo.

¹Soro de suíno não inoculado e em baía separada dos suínos inoculados.

²Soro de suíno não inoculado, mas em contato com os suínos inoculados.

5.2.11. Obtenção e caracterização de amostras de soro e tecido de suínos doentes

Com o objetivo de obter novas amostras de soro de suínos naturalmente infectados, 55 suínos provenientes de diferentes granjas de terminação e que apresentavam sintomas como diminuição de peso, foram abatidos, necropsiados, seu sangue coletado, e amostras do pulmão e da traquéia recolhidas, para posterior análise.

As amostras de soro foram ensaiadas em um ELISA-ETMH7448 e as amostras de tecido tiveram a presença de *M. hyopneumoniae* determinada por PCR e imunohistoquímica.

5.2.12. Imunização de animais e produção de anti-soros

Os experimentos de imunização de suínos foram realizados no CNPSA/EMBRAPA. Foram utilizados leitões com 35 dias de idade, da raça Landrace e com sorologia negativa ao teste de ELISA-T. Estes leitões eram provenientes de um rebanho SPF (*specific pathogen free*) com relação a doenças respiratórias, estabelecido por histerectomia e mantido sob condições de estrito controle de entradas e saídas de pessoas no ambiente, bem como controle ambiental.

Nos experimentos em coelhos, foram utilizados animais machos, com no mínimo 3 kg, sem doenças aparentes.

Para obtenção de anti-soros hiperimunes contra *M. hyopneumoniae*, suínos e coelhos foram imunizados por inoculação intramusculares de extrato emulsificado de

M. hyopneumoniae ECTMH7448 (1 mg) até o aparecimento de uma resposta imune considerada satisfatória em testes de ELISA e/ou imunoblot. Este extrato emulsificado foi preparado através da emulsão com adjuvante completo de Freud (Sigma Chemical Co.), na proporção de 1:1 com o ECTMH7448 para a primeira imunização e com adjuvante incompleto de Freud (Sigma Chemical Co.) nas demais.

Nos experimentos de imunização de coelhos utilizando-se as proteínas recombinantes purificadas, foi utilizado o mesmo protocolo descrito acima, mas com 200 µg por inoculação.

5.2.13. Titulação de anticorpos

Os anti-soros obtidos através dos procedimentos de imunização de suínos foram titulados no CNPSA/EMBRAPA por testes de ELISA-T (Piffer *et alii*, 1998) e novamente titulados em nosso laboratório por *imunoblot* contra extrato total de *M. hyopneumoniae* 7448, utilizando anticorpos anti-suíno (IgG - Sigma Chemical Co; IgA - Serotec; IgM - Kpl) ou anti-coelho IgG conjugados a fosfatase alcalina ou a peroxidase (Sigma Chemical Co.).

5.2.13.1. Imunoblots

Imunoblots das proteínas dos extratos celulares totais de micoplasma foram feitos de acordo com o protocolo descrito por Mori *et alii* (1988). Membranas de nitrocelulose sensibilizados com 1 µg das proteínas purificadas foram incubadas por 2 h com os anti-soros a serem titulados em diversas diluições seriadas. A reação imune obtida foi revelada após a incubação durante 1 h com o conjugado apropriado - em uma diluição previamente determinada - seguida por um período final de incubação em solução reveladora contendo o substrato de cada enzima de acordo com o conjugado utilizado (peroxidase: diaminobenzidina + peróxido de hidrogênio; fosfatase alcalina: 5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolilfosfato p-Toluideno + azul de nitrotetrazólio) (Sigma Chemical Co.).

5.2.14. Adsorção

Quando necessário, foi feita a adsorção dos soros contra extratos de *E. coli*. Para a adsorção, extratos celulares de *E. coli* foram diluídos 1:10, em PBS e incubados por 2 h em presença de membranas de nitrocelulose. Essas membranas foram bloqueadas e depois incubadas durante 1 h com o soro diluído 1:5, em PBS. O título do soro foi determinado por imunoblot.

5.2.15. ELISA com antígenos recombinantes p36 e NrdF

Para a padronização do ELISA foram utilizadas microplacas de 96 poços, com fundo plano (Falcon, modelo 3192). Diluições seriadas dos antígenos (1 ng – 2µg) foram preparadas em 300 µL de PBS ou carbonato/bicarbonato e colocadas, em triplicatas de 100 µL, em cada poço da microplaca, e incubadas por 16 h a 4 °C. Após incubação os poços foram lavadas 5 vezes com 200 µL em solução de lavagem (PBS + 0,01% Tween 20) do ELISA. A diluição de conjugados (1:100 – 1:12800) e dos soros (1:100 – 1:2000), o tempo e o tipo de solução de bloqueio, o tempo de incubação do soro primário (1, 3 e 16 h), seguido do tempo de incubação com o conjugado (30 min, 2 h, 3 h), foram testados para cada antígeno e a otimização baseada na diluição onde a distinção entre os soros controle positivo e negativo foram mais evidentes. Dois diferentes substratos cromogênicos (o-fenilenodiamina e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram ensaiados para a revelação do ELISA. Para este teste, diferentes concentrações dos conjugados com peroxidase, foram preparadas em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e utilizadas para sensibilizar uma microplaca por 16 h a 4 °C, e após 5 lavagens com solução de lavagem do ELISA, foram adicionados 150 µL de solução contendo cada um dos substratos e incubado por 15 min no escuro. Após este tempo, foram adicionados 50 µL de ácido sulfúrico 12% e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplaca a 492 nm.

Para estabelecer o ponto de corte da reação entre soros reagentes e não reagentes foram usados seis animais controles negativos, cujos soros estão descritos no item 5.2.10. O ponto de corte foi calculado sobre estas amostras de soros, utilizando-se a média aritmética dos valores de absorbância, acrescentando-se ao valor, três desvios padrão da média. Novos soros negativos foram obtidos ao longo deste trabalho e incorporados neste cálculo, assim foram utilizados 25 soros negativos para compor este valor final.

5.2.16. ELISA extrato total de *M. hyopneumoniae*

Para a padronização de um ELISA diagnóstico de PMS, semelhante ao ELISA-T de uso corrente no CNPSA/EMBRAPA, que pudesse ser aplicado em nosso laboratório na avaliação de novas amostras de soros de suínos doentes e na titulação dos já disponíveis, foram testadas diversas variações do protocolo utilizado no CNPSA/EMBRAPA (Kich, comunicação pessoal).

Microplacas foram sensibilizadas com 26 ng por poço de antígeno diluído em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas em câmara úmida a 4 °C por 16 h e

lavadas 5 vezes com solução de lavagem de ELISA. O soro primário era diluído 1:50 - 1:1000 em bloto ELISA e incubado por 2 h. Após a lavagem da placa (5 X) foi adicionado o conjugado anti-IgG (1:200 - 1:10.000), por 2 h e foram procedidas mais 10 lavagens com tampão fosfato-NaCl e incubadas com 150 µL de solução de OPD (Sigma Chemical Co.) por 15 min. A reação foi parada pela adição de 12% de ácido sulfúrico e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplaca a 492 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata e o teste repetido 2 x.

Os ensaios do ELISA ECTMH7448 foram realizados diluindo-se os soros dos suínos doentes controles em 50, 100, 200 e 500 vezes e soros de suínos imunizados em 50, 100, 200, 500 e 1000 vezes. Verificou-se nas diluições 1:200 e 1:500 dos soros de suínos doentes, havia uma diminuição dos valores de absorbância dos soros de suínos positivos, com uma leve tendência de aproximação de valores de animais negativos. Assim, optou-se pela diluição de 100 vezes. Para o estabelecimento do ponto de corte da reação entre soros positivos e negativos trabalhou-se com antígeno de *M. hyopneumoniae* na concentração de 26 ng de proteína por poço e conjugado diluído 1:2000. As 6 amostras de soros dos animais-controle negativos foram diluídos 1:100 para a obtenção das densidades ópticas, cálculo da média e o desvio padrão. Para as condições estudadas o ponto de corte ficou estabelecido em 0,186.

5.2.17. Imuno-histoquímica

Os leitões de idades variadas foram necropsiados e as lesões morfológicas compatíveis com PMS, coletadas e submetidas a exames histopatológicos e identificação de *M. hyopneumoniae* pela técnica de imunoperoxidase (Cheikh Saad *et alii*, 2003), utilizando os anticorpos produzidos através da imunização de suínos por inoculação intramuscular do extrato celular de *M. hyopneumoniae*, soros hiperimmune produzido em coelho, anti-p36 e anti-NrdF.

5.3. Resultados

5.3.1. Otimização da expressão das proteínas p36 e NrdF em *E. coli*

Várias condições de expressão dos clones recombinantes p36-GST e NrdF-GST foram testadas, variando-se a temperatura, o tempo e a concentração de indutor. Houve expressão em todas as condições testadas, mas o nível de expressão das proteínas de fusão NrdF-GST e p36-GST foi maior com indução a 37 °C por 5 h com 0,2 mM de IPTG (Figura 7). As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* predominantemente na forma insolúvel, como demonstrado por SDS-PAGE do sobrenadante e do precipitado após a lise celular. Observa-se também a presença de produtos truncados destas proteínas, mais evidente para a proteína NrdF-GST. O rendimento total de proteínas de fusão nesta etapa não foi possível de ser quantificado, devido à insolubilidade das mesmas, mas o rendimento de proteína solúvel nestas condições foi de 0,3 mg/L de cultura para ambas as proteínas.

Diversos agentes solubilizantes foram testados para a solubilização das proteínas de fusão NrdF-GST e p36-GST (Figura 8). Os tratamentos utilizando 1% de CTAB, 2-6 M de cloreto de guanidina, 1-2 M de uréia, 2% de Tween 20, 0,1-1% de SDS, 0,1-1% de sarcosil ou 2% de Triton X-100 não foram capazes de solubilizar as proteínas, enquanto os tratamentos com 2% de SDS, 7 M de uréia, apresentaram uma percentual de solubilização de aproximadamente 50% da proteína; no entanto, as proteínas assim solubilizadas não foram capazes de se ligar à resina (dados não mostrados). Já o tratamento com 5 mM de DTT, foi capaz de solubilizar aproximadamente 50% da proteína p36-GST, mas não a proteína NrdF. Os melhores resultados foram obtidos após o tratamento com 10 mM de CAPS/sarcosil (para ambas as proteínas), que solubilizou praticamente toda a proteína. Antes dos procedimentos de purificação das proteínas recombinantes, foram feitos testes de ligação das proteínas de fusão à resina da cromatografia. Tais testes demonstraram que as proteínas de fusão solubilizadas com CAPS/sarcosil mantiveram a propriedade de ligação à resina, não sendo necessária a diálise das amostras para remoção do agente solubilizador antes cromatografia (dados não mostrados).

5.3.2. Purificação das proteínas recombinantes p36 e NrdF

Os extratos solubilizados em CAPS/sarcosil foram utilizados para purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade em resina de glutationa-Sepharose

4B seguida por hidrólise com trombina para separação da porção correspondente à GST (Figura 9). O rendimento total obtido foi de 3 mg e de 2,3 mg por litro de cultura da bactéria, respectivamente, para a p36 e a NrdF recombinantes.

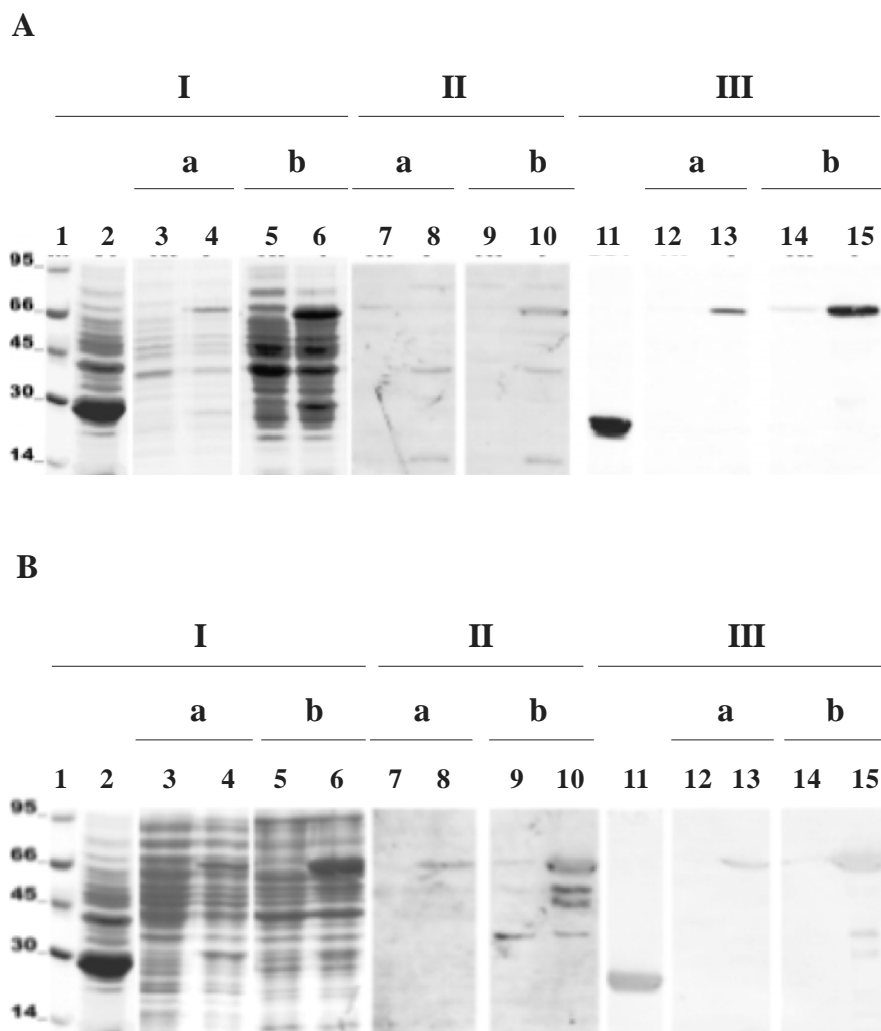


Figura 7. Análise eletroforética (I) e por imunoblot (II e III) do extrato celular de *E. coli* expressando as proteínas recombinantes p36-GST (A) e NrdF-GST (B) de *M. hyopneumoniae*. Géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% corados com azul de Coomassie foram eletro-transferidos para membrana de nitrocelulose e um imunoblot foi realizado. (II) Imunoblot utilizando como soro primário o soro hiperimune anti-*M. hyopneumoniae* adsorvido contra extrato de *E. coli* (1:100), e como soro secundário anti-coelho IgG conjugado com fosfatase alcalina (1:2500); (III) imunoblot utilizando anticorpo monoclonal contra GST (1:2000) e revelado pelo método da peroxidase (IgG anti-camundongo 1:2000); a, sobrenadante; b, precipitado; 1, marcador; 2, vetor induzido; 3, 5, 7, 9, 12 e 14, não induzido; 4, 6, 8, 13, e 15, induzido; e 11, Glutathiona-S-transferase

purificada. As massas moleculares das proteínas do marcador estão indicadas à esquerda de cada figura.

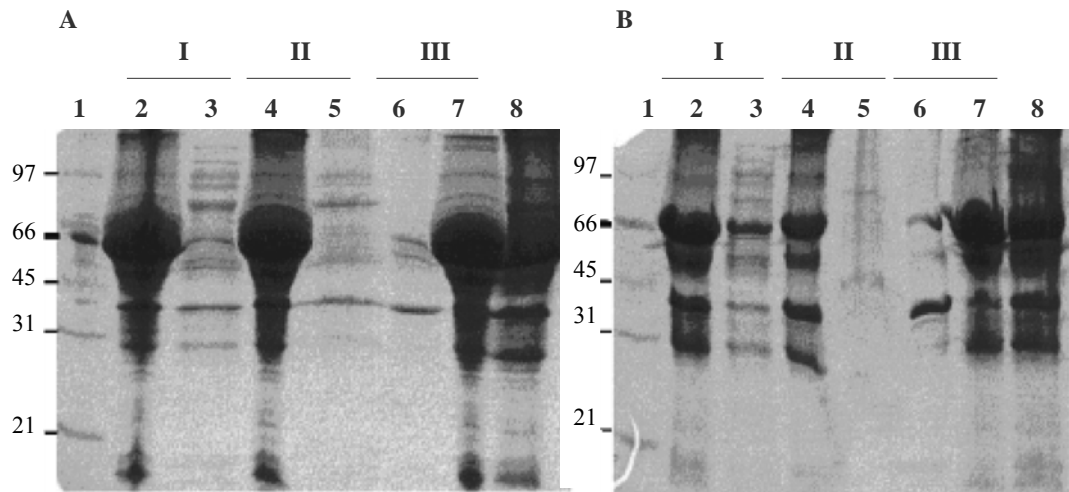


Figura 8. Solubilização das proteínas de fusão NrdF-GST (A) p36-GST (B). Os extratos protéicos foram tratados com DTT (I), Tween-20 (II) e CAPS/sarcosil (III), conforme indicado. O sobrenadante (3, 5, 7) e o precipitado (2, 4, 6, 8) de cada extrato antes e após o tratamento foram então separados por SDS-PAGE em géis com concentração de 12%, que foram corados com azul de Coomassie. As proteínas de fusão aparecem na forma de bandas dominantes na altura correspondente à massa molecular de 66 kDa. Os marcadores de massa molecular (kDa) estão indicados à esquerda de cada gel (1).

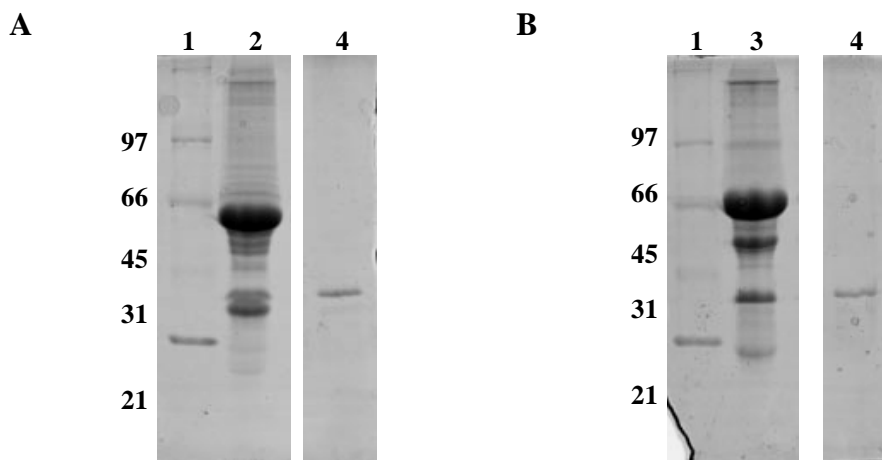


Figura 9. Purificação das proteínas recombinantes p36 (A) e NrdF (B) em coluna de afinidade. Frações de um extrato protéico contendo as proteínas de fusão p36-

GST (2) e NrdF-GST (3) aplicado em coluna de afinidade Glutathiona-Sepharose, e as frações eluídas da coluna após a clivagem das proteínas de fusão com trombina (4) foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida-SDS 12% e coradas com azul de Coomassie. Os marcadores de massa molecular (kDa) estão indicados à esquerda de cada gel.

5.3.3. Produção de anticorpos policlonais monoespecíficos contra p36 e NrdF.

As proteínas NrdF e p36 recombinantes purificadas foram utilizadas na imunização de coelhos, para a produção dos soros hiperimunes correspondentes. Estes soros, em análise por *imunoblot* (dados não mostrados), reconheceram as proteínas recombinantes especificamente nos extratos de *E. coli* em diluições de até 1:100 ou 1:200 para as proteínas recombinantes NrdF e p36, respectivamente. Uma fraca reatividade foi observada contra *E. coli* para ambas as proteínas, em ambos os testes.

Para avaliação adicional da especificidade destes anti-soros frente a extratos de outras bactérias contra as quais existe risco potencial de reatividade cruzada, foram realizados imunoblot e ELISA utilizando como antígenos extratos celulares de *E. coli*, *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* 7448, J, 7422 e PMS e as proteínas purificadas.

Apenas o anti-soro contra p36 mostrou-se específico para *M. hyopneumoniae* 7448, J, 7422 e PMS tanto no imunoblot, quanto em ELISA. O soro anti-NrdF mostrou uma reatividade cruzada fraca contra a proteína p36 purificada, e contra as outras bactérias (dados não mostrados).

Além da avaliação da especificidade das proteínas recombinantes p36 e NrdF por imunoblot, foi realizado um estudo preliminar para avaliar a antigenicidade destas proteínas frente a um painel de 10 soros de suínos naturalmente infectados, 3 soros de suíno imunizados com extrato total de *M. hyopneumoniae*, e 6 soros de suínos experimentalmente inoculados com *M. hyopneumoniae*, através de ELISA.

Apesar de os soros hiperimunes terem apresentado reatividade contra p36 e NrdF, apenas 8 soros de suínos naturalmente infectados demonstraram alguma reatividade quando testados contra a proteína p36 e 7 quando testados contra a proteína NrdF. Com relação aos soros de suínos experimentalmente inoculados, apenas 4 apresentaram reatividade contra as proteínas recombinantes (dados não mostrados).

5.3.4. Ensaios de imuno-histoquímica com os soros anti-p36 e anti-NrdF.

Os soros policlonais monoespecíficos produzidos em coelhos contra as proteínas NrdF e p36 recombinantes purificadas foram utilizados na padronização de um ensaio de imuno-histoquímica para diagnóstico da PMS. Somente o soro anti-p36 apresentou reação positiva na imuno-histoquímica contra cortes de pulmão de suínos doentes (Figura 10), cuja presença de *M. hyopneumoniae* também foi confirmada por PCR e ELISA ECTMH7448, sendo que esta reação foi de intensidade menor do que a reação do controle utilizando-se soro de coelho hiperimune contra *M. hyopneumoniae*. Porém, o soro anti-p36 apresentou uma vantagem importante, a presença de menor reação inespecífica de fundo, principalmente quando adsorvido com fígado de suíno SPF, quando comparado ao controle positivo (dados não mostrados). O soro anti-NrdF não apresentou reação positiva nas condições testadas (dados não mostrados).

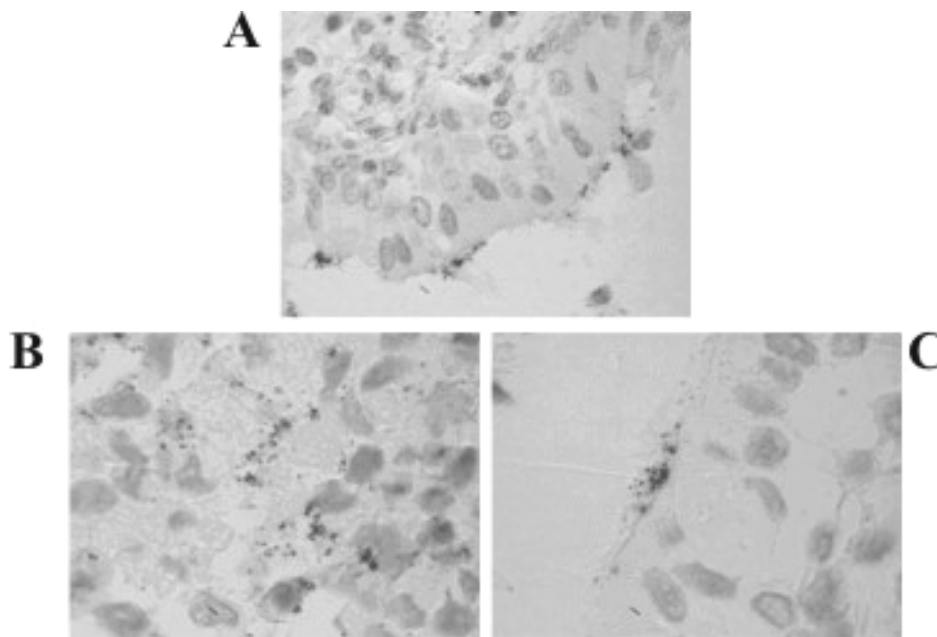


Figura 10. Reatividade do soro anti- p36 contra células de *M. hyopneumoniae*, no pulmão de suínos doentes. Secções de pulmão de suínos doentes, cuja presença de *M. hyopneumoniae* foi independentemente confirmada por PCR e ELISA ECTMH7448, foram incubadas com diluições de 1:200 de soro anti-p36 (B, C) e com 1:1000 de soro hiperimune produzido em coelho (A) por 2 h. Observa-se marcação positiva (marrom) no interior dos brônquios (A, C), e no exsudato celular intrabronquial (B). Em azul observa-se o núcleo das células corado com hematoxilina. Aumento: 1000 X.

5.3.5. Caracterização de amostras de tecido e soro de suínos doentes quanto a presença de *M. hyopneumoniae*.

Durante o decorrer deste trabalho, foram coletadas 55 novas amostras de soro e tecido de suínos que apresentavam sintomas de infecção por *M. hyopneumoniae*. Em uma primeira análise, 38 (60,1%) dos animais necropsiados apresentaram lesões macroscópicas típicas de *M. hyopneumoniae* (Tabela 3), variando a percentagem afetada do pulmão: 13 animais (23,6%) com até 10% do pulmão lesionado; 10 (18,2%) com 20-30% do pulmão comprometido, 8 (14,5%) com 30-50% e, finalmente, 7 animais (12,7%) com mais de 50% do pulmão lesionado.

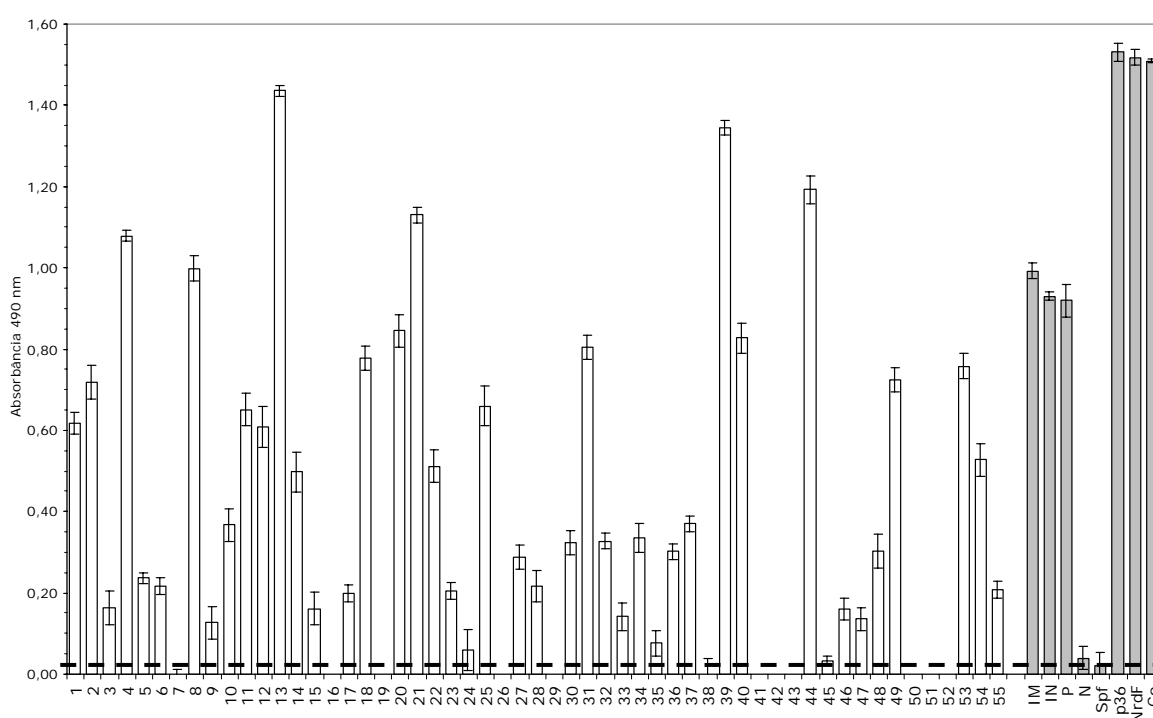


Figura 11. ELISA-ECTMH7448 das amostras de soro de suínos doentes (□). Aliquotas de soro de suínos doentes (1: 200) foram incubadas (2 h) em microplacas contendo antígeno ECTMH7448 (26 ng); após, foram incubadas com anti-IgG de suínos/coelho conjugado com peroxidase (1: 2000), revelado com OPD e a absorbância a 492 nm foi plotada no gráfico. (—) Ponto de corte; (■) soros controle: IM, soro de suíno imunizado com ECTMH7448 (1:2000); IN, soro de suíno inoculado experimentalmente com *M. hyopneumoniae* (1:200); P, soro controle positivo no ELISA-T (1:200); N, soro controle negativo no ELISA-T (1:200); SPF, soro de suíno SPF para *M. hyopneumoniae* (1:200); p36, soro anti-p36; NrdF, soro anti-NrdF; Co, soro de coelho hiperimune contra *M. hyopneumoniae*.

Das amostras de sangue analisadas por ELISA-ECTMH7448, 40 (70,9%) foram positivas no ELISA-ECTMH7448 (Figura 11, Tabela 3). Para as amostras de tecido, 35 (63,6%) foram positivas nos testes de PCR para a presença de *M. hyopneumoniae* (Tabela 3).

Como se pode observar, 5 amostras foram positivas no ELISA, mas negativas na PCR, e destas amostras, 1 não apresentava lesão macroscópica, 3 tinham até 10% de área afetada no pulmão e 1 tinha entre 20-30% do pulmão afetado. Não foi observada nenhuma amostra positiva na PCR, mas negativa no ELISA.

As amostras que tiveram valores de absorbância mais altos no ELISA (0,75-1,5) foram as dos animais que apresentaram mais de 30% de área pulmonar afetada, com exceção da amostra 18, com apenas 10% de área afetada.

Tabela 3. Análise por PCR e ELISA-ECTMH7448 das amostras de sangue e tecido coletadas de suínos com sintomas de infecção por *M. hyopneumoniae*. A numeração das amostras segue a mesma ordem utilizada na Figura 11.

Amostra	Identificação	Área pulmonar afetada (%)	ELISA ¹	PCR ²
1	N0001/1205	10-20	++	+
2	N0002/1205	> 50	+++	+
3	N0003/1205	0	+	-
4	N0004/1205	> 50	+++	+
5	N0005/1205	<10	+	+
6	N0006/1205	<10	+	+
7	N0007/1205	0	-	-
8	N0008/1205	> 50	+++	+
9	N0009/1205	10-20	+	-
10	N0010/1205	10-20	++	+
11	N0011/1205	20-30	++	+
12	N0012/1205	20-30	++	+
13	N0013/1205	> 50	+++	+
14	N0014/1205	30-50	+++	+
15	N0015/1205	20-30	++	+
16	N0016/1205	0	-	-
17	N0017/1205	10	+	+

Tabela 3. Análise por PCR e ELISA-ECTMH7448 das amostras de sangue e tecido coletadas de suínos com sintomas de infecção por *M. hyopneumoniae* (continuação).

Amostra	Identificação	Área pulmonar afetada (%)	ELISA¹	PCR²
18	N0018/1205	10	+++	+
19	N0019/1205	0	-	-
20	N0020/1205	30-50	+++	+
21	N0021/1205	> 50	+++	+
22	N0022/1205	20-30	++	+
23	N0023/1205	10-20	+	+
24	N0024/1205	0	+/-	-
25	N0025/1205	10	++	+
26	N0026/1205	0	-	-
27	N0027/1205	10	++	+
28	N0028/1205	<10	+	+
29	N0029/1205	0	-	-
30	N0030/1205	30-50	++	+
31	N0031/1205	30-50	+++	+
32	N0032/1205	20-30	++	+
33	N0033/1205	10	+	-
34	N0034/1205	10	++	+
35	N0035/1205	0	-	-
36	N0036/1205	10	++	+
37	N0037/1205	10	++	+
38	N0038/1205	0	-	-
39	N0039/1205	> 50	+++	+
40	N0040/1205	30-50	+++	+
41	N0041/1205	0	-	-
42	N0042/1205	0	-	-
43	N0043/1205	0	-	-
44	N0044/1205	> 50	+++	+
45	N0045/1205	0	-	-
46	N0046/1205	10	+	-

Tabela 3. Análise por PCR e ELISA-ECTMH7448 das amostras de sangue e tecido coletadas de suínos com sintomas de infecção por *M. hyopneumoniae* (continuação).

Amostra	Identificação	Área pulmonar afetada (%)	ELISA ¹	PCR ²
47	N0047/1205	10	+	-
48	N0048/1205	20-30	++	+
49	N0049/1205	30-50	+++	+
50	N0050/1205	0	-	-
51	N0051/1205	0	-	-
52	N0052/1205	0	-	-
53	N0053/1205	30-50	+++	+
54	N0054/1205	20-30	++	+
55	N0055/1205	0	+	+

¹ As amostras foram categorizadas de acordo com a medida da absorbância:

(-) <0,1 (+) 0,1-0,24; (++) 0,25-0,74; (+++) 0,75-1,5.

² (+) resultado positivo no PCR; (-) não houve amplificação no PCR.

6. Discussão.

Neste estudo, clones recombinantes das proteínas p36 e NrdF foram submetidos a diferentes condições de expressão e os resultados obtidos revelaram expressão destas proteínas em quantidade muito pequena e somente na forma insolúvel. Proteínas heterólogas, expressas em *E. coli* em grandes quantidades, freqüentemente acumulam e formam agregados insolúveis, os chamados corpúsculos de inclusão (Sambrook & Russel, 2001). Apesar de diferentes temperaturas de incubação e concentração de IPTG utilizadas na indução das proteínas p36-GST e NrdF-GST ainda poderem ser testadas para evitar a sua acumulação na forma de corpos de inclusão e diminuir as proteínas truncadas observadas, não há necessidade de mudanças de protocolo, pois as proteínas de fusão puderam ser solubilizadas com CAPS/sarcosil e facilmente purificadas por cromatografia de afinidade em resina glutationa-sepharose 4B e as proteínas truncadas observadas estão de acordo com o comumente observado para proteínas de micoplasmas expressas em *E. coli* (Notarnicola *et alii*, 1990).

As proteínas recombinantes p36 e NrdF, já sem a porção GST, foram utilizadas para produzir anti-soros policlonais mono-específicos em coelhos, devido à praticidade e facilidade de manipulação destes animais quando comparados com suínos. O soro anti-p36 mostrou ser específico para *M. hyopneumoniae* por imunoblot e por ELISA e reagiu fortemente contra as cepas referência (7448, 7422, J e PMS), o que indica que este seria um bom antígeno para padronização de um ELISA diagnóstico para PMS, ao contrário do soro anti-NrdF, que apresentou reatividade cruzada com as outras espécies bacterianas. Esta reatividade cruzada apresentada por NrdF não é nenhuma surpresa, visto que o produto traduzido do gene *nrdF* apresenta identidade de mais de 80% com outros micoplasmas, como *M. pulmonis*, *M. penetrans*, *M. mycoides*, *M. gallisepticum*; no caso de p36 a identidade observada é menor (49-50%) para *M. mobile*, *M. pneumoniae*, *M. mycoides*, *M. caprilicum* e *M. genitalium*. Uma reação fraca contra proteínas de *E. coli* também foi observada para ambos os anti-soros, mas uma vez que *E. coli* é uma bactéria normal da flora intestinal de coelhos e como as proteínas foram purificadas a partir de extratos de *E. coli* expressando as proteínas, essa reação não só já era esperada, como foi observada em outros trabalhos (Stipkovits *et alii*, 1991; Caron *et alii*, 2000b).

Estudos preliminares para utilização destas proteínas purificadas como antígeno em um ELISA para detecção de anticorpos em soros de suínos naturalmente e experimentalmente infectados estão sendo feitos. Além disso, testes foram feitos em paralelo utilizando-se a proteína recombinante de *M. hyopneumoniae* Hsp70 produzida em nosso laboratório com os mesmos soros utilizados, e ao contrário do observado para as proteínas recombinantes p36 e NrdF, todos os soros tiveram reatividade comparativa bem maior para quantidades bem menores da proteína Hsp70 (dados não mostrados). Obviamente, este estudo precisa ainda ser estendido a outras amostras de soro, mas os dados obtidos até o momento sugerem que estas proteínas são aparentemente menos imunogênicas do que a proteína recombinante Hsp70 também produzida no laboratório (dados não mostrados), o que pode explicar os resultados obtidos quando utilizamos estas proteínas como antígeno em ELISA. Isso está de acordo com o encontrado por Caron *et alii* (2000b) para a proteína p36. Além disso, no decorrer deste estudo, chegou até nós o trabalho de Assunção *et alii* (2005) que descreve diferentes padrões antigênicos da proteína p36 na mesma cepa de *M. hyopneumoniae*, observada depois de várias passagens em meio de cultura. Segundo estes autores, resultados anteriores já haviam mostrado que estudos com anti-soros produzidos contra diferentes linhagens da mesma espécie de micoplasma, ou anti-soros produzidos contra a mesma cepa referência em diferentes laboratórios, têm

resultados diferentes. Essa variabilidade encontrada pode ter implicações nos métodos diagnósticos, uma vez que diferenças de estrutura antigênica e expressão podem afetar resultados e interpretações, levando a falsos negativos e conclusões incorretas, tornando ainda mais importante estudos epidemiológicos que identifiquem e isolem diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* presentes no Brasil, a fim de que os métodos diagnósticos e mesmo os antígenos vacinais que venham a ser desenvolvidos sejam mais eficazes.

7. Discussão, conclusões e perspectivas.

Este trabalho faz parte do Projeto Genoma Funcional de Micoplasmas (Programa de Investigação de Genomas Sul + Genoma Brasileiro) e os resultados apresentados estão diretamente relacionados a três dos objetivos principais do projeto: genômica comparada e evolutiva de micoplasmas (Estudo I); estudo de aspectos possivelmente relacionados à patogenicidade de *M. hyopneumoniae* (Estudo I e II); e produção e caracterização de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* com potencial para utilização em imunodiagnóstico e vacinação (Estudo III).

Conforme discutido ao longo deste trabalho, os métodos diagnósticos de uso corrente para a detecção de infecções por *M. hyopneumoniae*, sejam eles baseados em técnicas imunológicas, no cultivo e isolamento dos agentes etiológicos ou em métodos moleculares, apresentam diversas limitações. Além disso, as vacinas para PMS atualmente disponíveis não previnem a transmissão, apesar de reduzirem significativamente os sintomas clínicos e as lesões pulmonares e, em alguns casos, reduzirem o número de micoplasmas no trato respiratório de suínos. O entendimento da biologia da bactéria além da identificação, detecção e purificação de componentes específicos de *M. hyopneumoniae*, os quais estejam envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, além da aderência ou dano celular ao trato respiratório, podem prover uma base para o desenvolvimento de melhores vacinas.

A sorologia é comumente utilizada para avaliar o nível de imunidade frente a infecções por *M. hyopneumoniae* de um rebanho em vários estágios da produção. Entretanto, a interpretação de resultados de dados sorológicos é frequentemente prejudicada por fatores como diferenças antigênicas entre a cepa que está induzindo a resposta imune e a cepa de origem dos antígenos utilizados nos testes diagnósticos. Isso reforça a necessidade do isolamento e caracterização antigênica de novas cepas de *M. hyopneumoniae*. Ao mesmo tempo, existem dificuldades associadas à diferenciação entre anticorpos induzidos pela vacinação e os induzidos pela infecção. Neste sentido, o desenvolvimento de um ELISA utilizando-se como antígenos proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* pode trazer melhorias no diagnóstico da infecção, principalmente na diminuição das reações cruzadas com antígenos de outros micoplasmas.

O repertório de proteínas antigênicas caracterizadas e disponíveis para utilização é ainda bastante restrito, o que é um obstáculo importante tanto para o imunodiagnóstico, quanto para a vacinação. Com a disponibilidade das seqüências dos genomas de diferentes

cepas de *M. hyopneumoniae* (Minion *et alii*, 2004; Vasconcelos *et alii*, 2005), espera-se que estas limitações possam ser significativamente minimizadas, a partir da identificação e da caracterização imunológica de um número maior de proteínas antigênicas da bactéria. Neste contexto, a análise comparativa do genoma de três cepas de *M. hyopneumoniae* viabilizou a identificação e a caracterização preliminar de 118 CDSs que codificam para potenciais fatores de virulência (Estudo I). Dentre os fatores identificados, estão dez proteínas já previamente caracterizadas como adesinas, oito lipoproteínas, doze proteases, dez chaperonas e oito antígenos não-relacionados a adesinas ou outros fatores de virulência conhecidos. Estes oito antígenos, previamente caracterizados como de relevância para diagnóstico e/ou vacinação para micoplasmas e, em alguns casos, com patente registrada nos Estados Unidos e na Europa são: p36 (Frey *et alii*, 1994), p46 (Futo *et alii*, 1995), p60 (Henrich *et alii*, 1998), p65 (Kim *et alii*, 1990), p80 (Tola *et alii*, 2001), p95 (Gonçalves *et alii*, 1998), p115 (Alexander, 1987) e NrdF (Fagan *et alii*, 1996). Muitos dos potenciais fatores de virulência identificados neste trabalho são candidatos naturais para a clonagem e a produção das moléculas recombinantes (DNA ou proteínas), a serem avaliadas como componentes de uma possível vacina recombinante para a PMS e/ou como reagentes para imunodiagnóstico. Isso pode ser ilustrado pelo fato de que recentemente, a CDS mhp378 (MHJ_0363/MHP7448_0367) foi experimentalmente comprovada como uma proteína imunogênica com potencial para diagnóstico (Meens *et alii*, 2006), além das proteínas Hsp70 e EF-tu (Schuck, comunicação pessoal). Do mesmo modo, o estudo funcional destes genes e de seus produtos pode prover melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na infecção e na sobrevivência do *M. hyopneumoniae* no hospedeiro.

Algumas das seqüências deduzidas de aminoácidos de *M. hyopneumoniae* que foram analisadas no Estudo I apresentaram diferenças significativas no tamanho das CDSs correspondentes nas cepas J, 7448 e 232. Foi verificado na análise comparativa que as diferenças observadas são devidas a diferenças entre cepas na extensão de seqüências nucleotídicas repetitivas no interior das regiões codificadoras. Levando-se em consideração que variações genéticas e antigênicas de *M. hyopneumoniae* (Frey *et alii*, 1992; Artiushin & Minion, 1996; Stakenborg *et alii*, 2005), podem determinar diferenças de virulência entre cepas (Vicca *et alii*, 2003), bem como já foi demonstrado para *M. hyopneumoniae* e outros micoplasmas, que a variação antigênica de proteínas de superfície desempenha um papel importante na sobrevivência destes organismos no hospedeiro (Van der Woude & Baumber, 2004), o grau de variabilidade entre as cepas e o possível significado biológico

das variações neste número de repetições foi investigado e estendido para 2 outras cepas (7422 e PMS).

Conforme apresentado no Estudo II, foram identificadas 22 VNTRs, de 12 CDSs. Estas VNTRs codificam para proteínas de superfície, adesinas e fatores de virulência. As VNTRs identificadas codificam para proteínas com variações no número de repetições de aminoácidos (VNTARs). Estas VNTARs determinam variações estruturais, físico-químicas e antigênicas nas proteínas correspondentes, com implicações potenciais para a antigenicidade destas proteínas, pelo menos *in silico*, além disso, sabe-se que muitas das variações genéticas determinam direta ou indiretamente efeitos que são mais óbvios em relação à antigenicidade. Pelo menos duas destas CDS que apresentam variação no número de repetições já foram comprovadas experimentalmente como imunogênicas: p97 (Hsu *et alii*, 1997) e p76 (Pinto *et alii*, aceito). As bactérias podem alterar a expressão de antígenos de superfície de forma reversível, possibilitando a colonização e sua sobrevivência na presença de anticorpos específicos (Van der Woude & Baumler, 2004). Diferenças em antígenos de superfície (Wise & Kim, 1987) e no conteúdo de lipídios de *M. hyopneumoniae* já foram reportadas (Chen *et alii*, 1998). Porém, indícios reais do significado biológico destas variações só poderão ser alcançados após os produtos de amplificação destas VNTRs serem clonados em vetores de expressão da série pGEX (Amersham) para produção dos peptídeos recombinantes correspondentes, e ensaios comparativos de ELISA frente a soros de suínos infectados com *M. hyopneumoniae*, demonstrarem variação no grau de antigenicidade dos peptídeos recombinantes correspondentes das diferentes cepas.

Um PCR baseado nestas VNTRs foi proposto para identificação de cepas de *M. hyopneumoniae* a campo e acredita-se que este pode ser extremamente útil na diferenciação das cepas presentes nos diferentes rebanhos. Embora este método tenha se mostrado sensível e eficiente na tipificação de amostras de laboratório e testes preliminares apontem seu potencial para detecção e tipificação de amostra de biópsia e de *swab* nasal de suínos, este PCR ainda não foi validado em amostras de pulmão e lavados brônquicos de suínos naturalmente infectados.

No Estudo III, foi descrita a produção e a purificação das proteínas recombinantes p36 e NrdF, além da produção de soros policlonais utilizando as proteínas purificadas. O anti-soro produzido contra a proteína p36 mostrou-se promissor como reagente em ensaios de imunoperoxidase, com uma especificidade aparentemente alta, ainda mais que em ensaios utilizando estes anti-soros realizados no CNPSA/EMBRAPA o soro anti-p36

apresentou uma vantagem importante em relação ao soro hiperimune de coelho contra *M. hyopneumoniae* que normalmente é utilizado: a ausência quase total de reação inespecífica (Morés: comunicação pessoal), o que pode trazer melhorias importantes em termos da especificidade do teste.

O ELISA utilizando as proteínas recombinantes purificadas parece ser promissor como ferramenta diagnóstica apenas para o antígeno p36, embora o painel de soros utilizado ainda deva ser expandido, sendo esta uma perspectiva imediata deste trabalho. Em adição, como perspectiva a longo prazo, as proteínas recombinantes produzidas podem e devem ser avaliadas como antígeno vacinal, principalmente a proteína NrdF, pois resultados promissores têm sido obtidos com a subunidade R2 desta proteína expressada em uma cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* (cepa *aroA* SL3261; Fagan *et alii*, 2001).

Apesar de um ELISA utilizando extrato total de *M. hyopneumoniae* 7448 como reagente ter sido padronizado e utilizado neste trabalho, ainda é necessário realizar testes comparativos em paralelo do ELISA-ECTMH7448 com o ELISA-T do CNPSA/EMBRAPA para determinar se o ELISA-ECTMH7448 é equivalente, pior, ou melhor, em termos de sensibilidade do que o ELISA-T. Espera-se que o ELISA-ECTMH7448 seja mais sensível, uma vez que além das proteínas de membrana também presentes no ELISA-T, contém proteínas citosólicas, tais como a Hsp70, cuja proteína recombinante expressada em *E. coli* tem se mostrado bastante imunogênica em testes preliminares (Schuck, comunicação pessoal).

Com relação às amostras de soro e tecido pulmonar de suínos coletadas no decorrer deste trabalho, ainda é necessária a realização de análises por imunoperoxidase, provavelmente utilizando o soro anti-p36, para confirmar a presença de *M. hyopneumoniae* de três maneiras independentes e, por fim, tentar estabelecer correlação entre os exames. Além disso, a aplicação do VNTR-PCR nestas amostras pode trazer informações epidemiológicas importantes, referentes à(s) cepa(s) responsável(is) pela infecção destes animais. A fim de aumentar a amostragem para estes estudos, estão sendo coletadas novas amostras de soro e tecido de suínos doentes, provenientes de diferentes localidades.

Os resultados obtidos/iniciados neste trabalho poderão permitir o estabelecimento de métodos diagnósticos mais eficientes para a identificação precisa de *M. hyopneumoniae*. O ELISA e testes de imunoperoxidase utilizando antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae* poderão também ser de valia para o monitoramento sanitário de rebanhos suínos quanto à presença assintomática de *M. hyopneumoniae*. Uma vez estabelecidos e

validados os novos métodos diagnósticos gerados, estes poderão ser imediatamente repassados para utilização rotineira pelos usuários finais nas agroindústrias e/ou centros de diagnóstico estatais ou privados.

8. Referências bibliográficas (referente às seções 1, 2, 5, 6 e 7).

- ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. A suinocultura brasileira. Disponível em: <<http://www.abipecs.com.br>>. Acesso em: 25 julho, 2006.
- ADEGBOYE, D. S. A review of mycoplasma-induced immunosuppression. **Br. Vet. J.**, v. 134, n. 6, p. 556-560, 1978.
- ALEXANDER, A. G. Analysis of protein antigens of *Mycoplasma hominis*: detection of polypeptides involved in the human immune response. **Isr. J. Méd. Sci.**, v. 23, n. 6, p. 608-612, 1987.
- AMANFU, W.; WENG, C. N.; ROSS, R. F.; BARNES, H. J. Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by directed immunofluorescence. **Am. J. Vet. Res.**, v. 45, p. 1349-1352, 1984.
- ANTUNES, R. De arroba a arroba. **Suinocultura Industrial**, v. 154, p. 42-43, 2001.
- ARMSTRONG, C. H.; FREEMAN, M. J.; SANDS-FREEMAN, L. Cross-reactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: practical implications for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 23, p. 654-656, 1987.
- ARTIUSHIN, S., MINION, F.C. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 324-328, 1996.
- ASAI, T.; OKADA, M.; ONO, M.; MORI, Y.; YOKOMIZO, Y.; SATO, S. Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 44, n. 1, p. 97-102, 1994.
- ASSUNÇÃO, P.; De LA FÉ, C.; RAMIREZ, A. S.; GONZALEZ, L. O.; POVEDA, J. B. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. **Vet. Res. Commun.**, v. 29, n. 7, p. 563-574, 2005.
- AWUMBILA, B.; ROSENBUSCH, R. Metabolism inhibition as a result of interaction of antibody with a membrane protein of *Mycoplasma bovoculi*. **Curr. Microbiol.**, v. 22, p. 221-224, 1991.
- BAUMGARTNER, A.; NICOLET, J. Detection of antibodies against membrane-glycoproteins of swine erythrocytes after experimental infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 7, n. 1, p. 73-79, 1984.
- BEREITER, M.; YOUNG, T.F.; JOO, H.S.; ROSS, R.F. Evaluation of the ELISA, and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. **Vet. Microbiol.**, v 25, p. 177-192, 1990.

- BLANCHARD, B. ; KOBISCH, M.; BOVE, J. M.; SAILLARD, C. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. **Mol. Cell Probes**, v. 10, n. 1, p. 15-22, 1996.
- BOHRER, P. B. Perspectivas da suinocultura no Centro-Oeste brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6, 1993, Goiânia. **Resumos**. Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 125-126, 1993.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BURCH, D. G. S. The comparative efficacy of antimicrobials for the prevention and treatment of enzootic pneumoniae and some of their pharmacokinetic/ pharmacodynamic relationships. **Pig J.**, v. 53, p. 8-27, 2004.
- CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; BOSCH, G. J. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. **J. Swine Health Prod.** v. 7, n. 6, p. 263-268, 1999.
- CARON, J.; OUARDANI, M.; DEA, S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 1390-1396, 2000a.
- CARON, J.; SAWYER, N.; BEN ABDEL, M. B.; CHEIKH SAAD, B. K.; DEA, S. Species-specific monoclonal antibodies to Escherichia coli-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Clin. Diagn. Lab Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 528-535, 2000b.
- CASSELL, G. H.; LINDSEY, J. R.; BAKER, H. J. Immune response of pathogen-free mice inoculated intranasally with *Mycoplasma pulmonis*. **J. Immunol.**, v. 112, n. 1, p. 124-136, 1974.
- CASTRO, L. A.; PEDROSO, T. R.; KUCHIISHI, S. S.; RAMENZONI, M.; KICH, J. D.; ZAHA, A.; VAINSTEIN, M. H.; FERREIRA, H. B. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **Vet. Microbiol.**, v. 116, n. 4, p. 258-269, 2006.
- CHAKRAVARTI, D. N.; FISKE, M. J.; FLETCHER, L. D.; ZAGURSKY, R.J. Mining genomes and mapping proteomes: identification and characterization of protein subunit vaccines. **Dev. Biol.**, v. 103, p. 81-90, 2000.
- CHEIKH SAAD, B. K.; SHARECK, F.; DEA, S. Monoclonal antibodies to Escherichia coli-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, n. 3, p. 459-468, 2003.
- CHEN, J.R., LIN, J.H., WENG, C.N., LAI, S.S. Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 97-110, 1998.

- CHEN, A. Y. ; FRY, S. R.; FORBES-FAULKNER, J.; DAGGARD, G.; MUKKUR, T. K. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 7, p. 923-929, 2006.
- CHEN, Y. L.; WANG, S. N.; YANG, W. J.; CHEN, Y. J.; LIN, H. H.; SHIUAN, D. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1155-1160, 2003.
- DALLA COSTA, O.; MORES, N.; SOBESTIANSKY, J.; BARIONI, W. JR.; PIFFER, I.; PEDROSO-DE-PAIVA, D.; GUZZO, R.; LIMA, G.; PERDOMO, C. Estudos ecopatológicos nas fases de crescimento e terminação: fatores de risco associados à rinite atrofica progressiva e à pneumonias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999, Belo Horizonte. **Resumos**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 169-170, 1999.
- DAWSON, A.; HARVEY, R. E.; THEVASAGAYAM, S. J.; SHERINGTON, J.; PETERS, A. R. Studies of the field efficacy and safety of a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine for pigs. **Vet. Rec.**, v. 151, n. 18, p. 535-538, 2002.
- DEBEY, M. C.; ROSS, R. F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 12, p. 5312-5318, 1994.
- DESROSIERS, R. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **J. Swine Health Prod.**, v. 9, n. 5, p. 233-237, 2001.
- DESROSIERS, R. Control of bacterial respiratory diseases. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15, 1998, Birmingham. **Proceedings**. Birmingham: International Pig Veterinary Society, p.5-9, 1998.
- DOSTER, A. R.; LIN, B. C. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 10, p. 1719-1721, 1988.
- ETHERIDGE, J. R.; LLOYD, L. C. A method for assessing induced resistance to enzootic pneumonia of pigs. **Res. Vet. Sci.**, v. 33, n. 2, p. 188-191, 1982.
- EVOLUÇÃO DA SUINOCULTURA. A evolução da suinocultura. Disponível em: <<http://www.suino.com>>. Acesso em 07 de dezembro, 2001.
- FAGAN, P. K.; DJORDJEVIC, S. P.; EAMENS, G. J.; CHIN, J.; WALKER, M. J. Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 3, p. 1060-1064, 1996.
- FAGAN, P. K.; WALKER, M. J.; CHIN, J.; EAMENS, G. J.; DJORDJEVIC, S. P. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the

immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. **Microb Pathog.**, v. 30, n. 2, p. 101-110, 2001.

FAO - Food and Agriculture Organization. Pork Meat Statistics 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 25 de agosto, 2006.

FAO - Food and Agriculture Organization. Projections to the Year 2010. **FAO Commodities and Trade Technical Papers**. 193pg, 2003.

FELD, N. C.; QVIST, P.; AHRENS, P.; FRIIS, N. F.; MEYLING, A. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Microbiol.**, v. 30, n. 1, p. 35-46, 1992.

FONSECA, A.; BOROWSKY, S.; LUNGE, V.; IKUTA, N.; MARQUES, E. Diagnóstico molecular de patógenos respiratórios suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999, Belo Horizonte. **Resumos**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 155-156, 1999.

FREY, J.; HALDIMANN, A.; KOBISCH, M.; NICOLET, J. Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. **Microb. Pathog.**, v. 17, n. 5, p. 313-322, 1994.

FREY, J., HALDIMANN, A., NICOLET, J. Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 275-280, 1992.

FRIIS, N. F. Resistance of porcine mycoplasmas to heat. **Acta Vet. Scand.**, v. 15, n. 2, p. 283-285, 1974.

FUTO, S.; SETO, Y.; MITSUSE, S.; MORI, Y.; SUZUKI, T.; KAWAI, K. Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 7, p. 1915-1917, 1995.

GARLINGHOUSE, L. E.; DIGIACOMO, R. F.; VAN,HOOSIER, G. L. ; CONDON, J. Selective media for *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica*. **Lab. Anim. Sci.**, v. 31, n. 1, p. 39-42, 1981.

GEARY, S. J.; WALCZAK, E. M. Isolation of a cytopathic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 2, p. 576-578, 1985.

GOMES, M. F. M. Análise prospectiva do complexo agroindustrial de suínos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6, 1992, Goiânia. **Resumos**. Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 3-10, 1992.

GONÇALVES, R.; REGALLA, J.; NICOLET, J.; FREY, J.; NICHOLAS, R.; BASHIRUDDIN, J.; DE SANTIS, P.; GONCALVES, A P. Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. **Vet. Microbiol.**, v. 63, n. 1, p. 13-28, 1998.

- GOODWIN, R. F. In vitro activity of tiamulin against porcine mycoplasmas. **Res. Vet. Sci.**, v. 38, n. 1, p. 124-125, 1985.
- GOODWIN, R. F. W.; A. P. POMEROY, A. P.; WHITTLESTONE, P. Production of enzootic pneumonia in pigs with mycoplasma. **Vet. Rec.**, v. 77, p. 1247-1249, 1965.
- GOODWIN, R. F.; WHITTLESTONE, P. Enzootic pneumonia of pigs: immunization attempts inoculating *Mycoplasma suis pneumoniae* antigen by various routes and with different adjuvants. **Br. Vet. J.**, v. 129, n. 5, p. 456-464, 1973.
- GRODBERG, J.; DUNN, J. J. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 3, p. 1245-1253, 1988.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Vet. Microbiol.**, v. 100, n. 3-4, p. 255-268, 2004.
- HALDIMANN, A.; NICOLET, J.; FREY, J. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, n. 2, p. 317-323, 1993.
- HENRICH, B.; BERNS, G.; WEINHOLD, M.; KITZEROW, A.; SCHAAL, H.; HADDING, U. Cloning and expression of P60, a conserved surface-localized protein of *Mycoplasma hominis*, in *Escherichia coli*. **Biol. Chem.**, v. 379, n. 8-9, p. 1143-1150, 1998.
- HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E.; DEWEY, C. E. Influence of age and maternal antibodies on antibody responses of neonatal piglets vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **J. Swine Health Prod.**, v. 12, p. 10-16, 2004.
- HOLMGREN, N. An indirect haemagglutination test for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* using formalinized tanned swine erythrocytes. **Res. Vet. Sci.**, v. 16, n. 3, p. 341-346, 1974.
- HOVENIER, R. Oportunidades & Desafios na Indústria Suinícola Emergente da Europa Central. 7º. Seminário Internacional de Suinocultura, Costa do Sauípe. Cobertura On-line **Suinocultura Industrial**. < <http://www.suinoculturaindustrial.com.br>>. Acesso 08 de setembro, 2006).
- HOWARD, C. J.; TAYLOR, G. Immune responses to mycoplasma infections of the respiratory tract. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 10, n. 1, p. 3-32, 1985
- HOWARD, C. J.; TAYLOR, G. Interaction of mycoplasmas and phagocytes. **Yale J. Biol. Med.**, v. 56, n. 5-6, p. 643-648, 1983.
- HOWARD, C. J.; THOMAS, L. H.; PARSONS, K. R. Immune response of cattle to respiratory mycoplasmas. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 17, n. 1-4, p. 401-412, 1987.

- HSU, T.; ARTIUSHIN, S.; MINION, F.C. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*, **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 1317–1323, 1997.
- INAMOTO, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAMOTO, K.; NAKAI, Y.; OGIMOTO, K. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 56, n. 2, p. 393-394, 1994.
- IRIGOYEN, L. F. ; VAN ALSTINE, W. ; TUREK, J. et al. Ultrastructural observation of the airways of recovered and susceptible pigs after inoculation with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.18, n.1, p. 1-7, 1998.
- JENSEN, D.S.; ERSBOLL, A.K.; NIELSEN, J.P. A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs, **Prev. Vet. Med.**, v. 54, p. 265–278, 2002.
- JUNGBLUT, P. R.; SCHAIBLE, U. E.; MOLLENKOPF, H. J.; ZIMNY-ARNDT, U.; RAUPACH, B.; MATTOW, J.; HALADA, P.; LAMER, S.; HAGENS, K.; KAUFMANN, S. H. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. **Mol. Microbiol.**, v. 33, n. 6, p. 1103-1117, 1999.
- KAHANE, I. In vitro studies on the mechanism of adherence and pathogenicity of mycoplasmas. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 20, n. 9, p. 874-877, 1984.
- KICH, J. D.; PONTES, A. P. Análise atual das doenças respiratórias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 58-67, 2001.
- KIM, M. F.; HEIDARI, M. B.; STULL, S. J.; MCINTOSH, M. A.; WISE, K. S. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 8, p. 2637-2643, 1990.
- KLINKERT, M. Q.; HERRMANN, R.; SCHALLER, H. Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expression plasmid library. **Infect. Immun.**, v. 49, n. 2, p. 329-335, 1985.
- KRAUSE, D. C. *Mycoplasma pneumoniae* cytaherence : organization and assembly of the attachment organelle. **Trends Microb.**, v. 6, n. 1, p. 15-18, 1998.
- KRISTENSEN, B.; PAROZ, P.; NICOLET, J.; WANNER, M.; DE WECK, A. L. Cell-mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 42, n. 5, p. 784-788, 1981.
- KWON, D.; CHAE, C. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. **Vet. Pathol.**, v. 36, n. 4, p. 308-313, 1999.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- MADEC, F. Enzootic respiratory diseases in the growing-finishing pig and control: a compound problem and still a challenge. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 48-57, 2001.
- MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; LEIN, A.; VRIJENS, B.; DE KRUIF, A. The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. **Zentralbl. Veterinarmed. B**, v. 45, n. 8, p. 495-505, 1998.
- MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; VRIJENS, B.; VERBEKE, W.; VIAENE, J.; DE KRUIF, A. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. **Vaccine**, v. 17, n. 9-10, p. 1024-1034, 1999.
- MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. **Vet. Q.**, v. 18, n. 3, p. 104-109, 1996.
- MAPA/SIGSIF. - Ministério da Agricultura, Pecuário e do Abastecimento, / Serviço de Inspeção Federal, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 25 de agosto, 2006.
- MARTELLI, P.; TERRENI, M.; GUAZZETTI, S.; CAVIRANI, S. Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health**, v. 53, n. 5, p. 229-233, 2006.
- MARTINS, C. Fatores e perspectivas mundiais na oferta e demanda da carne suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999, Belo Horizonte. **Resumos**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 53-61, 1999.
- MATTSSON, J. G.; BERGSTROM, K.; WALLGREN, P.; JOHANSSON, K. E. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 893-897, 1995.
- MEENS, J., SELKE, M., GERLACH, G. F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. **Vet Microbiol.**, v. 116, n. 1-3, p. 85-95, 2006.
- MESSIER, S.; ROSS, R. F.; PAUL, P. S. Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, n. 1, p. 52-58, 1990.
- MINION, F. C. ; LEFKOWITZ, E. J.; MADSEN, M. L.; CLEARY, B. J.; SWARTZELL, S. M.; MAHAIRAS, G. G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 21, p. 7123-7133, 2004.

- MORI, Y.; HAMAOKA, T.; SATO, S.; TAKEUCHI, S. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 19, n. 3-4, p. 239-250, 1988.
- NICOLET, J. Animal mycoplasmoses: a general introduction. **Rev. Sci. Tech.**, v. 15, n. 4, p. 1233-1240, 1996.
- NOTARNICOLA, S. M.; MCINTOSH, M. A.; WISE, K. S. Multiple translational products from a *Mycoplasma hyorhinis* gene expressed in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 6, p. 2986-2995, 1990.
- NOYES, E. P.; FEENEY, D. A.; PIJOAN, C. Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 197, n. 8, p. 1025-1029, 1990.
- OKADA, M.; ASAI, T.; ONO, M.; SAKANO, T.; SATO, S. Protective effect of vaccination with culture supernate of *M. hyopneumoniae* against experimental infection in pigs. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health**, v. 47, n. 7, p. 527-533, 2000.
- ONOVIRAN, O.; TAYLOR-ROBINSON, D. Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides subsp mycoides* in cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Rec.**, v. 105, n. 8, p. 165-166, 1979.
- PIFFER, I. A.; FREITAS, A. R.; MUNARO, N. M.; SONCINI, R. A. Efeito das afecções pulmonares observadas no abate sobre o desenvolvimento dos suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2, 1985, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 105-106, 1985.
- PIFFER, I.; BRITO, J. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos. **Documento 23**. Concórdia: Embrapa suínos e aves, 12p., 1993.
- PIFFER, I. A.; FRAZZON, A. P.; COLLARES, R. M.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S.; SILVA, S. C. Molecular methods applied to the diagnosis micoplasmal pneumonia in pigs. **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, p. 123, 1998.
- PIJOAN, C. Secretion of hydrogen peroxide by some common pig mycoplasmas. **Vet. Rec.**, v. 95, n. 10, p. 216-217, 1974.
- PLOMGAARD, J. Eradication of respiratory diseases from the swine herd without depopulation. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999, Belo Horizonte. **Resumos**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 113-118, 1999.
- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.
- ROBERTS, D. H. Preliminary studies on the cell-mediated immune response in pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Br. Vet. J.**, v. 129, n. 5, p. 427-438, 1973.

- ROSENGARTEN, R.; YOGEV, D. Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 149-158, 1996.
- ROSS, R. F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B. E. et al. **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, p.495-510, 1999.
- ROSS, R. F.; YOUNG, T. F. The nature and detection of mycoplasmal immunogens. **Vet. Microbiol.**, v. 37, n. 3-4, p. 369-380, 1993.
- ROSS, R. F.; ZIMMERMANN-ERICKSON, B. J.; YOUNG, T. F. Characteristics of protective activity of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 45, n. 10, p. 1899-1905, 1984.
- ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol Rev.**, v. 83, n. 2, p. 417-432, 2003.
- RUIZ, A.; GALINA, L.; PIJOAN, C. *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars. **Can. J. Vet. Res.**, v. 66, n. 2, p. 79-85, 2002.
- SALMAN, M.; ROTTEM, S. The cell membrane of *Mycoplasma penetrans*: lipid composition and phospholipase A1 activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1235, n. 2, p. 369-377, 1995.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2001.
- SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; RAMIREZ, A. S.; FERNANDEZ, A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; JOVER, A.; LORENZO, H.; HERRAEZ, P.; RODRIGUEZ, F. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Pathol.**, v. 40, n. 4, p. 395-404, 2003.
- SCHEIDT, A. B.; FROE, D.; CLINE, T.; MAYROSE, V.; EINSTEIN, M. The use of long-acting oxytetracycline (LA200tm) in two swine herds for control of enzootic pneumonia. **Proc. Int. Congr. Pig. Vet. Soc.**, v. 11, p. 87, 1990.
- SCHWARTZ, K. J. O papel do *Mycoplasma hyopneumoniae* no complexo de doenças respiratórias dos suínos. In: Seminário Internacional Pfizer de Pneumonia Enzootica, 1, Campinas. **Anais**, p. 23-40, 2001.
- SECEX - Secretaria do Comércio Exterior. Indicadores e Estatísticas de Comércio Exterior. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex>>. Acesso em 25 de agosto, 2006.
- SHELDRAKE, R. F.; ROMALIS, L. F.; SAUNDERS, M. M. Serum and mucosal antibody responses against *Mycoplasma hyopneumoniae* following intraperitoneal vaccination and challenge of pigs with *M. hyopneumoniae*. **Res. Vet. Sci.**, v. 55, n. 3, p. 371-376, 1993.
- SHIMOJI, Y.; OISHI, E.; MUNETA, Y.; NOSAKA, H.; MORI, Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of

Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. **Vaccine**, v. 21, n. 5-6, p. 532-537, 2003.

- SILVA, A. F.; PAGANINI, F. J.; ACOSTA, J. C.; ROCHA, P. H.; MISTURA, H.; MARCON, E.; SIMON, V. A.; CASAGRANDE, H. A.; FLOSS, J. M. Programa de gerenciamento de doenças respiratórias em suínos. I - Estudo do perfil de doenças respiratórias nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 2, p. 31-32, 2001.
- SITJAR, M.; NOYES, E. P.; SIMON, X.; PIJOAN, C. Relationships among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions, and production parameters in pigs. **J. Swine Health Prod.**, v. 4, n. 6, p. 273-277, 1996.
- SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO JR, P.; MATOS, F. H. M. **Pneumonia Enzoótica** Suína. Série Sanidade em Foco 1. Goiânia, Goiás. Goiânia, Pfizer, 2001.
- SOBESTIANSKY, J.; DALLA COSTA, O. A.; MORES, N.; BARIONI, W.; PIFFER, I. A.; PEDROSO DE PAIVA, D. Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias: prevalência de rinite atrófica e de pneumonia nas fases de crescimento e terminação na região Sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999, Belo Horizonte. **Resumos**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 171-172, 1999.
- SØRENSEN, V., AHRENS, P., BARFOD, K., FEENSTRA, A. A., FELD, N. C., FRIIS, N. F., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, N. E., PEDERSEN, M. W. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. **Vet Microbiol.** v. 54, p. 23-24, 1997.
- STAKENBORG, T.; VICCA, J.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H.; PEETERS, J.; DE KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D. A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. **Vet. Res. Commun.**, v. 30, n. 3, p. 239-247, 2006.
- STAKENBORG, T., VICCA, J., BUTAYE, P., MAES, D., PEETERS, J., DE KRUIF, A., HAESEBROUCK, F. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. **Vet. Microbiol.**, v. 109, n. 1-2, p. 29-36, 2005.
- STEVENSON, G. W. Bacterial pneumonia in swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15, 1998, Birmingham. **Proceedings**. Birmingham: International Pig Veterinary Society, p.11-20, 1998.
- STIPKOVITS, L.; NICOLET, J.; HALDIMANN, A.; FREY, J. Use of antibodies against the P36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. **Mol. Cell Probes**, v. 5, n. 6, p. 451-457, 1991.
- STRAIT, E. L.; ERICKSON, B. Z.; THACKER, E. L. Analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Proc. AASV.**, Des Moines, Iowa. p.95-96, 2004.

- STRASSER, M.; ABIVEN, P.; KOBISCH, M.; NICOLET, J. Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 31, n. 1-2, p. 141-153, 1992.
- STRASSER, M.; FREY, J.; BESTETTI, G.; KOBISCH, M.; NICOLET, J. Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 4, p. 1217-1222, 1991.
- STRAW, B. E.; TUOVINEN, V. K.; BIGRAS-POULIN, M. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 195, n. 12, p. 1702-1706, 1989.
- STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.**, v. 189, n. 1, p. 113-130, 1986.
- SWITZER, W.P.; ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In **Disease of Swine**, 4th ed. Ed. H.W. Dunne and A.D. Leman. Ames: Iowa State Univ Press, pp. 741-764, 1975.
- THACKER, B. J.; BOETTCHER, T. B.; ANDERSON, T. S.; THACKER, E. L.; YOUNG, T. F. The Influence of passive immunity on serological responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination. **Proc. 15th IPVS Congress**, Birmingham, UK p. 154, 1998.
- THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 5, n. 2, p. 317-320, 2004.
- THACKER, E. L. Lung inflammatory responses. **Vet. Res.**, v. 37, n. 3, p. 469-486, 2006
- THACKER, E. L.; HALBUR, P. G.; ROSS, R. F.; THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B. J. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 3, p. 620-627, 1999.
- THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; KUHN, M.; HAWKINS, P. A.; WATERS, W. R. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 61, n. 11, p. 1384-1389, 2000.
- THACKER, E. L.; THACKER, B. Vaccination as a means of controlling *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Proc A.D. Leman Swine Conference**, p. 84-86, 2000.
- THACKER, E.; STRAIT, E.; RUEBLING, K.; NILUBOL, D.; ERICKSON, B.; WHITE, R. Evaluation of organism number and the immune response to one dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines. **Proc. of the 18th International Pig Vet. Soc. Cong. (IPVS)**, Hamburg, Alemanha, p. 383, 2004.
- THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B. J.; HALBUR, P. G.; THACKER, E. L. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine

reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 11, n. 5, p. 901-908, 2004.

THELANDER, L.; REICHARD, P. Reduction of ribonucleotides. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 48, p. 133-158, 1979.

THOMAS, C. B.; VAN ESS, P.; WOLFGRAM, L. J.; RIEBE, J.; SHARP, P.; SCHULTZ, R. D. Adherence to bovine neutrophils and suppression of neutrophil chemiluminescence by *Mycoplasma bovis*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 27, n. 4, p. 365-381, 1991.

TOLA, S.; CROBEDDU, S.; CHESSA, G.; UZZAU, S.; IDINI, G.; IBBA, B.; ROCCA, S. Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, n. 1, p. 45-50, 2001.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Livestock and Poultry: World Markets and Trade, March 2006. Disponível em : <<http://www.usda.gov>>, Acesso em 25 de agosto, 2006.

VAN OVERBEKE, I.; CHIERS, K.; CHARLIER, G.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. **Vet. Microbiol.**, v. 88, n. 1, p. 59-74, 2002.

VAN REETH, K., VAN GUCHT, S.; PENSAERT, M. In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 87, p. 161-168, 2002.

VASCONCELOS, A. T.; FERREIRA, H. B.; BIZARRO, C. V.; BONATTO, S. L.; CARVALHO, M. O.; PINTO, P. M.; ALMEIDA, D. F.; ALMEIDA, L. G.; ALMEIDA, R.; ALVES-FILHO, L.; ASSUNCAO, E. N.; AZEVEDO, V. A.; BOGO, M. R.; BRIGIDO, M. M.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, S. S.; CAREPO, M. S.; CARRARO, D. M.; DE MATTOS CASCARDO, J. C.; CASTRO, L. A. ET AL. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 16, p. 5568-5577, 2005.

VICCA, T.J., STAKENBORG, D., MAES, P., BUTAYE, J., PEETERS, DE KRUIF, A., HAESEBROUCK, F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Vet. Microbiol.**, v. 97, p. 177-190, 2003.

VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; DE KRUIF, A.; HAESEBROUCK F. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Ant. Ag. Chem.**, v. 48, n. 11, p. 4470-4472, 2004.

VIOLA, E. A.; BARTELS, H. Perspectivas da assistência técnica e extensão rural. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6, 1993, Goiânia. **Resumos**. Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, v. 1, p. 39-42, 1993.

- WALKER, J.; LEE, R.; MATHY, N.; DOUGHTY, S.; CONLON, J. Restricted B-cell responses to microbial challenge of the respiratory tract. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 54, n. 1-4, p. 197-204, 1996.
- WALLGREN, P.; BOLSKE, G.; GUSTAFSSON, S.; MATTSSON, S.; FOSSUM, C. Humoral immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. **Vet. Microbiol.**, v. 60, n. 2-4, p. 193-205, 1998.
- WALLGREN, P.; SCHWAN, O.; MATTSSON, S.; BOLSKE, G. Comparison of the sensitivity of two ELISA systems for detection of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected herds. **Proc. Int. Congr. Pig. Vet. Soc.**, v 14, p. 217, 1996.
- VAN DER WOUDE, M.W., BAUMLER, A.J. Phase and antigenic variation in bacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 3, p. 581-611, 2004.
- WANNEMUEHLER, M. J.; GALVIN, J. E. Bacterial immunogens and protective immunity in swine. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 43, n. 1-3, p. 117-126, 1994.
- WINDSOR, R. S.; MASIGA, W. N. The effect of the route of administration on the immunity produced by the T1 strain of *Mycoplasma mycoides* sub-species *mycoides*. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.**, v. 30, n. 3, p. 259-267, 1977.
- WISE, K. S.; KIM, M. F. Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 12, p. 5546-5555, 1987.
- WIZEMANN, T. M.; HEINRICHS, J. H.; ADAMO, J. E.; ERWIN, A. L.; KUNSCH, C.; CHOI, G. H.; BARASH, S. C.; ROSEN, C. A.; MASURE, H. R.; TUOMANEN, E.; GAYLE, A.; BREWAH, Y. A.; WALSH, W.; BARREN, P.; LATHIGRA, R.; HANSON, M.; LANGERMANN, S.; JOHNSON, S.; KOENIG, S. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1593-1598, 2001.
- WU, C. C.; SHYROCK, T. R.; LIN, Y. L.; et al. Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. **Swine Health Prod.**, v. 5, n. 6, p. 227-230, 1997.
- YOUNG, T. F.; ERICKSON, B. Z.; ROSS, R. F.; WANNEMUEHLER, Y. Hemagglutination and hemagglutination inhibition of turkey red blood cells with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, n. 7, p. 1052-1055, 1989.
- ZHANG, Q.; YOUNG, T. F.; ROSS, R. F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 3, p. 1013-1019, 1995.