

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Centro de Desenvolvimento Tecnológico



Dissertação

**Desenvolvimento de um ELISA indireto com antígenos
recombinantes para detecção de anticorpos contra
*Mycoplasma hyopneumoniae***

Clarice Brinck Brum

Pelotas, 2011

CLARICE BRINCK BRUM

**Desenvolvimento de um ELISA indireto com antígenos
recombinantes para detecção de anticorpos contra
*Mycoplasma hyopneumoniae***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências (área do
conhecimento: Biologia Molecular).

Orientador: Dr. Odir Antônio Dellagostin
Co-orientadora: Dra. Simone Simionatto

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B893d Brum, Clarice Brinck
Desenvolvimento de um ELISA indireto com antígenos
recombinantes para detecção de anticorpos contra
Mycoplasma hyopneumoniae / Clarice Brinck Brum. – 46f. :
graf. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro
de Desenvolvimento Tecnológico, 2011. – Orientador Odir
Antônio Dellagostin ; co-orientador Simone Simionatto.

1.Biotecnologia. 2.Mycoplasma hyopneumoniae.
3.Proteínas recombinantes. 4.ELISAS. 5.Pneumonia
enzoótica suína(PES). I. Dellagostin, Odir Antônio.
II.Simionatto, Simone. III.Título.

CDD: 636.40896

Banca examinadora:

Dra. Sibeles Borsuk, Universidade Federal de Pelotas.

Dra. Vanusa Pousada da Hora, Universidade Federal do Rio Grande.

Dr. Fabricio Rochedo Conceição, Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas.

Aos meus queridos e amados pais Hermes e Roze,
sempre presentes, apesar da distância que nos separa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo e por todos.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de estar cursando o mestrado em Biotecnologia.

Em especial ao meu orientador, Prof. Odir Dellagostin, pela oportunidade, conhecimento e a orientação que sempre foram imprescindíveis para minha formação profissional.

À minha co-orientadora, Simone Simionatto, que mesmo distante sempre me ajudou nas decisões e dicas que orientaram a realização desse trabalho.

Ao Prof. Fabrício Conceição pela ajuda durante grande parte do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos irmãos, Cássia e Afonso, por todo o amor, amizade e companheirismo.

Aos avós Vergilino, Maria e Selma pelo amor e cuidados prestados ao longo do período desse trabalho.

Ao Chico, pelo amor, carinho, compreensão, enorme apoio e incentivo em toda essa etapa.

À minha amiga Natália, pela ajuda na compilação dos dados nas várias horas de trabalho.

As amigas Daniela Ramos e Silvana Marchioro, pela amizade, companheirismo, sempre prontas para ajudar e dar sua opinião, até mesmo nas situações mais embaraçosas, valeu amigas!!!

À Vanusa, responsável pelos meus primeiros passos na biotecnologia. Obrigada por tudo Zazá!!!

À Sibeles, pela ajuda nas análises. Sibe, tua ajuda foi peça fundamental para chegar ao fim desse trabalho.

As técnicas e amigas Kátia e Michele, pelo apoio, pois sempre estavam prontas para ajudar.

Ao colega Sérgio, sua ajuda com os ELISAS foi muito importante.

Aos estagiários Cledir, Andressa e Charles, pela ajuda em diversas etapas.

Ao Sr. Vilson, pelo apoio, amizade e ajuda nas coletas.

Aos demais colegas do laboratório de Biologia Molecular, André, Michel, Samuel, Amilton, Daiane, Carol R., Karen, Vanessa, Carol X., Taís, Kátia B., Karine, pelo convívio diário.

À Embrapa Suínos e Aves, pela colaboração e fornecimento do material biológico.

A todos os professores, funcionários e alunos do Centro de Biotecnologia da UFPel que colaboraram de alguma forma.

Àqueles que literalmente deram o sangue para a execução deste trabalho, os “porquinhos”.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

BRUM, Clarice. **Desenvolvimento de um ELISA indireto com antígenos recombinantes para detecção de anticorpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2011. 46f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das principais doenças respiratórias que acomete suínos no mundo. Esta doença é caracterizada por retardo no desenvolvimento, principalmente em animais em fase de crescimento e terminação, ocasionando perdas econômicas significativas no rebanho. O diagnóstico presuntivo é baseado em sinais clínicos e na presença de lesões, no entanto, testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo da doença. Embora o cultivo do agente seja considerado o padrão ouro, o mesmo não é usado como rotina, devido ao crescimento extremamente lento deste agente e a interferência por outros micoplasmas. Desta forma, há a necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais sensíveis e específicos para esta doença. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um ELISA indireto para a detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*. Para isso, foram testadas individualmente seis proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli*, consideradas espécie-específica (P46, P95, P97 like, P102AB, Lppt e proteína hipotética 987), utilizadas como antígeno na sensibilização de placas de ELISA. Cada uma destas proteínas foi confrontada com 3 categorias de soros de suínos. A sensibilidade e especificidade obtida para cada uma das proteínas foram respectivamente as seguintes: P95, 74,3% e 97,6%; P46, 53,7% e 97,6%; Lppt, 28,4% e 97,2%; 987, 27,1% e 96,1%; P102AB, 65,5% e 97,6%; P97 like, 72,6% e 97,2%. Usando o ponto de corte definido, foi calculado o valor preditivo positivo que variou de 17,4% (para prevalências de 10%) a 99,4% (para prevalências de 90%), e o valor preditivo negativo que variou de 34,5% a 99,5% dependendo da prevalência da doença em uma determinada área. Estes dados mostram que proteínas como a P95, P46, P102AB e P97 like são potenciais alvos para uso em testes de diagnóstico para detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*.

Palavras chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*. Pneumonia Enzoótica. ELISA. diagnóstico.

ABSTRACT

BRUM, Clarice. **Development of an ELISA with recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2011. 46f. Dissertation (Master) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of swine enzootic pneumonia (EP), one of the most important respiratory diseases which affect swine worldwide. This disease is characterized by retarded development, especially in animals in the growing and finishing phase, causing significant economic losses in the herd. The presumptive diagnostic is based on clinical signs and lesions, however, laboratory tests are needed for a conclusive diagnosis of disease. Although the culture of the agent is considered the gold standard, it is not used routinely because of the slow growth of the bacterium and interference by other mycoplasmas. Therefore, there is a need for development of more sensitive and specific diagnostic methods for this disease. This study aimed the standardization and validation of an ELISA for detection of antibodies against *M. hyopneumoniae*. For this, six recombinant proteins of *M. hyopneumoniae* considered species-specific (P46, P95, P97 like, P102AB, Lppt and hypothetical protein 987) were evaluated. They were used as antigen for coating ELISA plates. Each of these proteins was confronted with three sets of pig serum. The sensitivity and specificity obtained for each protein were respectively: P95, 74.3% e 97.6%; P46, 53.7% e 97.6%; Lppt, 28.4% e 97.2%; 987, 27.1% e 96.1%; P102AB, 65.5% e 97.6%; P97 like, 72.6% e 97.2%. Using the set cut-off point, we calculated the positive predictive value, which ranged from 17.4% (for prevalence of 10%) to 99.4% (for prevalence of 90%), and negative predictive value which ranged from 34.5% to 99.5% depending on the prevalence of disease in a given area. These data show that the proteins P95, P46, P97 and P102AB like are potential targets to be use in diagnostic tests to detect antibodies against *M. hyopneumoniae*.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*. Enzootic Pneumonia. ELISA. diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteínas recombinantes de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> utilizadas neste trabalho.....	24
Tabela 2	Média, desvio padrão e ponto de corte estabelecidos.....	26
Tabela 3	Resultado do ELISA indireto com as proteínas e extrato.....	27
Tabela 4	Resultados comparativos com proteínas recombinantes, extrato e kit comercial.....	28
Tabela 5	Resultados de sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Quadro esquemático com as fórmulas de sensibilidade, especificidade e valor preditivo.....	28
Figura 2	Valores preditivo positivo e negativo em relação à prevalência da doença, determinados pela análise ROC.....	29

SUMÁRIO

Desenvolvimento de um ELISA indireto com antígenos recombinantes para detecção de anticorpos contra <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	2
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.1 Pneumonia Enzoótica Suína (PES)	12
1.2 Etiopatogenia.....	12
1.3 Epidemiologia.....	13
1.4 Controle.....	14
1.5 Vacinas.....	15
1.6 Diagnóstico.....	16
2. OBJETIVOS	19
3. ARTIGO.....	20
RESUMO.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	32
4. CONCLUSÃO.....	36
5. REFERÊNCIAS.....	37

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Pneumonia Enzoótica Suína (PES)

A cadeia produtiva da suinocultura brasileira está em fase de constante crescimento, proveniente do grande avanço genético, de nutrição e manejo. Isso se observa principalmente pelo crescimento da produção de carne suína. No Brasil, constatou-se que o abate de suínos nos últimos anos vem apresentando uma trajetória de alta nos seus indicadores, com aumento de 2,9% ao ano. A Região Sul representa 65,4% da produção nacional (IBGE, 2010).

As doenças respiratórias constituem um dos mais importantes problemas de saúde associados à produção suína. Dentre estas enfermidades a que apresenta maior impacto na cadeia produtiva é a Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* (FREY et al., 1994; RAUTIAINEN, WALLGREN, 2001). A PES é uma doença contagiosa e caracterizada por uma broncopneumonia catarral que, clinicamente manifesta-se por tosse seca e crônica, atraso no ganho de peso, alta morbidade e baixa mortalidade. Suínos em todas as idades são susceptíveis à infecção, sendo que a forma clínica da doença é mais frequente em animais em fase de crescimento e terminação (SOBESTIANSKY et al., 1999). Esta infecção é altamente prevalente em quase todas as áreas produtivas e causa significativas perdas econômicas (ROSS, 1999). O *M. hyopneumoniae* é considerado também um dos agentes primários envolvidos no complexo de doenças respiratórias de suínos (PRDC) (THACKER, 2006).

1.2 Etiopatogenia

O *M. hyopneumoniae* é o agente etiológico da PES, porém outros patógenos são frequentemente encontrados durante o curso da doença (THACKER, 2006). A ausência da parede celular proporciona um pleomorfismo às células do micoplasma, podendo variar de esférico a bacilar, de filamentososo a helicoidal. O diâmetro da forma esférica varia de 0,3 a 0,8 μm e possui uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana. A ausência de parede celular favorece também a passagem desses microrganismos por

membranas com porosidade de até 0,22 μm . A maioria dos micoplasmas cresce lentamente em meio de cultivo e as colônias tornam-se visíveis após 2 a 3 dias de incubação, aumentando de 0,25 a 1 mm de diâmetro em aproximadamente 10 dias. As células do micoplasma coram-se pelas técnicas de Giemsa, Casteñeda, Dienes e azul de metileno. As condições ideais de cultivo *in vitro* são: temperatura de 37 °C, pH 7,5, atmosfera com 5 a 10% de CO₂ (ROSS, 1999).

Este microrganismo liga-se especialmente aos cílios do epitélio respiratório dos suínos, causando redução do movimento ciliar e, conseqüentemente, decréscimo da função do mecanismo natural de defesa do trato respiratório. Ao colonizar o epitélio do trato respiratório, compromete sua integridade através da indução de uma resposta inflamatória (SOBESTIANSKY et al., 1999). O período de incubação desse agente varia de 10 a 16 dias, sob condições experimentais. Ao colonizar as células epiteliais respiratórias causam redução da atividade ciliar do epitélio respiratório, ciliostase e perda dos cílios (ROSS, 1999), predispondo os animais a infecções secundárias e oportunistas. Danos nas células epiteliais podem ser causados também por toxicidade moderada de produtos do metabolismo, como o peróxido de hidrogênio e radicais de superóxido (RAZIN et al., 1998). Embora o *M. hyopneumoniae* seja considerado patógeno respiratório, estudos recentes reportaram o isolamento deste agente de órgãos de suínos infectados experimentalmente como fígado, baço e rim (MAROIS et al., 2007). Este resultado sugere que a infecção causada pelo *M. hyopneumoniae* não é restrita ao aparelho respiratório e merece estudos futuros.

1.3 Epidemiologia

O contato direto é considerado a principal forma de transmissão, no entanto a disseminação através de aerossóis vem sendo considerada uma via potencial de transmissão dentro do plantel e entre plantéis diferentes (BARGEN, 2004). A transmissão passiva pode ocorrer através de utensílios provindos de granjas contaminadas. Porém, a forma mais frequente de transmissão ocorre da matriz para a progênie (SIBILA et al., 2009).

A doença tem ampla distribuição geográfica, podendo acarretar grandes perdas econômicas para o produtor e a indústria, principalmente com o aumento do uso de

medicamentos e a piora na conversão alimentar dos suínos (MAES et al., 2008). Estudos realizados em diferentes países indicam que as lesões sugestivas da PES ocorrem de 30% a 80% dos suínos abatidos. Na região Sul do Brasil, que representa cerca de 65% do abate nacional, constatou-se que 55% dos suínos ao abate apresentavam lesões sugestivas de PES e 100% dos rebanhos examinados estavam afetados (SOBESTIANSKY, 1999). Dados semelhantes foram descritos por MAES et al. (1999) que relataram ter mais de 90% dos rebanhos belgas infectados por *M. hyopneumoniae*.

1.4 Controle

Dada a importância da PES no cenário mundial de produção de suínos, especialmente no que diz respeito às perdas econômicas decorrentes de infecções e co-infecções com outros patógenos, torna-se cada vez mais necessária a implementação de medidas de controle efetivas. O controle da infecção por *M. hyopneumoniae* pode ser realizado de diferentes maneiras, tais como: boas práticas de manejo e nas condições de alojamento, o uso de antimicrobianos e a vacinação dos animais (MAES et al. 2008).

As melhorias nas práticas de manejo são primordiais para o controle de infecções por *M. hyopneumoniae*, e deve ser a primeira medida a ser tomada. Instituir mudanças relacionadas aos: sistemas de produção *all-in, all-out*, cuidados especiais na compra de novos animais, tamanho do rebanho, controle de outras doenças, assim como práticas de biossegurança, podem reduzir a disseminação do agente, diminuir o dano pulmonar por outros patógenos e levar a um considerável aumento no controle da PES (MAES et al., 2008).

A redução na densidade de suínos nos diferentes estágios da produção tem reduzido os números de doenças respiratórias. Uma superlotação de suínos pode aumentar a transmissão de patógenos respiratórios e de estresse, deixando os animais mais susceptíveis a doenças infecciosas. Porém, numa criação intensiva a baixa densidade de suínos é economicamente inviável. Portanto, é recomendável encontrar a densidade apropriada para o *status* sanitário do lote capaz de maximizar o retorno financeiro (MAES et al., 2007).

1.5 Vacinas

A vacinação é considerada a prática mais efetiva no controle da doença (ROSS, 1999). As vacinas disponíveis comercialmente são bacterinas as quais conferem apenas uma proteção parcial, não prevenindo a colonização do agente ao epitélio respiratório dos suínos (THACKER et al., 1998, 2000). Além disso, esta vacina apresenta elevado custo de produção, principalmente devido ao crescimento fastidioso deste agente (CHEN et al., 2001).

O mecanismo exato de proteção conferido pelas bacterinas comerciais não está totalmente esclarecido, entretanto estudos sugerem que os anticorpos de mucosa e resposta imune sistêmica mediada por células são importantes no controle da doença (THACKER et al., 2000). Porém, a correlação entre a produção de anticorpos locais específicos e a proteção contra a pneumonia ainda não foi esclarecida. Experimentos de desafio em suínos demonstraram que o nível de anticorpos no trato respiratório de suínos não esteve relacionado à proteção contra a pneumonia (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al., 1998).

Já foram produzidas e avaliadas várias proteínas de *M. hyopneumoniae* quanto a sua antigenicidade e/ou imunogenicidade (LIN et al., 2003; MEENS et al., 2006; OKAMBA et al., 2007; CHEN et al., 2008, MARCHIORO et al., 2008, SIMIONATTO et al., 2008). No entanto, somente duas destas foram testadas em ensaio de imunoproteção em suínos, as quais induziram apenas redução das lesões pulmonares e melhoria nas taxas de conversão alimentar (FAGAN et al., 2001; SHIMOJI et al., 2003; OKAMBA et al., 2010).

Com o sequenciamento e análise proteômica complementar de cinco cepas de *M. hyopneumoniae* (232, 7448, 7422, J, 186), foi possível a identificação de genes que codificam proteínas com potencial para utilização em imunodiagnóstico e/ou vacinação (VASCONCELOS et al., 2005). Simionatto (2009) produziu e caracterizou 35 destas proteínas, as quais foram clonadas, expressas em *Escherichia coli*, purificadas e caracterizadas quanto à imunogenicidade e antigenicidade. Algumas destas apresentaram potencial para utilização em teste de imunodiagnóstico.

Nos últimos anos, a disponibilidade de sequências inteiras de genomas tem mudado a metodologia utilizada para o desenvolvimento de vacinas, e introduzido uma nova maneira de pensar este processo (RAPPUOLI, 2001). Este aumento no

número de genomas tem induzido a aplicação da vacinologia reversa principalmente para patógenos dos quais a vacinologia clássica tem falhado (MORA et al., 2006). Porém a o sequenciamento de um ou dois genomas por espécie nem sempre é suficiente. Com a variabilidade genética existente entre algumas cepas, muitas vezes, se faz necessário o sequenciamento de um maior número de isolados para entender melhor a base destas espécies (MORA et al., 2005).

A tecnologia do DNA recombinante, associada à abordagem da vacinologia reversa, têm fornecido ferramentas valiosas para a produção de proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* em sistemas heterólogos. Estas proteínas podem resultar em vacinas contra PES mais eficientes, substituindo as atuais que apresentam elevado custo de produção devido à dificuldade no cultivo do agente (KOBISCH; FRIIS, 1996).

1.6 Diagnóstico

Para detecção do *M. hyopneumoniae* são utilizados várias estratégias de diagnóstico, no entanto estas apresentam suas limitações. Sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas podem ser usadas para um diagnóstico presuntivo da PES, porém testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo da doença (ROSS, 1999). A inspeção em abatedouros é frequentemente utilizada para estimar a incidência de PES. O pulmão de pelo menos 30 animais deve ser examinado para determinar uma medida de prevalência e severidade na pneumonia em nível de rebanho. Porém, as lesões causadas por *M. hyopneumoniae* não são patognomônicas (SIBILA et al., 2009).

O cultivo do *M. hyopneumoniae* é descrito como o padrão ouro, porém, ele não é usado como rotina no diagnóstico devido ao crescimento extremamente lento deste agente e a interferência com outros micoplasmas. As técnicas de imunofluorescência (IF) e imunohistoquímica (IHC) são utilizadas para identificação de *M. hyopneumoniae* em tecidos ou em esfregaços de lâminas. No entanto, esta técnica tem a desvantagem de ser realizada *post-mortem* (SIBILA et al., 2008).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido descrita como uma das técnicas mais sensíveis para detecção de infecções causadas pelo *M.*

hyopneumoniae (CALSAMIGLIA et al., 1999). A técnica de PCR apresenta diversas vantagens devido a sua sensibilidade, especificidade e rapidez (THACKER, 2004).

Vários trabalhos já foram descritos utilizando diferentes variações da técnica, bem como diferentes alvos (CARONETAL et al., 2000; VERDINETAL., 2000; KURTH et al., 2002; DUBOSSON et al., 2004; STAKENBORG et al., 2005; CAI et al., 2007; STRAIT et al., 2008). O tecido pulmonar é o mais utilizado para detecção do organismo por PCR, enquanto que o isolamento é mais variável em amostras coletadas na cavidade nasal. O uso de PCR para o diagnóstico da infecção natural a partir de *swab* nasal foi descrito como o mais promissor, uma vez que houve correlação entre a detecção do DNA do *M. hyopneumoniae* e a presença de lesões da PES (SIBILA et al., 2004; 2007). A variação *Nested-PCR* usando dois conjuntos de *primers* é visto como a técnica mais sensível para detectar a infecção (SIBILA et al., 2008), porém pode apresentar resultados falsos positivos uma vez que possui facilidade na contaminação das amostras.

Os testes sorológicos são comumente utilizados para diagnosticar a PES. Detecção de anticorpos para *M. hyopneumoniae* pode ser realizada por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e, menos frequentemente, pelo teste de fixação do complemento. O ELISA é um método automatizado rápido e barato que fornece informações úteis quanto à presença de anticorpos (SIBILA et al., 2008). Atualmente os mais utilizados são ELISA de bloqueio (IDEIA, *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA kit, Oxoid) e dois tipos de ELISA indireto (HerdCheck, IDEXX e Tween 20-ELISA). No entanto, estudos comparativos reportaram divergências quanto à sensibilidade e especificidade destes kits (SORENSEN et al., 1997; STRAIT et al., 2004; ERLANDSON et al., 2005).

Na busca de um teste sorológico eficiente para a PES, diferentes antígenos de *M. hyopneumoniae* já foram avaliados. OKADA et al. (2005) utilizou um anticorpo monoclonal anti-P46 e a proteína recombinante P46 em um ELISA duplo-sanduíche. Porém demonstraram que em suínos experimentalmente infectados os resultados de ELISA e teste de fixação do complemento, não foram sensíveis e específicos para *M. hyopneumoniae*. Um ELISA indireto utilizando como antígeno a região N-terminal e C-terminal da P97 foi proposto por Jang e Kim (2007). No entanto, somente a região C-terminal foi considerada promissora para uso como sorodiagnóstico. Das

70 amostras testadas, 26 (37%) foram soropositivas, enquanto que a porção N-terminal dessa mesma proteína, apenas 4 (6%) amostras foram positivas nesta região.

Em um estudo, com objetivo de diferenciar animais infectados de animais vacinados, desenvolveram um ELISA (SIgA-ELISA) baseado na adesina P97R1 para detecção de imunoglobulina A secretória contra *M. hyopneumoniae*. Este trabalho demonstrou alta correlação (95,8%) entre os resultados por *Nested-PCR* e SIgA-ELISA (FENG et al., 2010).

Considerando as vantagens e desvantagens de cada estratégia de diagnóstico, deve-se levar em conta o material a ser diagnosticado e o grau de infecção. MOORKAMP et al. (2010), observaram que IHC parece ser mais correlacionado com a presença de lesões pulmonares macroscópicas do que em infecções latentes com *M. hyopneumoniae* enquanto que PCR parece ser mais sensível para detectar infecções recentes, incluindo infecções latentes antes de as lesões pulmonares serem detectáveis. O diagnóstico de *bronchoalveolar lavage fluid* (BALF) com *Nested-PCR* demonstrou-se sensível, mas não traz informações sobre a severidade das lesões de pulmão tais como as avaliações macroscópicas na necropsia e IHC em secção de tecido. A detecção de *M. hyopneumoniae* em BALF por *Nested-PCR* correlaciona-se significativamente com a ocorrência de lesões macroscópicas e histopatológicas típicas (MOORKAMP et al., 2010).

2.OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolvimento e padronização de um ELISA indireto testando individualmente seis proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* como antígeno, visando ao diagnóstico sorológico da PES.

Objetivo específico

Avaliar a eficiência de seis proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* como antígeno em um ELISA indireto;

Avaliar a especificidade e sensibilidade do ELISA indireto com cada uma das seis proteínas recombinantes.

3 ARTIGO

Desenvolvimento de um ELISA indireto com antígenos recombinantes para detecção de anticorpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

C.B. Brum¹, S. Simionatto^{1,2}, S.B. Marchioro¹, S. Jorge¹, F.R. Conceição¹, O.A.
Dellagostin^{1*}

¹Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade
Federal de Pelotas, RS, Brasil

²Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande
Dourados, Dourados, MS, Brasil.

* Autor para correspondência:

Odir Antônio Dellagostin

Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFPel.

Campus universitário s/nº; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas-RS; Brasil.

odir@ufpel.edu.br

RESUMO

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma das principais doenças respiratórias que acomete suínos no mundo. Esta doença é caracterizada por retardo no desenvolvimento, principalmente em animais em fase de crescimento e terminação, ocasionando perdas econômicas significativas no rebanho. O diagnóstico presuntivo é baseado em sinais clínicos e na presença de lesões, no entanto, testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo da doença. Desta forma, há a necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais sensíveis e específicos para esta doença. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um ELISA indireto para a detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*. Para isso, foram testadas individualmente seis proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* expressas em *E. coli*, consideradas espécie-específica (P46, P95, P97 like, P102AB, Lppt e proteína hipotética 987), utilizadas como antígeno na sensibilização de placas de ELISA. Cada uma destas proteínas foi confrontada com 3 categorias de soros de suínos. A sensibilidade e especificidade obtida para cada uma das proteínas foram respectivamente as seguintes: P95, 74,3% e 97,6%; P46, 53,7% e 97,6%; Lppt, 28,4% e 97,2%; 987, 27,1% e 96,1%; P102AB, 65,5% e 97,6%; P97 like, 72,6% e 97,2%. Usando o ponto de corte definido, foi calculado o valor preditivo positivo que variou de 17,4% (para prevalências de 10%) a 99,4% (para prevalências de 90%), e o valor preditivo negativo que variou de 34,5% a 99,5% dependendo da prevalência da doença em uma determinada área. Estes dados mostram que proteínas como a P95, P46, P102AB e P97 like são potenciais alvos para uso em testes de diagnóstico para detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*.

Palavras chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, PES, ELISA, diagnóstico.

1 INTRODUÇÃO

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma doença respiratória de distribuição mundial (FABLET, 2010), contagiosa e caracterizada por uma broncopneumonia catarral que, clinicamente manifesta-se por tosse seca e crônica, atraso no ganho de peso, alta morbidade e baixa mortalidade. Suínos em todas as idades são susceptíveis a infecção, sendo que a forma clínica da doença é mais comum em animais em fase de crescimento e terminação (SOBESTIANSKY et al., 1999). Esta doença está entre as enfermidades respiratórias multifatoriais de grande importância em suínos, pois ocasiona grandes perdas econômicas, principalmente com o aumento do uso de medicamentos e a piora da conversão alimentar dos suínos (MAES et al., 2008).

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da PES, porém, outros patógenos são frequentemente encontrados no curso da doença (THACKER, 2006). Sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas podem ser usadas para um diagnóstico presuntivo da PES, porém testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo da doença (ROSS, 1999). O cultivo do *M. hyopneumoniae* é descrito como o padrão ouro, porém, ele não é usado como rotina no diagnóstico devido ao crescimento extremamente lento deste agente e a interferência com outros micoplasmas. A infecção é monitorada por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Atualmente são mais utilizados no diagnóstico da PES dois ELISAS que são de bloqueio (IDEI, *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA kit, Oxoid) e dois tipos de ELISA indireto (HerdCheck, IDEXX e Tween 20-ELISA). No entanto, estudos comparativos reportaram divergências quanto à sensibilidade e especificidade destes kits (SORENSEN et al., 1997; STRAIT et al., 2004; ERLANDSON et al., 2005). No Brasil, o diagnóstico da PES é, usualmente, feito pelo ELISA padronizado no Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPISA), utilizando antígenos extraídos da superfície dos micoplasmas com Tween-20 (ELISA-T) (PIFFER et al., 1998).

Com o sequenciamento e análise proteômica complementar de cinco cepas de *M. hyopneumoniae* (232, 7448, 7422, J e 186) é possível a identificação de genes que codificam proteínas com potencial para utilização em imunodiagnóstico e/ou vacinação (VASCONCELOS et al., 2005). SIMIONATTO (2009) produziu um amplo

número destas proteínas, as quais foram purificadas e caracterizadas quanto à imunogenicidade e antigenicidade. Algumas destas apresentaram potencial para utilização em teste de imunodiagnóstico. Com base nestes resultados e frente à necessidade de um diagnóstico mais sensível e específico para PES, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar individualmente seis proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* (P46, P95, Lppt, P97 like, 987, P102AB) como antígeno no desenvolvimento de um ELISA indireto para detectar anticorpos deste agente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de sangue dos suínos

Os soros de suínos foram coletados por punção da veia jugular dos animais, durante o período de Janeiro a Outubro de 2010. Após as coletas as amostras foram centrifugadas para obtenção dos soros e armazenadas a -20 °C até o uso. Neste estudo foram utilizados 550 soros de suínos provenientes de diferentes granjas, conforme segue abaixo:

Categoria 1: 253 soros de suínos provenientes de granjas consideradas livres de *M. hyopneumoniae*. O controle sanitário da granja é realizado através de testes sorológicos por ELISA (kit comercial) e por PCR a cada três meses. Há mais de quatro anos a granja é negativa para este patógeno.

Categoria 2: 246 soros de suínos provenientes de granjas com sinais clínicos da PES e com sorologia positiva para *M. hyopneumoniae*.

Categoria 3: 50 soros de suínos com lesões sugestivas da PES ao abate;

2.2 Seleção dos antígenos recombinantes de *M. hyopneumoniae*

Foram selecionadas seis proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* (P46, P95, P97 like, 102AB, Lppt e proteína hipotética 987) com base nos resultados de diferentes testes de antigenicidade e imunogenicidade, conforme descrito por Simionatto (2009). Brevemente, as proteínas selecionadas induziram anticorpos em camundongos, os quais reconheceram, em *Western blot*, proteínas nativas de *M. hyopneumoniae* cepas 7448, 7422 e J, e não reconheceram duas espécies saprófitas de micoplasmas de suínos (*M. hyorhinae* e *M. flocculare*), denotando

serem prováveis proteínas específicas de *M. hyopneumoniae*. Em um grupo de 35 proteínas recombinantes testadas, estas seis proteínas apresentaram maior antigenicidade em testes preliminares (ELISA e *Western blot*) com soros de suínos convalescentes. Cada uma das seis proteínas selecionadas foi utilizada como antígeno no desenvolvimento de um ELISA indireto (Tabela 1).

Tabela 1: Proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* utilizadas neste trabalho.

Anotação do Genoma	Característica (denominação)	Região clonada (amino ácido)	Tamanho da proteína recombinante
MHP0513	P46	102 – 420	35 kDa
MHP0099	P95	564 – 911	43 kDa
MHP0272	P97 like	917 – 1225	35 kDa
MHP0199	P102AB	441 – 841	46 kDa
MHP0372	Lppt	497 – 883	44 kDa
MHP0660	P. hipotética (987)	1 – 394	48,5 kDa

2.3 Purificação das proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae*

As seis proteínas recombinantes selecionadas foram purificadas conforme descrito por Simionatto (2009). Brevemente, os plasmídios recombinantes foram transformados na cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) Códon Plus RIL competente, cultivada em meio de cultura Luria-Bertani (LB) com canamicina (50 µg/ml) até a fase log de crescimento e induzidas por 3 h com 0,3 mM de IPTG. A purificação das mesmas foi realizada por cromatografia líquida de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema ÄKTAPrime (GE Healthcare). A pureza foi determinada através de um SDS-PAGE e a sua concentração pelo Kit BCA™ Protein Assay (Pierce). Todas expressas na forma insolúvel e o protocolo de solubilização com uréia adotado nesse estudo foi eficiente para a obtenção destas proteínas.

2.4 ELISA com extrato de *M. hyopneumoniae*

Com o intuito de comprovar que os soros de suínos provindos de granjas positivas apresentavam anticorpos contra *M. hyopneumoniae*, foi realizado um ELISA indireto com um lisado de célula da cepa *M. hyopneumoniae* 7448. Placas de

poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 µl/cavidade de extrato de célula de *M. hyopneumoniae* cepa 7448 na diluição 1:800, dissolvido em 0,1 M de tampão carbonato de sódio (pH 9,6), e incubadas *overnight* a 4 °C, seguida de uma incubação a -70 °C por 2 h. Após descongelamento a temperatura ambiente, as placas foram lavadas com 0.1 M de tampão fosfato salina (PBS, pH 7.4) contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBST). Em seguida as placas foram bloqueadas com 5% (leite em pó diluído em PBS) a 4 °C por 16 h. Os soros de suínos foram utilizadas na diluição 1:100 em solução de bloqueio, adicionados na placa após nova lavagem e mantidos por 2 h a 37 °C. Anticorpo anti-IgG suíno conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição 1:6000 em solução de bloqueio, foi adicionado e incubado a 37 °C por 1 h. As reações foram reveladas com dicloridrato de fenilenodiamina (OPD-Sigma Fast) e peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos de incubação no escuro a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 N. A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de microplacas (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments), com filtro de 492 nm. A média dos valores de absorbância foi calculada com o soro analisado em duplicata.

2.5 ELISA indireto com as proteínas recombinantes

Cada uma das seis proteínas recombinantes foi utilizada como antígeno na sensibilização de microplacas de poliestireno com 96 cavidades (TPP). Foi utilizado 10 ng de cada proteína recombinante por placa. As proteínas foram diluídas em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,6 colocando 100 µl por cavidade e incubadas a 4 °C 16 h. As placas foram lavadas com PBST e incubadas com 200 µl de solução de bloqueio 5% por 2 h a 37 °C. Após lavagens com PBST foram adicionado os soros suínos, diluídos 1:100 em solução de bloqueio, por 2 h a 37 °C, avaliados em duplicata. Após nova lavagem, o anticorpo anti-IgG suíno conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição 1:6000, foi adicionado e incubado a 37 °C por 1 h. As reações foram reveladas conforme descrito no item 2.4.

2.6 ELISA kit comercial

Com o objetivo de comparar a eficiência do ELISA utilizando as proteínas recombinantes com ELISA comercial, os soros de suínos foram confrontados com o

kit de ELISA comercial HerdCheck®, conforme indicações do fabricante (IDEXX, USA). Para tanto utilizou-se uma amostragem aleatória de 119 soros provenientes de todas as categorias.

2.7 Análise estatística

Para determinação de amostras positivas e negativas, foi determinado o ponto de corte como sendo a média dos soros negativos, mais 2 desvio padrão (SD), para cada uma das proteínas e o extrato, conforme Tabela 2. Amostras que apresentaram valor de absorbância acima do ponto de corte foram consideradas positivas, já abaixo do ponto de corte foram consideradas negativas. Posteriormente foi calculada a sensibilidade e especificidade de cada uma das proteína e do extrato. Foi utilizando o software estatístico MedCalc (versão 10.3.0.0) (www.medcalc.br) para o cálculo dos valores preditivos negativo e positivo.

3 RESULTADOS

3.1 ELISA com extrato de célula

O ELISA utilizando extrato de *M. hyopneumoniae* cepa 7448, de um total de 549 soros, 285 (51,9%) das amostras foram positivas e 241 (43,9%) das amostras negativas, demonstrando que 50% dos suínos utilizados neste estudo apresentam anticorpos contra a *M. hyopneumoniae*. O ponto de corte para este teste foi determinado através da média dos soros provindos das granjas consideradas negativas para a PES (categoria 1), acrescidos de dois desvio padrão (SD) (Tabela 2).

Tabela 2: Média, desvio padrão e ponto de cada uma das proteínas e do extrato

Proteínas	Média	Desvio Padrão	Ponto de corte (Média + 2 SD)
P95	0,121	0,082	0,286
P46	0,131	0,098	0,326
Lppt	0,160	0,105	0,369
987	0,284	0,128	0,539
P97 like	0,128	0,074	0,276
P102 AB	0,118	0,080	0,279
Extrato	0,195	0,132	0,459

3.3 ELISA indireto com proteínas recombinantes

Os resultados do ELISA realizados com cada uma das seis proteínas confrontadas com os soros de suínos são mostrados na tabela 3.

Tabela 3: Resultado do ELISA com os 549 soros utilizados neste estudo, com cada uma das proteínas avaliadas e extrato.

	P95	P46	Lppt	987	P97 like	P102 AB	Mix	EXT
+	220	159	84	80	215	194	248*	285
-	247	247	246	243	246	247	231**	241
Falsos -	76	137	212	216	81	102	48	11
Falsos +	6	6	7	10	7	6	22	12
Total	549	549	549	549	549	549	549	549

+, Número de soros positivos com cada um dos testes.

-, Número de soros negativos com cada um dos testes.

Falsos -; Número de soros de categoria positivos com resultado negativo.

Falsos +; Número de soros de categoria negativos com resultado positivo.

*, Número de soros positivos com pelo menos uma proteína.

**, Número de soros negativos com todas as proteínas.

EXT, extrato de *M. hyopneumoniae* cepa 7448.

De um total de 119 soros testados com o kit comercial HerdCheck® (IDEXX, USA), 20 eram soros da granja livre de *M. hyopneumoniae* e os outros 99 eram de granja com histórico da doença ou coletados no momento do abate com lesões sugestivas da PES (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado comparativo entre as proteínas recombinantes, extrato e o kit comercial HerdCheck® (IDEXX, USA)

	P95	P46	Lppt	987	P97 like	P102AB	Ext.	Kit
+	81	66	41	77	91	79	96	24
-	38	53	78	42	28	40	23	95
Total	119	119	119	119	119	119	119	119

+, Número de soros positivos com cada um dos testes.

-, Número de soros negativos com cada um dos testes.

EXT, extrato de *M. hyopneumoniae* cepa 7448.

Kit, Kit comercial HerdCheck® (IDEXX, USA).

3.4 Sensibilidade, Especificidade e Valor preditivo

Para o cálculo de sensibilidade e especificidade foram utilizadas as seguintes fórmulas (Figura 1).

Figura 1: Fórmulas para cálculo de sensibilidade, especificidade e valores preditivos. POS, Amostras positivas; NEG, Amostras negativas; VPP, Valor preditivo positivo; VPN, Valor preditivo negativo; VPP, Valor preditivo positivo.

		DOENÇA		
		Presente	Ausente	
T E S T E	POS	A Verdadeiro Positivo	B Falso Positivo	Sensibilidade = $A / (A+C)$
	NEG	C Falso Negativo	D Verdadeiro Negativo	Especificidade = $D / (D+B)$
				VPP = $A / A+B$
				VPN = $D / C+D$

Com a utilização das fórmulas acima descritas foi possível calcular a sensibilidade e especificidade de cada uma das proteínas e do extrato (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados de sensibilidade e especificidade de cada proteína e extrato

	P95	P46	Lppt	987	P97 like	P102 AB	Ext.
Sensibilidade*	74,3	53,7	28,4	27,1	72,6	65,5	96,3
Especificidade*	97,6	97,6	97,2	96,1	97,2	97,6	95,3

*Valores em porcentagem (%)

Usando o ponto de corte definido, foi calculado o valor preditivo positivo que variou de 17,4% (para prevalências de 10%) a 99,4% (para prevalências de 90%), e o valor preditivo negativo que variou de 34,5% a 99,5% dependendo da prevalência da doença em uma determinada área (Figura 2).

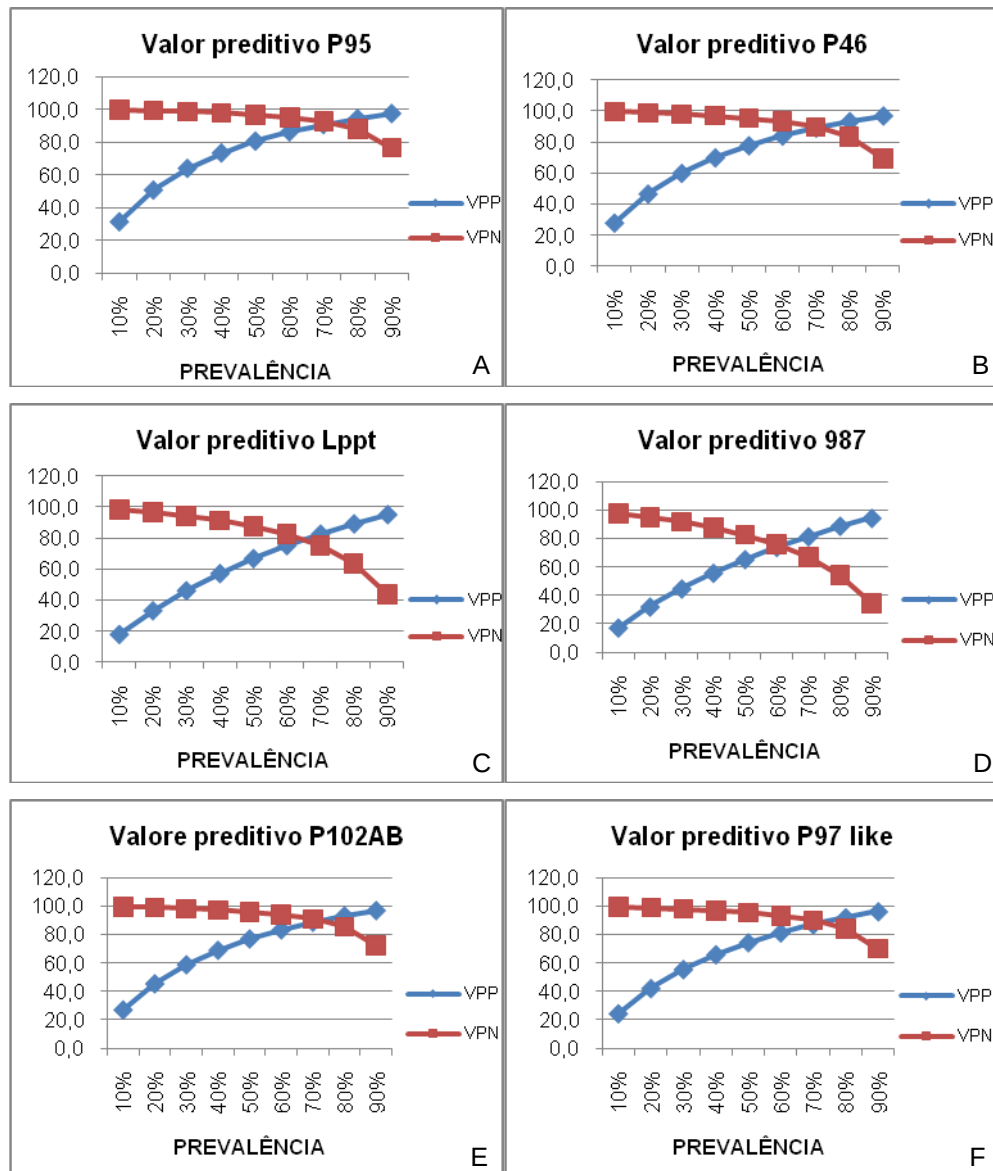


Figura 2: Valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do ELISA com P95 (A), P46 (B), Ltp (C), 987 (D), P102AB (E) e P97 like (F) para detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*, em relação à prevalência do patógeno.

4 DISCUSSÃO

Várias metodologias são usadas para monitorar a infecção causada por *M. hyopneumoniae*. Sinais clínicos e a presença de lesões são utilizados como diagnóstico presuntivo da PES, porém os sinais clínicos podem estar relacionados a infecções com outros patógenos (SIBILA et al., 2008). Desta forma, testes laboratoriais são necessários para o diagnóstico conclusivo. Embora a cultura do *M. hyopneumoniae* seja descrita como padrão ouro, a mesma não é utilizada como rotina de diagnóstico (SIBILA et al., 2008).

Diferentes estudos têm demonstrado que proteínas recombinantes são úteis para detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* por ELISA (JANG & KIM, 2007; OKADA et al., 2005, 2010). SIMIONATTO (2008) testou um grande número de antígenos (35), das quais seis (P46, P95, P97 like P102AB, Ltp, proteína hipotética 987) foram selecionados para este estudo, pois através de *blast* e *western blot* foi possível observar que são antígenos presentes somente em *M. hyopneumoniae* com alta identidade. O protocolo para obtenção desses antígenos expressos em *E. coli* foi eficiente, podendo render em média 10 mg/L de cultivo. Como são utilizados apenas 10 ng de proteína recombinante para sensibilizar cada cavidade da placa de ELISA, essa quantidade é suficiente para sensibilizar 10.415 placas. Tendo em vista o rendimento, baixo custo e a facilidade de produção e padronização de uma proteína recombinante, poderia se tornar mais viável comercialmente do que o extrato de *M. hyopneumoniae*, tendo em vista que o crescimento é extremamente lento e fastidioso. Além disso, estudos do nosso grupo demonstram que alguns antígenos expressos durante a infecção por *M. hyopneumoniae*, não são expressos por cepas cultivadas *in vitro*, fato que poderia comprometer a sensibilidade de testes que utilizam extratos de *Mycoplasma* como antígeno.

O desempenho do kit comercial, do ELISA com extrato do *M. hyopneumoniae* e do ELISA indireto com proteínas recombinantes foi comparado utilizando 99 soros de suínos com lesões sugestivas para a PES no momento do abate. O resultado demonstrou que o ELISA utilizando o kit comercial detectou apenas 25 soros positivos (22%), o extrato detectou 96 positivos (96,96%) e o ELISA indireto utilizando as proteínas recombinantes P95 e P97 like detectaram 81 (81,81%) e 91 positivos (91,91%), respectivamente. Estes resultados indicam que estes antígenos

recombinantes são alvos promissores para serem utilizados em testes de diagnósticos, uma vez que apresentaram índices de positividade superiores aos apresentados pelo kit comercial e próximos ao ELISA com o extrato de *M. hyopneumoniae*. No entanto, o ELISA com antígenos recombinantes aumenta a especificidade do teste, se comparado ao extrato, reduzindo a possibilidade de resultados falsos positivos.

FENG et al., (2010), visando à discriminação de animais infectados de vacinados, desenvolveu um teste de ELISA (SIgA-ELISA) baseado na adesina P97R1 para detecção de imunoglobulina A secretória contra *M. hyopneumoniae*. Este teste apresentou uma sensibilidade de 97%. No presente trabalho avaliamos a P97 like, a qual apresentou resultados similares, com 96,8% sensibilidade. Já OKADA et al., (2005) utilizaram um anticorpo monoclonal anti-P46 e a proteína recombinante P46 em um ELISA duplo-sanduíche. O antígeno foi específico para *M. hyopneumoniae*, pois não há reação em ELISA com outros micoplasmas, como *M. flocculare*, *M. hyorhinis* e *M. hyosynoviae*. Neste estudo a proteína P46 também apresentou consideráveis índices de sensibilidade e especificidade, 96,4% e 72,4%, respectivamente. No entanto, nós testamos outros antígenos ainda não testados em ensaios de diagnóstico sendo que alguns destes apresentaram resultados ainda melhores que a P46, como P95, com 97,4% e 76,5% e a P102AB com 97% e 70,7% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Estes resultados indicam que estes alvos são promissores para uso em testes de diagnóstico.

Um estudo realizado por Lopes (2004) analisou 7.509 amostras de pulmão suíno e obteve uma prevalência em média da PES de 45,9% em São Gabriel do Oeste, MS. Dados do Programa Econômico Coopers (2001) revela uma prevalência de PES de 75,7% em São Paulo. Já SOBESTIANSKY (1999), em levantamento realizado em granjas comerciais localizadas na região sul do país, constatou que 55% dos suínos de abate tinham lesões sugestivas de PES. Considerando esta prevalência da doença pode-se observar que em nosso trabalho o valor preditivo positivo variou de 89% a 97% e valor preditivo negativo que variou de 51% a 75% dependendo da proteína.

Com os resultados obtidos, foi possível demonstrar que o ELISA avaliado neste estudo é capaz de detectar anticorpos contra o *M. hyopneumoniae* em suínos

infectados, com consideráveis índices de especificidade e sensibilidade utilizando as proteínas P102AB, P95, P46 e P97 like, as quais mostraram ser alvos promissores no desenvolvimento de um teste de diagnóstico sorológico eficiente para a PES.

5 REFERÊNCIAS

- ERLANDSON, K.; EVANS, R. B.; THACKER, B. J.; WEGNER, M. W.; THACKER, E. L. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent 13 assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal Swine Health and Production**, v.13, 14 p.198–203, 2005.
- FABLET C, MAROIS C, KOBISCH M, MADEC F, ROSE N. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. **Veterinary Microbiology**, 143, 238–245, 2010.
- FENG, Z.; SHAO, G.; LIU, M.; WANG, H.; GAN, Y.; WU, X. Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Veterinary Microbiology**, v.143, p.410–416, 2010.
- JANG , J. E & KIM, T.J. 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**. 71:278–282, 2007.
- LOPES, P.C.S; GRANDO, A. F; KAMIMURA, R; ARANTES, V.M. Prevalência e controle de Pneumonia Enzoótica no rebanho suíno de São Gabriel do Oeste de 2002 a 2004. **Tecnologia em Sanidade Animal**, 2004
- MAES, D.; SEGALLES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary microbiology**, v. 126, p. 297–309, 2008.
- OKADA, M.; ASAI, T.; FUTO, S.; MORI, Y.; MUKAI, T.; YAZAWA, S.; UTO, T.; SHIBATA, I.; SATO, S. 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, 2005.

OKADA, F. R.; ARELLA, M.; MUSIC, N.; JIA, J. J.; GOTTSCHALK, M.; GAGNON, C. A. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the c-terminal portion of the p97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. **Vaccine**, V.28, P.4802–4809, 2010.

PIFFER, I. A.; FRAZZON, A. P.; COLLARES, R. M.; SCHRANK, A.; SCHARANK, I. S.; SILVA, S. C. Molecular methods applied to the diagnosis mycoplasmal pneumonia in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.123, 1998.

ROSS, R. F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW BE, D'ALLAIRE S, ENGELING WL, TAYLOR DJ. **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames. Cap.36, 7 p. 495–505, 1999.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESEBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, 181, p. 221-231, 2008.

SILVA, A. F. da. Gerenciamento e controle das doenças respiratórias dos suínos. São Paulo. **Coopers**, 2001.

SIMIONATTO, S. **Produção e caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para uso em imunodiagnóstico e vacinação**. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.

SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI V.; HARTWIG, D. D.; CARLESSI, R. M.; MUNARI, F. M.; LAURINO, J. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. 2009.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. Pneumonia enzoótica. **Clínica e Patologia Suína**, 2ª ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359, 1999.

SØRENSEN, V., AHRENS, P., BARFOD, K., FEENSTRA, A., FELD, N., FRIIS, N., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, N., PEDERSEN, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. **Veterinary Microbiology**. 54, 23–34, 1997

STRAIT, E. L., ERICKSON, B. Z., THACKER, E. L. Analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. In: **American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting**, Des Moines, Iowa. p. 95, 2004.

THACKER, E. Mycoplasmal diseases. In: STRAW BE, ZIMMERMAN JJ, D'ALLAIRE S, TAYLOR DJ. **Diseases of Swine**. Blacwell Publishing Ltd., Oxford, UK. Cap.42, p.701–717, 2006.

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.; MATTOS CASCARDO, J.C.; CASTRO, L.A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE, G.; COLLEVATTI, R.G.; CUNHA, C.W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARAES, C.T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S.N.; KRIEGER, M.A.; LAURINO, J.P.; LIMA, L.F.; LOPES, M.I.; LORETO, E.L.; MADEIRA, H.M.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINKOVICS, C.T.; MEDEIROS, S.R.; MOREIRA, M.A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C.E.; NICOLAS, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXAO, R.F.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.; SALIM, A.C.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA, S.C.; SOARES,

C.M.; SOUZA, K.R.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS, M.B.; TEIXEIRA, S.M.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO, L.W.; SIMPSON, A.J; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **J. Bacteriol.**, v.187, p.5568–5577, 2005.

4 CONCLUSÕES

Considerando os dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- ✓ As técnicas utilizadas para expressão e purificação das proteínas de *M. hyopneumoniae* foram eficientes para obtenção de quantidades suficientes de proteínas para realização deste estudo;
- ✓ Das seis proteínas testadas (P95, P46, P102AB, P97 like, Lppt e 987), as proteínas P95, P46, P102AB, P97 like, apresentaram os melhores índices de especificidade e sensibilidade na detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae*, e poderão vir a ser utilizadas no diagnóstico da pneumonia enzoótica suína através de ELISA indireto.

5 REFERÊNCIAS

- BARGEN, L. E. A system response to an outbreak of enzootic pneumonia in grow/finish pigs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p.856-859, 2004.
- CAI, H. Y.; DREUMEL, T. V.; MCEWEN, B.; HORNBY, G.; BELL-ROGERS, P.; MCRAILD, P.; JOSEPHSON G.; MAXIE, G. Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, V.19, P.91–95, 2007.
- CALSAMIGLIA, M. PIJOAN, C., TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect 17 *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.246–251, 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. **Journal of Clinical Microbiology** 38, 1390–1396, 2000.
- CHEN, J. R.; LIAO, C. W.; MAO, S. J.; WENG, C. N. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with Pseudomonas exotoxin: in vivo evolution of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**. 80, 347-357, 2001.
- CHEN, A.Y.; FRY, S.R.; DAGGARD, G.E.; MUKKUR, T.K.S. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. **Vaccine** 26, 4372-4378, 2008.
- DUBOSSON, C.R.; CONZELMANN, C.; MISEREZ, R.; BOERLIN, P.; FREY, J.; ZIMMERMANN, W.; HÄNI, H.; KUHNERT, P. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, 102, 55-65, 2004.

DJORDJEVIC, S.; EAMENS, G.J.; ROMALIS, L.F.; NICHOLLS, P.J.; TAYLOR, V.; CHIN, J. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. **Australian veterinary journal**, v.75, p.504–511, 1997.

ERLANDSON, K.; EVANS, R.B.; THACKER, B.J.; WEGNER, M.W.; THACKER, E.L. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent 13 assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal Swine Health and Production**, v.13, 14 p.198–203, 2005.

FENG, Z.; SHAO, G.; LIU, M.; WANG, H.; GAN, Y.; WU, X. Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Veterinary Microbiology**, v.143, p.410–416, 2010.

FAGAN, P.K.; WALKER M.; CHIUN, 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, **Microbial Pathogenesis**. 101-110, 2001.

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Capturado em 28 Janeiro 2011. On line. Disponível na Internet <http://www.ibge.gov.br/>

KOBISCH, M.; FRIIS, N.F. Swine mycoplasmoses. **Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties**, v.15, p.1569–1605, 1996.

KURTH, K.T., HSU, T., SNOOK, E.R., THACKER, E.L., THACKER, B.J., MINION, F.C. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 14, 463–469, 2002.

JANG, J. E & KIM, T.J. 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**. 71:278–282, 2007.

LIN, J.; WENG, C. N.; LIAO, C. W.; YEH, K. S.; PAN M. J. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **The journal of veterinary medical science**, V.65, P.69–74, 2003.

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, p.1024–1034, 1999.

MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs, **Veterinary Microbiology**. 126, 297-309, 2007.

MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary microbiology**, v. 126, p. 297–309, 2008.

MARCHIORO, S.B. **Expressão heteróloga, purificação e caracterização de proteínas transmembrana de *Mycoplasma hyopneumoniae***. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MAROIS, C.; CARROU, J. L.; KOBISCHA, M.; GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in

experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.96–104, 2007.

MEENS, J.; SELKE, M.; GERLACH, G-F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins mhp378 and mhp651. **Veteterinary Microbiology**, v.116, P.85–95, 2006.

MEENS, J.; BOLOTIN, V.; FRANK, R.; BÖHMER, J.; GERLACH, G. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. **Veterinary Microbiology**, v.142, i.3-4, n.19, p.293-302, 2010.

MORA, M.; BENSI, G.; CAPO, S.; FALUGI, F.; ZINGARETTI, C.; MANETTI, A.G.O.; MAGGI, T.; TADDEI, A. R.; GRANDI, G.; TELFORD J.L. Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, p.15641-15646, 2005.

MORA, M.; DONATI, C.; MEDINI, D.; COVACCI, A.; RAPPUOLI, R. Microbial genomics and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p. 532-536, 2006.

MOORKAMP, L.; BEILAGE, E.; HEWICKER - TRAUTWEIN, M. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in piglets. **Tierärztliche Praxis Großtiere**. v.6, 2010.

OKADA, M.; ASAI, T.; FUTO, S.; MORI, Y.; MUKAI, T.; YAZAWA, S.; UTO, T.; SHIBATA, I.; SATO, S. 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, 2005.

OKAMBA, F.; MOREAU, E.; CHEIKH SAAD BOUH, K.; GAGNON, C. A.; MASSIE, B.; ARELLA, M. Immune responses induced by replication-defective andenovirus

expressing the C-terminal portion of *Mycoplasma hyopneumoniae*-P97 adhesin. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.767–774, 2007.

OKAMBA, F. R.; ARELLA, M.; MUSIC, N.; JIA, J. J.; GOTTSCHALK, M.; GAGNON, C. A. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the c-terminal portion of the p97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. **Vaccine**, V.28, P.4802–4809, 2010.

RAPPUOLI R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v.19, p.2688-2691, 2001.

RAUTIAINEN, E.; WALLGREN, P.; Aspects of the Transmission of Protection against *Mycoplasma hyopneumoniae* from Sow to Offspring. **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p. 55-65, 2001.

RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62, 1094–1156, 1998.

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW BE, D'ALLAIRE S, ENGELING WL, TAYLOR DJ. **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames, Cap.36, 7 p. 495–505. 1999.

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** 21, 532–537, 2003.

SIBILA, M., NOFRARIAS, M., LOPEZ-SORIA, S., SEGALÉS, J., VALERO, O., ESPINAL, A., CALSAMIGLIA, M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet. Microbiol.* 122, 97-107, 2007.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, 181, p. 221-231, 2008.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v.181, i.3, p.221-231, 2009.

SIMIONATTO, S. **Produção e caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para uso em imunodiagnóstico e vacinação**. 2008. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2008.

SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI V.; HARTWIG, D. D.; CARLESSI, R. M.; MUNARI, F. M.; LAURINO, J. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. 2009.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. Pneumonia enzoótica. **Clínica e Patologia Suína**, 2ª ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359, 1999.

SØRENSEN, V., AHRENS, P., BARFOD, K., FEENSTRA, A., FELD, N., FRIIS, N., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, N., PEDERSEN, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. **Veterinary Microbiology**. 54, 23–34. 1997.

STAKENBORG, T.; VICCA, J.; BUTAYE, P.; MAES, D.; PEETERS, J.; DE KRUIF, A.; HAESBROUCK, F. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, 109, p.29-36, 2005.

STRAIT, E.L., ERICKSON, B.Z., THACKER, E.L. Analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. In: **American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting**, Des Moines, Iowa. p. 95. 2004.

STRAIT, E. L.; E. L.; MADSEN, M. L.; MINION, F. C.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; DAMMEN, M.; JONES, K. R.; THACKER, E. L.. Real-time PCR assays to address genetic diversity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2491-2498, 2008.

THACKER, E.; THACKER, B.; BOETTCHER, T.; JAYAPPA H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. **Journal Swine Health and Production**, 6 107–112, 1998.

THACKER, E; THACKER, B.; KUHN, M.; HAWKINS, P.; WATERS, R. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of Veterinary Research**, 61, 1384–1389, 2000a.

THACKER, E.L.; THACKER, B.J; YOUNG, T.F.; HALBUR, P.G. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vaccine**, 18, 1244–1252, 2000b.

THACKER E. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal Health Research Reviews**, 5, 317–320, 2004.

THACKER, E. Mycoplasmal diseases. In: STRAW BE, ZIMMERMAN JJ, D'ALLAIRE S, TAYLOR DJ. **Diseases of Swine**. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2006. Cap.42, p.701–717.

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.; MATTOS CASCARDO, J.C.; CASTRO, L.A.; CAVALCANTI, G.; CEMALE, G.; COLLEVATTI, R.G.; CUNHA, C.W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBROS, B.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; FALCAO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M.S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.; FRIAS, D.; GRANGEIRO, T.B.; GRISARD, E.C.; GUIMARAES, C.T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S.N.; KRIEGER, M.A.; LAURINO, J.P.; LIMA, L.F.; LOPES, M.I.; LORETO, E.L.; MADEIRA, H.M.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINKOVICS, C.T.; MEDEIROS, S.R.; MOREIRA, M.A.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C.E.; NICOLAS, M.F.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXAO, R.F.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L.S.; POTRICH, D.P.; SALIM, A.C.; SANTOS, F.R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M.P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SCHUCK, A.F.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SILVA, S.C.; SOARES, C.M.; SOUZA, K.R.; SOUZA, R.C.; STAATS, C.C.; STEFFENS, M.B.; TEIXEIRA, S.M.; URMENYI, T.P.; VAINSTEIN, M.H.; ZUCCHERATO, L.W.; SIMPSON, A.J; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, 187, 5568–5577, 2005.

VERDIN, E., SAILLARD, C., LABBE´, A., BOVE´, J.M., KOBISCH, M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washing from pigs. **Veterinary Microbiology** 76, 31–40, 2000.