

RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* COMO CANDIDATO VACINAL EM SUÍNOS

NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA¹; SÉRGIO JORGE¹; CHARLES GOMES
KLAZER¹; ANA CAROLINA PEITER¹; SILVANA BEUTINGER MARCHIORO¹; ODIR
ANTONIO DELLAGOSTIN¹

¹ Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade
Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com;

¹ Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade
Federal de Pelotas – sergiojorgevet@hotmail.com

¹ Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade
Federal de Pelotas – odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), doença respiratória crônica que afeta principalmente suínos em fase de crescimento e terminação (SIBILA, 2009). O microrganismo adere e danifica o epitélio ciliar do trato respiratório. Esta doença é caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, piora nas taxas de conversão alimentar e retardo no crescimento dos suínos, causando consideráveis perdas econômicas à produção suína (SOBESTIANSKY et al., 1999; ROSS et al., 1986). Ao colonizar as células epiteliais respiratórias, *M. hyopneumoniae* causa redução da atividade ciliar do epitélio respiratório, ciliostase e perda dos cílios (DEBEY, 1994), predispondo os animais a infecções secundárias e oportunistas.

O controle da infecção é realizado principalmente com técnicas adequadas de manejo e melhorias nas condições de alojamento, uso de antimicrobianos e vacinação dos animais (MAES et al., 2008). *M. hyopneumoniae* é um microrganismo fastidioso, cresce lentamente em meio de cultivo Friis enriquecido com soro suíno (FRIIS, 1975) e seu isolamento é dificultoso devido à frequente contaminação de outros micoplasmas como o *Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma flocculare* (ROSS, 1999). Estas características encarecem a produção de vacinas preparadas com bactérias inteiras inativadas (bacterinas), utilizadas no controle da PES. Estas vacinas reduzem as lesões pulmonares e os sinais clínicos, mas não impedem a colonização do agente. No entanto, a vacinação é considerada a forma mais eficiente de controle desta infecção.

Neste contexto, faz-se necessária a busca de novas alternativas para a profilaxia da PES. A produção de vacinas desenvolvidas através da tecnologia do DNA recombinante é altamente promissora. A subunidade da proteína de choque térmico P65, chamada P42 (CHOU et al., 1997; CHEN et al., 2003), é considerada um antígeno potencial. O objetivo deste trabalho foi purificar e avaliar a proteção em suínos imunizados com o antígeno recombinante P42 visando o desenvolvimento de uma vacina mais eficiente e de baixo custo para o controle da PES.

2. METODOLOGIA

2.1 Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante

A sequência codificadora do antígeno P42 foi amplificada por PCR, utilizando DNA extraído de *M. hyopneumoniae* cepa 7448 como molde. O gene resultante foi clonado no vetor pAE, utilizando *E. coli* TOP 10. Os clones recombinantes foram selecionados e propagados em caldo LB contendo 100 µg/ml de ampicilina. A presença do inserto foi confirmada por PCR e digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*l. O vetor pAE/P42 foi transformado por choque térmico em *E. coli* BL21 DE3 e esta foi inoculada em meio LB contendo ampicilina (37 °C, 250 rpm) até atingir a fase *log* de crescimento. A expressão da proteína foi induzida por 3 h com 1,0 M de Isopropylβ-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). A proteína recombinante foi solubilizada em tampão contendo 0,2% de NLauroylsarcosine e purificada por cromatografia de afinidade utilizando *Sepharose* (HisTrap™) carregada com níquel. A pureza da mesma foi determinada através de SDS-PAGE 12%, e a concentração determinada pelo kit BCA™ Potein Assay (Pierce).

2.2 Imunização dos suínos

Para realização do experimento, suínos com 21 dias de idade (não vacinados para PES) com status “positivo” para PES (Kit HerdChek® *Mycoplasma hyopneumoniae* IDEXX e PCR), foram divididos em três grupos experimentais de 8 animais cada da seguinte forma: grupo 1, leitões imunizados com adjuvante oleoso Montanide® (controle negativo); grupo 2, leitões imunizados com a proteína recombinante P42 (rP42) adsorvida em Montanide® e grupo 3, leitões imunizados com rP42 suspensa em PBS. Os leitões receberam uma dose de 100 µg no dia 0 de cada formulação vacinal. Amostras de sangue total sem anticoagulante foram coletadas através de punção da veia jugular nos dias 0, 21, 42, 63 e 84 para avaliação da resposta imune humoral. O soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20 °C.

2.3 ELISA

O título de anticorpos contra o antígeno rP42 foi determinado através de ELISA. Placas de poliestireno foram sensibilizadas *overnight* com 50 ng da proteína rP42 por cavidade, dissolvida em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. As placas foram lavadas três vezes com solução fosfato salina contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) e incubadas por 2 h a 37 °C com 200 µl de solução bloqueio (leite desnatado 5%). Posteriormente as placas foram lavadas com PBS-T e as cavidades foram incubadas com soros dos animais imunizados nos dias 0, 21, 42, 63 e 84 pós-inoculação, na diluição de 1:50 por 1 h a 37 °C. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com soro IgG anti-suíno conjugado com peroxidase (Sigma®), diluído 1:6000 em solução bloqueio por 1 h a 37 °C. A reação colorimétrica foi visualizada utilizando-se peróxido de hidrogênio e ortofenilenodiamina (Sigma®) e interrompida com 50 µl de 2 M H₂SO₄ por cavidade. A absorbância foi determinada em filtro 490 nm em leitor de ELISA Victor X3™ (Perkin Elmer). Os valores médios foram calculados das amostras dos soros ensaiadas em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A subunidade P42 da chaperona molecular DnaK é uma proteína de choque térmico, e tem sua expressão aumentada em situações de estresse para a célula bacteriana, como durante o processo de colonização do hospedeiro e desenvolvimento da doença. A expressão e caracterização deste antígeno é um importante passo para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a

PES que promova uma resposta imune protetora e de baixo custo. Os processos de clonagem, expressão, purificação e caracterização da proteína recombinante P42 foram considerados efetivos, sendo a expressão deste antígeno satisfatória em *E. coli* (Figura 1).

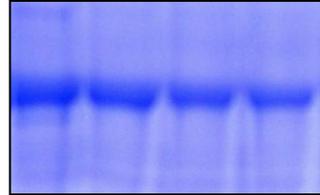


Figura 1. Gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie blue demonstrando a expressão da proteína rP42 em *E. coli* purificada por cromatografia de afinidade

A imunoreatividade dos soros de suínos imunizados com o antígeno rP42 foi avaliada por ELISA. Todos os animais que foram imunizados foram imunorreagentes contra a proteína rP42 a partir do dia 21 pós-imunização, porém o grupo imunizado com a rP42 + Montanide obteve destaque quando comparado com o grupo rP42 + PBS mantendo resposta constante até o dia 84 pós-imunização, sugerindo que o adjuvante oleoso presente na formulação potencializa a resposta imune humoral (Figura 2).

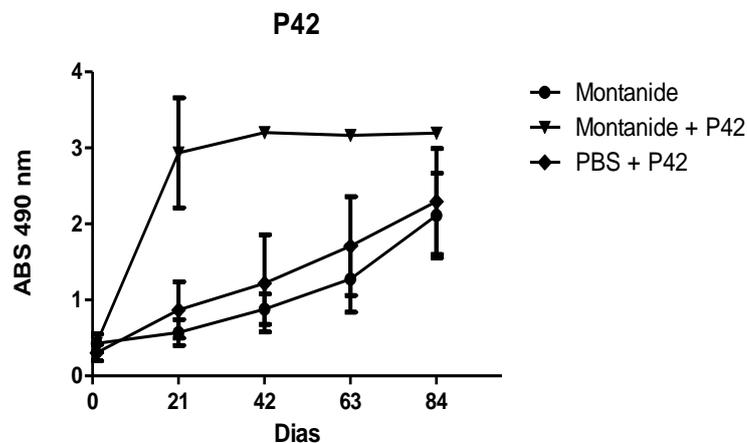


Figura 2. Resposta imune humoral dos soros dos suínos inoculados com as diferentes formulações vacinais, confrontados com o antígeno rP42, avaliados através de ELISA.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos concluí-se que a expressão do antígeno é efetiva em sistema heterólogo. A vacina de subunidade recombinante P42 foi capaz de induzir resposta imune humoral em suínos naturalmente infectados por *M. hyopneumoniae*, sugerindo o potencial deste antígeno como candidato para compor uma nova vacina contra PES. Desta maneira, torna-se ainda mais importante a avaliação da resposta celular dos grupos vacinados, uma vez que a indução de resposta mediada por células é conhecidamente como o mais efetivo contra a infecção (MARCHIORO et al., 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **Infection and Immunity**, v.71, n.3, p. 1155-1160, 2003.
- CHOU, S. Y.; CHUNG T. L.; CHEN R. J.; RO, L. H.; TSUI, P. I.; SHIUAN, D. Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein)-like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Biochemistry Molecular Biology**, v.41, n. 4, p.821–831, 1997.
- DEBEY, M.C. & ROSS, R.F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection and Immunity**, v.62, n.12, p.5312-5318, 1994.
- FRIIS, N.F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. **Nord Veterinary Medicine**, v.27, p.337-339, 1975.
- MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T., et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.126, n.4, p.297-309, 2008.
- MARCHIORO, S.B.; SIMIONATO, S.; GALLI, V.; CONCEIÇÃO, F.R.; BRUM, C.B.; FISH, A.; GOMES, C. K.; DELLAGOSTIN, O. A. Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet Microbiol**, v.155, n.1, p.44–52, 2012.
- SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* e infection. **The Veterinary Journal**, v.181, p.221–231, 2009.
- ROSS, R.F.; LEMAN, A.D.; STRAW, B.; GLOCK, R.D.; MENGELING, W.L.; PENNY, R.H.C.; SCHOLL, E. Diseases of Swine. **Mycoplasma Diseases**. The Iowa State University Press, Ames, IA, 1986, p. 469–483.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e Patologia Suína**. Goiânia: 2^a ed., Art 3 Impressos Especiais, 1999. p.359.