

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS  
CONTRA A REGIÃO R1 DA ADESINA P97 DE *Mycoplasma hyopneumoniae* PARA  
A UTILIZAÇÃO EM ENSAIO DE SEPARAÇÃO MAGNÉTICA

**REMIÃO, Mariana Härter<sup>1</sup>; MONTE, Leonardo Garcia<sup>1</sup>; JORGE, Sérgio<sup>2</sup>;  
GALLI, Vanessa<sup>2</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada – Centro de Biotecnologia, Cenbiot/UFPel.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia, Cenbiot/UFPel.

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

marri.hr@hotmail.com

## 1 INTRODUÇÃO

A pneumonia enzoótica suína (PES) é uma doença respiratória contagiosa associada ao patógeno primário *Mycoplasma hyopneumoniae*. Os animais acometidos apresentam uma broncopneumonia catarral devido à destruição do elevador mucociliar, que é o principal mecanismo de imunidade inata do trato respiratório, pré-dispondo os suínos a infecções secundárias oportunistas. Devido às perdas econômicas significativas, a PES é considerada uma doença de grande relevância para a produção mundial de suínos (Debey & Ross, 1994).

Estudos demonstraram que o processo de ancoramento do *M. hyopneumoniae* aos cílios da mucosa do trato respiratório suíno é auxiliado por uma adesina espécie específica chamada P97. A adesão do patógeno é mediada pela porção C-terminal da P97, uma região repetitiva denominada R1 (Hsu, 1998).

Microesferas magnéticas conjugadas com proteína A tem sido frequentemente utilizadas em aplicações biotecnológicas, tal como na separação imunomagnética (IMS). Para a realização da IMS, anticorpos policlonais ou monoclonais, específicos para antígenos de superfície conservados, são adsorvidos na superfície das microesferas, possibilitando a separação e concentração de agentes patogênicos a partir de alimentos ou amostras biológicas (Moreira, 2008).

Este trabalho descreve a produção e a avaliação de anticorpos policlonais contra a região R1 da P97, visando a sua utilização em ensaios de detecção e isolamento de *M. hyopneumoniae*.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A sequência codificadora para a região R1 da P97 de *M. hyopneumoniae* foi amplificada por PCR e clonada em plasmídeo de expressão em *Escherichia coli* segundo Conceição et al. (2006), visando a obtenção da proteína recombinante para a produção do anticorpo policlonal em camundongo.

A produção dos anticorpos policlonais foi realizada conforme Cevenini et al. (1991). Os anticorpos obtidos do fluido ascítico foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína G-Sepharose (GE Healthcare Company, USA) seguindo as instruções do fabricante e a concentração final mensurada em espectrofotômetro a 280 nm.

Após a purificação dos anticorpos policlonais, a amostra foi titulada através de ELISA indireto utilizando como antígeno 5 mg/mL da R1 recombinante para a sensibilização da placa.

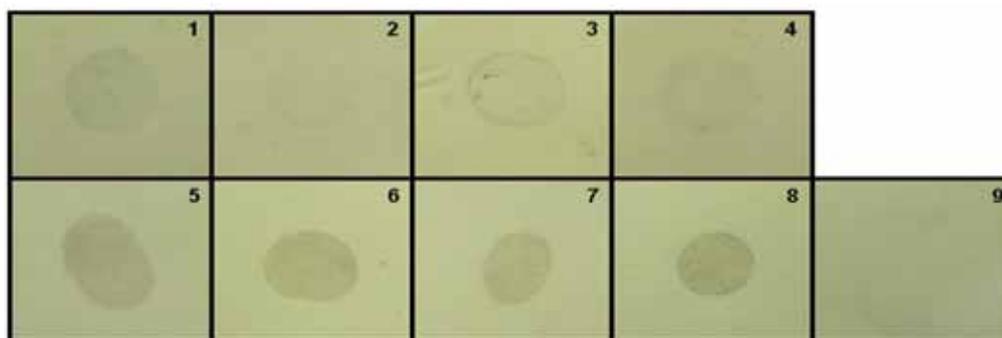
Para caracterizar os anticorpos policlonais anti-R1, um DOT BLOT com extrato de *M. hyopneumoniae* foi realizado. Duas cepas foram utilizadas no

experimento: a cepa 7448 e um isolado da Universidade de São Paulo, denominado cepa USP. Como controle positivo foi usado R1 recombinante, a quimera recombinante LTB-R1 (Conceição et al., 2006) e um anticorpo monoclonal anti-R1. Como controle negativo foi utilizado soro normal de camundongo.

Realizados os testes imunológicos com os anticorpos policlonais, estes foram adsorvidos a partículas magnéticas de poliestireno (Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN) conforme instruções do fabricante. Brevemente, as partículas foram lavadas com ajuda de um separador magnético e ressuspensas em 1 mL de tampão borato (pH 8.2, 50 mM) contendo 1,2 mg de anticorpo. O complexo de partículas e anticorpos foi adicionado a um cultivo de 14 dias de *M. hyopneumoniae* por 3 horas. A seguir, as partículas foram lavadas até a remoção das bactérias não ligadas. O DNA do produto imunoseparado foi extraído com Bacterial Genomic DNA extraction (GE Healthcare) ou com solução de extração contendo 0,125% de SDS e 50 mM de NaOH seguido de fervura por 15 min. Para confirmar a captura do *M. hyopneumoniae*, uma Nested-PCR foi realizada (Casamiglia et al., 1999). No controle negativo foi adicionado água e no positivo DNA de *M. hyopneumoniae* cepa 7448. O produto de cada PCR foi corado com gel red, submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% e visualizado em luz UV.

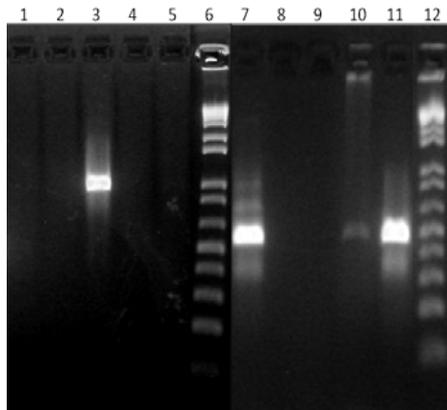
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os anticorpos policlonais anti-R1 apresentaram título elevado, já que foram verificadas reações no ELISA indireto até a diluição 1:512.000. Os resultados obtidos no DOT-BLOT mostram que o anticorpo policlonal anti-R1 foi capaz de reconhecer a proteína nativa de *M. hyopneumoniae*, como podemos observar na Figura 1, demonstrando potencial para ser utilizado em separação imunomagnética.



**Figura 1.** Reações obtidas com a técnica de DOT-BLOT usando os anticorpos contra R1. 1- rR1 e Ac policlonal; 2- rR1 e Ac monoclonal; 3- rLTB-R1 e Ac policlonal; 4- rLTB-R1 e Ac monoclonal; 5- Cepa USP e Ac policlonal; 6- Cepa USP e Ac monoclonal; 7- Cepa 7448 e Ac policlonal; 8- Cepa 7448 e Ac monoclonal; 9- Controle negativo.

A técnica de imunoseparação foi realizada com sucesso, havendo a confirmação da captura da bactéria através da amplificação por Nested-PCR de um fragmento do rRNA 16S de *M. hyopneumoniae*. A extração de DNA utilizando o kit comercial mostrou-se mais eficiente do que a utilização de tampão de extração seguido de fervura (Fig. 2).



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 0,8%, realizada com os produtos da Nested-PCR. As colunas de 1 a 5 representam a primeira reação de amplificação utilizando os primers mais externos ao gene 16S *rRNA*. As colunas 7 a 11 representam a segunda reação de amplificação utilizando os primers mais internos ao gene 16S *rRNA*. Colunas 1 e 8 controle negativo, 2 e 9 controle de contaminação da bancada, 3 e 7 controle positivo, 4 e 10 IMS com DNA extraído com SDS; 5 e 11 IMS com DNA extraído com kit. Colunas 6 e 12, marcador de massa molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

#### 4 CONCLUSÕES

Os anticorpos policlonais produzidos neste estudo foram capazes de reconhecer a região R1 da proteína P97 nativa, mostrando-se eficientes na captura de *M. hyopneumoniae* através de um sistema de separação magnética. Além disso, eles poderão ser utilizados em outras técnicas imunológicas, como imunohistoquímica e imunofluorescência.

#### 5 REFERÊNCIAS

CASAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; TRIGO, A;. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p.246-251, 1999.

CEVENINI, R.; SAMBRI, V.; PILERI, S.; RATTI, G.; LA PLACA, M;. Development of transplantable ascites tumours which continuously produce polyclonal antibodies in pristane primed BALB/c mice immunized with bacterial antigens and complete Freund's adjuvant. **Journal Immunological Methods**, v.140, p. 111-118, 1991.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v.24, p.5734-5743, 2006.

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, p.5312-5318,1994.

HSU, T.; MINION, F. C. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. **Infection and Immunity**, v.66, p.4762-4766, 1998.

MOREIRA, A.N.; CONCEIÇÃO, F.R.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; RAMOS, R.J.; CARVALHAL, J.B.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A.G. Detection of *Salmonella typhimurium* in raw meats using inhouse prepared monoclonal antibody coated-magnetic beads and PCR assay of the fimA gene. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, v.29, p.58-69, 2008.