

# UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA DE *Mycoplasma hyopneumoniae* PARA SORODIAGNÓSTICO DA PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA

PAGLIARINI, R. L.<sup>1\*</sup>; MARCHIORO, S.B.<sup>1</sup>; SIMIONATTO, S.<sup>1</sup>; BRUM, C.B.<sup>1</sup>; GALLI, V.<sup>1</sup>; KLEIN, C. S.<sup>2</sup>; REBELATTO, R.<sup>2</sup>; DELLAGOSTIN, O.A.<sup>1</sup>

## INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas enfrentados pela suinocultura industrial, em âmbito mundial, são as enfermidades que acometem o sistema respiratório de suínos (STAKENBORG, 2005). Dentre as doenças respiratórias que afetam estes animais, a Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma das mais comuns, causando sérios prejuízos econômicos na produção suinícola. As perdas ocorrem principalmente devido ao retardo no crescimento, gastos com medicamentos, piora na conversão alimentar e a pré-disposição a patógenos secundários (ROSS, 1999).

A transmissão do agente entre os animais pode ocorrer de forma direta, através do contato com secreções do trato respiratório de suínos infectados, e indireta através de aerossóis (SIBILA, 2008). Estas características de transmissão associadas aos fatores climáticos como temperatura, umidade, volume de ar, ventilação e gases, juntamente com sistemas de produção contínua e falta de higiene, aumentam o risco de ocorrência da PES nas granjas (SCHWARTZ, 2001), predispondo a uma alta morbidade no rebanho, evidenciada em diversos levantamentos sorológicos já realizados (MORENO, 1999; FLECK & SNELSON, 2004; FANO, 2005).

A forma clínica da doença é mais comum nos animais em crescimento e terminação, mas em rebanhos sem imunidade, a doença pode afetar leitões já a partir de duas semanas de idade, bem como animais em fase de reprodução (STÄRK, 2000). Os sinais clínicos variam com a presença ou ausência de outras infecções respiratórias. Tosse crônica e não produtiva é o principal sinal clínico da doença, a qual aparece de 10-16 dias após infecção experimental, mas este período pode variar em condições de campo (MAES, 2008).

O diagnóstico precoce e o isolamento dos animais infectados do rebanho são métodos eficazes para prevenir a propagação da doença (FUTO, 1995). Várias metodologias são usadas para monitorar a infecção causada pelo *M. hyopneumoniae*. Sinais clínicos e a presença de lesões são utilizados como diagnóstico presuntivo da doença (ROSS, 1999), no entanto testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo. A utilização de técnicas com alta especificidade, de fácil aplicação e baixo custo são fundamentais para realização de diagnóstico e contribuem no controle. Vários testes sorológicos como o teste de fixação de complemento, teste de hemaglutinação indireta e ELISA tem sido desenvolvidos para detecção de anticorpos de *M. hyopneumoniae* em soros de suínos, no entanto várias divergências entre as técnicas foram relatadas. Este trabalho tem como objetivo avaliar novos antígenos de *M. hyopneumoniae* para

---

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular, CenBiot/UFPeL, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, [ronaldopagliarini@yahoo.com.br](mailto:ronaldopagliarini@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSEA/EMBRAPA), Concórdia, SC.

utilização no diagnóstico sorológico da Pneumonia Enzoótica Suína, através de ELISA indireto, buscando alvos com uma alta sensibilidade e especificidade, que garantam um método diagnóstico eficiente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Análise das Seqüências Codificadoras (CDS):** A partir do seqüenciamento da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*, realizado pelo projeto Rede Sul de Análise de Genomas e Biologia Estrutural – Programa de Investigação de Genoma Sul (PIGS), com o auxílio dos programas de bioinformática (PFAM, SWISS-PROT, PROSITE, NNPRELECT, VECTOR) foram identificadas e analisadas CDS pertencentes ao grupo de proteínas transmembrana, buscando satisfazer características como: possível envolvimento das proteínas codificadas em aspectos relacionados à patogenicidade e/ou a antigenicidade, seqüências hidrofílicas com poucos ou nenhum códon de triptofano.

**Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*:** As CDS selecionadas foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor de expressão Champion pET200D/TOPO His-tag (Invitrogen), expressas em *E. coli* BL21(DE3) Rill e as proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade Ni-Sepharose. A pureza das mesmas foi determinada através SDS-PAGE e a concentração pelo Kit BCA<sup>TM</sup> Protein Assay (Pierce).

**Avaliação antigênica:** As proteínas clonadas e purificadas foram utilizadas para detectar anticorpos contra *M. hyopneumoniae* através da técnica de ELISA. Foram avaliados 22 soros de animais de campo, 3 soros de animais imunizados com a cepa 7448, e 5 soros de animais SPF, os quais serviram como controle negativo, e 1 um soro como controle positivo da reação. Todos foram testados em triplicatas. A concentração das proteínas recombinantes utilizadas para sensibilizar as placas variou entre 5 e 50 ng por poço, de acordo com os melhores resultados obtidos na padronização. Os soros suínos foram diluídos 1:100, e o anticorpo anti-IgG suíno conjugado com peroxidase (*Sigma*) 1:6000. A reação foi revelada com o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD-Sigma), acrescido de peróxido de hidrogênio, por 15 minutos, parada com ácido sulfúrico 1N, e lida em leitor de ELISA com filtro de 492 nm (OD<sub>492</sub>). Para a validação do teste, o ponto de corte (*cut-off*) foi calculado pela média das absorbâncias das amostras negativas acrescidas de duas vezes o desvio padrão dessas amostras, separando assim as amostras positivas das negativas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas 18 CDS pertencentes ao grupo de proteínas transmembrana da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*, sendo que de uma delas selecionou-se duas regiões, C e N-terminal. Das 18 CDS selecionadas, todas foram amplificadas pela técnica de PCR, 16 delas clonadas e caracterizadas, tendo seu DNA plasmidial extraído para serem submetidos aos processos de expressão e purificação. Os clones caracterizados como recombinantes foram submetidos à transformação por choque térmico na cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) Plus Rill, obtendo-se oito proteínas recombinantes purificadas nas mais variadas concentrações (Tabela 1).

**Tabela 1:** Identificação dos alvos, região amplificada, tamanho e resultados obtidos.

Gi/MHP	Região Amplificada (aa)	Tamanho (pb)	Amplificada	Clonada	Purificada	Proteína kDa
Gi 72080875	31 - 386	1086	Sim	Sim	Não	41
Gi 72080747 N/C	67-284/ 904 - 1199	672 / 906	Sim (N-ter) Sim (C-ter)	Sim (N-ter) Sim (C-ter)	Sim (N-ter) Sim (C-ter)	26/ 37
Gi 72080970	131- 345	666	Sim	Sim	Não	26
Gi 72080361	238 - 665	1305	Sim	Sim	Não	50
Gi 72080362	16 - 298	867	Sim	Sim	Não	35
Gi 72080363	278 - 671	1204	Sim	Sim	Sim	45
Gi 72080580	20 - 195	550	Sim	Sim	Não	22
Gi 72080587	248 - 748	1525	Sim	Sim	Não	60
Gi 72080604	123 - 311	589	Sim	Sim	Não	23
Gi 72080656	74 - 444	1110	Sim	Sim	Sim	42
Gi 72080719	1 - 257	768	Sim	Sim	Não	29
Gi 72080669	56 - 264	624	Sim	Sim	Sim	25
Gi 72080680	1 -166	495	Sim	Sim	Não	19
Gi 72080775	31 - 512	1443	Sim	Não	Não	56
Gi 72080811	258 - 524	798	Sim	Sim	Sim	31
Gi 72080818	2 - 284	846	Sim	Não	Não	32
Gi 72080820	576 -744	504	Sim	Sim	Sim	20
Gi 72080924	110 - 379	807	Sim	Sim	Sim	31

A avaliação antigênica realizada nesse estudo pela técnica de ELISA demonstrou que as oito proteínas utilizadas como antígenos reagiram com a maioria dos 22 soros de campo testados. Dentre estas proteínas as que demonstraram um melhor perfil antigênico foram as com a identificação final 669 e 811, ambas com 21 amostras positivas, e também com as maiores absorvâncias observadas. As proteínas com final 747N, 820 e 747C foram positivas para 20 soros, e a 363 foi positiva para 18 amostras de soros testadas. As proteína 924 e 656 revelaram-se positivas para 17 amostras, o menor valor obtido.

Estes resultados demonstram a capacidade destas proteínas em reconhecer anticorpos de *M. hyopneumoniae* nos soros de suínos naturalmente infectados, no entanto, mais testes necessitam ser realizados para comprovar a especificidade desses antígenos. Devido às características singulares da PES, o diagnóstico presuntivo através de sinais clínicos e necropsia podem ser realizados. No entanto este método pode ser considerado impreciso, pois as avaliações possuem certo grau de subjetividade.

Na busca de diagnóstico preciso pode-se optar pelo isolamento e cultivo do agente. No entanto, por se tratar de um microrganismo de caráter fastidioso, de crescimento lento e que requer meio seletivo, complexo e de alto custo para o seu crescimento (ROSS, 1999), as técnicas para seu isolamento não são rotineiramente utilizadas. A produção de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* em *E. coli*, tem sido sugerida como alternativa para testes de diagnóstico e vacinação da PES, pois se trata de uma técnica viável que dispensa o isolamento e cultivo do agente. Alguns estudos têm demonstrado que proteínas recombinantes são capazes de

reconhecer anticorpos contra *M. hyopneumoniae* pela técnica de ELISA (JAN, 2007; OKADA, 2005). Esta técnica é considerada útil para a detecção de anticorpos contra este microrganismo, pelo seu baixo custo, fácil execução e possibilidade de análise de um grande número de amostras em curto espaço de tempo (SIBILA, 2008). Isso viabiliza a realização de diagnóstico de rebanhos, a fim de monitorar a incidência da PES e detectar a presença da doença antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos e ocorrência de significativas perdas econômicas. Porém no que diz respeito à especificidade, novos testes devem ser realizados a fim de buscar a consolidação do ELISA como um teste confiável no diagnóstico e controle da PES.

## CONCLUSÃO

As proteínas recombinantes produzidas e avaliadas neste trabalho demonstraram-se antigênicas para a maioria dos soros testados, no entanto outros testes são necessários para selecionar os antígenos que além de uma boa antigenicidade apresentem uma alta especificidade. Isso possibilitará sua utilização em testes de ELISA para diagnóstico da PES, uma alternativa promissora por se tratar de uma técnica que permite o diagnóstico precoce da enfermidade, analisando um grande número de amostras com baixo custo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FANO, E., *et al.* Dynamics and persistence of *Mycoplasma Hyopneumoniae* infection in pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, p.223-228, 2005.

FLECK, R.; SNELSON, H. Doenças Respiratórias – Uma atualização nas medidas de controle de *Mycoplasma Hyopneumoniae*. Anais do **II Congresso Latino Americano de Suinocultura**. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2004.

FUTO, S., *et al.* Recombinant 46- kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.680-683, 1995.

JAN, E.J., *et al.* In vitro expression of the 50 kDa and 30 kDa fragments of the P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* and their use for serodiagnosis. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p. 278-282, 2007.

MAES, D., *et al.* Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.126, p. 297-309, 2008.

MORENO, A., *et al.* Levantamento sorológico para *Mycoplasma hyopneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. Anais **IX ABRAVES**, p.161-162, 1999.

OKADA, M., *et al.* Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.251-259.

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: **Diseases of Swine**. Ed 8ª, Iowa State University Press, Ames, Iowa, p. 495-510, 1999.

SIBILA, M., *et al.* Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal** (2008), doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020

SCHWARTZ, K. J. O papel do *Mycoplasma hyopneumoniae* no complexo de doenças respiratórias dos suínos. In: **Seminário Internacional Pfizer de Pneumonia Enzoótica**. Anais, Campinas, p.23-40, 2001.

STAKENBORG, T., *et al.*. The Diversity of *Mycoplasma Hyopneumoniae* Within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v.109 p. 29-36, 2005.

STÄRK, K. D. C. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine – A literature review. **Veterinary Journal**, v.159, p.37-56, 2000.