

## RESPOSTA IMUNE HUMORAL INDUZIDA POR UMA QUIMERA DE ANTÍGENOS DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS

**STARK, Cledir B.<sup>2</sup>; MARCHIORO, Silvana B.<sup>1</sup>; JORGE, Sérgio<sup>1</sup>;  
DELLAGOSTIN, Odir<sup>1</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio R.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular; <sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada – Centro de Biotecnologia/UFPel, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354 – Pelotas – RS, CEP 96010-900.  
[cledirstark@hotmail.com](mailto:cledirstark@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A Pneumonia Micoplásmica Suína (PMS), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, constitui uma das doenças respiratórias de maior impacto econômico na suinocultura. É uma doença crônica, altamente contagiosa, com alta morbidade e baixa mortalidade que se caracteriza por uma broncopneumonia catarral, manifestada clinicamente por tosse seca, piora nas taxas de conversão alimentar tendo como consequência atraso no ganho de peso (SOBESTIANSKY et al., 1999a). O *M. hyopneumoniae* destrói o elevador mucociliar (DEBEY & ROSS, 1994), pré-dispondo os suínos a infecções secundárias (ROSS, 1999), aumentando ainda mais os gastos com a produção. É transmitida principalmente pelo contato direto entre os suínos ou através de tosse e espirro (STEVENSON, 1998), mas variáveis ambientais e de manejo podem favorecer a sua ocorrência e severidade.

Atualmente a vacinação é a forma mais efetiva de controlar a PMS (LIN et al., 2003), no entanto, as vacinas disponíveis comercialmente são constituídas de cultivos “*in vitro*” de *M. hyopneumoniae*, o que encarece excessivamente sua produção além de conferirem proteção parcial aos suínos (HAESEBROUCK et al., 2004), reduzindo as lesões, mas não a colonização (SIBILA et al., 2008), não impedindo assim o estabelecimento de suínos portadores, uma vez que não estimulam o sistema imune de mucosa, cujo principal mecanismo de proteção é mediado pela IgA secretora - IgAs (MCGHEE, 1992).

Portanto, a produção de vacinas mais eficientes, desenvolvidas através de novas tecnologias, como as que utilizam a tecnologia do DNA recombinante, é promissora. Entretanto, muitas proteínas recombinantes, produzidas por esta metodologia, não são suficientemente imunogênicas a ponto de conferir uma imunidade protetora, tornando-se indispensável à utilização de adjuvantes, como a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), que além de constituir um adjuvante da imunidade de mucosa, estimula uma potente resposta sistêmica e secretória (IgAs) de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados (DE HAAN et al., 2001; FINGERUT et al., 2005). Assim, a LTB recombinante, fusionada a antígenos recombinantes (quimera), pode representar uma nova alternativa no controle da PMS.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune humoral induzida pela aplicação parenteral e nasal de uma quimera constituída pelos antígenos R1 (P97), P42 e NrdF de *M. hyopneumoniae*, fusionados a LTB, em suínos, visando o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a PMS.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de animais livres de *M. hyopneumoniae*

Foram utilizados três leitões não vacinados adquiridos do Complexo Agropecuário da Palma – Pelotas/RS, de um rebanho positivo para *M. hyopneumoniae*, de acordo com os resultados obtidos por FISCH et al (2009). A obtenção de animais livres foi possível mediante a estratégia de desmame precoce medicado (HARRIS & ALEXANDER, 1999), de forma que os animais foram tratados com tulatromicina (2,5 mg/kg) e desmamados aos 14 dias de vida. Após esse período foram transferidos para o biotério da UFPel, onde seguiu-se o aleitamento até os 21 dias e após alimentados com ração, isenta de antimicrobianos até o dia do abate, e água *ad libitum*.

### 2.2 Inoculações dos animais, coleta do soro e lavado traqueobrônquico

Os animais foram devidamente identificados e inoculados aos quatro meses de idade com 500 µg da quimera recombinante LTB-R1-P42-Nrdf, simultaneamente por via intramuscular e intranasal, totalizando três inoculações, com intervalos de uma semana. Semanalmente era realizada a coleta de sangue através de punção da veia jugular para fazer a avaliação da resposta imune humoral sistêmica (IgG). O sangue foi coletado em um tubo sem anticoagulante e incubado a 37 °C por uma hora, sendo posteriormente centrifugado por 5 minutos (3.000 rpm), e o soro estocado à -20 °C até sua utilização. O lavado traqueobrônquico foi obtido após eutanásia de um dos animais inoculados. Tampão fosfato salina estéril (10 ml) foi inoculado no trato respiratório desse animal, homogeneizado e recuperado novamente. O lavado foi centrifugado por 10 minutos (3.000 rpm) e o sobrenadante coletado e estocado a -20 °C.

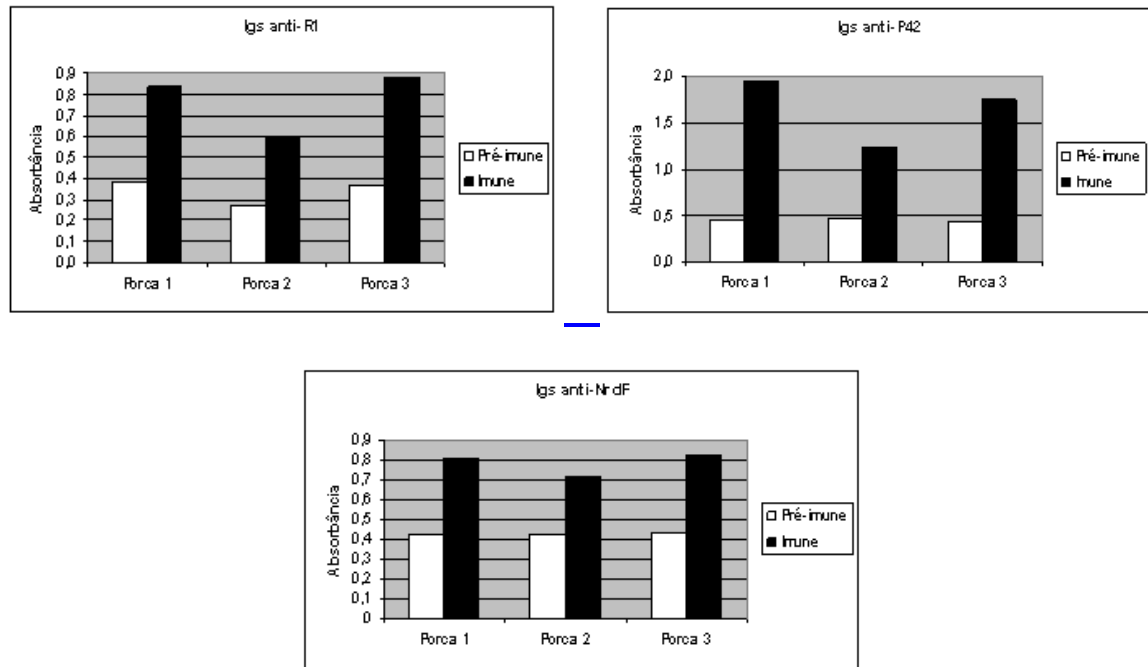
### 2.3 ELISA indireto

A detecção de anticorpos no soro e no lavado traqueobrônquico foi determinada por ELISA indireto utilizando microplacas Maxi-Sorp de 96 cavidades, sensibilizadas com 100 µL de cada antígeno: R1, P42 e Nrdf (50 ng/cavidade), diluídos em tampão carbonato/bicarbonato e incubadas *overnight* a 4 °C. Após, foram lavadas três vezes com PBS-T, sendo então incubadas com 200 µL de tampão de bloqueio a 37 °C por 2 horas. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas com soro suíno (1:100) ou com lavado traqueobrônquico (1:10) à 37 °C por 2 horas. Após lavar com PBS-T, as cavidades foram incubadas com anticorpo anti-IgG ou anti-IgA de suíno conjugado com peroxidase (1:6000) à 37 °C por 1 hora. As reações foram reveladas com o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma) e peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos, a reação foi parada com a adição de 50 µL de 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A absorbância foi determinada em filtro de 492 nm em leitor de ELISA.

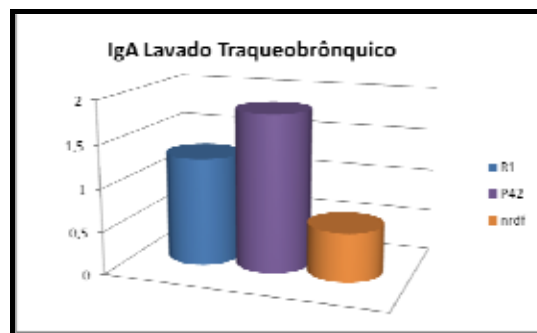
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A avaliação de anticorpos pela técnica de ELISA no soro dos animais inoculados permitiu observar uma pequena variação entre cada animal, e uma diferença maior contra cada antígeno, na resposta anti-IgG, demonstrando que cada um deles é diferenciado na capacidade de induzir uma resposta imune. A

maior resposta foi obtida com o antígeno P42 e a menor com o antígeno Nrdf (Fig. 1). Dados semelhantes foram observados na produção de anticorpos anti-IgA contra cada antígeno, obtidos de lavado traqueobrônquico do animal eutanasiado. O antígeno que induziu maior resposta foi o P42, seguido de R1 e Nrdf (Fig. 2), demonstrando o potencial da LTB como adjuvante da imunidade de mucosa.



**Fig. 1, 2 e 3:** Níveis de anticorpos sistêmicos anti-R1, anti-P42 e anti-NrdF, determinados mediante ELISA indireto, de leitões inoculados com 3 doses de quimera sintética. Pré-imune corresponde ao soro do dia 0 e Imune ao soro coletado após a terceira dose.



**Fig. 4:** Resposta anti-IgA obtido através de ELISA indireto de lavado traqueobrônquico de um animal inoculado com a quimera recombinante. Valores apresentados em absorbância (492 nm).

#### 4. CONCLUSÕES

Pelos resultados gerados neste estudo podemos concluir que a quimera recombinante LTB-R1-P42-Nrdf foi capaz de induzir uma resposta imune humoral específica contra os antígenos avaliados. Além disso, induziu IgA específica na mucosa respiratória, fato que pode melhorar a proteção contra *M.*

*hyopneumoniae*. Futuros experimentos, visando comprovar a eficiência deste protótipo de vacina, serão conduzidos em breve utilizando um número maior de animais.

## 5. REFERÊNCIAS

- DEBEY, M.C. & ROSS, R.F. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection and Immunity**, 62:5312-5318.
- DE HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; HOLTROP, M.; et al., 2001. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA or IgG mediated protective mucosal immunity. **Vaccine**, 19: 2898-2907.
- FINGERUT, E.; GUTTER, B.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J., 2005. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of *Escherichia coli* enterotoxin produced in yeast. **Vaccine**, 23:4685-4696.
- FISCH, A., et al. Ocorrência de *Mycoplasma hyopneumoniae* nas fêmeas suínas do Complexo Agropecuário da Palma – Pelotas/RS. In: **XVIII CIC / XI ENPOS / I Mostra Científica – UFPel**, Pelotas, 2009
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; et al., 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, 100:255-268
- HARRIS, H.; ALEXANDER, T., Methods of disease control. In: STRAW, B., D'ALLAIRE, S., MENGELING, W., TAYLOR, D. (Eds.), **Diseases of Swine**. 8th ed. Iowa State University Press, Ames, 1999, pp. 1077–1110.
- LIN, J.H. et al. 2003. Protective effects of oral microencapsuled *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **Journal of Veterinary Medicine Science**, 65:69-74.
- MCGHEE, J.R.; MESTECKY J.; DERTZBAUGH M.T.; et al. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, 10:75-88.
- ROSS, R. Mycoplasmal diseases. In: Straw, B.E., Allaire, S.D., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), **Disease of swine**, Iowa State University Press, Ames, 1999, p. 495-509.
- SIBILA, M.; BERNAL, R.; TORRENTS, D.; et al. 2008. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. **Veterinary Microbiology**, 127:165-170.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; et al. 1999a. Pneumonia enzoótica. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2ª ed., Art 3 Impresses Especiais, Goiânia, Goiás, p.359.
- STEVENSON, G.W. Bacterial pneumoniae in swine. In: **International Practitioner Veterinary Society (IPVS)**, Birmingham, England. 1998, p.11–20.