



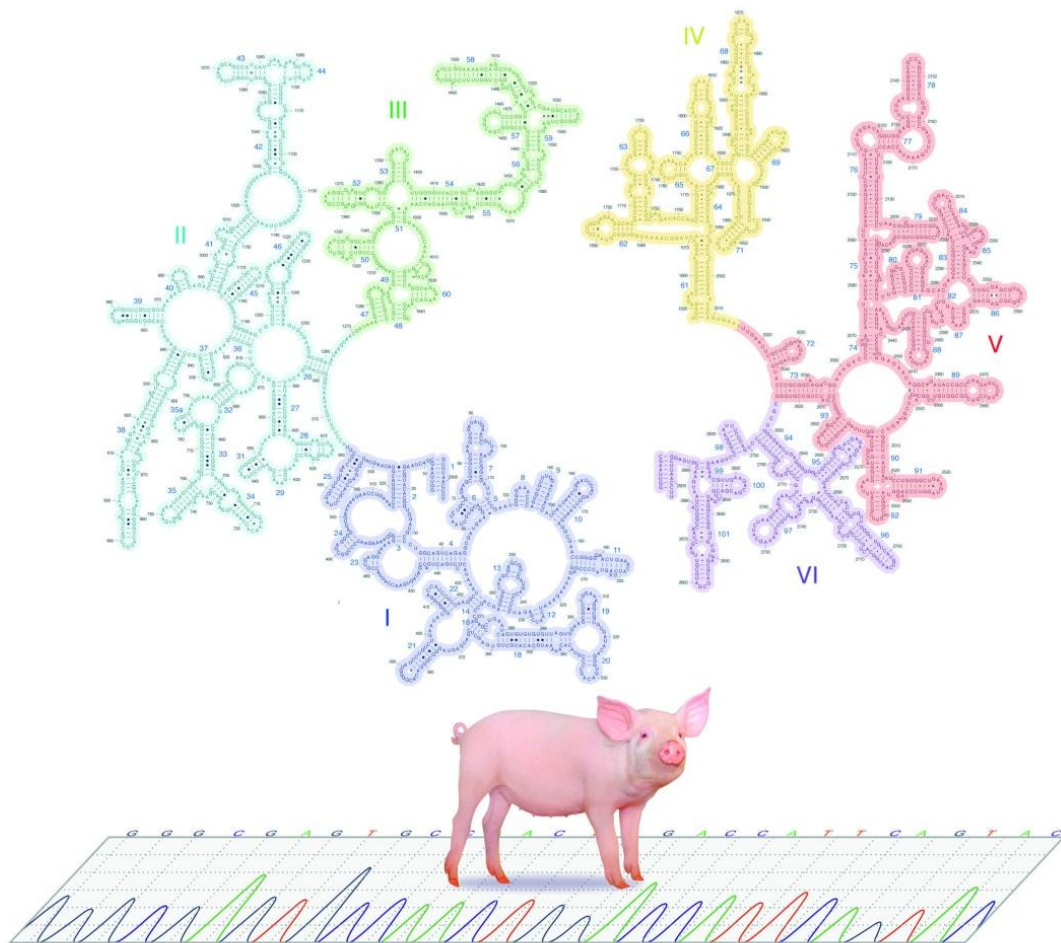
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



Universidad de las Palmas de Gran Canaria
Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA REGIÓN INTERGÉNICA ARNr 16S-23S Y DEL GEN ARNr 23S EN CEPAS DE CAMPO DE *Mycoplasma hyopneumoniae*. ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LOS MICOPLASMAS PORCINOS EN BASE AL GEN ARNr 23S



CARLOS GUILLERMO POVEDA TURRADO

Las Palmas de Gran Canaria, 2012.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	VII
AGRADECIMIENTOS.....	XV
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY.....	XXI
ABREVIATURAS.....	XXV
CAPÍTULO I.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
I.1.- TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE LOS <i>MOLLICUTES</i>	1
I.2.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MICOPLASMAS.....	5
I.3.- <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i>	14
I.3.1.- CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS.....	14
I.3.2.- CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS Y CULTURALES.....	16
I.3.3.- PATOGENICIDAD Y FACTORES DE VIRULENCIA.....	17
I.3.4.- EPIDEMIOLOGÍA.....	24
I.3.5.- SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES.....	28
I.3.6.- ANTIBIOTERAPIA.....	30
I.3.7.- INMUNIDAD NATURAL E INMUNOPROFILAXIS.....	31
I.4.- <i>MYCOPLASMA HYORHINIS</i>	34
I.5.- <i>MYCOPLASMA FLOCCULARE</i>	36
I.6.- <i>MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE</i>	37
I.6.- <i>MYCOPLASMA HYOPHARYNGIS</i>	38
ANEXO: Tablas.....	39

CAPÍTULO II.....	49
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE CAMPO DE <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i>.....	49
II.1.-INTRODUCCIÓN.....	49
II.2.-MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
II.2.1.- TOMA DE MUESTRAS.....	51
II.2.2.- AISLAMIENTO Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	51
II.2.3.- PRUEBAS DE REVERSIBILIDAD.....	53
II.2.4.- CLONAJE DE LAS CEPAS.....	53
II.2.5.- IDENTIFICACIÓN DE MICOPLASMAS.....	53
II.2.5.1.- Identificación cultural.....	53
II.2.5.1.1.- Características generales de los cultivos.....	53
II.2.5.1.2.- Sensibilidad a la Digitonina.....	54
II.2.5.1.3.- Características Bioquímicas y Enzimáticas.....	55
II.2.5.2.- Pruebas Definitivas.....	57
II.2.5.2.1.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	57
II.2.5.2.1.1.- Extracción del ADN.....	57
II.2.5.2.1.1.1.- Extracción del ADN mediante sílica.....	58
II.2.5.2.1.1.2.- Extracción fenólica del ADN.....	59
II.2.5.2.1.2.- Cebadores empleados.....	60
II.2.5.2.1.3.- Reacción de q-PCR.....	60
II.2.5.2.1.4.- Reacción de PCR de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	61
II.2.5.2.1.5.- Reacción de PCR de <i>M. flocculare</i>.....	61

II.2.5.2.1.6.- Reacción de PCR de <i>M. hyosynoviae</i>	62
II.2.5.2.1.7.- Reacción de PCR de <i>M. hyorhinis</i>	62
II.2.5.2.1.8.- Electroforesis de los productos amplificados...	63
II.2.6.-ALMACENAMIENTO DE LAS CEPAS OBTENIDAS.....	63
II.3.-RESULTADOS.....	64
II.4.-DISCUSIÓN.....	68
ANEXO: Tablas y Figuras.....	73
ANEXO: Medios y Reactivos.....	85
CAPÍTULO III.....	91
ANÁLISIS DE LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S ARNr Y DEL GEN QUE CODIFICA EL ARNr 23S EN CEPAS DE CAMPO DE <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i>	91
III.1.-INTRODUCCIÓN.....	91
III.2.-MATERIAL Y MÉTODOS.....	95
III.2.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	95
III.2.2.- REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR).....	
III.2.2.1.- Extracción del ADN.....	96
III.2.2.2.- Cebadores empleados.....	97
III.2.2.2.1.- Cebadores para la Región Intergénica 16S-23S ARNr	97
III.2.2.2.2.- Cebadores para el gen codificante del ARNr 23S.....	97
III.2.2.3.- PCR en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>	98
III.2.2.4.- Electroforesis de los productos amplificados.....	99

III.2.3.- SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	100
III.2.3.1.- Precipitación de las muestras para secuenciación.....	100
III.2.3.2.- Reacción de Secuenciación.....	101
III.2.4.- HERRAMIENTAS INFORMATICAS DE ANÁLISIS	102
III.2.4.1.- FINCHTV.....	102
III.2.4.2.- GENE RUNNER.....	102
III.2.4.3.- BIOEDIT.....	103
III.2.4.4.- MEGA.....	103
III.2.5.- DISEÑO DE NUEVOS CEBADORES.....	104
III.3.-RESULTADOS.....	105
III.3.1- ANÁLISIS DE LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S ARNr...	105
III.3.2- ANÁLISIS DEL GEN CODIFICANTE DEL ARNr 23S.....	107
III.4.-DISCUSIÓN.....	111
III.4.1- LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S ARNr.....	111
III.3.2- EL GEN CODIFICANTE DEL ARNr 23S.....	114
ANEXO: Tablas y Figuras.....	121
CAPÍTULO IV.....	149
ANÁLISIS DEL GEN QUE CODIFICA EL ARNr 23S EN LAS CEPAS DE REFERENCIA DE MICOPLASMAS PORCINOS...	149
IV.1.-INTRODUCCIÓN.....	149
IV.2.-MATERIAL Y MÉTODOS.....	153
IV.2.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	153

IV.2.2.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	153
IV.2.2.1.- Cebadores empleados.....	154
IV.2.2.1.1.- Cebadores para el gen codificante del ARNr 23S.....	154
IV.2.2.2.- PCR en cepas de referencia de micoplasmas porcinos.....	156
IV.2.2.3.- Electroforesis de los productos amplificados.....	157
IV.2.3.- SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS.....	157
IV.3.-RESULTADOS.....	158
IV.4.-DISCUSIÓN.....	161
ANEXO: Tablas y Figuras.....	169
CONCLUSIONES.....	185
BIBLIOGRAFÍA.....	189
ENTIDADES COLABORADORAS.....	227

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1.- Dosis de los principios activos para el tratamiento y control de la NEP.....	39
Tabla I.2.- Fármacos medicamentosos para el tratamiento y control de la NEP.....	40
Tabla I.3.- Vacunas comerciales de distribución en España frente a la NEP.....	47
Tabla II.1.- Cebadores específicos para micoplasmas porcinos.....	73
Tabla II.2.- Protocolo para q-PCR de micoplasmas porcinos.....	73
Tabla II.3.- Temperatura de fusión (“melting”) en q-PCR.....	74
Tabla II.4.- Protocolo de ciclos y temperaturas para la PCR de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	74
Tabla II.5.- Protocolo de ciclos y temperaturas para la PCR de <i>M. flocculare</i>.....	74
Tabla II.6.- Protocolo de ciclos y temperaturas para la PCR de <i>M. hyosynoviae</i>.....	75
Tabla II.7.- Protocolo de ciclos y temperaturas para la PCR de <i>M. hyorhinae</i>.....	75
Tabla II.8.- Características bioquímicas y enzimáticas de los principales micoplasmas porcinos y estructura de las colonias.....	75

Tabla II.9.- Cepas puras de <i>M. hyopneumoniae</i>, aisladas anteriormente entre 2003 y 2005.....	76
Tabla II.10.- Aislamientos de cepas puras de micoplasmas porcinos en muestras remitidas desde Zaragoza y Madrid, 2006.....	76
Tabla II.11.- Aislamientos de micoplasmas porcinos, en muestras de Gran Canaria, realizados entre 2007-2009.....	77
Tabla II.12.- Presencia de micoplasmas porcinos demostrada por aislamiento en los pulmones muestreados entre 2007 y 2009.....	77
Tabla II.13.- Aislamientos de micoplasmas porcinos en muestras de Gran Canaria, en 2007.....	78
Tabla II.14.- Aislamientos de micoplasmas porcinos en muestras de Gran Canaria, en 2008.....	79
Tabla II.15.- Aislamientos de micoplasmas porcinos en muestras de Gran Canaria, en 2009.....	80
Tabla II.16.- Ceparario de cultivos puros de <i>M. hyopneumoniae</i> para el estudio de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y gen ARNr 23S.....	81
Tabla II.17.- Tiempos medios para el aislamiento de las distintas especies, en muestras de Gran Canaria, años 2007, 2008, y 2009.....	82
Tabla III.1.- Cebadores empleados para la Región Intergénica 16S-23S ARNr.....	121
Tabla III.2.- Cebadores empleados para el gen codificante del ARNr 23S.....	121
Tabla III.3.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen codificante del ARNr 23S en <i>M. hyopneumoniae</i>.....	122

Tabla III.4.- Protocolo de PCR aplicado para la amplificación de la Región Intergénica 16S-23S ARNr.....	122
Tabla III.5.- Protocolo de PCR aplicado para la amplificación de la los Fragmentos A y F del gen codificante del ARNr 23S.....	122
Tabla III.6.- Protocolo de PCR aplicado para la amplificación de la los Fragmentos B, C, D, y E, del gen codificante del ARNr 23S.....	123
Tabla III.7.- Patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en <i>M. hyopneumoniae</i>.....	123
Tabla III.8.- Similitud comparada de los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en <i>M. hyopneumoniae</i>.....	124
Tabla III.9.- Longitud del genoma secuenciado de los patrones secuenciales 16S-23S ARNr en <i>M. hyopneumoniae</i>.....	124
Tabla III.10.- Diferencias entre los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en <i>M. hyopneumoniae</i>.....	125
Tabla III.11.- Patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	126
Tabla III.12.- Similitud comparada del gen codificante del ARNr 23S en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	126
Tabla III.13.- Diferencias entre los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	127
Tabla III.14.- Correlación entre los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y del gen ARNr 23S en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	128
Tabla III.15.- Discrepancias en las secuencias y similitud del gen ARNr 23S de las cepas 232, J, y 7448 de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	129

Tabla III.16.- Discrepancias en las secuencias del gen ARNr 23S de las cepas 232, J, 7448 y 168, de <i>M. hyopneumoniae</i>	129
Tabla III.17.- Similitud comparada de las secuencias del gen ARNr 23S de las cepas 232, J, 7448 y 168, de <i>M. hyopneumoniae</i>	130
Tabla III.18.- Similitud comparada entre patrones secuenciales del gen ARNr 23S de las cepas de campo y las cepas 232, J, 7448 y 168, de <i>M. hyopneumoniae</i>	130
Tabla III.19.- Diferencias entre todos los patrones secuenciales analizados del gen ARNr 23S de <i>M. hyopneumoniae</i>	131
Tabla III.20.- Secuencia universal del gen codificante del ARNr 23S de <i>M. hyopneumoniae</i> , con códigos para polimorfismos.....	132
Tabla III.21.- Secuencia consenso del gen codificante del ARNr 23S de <i>M. hyopneumoniae</i>	133
Tabla III.22.- Conversión de las posiciones discrepantes en el gen ARNr 23S de <i>M. hyopneumoniae</i> según la numeración <i>E. coli</i>	134
Tabla IV.1.- Cebadores empleados para los Fragmentos B, C, D, y E, del gen codificante del ARNr 23S en micoplasmas porcinos.....	169
Tabla IV.2.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen ARNr 23S en <i>M. hyorhinis</i> y <i>M. hyopharyngis</i>	169
Tabla IV.3.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen ARNr 23S en <i>M. flocculare</i>	170
Tabla IV.4.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen codificante del ARNr 23S en <i>M. hyosynoviae</i>	170
Tabla IV.5.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen ARNr 23S en <i>M. hyopneumoniae</i>	170

Tabla IV.6.- Secuencia completa del gen codificante del ARNr 23S en <i>M. hyorhinis</i> (cepa BTS-7).....	171
Tabla IV.7.- Diferencias entre las secuencias del gen codificante del ARNr 23S entre las cepas de <i>M. hyorhinis</i>.....	171
Tabla IV.8.- Secuencia completa del gen codificante del ARNr 23S en <i>M.flocculare</i> (cepa MS42).....	172
Tabla IV.9.- Diferencias entre las secuencias MS42 (1994) y MS42 (2011) del gen codificante del ARNr 23S en <i>M.flocculare</i>.....	172
Tabla IV.10.- Secuencia completa del gen codificante del ARNr 23S en <i>M. hyosynoviae</i> (cepa S16).....	173
Tabla IV.11.- Secuencia completa del gen codificante del ARNr 23S en <i>M. hyopharyngis</i> (cepa H3-6B F).....	173
Tabla IV.12.- Similitud comparada de las secuencias del gen ARNr 23S en los micoplasmas porcinos.....	174
Tabla IV.13.- Similitud comparada de las secuencias de los genes codificantes del ARNr 23S y ARNr 16S de los micoplasmas porcinos respecto a las secuencias génicas de <i>E. coli</i>.....	174
Tabla IV.14.- Similitud comparada de las secuencias del gen ARNr 16S en los micoplasmas porcinos.....	174

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.- Clasificación taxonómica del Género <i>Mycoplasma</i>.....	6-7
Figura I.2.- Colonias de 3 diferentes <i>Mycoplasma spp.</i>, aislados de gaviotas de Kelp (<i>Larus dominicanus vetula</i>).....	13
Figura I.3.- Lesiones de NEP en pulmones de animales sacrificados a los 6 meses de vida	29
Figura II.1.- Electroforesis de productos amplificados para detección de <i>M. hyopneumoniae</i> y <i>M. hyorhinis</i>.....	82
Figura II.2.- Electroforesis de productos amplificados para detección de <i>M. hyopneumoniae</i> en cepas de 2003-2005 y 2006.....	83
Figura II.3.- Electroforesis de productos amplificados para detección de <i>M. hyopneumoniae</i> en cepas de 2007 y 2009.....	83
Figura II.4.- Colonias en medio sólido de <i>M. hyopneumoniae</i>, <i>M. hyorhinis</i>, <i>M. hyosynnoviae</i> y <i>M. flocculare</i>.....	84
Figura III.1.- Representación esquemática de la posición de los cebadores para PCR del gen que codifica el ARNr 16S y la ISR.....	135
Figura III.2.- Representación esquemática de la posición de los cebadores para PCR del gen que codifica el ARNr 23S.....	135
Figura III.3.- Electroforesis de productos amplificados de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>, de 2007-2009.....	136
Figura III.4.- Electroforesis de productos amplificados de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i> y otros micoplasmas porcinos.....	136

Figura III.5.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos B y C en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	137
Figura III.6.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos D y E en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	137
Figura III.7.- Electroforesis del producto amplificado del Fragmento A en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	138
Figura III.8.- Electroforesis del producto amplificado del Fragmento F en cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>.....	138
Figura III.9.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr.....	139
Figura III.10.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen ARNr 23S de las cepas de campo.....	140
Figura III.11.- Dendrograma taxonómico de los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr.....	147
Figura III.12.- Dendrograma taxonómico de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S.....	147
Figura IV.1.- Representación esquemática de la posición de los cebadores para PCR de los Fragmentos B, C, D, y E del gen que codifica el ARNr 23S en micoplasmas porcinos.....	175
Figura IV.2.- Representación esquemática de la posición de los cebadores para PCR de los Fragmentos A y F del gen que codifica el ARNr 23S en micoplasmas porcinos.....	175
Figura IV.3.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos B, C, D, y E, del gen codificante del ARNr 23S de <i>M. hyosynoviae</i>, <i>M. hyorhinis</i> y <i>M. flocculare</i>.....	176

Figura IV.4.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos A, B, C, D, E, y F del gen codificante del ARNr 23S de <i>M. hyopharyngis</i>.....	176
Figura IV.5.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos A y F, del gen codificante del ARNr 23S de las cepas de referencia de los micoplasmas porcinos.....	177
Figura IV.6.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos A, del gen codificante del ARNr 23S en las cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>. Prueba de especificidad.....	177
Figura IV.7.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos A, del gen codificante del ARNr 23S en las cepas de campo de <i>M. hyopneumoniae</i>. Prueba de sensibilidad.....	178
Figura IV.8.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S de los micoplasmas porcinos.....	179
Figura IV.9.- Dendrograma taxonómico de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S de los micoplasmas porcinos.....	182
Figura IV.10.- Dendrograma taxonómico de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 16S de los micoplasmas porcinos.....	182
Figura IV.11.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 16S de los micoplasmas porcinos.....	183

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. **José Bismarck Poveda Guerrero** por todo el esfuerzo y dedicación que me ha concedido a lo largo de los años y depositar tantísima confianza en mí. Gracias por todos los conocimientos que me ha transmitido, dentro y fuera del laboratorio, y por animarme día a día a sacar lo mejor de mí mismo.

A la Prof. **Dr. Ana Sofía Ramírez Corbera** por su valiosa e ingeniosa visión científica, su energía, buen humor y optimismo. Gracias por ser mi guía en el mundo de la biología molecular, por las incontables horas repasando secuencias de nucleótidos, y todos sus sabios consejos.

A la Dr. **Patrícia Alexandra Clemente Janeiro de Assunção** por todo el trabajo realizado en su tesis doctoral, y haber escrito el libro que más veces he necesitado consultar a lo largo de estos años.

Al Ldo. **Rubén Sebastián Rosales Santana** por haber sido mi primer maestro en el laboratorio, e instruirme para sobrellevar con buen humor y acierto las complejidades que afrontamos todos los doctorandos.

Al Dr. **Nuno Tiago Antunes**, por enseñarme los pequeños matices del laboratorio, y señalarme el camino hacia la madurez.

Al Dr. **Alejandro Suárez Pérez** por ser el mejor compañero que uno pudiera desear. Gracias por tu excelente calidad humana y por ser “la otra mitad de los viejos becarios”.

A la Dr. **Evelyn Lobo** por haber cruzado medio mundo y darme la oportunidad de aprender con ella.

A la Prof. Dr. **Marisa Andrada Borzolino**, por iniciarme en la realidad de la producción y patología porcinas, y compartir generosamente su sabiduría.

A la Prof. Dr. **María del Mar Tavío Pérez** por sus valiosos consejos y su experiencia en el campo de las proteínas.

A la Lda. **Lidia Mederos Iriarte**, por tomar el relevo y mantener el barco a flote. Gracias por toda la ayuda en los momentos en que me veía desbordado, y haber compartido lo bueno y lo malo entre risas.

Al Ldo. **Orestes Vega Orellana** por sus ingeniosas aportaciones y su excelente buen humor, pero sobre todo por estar siempre ahí para echar una mano con arrolladora energía y buen hacer.

A **Esther**, por su magnífica asistencia técnica y experiencia casi artesanal en la elaboración de medios de cultivo.

A los compañeros del piso de abajo, “los infecciosos”, **Lorena, Judith, Fátima, Jimena, Dani, Félix, Soraya, Begoña** y **Fernando**, gracias por todas las veces que me han ayudado cada vez que he puesto un pie fuera de la “epi-cueva”, y por invitarnos a hacer equipo con ellos cada año en el concurso de paellas.

A mis antiguos profesores de la carrera y doctorandos de otras áreas, con los que he compartido clases, cursos, trabajos de máster, y risas en los pasillos... ¡sois muchos! Pero quiero agradecer especialmente al Prof. Dr. **Antonio Fernández** por su amistad y apoyo, al Dr. **Joaquín Amores** por haber sido alumno y maestro cuando empezábamos esta gesta, y a la Lda. **Yania Paz Sánchez** por todas las veces que colaboramos en la granja, y la sala de necropsias.

A mi **familia** cordobesa y canaria, especialmente a mi maravillosa **madre**.

A mis “colegas de siempre”: **Ubay, Iván, Javi, Rafa, Atolón, Fede, Kavy, Lucana**, y **Didi**, a los que espero dejar de hablarles sobre esta tesis de una vez por todas.

A **Vanessa**, por ser única y genial y por hacerme tan feliz todos estos años.

RESUMEN

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico de la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP), una enfermedad crónica de tipo respiratorio con profundo impacto en la producción porcina a nivel mundial, y se identifica como uno de los principales agentes patógenos implicados en el Complejo Respiratorio Porcino (CRP). Así mismo, es considerado en el ámbito de la micoplasmología, como una de las especies más laboriosas y exigentes para su aislamiento y cultivo.

Hasta el momento, únicamente cuatro cepas de *M. hyopneumoniae* han sido secuenciadas por completo por otros autores (cepa 232, 7448, J, y 168). Sin embargo, la dificultad para obtener nuevas cepas de campo y para trabajar con este microorganismo, supone una barrera para explorar las variaciones naturales que puede presentar *M. hyopneumoniae* en determinadas regiones del genoma. En este trabajo, hemos querido profundizar en el conocimiento de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y en el gen que codifica el ARNr 23S en *M. hyopneumoniae*.

Para ello, hemos constituido un cepario de *M. hyopneumoniae*, empleando 11 cepas anteriormente aisladas en el período 2003-2005, y 9 cepas de nuevo aislamiento, aisladas entre 2006 y 2009. En 2006, el aislamiento de nuevas cepas se realizó a través de muestras remitidas desde mataderos de Madrid y Zaragoza. Entre 2007 y 2009, a través de tres rondas anuales de aislamientos, un total de 72 muestras fueron tomadas de 36 pulmones seleccionados en el Matadero Insular de Gran Canaria. En 16/36 (44,44%) de los pulmones muestreados se aisló una única especie de micoplasma porcino, mientras que 12/36 (33,33%) de los pulmones analizados, permitieron el aislamiento de dos especies diferentes. Tan solo 8/36 (23,3%) de los pulmones fueron negativos en el aislamiento de micoplasmas porcinos.

Obtuvimos 46/72 (63,89%) aislamientos positivos, de los cuales 34/46 (73,91%) fueron cepas puras de micoplasmas porcinos. *M. hyopneumoniae* fue aislado en 19/46 (41,3%) de las muestras positivas, obteniendo 7/46 (15,22%) cepas puras. *M. hyorhinis* fue el agente más aislado 35/46 (76,08%), tanto en solitario como en cultivo mixto con *M. hyopneumoniae*. Tan sólo 3/46 (6,52%) correspondieron a cepas puras de *M. hyosynoviae*,

mientras que *M. flocculare* únicamente fue identificado en 1/46 (2,17%) de las muestras positivas, en cultivo mixto con *M. hyopneumoniae*.

Los métodos tradicionales de tipificación funcional microbiológica, y el empleo diagnóstico de la Reacción en Cadena de Polimerasa de tipo convencional, así como a tiempo real (PCR y q-PCR) fueron aplicados con éxito a la hora de discriminar aislamientos de cultivos mixtos y de verificar la pureza de las cepas obtenidas en este estudio.

Un total de 20 cepas de *M. hyopneumoniae* fueron seleccionadas para el análisis de la Región Intergénica 16S-23S ARNr. La mayoría (14/20) muestran el patrón secuencial de la cepa virulenta 7448, o coinciden con el patrón de la cepa no virulenta J (2/20). No hubo correspondencia exacta con los patrones descritos para las cepas 232 y 168. Dos nuevos patrones secuenciales fueron identificados en 3/20 y 1/20 de las cepas de campo. Los 6 patrones secuenciales analizados muestran un tamaño variable de 486 a 495 nucleótidos, con sustituciones directas de nucleótidos y adiciones o deleciones.

Seleccionamos 14 de las 20 cepas de *M. hyopneumoniae* para obtener la secuencia del gen que codifica el ARNr 23S. La extensa longitud de este gen (2902 pares de bases) se secuenció mediante ensamblaje de las secuencias obtenidas por amplificación de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) de 6 fragmentos génicos correlativos superpuestos, utilizando cebadores publicados por otros autores y cebadores de nuevo diseño. Diez patrones secuenciales, diferentes a los descritos para las cepas 232, 7448, J, y 168, fueron identificados. En análisis conjunto, al menos 22 posiciones de nucleótidos en la secuencia, muestran variación entre 2 y 3 nucleótidos posibles.

En base a las divergencias en los patrones secuenciales de este gen, ha sido posible establecer una nueva secuencia, señalando estas 22 posiciones con los códigos de polimorfismos, así como una secuencia consensuada para este gen en *M. hyopneumoniae*. El estudio del dendrograma resultante, permite aglutinar en 4 grandes grupos todas las cepas analizadas, mientras que el estudio comparativo de los patrones secuencias permite determinar el grado de similitud entre las mismas (99,6% a 99,9%) y detectar la presencia

de mutaciones puntuales relacionadas con resistencias a antibióticos aportadas por otros autores. La relativa estabilidad de este gen, y la presencia de mutaciones puntuales, no parece guardar correlación con el patrón secuencial de la Región Intergénica 16S-23S ARNr.

Con el propósito de profundizar en el análisis taxonómico inter-especie de los micoplasmas porcinos, se secuenció el gen que codifica el ARNr 23S, mediante la amplificación por PCR de 6 fragmentos génicos correlativos superpuestos, empleando cebadores publicados por otros autores y cebadores de nuevo diseño.

Para *M. hyorhinis*, se secuenció este gen para la cepa de referencia BTS-7. Esta nueva secuencia, fue analizada en conjunto con las cepas secuenciadas por otros autores (GDL-1, MCLD, HUB-1) y una secuencia parcial, de una variante de la cepa BTS-7 mutante por selección frente a antibióticos, encontrando 2, 3 ó 5 nucleótidos diferentes por sustitución directa, así como deleciones, para un tamaño variable de 2894 a 2985 nucleótidos.

En el caso de *M. flocculare*, se empleó la cepa de referencia MS42 y se comparó con la secuencia publicada en 1994 del gen ARNr 23S de esta cepa. Al menos 29 puntos de discrepancia entre ambas secuencias de nucleótidos se han observado, a lo largo de los 2901 nucleótidos de este gen, en forma de sustituciones directas o deleciones. Dado que no ha sido publicada hasta el momento la secuenciación completa de este microorganismo, proponemos esta nueva secuencia como revisión a la secuencia anteriormente publicada.

M. hyosynoviae y *M. hyopharyngis* son dos especies relativamente poco estudiadas, sobre las que no se ha publicado su secuenciación genómica completa, ni del gen que codifica el ARNr 23S. Empleando las cepas de referencia S16 y H3-6B F, aportamos por vez primera la secuencia completa de este gen, con una longitud de 2908 y 2882 nucleótidos respectivamente.

Las secuencias obtenidas para el gen que codifica el ARNr 23S para cada una de las cepas de referencia de estos micoplasmas porcinos, fue analizada en conjunto con la

secuencia “consenso” elaborada a partir de todos los patrones secuenciales identificados en *M. hyopneumoniae*. La estructura del dendrograma y los valores porcentuales de similitud entre especies empleando este gen, se asemejan notablemente a los que pueden ser elaborados a partir de gen que codifica el ARNr 16S.

El análisis realizado, comparó ambos genes ARNr (16S y 23S) como herramientas filogenéticas independientes. En base al gen ARNr 23S, se aprecia un ligero incremento (0,6% a 4,5%) en la similitud de los micoplasmas porcinos, con dos únicas excepciones: la comparación taxonómica entre *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*, con un mismo valor de similitud (96,3%) en ambos modelos taxonómicos, y la comparación entre *M. hyorhinitis* y *M. hyosynoviae*, cuya similitud decreció un 1,6% respecto al modelo basado en el gen ARNr 16S. La comparación de las secuencias génicas ARNr 16S y 23S, respecto a las correspondientes en *E. coli*, reveló que la proximidad filogenética tiende a reducirse (1,8% a 3,3%) para 4 de estos micoplasmas porcinos, siendo la secuencia de *M. hyopharyngis* la única que incrementa su similitud con *E. coli* (0,8%) en base al gen ARNr 23S.

De manera adicional, algunos de los cebadores diseñados en este estudio para protocolos de PCR convencional, podrían ser aplicados con éxito para uso diagnóstico en aislamiento y cultivo de micoplasmas porcinos. Empleando la información obtenida de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y de las zonas más variables inter-especie del gen que codifica el ARNr 23S, es posible determinar regiones altamente conservadas sobre las que emplear cebadores de tipo específico para *M. hyopneumoniae* y otros micoplasmas porcinos.

Dado que la caracterización oficial de nuevas especies del Género *Mycoplasma*, próximamente tomará como criterio sustitutivo de las pruebas serológicas la aportación de los genes ARNr 16S, 23S y la región Intergénica entre ambos, este trabajo pretende arrojar un mayor conocimiento en las variaciones naturales del gen que codifica el ARNr 23S en *M. hyopneumoniae*, y añadir un punto de apoyo en posteriores análisis filogenéticos de *M. hyorhinitis*, *M. flocculare*, *M. hyosynoviae* y *M. hyopharyngis*, y resaltar la importancia de integrar el gen ARNr 23S como herramienta complementaria en la taxonomía tradicional fundamentada en el uso del gen ARNr 16S.

SUMMARY

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of enzootic pneumonia (EP), a chronic respiratory disease with profound impact on pig production worldwide, and it is identified as one of the main pathogens involved in the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). It is also considered in the field of mycoplasmaology, as one of the most time consuming and fastidious species for their isolation and culturing.

So far, only four strains of *M. hyopneumoniae* have been completely sequenced by previous authors (strains 232, 7448, J, and 168). However, the difficulty in obtaining new field strains and to work with this microorganism, is a barrier to explore the natural variations that may occur in certain regions of the genome of *M. hyopneumoniae*. In this work, we wanted to deepen the knowledge of the 16S-23S intergenic region and the gene encoding 23S rRNA in *M. hyopneumoniae*.

To do this, we have established a culture collection of *M. hyopneumoniae*, using 11 strains previously isolated in 2003-2005, and 9 new isolated strains obtained between 2006 and 2009. In 2006, the isolation of new strains was performed using samples sent from slaughterhouses of Madrid and Zaragoza. Between 2007 and 2009, through three annual rounds of isolations, a total of 72 samples were taken from 36 selected lungs in the Slaughterhouse of Gran Canaria. In 16/36 (44.44%) of the lungs sampled, a single porcine mycoplasma species were isolated, while 12/36 (33.33%) of the lungs analyzed, allowed the isolation of two different species. Only 8/36 (23.3%) of the lungs were negative in the isolation of porcine mycoplasmas.

We obtained 46/72 (63.89%) positive isolates, of which 34/46 (73.91%) were pure strains of porcine mycoplasmas. *M. hyopneumoniae* was isolated in 19/46 (41.3%) of the positive samples, obtaining 7/46 (15.22%) pure strains. *M. hyorhinis* was the most isolated agent 35/46 (76.08%), either alone or in mixed culture with *M. hyopneumoniae*. Only 3/46 (6.52%) were pure strains of *M. hyosynoviae*, while *M. flocculare* was identified in only 1/46 (2.17%) of the positive samples, in mixed culture with *M. hyopneumoniae*.

The traditional methods of microbiological functional characterization and diagnostic use of conventional and real time Polymerase Chain Reaction (PCR and q-PCR) were successfully applied to discriminate mixed cultures and verify the purity of the strains obtained in this study.

A total of 20 strains of *M. hyopneumoniae* were selected for analysis of the 16S-23S intergenic region of rRNA. The majority (14/20) shows the sequential pattern of the pathogenic strain 7448, or match the pattern of non-pathogenic strain J (2/20). No exact correspondence were found with the patterns described for strains 232 and 168. Two new sequential patterns were identified in 3/20 and 1/20 of field strains. The 6 sequential patterns analyzed show a variable size of 486-495 nucleotides, differentiating by direct nucleotide substitutions and additions or deletions.

Select 14 of the 20 strains of *M. hyopneumoniae* to obtain the sequence of the gene encoding 23S rRNA. The extensive length of this gene (2902 pb) was sequenced by the assembly of sequences obtained by amplification of Polymerase Chain Reaction (PCR) by 6 correlative overlapping gene fragments using primers published by other authors and newly designed primers. Ten sequential patterns, different from those described for strains 232, 7448, J, and 168, were identified. In the pooled analysis, at least 22 nucleotide positions in the sequence, show variation between 2 and 3 possible nucleotides.

Based on the differences in sequential patterns of this gene has been possible to establish a new sequence, indicating these 22 positions with polymorphisms codes, as well as a consensus sequence for this gene in *M. hyopneumoniae*. The study of the resulting dendrogram, can bind into 4 large groups all strains tested, while the comparative study of sequence patterns allows to determine the degree of similarity between them (99.6% to 99.9%) and the presence of point mutations associated with resistance to antibiotics contributed by other authors. The relative stability of this gene, and the presence of mutations, does not seem to correlate with the sequential pattern of the 16S-23S intergenic region rRNA.

In order to further analyze taxonomic inter-porcine mycoplasma species, sequenced the gene encoding 23S rRNA was sequenced, by PCR amplification of 6 overlapping gene fragments, using primers published by other authors and newly designed primers.

The 23S rRNA gene was sequenced on BTS-7 reference strain for *M. hyorhinis*. This new sequence was analyzed in conjunction with strains previously sequenced by others (strains GDL-1, MCLD, HUB-1) and a partial sequence of a variant BTS-7 strain, an antibiotic resistance mutant, finding 2, 3 or 5 different nucleotide along sequences, by direct nucleotide substitution and deletions for a variable size of 2894 to 2985 nucleotides.

Strain reference MS42 was used in the case of *M. flocculare* and compared to the sequence published in 1994 of 23S rRNA gene for this same strain. At least 29 points of discrepancy between the two nucleotide sequences have been observed throughout the 2901 nucleotides of this gene, differing by direct replacements or deletions. Since so far it has not been published complete sequencing for this microorganism, we propose this sequence as a revision to the previously published sequence.

M. hyosynoviae and *M. hyopharyngis* are two relatively little studied species, for which no full genomic sequence are published, nor the gene encoding the 23S rRNA. Using reference strains S16 and H3-6B F, we provide first complete sequence of this gene, with a length of 2908 nucleotides and 2882 respectively.

The obtained sequences for the gene encoding the 23S rRNA for each of the reference strains of these swine mycoplasmas was analyzed in conjunction with the "consensus" sequence drawn from all sequential patterns identified in *M. hyopneumoniae*. The structure of the dendrogram and the percentage values of similarity between species using this gene are remarkably similar to those that can be produced from the gene encoding 16S rRNA.

The analysis, compared both rRNA genes (16S and 23S) as independent phylogenetic tools. Based on 23S rRNA gene, there was a slight increase (0.6% to 4.5%) on the similarity of swine mycoplasmas, with two exceptions: the taxonomic comparison between *M. hyopneumoniae* and *M. flocculare*, with the same similarity value (96.3%) in both taxonomic models, and the comparison between *M. hyorhinae* and *M. hyosynoviae*, whose similarity decreased by 1.6% compared to the model based on the 16S rRNA gene. Comparison of the 16S and 23S rRNA gene sequences to the corresponding *E. coli*, revealed that the phylogenetic proximity tends to be reduced (1.8% to 3.3%) for 4 of these swine mycoplasmas, *M. hyopharyngis* being the only sequence that increases (0.8%) the similarity to *E. coli* based on the 23S rRNA gene.

Additionally, some of the primers designed in this study to conventional PCR protocols could be successfully applied for diagnostic use in isolation and culture of swine mycoplasma. Using information obtained from the 16S-23S intergenic spacer region and the inter-species variable areas of gene encoding 23S rRNA, highly conserved regions can be determinate on which employ specific primers for *Mycoplasma hyopneumoniae* and other swine mycoplasmas.

Since the official characterization of new species in the genus *Mycoplasma*, will take as a substitutive criteria of the serological tests the inclusion of sequences for 16S and 23S rRNA genes and the intergenic spacer region, this study aims to shed more knowledge on natural variations of the gene encoding 23S rRNA of *M. hyopneumoniae*, as well as add a further foothold in phylogenetic analysis of *M. hyorhinae*, *M. flocculare*, *M. hyosynoviae* and *M. hyopharyngis*, and highlight the importance of integrating the 23S as a complementary tool to traditional taxonomy based on the use of 16S.

ABREVIATURAS

μl: microlitro

μm: micrómetro

A: Adenina

ABC: ATP-Binding Cassette

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNr: Ácido Desoxirribonucleico ribosómico

ADNt: Ácido Desoxirribonucleico transferente

AFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados

Ala: Alanina

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNr: Ácido Ribonucleico ribosómico

Asn: Asparagina

ATP: Adenosina Trifosfato

ATCC: American Type Culture Collection

C: Citosina

cols: colaboradores

CRP: Complejo Respiratorio Porcino

Da: Daltons

Dntps: Dinucleótidos-fosfato

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

G: Guanina

Gly: Glicina

Glu: Ácido glutámico

IFN-γ :Interferón gamma

IL: Interleuquina

ISR: Región Intergénica 16S-23S ARNr

kcal: kilocaloría

kDa: kiloDalton

km: kilómetro

kpb: kilopares de bases

LAMPs: Proteínas de Membrana Asociadas a Lípidos

Lys: Lisina

MAPK: Proteínas Quinasa Activadas por Mitógenos

mg: miligramo

ml: mililitro

nm: nanómetro

NCTC: National Collection of Type Cultures

NEP: Neumonía Enzoótica Porcina

NF- κ B: Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pg: picogramo

PGE₂: Dinoprostona

pM: picomolar

ppm: partes por millón

Pro: Prolina

PRRS: Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

p.v.: peso vivo

q-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

RAPD: Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico

rpm: revoluciones por minuto

seg: Segundos

Ser: Serina

SSR: Repeticiones Simples de Secuencias

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

T: Timina

TLR: Receptores Tipo Toll

Thr: Treonina

Tm: Tonelada métrica

TNF- α :Factor de necrosis tumoral

UE: Unión Europea

U.I.: Unidades Internacionales

Val: Valina

VNTR: Análisis multi-locus de Repeticiones en Tándem de Número Variable

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1.- TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE LOS *MOLLICUTES*

El estudio de los microorganismos lleva ineludiblemente a la clasificación de los mismos y a la determinación de su historia evolutiva. Los primeros intentos por clasificar y agrupar especies del reino procariota se basaron en la presencia y carácter (o ausencia) de la pared celular. La creciente aportación de información filogenética, obtenida a través del estudio del gen ARNr 16S, ha permitido un nuevo enfoque, al margen de las tipificaciones funcionales o morfo-estructurales (Vandamme y cols., 1996).

La Clase *Mollicutes* (del latín “*mollis*”: suave; “*cutis*”: piel), cuyo estatus taxonómico fue propuesto por Edward y Freunt (1967), engloba hoy en día numerosas especies, cuya relación filogenética más cercana se establece con bacterias Gram-positivas de la división *Firmicutes* (Woese y cols., 1980). Sin embargo, Murray (1984 a y b) propuso la separación de la división *Tenericutes*, siendo dicha propuesta aprobada por el Subcomité de Taxonomía para la clase *Mollicutes* (Tully, 1988) y redefinida posteriormente (Tully y cols., 1993). La Clase *Mollicutes* ha permanecido incluida en la división *Firmicutes* en revisiones del “Taxonomic Outline of Bacteria and Archea”, cuya filogenia se basa en el uso exclusivo del gen ARNr 16S (Garrity y cols., 2007). Sin embargo, el uso de marcadores filogenéticos alternativos, tales como subunidad β ARN polimerasa, chaperonina GroEL, aminoacils ARNt sintetasa y subunidades F_0F_1 -ATPasa (Ludwig y Schleifer, 2005; Ludwig y cols., 2009), junto al característico hecho de carecer de pared celular, parece defender la separación definitiva de los *Mollicutes* a través de la división *Tenericutes*.

Al menos tres de los Géneros contienen especies que actualmente son incultivables (*Phytoplasma*, *Eperythrozoon* y *Haemobartonella*). De esta manera, Brown y cols., (2010b), recogen la siguiente clasificación para la Clase *Mollicutes*, aunque, las especies

de los Géneros *Eperythrozoon* y *Haemobartonella* podrían ser transferidos eventualmente al Género *Mycoplasma*..

Phylum *Tenericutes*

Clase I. <i>Mollicutes</i>	<u>Tamaño del genoma</u>
Orden I. <i>Mycoplasmatales</i>	
Familia <i>Mycoplasmataceae</i>	
Género <i>Mycoplasma</i>	(580-1350 kpb)
Género <i>Ureaplasma</i>	(760-1140 kpb)
Familia <i>Incertae sedis</i>	
Género <i>Eperythrozoon</i>	(745 kpb)
Género <i>Haemobartonella</i>	(1200 kpb)
Orden II. <i>Entomoplasmatales</i>	
Familia <i>Entomoplasmataceae</i>	
Género <i>Entomoplasma</i>	(870-900 kpb)
Género <i>Mesoplasma</i>	(825-930 kpb)
Familia <i>Spiroplasmataceae</i>	
Género <i>Spiroplasma</i>	(780-2200 kpb)
Orden III. <i>Acholeplasmatales</i>	
Familia <i>Acholeplasmataceae</i>	
Género <i>Acholeplasma</i>	(1500-1650 kpb)
Familia <i>Incertae sedis</i>	
Género “ <i>Candidatus Phytoplasma</i> ”	(530-1350 kpb)
Orden IV. <i>Anaeroplasmatales</i>	
Familia <i>Anaeroplasmataceae</i>	
Género <i>Anaeroplasma</i>	(1500-1600 kpb)
Género <i>Asteroleplasma</i>	(1500 kpb)

Los *Mollicutes* pueden considerarse un grupo heterogéneo, con un tamaño medio de 200 a 500 nm de diámetro, caracterizados por la ausencia de pared celular, incapacidad para sintetizar peptidoglicano o sus precursores, (lo que les confiere resistencia a los

antibióticos beta-lactámicos) y requerimiento de esteroides y ácidos grasos en la mayoría de las especies cultivables (Razin y Freundt, 1984).

En su mayoría son anaerobios facultativos, aunque también existen anaerobios estrictos, y en medio sólido tienden a formar colonias con la característica forma de “huevo frito”. Estos microorganismos presentan un tamaño de genoma reducido (580 a 2200 kpb), y un bajo contenido de Guanina + Citosina (de 23 a 34% en la mayoría de especies, con excepciones hasta el 40% como *Asteroleplasma anaerobium* y *Mycoplasma pneumoniae*).

Así mismo, en contraste con otras bacterias, la mayoría de los *Mollicutes* presentan tan sólo una o dos copias de los genes ARNr (aunque algunas especies de *Mesoplasmas* presentan hasta tres copias). El gen ARNr 5S es sensiblemente menor en número de nucleótidos, y el número de genes ARNt es reducido. La ARN polimerasa es resistente a la rifampicina, y en alguno Géneros (incluido *Mycoplasma*), el codón UGA codifica triptófano en lugar de una señal de terminación (Brown y cols., 2010b).

Los *Mollicutes* son sensibles a la lisis por anticuerpos específicos sin la mediación del complemento, en pruebas de inhibición de crecimiento. Por este motivo, la producción de antisueros específicos, y la realización de pruebas de inhibición de crecimiento frente a los antisueros de todas las especies reconocidas, ha sido condición requerida en la caracterización de nuevas especies. Recientemente, el estudio del gen ARNr 16S ha sido implementado para la caracterización (Brown y cols., 2007), limitando el número de especies frente a las que realizar dichas pruebas serológicas.

Dada la relativa simplicidad genética y fenotípica de los *Mollicutes* respecto a otras bacterias, las primeras hipótesis sobre su origen apuntaron hacia la posible evolución desde un ancestro primitivo independiente. Sin embargo, Neimark (1979), , identificó enzimas características compartidas por estreptococos, bacterias ácido-lácticas y *Mollicutes*. Finalmente, el trabajo de Woese y cols. (1980), sobre el gen ARNr 16S, apunta a una “evolución reductiva” de los *Mollicutes*, cuyo origen parte desde una rama antigua del linaje clostridial. En el siguiente cuadro de texto (adaptado de Razin y cols., 1995), se detallan algunas de las características distintivas de los *Mollicutes* frente a otras bacterias:

Característica	<i>Mollicutes</i>	<i>Eubacteria</i>
Pared celular	Ausencia	Presencia
Membrana plasmática	Presencia de colesterol	Ausencia de colesterol
Tamaño del genoma	530-2220 kpb	1450->6000 kpb
Contenido de G+C	23-40 moles %	25-75 moles %
Nº de operones ARNr	1-3	1-10
Longitud del gen 5S ARNr	104-113 nucleótidos	114 nucleótidos
Nº de genes ARNt	30 (<i>M. capricolum</i>) 33 (<i>M. pneumoniae</i>)	51 (<i>B. subtilis</i>) 78 (<i>E. coli</i>)
Codón UGA	Codifica el triptófano en <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> y <i>Mesoplasma</i>	Codifican un codón <i>STOP</i>
ARN polimerasa	Resistente a rifampicina	Sensible a la rifampicina

Evolutivamente, los *Acholeplasmas* parecen ser el grupo más antiguo, cuya formación implicó la pérdida de la pared celular y una marcada reducción genómica. En base a los estudios sobre el ARNr 16S (Weisburg y cols., 1989), los *Acholeplasmas* son difícilmente distinguibles de los *Anaeroplasmas*. Sin embargo, la condición anaerobia de estos últimos, hace necesaria su distinción. Desde los *Acholeplasmas*, la separación de otros linajes en la clase *Mollicutes* ha ido acompañada por alteraciones génicas traducidas en cambios estructurales, (carácter helicoidal y motilidad en *Spiroplasmas*) o bien en posteriores reducciones genómicas más acusadas, como es el caso de los *Mycoplasmas*.

Los *Mollicutes* se consideran actualmente como los organismos replicantes de forma autónoma más pequeños, pero visibles al microscopio óptico. Su reducida carga génica está directamente relacionada con un menor número de genes respecto a otras bacterias, lo que condiciona un reducido rango de proteínas que pueden ser sintetizadas por estos microorganismos (Razin y Freundt, 1984; Razin y cols., 1998). La reducida capacidad metabólica y enzimática de los *Mollicutes* parece justificar la dependencia nutricional tan acusada de estos microorganismos y su parasitismo. Todos los *Mollicutes* actúan como comensales o bien como parásitos, y se distribuyen en un amplio rango de hospedadores, incluyendo vertebrados, insectos y plantas. Muchos de ellos pueden considerarse como patógenos de gran impacto en seres humanos, y otros seres vivos (Razin, 1992).

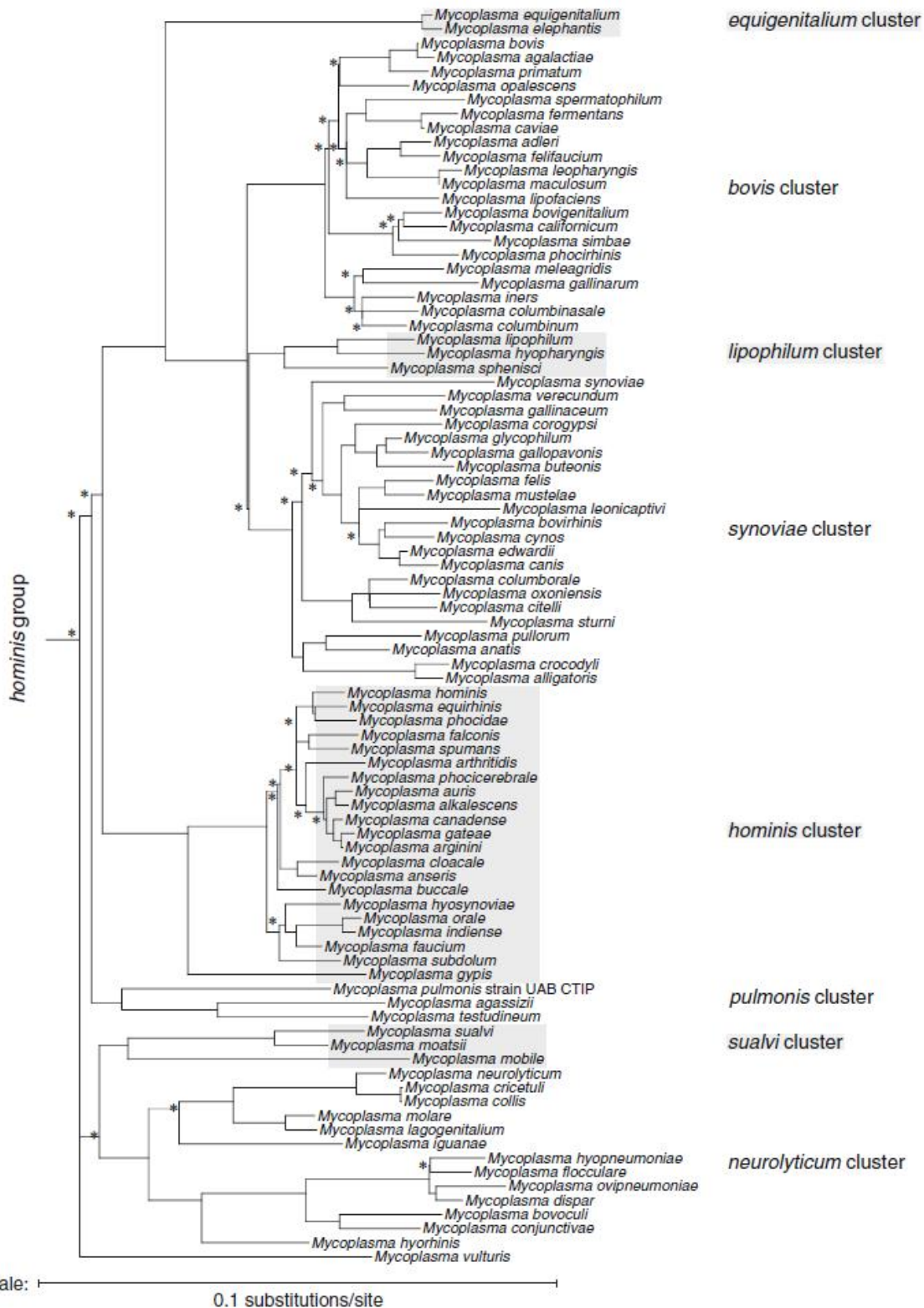
I.2.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MICOPLASMAS

El Género *Mycoplasma* (nombre común: micoplasmas) es sin duda el subconjunto de la Clase *Mollicutes* que mayor número de especies reconocidas aglutina (117 especies reconocidas y 14 especies candidatas a la caracterización oficial, Brown y cols., 2010a), y su número aumenta con la descripción de nuevas especies cada año (*Mycoplasma mucosicanis*, Spargser y cols., 2011; *Mycoplasma neophronis*, Suárez-Pérez y cols., 2012).

El primer aislamiento de micoplasmas, se debe a Nocard y Roux, en 1898, quienes consiguieron aislar el agente de la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina, constatando la capacidad del agente aislado (*M. mycoides subsp. mycoides*) para atravesar filtros porosos capaces de retener a otras bacterias. No obstante, la elección de las especies del grupo *Mycoides* como especies representativas del Género *Mycoplasma* (Nowak, 1929), ha supuesto una desafortunada elección para formular la organización taxonómica (dadas las peculiaridades del grupo *Mycoides*). Los últimos hallazgos (Mansó-Silvan y cols., 2009; Sharam y cols., 2010) han permitido la reclasificación de los anteriores taxones y serovares del grupo *Mycoides* en 5 especies, siendo su relación filogenética más estrecha con el Género *Spiroplasma* (Gasparich y cols., 2004). Sin embargo, las especies del grupo *Mycoides* presentan severas modificaciones respecto al patrón habitual de los *Spiroplasma* en cuanto a motilidad y estructura helicoidal.

A nivel taxonómico (Johansson y Pettersson, 2002), el resto de los microorganismos del Género *Mycoplasma* pueden ser divididos en al menos dos grupos (**Figura I.1**): grupo *hominis* (con los clústeres *equigenitalium*, *bovis*, *lipophilum*, *synoviae*, *hominis*, *pulmonis*, *sualvi* y *neurolyticum*) y grupo *pneumoniae* (con los clústeres *fastidiosum*, *hemotropic*, *pneumoniae*, *muris*, y *Ureaplasma*). Este último, compuesto por 7 especies de *Ureaplasma* (Kong y Gilbert, 2004), presentan suficientes características definitorias (colonias excepcionalmente pequeñas en comparación con los *Mycoplasmas*, ausencia de actividad hexoquinasa y arginina deiminasa, y presencia de un requerimiento estricto de urea como nutriente indispensable de los medios de cultivo) para dividir la familia de *Mycoplasmatales* en sendos Géneros (*Mycoplasmas* y *Ureaplasmas*).

El genoma de los micoplasmas oscila entre los 580 y 1350 kpb. En la secuencia génica de estos microorganismos aparecen con frecuencia Repeticiones Simples de Secuencia (SSRs), compuestas por nucleótidos simples o secuencias cortas reiterativas de oligonucleótidos, en tándem (Maniloff., 1992).



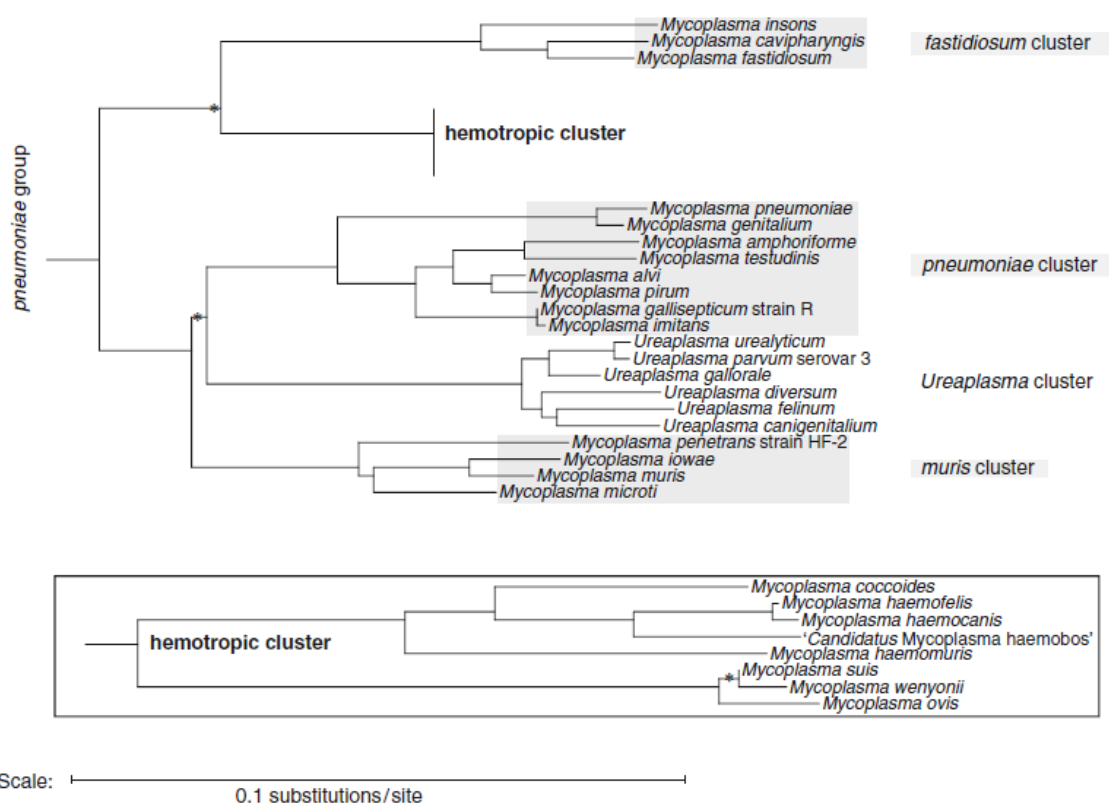


Figura I.1.- Clasificación taxonómica del Género *Mycoplasma* (grupo *hominis* y grupo *pneumoniae*), adaptado de Brown y cols., 2010a.

Las SSRs desempeñan diferentes funciones para las múltiples especies del Género *Mycoplasma*. Pueden actuar como moduladores de la expresión génica como *locus* de contingencia (Moxon y cols., 1994), o bien facilitar reajustes genómicos en los procesos de recombinación, afectando la estructura de algunas proteínas y su rango de interacción con otras proteínas (Mrázek, 2006).

Se consideran aerobios o anaerobios facultativos, con un crecimiento óptimo a 37°C. Los micoplasmas presentan un ciclo del ácido tricarbóxico incompleto, y carecen de quinonas o citocromos, lo que impide el proceso de la fosforilación oxidativa (Miles, 1992 a, b). Generalmente emplean azúcares o arginina como fuente principal de recursos (aunque algunas especies como *M. capricolum subs. capricolum* pueden emplear ambas, o bien ninguna de las anteriores, como en el caso de *M. bovis*, que emplea piruvato y ácidos orgánicos).

Son microorganismos pleomórficos, con amplia variedad de formas (esféricas, cocoidales, y piriformes), capaces de atravesar filtros entre 220 y 450 nanómetros (Poveda y cols., 2002). Son organismos dependientes del colesterol (Razin, 1974), por lo que tradicionalmente requieren suero animal para crecer en medios artificiales. Sin embargo, Ramírez y cols., (2008a), demostraron la eficacia de un medio semi-definido elaborado sin suero, para el crecimiento de micoplasmas caprinos.

Debido a la marcada dependencia nutricional y metabólica de los micoplasmas, es necesario un estrecho contacto con las células del hospedador, el cual es facilitado por la presencia de estructuras u orgánulos especializados de ensamblaje (*M. pneumoniae*, y *M. mobile*, Balish, 2006; Balish y Krause, 2006), o únicamente por proteínas variables de superficie (*M. synoviae*, *M. pulmonis*). Algunas especies, como es el caso de *M. penetrans*, presentan la capacidad de invadir y penetrar parcialmente las células del hospedador (Lo y cols., 1992), mientras que micoplasmas altamente patógenos, como *M. alligatoris*, podrían emplear una combinación de hialuroidasa y sialidasa en detrimento de las adhesinas (Brown y cols., 2004). A consecuencia de la adherencia a las células eucariotas, los productos tóxicos propios del metabolismo de los micoplasmas, tales como peróxido de hidrógeno y radicales superóxido generan daño oxidativo sobre las membranas de las células del hospedador (Razin, 1991).

La incapacidad de los micoplasmas para sintetizar una pared celular, condiciona la carencia de un espacio periplásmico, y de una membrana externa para el entrapamiento de las proteínas necesarias para cerrar sus superficies celulares. Sin embargo, presentan una membrana plasmática flexible de naturaleza trilaminar, compuesta mayoritariamente por lípidos y una fracción de proteínas, mientras que en menor grado la constituyen carbohidratos complejos en forma de glicoproteínas y glicolípidos (Kahane y Tully, 1976; Rottem y Kahane, 1993). Esta membrana, representa la única barrera que separa el interior citoplasmático del medio externo. Pese a su relativa simplicidad (con un peso aproximado al 10% de la membrana citoplasmática de *E. coli*), muestra una capacidad sorprendente para mantener una arquitectura de superficie que es versátil tanto antigénica como funcionalmente, y por tanto, contribuye al éxito de los micoplasmas en la adaptación a un

amplio rango de hospedadores, y en el establecimiento de enfermedades de naturaleza crónica (Rottem, 2003, Citti y cols., 2010).

Las proteínas constituyen un 50%-60% del peso de la membrana, siendo el ratio entre lípidos y proteínas de 60:1 a 65:1 (Weislander y cols., 1992). Las proteínas de membrana asociadas a lípidos (LAMPs) de algunos micoplasmas como *M. fermentans*, han demostrado alta antigenicidad y efecto citocida contra las células linfocíticas y monocíticas (Into y cols., 2002), así como capacidad para inducir la diferenciación y apoptosis en líneas celulares leucémicas (Hall y cols., 2000). Ello apunta a la factibilidad de la aplicación de las LAMPs como agentes terapéuticos contra la leucemia, o agentes inmunomoduladores en procesos cancerosos (Yuo y cols., 2006).

La mayoría de los micoplasmas son inmóviles, pero existen notables excepciones, tales como *M. pneumoniae* (Bredt y cols., 1970), *M. gallisepticum* (Erdmann, 1976), *M. pulmonis*, (Bredt y Radestock, 1977), *M. genitalium*, (Taylor-Robinson y Bredt, 1983), *M. mobile* (Kirchhoff y cols., 1984) y *M. amphoriforme* (Hatchell y cols., 2006). En el caso de *M. mobile*, el movimiento se produce de manera centrípeta, mediante unión, tracción y liberación por parte de múltiples proteínas de 50 nm de longitud, unidas a la maquinaria cinética (Miyata, 2010).

Los micoplasmas muestran una gran diversidad en cuanto a características fenotípicas y genómicas, así como un amplio rango de hospedadores naturales. Curiosamente, poseen un reducido número de proteínas con capacidad de reparar su ADN y una elevada tasa de mutación, lo que contribuye a acelerar la evolución de las especies de este Género (Rocha y Blanchard, 2002).

Aproximadamente, la mitad de las especies tipificadas del Género *Mycoplasma* se presentan en el hospedador correspondiente sin ocasionar un cuadro clínico o enfermedad aparente, aunque pueden actuar como patógenos oportunistas o patógenos secundarios (Baseman y Tully, 1997). Sin duda, las especies estudiadas con mayor profundidad son aquellas que actúan como patógenos primarios en humanos y animales domésticos.

Los micoplasmas patógenos primarios más importantes en el ser humano, son *M. pneumoniae*, *M. hominis*, y *M. genitalium* (Krause y Taylor-Robinson, 1992; Blanchard y Bébéar, 2002).

M. pneumoniae es uno de los agentes más importantes en los cuadros de bronquitis infecciosa y otras complicaciones de tipo respiratorio (Atkinson y cols., 2008). La evolución del cuadro pulmonar puede derivar en complicaciones de tipo dermatológico (Schalock y cols., 2006), artrítico (Ramírez y cols., 2005) o cardiovascular (Meseguer y cols., 2003), e incluso afectar a nivel del sistema nervioso central (Ramsay e Iivanainen, 1974; Powers y Johnson, 2012).

M. hominis es un parásito frecuentemente asociado al tracto urogenital femenino en procesos de vaginitis, vaginosis bacteriana e infecciones intrauterinas (Keane y cols., 2000). La capacidad de este micoplasma para acceder al feto, se asocia con un aumento de la morbilidad y mortalidad perinatal (Waites y cols., 1988; Gonçalves y cols., 2002).

M. genitalium se presenta en uretritis no gonocócicas en hombres (Gambini y cols., 2000; Jensen, 2004), y en procesos urogenitales infecciosos en mujeres (Baseman y cols., 2004; Blaylock y cols., 2004). Principalmente coloniza el territorio vaginal, aunque puede ser causa de cervicitis (Manhart y cols., 2001; Casin y cols., 2002).

La asociación de *M. penetrans* con las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), establecida por numerosos autores (Tully, 1993a; Blanchard, 1997; Blanchard y cols., 1997; Waites y Talkington, 2005) ha situado este micoplasma como patógeno de alto riesgo. Así mismo, otras especies del Género *Mycoplasma* pueden ser relacionadas con procesos artríticos, tales como *M. fermentans* (Gilroy y cols., 2001), y *M. salivarium* (Watanabe y cols., 1998), mientras que *M. hyorhinis* (Huang y cols., 2001) y otros *Mycoplasma spp.* (Zhao y cols., 2006), se han identificado en aislamientos relacionados con carcinomas.

En general, la personas inmunodeprimidas son susceptibles a infecciones zoonóticas por micoplasmas, (*M. haemofelis* en paciente con VIH, dos Santos y cols.,

2008), aunque también se ha documentado la enfermedad ocupacional “seal finger”, causada por *M. phocicerebrale* (Baker y cols., 1998), en pacientes no necesariamente inmunodeprimidos.

Por otra parte, los animales de producción también están sometidos a la presión infectiva por parte de algunas especies del Género *Mycoplasma* que actúan como patógenos primarios.

En la avicultura industrial destacan *M. meleagridis*, que afecta a los pavos con un cuadro de aerosaculitis, alteraciones muculoesqueléticas y reproductivas (Kleven, 1998), *M. synoviae*, causante de procesos sinovíticos infecciosos y procesos respiratorios en aves (Stipkovits y Kempf, 1996), y particularmente *M. gallisepticum*, como causante de enfermedad crónica respiratoria en gallináceas y de sinusitis en pavos (Kleven, 1998). La acción de estos agentes patógenos supone un gran impacto en la producción (Mohammed y cols., 1987; Bradbury, 2005) y la presencia y transmisión de estos agentes, entre aves silvestres y domésticas, ha sido estudiada por numerosos autores (Poveda y cols., 1990; O’Connor y cols., 1999; Lierz y cols., 2000; Luttrell y cols., 2001). Otras especies, como *M. iowae* (Al-Ankari y Bradbury., 1996) y *M. pullorum* (Moalic y cols., 1997) presentan características citopatogénicas, aunque aparecen con menor frecuencia.

En el ganado bovino, el agente de la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina, *M. mycoides subsp. mycoides*, (anteriormente definido como “*M. mycoides subsp. mycoides*, variante SC) ha sido responsable de cuantiosas pérdidas globales durante el siglo XX (Westberg y cols., 2004), y continúa siendo un problema sanitario en África y Asia (Lesnoff y cols., 2004; Fischer y cols., 2012). Así mismo, *M. bovis* es un agente de gran impacto ampliamente distribuido, y está relacionado con procesos poliartriticos, urogenitales y mastitis (Pfützner y Sachse, 1996; Nicholas y Ayling, 2003).

En los pequeños rumiantes, *M. capricolum subsp. capripneumoniae*, es el agente responsable de la pleuroneumonía contagiosa caprina, una enfermedad caracterizada por cuadros respiratorios graves y elevada mortalidad, siendo uno de los agentes de mayor impacto en el ganado caprino de África y algunas zonas de Asia (McMartin y cols., 1980;

Nicholas y Churchward, 2012). Por otra parte, *M. agalactiae*, *M. mycoides subsp. capri* (anteriormente definido como *M. mycoides subsp. mycoides*, variante LC), *M. capricolum subsp. capricolum* y *M. putrefaciens* ocasionan procesos de mastitis, artritis, y queratoconjuntivitis y participan en el síndrome de Agalaxia Contagiosa que pueden afectar a cabras y ovejas y es endémico en el área mediterránea (Bergonier y cols., 1997; Bergonier y Berthelot, 2008).

En el ganado porcino, *M. hyopneumoniae* actúa como patógeno primario como agente de la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP). Esta enfermedad de distribución mundial, supone un gran impacto económico en la producción porcina por su efecto directo (Kobisch y Friis, 1996; Thacker, 2006; Maes y cols., 2008) y por asociación con otros agentes bacterianos (Veenhuizen, 1998) y víricos (virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, Thacker, 2001; virus Influenza porcino, Thacker y cols., 2001; Circovirus porcino, Kim y cols., 2003) en el denominado “Complejo Respiratorio Porcino”. Otras especies del Género *Mycoplasma*, como *M. hyosynoviae* y *M. hyorhinis* pueden generar cuadros de artritis y poliserositis, especialmente en animales jóvenes (Kobisch y Marois, 2008).

Así mismo, *M. suis*, que pertenece al grupo de los micoplasmas hemotrópicos (actualmente incultivable), ha demostrado ser un patógeno de suidos domésticos (Hoelzle y cols., 2007) y salvajes (Hoelzle y cols., 2010), y es responsable de un grave cuadro de anemia en estos animales (Groebel y cols., 2009).

Por otra parte, los micoplasmas fueron identificados por primera vez como posibles contaminantes de las líneas celulares eucariotas por Robinson y cols., en 1956. La contaminación de las líneas celulares supone un problema de gran relevancia en la industria biotecnológica (Armstrong y cols., 2010), debido a que la presencia de los micoplasmas puede alterar la fisiología y metabolismo celular, modificar las condiciones del medio en que se cultivan las células y/o agotar alguno de los nutrientes del mismo, así como generar alteraciones cromosómicas y retrasar la replicación del cultivo. Ello se traduce en fracasos experimentales y/o falseo de resultados, así como en la erradicación de algunas líneas celulares.

Actualmente, los micoplasmas pueden considerarse como uno de los contaminantes más comunes y relevantes de las líneas celulares eucariotas (Drexler y Uphoff, 2002), afectando a un 15%-35% de las líneas celulares bien establecidas (Uphoff y Drexler, 2002b). Aunque numerosas especies del Género *Mycoplasma* y otros representantes de la Clase *Mollicutes* (tales como *Acholeplasma laidlawii*), han sido aisladas desde líneas celulares contaminadas, se considera que la gran mayoría de las contaminaciones por micoplasmas son debidas a *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. orale* y *M. hyorhinis*, y en menor grado a *M. pirum* y *M. salivarium* (Uphoff y Drexler, 2002a).

El control y erradicación de los micoplasmas de los cultivos de líneas celulares se consideró poco factible (Del Giudice y Gardella., 1996). En consecuencia, numerosos investigadores han dedicado sus esfuerzos al desarrollo de técnicas de identificación diagnóstica basadas en PCR, para microorganismos de la Clase *Mollicutes* o del Género *Mycoplasma*, (Van Kuppeveld y cols., 1994; Kong y cols., 2001; Sung y cols., 2006). Sin embargo, los últimos estudios aportan un mayor éxito en la completa eliminación mediante protocolos de tratamiento a base de fluorquinolonas, macrólidos y tetraciclinas (Uphoff y Drexler., 2011).

Finalmente, cabe destacar que a medida que otras especies hospedadoras de ámbito no doméstico (con independencia de la aparición de signos clínicos) son muestreadas, nuevas especies podrían contribuir a engrosar el Género *Mycoplasma*. (**Figura I.2**)



Figura I.2.- Colonias de 3 diferentes *Mycoplasma spp.*, aislados de gaviotas de Kelp (*Larus dominicanus vetula*). Muestras remitidas desde Western Cape y Port Elizabeth (Sudáfrica), actualmente en proceso de caracterización (Poveda y cols., 2008)

I.3.- MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente causal de la Neumonía Enzoótica Porcina, una enfermedad crónica respiratoria, altamente contagiosa en el ganado porcino (Ross, 1992).

Las células de *M. hyopneumoniae* son esféricas u ovaladas, inmóviles y con un diámetro que puede oscilar entre 400 y 1200 nm. Su membrana externa presenta 10 nm de espesor, y en tinciones de rojo rutenio se muestra una cápsula externa de 20 nm de espesor (Tajima y Yagihasi, 1982). El interior citoplasmático contiene material nuclear fibrilar y ribosomas y pueden observarse membranas intracitoplasmáticas al corte (Hovind-Hougen y Friis, 1991).

I.3.1- CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

El genoma completo de esta especie del Género *Mycoplasma* ha sido secuenciado hasta la fecha para 4 cepas distintas (cepa 232 por Minion y cols., 2004; cepa J y cepa 7448 por Vasconcelos y cols., 2005; cepa 168 por Liu y cols., 2011), mostrando variaciones genómicas entre las mismas, tal y como apuntaban estudios previos realizados con enzimas de restricción para demostrar la heterogeneidad cromosómica de *M. hyopneumoniae* (Frey y cols., 1992) así como las deleciones de estructuras génicas codificantes de las proteínas ABC de transporte PR1 y PR2 en algunas de las cepas altamente adaptadas a los medios de cultivo artificiales (Blanchard y cols., 1996).

El tamaño genómico oscila entre 892 y 925 kpb, con un contenido Guanina-Citosina del 28% al 28,6 %. El número de genes codificantes de proteínas que puede ser predicho, varía entre 679 y 695, mientras que el porcentaje medio de codificación puede oscilar entre el 80,6% y el 91%. Todas las cepas de *M. hyopneumoniae* poseen 30 genes ARNt, y un único operón ADNr 16S-23S, mientras que en contraste con otras especies, el

operón ADNr 5S se encuentra separado del 16S-23S. Los genes para la proteína de adhesión P97 (Zhang y cols., 1995) y para la proteína con capacidad de unión al plasminógeno P102 (Seymour y cols., 2012), se codifican asociadas en un operón, y ambos pueden presentar múltiples genes parálogos (Minion y cols., 2004).

Así mismo, a diferencia de otras especies del Género *Mycoplasma*, *M. hyopneumoniae* contiene relativamente pocos genes con secuencias reiterativas de repetición en tándem (SSRs). Sin embargo, las SSRs aparecen en número variable en genes asociados a las proteínas relacionadas con los procesos de adherencia al epitelio ciliar del hospedador, y se consideran relacionadas con el potencial de este micoplasma para variar su estructura antigénica tanto de las propias adhesinas, como de otras proteínas con función inmunomoduladora, diseñadas como señuelo para evadir una respuesta humoral efectiva por parte del hospedador (Wilton y cols., 1998).

Los genes ARNr 16S y 23S se encuentran flanqueados por reiteraciones Adenina/Timina en ambos extremos, pero la mayor parte de las SSRs en *M. hyopneumoniae* aparecen como largas reiteraciones Adenina/Timina situadas en Regiones Intergénicas, actuando como reguladores de inicio o de terminación de la transcripción, mientras que reiteraciones largas de trinucleótidos son más frecuentes en los genes (Mrázek, 2006).

La expresión génica puede variar para una misma cepa, en función de su mantenimiento *in vitro* o *in vivo*. Al menos 79 genes son susceptibles de sufrir cambios en su expresión. Aunque 41 de estos genes codifican “proteínas hipotéticas” (proteínas no caracterizadas, pero predichas en base al genoma), los cambios más significativos se producen en la expresión variable de algunas lipoproteínas, mayor expresión *in vivo* de proteínas de transporte, como translocasas y permeasas y mayor expresión *in vitro* de Factor de Elongación, ARN β Polimerasa, Adenilato Quinasa, y Prolina y Cisteína ARNt sintetasas (Madsen y cols., 2007). Estos resultados parecen reflejar que la expresión de las lipoproteínas depende de la interacción con el hospedador, y que dicha interacción fomenta la expresión de mecanismos de intercambio activo, mientras que el cultivo artificial genera

una sobreexpresión de las proteínas necesarias para la replicación, conversión del ATP y síntesis de proteínas.

La variabilidad genética de las cepas de campo de *M. hyopneumoniae* ha sido demostrada mediante análisis de la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y análisis multi-locus de repeticiones en tándem de número variable (VNTR), encontrando diferencias entre aislamientos producidos en animales de una misma piara, o incluso entre diferentes aislamientos realizados sobre un mismo individuo (Nathues y cols., 2011).

I.3.2- CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS Y CULTURALES

M. hyopneumoniae realiza metabolismo glicolítico (Jensen y cols., 1978), pero no posee la maquinaria enzimática para los ciclos del citrato (destinado a la síntesis de ácidos grasos y colesterol) y glyoxilato (para generar glucosa a partir de ácidos grasos), ni puede realizar las rutas gluconeogénicas ni de la pentosa fosfato. La síntesis de ATP se produce mediante fermentación láctica, o bien mediante la ruta glicolítica. Así mismo, es incapaz de sintetizar purina y pirimidina *de novo*, presentando en su lugar, enzimas de mecanismos de recuperación (Arraes y cols., 2007).

Debido a los altos requerimientos nutricionales de *M. hyopneumoniae*, así como al tiempo necesario para su adaptación a los medios artificiales, y a la presencia habitual de otros micoplasmas y bacterias en el tracto respiratorio y parénquima pulmonar de los animales infectados, este micoplasma es considerado como uno de los microorganismos más más tediosos y difíciles de aislar (Friis, 1971a; Goodwin, 1976; Friis, 1979; Kobisch y Friis, 1996; Brown y cols., 2010a). El cultivo de este micoplasma presenta acusadas exigencias en cuanto a la composición del medio empleado (Friis, 1971b, Friis 1975a) que debe ser elaborado siguiendo estrictas consideraciones en lo relativo a su calidad y pureza, así como, pH, humedad, y temperatura. Así mismo, debe aportar nutrientes indispensables para fomentar su crecimiento, tales como el colesterol de los sueros animales, aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos (Ross y Whittlestone, 1983).

Para el cultivo de *M. hyopneumoniae*, comúnmente se emplean variantes de los medios FF descritos por Friis (1971b) modificados posteriormente por Ross y Whittlestone (1983). Otros medios han demostrado ser eficaces en el cultivo de este micoplasma, tales como el medio A26 modificado (Goodwin, 1976), el medio modificado de Zwitzer (Cheng-lee y cols., 1982), el “Eagle Minimal Essential Medium” (Zielinsky y Ross, 1990) y el medio Sp4 II (Ramírez, 1999).

En el medio de cultivo líquido, el metabolismo nutricional de *M. hyopneumoniae* genera acidificación del mismo, reduciendo el valor inicial de pH (7,4). Por ello es frecuente la adición de Rojo-Fenol en los medios de cultivo, haciendo perceptible el crecimiento del microorganismo mediante un progresivo cambio de color, desde el rojo-rosa original del medio, hacia un color naranja-amarillo. La agitación circular, y especialmente la rotación circular continua, fomenta el crecimiento. En el medio sólido, las colonias carecen de la estructura clásica de otros *Mollicutes* (formas de “huevo frito”), mostrando una estructura irregular y asimétrica, sin un centro definido, y en ocasiones, de aspecto granuloso (Assunção, 2003).

Asumiendo una temperatura óptima de 37-38°C, las cepas adaptadas tras numerosos pases *in vitro* presentan un tiempo de generación de 10 horas aproximadamente (Stemke y Robertson, 1990). Sin embargo el cultivo primario tiene un bajo porcentaje de éxito, y depende en gran medida de las condiciones del medio empleado y de la atmósfera, temperatura y agitación a que sea sometido el cultivo tras el aislamiento. Además, el tiempo requerido para la correcta replicación y estabilidad del cultivo puede prolongarse entre 4 y 30 días, motivo por el que a nivel de diagnóstico, se recurre con frecuencia a las técnicas de biología molecular.

I.3.3- PATOGENICIDAD Y FACTORES DE VIRULENCIA

M. hyopneumoniae se adhiere a los cilios del epitelio respiratorio de las células del hospedador (Zhang y cols., 1995), originando progresivamente cilioestasis, pérdida de los

cilios y muerte de la célula epitelial. La primera barrera de protección del epitelio, el mucus, puede ser atravesada gracias a la unión de algunas proteínas de *M. hyopneumoniae* con glicosaminoglicanos, tales como la heparina (Jenkins y cols., 2006; Wilton y cols., 2009), ó con glicoproteínas plasmáticas del hospedador, como el fibrinógeno (Deutscher y cols., 2010), con el fin de facilitar la interacción con los elementos de la matriz extracelular.

Una vez superado el mucus, la adhesión se produce en dos fases diferenciadas. En primer lugar, la cápsula externa que rodea la membrana, que es de naturaleza hidrofóbica (Tajima y Yagihashi, 1982; Hovind-Hougen y Friis, 1991) permite la actuación de fuerzas hidrofóbicas no específicas de largo alcance, propiciando el contacto del agente con las células del hospedador (Zielinski y Ross, 1992). En segundo lugar, se producen reestructuraciones moleculares en los sitios de interacción de las células eucariotas, que son reconocidas por las adhesinas del agente, originando uniones fuertes de tipo ligando-receptor, anclando a *M. hyopneumoniae* a la célula hospedadora (Calus, 2009). Los glicolípidos sulfatados La, Lb y Lc descritos por Zhang y cols., (1994) actúan como los receptores primarios para la adhesión.

M. hyopneumoniae presenta diversos factores de virulencia, responsables de su capacidad para evadir el sistema inmune, o de generar daño sobre el hospedador. En general, los factores de virulencia pueden ser definidos en cinco categorías, (Henderson y cols., 1996):

- Adhesinas: diseñadas para posibilitar la unión con las células del hospedador.
- Modulinas: desencadenantes de una cascada de citoquinas por parte del hospedador, con consecuencias patológicas celulares.
- Impedinas: cuya función consiste en alterar el normal funcionamiento del sistema inmune, generando una respuesta ineficaz por parte del hospedador.
- Agresinas: componentes capaces de dañar directamente las células del hospedador o facilitar la diseminación del agente.
- Invasinas: destinadas a facilitar la entrada del patógeno en las células hospedadoras.

La principal adhesina de *M. hyopneumoniae* es la proteína P97, caracterizada por Zhang y cols., (1995). El gen que codifica esta proteína (Mhp 183), contiene 2 regiones repetitivas (R1 y R2). La región R1 codifica 5 aminoácidos (Ala/Thr, Lys, Pro, Glu/Val, Ala/Thr) con hasta 15 repeticiones de los mismos. La región R2 codifica 10 aminoácidos (Gly, Ala/Glu/Ser, Pro, Asn/Ser, Glu, Gly, Lys, Lys, Ala) con al menos 3 repeticiones (Hsu y cols., 1997, Wilton y cols., 1998). Sin embargo, el número de repeticiones varía de una cepa a otra, y puede influir en la capacidad adherente, la cual depende de los aminoácidos codificados en la región R1 (Hsu y Minion, 1998a). Aparentemente, para lograr la adherencia, son necesarias al menos 8 repeticiones de las secuencias R1 (Minion y cols., 2000). La traducción del gen para la P97, genera un producto de 124,9 kDa, que se escinde en el aminoácido 195 del extremo N-terminal, liberando un pequeño fragmento de 22 kDa, mientras que el resto de la proteína sufre posteriormente escisiones parciales, en múltiples sitios y con frecuencia variable para diferentes cepas (Djordjevic y cols., 2004). Además de la adherencia ciliar, al menos dos lugares de unión a la heparina fueron identificados por Jenkins y cols., (2006) en la P97.

Otra adhesina importante, la proteína P102, se codifica en un operón junto a la P97 (Hsu y Minion, 1998b; Minion y cols., 2004). El gen que codifica esta proteína (Mhp 182), genera un producto que es escindido en dos fragmentos (Djordjevic y cols., 2004), y se expresa durante el curso de la infección *in vivo* (Adams y cols., 2005). Los fragmentos generados, de 42 kDa y 60 kDa y son capaces de unirse al plasminógeno del hospedador, el cual es activado por el activador tisular del plasminógeno, lo que permite la degradación del fibrinógeno (Seymour y cols., 2012).

La glicoproteína con actividad adhesina de 110 kDa descrita por Chen y cols., (1998), parece corresponder con uno de los tres fragmentos en que la proteína P159 (Mhp 494) es escindida, junto a otros dos fragmentos de 27 kDa y 52 kDa. Esta adhesina presenta al menos dos sitios de unión a heparina, actuando de manera dosis-dependiente. La adhesión de *M. hyopneumoniae* en el cultivo celular de epitelio renal PK15 parece depender de la P159, y esta adhesión puede ser inhibida al incrementar la concentración de heparina. (Burnett y cols., 2006).

La proteína P216 es codificada por un gen (Mhp 493), que es parálogo de la P97. Este gen (Mhp 493), se localiza a 129 nucleótidos del gen que codifica la P159 (Mhp 494), y ambas proteínas parecen presentar funciones relacionadas (Adams y cols. 2005). La P216 es escindida en sendos productos de 120 kDa y 85 kDa, ambos localizados en la superficie celular, y con capacidad de adhesión ciliar y a la heparina (Wilton y cols., 2009).

La proteína P116, codificada por el gen Mhp 108, presenta capacidad de adhesión a la fibronectina y al plasminógeno a través de su dominio C-terminal, y es una de las adhesinas responsables de la unión de *M. hyopneumoniae* en los cultivos celulares de origen renal PK15 (Seymour y cols., 2010). Otro de los genes parálogos de la P97, el gen Mhp107, codifica una proteína de 120 kDa con capacidad de unión a la fibronectina y el plasminógeno (Seymour y cols., 2011).

Los genes Mhp 385 y Mhp384 se comportan respectivamente como parálogos de los genes que codifican las proteínas P97 y P102. Ambos presentan capacidad de adhesión ciliar y a la heparina, a través de escisiones de la preproteína que codifican, de 50 kDa y 60kDa para la Mhp 385, y de 88 kDa para la Mhp 384 (Deustscher y cols., 2012).

Así mismo, los genes Mhp 684 y Mhp 683 son parálogos de P97 y P102 respectivamente. En este caso, el gen Mhp 684 codifica la proteína P146, compuesta por tres fragmentos identificados en la superficie celular, de 85 kDa, 50 kDa, y 40 kDa, con capacidad de adhesión a los cilios y heparina, aunque ligeras alteraciones terminales permitirían la unión del plasminógeno. La P146 sufre posteriormente múltiples y variables procesos proteolíticos, derivando en hasta nueve fragmentos menores que redefinen la topografía de superficie (Bogema y cols, 2012). El gen Mhp 683 codifica la proteína P135, compuesta por tres fragmentos de 45 kDa, 48 kDa y 50 kDa, todos ellos con capacidad de adhesión a los cilios y a los glucosaminoglicanos (Bogema y cols., 2011).

El gen Mhp 271, es otro gen parálogo de la P97, aparentemente con función de adhesina. Curiosamente, este gen contiene 2 copias de las regiones R1, separadas por una región R2, las cuales son traducidas en dos copias de decapeptidos seguidas por seis copias de pentapeptidos. Deustscher y cols., (2010), determinaron a través de proteínas

recombinantes, que la proteína codificada por este gen (Mhp 271), presenta capacidad adherente sobre los cilios epiteliales, así como adhesión a la heparina y fibronectina, y sugieren que en ausencia de las 8 copias mínimas necesarias de la región R1 para lograr la adherencia ciliar, la existencia de un dominio cercano codificado por una región R2 podría asistir a los procesos de adherencia.

La infección que causa *M. hyopneumoniae* genera una respuesta intensa por parte del sistema inmune del hospedador, pero dicha respuesta es a menudo ineficaz y conduce al desarrollo de una inflamación de tipo crónico, de la que es responsable en mayor medida la propia respuesta inmune del hospedador (Thacker, 2006).

Dicha respuesta deriva en un incremento en la producción de factores proinflamatorios y antiinflamatorios, así como mediadores de la inmunoregulación. Tras la infección, se produce un aumento de prostaglandina E₂ (PGE₂), Interleuquinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18), Factor de necrosis tumoral (TNF- α) e Interferón gamma (IFN- γ) en tejidos alveolares y tejido linfoide asociado a bronquios y alvéolos (Thanawongnuwech y Thacker, 2003; Thanawongnuwech y cols., 2004, Muneta y cols., 2006; Muneta y cols., 2008). Los diseños experimentales realizados sobre líneas celulares de macrófagos de origen murino, expuestas a la acción de *M. hyopneumoniae*, confirman la implicación de las rutas de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), relacionadas con la regulación al alza de citoquinas proinflamatorias, y la producción de óxido nítrico (Hwang y cols., 2011).

En otras especies del Género *Mycoplasma*, las lipoproteínas de membrana han demostrado funcionar como modulinas (Rottem, 2003), y en el caso de *M. hyopneumoniae*, estas interactúan con los receptores tipo toll (TLR), concretamente TLR-2 y TLR-6 (Muneta y cols., 2003). Algunas de las lipoproteínas caracterizadas hasta la fecha en *M. hyopneumoniae*, tales como las codificadas por los genes Mhp 378 y Mhp 651 (Meens y cols., 2006), y Mhp 366 (Meens y cols., 2010), podrían cumplir esta función.

Por otra parte, la larga permanencia de *M. hyopneumoniae* en los animales infectados, demuestra que existen procesos diseñados para evadir la respuesta inmune específica, así como mecanismos para minimizar el daño ocasionado por procesos inespecíficos generados por los tejidos del hospedador. En este sentido, múltiples proteínas de este microorganismo pueden ser catalogadas como impedinas (Calus, 2009).

En primer lugar, la presencia de numerosas proteínas con capacidad adhesina, susceptibles de ser escindidas en fragmentos peptídicos que mantienen capacidad adherente (Djordjevic y cols., 2004), contribuye a prevenir la completa eliminación en presencia de una respuesta inmune específica (Hsu y Minion, 1998b).

Además, al menos la mitad de los genes parálogos de la P97/P102 contienen secuencias simples de repetición en tándem (SSRs), tal y como ocurre con otros 6 genes que codifican proteínas de membrana, (Vasconcelos y cols., 2005), lo cual se traduce en proteínas con repeticiones cíclicas de aminoácidos, que pueden expresar un tamaño variable por la presión de selección que ocurre *in vivo*, derivando en la aparición de nuevas cepas (Vranckx y cols., 2011), y posiblemente eludiendo así la respuesta específica del hospedador. Así mismo, la presencia de cadenas largas de mononucleótidos poli-A o poli-T en el genoma, podrían desempeñar funciones de variación de fase (On/Off), activando o inhibiendo la expresión de algunos genes relacionados con proteínas de membrana, o determinando señales prematuras de terminación, contribuyendo a alterar la arquitectura externa de *M. hyopneumoniae* (Mrázek, 2006).

En segundo lugar, otras impedinas podrían desempeñar funciones directas de protección. La lipoproteína P65 (Mhp 677), es una enzima lipolítica, con actividad lipasa y esterasa, destinada a reducir la eficacia de los surfactantes pulmonares durante la infección (Schmidt y cols., 2004). La proteína codificada por el gen Mhp 283, parece actuar como una peroxiredoxina, diseñada para reducir el estrés oxidativo (Machado y cols., 2009).

Así mismo, la respuesta al shock térmico entre 37°C y 42°C ha sido investigada mediante microarrays, identificando al menos 91 genes con cambios significativos en su expresión, aunque 54 de los mismos permanecen sin caracterización funcional. Entre los

genes expresados al alza destacan dnaK (Mhp 072) identificada como proteína con función chaperona, así como parC (Mhp 034), dnaJ (Mhp 073), and clpB (Mhp 278), destinadas a intervenir en el plegamiento inicial de nuevas proteínas, degradar proteínas incorrectamente desplegadas, y participar en actividades de división celular asociadas con la estructura del ADN, y el gen ffh que codifica un péptido de 54 kDa, cuya función es aumentar la translocación de proteínas para estabilizar la membrana externa o bien para mantener la integridad de las proteínas de membrana (Madsen y cols., 2006a).

De manera similar, el estudio por microarrays sobre la depleción de hierro en cultivos *in vitro*, mostró 27 genes con diferencias significativas en su expresión. Los 18 genes expresados a la baja parecen relacionados con funciones de crecimiento celular y traducción proteínica. De los 9 genes regulados al alza, mglA and potB se relacionan con procesos de transporte, y los genes iolCB, iolC, glpQ y ackA con funciones metabólicas (Madsen y cols., 2006b).

En contraste, relativamente pocas agresinas han sido identificadas y caracterizadas en *M. hyopneumoniae*. La producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un recurso a menudo utilizado por otras especies del Género *Mycoplasma* (Pilo y cols., 2007), consecuentemente activando NF-κB e incrementando la producción de citoquinas proinflamatorias.

Dado que *M. hyopneumoniae* carece de la capacidad para sintetizar los precursores de los ácidos nucleicos (Minion y cols., 2004) el empleo de nucleasas resulta indispensable para liberar nucleótidos del hospedador. La lipoproteína de 33 kDa que codifica el gen Mhp 379 parece cumplir esta función, y su acción es dependiente de Ca²⁺ (Schmidt y cols., 2007). Por otra parte, al menos 12 genes codificantes de proteasas pueden ser deducidos en base a la secuenciación completa del genoma (Minion y cols., 2004; Vasconcelos y cols., 2005), de los cuales, al menos 5, Map, PepA, PepF, PepP y Gcp, presentan una estructura afín a las aminopeptidasas, mientras que los genes Mhp 287 y Mhp 292 codifican estructuras proteínicas con actividad serín proteasa (Ferreira y de Castro, 2007).

Finalmente, es difícil discernir si algunas de las proteínas de *M. hyopneumoniae* pueden ser catalogadas como invasinas, dado que no ha sido demostrada su penetración como patógeno intracelular. Sin embargo, el papel de las proteínas con capacidad de unión a la heparina y otros polisacáridos sulfatados incrementa la colonización e invasión de otras bacterias, tales como *Streptococcus pyogenes* y *Neisseria gonorrhoeae* (Duensing y cols., 1999). Por tanto, algunas de las adhesinas tales como P102, P159, y las proteínas codificadas por los genes Mhp 385 y Mhp 384 podrían ser clasificadas como tales.

I.3.4- EPIDEMIOLOGÍA

Mycoplasma hyopneumoniae se considera un agente de distribución mundial, prácticamente ubicuo en todas las explotaciones porcinas, afectando clínica y subclínicamente a los animales de la explotación, aunque la incidencia de lesiones típicas en pulmones observados en matadero oscila entre el 30% y el 80% de los animales sacrificados (Ross, 1999).

La presencia del agente patógeno en la piara conlleva ciclos de infección coincidentes con la disminución de los anticuerpos maternos de los lechones, que paulatinamente muestran seroconversión frente a *M. hyopneumoniae* hacia el final de estancia en lechoneras y entrada a pre-cebo (Calsamiglia y cols., 1999). Aparentemente, un bajo porcentaje (del 0,5% hasta el 3,8%) de los lechones de entre 1 a 3 semanas pueden ser diagnosticados como portadores mediante técnicas de PCR anidada en muestras nasales (Sibila y cols., 2007 a y b) y hasta el 12,3% en lavados traqueobronquiales (Moorkamp y cols., 2009). No obstante, a través del ciclo productivo, la incidencia de *M. hyopneumoniae* aumenta entre los animales destetados, identificando como positivos entre el 10% y 60% mediante PCR anidada de torundas nasales (Calsamiglia y cols., 1999), y una seroconversión del 3% al 51% (Sibila y cols., 2008).

Tras el ciclo de engorde, la seroconversión de los animales que llegan al matadero puede variar del 0% al 100% (Maes y cols., 1998) en función de múltiples factores, tales

como la aplicación de vacunación, densidad e intensidad de la producción, separación efectiva por edades, o aplicación de sistema todo-dentro/todo-fuera. En general, un alto porcentaje de los animales que completan el ciclo hasta matadero, muestra seroconversión positiva (79% al 86%, Sibila y cols., 2007b). En desafíos realizados mediante lechones inoculados vía intratraqueal y lechones no inoculados pero expuestos a los animales desafiados (Fano y cols., 2005), el porcentaje de seroconversión al sacrificio fue incluso mayor (77% al 100%).

Entre las madres reproductoras, la seroconversión frente a *M. hyopneumoniae* puede alcanzar valores de hasta el 65% de los animales (grosse Beilage y cols., 2009). A pesar de que la transmisión intrauterina o vía lactogénica no ha sido demostrada (Sibila y cols., 2007a), las reproductoras juegan un papel importante en la transmisión temprana del agente (Thacker, 2006), y posiblemente en el mantenimiento del patógeno en la explotación (grosse Beilage y cols., 2009).

Las dos fuentes principales de transmisión en las piaras indemnes, son la introducción de animales infectados y la exposición al agente por vía aérea desde otras explotaciones cercanas (Ross, 1999). La transmisión de *M. hyopneumoniae* puede producirse de manera vertical (de las reproductoras a los lechones) o de manera horizontal por exposición directa o indirecta con otros animales infectados (Thacker, 2006; Villareal, 2010). El contagio por contacto directo se produce mediante interacciones “nariz-con-nariz” al contactar las secreciones nasales del animal infectado con otro sano, o bien a través de pequeñas gotas expelidas mediante toses, que vehiculan el agente, facilitando su llegada hasta las vías respiratorias altas de los animales sanos (Goodwin, 1985; Stärk y cols., 1998).

La transmisión mecánica por vía aérea de *M. hyopneumoniae* entre módulos de alojamiento, puede ser contenida mediante filtración del aire, tal y como reseñan Dee y cols., (2009a), en un estudio longitudinal de tres años en el que repetidamente, una sala carente de filtrado de aire, situada a más de 120 metros de la fuente de infección, permitía el contagio por aerosol, mientras que los módulos cercanos dotados de filtros de aire

impedían la transmisión del agente. La eficacia de los filtros parece ser satisfactoria tanto en filtros mecánicos, antimicrobianos y electrostáticos (Dee y cols., 2011).

La distancia a la que *M. hyopneumoniae* puede desplazarse transportado vía aerógena, puede verse influida por la orografía y las rutas aéreas naturales (Goodwin, 1985). En un seguimiento de 37 explotaciones pobladas con reproductoras seronegativas realizado en el año 2002 por Desrosiers, al menos 18 explotaciones sufrieron brotes eventualmente, todas ellas situadas a menos de 1,5 km de la sucesiva fuente de contagio, mientras que las granjas situadas a más de 2 km permanecieron indemnes. Posteriormente, Dee y cols., (2009b), demostraron que podían identificarse como positivas, muestras de aire situadas a 4,7 km de la explotación, en presencia de vientos dominantes. Por otra parte, Otake y cols., (2010), incrementaron esta distancia hasta 9,2 km desde la fuente de origen.

La supervivencia y efectividad del agente en el medio externo también podría verse influenciada por condiciones de frío y humedad. En este sentido, Segalés y cols. (2011), sugieren que el ratio de animales positivos detectados por PCR de torundas nasales, se correlaciona positivamente con las épocas de mayores precipitaciones, y que el porcentaje de animales positivos a la seroconversión se correlaciona positivamente con las épocas de menor temperatura, concluyendo que los animales nacidos en otoño, que comienzan el engorde en invierno y se sacrifican en primavera, son los más propensos a la infección y a la posterior seroconversión.

Los factores de riesgo más importantes dependen de las características intrínsecas de la pira, prácticas de manejo y condiciones de alojamiento, medidas de bioseguridad, y efectos estacionales (Villareal, 2010). El tamaño y tipo del hato influyen en la presentación de la enfermedad, existiendo una relación positiva entre el número de animales y la incidencia de la enfermedad (Goodwin, 1985; Villareal, 2010). Las explotaciones de crecimiento y engorde, parecen más susceptibles que aquellas con reproductoras, debido a la continua llegada de animales desde diferentes granjas de reproducción (Stärk, 2000). Entre los factores de riesgo asociados al manejo, una gran tasa de reemplazo de animales, alta densidad de los mismos y prácticas de flujo continuo, influyen en la presentación

clínica de la enfermedad, mientras que procedimientos “todo-dentro/todo-fuera” y condiciones de vacío y limpieza sobre los módulos de alojamiento, reducen la presentación y gravedad de las manifestaciones clínicas (Sibila y cols., 2004).

Por otra parte, el papel que desempeñan los suidos salvajes y los cerdos domésticos asilvestrados como posibles reservorios de la enfermedad continúa siendo investigado. Vengust y cols., (2006), demostraron la presencia de anticuerpos por ELISA en el 21% de los jabalíes muestreados en su estudio. Así mismo, Marois y cols., (2006), detectaron al agente mediante PCR y constataron que un 58% de las muestras analizadas por ELISA resultaron positivas. Ecco y cols., (2009), revelaron mediante técnicas de inmunohistoquímica la presencia de *M. hyopneumoniae* en la superficie epitelial de bronquios y bronquiolos en jabalíes de granja afectados por un brote de neumonía.

Estas evidencias apuntan a que los jabalíes (*Sus scrofa*) son susceptibles a la infección por *M. hyopneumoniae*. Sin embargo, el curso de la enfermedad parece ser subclínico, y la presencia de lesiones típicas de Neumonía Enzoótica parece limitarse a aquellas de naturaleza microscópica (Sibila y cols., 2010). El genotipado de las cepas identificadas en jabalíes, muestra cierta relación con las cepas de *M. hyopneumoniae* procedentes de cerdos domésticos, sin que haya sido encontrada una coincidencia plena entre ambos tipos. Así mismo, la diversidad genética entre las cepas genotipadas en jabalíes es elevada, aunque la misma cepa puede ser identificada en animales localizados en áreas geográficas cercanas (Kuhnert y cols., 2011).

Finalmente, queda por determinar el posible impacto epidemiológico de los propios ganaderos y personal de granja, como vectores mecánicos de *M. hyopneumoniae*. En un reciente estudio realizado sobre trabajadores de granja, (Nathues y cols., 2012), todos ellos expuestos por contacto directo con los animales de sus respectivas explotaciones en las 24 horas previas a la toma de muestras, un 14,8% (16 de 108) de los mismos resultaron positivos mediante q-PCR específica frente a *M. hyopneumoniae* en torundas de mucosa nasal. Los trabajadores que cuidan un mayor número de animales fueron más propensos a la identificación positiva, y se determinó que el mayor factor de riesgo para dicha identificación fue la exposición a poblaciones de lechones infectados.

I.3.5- SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES.

La sintomatología clínica de la NEP puede variar entre los individuos infectados, en función de su edad, estado reproductivo, y la aplicación de medidas de control y profilaxis, mientras que la gravedad de la misma, puede verse incrementada por el estrés del ambiente de producción y por la presencia de otros agentes infecciosos que magnifican de manera directa los síntomas y lesiones, tales como *Pasteurella multocida* (Ciprián y cols., 1994).

Otros agentes patógenos pueden interaccionar de manera indirecta en calidad de patógenos secundarios frecuentemente asociados con *M. hyopneumoniae*, tales como el virus del PRRS (Thacker, 2001), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, estreptococos de tipo Alfa-hemolíticos (Palzer y cols., 2008), y *Circovirus porcino* tipo 2 (Opriessing y cols., 2007). Generalmente, la presencia de patógenos concomitantes desencadena una aparición más temprana de los signos clínicos, y lesiones neumónicas más severas. Desde una perspectiva biológica, todos estos patógenos contribuyen al incremento del estrés inmunológico en los animales, y adicionalmente, pueden enmascarar la sintomatología clínica propia de la NEP. Sin embargo, estudios experimentales recientes, descartan la posible exacerbación de los signos clínicos y lesiones en la interacción de *M. hyopneumoniae* y *Circovirus porcino* tipo 2, (Sibila y cols., 2012).

En ausencia de otros agentes, la NEP cursa con alta morbilidad y baja mortalidad, y la apreciación de todos los signos clínicos no siempre es posible a nivel individual, por lo que la sintomatología ha de ser valorada a través de la observación de grupos de animales. En general, los signos clínicos más notorios son la presencia de tos e hipertermia, respiración con soplo, inapetencia y/o anorexia, mientras que las cojeras y artritis son menos frecuentes (Kobisch y Friis, 1996; Kobisch y Marois, 2008).

En los animales adultos, especialmente entre aquellos expuestos anteriormente a la enfermedad y animales inmunizados, algunos individuos pueden cursar la NEP de modo inaparente ó tan sólo con una moderada hipertermia (Sibila y cols., 2009). En animales

jóvenes, es frecuente observar retraso en el crecimiento de individuos o de algunos lotes, debido a la menor ingesta y al aumento del índice de conversión (Jensen y cols., 2002), especialmente durante la fase más acusada de toses en los lechones (Clark y cols., 1993).

Las lesiones pulmonares macroscópicas (**Figura I.3**) se visualizan como áreas neumónicas, edematosas y “carnificadas” en fases más agudas, o bien como alveolos colapsados en áreas adyacentes con enfisema alveolar, en procesos crónicos y cicatriciales. Los linfonódulos bronquiales y mediastínicos pueden aparecer inflamados, y ocasionalmente existen lesiones pericárdicas y articulares de componente fibrinoso (Kobisch y Friis, 1996; Jensen y cols., 1995).

A nivel microscópico se produce la pérdida de cilios y exfoliación de células ciliadas, e hiperplasia de células caliciformes y glándulas submucosas. El cuadro lesional genera una bronconeumonía catarral, edema alveolar e infiltrado de macrófagos y neutrófilo, siendo estos últimos sustituidos por linfocitos. Posteriormente, se produce el acúmulo de células mononucleares en los septos alveolares, y el cuadro deriva hacia una bronconeumonía intersticial con hiperplasia perivascular y peribronquial del tejido linfoide asociado a los bronquiolos (Paz-Sánchez, 2011).

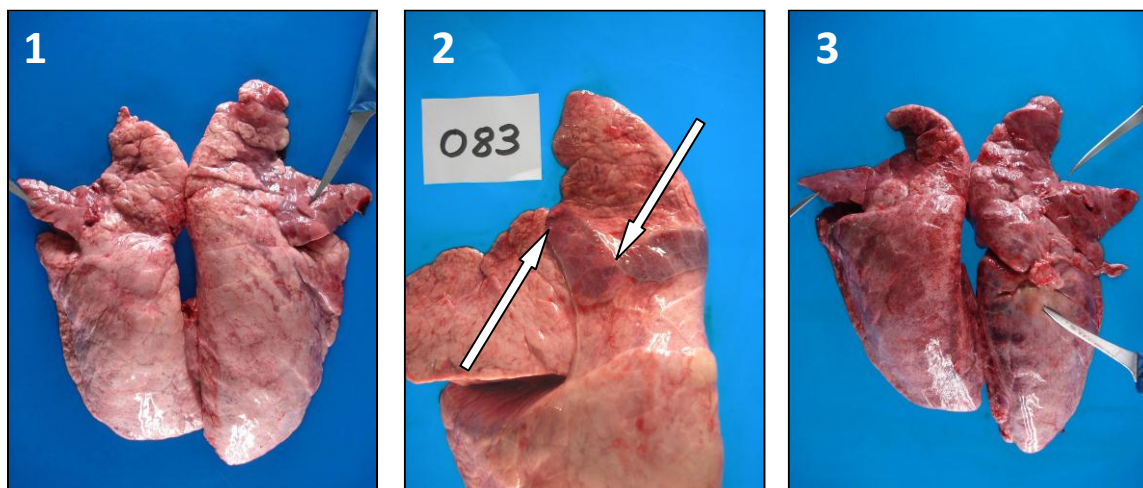


Figura I.3.- Lesiones de NEP en pulmones de animales sacrificados a los 6 meses de vida. (1): lesiones típicas en ambos lóbulos mediales; (2): Lesión “en secuestro” en los límites del lóbulo craneal y medial; (3): Lesiones de NEP junto a lesiones secundarias y pleuritis.

I.3.6- ANTIBIOTERAPIA.

En general se considera que los antibióticos más eficaces en el tratamiento de las infecciones por micoplasmas son las tetraciclinas, los macrólidos, y algunas fluoroquinolonas (Assunção, 2003). La eficacia en el tratamiento y control de la NEP mediante antibióticos depende en gran medida del momento de aplicación. Por ello, se recurre con frecuencia a tratamientos continuados en un prolongado espacio de tiempo, siendo más eficaces cuando se aplican inmediatamente tras la aparición de los primeros signos clínicos, de forma parenteral en individuos clínicamente enfermos, y vía oral en la alimentación de hembras reproductoras y otros animales expuestos.

La tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas, pleuromutilinas (tiamulina y valnemulina), fluoroquinolonas, florfernicol y aminoglicosidos son los antimicrobianos más activos frente a *M. hyopneumoniae* (Vicca, 2005). La **Tabla I.1** del “ANEXO: Tablas” de este capítulo, muestra la dosis de los principios activos frente a la NEP, mientras que la **Tabla I.2** detalla algunos de los principales antimicrobianos distribuidos en España para el tratamiento de la NEP.

En condiciones óptimas, para el control de esta enfermedad se puede aplicar el tratamiento durante 1 a 3 semanas, comenzando 1 semana antes del momento previsto de inicio de la enfermedad (Thacker y cols., 2004). Generalmente, el tratamiento no previene la infección, pero puede reducir la severidad de la presentación y la carga de infección en los animales y su ambiente (Maes y cols., 2008). Para la erradicación del agente, se debe recurrir a los antibióticos de efecto micoplasmicida, tales como fluoroquinolonas y aminoglucoisidos (Vicca, 2005).

La aparición de resistencias a antibióticos ha sido documentada en tetraciclinas (Inamoto y cols., 1994), macrólidos, lincosamidas y fluoroquinolonas (Vicca y cols., 2004), pero por el momento no ha constituido un problema para el tratamiento de *M. hyopneumoniae* (Maes y cols., 2008).

I.3.7- INMUNIDAD NATURAL E INMUNOPROFILAXIS.

La dinámica de la infección por *M. hyopneumoniae* es de naturaleza crónica, y su éxito como agente infeccioso se ve influenciado por los siguientes factores:

- 1) La llegada del patógeno genera una respuesta lenta por parte del sistema inmune, ya que requiere un considerable tiempo para su identificación como agresor inmunológico.
- 2) La primera respuesta inmune es poco eficaz, ya que el microorganismo enmascara hasta cierto punto su presencia en el hospedador, al diseñar parte de su estructura proteica con dominios variables, o bien a imitación de las del animal hospedador.
- 3) La respuesta inflamatoria daña los tejidos del pulmón, y facilita la llegada de otros patógenos, por lo que el sistema inmune agota parte de sus recursos en combatir otros agentes infecciosos, generalmente más inmunógenos.
- 4) Es la respuesta celular, conseguida tras meses de exposición al agente de la NEP, la que permite al organismo del animal frenar la infección.

Las reproductoras transfieren parte de su inmunidad a los lechones través del calostro. Por tanto, las hembras de más edad suelen proveer a sus lechones de una inmunidad más efectiva que la de las nuevas hembras de reposición o nulíparas (Sibila y cols., 2008). La vacunación de las reproductoras se recomienda entre las 3^a y la 5^a semana previa al parto, con el fin de incrementar la inmunidad pasiva transferida a los lechones (Maes y cols., 2008). Se considera especialmente aconsejable vacunar a las hembras jóvenes de reposición, que pese a haber mantenido contacto con la enfermedad, carecen de una respuesta celular plenamente desarrollada, como ocurre en el caso de las hembras de más edad. Tras la vacunación, la seroconversión en los animales vacunados puede ser evidenciada a partir de las 2 semanas.

En el caso de las reproductoras, la vacunación está indicada para que la cantidad y calidad de los anticuerpos maternos y células linfocitarias originen una protección más eficaz y duradera en los lechones durante las primeras semanas de vida (Bandrick y cols., 2008). La vacunación de las reproductoras se traduce en una infección más tardía y menos severa de los lechones, por lo que los animales llegan al sacrificio con un menor porcentaje de tejido pulmonar lesionado, manteniendo un menor índice de conversión durante el ciclo productivo (Lehner y cols., 2008).

Ni los anticuerpos maternos (Thacker y cols., 2000), ni la vacunación de los lechones (Meyns y cols., 2006; Villareal y cols., 2011b) previenen la infección ni la transmisión de *M. hyopneumoniae* entre los animales. Sin embargo, los animales vacunados muestran menos lesiones pulmonares y un menor coste productivo derivado de la enfermedad (Dohoo y Montgomery, 1996; Sibila y cols., 2007b). Tanto las vacunas comerciales (Strait y cols., 2008), como las vacunas elaboradas a partir de cepas de campo (Feng y cols., 2010; Li y cols., 2012), han demostrado una eficacia parcial en el control de la NEP, aunque su uso parece justificado. Recientemente, Vranckx y cols., (2012) demostraron que la vacunación reduce la infiltración de macrófagos alveolares en el tejido linfoide asociado a bronquios tras la infección, y que la replicación de *M. hyopneumoniae* en el tejido pulmonar también puede verse disminuida.

El factor más importante para obtener los mejores resultados en la vacunación de los lechones depende de la elección acertada del momento de la misma (Desrosiers, 2001). La vida media de los anticuerpos maternos oscila entre las 2 y las 4 primeras semanas de vida. Así mismo, los animales necesitan desarrollar plenamente su sistema inmune para que la vacunación sea más eficaz. Así pues, las vacunaciones precoces resultan en muchos casos poco eficaces, ya que la inmunidad pasiva que transfiere la madre a los lechones puede interferir en el correcto funcionamiento de la vacuna, siendo el título de anticuerpos más importante que la edad o madurez del sistema inmune del lechón (Hodgins y cols., 2004). En este sentido, las vacunaciones demasiado tempranas de los animales, aunque menos eficaces que otras más tardías (Strauss y cols., 2007), siguen siendo preferibles frente a la no vacunación de los animales (Smith y cols., 2003; Holyoake y Callina, 2006).

El momento óptimo para la vacunación de los lechones oscila entre las 4 y las 8 semanas de vida (grosse Beilage y Schreiber, 2005). Los protocolos más exitosos de vacunación se obtienen en los casos de aplicación de dos dosis, generalmente realizados en la 4ª y 6ª semana de vida de los lechones (Sibila y cols., 2007b). El momento adecuado para administrar la vacuna en una única dosis, oscila entre la 3ª y 6ª semana de vida, dependiendo tanto de la presión de infección de la explotación, como de la cantidad y calidad de los anticuerpos y linfocitos maternos, siendo más eficaz la vacunación monodosis de los lechones en la 6ª semana de vida, si las madres reproductoras han sido también vacunadas de 3 a 6 semanas antes del parto (Lehner y cols., 2008). Sin embargo, otros autores defienden que el empleo de la vacunación temprana en formato monodosis, aplicada entre la 1ª a 3ª semana de vida, presenta la misma eficacia que los protocolos de doble dosis más tardíos (Haesebrouck y cols., 2004; Lillie y cols., 2006; Lillie y cols., 2007). La vacunación frente a la NEP resulta efectiva con independencia de las condiciones iniciales de estatus serológico del hato, y otros parámetros de alojamiento (Garlaite y cols., 2004; Siugzdaite y cols., 2005), aunque en estudios experimentales, la protección resulta más evidente cuando los animales son desafiados con cepas altamente virulentas (Villareal y cols., 2011a).

La interacción con los programas vacunales para otros agentes es objeto de controversia. En el caso del virus PRRS, algunos de los estudios realizados descartan el fracaso en la seroconversión y protección, así como la interferencia entre ambos programas vacunales (Genzow y cols., 2006; Drexler y cols., 2010). Sin embargo, Le Roith y cols., (2011), comprobaron que la vacuna atenuada de PRRS, induce la activación de linfocitos T reguladores, lo que aumenta la IL-10 (inhibidora de citosinas) en detrimento del IFN- γ (activador de macrófagos), exacerbando las lesiones de NEP. Por otra parte, no parece existir interacción con la vacuna del Síndrome de Desmedro (Haruna y cols., 2006; Rapp-Gabrielson y cols., 2008), aunque una vacunación muy tardía frente a la NEP (6ª a 10ª semana de vida) en presencia del *Circovirus porcino* tipo 2, podría aumentar la amplificación vírica y la depleción del tejido linfoide (Opriessnig y cols., 2006).

La **Tabla I.3**, del “**ANEXO: Tablas**” de este capítulo, muestra algunas de las vacunas comerciales empleadas frente a la NEP, de distribución en España.

I.4.- *MYCOPLASMA HYORHINIS*

M. hyorhinis es uno de los microorganismos más frecuente en el ganado porcino, relacionado con procesos neumónicos y cuadros de artritis y poliserositis en lechones, aunque su virulencia podría variar en gran medida de una cepa a otra (Friis, 1971a; Kobisch y Friis, 1996). Su aislamiento y replicación desde el parénquima pulmonar hacia medios de cultivo artificiales es más rápido y generalmente más exitoso que en el caso de *M. hyopneumoniae* (Friis, 1979; Assunção y cols., 2005). Tras la adaptación al medio, los cultivos crecen bien en 24 a 48 horas, y en los medios sólidos produce colonias con la morfología típica de “huevo frito”. Posee capacidad fermentadora sobre los azúcares, aunque no hidroliza la arginina ni la urea (Ross y Whittlestone, 1983; Ross, 1992).

Además de su presencia en pulmón, *M. hyorhinis* ha podido ser aislado de la mucosa del tracto respiratorio superior y tonsilas, conjuntiva, lesiones pericárdicas, pleura y cavidad peritoneal, y oído medio (Friis, 1976; Friis y Fenestra, 1994; Friis y cols., 2002; Makhanon y cols., 2012). Así mismo, se ha relacionado con procesos de inflamación de la trompa de eustaquio (Morita y cols., 1999), otitis media (Morita y cols., 1998), y procesos abortivos (Shin y cols., 2003).

El ciclo de transmisión comienza desde el parto, de madres a lechones o de manera ambiental desde otros animales (Ross, 1992). Muchos de los animales infectados pueden cursar de modo subclínico. En la fase aguda de la enfermedad, los signos se relacionan con hipertermia, cojera e inflamación de articulaciones, inapetencia y dificultad respiratoria. (Kobisch y Friis, 1996; Kobisch y Marois; 2008). *M. hyorhinis* puede ser aislado indistintamente desde pulmones sanos como desde pulmones neumónicos. Recientemente, algunos estudios sugieren que *M. hyorhinis* podría actuar como amplificador del cuadro sintomático y lesional, así como patógeno de frecuente asociación, en las coinfecciones con *M. hyopneumoniae* (Palzer y cols., 2008), o bien incluso como un agente neumónico de carácter propio, con capacidad para ocasionar lesiones neumónicas indistinguibles de las producidas por *M. hyopneumoniae* (Lin y cols., 2006; Lobo y cols., 2011).

Este micoplasma es uno de los contaminantes de líneas celulares más habitual y persistente (Uphoff y Drexler, 2002a), con capacidad incluso para invadir y penetrar en el citoplasma de las células de líneas melanómicas, lo que podría contribuir a dificultar su eliminación (Kornspan y cols., 2010).

Por otra parte, parece existir una correlación positiva entre la presencia de *M. hyorhinitis* y carcinomas en seres humanos (Huang y cols., 2001), especialmente en carcinomas gástricos (Zhang y cols., 2002; Yang y cols 2010). El estudio de algunas de las cepas aisladas desde tejidos y líneas celulares humanas y animales de origen tumoral, ha permitido relacionar la proteína P37 de *M. hyorhinitis* con procesos oncológicos, y renombrarla en función de su estructura, como “proteína extraplasmática de unión a tiamina” (Sippel y cols., 2009). Esta proteína presenta la capacidad de detener la senescencia celular, aumentar la clonogenicidad y alterar los receptores de factor de crecimiento epidérmico de tipo 2, aunque en sentido opuesto, un fragmento de la P37, tras la escisión de 28 aminoácidos del extremo N-terminal, induce la senescencia celular. Todo ello en conjunto, supone la inducción de alteraciones neoplásicas de tipo maligno o canceroso (Liu y cols., 2007; Yang y cols., 2010).

I.5.- *MYCOPLASMA FLOCCULARE*

M. flocculare es un hospedador habitual de las mucosas de naturaleza respiratoria del cerdo, y podría estar presente en todas las explotaciones porcinas (Kobisch y Friis, 1996; Kobisch y Marois, 2008). Este micoplasma fue aislado por Friis (1972), y caracterizado serológicamente por Meyling y Friis en dicho año. Su estatus taxonómico quedó establecido por Rose y cols. (1979). Precisamente, el mayor interés que despierta este microorganismo es su estrecha relación taxonómica (Huang y Stemke, 1992; Stemke y cols., 1992; Stemke y cols., 1994) y ecológica (Kobisch y Friis, 1996) con *M. hyopneumoniae*, además de su posible interferencia en el aislamiento de cepas puras de este último (Assunção, 2003; Assunção y cols., 2005).

El cultivo en medio líquido resulta más lento que en *M. hyopneumoniae*, aunque la metabolización de la glucosa puede ser más intensa (Stemke y Robertson, 1990), con marcado pleomorfismo y crecimiento micelar (Hovind-Hougen y Friis, 1991). En medio sólido, las colonias presentan morfología atípica sin área central (Kobisch y Friis, 1996).

Aunque *M. flocculare* es un comensal habitual de la nasofaringe (Friis, 1975a), y puede ser aislado tanto de pulmones sanos como de pulmones neumónicos (Falk y cols., 1991) todos los estudios experimentales coinciden en señalar esta especie como no patógena (Friis, 1973 y 1974; Armstrong y cols., 1987; Abiven y cols., 1992; Strasser y cols., 1992).

A pesar de la similitud genética con *M. hyopneumoniae*, la hibridación ADN-ADN apenas llega al 10% (Stemke y cols., 1985), existe una clara relación antigénica (Friis y Jensen, 1984; Bölske y cols., 1987), aunque las reacciones cruzadas no son un problema para el diagnóstico (Kobisch y Friis, 1996). Curiosamente, la comparación de mapas genéticos entre *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*, revela 3 grandes inversiones cromosómicas en este último, una de ellas con el operón 16S-23S, mientras que las dos restantes podrían aglutinar parte de los genes para adhesinas, como la P97 y otros factores de virulencia que sí están presentes en *M. hyopneumoniae* (Blank y Stemke, 2001).

I.6.- MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE

M. hyosynoviae fue descrito y caracterizado por Ross y Karmon en 1970, a partir del tracto respiratorio de cerdos en Dinamarca. El aparente tropismo de este micoplasmas por las articulaciones (Ross y Duncan, 1970), fue demostrado a través de inoculaciones experimentales con dicho agente para inducir artritis, y su posterior detección por inmunofluorescencia (Ross y cols., 1971; Potgieter y Ross, 1972; Ross y cols., 1977).

Con mayor frecuencia, puede ser aislado en las tonsilas (Friis y cols., 1991), aunque puede ocupar las mucosas de las vías respiratorias y pulmón (Furlong y Tuner, 1975), y diseminarse por vía sanguínea hasta alcanzar las articulaciones y líquido sinovial (Hagedorn-Olsen y cols., 1999 a y b). Su presencia se traduce en cuadros de sinovitis, artritis, cojera aguda y ocasionalmente en pericarditis (Ross, 1973; Jensen y cols., 1995; Nielsen y cols., 2001). Se considera un patógeno habitual de las explotaciones porcinas altamente industrializadas, causante de grandes pérdidas económicas (Kobisch y Friis, 1996). El cultivo primario en aislamiento puede prolongarse días o semanas, particularmente cuando no se enriquece el medio artificial con mucina porcina, aunque una vez bien establecido, el cultivo se replica con rapidez, hidrolizando la arginina pero no fermenta la glucosa. En medio sólido forma colonias típicas con morfología de “huevo frito” y producción de películas y cristales (Ross y Whittlestone, 1983).

La diversidad genética de *M. hyosynoviae* fue revelada mediante técnicas AFLP, demostrando que diferentes cepas pueden estar presentes en una única piara (Kokotovic y cols., 2002b). En condiciones naturales, la infección es transmitida de madres a lechones por contacto directo, o bien por gotas en aerosol procedentes de otros animales. Los anticuerpos maternos permanecen entre 8 y 12 semanas, siendo el período de infección más habitual a partir de la 11ª semana (Hagedorn-Olsen y cols., 1999c), aunque no parece existir una edad limitante en la presentación clínica, en estudios experimentales (Lauritsen y cols., 2008). El monitoreo por ELISA de la dinámica de la enfermedad, demuestra que el período crítico de infección transcurre entre la 4ª y 12ª semana, y que esta progresa de manera similar en presencia o ausencia de artritis clínica (Nielsen y cols., 2005).

I.7.- MYCOPLASMA HYOPHARYNGIS

M. hyopharyngis fue aislado y descrito por primera vez por Erickson y cols., en los Estados Unidos en 1986, a partir de la mucosa nasofaríngea en dos piaras de cerdos, empleando medio de cultivo D-TS. Posteriormente, Bradbury y cols., (1994), aislaron este micoplasma desde líquido sinovial procedente de cerdos con problemas articulares, en Reino Unido y Dinamarca, mientras que Friis y cols., (2003) aislaron este microorganismo en vías aéreas superiores, realizando raspados de la superficie tonsilar de los animales. Sin embargo, el bajo número de aislamientos (probablemente relacionado con la dificultad para su aislamiento y cultivo), y la poca información disponible sobre su prevalencia entre el ganado porcino, hace que sea difícil establecer su importancia y determinar su verdadero impacto ecológico (Kobisch y Friis, 1996)

M. hyopharyngis comparte algunas características culturales con *M. hyosynoviae*, ya que ambos metabolizan la arginina, y pueden generar películas y cristales en el medio sólido (Friis y cols., 2003). Sin embargo, a diferencia de la evolución convergente que muestran *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* y *M. hyorhinis*, tanto *M. hyopharyngis* como *M. hyosynoviae* proceden de orígenes ancestrales independientes (y no relacionados entre sí mismos ni con los anteriores), siendo su relación filogenética más estrecha con algunos de los micoplasmas, que son considerados como comensales habituales en el ser humano (Blanck y cols., 1996). Actualmente, se considera a *M. hyopharyngis* dentro del cluster *lipophilum* (Pettersson y cols., 1994; Pettersson y cols., 2001).

En otros casos, *M. hyopharyngis* ha sido identificado en diferentes especies animales. Collighan y Woodward (1997), amplificaron las secuencias del gen ARNr 16S en un estudio orientado a la identificación de *Treponema* en biopsias de animales afectados por dermatitis digital bovina, logrando amplificar en una de las muestras, una secuencia cuya similitud con la de *M. hyopharyngis* fue del 98%. Por otra parte, Hartmann y cols., (2010), detectaron *M. hyopharyngis* por PCR y secuenciación, en gatos afectados por conjuntivitis e infección de las vías respiratorias altas.

ANEXO: Tablas

Tabla I.1.- Dosis de los principios activos para el tratamiento y control de la NEP.

PRINCIPIO ACTIVO	Vía parenteral (Intramuscular)	En el agua de bebida	En el pienso
DOXICICLINA	40-60 mg/10 kg p.v./día durante 4-5 días	50-100 mg/Litro de agua durante 4-5 días	
ENROFLOXACINA	25-50 mg/10 kg p.v./día durante 3-4 días		
NORFLOXACINA	25 mg/10 kg de p.v.		100-150gr/Tm de pienso durante 5-7 días
ERITROMICINA	2-10-20 mg/kg p.v.		
ESPIRAMICINA	900.000 U.I. /10 kg p.v.	300.000-600.000 U.I./Litro de agua de bebida	200mg/10 kg p.v. 800.000 U.I./10 kg p.v.
KITASAMICINA		100-200 ppm/Litro agua de bebida durante 2-3 días	110-330 ppm/Tm de pienso durante 5-7 días
LINCOMICINA	110 mg/10 kg p.v. durante 3-7 días	30-60mg/10 kg p.v./ día	
LINCOMICINA + ESPECTINOMICINA	150 mg/10 kg p.v. 4-7 días		20-40 gr/Tm
MARBOFLOXACINO	20mg/10kg p.v. 3-5 días		
SULFAMIDA + TRIMETROPIN	(150-200) + (40-50) mg/10 kg p.v .	(150-300) +40 mg/10 kg de p.v.	(150-300) + 40 mg/10 kg de p.v.
OTRAS TETRACICLINAS	200 mg/10 kg p.v. dosis única	Animales pequeños: 0,40 a 1 g/kg p.v./día, en 2 dosis, durante 5 a 7 días. Adultos: 0,20 a 0,40 g/kg p.v./día, en 2 dosis, durante 5 a 7 días 100-200 mg/Litro agua de bebida	1-4 kg/Tm (el producto viene en 100mg/gr) Dosis: 100-400gr/Tm de pienso
TIAMULINA	100-150mg/10 kg p.v.	Desde 64,8-81mg/10 kg p.v. hasta 247 mg/10 kg p.v.	40-80 o 80-100 mg/10Kg p.v.
TILMICOSINA			160mg/10kg p.v.
TILOSINA	90-100 o 200 mg/10 kg p.v.	250 mg/Litro de agua de bebida	0,5 kg/Tm pienso (100 ppm de tilosina).

Tabla I.2.- Fármacos medicamentosos para el tratamiento y control de la NEP.

PRINCIPIO ACTIVO	FÁRMACO DE VENTA	CASA COMERCIAL	VÍA DE APLICACIÓN	DOSIS
DOXICICLINA	Calierdoxina	CALIER	INYECTABLE	40-60 mg/10 kg p.v./día, 4-5 días
	Doxivet inyectable	DIVASA-FARMAVIC	INYECTABLE	0,4 - 0,6 ml/10 kg p.v./día 4 - 5 días (40-60 mg/10 kg p.v.)
	Doxivet-10	DIVASA-FARMAVIC	EN AGUA DE BEBIDA	50 mg/Litro en agua de bebida
	Dox Esteve	ESTEVE	EN AGUA DE BEBIDA	10 mg/kg p.v./día durante 4-5 días (1 gr/10 kg de p.v.)
	Doxidol	FATRO	EN AGUA DE BEBIDA	1 gr/10 kg p.v. durante 5 días
	Hypramix Doxi 125mg/g	HIPRA	ORAL EN PIENSO	2 kg/Tm equivale a 10-12 mg/kg p.v. día, 8 días
	Hypramix Doxi 50mg/g	HIPRA	ORAL EN PIENSO	5 kg/Tm equivale a 10-12mg/kg p.v. día, 8 días
	Hipra Doxi S	HIPRA	EN AGUA DE BEBIDA	1 ml/Litro agua de bebida (10 mg/kg p.v./día), 8 días.
	Hipra Doxi P	HIPRA	EN AGUA DE BEBIDA	1 g/Litro agua de bebida (10 mg/kg p.v./día), 8 días.
	Doxinyl	INVESA	EN AGUA DE BEBIDA	1 ml/10 kg p.v. día (10 mg/kg p.v.) durante 5 días
	Doxiprex 100mg/g Premezcla	INVESA	ORAL EN PIENSO	10 mg /kg de p.v./día (1 gr de Doxyprex/10 kg de p.v.) 7 días.
	Karidox 100mg/ml	KARIZOO	EN AGUA DE BEBIDA	1 ml/10 kg p.v./día (10 mg/kg p.v.)
	Ladoxyn 500 mg/g	KARIZOO	EN AGUA DE BEBIDA	20 mg/kg p.v. (equiv. 40 mg/kg p.v.) durante 5 días
	Doxiciclina 10% Lamons	LAMONS	EN AGUA DE BEBIDA	1 ml/10 kg p.v. día 5 días(0,1 mg/kg p.v. día)
	Maydox	MAYMÓ	INYECTABLE	40-60 mg/10 kg p.v. 4-5 días
Syvadox 10%	SYVA	EN AGUA DE BEBIDA	100 mg/10 kg p.v./día, durante 5 días	

ENRO-FLOXACINA	Baytril 0,5%	BAYER	SOLUCIÓN ORAL	2,5 mg/kg p.v.
	Baytril 5%	BAYER	INYECTABLE	2,5 mg/kg p.v.
	Baytril 10%	BAYER	INYECTABLE	2,5 mg/kg p.v.
	Roxacin	CALIER	INYECTABLE	1 mg/kg día
	Quinoex 10%	CEVA	INYECTABLE	25-50 mg/10 kg p.v. día
	Enrovet inyectable	DIVASA-FARMAVIC	INYECTABLE	2,5 mg/kg p.v.
	Alsir lechones	ESTEVE	SOLUCIÓN ORAL	1,7 mg/kg p.v.
	Alsir 5%	ESTEVE	INYECTABLE	2,5 mg/kg p.v. durante 3 días
	Unisol 5mg/ml	FATRO	SOLUCIÓN ORAL	5 mg/3 kg p.v. día
	Fatroflox	FATRO	INYECTABLE	2,5-5 mg/kg p.v. durante 3-4 días
	Hipralona	HIPRA	INYECTABLE	1 ml/Litro agua de bebida (12 mg/kg p.v./día), 3-5 días.
	Ganadexil 5% Enroflox.	INVESA	INYECTABLE	25-50 mg/kg p.v./día, 3 días
	Kariflox 5mg/ml	KARIZOO	SOLUCIÓN ORAL	5 mg/3 kg p.v. día, 3-5 días
	Syvaquinol 100	SYVA	INYECTABLE	25 mg/10 kg p.v./día, 3-4 días
	Syvaquinol 25	SYVA	INYECTABLE	25 mg/10 kg p.v./día, 3-4 días
NOR-FLOXACINA	Anflox Feed Premix	ANUPCO	ORAL EN PIENSO	100-150 gr/Tm de pienso, 5-7 días
	Anflox Gold Premix	ANUPCO	ORAL EN PIENSO	100-150 gr/Tm de pienso, 5-7 días
	Anflox Injection 10%	ANUPCO	INYECTABLE	25 mg/10 kg p.v.

ERI-TROMICINA	Pantomicina 200	CEVA	INYECTABLE	10-20 mg/kg p.v./día
	Ilovetmr 20%	FARCO VET	INYECTABLE	10-20 mg/ kg p.v./día
	Pedermicina	FATRO	INYECTABLE	2 mg/kg p.v./día
	Pantoyet	SYVA	INYECTABLE	100 mg/15-45 kg p.v./día
ESPIRA-MICINA	Macrolvet	DIVASA-FARMAVIC	INYECTABLE	900.000 U.I. /10 kg p.v.
	Spyr	MAYMÓ	INYECTABLE	800.000 U.I./10 kg p.v. durante 2-3 días
	Spyr Polvo	MAYMÓ	EN AGUA DE BEBIDA	807.000 U.I./10 kg p.v.
	Ganapork F	OVEJERO	EN AGUA DE BEBIDA	300.000 - 600.000 U.I./Litro agua de bebida
	Ganapork Inyectable	OVEJERO	INYECTABLE	800.000 U.I./10 kg p.v.
	Ganapork Premezcla	OVEJERO	ORAL EN EL PIENSO	200 mg/10 kg p.v.
	Mycogal 105	OVEJERO	INYECTABLE	840.000 U.I./10 kg p.v.
KITASA-MICINA	Kitacin 110 Premix	ANUPCO	ORAL EN EL PIENSO	110-330 ppm/Tm de pienso, 5-7 días
	Kitacin 200W	ANUPCO	EN AGUA DE BEBIDA	100-200 ppm/Litro agua de bebida, durante 2-3 días
LINCOMICINA	Linalten	CALIER	INYECTABLE	110 mg/10 kg p.v./día 3-7 días
	Lincovet	CEVA	EN AGUA DE BEBIDA	30-60 mg/10 kg p.v./día
	Fatrolin	FATRO	EN AGUA DE BEBIDA	30-60 mg/10 kg p.v./día
	Linc. 150 Ganadexil	INVESA	EN AGUA DE BEBIDA	8,4 mg/10 kg p.v./día
	Lincoxil 40%	INVESA	EN AGUA DE BEBIDA	30-60 mg/10 kg p.v./día

	Lincosol 40%	KARIZOO	EN AGUA DE BEBIDA	30-60 mg/10 kg p.v./día
	Lincosol 40% Soluble Powder	KARIZOO	EN AGUA DE BEBIDA	30-60 mg/10 kg p.v./día
	Lincomay	MAYMÓ	EN AGUA DE BEBIDA	30-60 mg/10 kg p.v./día
LINCOMICINA + ESPECTINOMICINA	Icamicina LS	CEVA	INYECTABLE	50+100 mg/10 kg p.v./día
	Lincostran	FATRO	INYECTABLE	50+100 mg/10 kg p.v./día
	Pneumotos I	HIPRA	INYECTABLE	45+90 a 195+97,5 mg/10 kg p.v. día
	Linco-Res	LABIANA	INYECTABLE	50+100 mg/10 kg p.v. día
	Hemoenterol P44	OVEJERO	ORAL EN PIENSO	de(22 gr+22 gr) a (44 gr+44 gr)/Tm de pienso durante 21 días
	Biseptyl	SYVA	INYECTABLE	50+100 mg/10 kg p.v. día
MARBO-FLOXACIN	Marbocyl 2%	VÉTOQUINOL	INYECTABLE	20 mg/10 kg p.v. durante 3-5 días
	Marbocyl 10%	VÉTOQUINOL	INYECTABLE	20 mg/10 kg p.v. durante 3-5 días
SULFAMIDA	Cotrin 240 Injection	ANUPCO	INYECTABLE	160 mg/10 kg p.v. una o dos dosis separadas 48 horas
	Cotrin 720 W	ANUPCO	EN PIENSO y AGUA DE BEBIDA	150-300 mg/10 kg p.v./día durante 4-5 días
	Farcotrin Plus	FARCO VET	INYECTABLE	0,6 ml/ 10 kg de p.v. (210 + 42 mg sulfa + trimetoprin)
	Ulfaprisol	FATRO	ORAL O AGUA DE BEBIDA	1,7 g/10 kg de p.v. (255+ 51 mg sulfa + trimetoprin)
	Zinaprim	INVESA	EN AGUA DE BEBIDA	1 gr/10 kg de p.v. (200 + 40 mg sulfa + trimetoprin)
	Tromexín	INVESA	PIENSO O AGUA	1 gr/10 kg de p.v. (200 + 40 mg sulfa + trimetoprin)

	Kariprim-TS	KARIZOO	INYECTABLE	1 ml/10 kg p.v.(125+100+25 mg sulfa + tilosina + trimetoprin)
OTRAS TETRA-CICLINAS	Ancomycin 100	ANUPCO	INYECTABLE	100 mg/10 kg p.v.
	Ancomycin 200	ANUPCO	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v.
	Rimoxi 500	ANUPCO	ORAL EN PIENSO	200-300 gr/Tm de pienso
	Calimicina 200CL	CALIER	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v. dosis única
	Tenalina L.A.	CEVA	INYECTABLE	200.000 U.I./10 kg p.v.
	Oxitetraciclina a Lagro	CEVA	EN AGUA DE BEBIDA	100-200 mg/Litro agua de bebida
	Ciclosol 200 L.A.	FATRO	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v. dosis única
	Oxitetraciclina a 200 L.A.	INVESA	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v. dosis única
	Alamycin LA 300	KARIZOO	INYECTABLE	300 mg/10 kg p.v. dosis única
	Oxi-Karizoo L.A.	KARIZOO	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v. dosis única
	Oxilabicyclina -200 Retard	LABIANA	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v. dosis única
	Oxitetraciclina a Soluble	MAYMÓ	EN AGUA DE BEBIDA	100-200 mg/Litro agua de bebida
	Clortetracyclina Soluble	MAYMÓ	EN AGUA DE BEBIDA	Animales pequeños: 0,40 a 1 g/kg p.v./día, en 2 dosis, durante 5 a 7 días. Adultos: 0,20 a 0,40 g/kg p.v./día, en 2 dosis, durante 5 a 7 días.
	Oxitetraciclina a 10%	MAYMÓ	ORAL EN PIENSO	1-2 kg/Tm

	Oxiclin 20%	OVEJERO	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v. dosis única (oxitetraciclina)
	Tetraciclina Premezcla	SYVA	ORAL EN PIENSO	1-4 kg/Tm (el producto viene en 100 mg/gr) dosis: 100-400 gr/Tm de pienso
	Forticlina Retard	SYVA	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v. dosis única (oxitetraciclina)
	Ganaciclina	VÉTOQUINOL	INYECTABLE	75-100 mg/10 kg p.v./día durante 3- 4 días
TIAMULINA	Tiamulin 100	ANUPCO	INYECTABLE	100 mg/10 kg p.v.
	Caliermutin 10mg/g	CALIER	ORAL EN PIENSO	40-80 mg/10 kg p.v.
	Caliermutin 2%	CALIER	ORAL EN PIENSO	40-80 mg/10 kg p.v.
	Macromutin 162mg/ml	CALIER	INYECTABLE	100-150 mg/10 kg p.v.
	Macromutin 125mg/ml	CALIER	SOLUCIÓN ORAL	64,8-81mg/10 kg p.v.
	Macromutin 45%	CALIER	EN AGUA DE BEBIDA	64,8-81mg/10 kg p.v.
	Tiamvet 20% PS	CEVA	EN AGUA DE BEBIDA	400 mg/10 kg p.v. día durante 3-5 días
	Karimulina 125mg/ml Solución Oral	KARIZOO	EN AGUA DE BEBIDA	247 mg/10 kg p.v./día 3-5 días
	Lamulin 364,2mg/g Granulado	KARIZOO	EN AGUA DE BEBIDA	90 mg/10 kg p.v./día durante 5 días
	Lamulin 81mg/g Premezcla	KARIZOO	ORAL EN PIENSO	80-100 mg/10 kg p.v./día
	Pulmo THF 200 Premix	ANUPCO	ORAL EN PIENSO	15-20 mg/10 kg p.v./día durante 2 meses
TILMICOSINA	Tilmovet 250mg/ml	CALIER	ORAL	160 mg/10 kg p.v.
	Tilmovet Prem. Medic.	CALIER	ORAL EN PIENSO	160 mg/10 kg p.v.

TILOSINA	Tylosin 200	ANUPCO	INYECTABLE	20-100 mg/10 kg p.v.
	Biomacrotil 200	CALIER	INYECTABLE	200 mg/10 kg de p.v.
	Tilosina 200	CHEMICAL IBERICA	INYECTABLE	100-200 mg/10 kg de p.v./día
	Tyloprim	HIPRA	INYECTABLE	90-100 mg/10 kg de p.v./día
	Hipramix Til	HIPRA	ORAL EN PIENSO	0,5 kg/Tm en pienso (100 ppm de tilosina).
	Tilosina 100 Ganadexil	INVESA	EN AGUA DE BEBIDA	250 mg/Litro de agua de bebida
	Tilosina 200 Ganadexil	INVESA	INYECTABLE	90-100 mg/10 kg p.v. cada 12 horas, durante 3 días
	Tylmax LA 250 mg/ml	KARIZOO	INYECTABLE	200 mg/10 kg p.v.
	Tilosina 200 Labiana	LABIANA	INYECTABLE	90-100 mg/10 kg p.v. cada 24 horas, durante 5 días
	Tilosul	SYVA	INYECTABLE	100 mg/10 kg p.v.

Tabla I.3.- Vacunas comerciales en España frente a la NEP.

NOMBRE	LABORATORIO	EDAD DE APLICACIÓN	DOSIFICACIÓN
Ingelvac MycoFLEX®	BOEHRINGER	Cumplida la 3ª semana de vida	1 dosis de 1ml
Ingelvac® M hyo	BOEHRINGER INGELHEIM SA	Cumplida la 3ª semana de vida	1 dosis de 2ml
M+PAC	INTERVET SCHERING- PLOUGH, S.A.	Cumplida la 4ª o 5ª semana de vida	2 dosis de 1ml+1ml o bien 1 dosis de 2ml
Myco Silencer® ONCE	INTERVET SCHERING- PLOUGH, S.A.	Cumplida la 3ª semana de vida, o bien 3ª y 5ª semana de vida	1 dosis de 2ml a la 3ª semana de vida o bien 2 dosis de 1ml en cada vacunación.
Porcilis M Hyo	INTERVET SCHERING- PLOUGH, S.A.	Cualquier edad una vez cumplida la 1ª semana de vida	2 dosis de 2 ml, con 21 días de diferencia
Suvaxyn Respifend MH®	FORT DODGE	Cualquier edad una vez cumplida la 1ª semana de vida, revacunando 2-3 semanas después	2 dosis de 2ml, con 2-3 semanas de diferencia
Suvaxyn MH One®	FORT DODGE	Cumplida la 3ª semana de vida	1 dosis de 2ml
Suvaxyn Respifend HP/HPS® (para <i>M. hyopneumoniae</i> y <i>Haemophilus parasuis</i>)	FORT DODGE	Cualquier edad una vez cumplida la 1ª semana de vida, revacunando 2-3 semanas después	2 dosis de 2ml, con 2-3 semanas de diferencia
MYPRAVAC® SUIS	HIPRA	Cumplida la 1ª semana de vida, revacunar cumplida la 4ª semana de vida	1 dosis de 2ml a la 1ª semana de vida, y otra dosis de 2ml la 4ª semana de vida.
Sprintvac®	LAPISA	Cumplida la 2ª o 3ª semana de vida	1 dosis de 2ml
Myco Shield™	NOVARTIS	Cumplida la 2ª semana de vida, revacunar tras 2 semanas	1 dosis de 2 ml, y 1 dosis de 2ml, con 2 semanas de diferencia
Respisure®1one	PFIZER	Cualquier edad una vez cumplida la 1ª semana de vida	1 dosis de 2ml
Rhivanvac (para <i>M. hyopneumoniae</i> y otros agentes del CRP)	SYVA	No especificado	1 dosis de 2ml

CAPÍTULO II

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE CAMPO DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

II.1.- INTRODUCCIÓN

El sector porcino representa uno de los pilares de la economía ganadera en aquellas zonas del mundo donde el cerdo es objeto de consumo. La economía asociada a este sector, tiene un gran peso en las producciones finales agrarias de muchos de los países miembros de la Unión Europea, tales como Dinamarca, Bélgica, Polonia y Alemania. En concreto, países como Dinamarca, Alemania, España, Francia y Polonia y Holanda aglutinan dos terceras partes de los cerdos producidos en la UE (Marquer, 2010).

La intensificación de las producciones, y la aparición de nuevos retos sanitarios para la cabaña porcina, tales como los virus de Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), y Circovirus porcino asociado al Síndrome de Desmedro, (Thacker, 2001; Opriessnig y cols., 2007) no sólo agravan y redefinen el Complejo Respiratorio Porcino, sino que contribuyen en cierta medida a enmascarar la importancia decisiva que tiene la Neumonía Enzoótica Porcina en las explotaciones ganaderas, a través de su agente etiológico, *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Pese al reducido índice de mortalidad, su impacto en la producción puede considerarse elevado (Pointon y cols., 1985), ya que incrementa el índice de conversión, disminuye el desarrollo de los animales, y contribuye parcialmente al éxito en la invasión de otros agentes infecciosos (Maes y cols., 2008). En este sentido, puede considerarse que el impacto económico que produce la presencia de dicha enfermedad es a menudo infravalorado.

La Neumonía Enzoótica Porcina (NEP) fue descrita por primera vez en Alemania en 1930. Su agente etiológico, *Mycoplasma hyopneumoniae*, fue aislado y caracterizado en esfuerzo conjunto, por los investigadores Maré y Switzer (Estados Unidos, 1965) y

Goodwin y Whittlestone (Reino Unido, 1966). Desde entonces, numerosos autores han constatado la dificultad que entraña el aislamiento de cepas puras de este agente etiológico, atribuible tanto a las necesidades específicas que deben cumplir los medios para su cultivo, como a la presencia habitual de agentes microbianos y otros micoplasmas asociados al porcino.

Si bien el diagnóstico de la enfermedad es comúnmente realizado mediante técnicas histopatológicas, serológicas, o de biología molecular (Sibila y cols., 2009), el laborioso cultivo de este microorganismo sigue siendo considerado como la “técnica de oro”.

Debido a la variabilidad antigénica, proteica e incluso genética que muestran las diferentes cepas aisladas de *M. hyopneumoniae*, el aislamiento y cultivo de este microorganismo nos permite profundizar en el conocimiento que hasta el momento poseemos sobre dicho agente, y desentrañar algunos de los interrogantes en torno a sus características fundamentales.

Así pues, en este capítulo nos propusimos la elaboración de un cepario representativo de *M. hyopneumoniae*, a partir de cepas aisladas en la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria, en el período 2003-2009. Para ello, nuestros objetivos han sido los siguientes:

- 1.- Aislamiento e identificación de micoplasmas porcinos mediante características culturales y perfiles bioquímicos, en las campañas de aislamiento comprendidas entre 2006-2009.
- 2.- Confirmación de la identificación cultural y bioquímica de los aislamientos, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- 3.- Reactivación, clonaje y comprobación por PCR de las cepas anteriormente aisladas en el período 2003-2005.

II.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

II.2.1.- TOMA DE LAS MUESTRAS

Se procesaron 86 muestras de hisopos pulmonares recogidas por veterinarios en mataderos de la Península Ibérica, remitidas a nuestra unidad en el año 2006. Las muestras, tomadas en Madrid y Zaragoza, fueron realizadas sobre los lóbulos apicales y mediales de pulmones cuya área lesional superase el 50% del lóbulo muestreado.

Así mismo, se realizaron tres muestreos, cada uno sobre 12 pulmones porcinos recogidos en el Matadero Insular de Gran Canaria, para su posterior procesamiento en el laboratorio de Epidemiología y Medicina Preventiva del Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de Las Palmas de Gran Canaria (enero de 2007, julio de 2008, Octubre de 2009). Para cada una de las campañas de aislamiento realizadas entre 2007 y 2009, se seleccionaron 3 pulmones por cada posible lóbulo afectado (apical, medial, diafragmático e intermedio), cuya área lesional no superase el 25% de la extensión total de dicho lóbulo. Se tomaron 2 muestras de de cada pulmón, accediendo a diferentes áreas de un mismo lóbulo afectado.

II.2.2.- AISLAMIENTO Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

El aislamiento de micoplasmas porcinos fue realizado utilizando el medio de Friis, modificado por Ross y Whittlestone (1983), empleando ampicilina para sustituir la penicilina G, y suplementado con suero equino y porcino en proporciones idénticas, tal y como se indica en el “**ANEXO: Medios y Reactivos**” de este capítulo.

El procesado de las muestras fue el siguiente:

Trabajando en cámara de flujo laminar, depositamos el pulmón sobre papel secante y exponemos la zona sobre la que queremos tomar la muestra. A continuación, flameamos una lámina de metal, con la que cauterizamos la superficie del pulmón, creando una zona estéril en superficie. Con bisturí estéril, incidimos en el área cauterizada, exponiendo así los tejidos interiores de la zona a muestrear. En este punto, utilizando un hisopo estéril, accedemos al parénquima pulmonar, pudiendo realizarse como una simple punción o punto de contacto, o bien por arrastre del hisopo en una superficie no superior a los 2 cm de longitud.

Tras este proceso, el hisopo es introducido en un tubo con 2 ml de medio de Friis modificado, y colocado en estufa a 37°C, en condiciones de aerobiosis y agitación continua. Los tubos inoculados con el hisopo de muestreo fueron inspeccionados cada 24 horas hasta constatar un cambio de pH o aumento de la turbidez, para realizar un filtrado con membranas estériles de 0,45 µm.

El medio filtrado se subcultivó en un nuevo tubo de medio estéril previamente atemperado, y colocado nuevamente bajo las condiciones iniciales de temperatura y agitación. Semanalmente, se retiraron 0,5 ml de cada cultivo, que fueron repuestos con la misma cantidad de medio fresco, durante al menos dos meses, antes de señalarlas como negativas.

Aquellas muestras que tras el proceso de filtrado realizaron un nuevo cambio de pH fueron sembradas en placas de medio Friis sólido, elaborado sin antibiótico, empleando 100 µl del cultivo. Las placas fueron incubadas en condiciones aeróbicas, a 37°C y en cámara húmeda hasta observar la aparición de colonias en 48-96 horas, y se mantuvieron hasta dos semanas, antes de considerarlas negativas.

En adición, once cepas liofilizadas de *M. hyopneumoniae*, previamente obtenidas a través de pulmones del Matadero Insular de Gran Canaria, aisladas en la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva de la Facultad de Veterinaria en los años 2003 y 2005 fueron cultivadas, clonadas y confirmadas por PCR para su posterior inclusión en el cepario empleado en los siguientes capítulos.

II.2.3.- PRUEBAS DE REVERSIBILIDAD

Cada uno de los cultivos positivos fue sometido a pruebas de reversibilidad, con el objeto de descartar la presencia posible presencia de otras bacterias.

Dado que el aislamiento primario se realizó en un medio de cultivo formulado con antibiótico, en este caso ampicilina, fue necesario verificar la ausencia de bacterias que pudiesen haber perdido la capacidad de sintetizar su pared celular por la presencia del antibiótico betalactámico (formas L bacterianas). Para ello los cultivos fueron sembrados en placas de medio sólido Columbia suplementado con 10% de sangre de caballo.

II.2.4.- CLONAJE DE LAS CEPAS

Los diferentes cultivos fueron sometidos a un proceso consecutivo de triple clonaje, con el fin de asegurar la homogeneidad de los mismos.

Para este proceso, las muestras con capacidad de producir colonias fueron inoculadas en nuevos tubos de medio realizando una dilución decimal, para ser posteriormente resembrarlas de nuevo, en placas de medio sólido. Con puntas estériles, se recogieron colonias individuales, que se depositaron en tubos de medio Friis modificado estéril.

II.2.5.- IDENTIFICACIÓN DE MICOPLASMAS

II.2.5.1.- Identificación cultural

II.2.5.1.1.- Características generales de los cultivos

Los parámetros valorables en la identificación de micoplasmas porcinos se realizaron tanto en los cultivos de medio líquido, como en placas de medio sólido. Las descripciones de autores previos (Friis, 1969; Armstrong y Friis, 1981; Stemke y Robertson, 1990) definieron los criterios a valorar.

En el medio líquido, el primer aspecto a considerar fue el cambio de pH en el medio Friis, apreciado a simple vista como un cambio en el color original del medio (rojo anaranjado) hacia el color amarillo o violeta. El tiempo requerido para producir este cambio tras el filtrado de la muestra, fue así mismo una característica indicadora.

En el medio sólido, la estructuras de las colonias fueron categorizadas en colonias típicas de micoplasmas (colonias en “huevo frito”) o colonia irregulares o atípicas (pseudocolonias). Finalmente se determinó la presencia o ausencia de películas y cristales en las placas de medio sólido.

II.2.5.1.2.- Sensibilidad a la Digitonina

El requerimiento de colesterol, es uno de los criterios que permite establecer diferencias entre los numerosos Géneros englobados taxonómicamente en la Clase *Mollicutes*.

Así, cabe distinguir entre los Géneros que requieren colesterol, (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Spiroplasma*, *Anaeroplasma*), de aquellos que no requieren dicho lípido esteroide (*Acholeplasma*, *Asteroplasma*, *Mesoplasma*).

La digitonina, obtenida de la *Digitalis purpurea*, es un glucósido susceptible de ser incorporado en las membranas de aquellos micoplasmas con requerimientos de esterol. Este compuesto origina una desestructuración en la membrana lipídica, impidiendo la correcta elaboración de dicha membrana, lo que se traduce en la incapacidad para formar colonias bien definidas.

Freundt y cols., 1973, desarrollaron un método indirecto para constatar el requerimiento de esteroides, basándose en las características de este compuesto. Incorporando discos estériles previamente impregnados con digitonina sobre las placas de cultivo, se revela un halo de inhibición en torno al mismo, de al menos 6 milímetros, impidiendo el desarrollo de las colonias en aquellos microorganismos capaces de incorporar colesterol. Friis, (1975b) aplicó esta técnica con éxito sobre micoplasmas porcinos.

Para la realización de esta prueba, placas de medio sólido de Friis modificado, elaboradas sin antibiótico, fueron sembradas con 150 µl de los cultivos con capacidad de producción de colonias. Las placas fueron incubadas durante al menos 30 minutos a 37°C, para posteriormente depositar un disco previamente impregnado con digitonina. Finalmente las placas se incubaron una semana en cámara húmeda a 37°C, siendo revisadas diariamente hasta constatar la presencia o ausencia de un halo de inhibición.

II.2.5.1.3.- Características Bioquímicas y Enzimáticas

La adición de determinados sustratos al medio de cultivo y la capacidad de los microorganismos para asimilarlos, alterando con ello el medio en el que son cultivados, a través de los compuestos generados por su metabolismo, permite identificar las rutas metabólicas empleadas por los micoplasmas, y clasificarlos en base a su utilización. La metodología aplicada se diseñó en base a la metodología descrita por Poveda (1998) y Poveda y Nicholas, (1998), tal y como se describe a continuación.

Se elaboraron tres lotes de medio Friis modificado, suplementando su composición original con un 1% de glucosa, 1% de arginina ó 1% de urea. De cada uno de los cultivos se sembró 200 microlitros para cada uno de los medios suplementados, los cuales fueron incubados durante 24 horas en agitación continua. Posteriormente se añadieron 0,5 mililitros de parafina estéril creando una barrera anaeróbica entre el medio y el aire

restante del tubo de cultivo, y se suspendió la agitación continua, manteniendo los cultivos a 37°C.

La prueba de la glucosa se consideró positiva cuando un descenso de al menos media unidad, en el pH del medio Friis modificado suplementado con glucosa, alteró la coloración original del medio hacia amarillo.

Las pruebas de la arginina y de la urea fueron consideradas positivas cuando un aumento de al menos media unidad en el pH del medio Friis modificado suplementado con uno de estos metabolitos, alteró la coloración original del medio hacia violeta.

La caracterización enzimática de los micoplasmas porcinos se realizó en base a la presencia o ausencia, de películas y cristales en torno a las colonias obtenidas en medio sólido. La presencia de estas dos estructuras es atribuible a la acción de una lipasa, y sus efectos son constatables en las fases más tardías del crecimiento colonial.

La acción enzimática permite la formación de una película que cubre las colonias, cuya composición se basa en el colesterol y en fosfolípidos. Así mismo, su actuación enzimática sobre los ácidos grasos, genera depósitos de sales de calcio y magnesio que precipitan a modo de cristales.

Se elaboraron placas de medio sólido Friis modificado, enriquecidas con un mayor porcentaje de suero (20%). Tras atemperar a 37°C durante 30 minutos las placas de medio, estas fueron inoculadas con 200 microlitros de los cultivos, retirando tras 15 minutos cualquier exceso de líquido que no hubiera sido absorbido por el agar. Finalmente fueron puestas en incubación en cámara húmeda a 37°C, y revisadas diariamente.

En las pruebas positivas, se observó la formación de cristales alrededor de las colonias, empleando un microscopio de 4x aumentos. La presencia de la película es evidenciada a simple vista en el último día de incubación, mediante la adición de abundante agua destilada sobre la superficie de la placa. La fina capa que recubre las colonias se desprende fácilmente, y queda flotando en superficie.

Ambos efectos deben aparecer juntos en las pruebas positivas, ya que son dependientes de la acción enzimática de los microorganismos examinados, sobre los ácidos grasos y lípidos que hay presentes en el medio de cultivo.

II.2.5.2.- Pruebas Definitivas

II.2.5.2.1.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La identificación definitiva de los cultivos y cepas anteriormente aisladas fue llevada a cabo mediante técnicas de biología molecular. Cada uno de los cultivos fue analizado para la detección de ADN de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis*, *M. flocculare* y *M. hyosynoviae*.

La identificación se realizó mediante PCR a tiempo real (q-PCR) y fue confirmada mediante PCR convencional. Los cebadores diseñados para cada una de las especies fueron realizados según la descripción realizada previamente por los autores correspondientes.

La identificación de *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* y *M. hyosynoviae* se realizó con cebadores que amplifican regiones específicas del gen que codifica para el ARNr 16S, y se realizaron mediante las PCR descritas por Mattsson y cols., 1995; Stemke y cols., 1994; y Kokotovic y cols., 2002a, respectivamente. En el caso de *M. hyorhinitis*, se utilizaron cebadores de acuerdo a la PCR descrita por Caron y cols., 2000, capaces de amplificar de modo específico una secuencia del gen que codifica la proteína p37.

II.2.5.2.1.1.- Extracción del ADN

La extracción del ADN de los cultivos se realizó en dos etapas consecutivas a lo largo del proceso de aislamiento, empleando dos protocolos diferentes.

II.2.5.2.1.1.1.- Extracción del ADN mediante sílica.

En primer lugar, se aplicó la extracción rápida de ADN descrita por Tola y cols. (1997), sobre el primer subcultivo realizado a partir de las muestras previamente filtradas.

Se emplearon 100 µl de cultivo en fase logarítmica de crecimiento, a los que se añadió 100 µl de solución desnaturante, manteniendo los viales eppendorf en agitación continua durante 10 minutos. 900 µl de tampón de lisis y 40 µl de sílica fueron añadidos a cada vial de muestra y se mantuvieron en agitación continua durante otros 10 minutos. Cada muestra fue centrifugada a 12000 xg durante 15 segundos y descartado el sobrenadante.

Se añadió 1 ml de tampón de lavado, resuspendiendo el precipitado mediante vórtex y se centrifugó de nuevo a 12000 g durante 15 segundos, repitiendo este proceso una vez más. A continuación se añadió 1 ml de etanol al 70%, resuspendiendo el precipitado mediante vórtex, y se centrifugó de nuevo a 12000 g durante 15 segundos, repitiendo este proceso una vez más. Se añadió 1 ml de acetona, resuspendiendo el precipitado mediante vórtex y se centrifugó nuevamente a 12000 g durante 15 segundos. El último sobrenadante fue descartado, y se colocaron los eppendorf boca abajo sobre papel de secar.

Posteriormente se incubaron las muestras a 56°C durante 10 minutos con la tapa abierta para permitir la evaporación, y se añadieron 100 µl de TE buffer pH 8.0, resuspendiendo las muestras con el vórtex. En este punto, se llevó a cabo un último período de incubación de las muestras a 56°C (con la tapa cerrada). Finalmente se homogeneizaron bien cada una de las muestra empleando el vórtex, y se centrifugaron a 12000 g durante 2 minutos.

El ADN queda en el sobrenadante, y es transferido a un nuevo vial eppendorf estéril, siendo almacenado en nevera a -20°C hasta su uso.

II.2.5.2.1.1.2.- Extracción fenólica del ADN.

En segundo lugar, tras la fase de clonaje de las muestras, se adaptó un protocolo de extracción fenólica (Chomczynski y Sacchi, 1987), para obtener el ADN de los cultivos.

Para ello se tomó 1 ml de cultivo en fase logarítmica de crecimiento, centrifugando los mismos a 14000 xg durante 10 minutos. Descartando el sobrenadante, el precipitado de cada muestra fue resuspendido añadiendo 0,5 ml de PBS estéril, y nuevamente centrifugado a 14000 xg. Este proceso se repitió dos veces, para finalmente resuspender el precipitado con 400 microlitros de PBS, a los que se añadió 20 µl de SDS al 20%, 2 µl de proteinasa K a una concentración de 100 µg/ml, y 378 µl de solución de Stock elaborada a partir de Tris, EDTA y NaCl. Los viales eppendorf fueron incubados a 50°C durante 1 hora en agitación continua.

Posteriormente se añadieron 400 µl de fenol equilibrado con Tris HCl 0,1M a pH 8.0 y se agitaron manualmente durante 15 minutos. De nuevo se centrifugaron las muestras, en este caso a 8000 xg durante 15 minutos, para recuperar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo vial eppendorf estéril, al que se añadió 400 µl de Cloroformo : Alcohol isoamílico (24/1). Se agitó suavemente por inversión durante 5 minutos, y se centrifugaron los viales a 8000 xg durante 15 minutos. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante y fue transferido a un nuevo eppendorf, añadiendo 400 µl de isopropanol frío. Los viales se mantuvieron toda la noche en refrigeración a 4°C.

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12000 xg durante 30 minutos, a 4°C de temperatura. Se descartó el sobrenadante y se añadió 400 µl de etanol al 70% para lavar el precipitado. De nuevo se centrifugaron los viales, a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, y se dispusieron los eppendorf durante 15 minutos a 30°C para retirar el exceso de humedad.

Finalmente el precipitado fue resuspendido en 50 µl de TE buffer pH 8.0 y almacenado en nevera a -20°C hasta su uso.

II.2.5.2.1.2.- Cebadores empleados

Los cebadores fueron diseñados de acuerdo a las indicaciones de los trabajos de los autores previamente citados (Mattsson y cols., 1995; Stemke y cols., 1994; Caron y cols., 2000 y Kokotovic y cols., 2002a), y fueron producidos por Sigma-Genosys Ltd. La secuencia de los mismos y el tamaño del producto amplificado se detallan en la **Tabla II.1** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo.

II.2.5.2.1.3.- Reacción de q-PCR para la detección de micoplasmas porcinos.

Para la identificación del ADN de micoplasmas porcinos, se empleó un protocolo diseñado para q-PCR, adaptando las diferentes PCRs descritas por otros autores (Mattsson y cols., 1995; Stemke y cols., 1994; Caron y cols., 2000 y Kokotovic y cols., 2002a) bajo un único protocolo (**Tabla II.2**), siendo cada muestra, analizada de modo independiente con cada una de las parejas de cebadores anteriormente citados (**Tabla II.1**). La temperatura de fusión (“melting temperature”) para cada una de las especies de micoplasmas porcinos analizadas (*M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinitis* y *M. hyosynoviae*), fue determinada mediante reacción q-PCR sobre las cepas tipo de cada especie (**Tabla II.3**).

La reacción de amplificación se elaboró para cada muestra sobre un total de 25 µl, empleando para ello 12,5 µl de iQTM SYBR Green Supermix (BIO-RAD), elaborado con 0,4 mM de cada dNPT, 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂, enzima iTaq DNA polimerasa, SYBR Green I, tampones de reacción, 2 µl de cada pareja de cebadores (1 µl por cebador, a una concentración de 20 pM cada uno), 5,5 µl de agua ultra-pura estéril, y 5 µl de ADN muestra, previamente obtenido mediante el protocolo descrito por Tola y cols. (1997).

II.2.5.2.1.4.- Reacción de PCR de *Mycoplasma hyopneumoniae*

La identificación de *M. hyopneumoniae* se confirmó por reacción de PCR empleando los cebadores descritos por Mattsson y cols., 1995 (**Tabla II.1**), utilizando 1 µl de cada cebador, a una concentración de 25 pM. La reacción de amplificación se llevó a cabo empleando 0,5 µl de enzima Taq polimerasa, 0,5 µl de dinucleótidos fosfatos a una concentración de 1,25 mM, 2 µl de Cl₂Mg, 2,5 µl de tampón, 2,5 µl de ADN obtenido por extracción fenólica, y 15 µl de H₂O estéril ultrapura, para obtener un volumen total de 25 µl para cada muestra.

El ADN extraído de la cepa J (NCTC 10110) fue utilizado como control positivo, y H₂O estéril ultrapura como control negativo de la reacción. El protocolo empleado se muestra en la **Tabla II.4**.

II.2.5.2.1.5.- Reacción de PCR de *Mycoplasma flocculare*

La identificación de *M. flocculare* se confirmó por reacción de PCR empleando los cebadores descritos por Stemke y cols., 1994, (**Tabla II.1**) utilizando 1 µl de cada cebador, a una concentración de 100 pM. La reacción de amplificación se llevó a cabo empleando 0,5 µl de enzima Taq polimerasa, 0,5 µl de dinucleótidos fosfatos a una concentración de 1,25 mM, 2 µl de Cl₂Mg, 2,5 µl de tampón, 2,5 µl de ADN obtenido por extracción fenólica, y 15 µl de H₂O estéril ultrapura, para obtener un volumen total de 25 µl para cada muestra.

El ADN extraído de la cepa MS42 (NCTC 10143) fue utilizado como control positivo, y H₂O estéril ultrapura como control negativo de la reacción. El protocolo empleado se muestra en la **Tabla II.5**.

II.2.5.2.1.6.- Reacción de PCR de *Mycoplasma hyosynoviae*

La identificación de *M. hyosynoviae* se confirmó por reacción de PCR empleando los cebadores descritos por Kokotovic y cols., 2002a (**Tabla II.1**), utilizando 1 µl de cada cebador, a una concentración de 100 pM. La reacción de amplificación se llevó a cabo empleando 0,5 µl de enzima Taq polimerasa, 0,5 µl de dinucleótidos fosfatos a una concentración de 1,25 mM, 2 µl de Cl₂Mg, 2,5 µl de tampón, 2,5 µl de ADN obtenido por extracción fenólica, y 15 µl de H₂O estéril ultrapura, para obtener un volumen total de 25 µl para cada muestra.

El ADN extraído de la cepa S16 (NCTC 10167) fue utilizado como control positivo, y H₂O estéril ultrapura como control negativo de la reacción. El protocolo empleado se muestra en la **Tabla II.6**.

II.2.5.2.1.7.- Reacción de PCR de *Mycoplasma hyorhinis*

La identificación de *M. hyorhinis* se confirmó por reacción de PCR empleando los cebadores descritos por Caron y cols., 2000 (**Tabla II.1**), utilizando 1 µl de cada cebador, a una concentración de 50 pM. La reacción de amplificación se llevó a cabo empleando 0,5 µl de enzima Taq polimerasa, 0,5 µl de dinucleótidos fosfatos a una concentración de 1,25 mM, 2 µl de Cl₂Mg, 2,5 µl de tampón, 2,5 µl de ADN obtenido por extracción fenólica, y 15 µl de H₂O estéril ultrapura, para obtener un volumen total de 25 µl para cada muestra.

El ADN extraído de la cepa BTS-7 (NCTC 10130) fue utilizado como control positivo, y H₂O estéril ultrapura como control negativo de la reacción. El protocolo empleado se muestra en la **Tabla II.7**.

II.2.5.2.1.8.- Electroforesis de los productos amplificados por PCR

Los productos amplificados por PCR convencional fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón de electroforesis (TAE, 1X), durante 40 minutos, empleando un marcador de peso molecular Amplisize Molecular Ruler de BIORAD, de diez marcajes, comprendidos entre 2000 y 50 pares de bases.

Los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio al 1,5% durante 20 minutos, y finalmente aclarados en agua destilada durante otros 20 minutos. El resultado fue comprobado mediante sistemas de análisis de imagen con luz ultravioleta.

II.2.6.- ALMACENAMIENTO DE LAS CEPAS OBTENIDAS

Para la conservación de las cepas aisladas, se añadió un volumen equivalente a cada cultivo de una solución de crioprotección elaborada con suero de caballo y suero de cerdo en idénticas proporciones, con un 5% de inositol.

Se distribuyeron 1 ml del cultivo y 1 ml de la solución crioprotectora en cada uno de los viales de liofilización, en condiciones de esterilidad. Los viales fueron almacenados durante 24 horas a -80°C y finalmente liofilizados en un liofilizador Telstar CRYODOS 45.

Las cepas liofilizadas permanecieron en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

II.3.- RESULTADOS

En el “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo se recogen los aislamientos realizados sobre las muestras remitidas a la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva en 2006, las campañas de aislamientos realizadas entre 2007 y 2009, y las cepas de *M. hyopneumoniae* que habían sido previamente aisladas (**Tablas II.9, II.10, II.11, II.12, II.13, II.14, II.15**). Así mismo se refleja el cepario seleccionado para la secuenciación y análisis de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y para el gen que codifica el ARNr 23S, realizada en capítulos posteriores (**Tabla II.16**).

Durante las campañas de aislamiento realizadas en pulmones del Matadero Insular de Gran Canaria, se muestrearon 36 pulmones, tomando un total de 72 muestras. Se realizaron aislamientos de micoplasmas en 28 de los 36 pulmones (77,7%), mientras que 12 de los pulmones resultaron negativos (23,3%). Sobre el número total de muestras (72), 46 resultaron positivas (63,89%) y 26 (36,11%) fueron negativas (**Tabla II.11**).

Sobre las muestras positivas (46), al menos 34 (73,91%) fueron aislamientos de cepas puras, siendo las restantes 12 (26,09%), aislamientos de cultivos mixtos. Del total de 46 muestras con aislamientos, 24 (52,17%) pertenecieron a cultivos puros de *M. hyorhinis*, 11 (23,91%) resultaron cultivos mixtos de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*, 7 (15,62%) pertenecieron a cultivos puros de *M. hyopneumoniae*, 3 (6,52%) pertenecieron a cultivos puros de *M. hyosynoviae*, y 1 (2,17%) resultó en un cultivo mixto de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* (**Tabla II.11**).

De estos 36 pulmones analizados con muestras pareadas, se detectó la presencia mediante técnicas de aislamiento de *M. hyorhinis* en 24 pulmones (66,6%), *M. hyopneumoniae* en 12 pulmones (33,3%), *M. hyosynoviae* en 2 pulmones (5,5%) y *M. flocculare* en 1 pulmón (2,7%). La presencia de una única especie de micoplasma fue contrastada en 16 pulmones (44,4%), mientras que en 12 de los pulmones (33,3%) se aislaron 2 especies distintas de micoplasmas (**Tabla II.12**). El detalle de los aislamientos realizados en cada campaña se muestra en las **Tablas II.13, II.14, y II.15**.

Un total de 86 muestras enviadas desde mataderos de Madrid y Zaragoza en 2006 fueron procesadas para obtener aislamientos de cepas puras (**Tabla II.10**). De dichas muestras se aislaron 18 cepas puras de micoplasmas (20,93%), las cuales correspondieron con 12 aislamientos de *M. hyorhinis* (13,95%) y 6 de *M. hyopneumoniae* (6,97%).

Sobre las cepas previamente aisladas, entre los años 2003 y 2005, se realizó el clonaje y verificación de la pureza de los cultivos (**Tabla II.9**), con lo que finalmente se elaboró un cepario representativo de *M. hyopneumoniae*, con aislamientos realizados en los años 2003, 2005, 2006, 2007, 2008 y 2009 (**Tabla II.16**).

Las características bioquímicas y las pruebas enzimáticas, así como la estructura de las colonias fueron consistentes con las descripciones previamente realizadas sobre los micoplasmas porcinos que son objeto de este estudio, y quedan recogidas en la **Tabla II.8**. La eficacia de dichas pruebas para la identificación de los cultivos fue satisfactoria en los aislamientos de cultivos puros.

Las cepas aisladas de *M. hyopneumoniae* acidificaron el medio de Friis, fermentaron la glucosa, y no hidrolizaron la arginina ni la urea. La estructura de las colonias fue “atípica”, y no produjeron películas ni cristales en el medio sólido.

Las cepas aisladas de *M. hyorhinis* acidificaron el medio de Friis, fermentaron la glucosa, y no hidrolizaron la arginina ni la urea. La estructura de las colonias fue “típica”, y no produjeron películas ni cristales en el medio sólido.

Las cepas aisladas de *M. hyosynoviae* alcalinizaron el medio de Friis, no fermentaron la glucosa, hidrolizaron la arginina pero no la urea. La estructura de las colonias fue “típica”, produciendo películas y cristales en el medio sólido.

La cepa aislada de *M. flocculare* acidificó el medio de Friis, no fermentó la glucosa, ni hidrolizó la arginina o la urea. La estructura de las colonias fue “atípica”, sin producción de películas ni cristales en el medio sólido.

Todos los aislamientos fueron sensibles a la prueba de la digitonina, (realizada con discos impregnados de dicha sustancia depositados en placas de medio sólido que fueron previamente inoculadas con las cepas aisladas) como corresponde con las especies del Género *Mycoplasma*.

El tiempo medio requerido para el desarrollo de los cultivos osciló en función de la especie en cuestión, siendo de 7 a 30 días para *M. hyopneumoniae*, 3 a 10 días para *M. hyorhinis*, 7 a 14 días para *M. hyosynoviae*, y 30 días para *M. flocculare* (**Tabla II.17**).

La identificación de los cultivos mediante las PCRs descritas en apartados anteriores, probó su eficacia tanto en los cultivos puros, como en los casos en que los cultivos resultaron mixtos.

La q-PCR se empleó de modo orientativo, (**Tabla II.3**) como paso previo al empleo de las PCR convencionales descritas por Mattsson y cols., 1995, Caron y cols., 2000, Stemke y cols., 1994 y Kokotovic y cols., 2002a. Su elevada sensibilidad, junto a su uso relativamente temprano sobre los cultivos permitió la identificación de ADN de los micoplasmas porcinos que son objeto de este estudio, tanto en las muestras donde fue posible realizar aislamientos, así como en algunas de las muestras en las que el aislamiento no prosperó.

La PCR descrita por Mattsson y cols., 1995, diseñada para la identificación de *M. hyopneumoniae*, (**Tabla II.4**), amplificó con éxito una banda de 649 pares de bases en 19 de las muestras recogidas en pulmones del Matadero Insular de Gran Canaria, así como en 6 muestras remitidas desde la Península Ibérica (Madrid y Zaragoza), y en las 11 cepas previamente aisladas en la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva.

La PCR descrita por Stemke y cols., 1994, diseñada para la identificación de *M. flocculare*, (**Tabla II.5**), amplificó con éxito una banda de 400 pares de bases en 1 de las muestras recogidas en pulmones del Matadero Insular de Gran Canaria.

La PCR descrita por Kokotovic y cols., 2002a, diseñada para la identificación de *M. hyosynoviae*, (**Tabla II.6**), amplificó con éxito una banda de 398 pares de bases en 3 de las muestras recogidas en pulmones del Matadero Insular de Gran Canaria.

La PCR descrita por Caron y cols., 2000, diseñada para la identificación de *M. hyorhinis*, (**Tabla II.7**), amplificó con éxito una banda de 346 pares de bases en 35 de las muestras recogidas en pulmones del Matadero Insular de Gran Canaria, así como en 12 muestras remitidas desde la Península Ibérica (Madrid y Zaragoza).

En el diseño del cepario que se emplearía para la secuenciación de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y del gen que codifica el ARNr 23S en posteriores capítulos (**Tabla II.16**), se optó por excluir las cepas provenientes de cultivos mixtos, con el fin de asegurar la máxima homogeneidad genética y la prevención de errores en la secuenciación.

Así mismo, se dio prioridad a aquellas cepas de *M. hyopneumoniae* en las que el crecimiento colonial en medio sólido fuese suficientemente evidente para asegurar el triple clonaje de las cepas. Finalmente y en base a los recursos disponibles, se optó por la inclusión de 20 cepas para el análisis de la Región Intergénica 16S-23S ARNr, y 14 de las anteriores fueron seleccionadas para el análisis del gen que codifica el ARNr 23S.

II.4.- DISCUSIÓN

M. hyopneumoniae es considerado por numerosos autores como un microorganismo de difícil aislamiento e identificación, debido a las exigentes condiciones para su cultivo y por la presencia habitual de otros micoplasmas porcinos, así como de bacterias (Friis, 1971a; Goodwin, 1976; Friis, 1979; Kobisch y Friis, 1996, Brown y cols., 2010a).

El medio de Friis (modificado por Ross y Whittlestone, 1983), empleado para el cultivo de micoplasmas porcinos resultó adecuado para el aislamiento, incluso con las modificaciones realizadas en el diseño de este estudio. Así pues, el incremento de la concentración del antibiótico betalactámico empleado (ampicilina) de 0,1mg/L a 0,5mg/L, combinado con el filtrado de las muestras por 0,45µm, permitió la reducción de contaminantes bacterianos sin suponer un factor inhibitorio en el aislamiento de micoplasmas.

Otra de las modificaciones realizadas sobre el medio fue la inclusión de suero porcino y suero equino en idénticas proporciones. No parece haber un claro consenso entre los investigadores anteriormente mencionados, en cuanto a la formulación más óptima del medio de cultivo empleado, siendo la concentración final del suero, y su procedencia a partir de équidos o suidos, objeto de debate entre los autores.

La utilización únicamente de suero equino en el estudio de aislamiento realizado por Assunção y cols., (2005), demuestra que el aislamiento de micoplasmas porcinos es perfectamente viable incluso sin la presencia de suero porcino en el medio de cultivo. Sin embargo, el empleo de suero de cerdo conlleva una reducción significativa en los tiempos medios para el aislamiento de las distintas especies de micoplasmas. Así mismo, implica en general un mayor éxito de cara al aislamiento de los micoplasmas presentes en la zona a muestrear. Este factor resulta negativo cuando la presencia de *M. hyorhinae* imposibilita la obtención de cepas puras de *M. hyopneumoniae*, pero resulta positivo cuando es *M. flocculare* el que coexiste con *M. hyopneumoniae*, ya que este último prospera con mayor

rapidez que *M. flocculare*, lo que facilita la separación por diluciones y clonaje, o bien mediante antisueros específicos.

Si bien en la producción industrial de material biológico, destinado a la inmunización de los animales, es recomendable la supresión del suero porcino, por los posibles riesgos que conlleva su uso, resulta razonable argumentar que para obtener aislamientos de micoplasmas sobre parénquima pulmonar, el suero de cerdo empleado en este estudio no demostró efectos inhibitorios, y supuso una reducción del tiempo necesario para la confirmación de los cultivos.

El método empleado para el aislamiento difiere considerablemente del descrito por Friis (1975a), consistente en la realización de diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-8} , partiendo de una suspensión preparada con una sección de parénquima pulmonar. Este método supone un incremento del trabajo a realizar por cada pulmón muestreado, así como la reducción del número de muestras sobre las que es posible trabajar, tanto por factores económicos, como por la capacidad espacial de los rotores de agitación alojados en las estufas. La técnica de aislamiento empleada en este estudio, cuya base se asienta en la toma de muestras pareadas por pulmón, con hisopo estéril, filtrado de las mismas a las 24 horas, y fomento del crecimiento de los micoplasmas, demostró una buena eficacia para el aislamiento de *M. hyopneumoniae* y de otros micoplasmas porcinos.

La frecuencia de aislamientos de micoplasmas sobre los 36 pulmones recogidos entre 2007 y 2009 fue satisfactoria, aislando micoplasmas en 28 de ellos (**Tablas II.11, II.12, II.13, II.14, y II.15** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo). El número de muestras positivas (46 de 72), una vez asumidos los condicionantes y dificultades que entrañan el aislamiento, reflejan que el protocolo de trabajo realizado fue adecuado para el aislamiento de los micoplasmas porcinos más frecuentes en parénquima pulmonar.

La presencia de una única especie de micoplasma fue contrastada por aislamiento en 16 de estos pulmones (44,4%), mientras que en 12 de ellos, (33,3%) fue posible aislar más de una especie. En estas campañas se obtuvieron 34 cepas puras y 12 aislamientos de

cultivos mixtos. Estos datos refuerzan la idea de la presencia de múltiples especies de micoplasmas porcinos en las vías respiratorias y tejido pulmonar del cerdo.

La mayoría de los aislamientos realizados fueron de *M. hyorhinis*, con 24 aislamientos de cepas puras, y 11 aislamientos en cultivos mixtos con *M. hyopneumoniae*. La presencia de *M. hyorhinis* en los cultivos mixtos imposibilitan generalmente la obtención de una cepa pura de *M. hyopneumoniae*, por lo que su aparición, si bien no tiene un efecto negativo en las pruebas diagnósticas de biología molecular, sí supone un inconveniente cuando nuestro objetivo es conseguir cepas puras.

No obstante, además de los 11 cultivos mixtos de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* anteriormente mencionados, y de un único aislamiento mixto de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*, se aislaron 7 cepas puras de *M. hyopneumoniae*, lo que arroja un total de 19 aislamientos de *M. hyopneumoniae*, si bien las cepas puras de *M. hyopneumoniae* representaron un 9,72% sobre el total de muestras tomadas (72), y un 15,22% sobre el total de muestras que resultaron positivas (46). Estos datos demuestran que el uso de inhibidores o antisueros frente a *M. hyorhinis* no fue indispensable para el aislamiento de cepas puras de *M. hyopneumoniae*.

Los micoplasmas porcinos aislados con menor frecuencia se identificaron como 3 cultivos de *M. hyosynoviae*, y un único aislamiento de *M. flocculare*, en cultivo mixto con *M. hyopneumoniae*. Estos datos confirman que la baja frecuencia de presentación de estas dos especies en parénquima pulmonar, se corresponde con su localización más frecuente como agentes primarios en otras regiones del organismo de los suidos.

Un estudio realizado por Friis (1971a), sobre 71 pulmones de porcino, demostró la presencia de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* en el 62%, 38% y 11 % respectivamente. Nuestro estudio confirmó la presencia de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* en el 66,6%, 33,3% y 5,5% respectivamente. Estos datos confirman que *M. hyorhinis* es el micoplasma que se aísla con mayor frecuencia, y parecen estar en consonancia con las prevalencias descritas por este autor.

La eficacia de las pruebas bioquímicas y enzimáticas, junto a la tipificación de las colonias en base al desarrollo de las mismas en medio sólido, resultó adecuada en los cultivos donde se aislaron cepas puras, siendo dicha eficacia puesta a prueba cuando los cultivos resultaron ser mixtos. En el caso de las cepas puras, los resultados de dichas pruebas se ajustaron a los perfiles descritos en la **Tabla II.8**

Los cultivos mixtos fueron detectados como tales, generalmente mediante las técnicas de biología molecular (PCR). En dichos cultivos, es frecuente que uno de los dos microorganismos implicados, eventualmente se imponga sobre el otro, a medida que los diferentes subcultivos se suceden a lo largo del tiempo. Esta situación es habitual cuando uno de los micoplasmas presentes en el cultivo es *M. hyorhinis*. En estos casos, se considera factible la obtención de cepas puras de *M. hyorhinis* mediante diluciones seriadas, seguidas por siembras en medio sólido y triple clonaje. Sin embargo no parece posible obtener cepas puras de *M. hyopneumoniae* cuando *M. hyorhinis* está presente en el cultivo original, dado que el ritmo de crecimiento y la resistencia a la acidez del medio parece ser mayor en este último, aunque de manera puntual, algunas cepas de *M. hyorhinis* resulten especialmente sensibles a descensos acusados del pH del medio.

Los cultivos mixtos de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*, aunque menos frecuentes, son más adecuados para la separación de ambas especies, debido a que el ritmo de crecimiento es similar, y al posible empleo de antisueros específicos frente a este último micoplasma. Sin embargo, de cara al objetivo a realizar en posteriores capítulos con las cepas puras de *M. hyopneumoniae*, se optó por incluir en dicho estudio únicamente aquellas cepas que fueron aisladas sin la presencia de otras especies de micoplasmas.

La identificación de los diferentes cultivos resultó óptima mediante el empleo de las PCRs descritas, si bien el uso de la q-PCR se realizó en las fases iniciales de aislamiento, como prueba orientativa. Debido a la elevada sensibilidad de la q-PCR, su empleo en fases tempranas del aislamiento aportó información sobre la flora micoplásmica presente en el tejido pulmonar en el momento del muestreo. Sin embargo, la detección de dicho ADN no conllevó necesariamente la prosperidad de los micoplasmas presentes en el cultivo, por lo

que su uso resultó de mayor utilidad para confirmar la pureza de las cepas, una vez que se realizaron subcultivos y triple clonaje.

Las técnicas de biología molecular empleadas mediante PCRs convencionales demostraron una eficacia suficiente para la identificación de los cultivos, y permite sustituir satisfactoriamente a las técnicas bioquímicas y enzimáticas, cuya eficacia resulta limitada tanto en los cultivos mixtos como en la correcta identificación entre *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*.

Los aislamientos realizados sobre las 86 muestras remitidas al laboratorio desde mataderos de Madrid y Zaragoza en 2006, arrojaron una menor eficacia en el aislamiento de micoplasmas, de las que se obtuvo 12 cepas puras de *M. hyorhinis* y 6 cepas puras de *M. hyopneumoniae*. Sin embargo, cabe resaltar el hecho de que en estas muestras tan sólo se trabajó con los cultivos que acidificaron el medio Friis, (descartando así la posibilidad de aislar *M. hyosynoviae*), y se desecharon los cultivos mixtos. Así mismo, el incremento de tiempo necesario para su procesado supuso una dificultad añadida para el aislamiento de micoplasmas.

Estos datos parecen confirmar la importancia, tanto de la elección de los pulmones a muestrear, en base a criterios lesionales, como la necesidad de realizar el procesado de las muestras lo antes posible, siendo el tiempo un factor clave para el desarrollo de la técnica de aislamiento.

Finalmente, el clonaje y comprobación por PCR de la pureza de las 11 cepas seleccionadas, aisladas en los años 2003 y 2005 fue satisfactorio, y permitió ampliar el rango de las cepas que fueron incluidas en el análisis de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y del gen que codifica el ARNr 23S, detallado en posteriores capítulos.

ANEXO: Tablas y Figuras

Tabla II.1.- Cebadores específicos para micoplasmas porcinos.

Cebador	Especificidad	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del fragmento amplificado
Mhyo 1	<i>M. hyopneumoniae</i>	GAC CCT TCA AGC TTC ACC AAG A	649 pb
Mhyo 2		TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C	
Mfloc 1	<i>M. flocculare</i>	ACG GGA TAG TAT TTT AGT TTT ACT A	400 pb
Mfloc 2		TCT TCC CTT ACA ACA GCA GTT TAC A	
Mhyos 1	<i>M. hyosynoviae</i>	CAG TTG AGG AAA TGC AAC TG	398 pb
Mhyos 2		TAG CTG CGT CAG TGA TTG G	
Sp37	<i>M. hyorhinis</i>	GTA GTC AAG CAA GAG GAT GT	346 pb
Asp37		GCT GGA GTT ATT ATA CCA GGA	

Tabla II.2.- Protocolo para q-PCR de micoplasmas porcinos.

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	120 seg.
2	35	95°C	45 seg.
		60°C	45 seg.
		72°C	60 seg.
3	1	95°C	60 seg.
4	1	55°C	60 seg.
5	66	65°C	10 seg.
6	1	4°C	Hold

Tabla II.3.- Temperatura de fusión (“melting”) en q-PCR para cada una de las cepas de referencia de las especies analizadas de micoplasmas porcinos.

Especies/cepa	Temperatura de “melting”
Cepa J (<i>M. hyopneumoniae</i>)	86 °C
Cepa MS42 (<i>M. flocculare</i>)	87°C
Cepa S16 (<i>M. hyosynoviae</i>)	87°C
Cepa BTS-7 (<i>M. hyorhinis</i>)	80°C

Tabla II.4.- Protocolo de ciclos y temperaturas para la PCR de *M. hyopneumoniae*.

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	240 seg.
2	35	95°C	45 seg.
		59°C	60 seg.
		72°C	120 seg.
3	1	72°C	600 seg.
4	1	4°C	Hold

Tabla II.5.- Protocolo de ciclos y temperaturas para la PCR de *M. flocculare*.

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	300 seg.
2	35	95°C	45 seg.
		55°C	45 seg.
		72°C	60 seg.
3	1	72°C	600 seg.
4	1	4°C	Hold

Tabla II.6.- Protocolo de ciclos y temperaturas para la PCR de *M. hyosynoviae*.

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	180 seg.
2	35	94°C	60 seg.
		54°C	60 seg.
		72°C	90 seg.
3	1	72°C	600 seg.
4	1	4°C	Hold

Tabla II.7.- Protocolo de ciclos y temperaturas para la PCR de *M. hyorhinis*.

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	180 seg.
2	35	94°C	60 seg.
		50°C	60 seg.
		72°C	90 seg.
3	1	72°C	600 seg.
4	1	4°C	Hold

Tabla II.8.- Características bioquímicas y enzimáticas de los principales micoplasmas porcinos, y estructura de las colonias.

Especie	Fermenta Glucosa	Hidroliza Arginina	Hidroliza Urea	Películas y Cristales	Colonias
<i>M. hyopneumoniae</i>	Si	No	No	No	Atípicas
<i>M. flocculare</i>	Sí	No	No	No	Atípicas
<i>M. hyosynoviae</i>	No	Si	No	Si	Típicas
<i>M. hyorhinis</i>	Si	No	No	No	Típicas

Tabla II.9.- Cepas puras de *M. hyopneumoniae*, aisladas anteriormente entre 2003 y 2005 en la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas, procedentes del Matadero Insular de Gran Canaria

Identificación	Cepa	Año
<i>M. hyopneumoniae</i>	F	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	I	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	K	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	O	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	3	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	68	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	69	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	75	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	78	2003
<i>M. hyopneumoniae</i>	88	2005
<i>M. hyopneumoniae</i>	235	2005

Tabla II.10.- Aislamientos de cepas puras de micoplasmas porcinos en muestras remitidas desde Zaragoza y Madrid, 2006.

Total de Muestras Realizadas	Cepas puras	MR	MH
86	18/86	12/86	6/86
(100%)	(20,93%)	(13,95%)	(6,97%)

<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. hyopneumoniae</i>
RMR-6	RMH-3
RMR-7	RMH-4
RMR-8	RMH-5
RMR-9	RMH-6
RMR-10	RMH-7
RMR-11	RMH-8
RMR-12	
RMR-13	
RMR-14	
RMR-15	
RMR-16	
RMR-17	

Tabla II.11.- Aislamientos de micoplasmas porcinos, en muestras de Gran Canaria, realizados entre 2007 y 2009.

Nº de Pulmones analizados	Pulmones con aislamientos	Pulmones sin aislamientos
36 (100%)	28 (77,7%)	8 (23,3%)

Nº de Muestras analizadas	Muestras con Aislamientos	Muestras sin aislamientos
72 (100%)	46 (63,89%)	26 (36,11%)

Total de Muestras positivas	Aislamientos de Cepas Puras	Aislamientos de Cultivos Mixtos
46 (100%)	34 (73,91%)	12 (26,09%)

Total de Muestras positivas	MR	MR/MH	MH	MS	MH/MF
46 (100%)	24/46 (52,17%)	11/46 (23,91%)	7/46 (15,22%)	3/46 (6,52%)	1/46 (2,17%)

(MR): *M. hyorhinis*; (MH): *M. hyopneumoniae*; (MS): *M. hyosynoviae*; (MR/MH): cultivo mixto de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*; (MF/MH): cultivo mixto de *M. flocculare* y *M. hyopneumoniae*.

Tabla II.12.- Presencia de micoplasmas porcinos demostrada por aislamiento en los pulmones muestreados entre 2007 y 2009.

Total de Pulmones	MR	MH	MS	MF	P1	P2
36	24/36	12/36	2/36	1/36	16/36	12/36
100%	66,6%	33,3%	5,5%	2,7%	44,4%	33,3%

(MR): *M. hyorhinis*; (MH): *M. hyopneumoniae*; (MS): *M. hyosynoviae*; (MF): *M. flocculare*; (P1): Presencia de una única especie de micoplasma; (P2): Presencia de dos especies diferentes de micoplasmas.

Tabla II.13.- Aislamientos de micoplasmas porcinos en muestras de Gran Canaria, 2007..

Nº de Pulmón	Lóbulo	Muestra	Identificación
1	Apical	GC 31	<i>M. hyorhinis</i>
		GC 32	<i>M. hyorhinis</i>
2	Apical	GC 33	MR/MH
		GC 34	MR/MH
3	Apical	GC 35	<i>M. hyorhinis</i>
		GC 36	-
4	Medial	GC 37	<i>M. hyorhinis</i>
		GC 38	<i>M. hyopneumoniae</i>
5	Medial	GC 39	MR/MH
		GC 40	<i>M. hyorhinis</i>
6	Medial	GC 41	<i>M. hyosynoviae</i>
		GC 42	<i>M. hyorhinis</i>
7	Diafragmático	GC 43	-
		GC 44	-
8	Diafragmático	GC 45	-
		GC 46	-
9	Diafragmático	GC 47	-
		GC 48	-
10	Intermedio	GC 49	<i>M. hyorhinis</i>
		GC 50	-
11	Intermedio	GC 51	-
		GC 52	<i>M. hyorhinis</i>
12	Intermedio	GC 53	-
		GC 54	-

(MR/MH): cultivo mixto de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*.

Tabla II.14.- Aislamientos de micoplasmas porcinos en muestras de Gran Canaria, 2008.

Nº de Pulmón	Lóbulo	Muestra	Identificación
13	Apical	101-a	<i>M. hyorhinis</i>
		101-b	<i>M. hyorhinis</i>
14	Apical	102-a	<i>M. hyorhinis</i>
		102-b	<i>M. hyorhinis</i>
15	Apical	103-a	-
		103-b	<i>M. hyopneumoniae</i>
16	Medial	104-c	<i>M. hyorhinis</i>
		104-d	<i>M. hyopneumoniae</i>
17	Medial	105-c	MR/MH
		105-d	<i>M. hyorhinis</i>
18	Medial	106-c	-
		106-d	<i>M. hyorhinis</i>
19	Diafragmático	107-e	MR/MH
		107-f	MR/MH
20	Diafragmático	108-e	-
		108-f	-
21	Diafragmático	109-e	-
		109-f	-
22	Intermedio	110-g	MR/MH
		110-h	-
23	Intermedio	111-g	<i>M. hyorhinis</i>
		111-h	<i>M. hyorhinis</i>
24	Intermedio	112-g	-
		112-h	-

(MR/MH): cultivo mixto de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*.

Tabla II.15.- Aislamientos de micoplasmas porcinos en muestras de Gran Canaria, 2009.

Nº de Pulmón	Lóbulo	Muestra	Identificación
25	Apical	1-A	MF/MH
		2-A	<i>M. hyopneumoniae</i>
26	Apical	3-A	<i>M. hyorhinis</i>
		4-P	-
27	Apical	5-P	<i>M. hyosynoviae</i>
		6-P	<i>M. hyosynoviae</i>
28	Diafragmático	7-A	<i>M. hyorhinis</i>
		8-A	<i>M. hyorhinis</i>
29	Diafragmático	9-A	-
		10-P	<i>M. hyopneumoniae</i>
30	Diafragmático	11-P	-
		12-P	<i>M. hyorhinis</i>
31	Medial	24-P	-
		25-P	<i>M. hyorhinis</i>
32	Medial	26-P	<i>M. hyorhinis</i>
		27-A	<i>M. hyorhinis</i>
33	Medial	28-A	MR/MH
		29-A	<i>M. hyopneumoniae</i>
34	Intermedio	30-A	-
		31-A	-
35	Intermedio	32-A	MR/MH
		33-P	MR/MH
36	Intermedio	34-P	MR/MH
		35-P	<i>M. hyopneumoniae</i>

(MR/MH): cultivo mixto de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*; (MF/MH): cultivo mixto de *M. flocculare* y *M. hyopneumoniae*.

Tabla II.16.- Cepario de cultivos puros de *M. hyopneumoniae*, para el estudio de la Región Intergénica 16S23S ARNr y gen ARNr 23S.

CEPA	AÑO	ISR	23S
2-A	2009	Si	Si
10-P	2009	Si	Si
29-A	2009	Si	Si
35-P	2009	Si	Si
103-b	2008	Si	
104-d	2008	Si	Si
GC 38	2007	Si	Si
RMH-7	2006	Si	Si
RMH-8	2006	Si	Si
Cepa 88	2005	Si	Si
Cepa 235	2005	Si	Si
Cepa 3	2003	Si	
Cepa 68	2003	Si	
Capa 69	2003	Si	
Cepa 75	2003	Si	Si
Cepa 78	2003	Si	
Cepa F	2003	Si	Si
Cepa I	2003	Si	Si
Cepa K	2003	Si	
Cepa O	2003	Si	Si

(ISR): cepas cuya Región Intergénica 16S-23S ARNr fue secuenciada en posteriores capítulos; (23S): cepas cuyo gen codificante para el ARNr 23S fue secuenciado en posteriores capítulos.

Tabla II.17.- Tiempos medios para el aislamiento de las distintas especies, en las campañas de muestreo realizadas en Gran Canaria, 2007, 2008, 2009.

Tiempos medios para el aislamiento	
<i>M. hyopneumoniae</i>	7-30 días
<i>M. hyorhinis</i>	3-10 días
<i>M. hyosynoviae</i>	7-14 días
<i>M. flocculare</i>	30 días

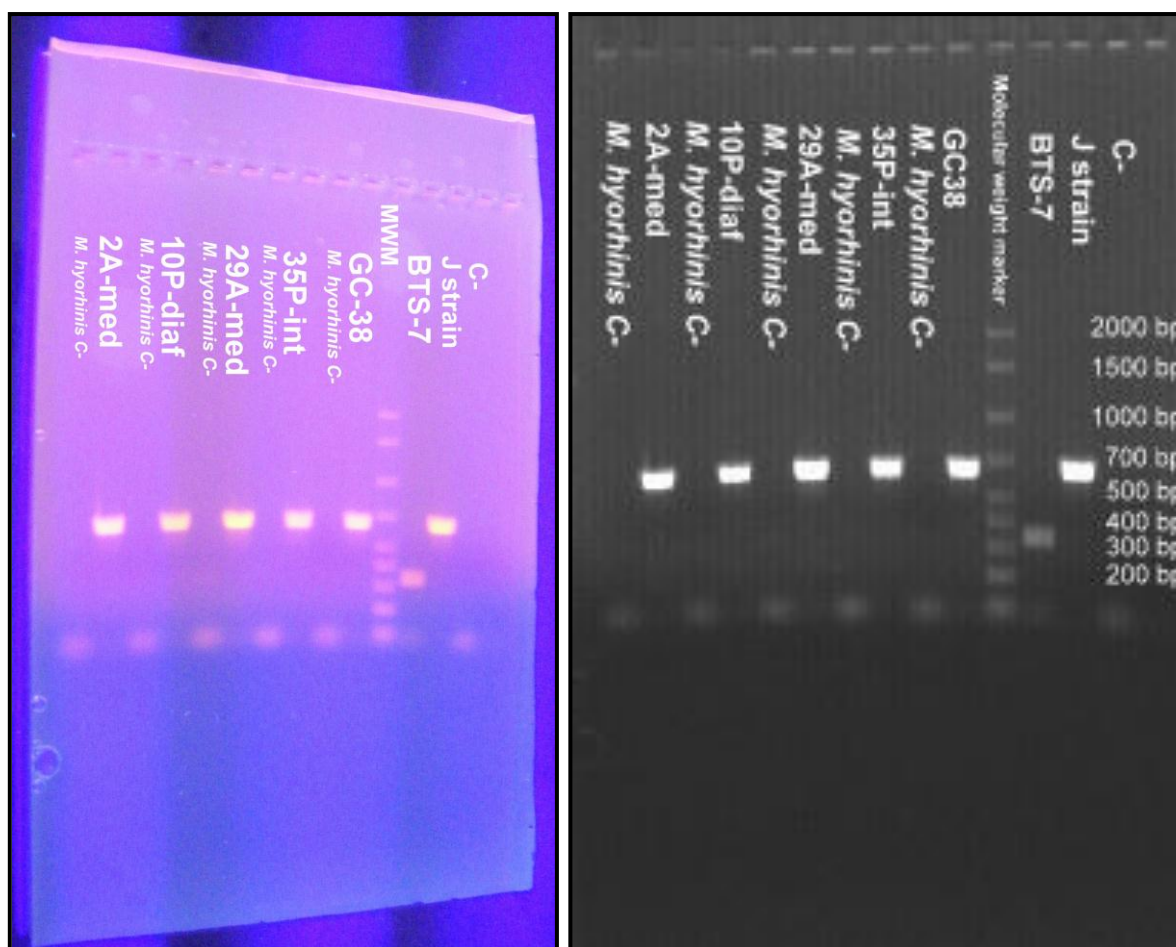


Figura II.1.- Electroforesis de productos amplificados para detección de *M. hyopneumoniae* y *M. hyorhinis*.

PCR de las cepas de *M. hyopneumoniae* (Mattsson y cols., 1995) aisladas en 2009 y 2007. Cada cepa está precedida por el resultado negativo de la PCR de Caron y cols., (2000), para la detección de *M. hyorhinis*. Las cepas BTS-7 y J, fueron empleadas como controles positivos. En el control negativo se utilizó agua ultrapura estéril, en lugar de ADN.

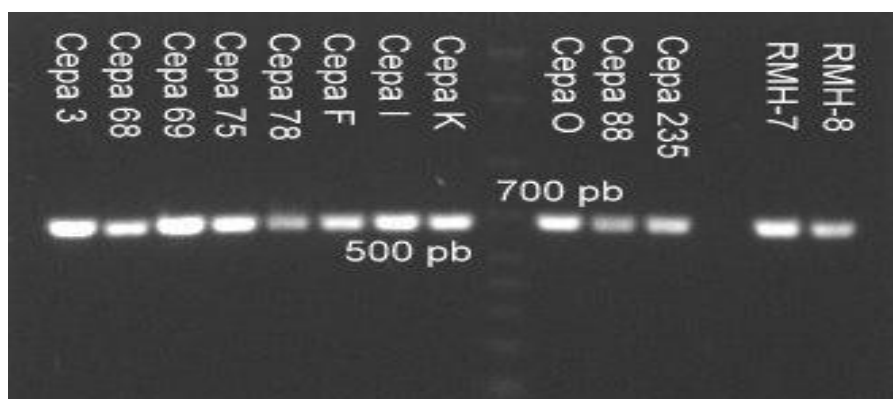


Figura II.2.- Electroforesis de productos amplificados para detección de *M. hyopneumoniae* en cepas de 2003-2005 y 2006.

PCR descrita por Mattsson y cols., (1995), para la detección de *M. hyopneumoniae*.

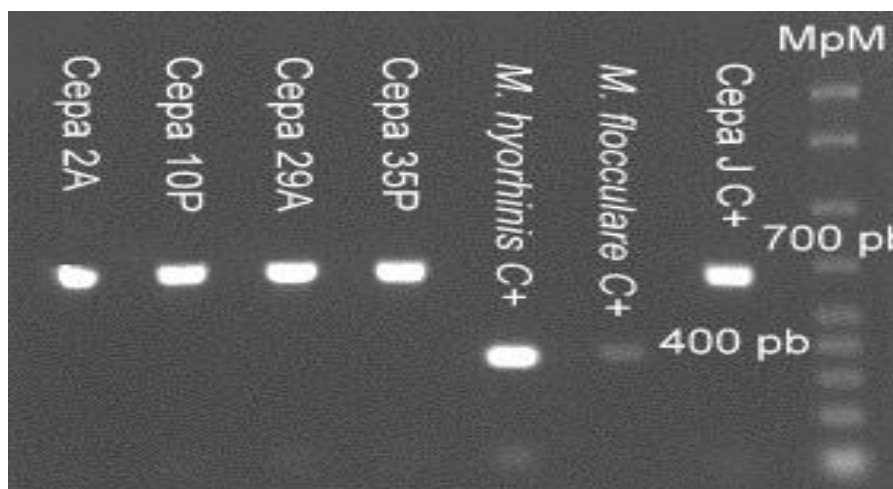
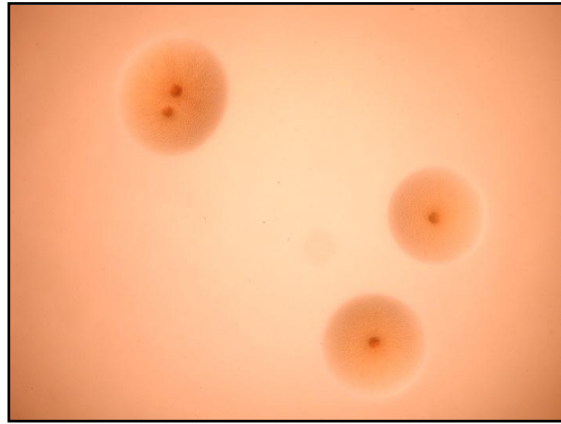


Figura II.3.- Electroforesis de productos amplificados para detección de *M. hyopneumoniae* en cepas de 2009.

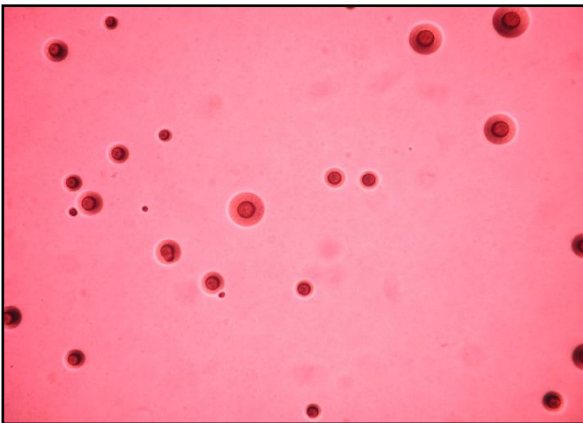
De izquierda a derecha, productos amplificados de las cepas de *M. hyopneumoniae* (PCR descrita por Mattsson y cols., 1995), controles positivos de *M. hyorhinis* (cepa BTS-7) y *M. flocculare* (MS42) empleando las PCRs descritas por Caron y cols., (2000), y Stemke y cols., (1994), y por último, la Cepa J como control positivo de *M. hyopneumoniae*. Mpm: marcador de peso molecular.



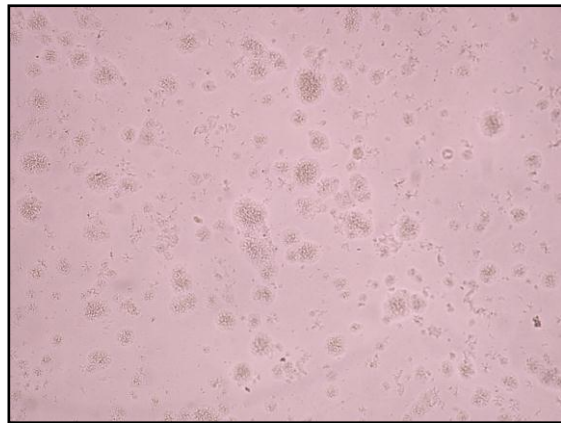
M. hyopneumoniae



M. hyorhinis



M. hyosynoviae



M. flocculare

Figura II.4 Colonias en medio sólido de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* y *M. flocculare*.

ANEXO: Medios y Reactivos

MEDIO DE FRIIS (1 Litro)

(Ross y Whittlestone, 1983)

Fase Autoclavable

Bacto PPLO Broth	5.0 g
Brain Heart Infusion (BHI)	4.8 g
Solución balanceada de Hanks A	25.0 ml
Solución balanceada de Hanks B	25.0 ml
Agua bidestilada	500.0 ml
Bacto PPLO Broth	5.0 g

Se ajusta el pH a 7,4 y se autoclava 30 minutos a 121 °C

- Para el medio sólido, se añade 16ml de solución de Dextran al 1% y 11,4 gr de Agar bacteriológico nº 1.

Fase Filtrable

Extracto fresco de levadura (25% p/v)	38.0 ml
Rojo Fenol solución al 0,2%	7.5 ml
Ampicilina (100mg/ml)	5.0 ml
Suero equino inactivado	85 ml
Suero porcino inactivado	85 ml
Agua bidestilada	229.5 ml

Se ajusta el pH a 7,4 y se esteriliza por filtración (0,22 µm)

- Ambos sueros fueron inactivados en baño María a 56 °C durante 30 minutos.

Finalmente se mezclaron ambas fases en condiciones de esterilidad, se alicuotó el medio, y se conservó a -20°C hasta su uso. Se realizó un control de esterilidad a 37°C durante una semana.

EXTRACTO DE LEVADURA (25% p/v)

(Saccharomyces cerevisiae)

1. Calentar en baño María 500 ml de agua bidestilada a 45°C, a los que se añaden 500 gr de levadura de panadería fresca pulverizada.
2. Aumentar la temperatura del baño hasta los 80°C, durante 90 minutos.
3. Retirar la suspensión del baño maría y dejarla enfriar durante al menos 15 minutos.
4. Empleando ácido clorhídrico concentrado, se ajusta el pH a 4,5.
5. Mantener la suspensión a temperatura ambiente, con frecuentes agitaciones durante 30 minutos.
6. Centrifugar a 3000 rpm, durante 30 minutos.
7. Recoger el sobrenadante, y se completa con un volumen equivalente de agua bidestilada.
8. Realizar un triple filtrado de la suspensión, empleando papel de filtro, y posteriormente emplear filtros de diámetro decreciente (1.2, 0.8, 0.45, 0.22 µm).
9. Conservar a -20°C hasta su uso (hasta 6 meses).

SOLUCIÓN BALANCEADA DE HANKS MODIFICADA

Solución A	
Cloruro Sódico (NaCl)	80.0 g
Cloruro Potásico (KCl)	4.0 g
Sulfato de magnesio heptahidrato (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1.0 g
Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	1.0 g
Cloruro Cálculo (CaCl ₂)	1.4 g
Agua bidestilada	500.0 ml
Solución B	
di-sodio hidrógeno fosfato dodecahidrato (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	1.5 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0.6 g
Agua bidestilada	500.0 ml

TRIS HCL 1M, pH 8,0

Disolver 60,55 gr de TRIS base en 400 ml de agua bidestilada, en matraz aforado. Ajustar el pH a 8,0 empleando HCl concentrado, y mantener en agitación constante. Enrasar hasta un volumen de 500 ml empleando agua bidestilada y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

EDTA 50X 0,5M, pH 8,0

Diluir 18,6 gr de Ácido Ethylenediamina – Tetra acético (EDTA) en 70 ml de agua bidestilada y ajustar el pH a 8,0 empleando NaOH. Ajustar el volumen a 100 ml en matraz aforado y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

SATURACIÓN DEL FENOL CON TRIS-HCL (100 ml)

Licuar fenol cristalizado en baño maría a 56°C, y pasar 100 ml a un recipiente forrado de papel de aluminio, manteniéndolo en agitación. Añadir 100 ml de Tris-HCl 1M con pH 8,0 y 0,1 gr de 8-hidroxiquinolina, cerrando el recipiente con papel de aluminio, y prolongar la agitación 15 minutos. A continuación, depositar en refrigeración durante 45 minutos para obtener la separación de las fases.

Desechar la fase superior y añadir 100 ml de Tris HCl 1M con pH 8,0 y 200 µl de Beta-mercaptoetanol y prolongar la agitación otros 15 minutos. De nuevo, colocar en refrigeración y desechar el sobrenadante.

Añadir 100 ml de Tris-HCl 0,1 M con pH 8,0, y prolongar la agitación 15 minutos. De nuevo, colocar en refrigeración y desechar la mayor parte del sobrenadante. Este debe ser recogido y su pH valorado, que debe ser superior a 7,6. Finalmente almacenar la solución a 4°C en un recipiente forrado con papel de aluminio.

SUSPENSIÓN DE SÍLICA

Añadir 60 gr de sílica a 500 ml de agua destilada. Decantar durante 24 horas, y eliminar el sobrenadante. Añadir el mismo volumen previamente retirado, con agua destilada, agitar el contenido durante 30 segundos y dejar que decante durante 24 horas. Posteriormente, desechar una parte del sobrenadante, y ajustar el pH a 2,0 empleando HCl concentrado. Finalmente distribuir en alícuotas y autoclavar a 121°C durante 30 minutos.

SOLUCIÓN DENATURANTE

Disolver 2 gr de hidróxido sódico y 8,8 gr de cloruro sódico en 100 ml de agua destilada.

TAMPÓN DE LAVADO

Disolver 120 gr de tiocianato de guanidina en 100 ml de Tris-HCl pH 6,4.

TAMPÓN DE LISIS

Disolver 120 gr de tiocianato de guanidina en 100 ml de Tris-HCl 0,1M, con pH 6,4. A continuación añadir 22 ml de EDTA 0,2M con un pH de 8.0 y finalmente 2,6 ml de Tritón X-100.

TE pH 8.0

Depositar en un matraz aforado 1 ml de Tris HCl 1M con pH 8,0 y añadir 200 µl de EDTA 50X. Ajustar el volumen hasta 100 ml empleando agua bidestilada. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

PREPARACIÓN DE DISCOS DE DIGITONINA

Elaborar una solución alcohólica de digitonina al 1,5%, y aplicar calor para facilitar la disolución. Tomando 20 µl, impregnar discos de papel de filtro estériles, de 6 mm de diámetro. Depositar los discos en estufa a 37°C durante 30 minutos, hasta quedar secos. Finalmente almacenarlos en refrigeración a 4°C hasta su uso.

TAE 50X

En un matraz aforado, depositar 10 ml de EDTA 0,5M con un pH de 8,0. A continuación añadir 5,71 ml de ácido acético glacial, y disolver 24,2 gr de Tris base en la fase líquida. Finalmente ajustar el volumen hasta 100 ml empleando agua bidestilada, y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

TAE 1X

Añadir 2 ml de TAE 50X a un matraz estéril, con 98 ml de agua bidestilada.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S ARNr Y DEL GEN QUE CODIFICA EL ARNr 23S EN CEPAS DE CAMPO DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

III.1.- INTRODUCCIÓN

La función vital de los ribosomas, como estructuras universales implicadas en la síntesis proteica, confiere un gran valor científico a los genes que determinan la codificación del ARNr que conforma estos orgánulos, ya que suponen una de las pocas estructuras génicas que comparten las diferentes especies (Fox y cols., 1980; Weisburg y cols., 1991).

La gran mayoría de la información de la que hoy en día disponemos sobre los genes que codifican el ARNr, se centra principalmente en el gen que codifica el ARNr 16S, pues su carácter conservativo a través de la biodiversidad evolutiva, y su menor tamaño relativo al compararlo con el gen que codifica el ARNr 23S, convirtieron inicialmente a este gen, en la estructura génica idónea sobre la que perfilar la taxonomía de la vida procariota (Ludwig y cols., 1998).

Eventualmente, las técnicas de tipificación funcional microbiológicas (cultivos selectivos, perfiles bioquímicos, serología, etc.) han dado paso a las técnicas de biología molecular (Lane y cols., 1985), aunque la filogenia funcional, que está basada en el uso de inhibidores de la síntesis proteica ribosomal, permite una clasificación bastante similar a la obtenida a través de la secuenciación de los genes ARNr 16S y/o 23S (Amils y cols., 1989; Briones y cols., 1998).

El papel biológico que desempeña la Región Intergénica 16S-23S ARNr (ISR) sigue siendo objeto de estudio, pero no cabe duda de que la presencia de esta región en el genoma, ha aportado una valiosa herramienta como complemento taxonómico en el estudio de las especies del Género *Mycoplasma* (Harasawa, 1999). Ha facilitado la separación de

biovares en especies distintas del Género *Ureaplasma* (*U. urealyticum* y *U. parvum*, Harasawa y Kanamoto, 1999), y sirve como punto de apoyo en la identificación de posibles nuevas especies (Chalker y Brownlie, 2004; Spargser y Rosengarten, 2007), así como en su posterior caracterización como especies reconocidas (*Mycoplasma mucosicanis*, Spargser y cols., 2011; *Mycoplasma neophronis*, Suárez-Pérez y cols., 2012).

Así mismo, la ISR ha demostrado su utilidad en el diagnóstico específico de microorganismos (Barry y cols., 1991), identificación de especies del Género *Mycoplasma* en cultivos celulares (Harasawa y cols., 1993), identificación de *Mollicutes* incultivables (*Phytoplasma*, Smart y cols., 1996), identificación especie-específica en aislamientos clínicos (*M. pulmonis*, Takahashi-Omoe y cols., 2004), diagnóstico directo sobre muestras clínicas (*M. felis*, Chalker y cols. 2004) y para el diseño de PCRs aún más específicas, que aquellas diseñadas sobre el gen que codifica el ARNr 16S (*M. synoviae*, Ramírez y cols., 2006 y 2012).

La variabilidad de la ISR no aparece como un fenómeno acotado entre distintas especies, ya que diferentes cepas pertenecientes a un mismo taxón, pueden presentar variaciones en sus secuencias (Gürtler y Stanisich, 1996; Gürtler, 1999), y dichas variaciones pueden funcionar como marcadores moleculares para el tipado de cepas en bacterias (Gürtler, 1993; Cartwright y cols., 1995; Houpijian y Raoult., 2001) y más concretamente, en especies del Género *Mycoplasma* (*M. gallisepticum*, Raviv y cols., 2007; Yavari y cols., 2007; *M. synoviae*, Ramírez y cols., 2011).

Por otra parte, la función biológica del ARNr 23S ha sido estudiada en profundidad, debido a la relevancia funcional que posee su estructura en la conformación de la subunidad 50S del ribosoma procarionta. La eficacia de dicha función, está condicionada por la configuración peptídica de la subunidad, y por tanto, en última instancia, de la información codificada en el gen del ARNr 23S.

La información que tenemos sobre el gen ARNr 23S, ha progresado paulatinamente, siguiendo la estela del estudio científico del gen que codifica el ARNr 16S. Así pues, tras los primeros trabajos realizados para la obtención de la secuencia

completa del gen que codifica el ARNr 23S en *E. coli* (Brosius y cols., 1980), la secuencia de al menos 14 especies pertenecientes al grupo de bajo porcentaje de Guanina-Citosina, fueron aportadas (Ludwig y cols., 1992). Entre estas secuencias, se incluyó por primera vez la de *M. hyopneumoniae*.

Debido a la mayor variabilidad entre especies que presenta este gen respecto al gen que codifica el ARNr 16S (Ludwig y cols., 1995), algunas aplicaciones de carácter taxonómico (*Phytoplasma*, Guo y cols., 2000; *Mycoplasma* y otras bacterias, Hunt y cols., 2006) y diagnóstico (Sung y cols., 2006); han sido desarrolladas con éxito en especies de diferente Géneros, de la Clase *Mollicutes*.

Sin embargo, el hecho de que el gen que codifica el ARNr 23S, sea capaz de sufrir alteraciones puntuales en su secuencia, a través de mutaciones que derivan en mecanismos de resistencia frente a antibióticos, (Sigmund y cols., 1982; Ettayebi y cols., 1985) ha propiciado que gran parte del trabajo científico sobre este gen en las especies del Género *Mycoplasma*, se haya basado en el estudio de dichas mutaciones (*M. pneumoniae*, Lucier y cols., 1995; Okazaki y cols., 2001; *M. hominis* y *M. fermentans*, Pereyre y cols., 2002; *M. gallisepticum*, Wu y cols., 2005; *M. hyopneumoniae*, Stakemborg y cols., 2005).

Debido al interés que despiertan las cepas con mecanismos de resistencias en el gen que codifica el ARNr 23S, son muy poco frecuentes los trabajos realizados para secuenciar y comparar este gen en cepas de una misma especie (*E. coli*, Anton y cols., 1999), sin la aplicación de técnicas *in vitro* y/o *in vivo* para incluir cepas mutantes resistentes.

En el caso de *M. hyopneumoniae*, las secuencias aportadas para el gen que codifica el ARNr 23S, de las cepas cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (cepa 232, Minion y cols, 2004; cepa 7448 y cepa J, Vasconcelos y cols., 2005; cepa 168, Liu y cols., 2011), junto a la secuencia original (Ludwig, y cols., 1992), suponen el único testimonio de la variabilidad de este gen, en cepas no relacionadas con mecanismos de resistencias para este microorganismo.

Por todo ello, en este capítulo nos proponemos los siguientes objetivos:

1.- La amplificación por PCR y secuenciación de la Región Intergénica 16S-23S ARNr de 20 cepas de campo de *M. hyopneumoniae*, identificación de las diferencias en los patrones secuenciales, el análisis de los mismos y de las secuencias previamente publicadas por otros autores.

2.- La amplificación por PCR y secuenciación del gen que codifica el ARNr 23S en 14 de las 20 cepas de campo de *M. hyopneumoniae*, mediante 6 fragmentos génicos correlativos superpuestos (Fragmentos A, B, C, D, E, F) y posterior ensamblaje de sus secuencias.

3.- La identificación de las diferencias en los patrones secuenciales del gen que codifica el ARNr 23S en las 14 cepas seleccionadas de *M. hyopneumoniae*, el análisis de los mismos y de las secuencias previamente publicadas por otros autores.

4.- La realización de una “Secuencia Universal” que catalogue todas las diferencias halladas entre los patrones secuenciales, y una “Secuencia Consenso”, que represente el patrón secuencial más común para *M. hyopneumoniae*.

5.- Determinar si existe alguna correlación entre los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y los patrones secuenciales del gen que codifica el ARNr 23S en *M. hyopneumoniae*.

III.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En el estudio de la Región Intergénica 16S-23S ARNr, se seleccionaron 20 cepas de campo de *M. hyopneumoniae*. Para el estudio del gen que codifica el ARNr 23S se eligieron 14 de las 20 cepas anteriormente mencionadas. La **tabla II.16** del “ANEXO: Tablas y Figuras” del capítulo anterior, muestra las cepas seleccionadas para este estudio.

La reactivación de las cepas se inició con la rehidratación de los cultivos liofilizados con 2ml de agua bidestilada estéril, y posteriormente se incubaron a 37°C en agitación continua durante 48 horas. Finalmente se realizaron subcultivos de 500 µl en nuevos tubos con medio de Friis modificado, y se mantuvieron en incubación y agitación hasta que la acidificación del medio indicó un crecimiento logarítmico de los cultivos.

III.2.2.- REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR fue empleada para la amplificación de la ISR y de los diferentes fragmentos que conforman el gen codificante del ARNr 23S. Con el fin de minimizar errores y estandarizar resultados, se emplearon kits comerciales para la extracción del ADN y para lograr las reacciones de amplificación.

La amplificación de la ISR se obtuvo mediante un único producto amplificado, empleando una pareja de cebadores, mientras que la amplificación del gen codificante del ARNr 23S se realizó en seis amplificaciones superpuestas, utilizando seis parejas de cebadores.

Las reacciones descritas fueron llevadas a cabo en un Termociclador “Mastercycler Gradiente” de la casa Eppendorf, y los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa para su comprobación, antes de la secuenciación.

III.2.2.1.- Extracción del ADN

El ADN de los cultivos fue extraído empleando un kit comercial de extracción de ADN genómico, (Realpure Extracción DNA Genómico), de la casa REAL, con las adaptaciones necesarias para los cultivos de micoplasmas, como se describe a continuación.

Lisis Celular: añadimos 1 ml del cultivo en fase logarítmica a un eppendorf y lo centrifugamos a 14.000 g durante 30 segundos. Eliminamos el sobrenadante y añadimos 600 µl de Solución de Lisis y 3 µl de Proteinasa K. El eppendorf se incubaba durante 1 hora a 55°C, y elevamos la temperatura a 80°C durante 5 minutos. Finalmente dejamos enfriar a temperatura ambiente.

Precipitación de Proteínas: añadimos 300 µl de Solución de Eliminación de Proteínas, y mezclamos los componentes empleando agitación con vórtex durante 30 segundos. Centrifugamos a 14.000 g durante 5 minutos, permitiendo así que las proteínas queden en la fase inferior del eppendorf.

Precipitación del ADN: Recogemos el sobrenadante con puntas estériles, evitando recoger parte de la fase inferior, y lo trasvasamos a un eppendorf nuevo, que contenga 600 µl de Isopropanol. Mezclamos los componentes del eppendorf por inversión manual. Centrifugamos a 14.000 g durante 3 minutos, y procedemos a eliminar el sobrenadante. Añadimos 600 µl de Etanol 70% e invertimos manualmente el eppendorf repetidas veces para lavar el precipitado de ADN. Para eliminar el Etanol, centrifugamos de nuevo a 14.000 g, durante 2 minutos y descartamos el sobrenadante con puntas estériles, para no desplazar el pellet. Finalmente dejamos invertido el eppendorf sobre papel de filtro durante 15 minutos, (cuidando que el precipitado no se desplace) y que se elimine cualquier rastro de humedad.

Hidratación del ADN: añadimos 200 µl de Solución de Hidratación e incubamos el eppendorf a 65°C durante 1 hora con agitaciones periódicas. Por último dejamos atemperar y almacenamos el ADN en congelación a -20°C hasta su uso.

III.2.2.2.- Cebadores empleados

Los cebadores fueron diseñados de acuerdo a las indicaciones de los trabajos de Ramírez y cols., (2008b), y en el caso de los cebadores de diseño nuevo, en función de las necesidades específicas de este estudio. Todos ellos fueron producidos por “Integrated DNA Technologies”.

III.2.2.2.1.- Cebadores para la Región Intergénica 16S-23S ARNr

Basándonos en los trabajos de Ramírez y cols., (2007), se produjeron los cebadores descritos como 16S+C y 23S-B, cuya secuencia figura en la **Tabla III.1** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo.

La **Figura III.1** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo, muestra la disposición esquemática de esta pareja de cebadores, así como la posición relativa de los cebadores empleados habitualmente para la amplificación del gen que codifica el ARNr 16S.

III.2.2.2.2.- Cebadores para el gen codificante del ARNr 23S

Para obtener la secuencia completa de este gen, y basándonos en los trabajos previos de Ramírez y cols., (2008b), se produjeron 6 parejas de cebadores, dividiendo así el gen objeto de este estudio en 6 fragmentos (Fragmento A, B, C, D, E, F), siendo amplificado cada uno de ellos por una pareja diferente de cebadores (**Tabla III.2**).

- Para el Fragmento A se emplearon los cebadores 1F-23S y 1R-23S.

- Para el Fragmento B, se emplearon los cebadores 2F-23S y 2R-23S.
- Para el Fragmento C, se emplearon los cebadores 3F-23S y 3R-23S.
- Para el Fragmento D, se emplearon los cebadores 4F-23S y 4R-23S.
- Para el Fragmento E, se emplearon los cebadores 5F-23S y 5R-23S.
- Para el Fragmento F, se emplearon los cebadores 6F-23S y 6R-23S.

De acuerdo a la secuencia específica de *M. hyopneumoniae*, no fue posible amplificar los Fragmentos A y F con los cebadores descritos. Por tanto, se optó por diseñar un cebador denominado “BoxA-hyop2” que fue emparejado con cebadores descritos por Ramírez y cols., (2008b), para obtener amplificaciones positivas en los fragmentos A y F, tal y como se muestra en la **Tabla III.3**.

- Para el Fragmento A, se emplearon los cebadores BoxA-hyop2 y 1R-23S.
- Para el Fragmento F, se emplearon los cebadores 6F-23S y BoxA-hyop2.

La Figura III.2 muestra la disposición esquemática y posición relativa de los cebadores empleados para la amplificación del gen codificante del ARNr 23S.

III.2.2.3.- Reacción en Cadena de Polimerasa aplicada sobre el ADN extraído de las cepas de campo de *M. hyopneumoniae*

La reacción de amplificación se llevó a cabo mediante el uso del Kit comercial Ilustra™ Pure Taq Ready-To-Go™ PCR Beads, de la casa GE Healthcare, para asegurar la homogeneidad en el proceso de la amplificación de los fragmentos de las regiones secuenciadas.

Componentes: Cada pocillo contiene una perla (“bead”) compuesta por estabilizantes, buffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, y 2-2.5 unidades de Pure Taq ADN polimerasa. El volumen final del “bead” reconstituido fue de 25 μ l. La concentración de cada dNTP fue de 200 mM en 10 mM de Tris-HCl a pH 9.0, 50 mM KCl y 1,5 mM de MgCl₂. Cada una de las reacciones se llevó a cabo añadiendo 1 μ l de cada cebador correspondiente, 3 μ l de ADN extraído mediante kit de extracción (Realpure Extracción DNA Genómico) y 20 μ l de H₂O estéril ultrapura.

El protocolo de ciclos y temperaturas empleado para la amplificación del producto de la Región Intergénica 16S-23S ARNr de *M. hyopneumoniae*, se muestra en la **Tabla III.4**.

Los protocolos de ciclos y temperaturas empleados para la amplificación del gen que codifica el ARNr 23S de *M. hyopneumoniae* se muestran en las **Tablas III.5** y **Tabla III.6**, siendo el primero de ellos, utilizado para la amplificación de los Fragmentos A y F, mientras que el segundo, fue aplicado para obtener la amplificación de los Fragmentos B, C, D, E.

III.2.2.4 Electroforesis de los productos amplificados por PCR

Los productos amplificados por PCR convencional fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón de electroforesis (TAE, 1X), durante 40 minutos, empleando un marcador de peso molecular Amplisize Molecular Ruler de BIORAD, de diez marcajes, comprendidos entre 2000 y 50 pares de bases. Los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio al 1,5% durante 20 minutos, y finalmente aclarados en agua destilada durante otros 20 minutos. El resultado fue comprobado mediante sistemas de análisis de imagen con luz ultravioleta.

La **Figura III.3** y **Figura III.4** muestran la electroforesis del producto amplificado de la Región Intergénica 16S-23S ARNr.

La **figura III.5, Figura III.6, Figura III.7 y Figura III.8** muestran la electroforesis del producto amplificado de los Fragmentos A, B, C, D, E, F, del gen codificante del ARNr 23S.

III.2.3.- SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS

La Secuenciación de las muestras se realizó a través del servicio de secuenciación de la Unidad de Genética del Colegio Universitario de Las Palmas (CULP).

III.2.3.1.- Precipitación de las muestras para secuenciación

La precipitación de las muestras se llevó a cabo siguiendo el protocolo mostrado a continuación:

- 1.- Se colocó en un eppendorf de 1,5 ml los siguientes componentes
 - 14,843 μ l de EtOH absoluto.
 - 4,4 μ l de H₂O.
 - 0,75 μ l de acetato sódico 3M pH 5.
 - 5 μ l de la muestra del ADN amplificado.
- 2.- Se aplicó agitación por vórtex y se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 3.- Se centrifugó a 14000 rpm durante 25 segundos.
- 4.- Se retiró el sobrenadante y se añadió 62,5 μ l de EtOH 70%.
- 5.- De nuevo, se aplicó una centrifugación de 14000 rpm, durante 5 minutos.
- 6.- Se retiró el sobrenadante, y se depositó la muestra en estufa a 37°C durante 10 minutos.
- 7.- Se resuspendió con formamida en un volumen de 20 μ l.
- 8.- Las muestras, una vez resuspendidas, se depositaron en las placas especiales del secuenciador.

III.2.3.2.- Reacción de Secuenciación

La reacción de secuenciación fue realizada mediante el Kit Big Dye de MCLAB, para un volumen de 5 µl. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, en cada reacción se distribuyeron los siguientes componentes:

- 0.5 µl de Solución 1.
- 0,75 µl de Solución 2.
- 1 µl de cebador (5 pM/ µl).
- 0,75 µl de agua.
- 2 µl de muestra, equivalentes a 25-50 ng, como corresponde a los productos de PCR cuyo tamaño oscila entre 500 y 1000 pares de bases.

El protocolo de ciclos y temperaturas para la reacción de secuenciación ABI PRISM 3100 se detalla a continuación:

- Ciclo 1; Temperatura de 94°C durante 3 minutos.
- Ciclo 2; Conlleva 25 repeticiones de los siguientes subciclos
 - Subciclo 1: Temperatura de 96°C durante 10 segundos.
 - Subciclo 2: Temperatura de 50°C durante 5 segundos.
 - Subciclo 3: Temperatura de 60°C durante 4 minutos.
- Ciclo 3; Temperatura de 4°C hasta finalización.

Todos los productos amplificados por PCR fueron secuenciados por duplicado, utilizando de modo independiente para cada reacción, ambos cebadores. Así pues, se obtuvo una secuencia con el cebador 5´-3´y otra secuencia con el cebador 3´-5´, en cada uno de los fragmentos secuenciados.

III.2.4.- HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS DE ANÁLISIS DE SECUENCIAS

La información obtenida a través de la secuenciación fue analizada mediante el empleo de las herramientas informáticas mencionadas a continuación.

III.2.4.1.- FINCHTV

La herramienta informática FICHTV versión 1.4.0 se empleó para la lectura de los cromatogramas de formato ABI, obtenidos de la secuenciación de los productos amplificados por PCR.

Mediante este programa, se determinó la calidad de las reacciones de secuenciación. Así mismo, permitió descartar las regiones iniciales y terminales de las secuencias, evitando errores en las mismas, debidos a sobresaturación y/o pérdida de lectura en el cromatograma.

III.2.4.2.- GENE RUNNER

La herramienta informática GENE RUNNER versión 3.0.1 permitió el alineamiento de ambas secuencias obtenidas de cada producto amplificado por PCR.

De esta manera, se obtuvo una “secuencia consenso” a partir de cada pareja de secuencias, verificando las posibles discrepancias entre ambas.

Así mismo, su uso permitió concatenar las diferentes secuencias consenso de cada fragmento analizado, y obtener una “secuencia final” resultante de la unión de las secuencias de cada Fragmento A, B, C, D, E, y F.

Mediante este programa se editó dicha secuencia final, con el fin de establecer el límite inicial y final de las mismas, de acuerdo a los límites indicados por los trabajos publicados previamente sobre la estructura de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y del gen que codifica el ARNr 23S de los micoplasmas porcinos (Minion y cols., 2004; Vasconcelos y cols., 2005; Liu y cols., 2011).

III.2.4.3.- BIOEDIT

La herramienta informática BIOEDIT versión 7.0.9 fue utilizada para la alineación y comparación de las secuencias finales (Thompson y cols., 1994). Su uso permitió una clara visualización de las divergencias en las secuencias analizadas, y su posición relativa en dichas secuencias.

Mediante este programa, se elaboraron las tablas de similitud comparada entre los diferentes patrones secuenciales (Altschul y cols., 1990; Altschul y cols., 1997).

III.2.4.4.- MEGA

La herramienta informática MEGA versión 5.0.3 desarrolló los dendrogramas taxonómicos, elaborados a partir de las secuencias finales analizadas. De esta manera, la información relativa a la proximidad filogenética de las secuencias, pudo ser condensada en esquemas visuales de tipo ramificado.

Mediante este programa, se realizaron las búsquedas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), entre las secuencias finales y aquellas depositadas por otros autores en las bases de datos secuenciales de tipo abierto de internet (GenBank).

III.2.5.- DISEÑO DE NUEVOS CEBADORES

El diseño de nuevos cebadores se realizó con la herramienta informática OLIGO7.0 (Software Medprobe), para aquellas regiones génicas no amplificadas por los cebadores inicialmente designados para cada Fragmento A, B, C, D, E, F del gen codificante del ARNr 23S (**Tabla III.2**), teniendo en consideración el cumplimiento de los siguientes parámetros:

- Eficiencia ≥ 450
- Dímeros en extremo 3' con $\Delta G \geq -3$ kcal/mol
- Dímeros en extremo 5' con $\Delta G \geq -7$ kcal/mol
- Hardpin-loop con $\Delta G \geq -3$ kcal/mol
- Balance de Adenina y Timina (A+T) respecto Guanina y Citosina (G+C)
- Tamaño de cebadores entre 17-25 pares de bases
- Tamaño de fragmento amplificado superior a 500 pares de bases.

III.3.- RESULTADOS

III.3.1.- ANÁLISIS DE LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S ARNr

El análisis de las secuencias de las 20 cepas de campo de *M. hyopneumoniae* muestra 4 patrones diferentes, a los que denominamos “Grupos I, II, III y IV” de la Región Intergénica 16S-23S ARNr, cuya distribución se especifica en la **Tabla III.7** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo.

La comparación de nuestras secuencias con otras previamente publicadas, demostró que tanto la cepa 7448 como la cepa J (secuenciadas en su totalidad por Vasconcelos y cols., 2005), correspondían por completa similitud (100%) con los patrones secuenciales de los Grupos I y II. Ninguna de las cepas secuenciadas presentó completa similitud con la cepa 232 (secuenciada en su totalidad por Minion y cols., 2004), ni con la cepa 168 (Liu y cols., 2011) cuyos patrones secuenciales se denominaron “Grupo V” y “Grupo VI” de la Región Intergénica 16S-23S ARNr (**Tabla III.7**). La **Figura III.9** muestra el alineamiento de las secuencias correspondientes a todos los grupos mencionados.

La similitud de las secuencias de los distintos grupos se refleja en la **Tabla III.8**. Los patrones secuenciales con menores porcentajes de similitud se situaron en un 96,5%, correspondiendo a la similitud comparada entre los patrones secuenciales del Grupo I y Grupo III. Los patrones secuenciales con mayores porcentajes de similitud correspondieron a la comparación del Grupo II frente a los Grupos IV, V y VI, con un porcentaje de similitud del 99,7%.

El tamaño del genoma analizado varió entre los diferentes grupos, siendo el de las cepas 232 (Grupo V) y 168 (Grupo VI) los de mayor longitud, con 495 bases, mientras que las cepas englobadas en el Grupo I, presentaron el menor tamaño genómico para esta región, con 486 bases. La longitud de las secuencias se muestra en la **Tabla III.9**.

Ningún polimorfismo fue apreciado en las secuencias. Las divergencias entre los diferentes patrones secuenciales se corresponden con deleciones o inserciones, así como sustituciones de bases. Las discrepancias en las secuencias de los Grupos I, II, III, IV, V y VI se detallan a continuación:

- Posición 30: Sustitución de Adenina por Timina en el Grupo III.
- Posición 156: Delección de Timina en el Grupo III.
- Posición 231: Sustitución de Citosina por Timina en el Grupo III.
- Posición 270: Delección de Adenina en el Grupo III.
- Posición 271: Inserción de Adenina en el Grupo VI.
- Posición 272: Delección de Timina en el Grupo III.
- Posición 396: Sustitución de Timina por Citosina en los Grupos I y III.
- Posición 397: Delección de Guanina en el Grupo I.
- Posición 397: Sustitución de Guanina por Adenina en el Grupo III.
- Posición 398: Delección de 7 bases (AAAATTA), hasta la posición 404, en el Grupo I.
- Posición 405: Inserción de Adenina en el Grupo V.
- Posición 419: Delección de 4 bases (AAAG), hasta la posición 422, en el Grupo III.
- Posición 428: Sustitución de Guanina por Citosina en el Grupo IV.

Todas estas divergencias quedan ilustradas en la **Tabla III.10**.

La interrelación taxonómica, realizada mediante la herramienta informática MEGA, en base a las secuencias de la Región Intergénica 16S-23S ARNr de todos los grupos mencionados, permitió la elaboración de un dendrograma taxonómico, como muestra la **Figura III.11**.

III.3.2.- ANÁLISIS DEL GEN CODIFICANTE DEL ARNr 23S

El análisis de las secuencias de las 14 cepas de campo de *M. hyopneumoniae* arrojó un total de 10 patrones secuenciales diferentes, a los que denominamos “Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX y X” del gen que codifica el ARNr 23S. La distribución de las cepas y su asignación en cada grupo se detalla en la **Tabla III.11** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo.

La **Figura III.10** muestra el alineamiento de las secuencias de las 14 cepas analizadas en este estudio, distribuidas en base a los 10 patrones secuenciales mencionados.

La similitud de las secuencias de los distintos grupos se refleja en la **Tabla III.12**. Los valores de similitud del 99,9% determinan la diferencia de uno a dos nucleótidos entre las secuencias alineadas. Los valores de similitud de 99,8% determinan la diferencia de 3 a 5 nucleótidos en las secuencias alineadas. Los valores de similitud de 99,7% determinan la diferencia de 6 a 8 nucleótidos en las secuencias alineadas. Los valores de similitud de 99,6% determinan la diferencia de 9 nucleótidos en las secuencias alineadas.

Los patrones secuenciales con menores porcentajes de similitud, situados en un 99,6%, correspondieron a la similitud comparada del Grupo IV, frente a los Grupos VII y IX. Los patrones secuenciales con mayores porcentajes de similitud, situados en un 99,9%, correspondieron a la comparación del Grupo II frente a los Grupos IV y V, así como a la similitud comparada del Grupo I con el Grupo VI, y del Grupo IV con el Grupo V.

El tamaño del genoma analizado fue de 2902 pares de bases para todas las cepas de *M. hyopneumoniae* estudiadas. No se apreciaron polimorfismos en las secuencias. Tampoco aparecieron inserciones o deleciones de nucleótidos, siendo todas las divergencias entre las cepas, producto de sustituciones de bases (19 en total). Las discrepancias entre los diferentes patrones secuenciales se detallan a continuación:

- Posición 323: Sustitución de Adenina por Guanina en el Grupo X.
- Posición 426: Los Grupos I, III, VI, VII y VIII presentan Guanina.
Los Grupos II, IV, V, IX y X presentan Adenina.
- Posición 573: Sustitución de Adenina por Guanina en el Grupo VII.
- Posición 657: Sustitución de Guanina por Adenina en el Grupo IX.
- Posición 1178: Sustitución de Adenina por Citosina en el Grupo III.
- Posición 1257: Sustitución de Timina por Citosina en el Grupo VII.
- Posición 1389: Sustitución de Guanina por Adenina en los grupos II y IV.
- Posición 1431: Sustitución de Guanina por Adenina en el Grupo X.
- Posición 1533: Sustitución de Adenina por Guanina en los Grupos III y VII.
- Posición 1544: Sustitución de Timina por Citosina en los Grupos III, VII, IX y X.
- Posición 1890: Sustitución de Adenina por Guanina en los Grupos II, IV y V.
- Posición 2073: Sustitución de Adenina por Guanina en los Grupos IV y VI.
- Posición 2157: Sustitución de Guanina por Adenina en el Grupo IX.
- Posición 2165: Sustitución de Citosina por Timina en el Grupo IX.
- Posición 2170: Sustitución de Timina por Adenina en el Grupo IX.
- Posición 2394: Sustitución de Guanina por Citosina en el Grupo VIII.
- Posición 2396: Sustitución de Adenina por Citosina en el Grupo VIII.
- Posición 2397: Sustitución de Guanina por Timina en el Grupo VIII.
- Posición 2824: Sustitución de Timina por Citosina en los Grupos II, IV y V.

Todas estas divergencias quedan ilustradas en la **Tabla III.13**.

La interrelación taxonómica, realizada mediante la herramienta informática MEGA, en base a las secuencias del gen que codifica el ARNr 23S de las 14 cepas secuenciadas para este estudio, junto a las secuencias previamente publicadas de las cepas 232, J, 7448 y 168, permitió la elaboración de un dendrograma taxonómico, como muestra la **Figura III.12**.

Finalmente, la correlación entre los patrones secuenciales descritos para la Región Intergénica 16S-23S ARNr y del gen que codifica el ARNr 23S, en las cepas de campo de *M. hyopneumoniae* estudiadas, se muestra en la **Tabla III.14**.

El análisis de las secuencias anteriormente publicadas por otros autores, reveló que las secuencias de la cepa 232, J y 7448 presentan discrepancias en 4 posiciones (323, 426, 2057, 2824), siendo tres de estas posiciones (323, 426, 2824), coincidentes con puntos de divergencia hallados en las secuencias de las cepas de campo. Por el contrario, la posición 2057, no coincidió con un punto de divergencia en la secuencia de las cepas de campo de *M. hyopneumoniae*.

La similitud comparada de las secuencias del gen que codifica el ARNr 23S de las cepas 232, J, 7448 presentó un valor del 99,8%, mostrando 3 nucleótidos diferentes entre cada una de estas secuencias, como refleja la **Tabla III.15**.

El análisis conjunto de las 3 cepas mencionadas, junto a la cepa asiática 168, añadió 4 posiciones de discrepancia adicionales (673, 1500, 1533, 1890), siendo dos de ellas (1533 y 1890), coincidentes con puntos de divergencia identificados en los patrones secuenciales. Por otra parte, dos de estas posiciones divergentes en la secuencia, (673 y 1500), resultaron únicas para la cepa 168. **Tabla III.16**.

La similitud de la cepa 168 respecto a la cepa J se estimó en 99,8%, con 4 nucleótidos diferentes entre ambas. Al comparar la cepa 168 con las cepas 232 y 7448, se encontraron 6 nucleótidos diferentes respecto a dichas secuencias, resultando en un menor valor de similitud (99,7%), como se muestra en la **Tabla III.17**.

La **Tabla III.18** refleja la similitud comparada de las secuencias de las cepas 232, J, 7448, y 168, respecto a los 10 patrones secuenciales descritos en este estudio. Los valores de similitud oscilaron entre 99,9% y 99,6%, lo que se traduce en discrepancias desde 1 hasta 9 nucleótidos, entre las secuencias previamente publicadas y los 10 patrones secuenciales mencionados.

La **Tabla III.19** detalla las diferencias puntuales a nivel de nucleótidos entre todos los patrones secuenciales analizados en este estudio.

A partir de los 10 patrones secuenciales descritos en este estudio, y en conjunto con las secuencias de las cepas 232, J, 7448, y 168, se elaboró una “secuencia universal” del gen que codifica el ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*, codificando los nucleótidos de las posiciones divergentes, (22 en total), con las claves utilizadas para polimorfismos, tal y como se detalla en la **Tabla III.20**.

Así mismo, se ha incluido una “secuencia consenso”, elaborada a partir de todas las secuencias anteriormente mencionadas para el gen que codifica el ARNr 23S. En esta secuencia consenso, las 22 posiciones de divergencia se han escrito con el nucleótido que aparece con mayor frecuencia, como muestra la **Tabla III.21**.

La **Tabla III.22** recoge la conversión de todas las posiciones discrepantes numeradas de acuerdo a la secuencia *E. coli* (Brosius y cols., 1980), y al modelo de estructura secundaria del ARNr 23S (Noller y cols., 1981), actualizado por el Laboratorio Noller, del Centro de Biología Molecular del ARN de Santa Cruz, Universidad de California.

III.4- DISCUSIÓN

III.4.1.- LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S ARNr

El papel de la Región Intergénica 16S-23S ARNr ha sido objeto de controversia en el estudio de las estructuras génicas de los microorganismos. Su situación única, alojada entre genes de vital importancia en el desarrollo de la vida, relegó esta región del genoma, a un papel secundario, concediendo todo el protagonismo a los genes ARNr.

Sin embargo, la concepción inicial de esta región como “ADN chatarra” (“junk DNA”) está en contraste con la percepción científica que predomina hoy en día, que establece que las estructuras génicas obsoletas o innecesarias desde el punto de vista evolutivo, tienden a desaparecer a lo largo de la línea evolutiva.

El carácter universal de esta región, y la presencia de sub-regiones muy conservadas en procariontes, incluidas las especies del Género *Mycoplasma* (estructuras “Box A” y “Box B”, Harasawa y cols., 1992; Harasawa, 1999; Harasawa y Kanamoto, 1999; Harasawa y cols., 2000; Harasawa y cols., 2004) con capacidad de función anti-terminal, para evitar finalizaciones prematuras de la transcripción de los operones ARNr, avalan la importancia de esta región. Hoy en día, el papel global que desempeña la Región Intergénica 16S-23S ARNr parece relacionado con los procesos de maduración del ARNr 16S y 23S (Pérez-Luz y cols., 1998; Shaver y cols., 2001).

Pese a las variaciones intra-especie, la Región Intergénica presenta suficientes variaciones inter-especie como para permitir el desarrollo de cebadores especie-específicos con fines diagnóstico para los micoplasmas. En algunos casos, la secuenciación de la ISR, en combinación con PCR y q-PCR ha permitido la detección e identificación de micoplasmas porcinos, (primer hallazgo de *M. hyorhinae* en Cuba, Lobo y cols., 2011) y *Ureaplasma spp.* en torundas de parénquima pulmonar porcino (Lobo y cols., datos no publicados).

Concretamente, en los micoplasmas porcinos, el tamaño del producto amplificado por PCR de la ISR con los cebadores empleados en nuestro estudio, fue diferente para las 4 especies más frecuentemente aisladas (*M. hyopneumoniae* 700 pb; *M. flocculare* 600 pb; *M. hyorhinitis* 500 pb; *M. hyosynoviae* 400 pb), lo que en sí mismo, constituye un modesto y sencillo método de identificación de los cultivos puros, toda vez que permite detectar la presencia de más de un tipo de ADN en la verificación de la pureza de los cultivos (**Figura III.4** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo).

La relación taxonómica de diferentes micoplasmas, analizada a través de esta región del genoma, ha sido ampliamente estudiada por Harasawa y cols., (1992, 1999, 2000, 2004). A pesar de ello, hay pocos estudios realizados para determinar la variabilidad de la Región Intergénica 16S-23S ARNr entre cepas de campo de un mismo taxón, dentro del Género *Mycoplasma*.

Los estudios realizados en micoplasmas aviares, revelaron que algunos micoplasmas, como *M. iowae*, presentaban ISR idénticas en todas las cepas de campo y serovares analizados (22 cepas de campo de *M. iowae*, Ramírez y cols., 2012). Así mismo, en otras especies como *M. pulmonis* (Harasawa, 1999), *U. urealyticum*, *U. parvum* (Harasawa y Kanamoto, 1999), *M. hominis*, *M. arginini*, *M. bovis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. hyorhinitis* y *M. felis* (Volokhov y cols., 2006), la similitud de la ISR entre distintas cepas es del 100%. En contraposición, las cepas de campo de *M. synoviae*, *M. gallisepticum* y *M. meleagridis* presentan un rango de similitud del 96,1%, 94% y 97,2% respectivamente (Ramírez y cols., 2007).

En el estudio que aquí presentamos, la Región Intergénica 16S-23S ARNr de 20 cepas de campo fue secuenciada a partir de los productos amplificados por PCR. Al menos 4 patrones secuenciales diferentes fueron obtenidos.

Estos patrones secuenciales (Grupos I, II, III y IV de la ISR.) fueron así mismo diferentes a las secuencias de la Región Intergénica 16S-23S ARNr de las cepas 232 (Minion y cols., 2004) y 168 (Liu y cols., 2011), denominadas como Grupos V y VI respectivamente (**Tabla III.10** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo).

El Grupo I de la ISR, engloba así mismo la secuencia de la cepa 7448 (Vasconcelos y cols., 2005), y fue el patrón secuencial que aglutinó mayor número de cepas de campo (14 de las 20 cepas).

El Grupo II de la ISR incluye la secuencia de la cepa J (Vasconcelos y cols., 2005). Los Grupos III y IV de la ISR resultaron secuencias no descritas para la Región Intergénica 16S-23S ARNr de *M. hyopneumoniae* por otros autores.

La similitud entre los 6 patrones secuenciales de la ISR osciló entre 96,5% hasta 99,7%, con un tamaño de 486 a 495 pares de bases (**Tabla III.8** y **Tabla III.9**).

La delección de las posiciones 397 hasta 404 (GAAAATTA) en las cepas del Grupo I de la ISR (14 cepas de campo y la cepa 7448) demuestra ser la zona más interesante para el diseño de cebadores. Estas posiciones, deberían ser evitadas como puntos de inicio de la unión del cebador con el ADN, para optimizar las posibilidades de amplificar el ADN de cualquier cepa de *M. hyopneumoniae*. Así mismo, la presencia de esta inserción en el resto de Grupos de la ISR, podría ser empleada para amplificar selectivamente las cepas de los Grupos II, III, IV, V y VI de la ISR, excluyendo así a las cepas cuyo patrón secuencial coincida con el Grupo I.

En nuestro estudio, encontramos que la Región Intergénica 16S-23S ARNr de 20 cepas de campo y 4 cepas secuenciadas por otros autores (cepas 232, 7448, J, y 168), pueden ser englobadas en 6 grupos. La mayoría de las cepas analizadas (15 de 24) presentan el patrón secuencial “Grupo I” de la ISR, mientras las 9 cepas restantes se distribuyen entre los otros 5 patrones secuenciales de la ISR (**Tabla III.7**).

Sin embargo, 14 cepas de campo (**Tabla III.11**) y estas mismas 4 cepas publicadas por otros autores (cepas 232, 7448, J, y 168), aportan un total de 14 patrones secuenciales diferentes cuando se analizan las secuencias del gen ARNr 23S.

Por tanto, no parece existir una correlación clara entre el patrón secuencial de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y el patrón secuencial del gen ARNr 23S en *Mycoplasma hyopneumoniae* (**Tabla III.14**).

Aunque la estructura secuencial básica de este gen mantiene una alta estabilidad, la aparición de pequeñas variaciones (en forma de sustituciones directas de nucleótidos), resalta el carácter variable del gen ARNr 23S entre diferentes cepas de *M. hyopneumoniae*.

Ello demuestra, que en *M. hyopneumoniae*, la variabilidad entre distintas cepas es mayor en el gen ARNr 23S que en la Región Intergénica 16S-23S ARNr. Sin embargo, como se detallará a continuación, la variación en el grado de similitud del gen ARNr 23S resultó mucho menor que la variación en el grado de similitud encontrado entre los diferentes grupos de la ISR.

III.4.2.- EL GEN CODIFICANTE DEL ARNr 23S

La **Tabla III.19** y la **Figura III.12** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo, detallan las diferencias posicionales de nucleótidos entre los patrones secuenciales analizados en este estudio y su agrupamiento filogenético en base a las diferencias identificadas entre las secuencias.

La primera secuencia completa del gen que codifica el ARNr 23S en *M. hyopneumoniae* (Ludwig y cols., 1992) ha demostrado una equivalencia aceptable al compararla con aquellas secuencias genómicas completas que han sido aportadas en los últimos años. No obstante, algunas discrepancias son dignas de mención.

En primer lugar, tan sólo en esta secuencia aparece un nucleótido adicional (G), concretamente en la posición 1243, con lo que la secuencia final consta de 2903 nucleótidos. Dado que dicho nucleótido no aparece insertado en ninguna de las secuencias

analizadas, y que dicha posición va precedida por el mismo nucleótido (G), parece lógico pensar que la presencia del mismo podría corresponder a un error en la lectura de la secuenciación. En segundo lugar, aunque dicha secuencia fue realizada sobre la cepa J, con la excepción del nucleótido adicional mencionado, su patrón secuencial fue idéntico al descrito para la cepa 232 (Minion y cols., 2004).

La secuenciación de la cepa 232, ha definido los puntos exactos para marcar los límites de este gen. En su comparación con la cepa virulenta 7448 y la cepa no virulenta J, encontramos una similitud del 99,8%, con 3 nucleótidos diferentes entre todas ellas, repartidos en 4 posiciones de la secuencia (**Tabla III.15**). La cepa 7448 difiere de estas dos cepas (y de las cepas de campo analizadas) en la posición 2057, al ser la única que muestra (T) en lugar de (A).

Por otra parte, la posición 2824, es diferente para cada una de estas 3 cepas. Si bien en la secuencia de la cepa 232, esta posición está ocupada por (T), y en la cepa J aparece (C), en la cepa 7448 el nucleótido es (G). En esta misma posición los patrones secuenciales de las cepas de campo mostraron únicamente (C: grupos II, IV y V) y (T: resto de grupos), siendo por tanto, la presencia de (G) en esta posición, otra singularidad única de la cepa 7448. Esta posición (2824) es así mismo, la única que muestra hasta 3 nucleótidos posibles, en las secuencias analizadas en este estudio (**Tabla III.19**).

La aportación de la secuencia de la cepa 168, añade nuevas posiciones de discrepancia respecto a las 3 cepas secuenciadas anteriormente. De estas posiciones, 2 parecen ser únicas para la cepa 168 (transiciones G673A y G1500A). Otras 2 posiciones (transiciones G1533A y A1890G) difieren de la cepa 232, J y 7448 (**Tabla III.16**).

Sin embargo, la transición G1533A aparece en todos los patrones secuenciales de las cepas de campo, excepto los grupos III y VII. Así mismo, la transición A1890G es compartida por los grupos II, IV y V. En conjunto, la secuencia de la cepa 168 presenta 5 nucleótidos en discrepancia con la cepa J (similitud del 99,8%), y 6 nucleótidos con las cepas 7448 y 232 (similitud del 99,7%) como muestra la **Tabla III.17**.

En el análisis de las 14 cepas de campo, se definieron 10 patrones secuenciales para el gen ARNr 23S (Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X), siendo los grupos I, II, y III representados por 3, 2 y 2 cepas respectivamente. El resto de los patrones se obtuvo por medio de una única cepa secuenciada para este gen (**Tabla III.11**). Ninguno de estos patrones secuenciales tuvo una correspondencia exacta (100%) con las secuencias publicadas por otros autores (**Tabla III.19**).

Un total de 19 posiciones fueron discrepantes entre las secuencias de los 10 grupos mencionados. De estas 19, al menos 12 correspondieron a transiciones expresadas en un único grupo, mientras que las 7 restantes fueron identificadas en al menos 2, 3 ó 5 de los grupos (**Tabla III.13**).

Analizando las discrepancias entre los 10 patrones secuenciales, observamos que presentan diferencias desde 1 hasta 9 nucleótidos. Ello determina un rango de similitud del 99,9 al 99,6% entre los mismos (**Tabla III.12**), siendo superior al rango de similitud encontrado (99,8 al 99,7%) entre las 4 cepas anteriores (232, J, 7448, y 168; **Tabla III.17**). La comparación de los 10 patrones secuenciales con estas 4 cepas, revela así mismo un rango de similitud que oscila entre el 99,9 y 99,6% (**Tabla III.18**).

Analizando los 10 patrones descritos, es posible identificar relaciones filogenéticas y valorar la importancia relativa de la transición de cada nucleótido en la posición correspondiente. Su análisis junto a las 4 secuencias realizadas por otros autores, permite clasificar las secuencias en 4 conjuntos (**Figura III.12**).

Un primer conjunto de secuencias, estaría representado por las secuencias del Grupo I (cepas O, I, 29-A), el Grupo VI (cepa F) y Grupo VIII (cepa 104d). Las secuencias del Grupo I y Grupo VIII son idénticas, con la salvedad de las tres transiciones únicamente descritas en la secuencia de este último (G2394C, A2396C y G2397T). No obstante, el Grupo I y el Grupo VI comparten una relación filogenética más estrecha, siendo su única discrepancia la transición A2073G en el grupo VI.

La transición A-G en la posición 2073, (que se corresponde con la posición 2058 siguiendo la numeración *E. coli*), fue descrita para *M. hyopneumoniae* (Stakenborg y cols., 2005), como un mecanismo de resistencia frente a antimicrobianos en cepas seleccionadas *in vivo*.

Esta transición (A2073G) también fue identificada en el Grupo IV (cepa 2-A). Sin embargo, este grupo parece tener mayor relación filogenética con el Grupo II (cepas 10-P y 35-P) y Grupo V (cepa GC38). Al menos 2 transiciones (A1890G y T2824C) separan a estos 3 grupos del resto de patrones de las cepas de campo, y las acercan filogenéticamente a las cepas 168 (que presenta la transición A1890G) y J (con la transición T2824C), conformando un segundo conjunto de secuencias. La transición G1389A, únicamente fue descrita en los Grupos II y IV, lo que determina una mayor proximidad entre sendas secuencias, dentro de este conjunto.

Por otra parte, el Grupo III (cepas RMH7 y RMH8) presentó una elevada similitud (99,9%) con la cepa 232, con sólo 2 nucleótidos diferentes en la secuencia. Una de las transiciones encontradas en el Grupo III (A1178C), resultó única para este grupo, mientras que la transición G323A, presente en la cepa 232, se identificó en todas las secuencias del estudio, excepto en el Grupo X.

Así mismo, El Grupo III y la cepa 232 guardan mayor relación filogenética con el Grupo VII (cepa 75). La secuencia del Grupo VII, mantiene notables paralelismos con sendas secuencias, con la salvedad de 2 transiciones identificadas únicamente en este patrón secuencial (A573G y T1257C). Estas tres secuencias (Grupo III, cepa 232 y Grupo VII), mantienen mayor proximidad filogenética con la cepa virulenta 7448.

Con la excepción de las 2 transiciones únicas para el Grupo VII (A573G y T1257C), y las 2 transiciones únicas para la cepa 7448 (A2057T y C/T-2824G), ambas secuencias son idénticas en todas las posiciones restantes. Estas 4 secuencias (Grupo III, Grupo VII, cepa 232 y cepa 7448) conforman un tercer conjunto por proximidad filogenética.

Un cuarto conjunto de secuencias se corresponde con los Grupos IX (cepa 235) y X (cepa 88), y su agrupamiento corresponde en mayor medida a la dificultad de posicionar estas secuencias en el dendrograma resultante, y no al hecho de que ambas cepas muestren mayor proximidad o porcentaje de similitud entre sí.

Ambas secuencias muestran peculiaridades que las diferencian del resto de secuencias analizadas, y que dificultan su posición filogenética en el entorno de las secuencias analizadas en este estudio.

En el caso del Grupo IX, aparecen 4 transiciones únicas (G657A, G2157A, C2165T, T2170A), que la separan del resto de secuencias. Otra de sus peculiaridades se debe a la transición T1544C, que aparece en todas las cepas anteriormente publicadas (cepas 232, J, 7448 y 168), pero sólo en algunos de los grupos descritos para las cepas de campo (Grupos III, VII, IX y X).

La mayor relación filogenética del Grupo IX ocurre con el Grupo VII (similitud del 99,8%). Por el contrario, mantiene numerosas discrepancias con el resto de las secuencias, siendo el patrón secuencial con menor similitud respecto al conjunto de las secuencias analizadas (99,7 a 99,6% con todas las secuencias restantes).

El Grupo X presenta una transición única (G1431A), así como una transición que sólo comparte con la secuencia de la cepa 232 (A323G). El Grupo X presenta su mayor similitud con la cepa 232, ya que discrepa en solo 3 posiciones con la secuencia de esta cepa, mientras mantiene un rango de 4 a 7 nucleótidos diferentes con el resto de las secuencias analizadas.

La secuencia universal que incluimos en este trabajo (**Tabla III.20**), señala todas las discrepancias entre las secuencias analizadas, y codifica mediante los símbolos empleados en polimorfismos, los diferentes nucleótidos que han sido identificados en las posiciones discrepantes.

La secuencia consenso que incluimos en este trabajo (**Tabla III.21**), representa la configuración teórica de la secuencia de nucleótidos para este gen en *M. hyopneumoniae*, tomando en consideración el patrón más habitualmente identificado en el análisis conjunto de los patrones secuenciales de las cepas de campo y las secuencias aportadas por Minion, Vasconcelos y Liu.

En ausencia de un modelo de estructura secundaria del ARNr 23S para *M. hyopneumoniae* con el que verificar la viabilidad biológica de esta secuencia consenso, el propósito de la misma es el de homogeneizar la secuencia de este gen con un doble objetivo; por una parte, servir de guía para el diseño de cebadores y sondas en el diseño de herramientas diagnósticas de carácter universal para este microorganismo, y por otra, actuar de secuencia molde para *M. hyopneumoniae* en el análisis y comparación del gen que codifica el ARNr 23S en diferentes especies de micoplasmas porcinos, realizada en el siguiente capítulo.

Uno de los pocos trabajos existentes de diversidad intraespecífica en el gen ARNr 23S (Anton y cols., 1999), mostró que la variación en el grado de similitud, en un único operón de 5 cepas de *E. coli*, se situaba entre 99,3 y 98,4%, si bien este rango se ampliaba al incluir los 7 operones de una sexta cepa (99,7 a 98,4%), y dicho rango puede ser de nuevo ampliado (99,9 a 98,4%) si añadimos en análisis posteriores, algunas de las secuencias que se han publicado para el gen ARNr 23S de *E. coli*, desde entonces.

En nuestro estudio, el grado de similitud para *M. hyopneumoniae* (99,9 a 99,6%) muestra una mayor constricción que en *E. coli*, y demuestra un tamaño de la secuencia más estable (2902 nucleótidos, frente a los 2902–2905 nucleótidos en *E. coli*). Así mismo, el número de posiciones con polimorfismos fue sensiblemente superior en *E. coli* (67 frente a 22 en *M. hyopneumoniae*).

Este contraste parece en consonancia con la percepción que tenemos de una evolución reductiva en *Mollicutes* respecto a otras bacterias, e indica que el patrón secuencial para este gen en *M. hyopneumoniae* está sujeto a un menor número de variaciones posibles.

La presencia de múltiples operones del gen ARNr 23S en la mayoría de Géneros en procariotas, conduce inevitablemente a un mayor rango de variación. Pei y cols., (2009), compararon la homogeneidad de las múltiples copias de este gen en 184 especies con más de un operón, y describieron variaciones en más del 60% de las mismas, con valores de similitud del 99,9 al 95,6%.

Sin embargo, tan solo 8 especies de las 184 del trabajo de Pei y cols., (2009), demostraron rangos de variación tan acusados, mientras que el resto de las especies en las que se presentó variación, la similitud osciló entre el 99,9 y 98,3%. Los hallazgos de estos autores sugieren una estricta limitación en la diversidad de este gen dentro del rango intra-especie (0,01 hasta 1,7% en la mayoría de los casos, pudiendo alcanzar hasta 4,4% en algunas especies).

Dado que *M. hyopneumoniae* dispone de una única copia del gen ARNr 23S (Taschke y cols., 1986), y que la mayoría de micoplasmas presentan una o dos copias del mismo, es razonable conjeturar, que futuros estudios intraespecíficos de este gen en especies del Género *Mycoplasma*, arrojen rangos de variación moderados en el grado de similitud de sus cepas, y que los porcentajes de similitud sean superiores a los establecidos en otras especies bacterianas con múltiples copias del gen ARNr 23S, como ocurre en la mayoría de las especies no incluidas en la Clase *Mollicutes*.

ANEXO: Tablas y Figuras

Tabla III.1.- Cebadores empleados para la Región Intergénica 16S-23S ARNr.
(Ramírez y cols., 2007).

Secuencia objetivo	Cebadores	Secuencia de los Cebadores
Región Intergénica 16S-23S	16S+C	5'-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3'
	23S-B	5'-CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG-3'

Tabla III.2.- Cebadores empleados para el gen codificante del ARNr 23S.

(Ramírez y cols., 2008b)

Secuencia objetivo	Cebadores	Secuencia de los Cebadores
Fragmento A	1F-23S	5'- GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A – 3'
	1R-23S	5'- CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC – 3'
Fragmento B	2F-23S	5'- GCG AAA TCG GAA GAG GCC AAA C – 3'
	2R-23S	5'- CAC CGC TAG CCA CCA GTC ATC C – 3'
Fragmento C	3F-23S	5'- GGT GAT CTA GCC ATG AGC AG – 3'
	3R-23S	5'- CCA TCG GCT ACG CTT TTC AGC C – 3'
Fragmento D	4F-23S	5'- GTA ACG TTT CGA AGT GAG AAT C – 3'
	4R-23S	5'- CCG TTA TAG TTA CGG CCG CCG TTC – 3'
Fragmento E	5F-23S	5'- GAC ACC TGC CCA GTC CCG GAA GG – 3'
	5R-23S	5'- CCG TCG ATG TGA ACT CTT GGG – 3'
Fragmento F	6F-23S	5'- GAA AGT AGG ACT TAG TGA TCC GG – 3'
	1F-23S	5'- GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A – 3'

Tabla III.3.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen codificante del ARNr 23S en *M. hyopneumoniae*.

Secuencia objetivo	Cebadores	Secuencia de los Cebadores
Fragmento A	BoxA-hyop2	5'- CAA AAG GCA AAA CAG CTC TTT -3'
	1R-23S	5'- CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC - 3'
Fragmento F	6F-23S	5'- GAA AGT AGG ACT TAG TGA TCC GG - 3'
	BoxA-hyop2	5'- CAA AAG GCA AAA CAG CTC TTT -3'

Tabla III.4.- Protocolo de PCR aplicado para la amplificación de la Región Intergénica 16S-23S ARNr. (Ramírez y cols., 2007).

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	120 seg.
2	35	94°C	15 seg.
		60°C	30 seg.
		72°C	120 seg.
3	1	72°C	60 seg.
4	1	4°C	Hold

Tabla III.5.- Protocolo de PCR aplicado para la amplificación de la los Fragmentos A y F del gen codificante del ARNr 23S. (Ramírez y cols., 2008b).

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	120 seg.
2	35	94°C	15 seg.
		45°C	30 seg.
		72°C	120 seg.
3	1	72°C	60 seg.
4	1	4°C	Hold

Tabla III.6.- Protocolo de PCR aplicado para la amplificación de los Fragmentos B, C, D y E del gen codificante del ARNr 23S. (Ramírez y cols., 2008b).

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	120 seg.
2	35	94°C	15 seg.
		55°C	30 seg.
		72°C	120 seg.
3	1	72°C	60 seg.
4	1	4°C	Hold

Tabla III.7.- Patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en *M. hyopneumoniae*. Las secuencias de las cepas señaladas con * (cepas 7448, J, 232 y 168), fueron obtenidas de Gene Bank.

GRUPOS DE LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S					
GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VI
Cepa 104-d	Cepa 29-A	Cepa 2-A	Cepa 10-P	Cepa 232*	Cepa 168*
Cepa 103-b	Cepa 88	Cepa 35-P			
Cepa RMH-8	Cepa J*	Cepa GC38			
Cepa RMH-7					
Cepa 235					
Cepa 78					
Cepa 75					
Cepa 69					
Cepa 68					
Cepa 3					
Cepa O					
Cepa K					
Cepa I					
Cepa F					
Cepa 7448*					

Tabla III.8.- Similitud comparada de los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en *M. hyopneumoniae*. Los valores en rojo y en azul indican los mayores y menores valores de similitud respectivamente.

	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VI
GRUPO I	ID	0,981	0,965	0,979	0,979	0,979
GRUPO II	0,981	ID	0,977	0,997	0,997	0,997
GRUPO III	0,965	0,977	ID	0,975	0,975	0,975
GRUPO IV	0,979	0,997	0,975	ID	0,995	0,995
GRUPO V	0,979	0,997	0,975	0,995	ID	0,995
GRUPO VI	0,979	0,997	0,975	0,995	0,995	ID

Tabla III.9.- Longitud del genoma secuenciado de los patrones secuenciales 16S-23S ARNr en *M. hyopneumoniae*.

LONGITUD DE LA REGIÓN INTERGÉNICA 16S-23S					
GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VI
486 bases	494 bases	487 bases	494 bases	495 bases	495 bases

Tabla III.10.- Diferencias entre los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en *M. hyopneumoniae* (Grupos I, II, III, IV, V y VI de la Región Intergénica 16S-23S ARNr).

Posición	PATRONES SECUENCIALES Región Intergénica 16S-23S					
	I	II	III	IV	V	VI
30	A	A	T	A	A	A
156	T	T	----	T	T	T
231	C	C	T	C	C	C
270	A	A	----	A	A	A
271	----	----	----	----	----	A
272	T	T	----	T	T	T
396	C	T	C	T	T	T
397	----	G	A	G	G	G
398	----	A	A	A	A	A
399	----	A	A	A	A	A
400	----	A	A	A	A	A
401	----	A	A	A	A	A
402	----	T	T	T	T	T
403	----	T	T	T	T	T
404	----	A	A	A	A	A
405	----	----	----	----	A	----
418	A	A	----	A	A	A
419	A	A	----	A	A	A
420	A	A	----	A	A	A
421	G	G	----	G	G	G
428	G	G	G	C	G	G

Tabla III.11.- Patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S en cepas de campo de *M. hyopneumoniae*.

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V
Cepa 29-A	Cepa 10-P	Cepa RMH-7	Cepa 2-A	Cepa GC38
Cepa O	Cepa 35-P	Cepa RMH-8		
Cepa I				

GRUPO VI	GRUPO VII	GRUPO VIII	GRUPO IX	GRUPO X
Cepa F	Cepa 75	Cepa 104-d	Cepa 235	Cepa 88

Tabla III.12.- Similitud comparada del gen codificante del ARNr 23S en cepas de campo de *M. hyopneumoniae*. Los valores en rojo y en azul indican mayores y menores valores de similitud respectivamente.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
GRUPO I	ID	0,998	0,998	0,998	0,998	0,999	0,998	0,998	0,997	0,998
GRUPO II	0,998	ID	0,997	0,999	0,999	0,998	0,997	0,997	0,997	0,997
GRUPO III	0,998	0,997	ID	0,997	0,997	0,998	0,998	0,997	0,997	0,998
GRUPO IV	0,998	0,999	0,997	ID	0,999	0,998	0,996	0,997	0,996	0,997
GRUPO V	0,998	0,999	0,997	0,999	ID	0,998	0,997	0,997	0,997	0,998
GRUPO VI	0,999	0,998	0,998	0,998	0,998	ID	0,998	0,998	0,997	0,998
GRUPO VII	0,998	0,997	0,998	0,996	0,997	0,998	ID	0,997	0,998	0,997
GRUPO VIII	0,998	0,997	0,997	0,997	0,997	0,998	0,997	ID	0,996	0,997
GRUPO IX	0,997	0,997	0,997	0,996	0,997	0,997	0,998	0,996	ID	0,997
GRUPO X	0,998	0,997	0,998	0,997	0,998	0,998	0,997	0,997	0,997	ID

Tabla III.13.- Diferencias entre los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S en cepas de campo de *M.hypopneumoniae*. (Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X del gen ARNr 23S).

Posición	PATRONES SECUENCIALES 23S									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
323	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G
426	G	A	G	A	A	G	G	G	A	A
573	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A
657	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G
1178	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A
1257	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T
1389	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G
1431	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
1533	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A
1544	T	T	C	T	T	T	C	T	C	C
1890	A	G	A	G	G	A	A	A	A	A
2073	A	A	A	G	A	G	A	A	A	A
2157	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G
2165	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C
2170	T	T	T	T	T	T	T	T	A	T
2394	G	G	G	G	G	G	G	C	G	G
2396	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A
2397	G	G	G	G	G	G	G	T	G	G
2824	T	C	T	C	C	T	T	T	T	T

Tabla III.14.- Correlación entre los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y del gen ARNr 23S en cepas de campo de *M. hyopneumoniae*.

Cepa	Año y Origen	Grupos 23S	Grupos ISR
Cepa I	2003, Gran Canaria	Grupo I	Grupo I
Cepa O	2003, Gran Canaria	Grupo I	Grupo I
Cepa 29-A	2009, Gran Canaria	Grupo I	Grupo II
Cepa 35-P	2009, Gran Canaria	Grupo II	Grupo III
Cepa 10-P	2009, Gran Canaria	Grupo II	Grupo IV
Cepa RMH-8	2006, Madrid	Grupo III	Grupo I
Cepa RMH-7	2006, Madrid	Grupo III	Grupo I
Cepa 2-A	2009, Gran Canaria	Grupo IV	Grupo III
Cepa GC38	2007, Gran Canaria	Grupo V	Grupo III
Cepa F	2003, Gran Canaria	Grupo VI	Grupo I
Cepa 75	2003, Gran Canaria	Grupo VII	Grupo I
Cepa 104-d	2008, Gran Canaria	Grupo VIII	Grupo I
Cepa 235	2005, Gran Canaria	Grupo IX	Grupo I
Cepa 88	2005, Gran Canaria	Grupo X	Grupo II

Las 6 cepas de *M. hyopneumoniae* no secuenciadas para el gen que codifica el ARNr 23S, (Cepas K, 3, 68, 69, 78 y 103-b) correspondieron al Grupo I de la ISR.

Tabla III.15.- Discrepancias en las secuencias y similitud comparada del gen ARNr 23S de las cepas 232, J, y 7448 de *M. hyopneumoniae*.

Posición					Similitud comparada					
					Cepa J	Cepa 7448	Cepa 232			
					323	426	2057	2824		
Cepa J	A	A	A	C	ID	0,998	0,998			
Cepa 7448	A	G	T	G	0,998	ID	0,998			
Cepa 232	G	G	A	T	0,998	0,998	ID			

Tabla III.16.- Discrepancias en las secuencias del gen ARNr 23S de las cepas 232, J, 7448 y 168, de *M. hyopneumoniae*.

Posición								
Cepa 168	A	G	A	A	A	G	A	C
Cepa J	A	A	G	G	G	A	A	C
Cepa 7448	A	G	G	G	G	A	T	G
Cepa 232	G	G	G	G	G	A	A	T

Tabla III.17.- Similitud comparada de las secuencias del gen ARNr 23S de las cepas 232, J, 7448 y 168, de *M. hyopneumoniae*.

Similitud comparada				
	Cepa 168	Cepa J	Cepa 7448	Cepa 232
Cepa 168	ID	0,998	0,997	0,997
Cepa J	0,998	ID	0,998	0,998
Cepa 7448	0,997	0,998	ID	0,998
Cepa 232	0,997	0,998	0,998	ID

Tabla III.18.- Similitud comparada entre patrones secuenciales del gen ARNr 23S de las cepas de campo y las cepas 232, J, 7448 y 168, de *M. hyopneumoniae*. Los valores en rojo y en azul indican los mayores y menores valores de similitud respectivamente.

	Cepa 168	Cepa J	Cepa 7448	Cepa 232
GRUPO I	0,997	0,998	0,998	0,998
GRUPO II	0,998	0,998	0,997	0,997
GRUPO III	0,997	0,998	0,998	0,999
GRUPO IV	0,998	0,998	0,997	0,997
GRUPO V	0,998	0,998	0,997	0,997
GRUPO VI	0,997	0,998	0,998	0,998
GRUPO VII	0,997	0,998	0,998	0,998
GRUPO VIII	0,996	0,997	0,997	0,997
GRUPO IX	0,997	0,997	0,997	0,997
GRUPO X	0,997	0,998	0,997	0,998

Tabla III.19.- Diferencias entre todos los patrones secuenciales analizados del gen ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*. Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, las secuencias previamente documentadas por otros autores (Cepas 232, J, 7448, y 168) y la secuencia consenso del gen que codifica el ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*.

Posición	PATRONES SECUENCIALES ARNr 23S														
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	232	J	7448	168	Cons.
323	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A
426	G	A	G	A	A	G	G	G	A	A	G	A	G	A	G
573	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A
657	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
673	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G
1178	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1257	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T
1389	G	A	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1431	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G
1500	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G
1533	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A	G	G	G	A	A
1544	T	T	C	T	T	T	C	T	C	C	C	C	C	C	C
1890	A	G	A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A
2057	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A
2073	A	A	A	G	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2157	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
2165	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C
2170	T	T	T	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T
2394	G	G	G	G	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G	G
2396	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A
2397	G	G	G	G	G	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G
2824	T	C	T	C	C	T	T	T	T	T	T	C	G	C	T

Tabla III.20.- Secuencia universal del gen codificante del ARNr 23S de *Mycoplasma hyopneumoniae*, con códigos para polimorfismos. Las 22 variaciones encontradas entre todas las secuencias analizadas (cepa 168, cepa J, cepa 7448, cepa 232, y Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X), han sido señaladas en rojo, y codificadas de acuerdo a las reglas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

Mycoplasma hyopneumoniae: (secuencia universal)

TTTTAAATAAATAAGAGTATTTGGTGGATGCCTTGGGTCTGAAAGTCGATGAAGGACGTGATTACCTGCG
ATAAGCTTCGTGGAGTTGGAAATAAACTATGATACGGAGATTTCCGAATGGGGGAACCCAATCTAGCAA
ACCTAGATTGCGCTTTAATGAATTCATAATTAAGCAGCGAGATACGTTGCGAATTGAAACATCTTAGTA
GCAACAGGAAAAGAAAATAAATAATGATTCCCAAAGTAGTGGCGAGCGAAATGGGAAGAGCCCAAACC
GTTTTTACGGGGTTATAGGACATTTAATTGAGTTAGAAAATTAT**R**TAATAGTAGAAAAAGTTGGAAAAGC
TTTGACATAGAAGGTGATATCCCTGTATATTAATTAATAATCTCATAGATGTATCCTGAGTAGGGCGG
GGCACGTG**R**AACCCGTCTGTAATTTGCCAGGACCCTGGTAAGGCTAAATACTAATCAGACACCGATA
GTAACTAGTACCCGTGAGGGAAAAGGTGAAAAGAACCCTGGAGAGGGGAGTGAAATAGATTCTGAAACCA
TTTACTTACAAGTAGTCA**R**AGCACGTTAATGTGTGATGGCGTACATCTTGCAGTATGGTCCGGCGAGTTA
TGTTAAACAAGCAAGGTTAAGCGGATTAAGCG**R**AGCCGTAGGGAAAACC**R**AGTCTAAATAGGGCGTTAAG
TTTGTGACATAGACCCGAAACCAGGTGATCTATCCATGAGCAGAATGAAACTTTGGTAACACAAAGTG
GAGGTTCGAACCCTAGTACGCTAAAAAGTGCCCGGATGACTTGTGGATAGCGGTGAAATTCCAATCGAA
CCTGGAGATAGCTGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTAGCGTATAGAATCTAATTAATGGGGGTAGA
GCATGAATGTGGAAATGGCGGCACCTAGCTGACTGACTATAATCAAACCTCCGAATACCAATTAATCTTAT
CTATGCAGTCGGAACGTGGGTGATAACGTCCCGCTCGCGAGGGAAAACAACCCAGATCGTCAGTAAAGG
TCCCAAAATTATGTTAAGTGAGAAAAGTTGTGAAATTTCTTAAACAACCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAG
CCACCATTTAAAGAGTGCCTAATTGCTCACTAGTCAAGAGATCTTGCGCCAATAATGTAACGGGACT**M**A
AACATAATACCGAAGCTGCGGGTAAACTTTTTAAGTTTACGTTAGGAGAGCGTTTTAATTTTCGCTGAAGC
TAGAGGG**Y**GACCACTAGTGGAGAAATTTAAAGTGAGAATGCCGGAATGAGTAACGATTTCGAAGTGAGA
ATCTTCGACGCCATTGGGGAAAGGTTTCTGGGCAAGGGTCGTCCACCCAGGGTTAGTCAGGGCCTAAG
GA**R**AGGCTGAAAAGCGTATCCGATGGATAATCGGTTAATATTCC**R**ATACTTGTATTGGAGTGTGGGAT
TACGAAAAAAGATAGTTTACCCTACTGATGTTGTTGGGTA**R**CAGTCAAGAAAGTTATATGGCAAA
TCCGTAT**R**ACATTAATTT**Y**AAGCTGTGATGCATAGGGAAAGAGACTCAAGTACCGAATTAATGACT
CTCTGTTTCCAAGAAAAGTCTCTAGCGCTAATTCATAACAACCTGTACCAAGAACGGACACACGTCCCC
AAGATGAGTATTCTAAGGTGAGCGAGAAAACCAATGTTAAGGAACTCTGCAAAATTATCCCGTACGTTT
GCAAGAAGGGATGCCCTTTTTCTTAAAGGGCCTCAGTAAAATAGGGGGGGCAACTGTTTATCAAAAACA
CAGCTCTCTGCAAAGGTGTAACCGAAGTATAGAGGGTGAAGCCTGCCAGTGCCCGAAGGTTAAGCGG
AGATGTTAGCCTATTGGC**R**AAGCATTCAAGTGAAGCCCGGGTGAACGGCGGCCGTAACTATAACGGTCC
TAAGTAGCGAAATTCCTTGTCAACTAATTATTGACCTGCACGAAAGGCGCAATGATCTCCCTACTGTCT
CAACATTGGACTCGGTGAAATTATGGTACCAGTGAACCGCTGGTT**W**CCCGCATCAAGACGA**R**AAGACC
CCGTGGAGCTTTACTATAAATTTCGTATTGAGAATTGGTTTATTATGTGTAGGATAGGTGGGAGATGTCGA
TCCAAGG**R**CGTAGT**Y**CTTG**W**GGAGTCAACCTGAAATACCACCTTAATAAATTGATTTTCTAACCTGC
TTCCCTAACAGGAAGAGAGACAGTGCCTGGTGGGTAGTTGACTGGGGCGGTTCGCTCCTAAAGAGTA
ACGGAGGTGTTCAAAGCTACACTCAATATGGTCGGAAACCATATGCAGAGCATAAAGGTAAGGTTGTTGG
TTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAS**SMK**GACTTAGTGATCCGGCGGTTCAATTGTGGA
ATGGCCGTCGCTCAACGGATAAAAGCTACCCCGGGATAACAGGCTAATCTCCCAAGAGATCAGATC
GACGGGAAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCGCATCCTGGAGCTGAAGTCGGTTCCAAGGTTTGG
CTGTTCCGCAATTAAGCGGTACGTGAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTCCGGTCCCTATCTGAT
GTGGGCGTTGGAATATTGATGAGAGCTGCTTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGACGTACCGCTGGTGT
TCCAGTTGCTTGCCAAAGGCATAGCTGGGTAGCTAAGTACGGAAAAGATAACCGCTGAAAGCATCTAA
GCGGGAAGCTTCTCAAAGATGAGTATTCCTTATGAAATTCCTTATAGAC**B**ATGAGGTTGATAGGTTAGA
GGTGAAGTGTAGCAATACATTACAGCTGACTAATACTAATAAATTCAAAGTTTAAAAAG

Longitud de la secuencia: 2902 nucleótidos.

R = G A	M = A C	Y = T C	W = A T	S = G C	K = G T	B = G T C
----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	------------------

Tabla III.21.- Secuencia consenso del gen codificante del ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*. Las 22 variaciones encontradas entre todas las secuencias analizadas (cepa 168, cepa J, cepa 7448, cepa 232, y Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X), han sido señaladas en verde, asignado la base A, T, G, C que aparece en la mayoría de las secuencias analizadas.

<u><i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>: (secuencia consenso)</u>				
TTITAAATAAATAAGAGTATTTGGTGGATGCCTTGGGTCTGAAAGTCGATGAAGGACGTGATTACCTGCC ATAAGCTTCGTGGAGTTGGAAAATAACTATGATACGGAGATTTCCGAATGGGGGAACCCAATCTAGCAA ACCTAGATTGCGCTTAAATGAATTCATAATTAAGCAGCGAGATACGTTGCGAATTGAAACATCTTAGTA GCAACAGGAAAAGAAAATAAATAATGATTCCCAAAGTAGTGGCGAGCGAAATGGGAAGAGCCCAAACC GTTTTACGGGGTTATAGGACATTTAATTGAGTTAGAAAATTATTAATAGTAGAAAAAGTTGGAAAGC TTTGACATAGAAGGTGATATCCCTGTATATTAATTATATAATCTCATAGATGTATCCTGAGTAGGGCGG GGCACGTGAACCCTGTCTGAATTTGCCAGGACCCTGGTAAGGCTAAATACTAACACACCCGATA GTAACTAGTAGCGTAGGGAAAGGTGAAAAGAACCCTGAGAGGGGAGTGAAATAGATTCTGAAACCA TTTACTTACAAGTAGTCAAGCACGTTAATGTGTGATGGCGTACATCTTGCAGTATGGTCCGGCGAGTTA TGTTAACAAGCAAGGTTAAGCGGATTAAGCGGAGCCGTAGGGAAACCAGTCTAAATAGGGCGTTAA GTTTGTGACATAGACCCGAAACCAGGTGATCTATCCATGAGCAGAATGAAACTTTGGTAACACAAAGT GGAGGTTTCAACCGTAGTACGCTAAAAGTGCCCGGATGACTTGTGGATAGCGGTGAAATTCCAATCGA ACCTGGAGATAGCTGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTAGCGTATAGAATCTAATTAATGGGGGTAG AGCACTGAATGTGGAATGGCGGCACCTAGCTGTACTGACTATAATCAAACCTCCGAATACCATTAATTA TCTATCGAATCGGAACGTGGGTGATAACGTCGCTCGCGAGGGGAAACAACCCAGATCGTACGTAAG GTCCCAAATATGTTAAGTGAGAAAAGTTGTGAAATTTCTTAAACAACCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCA GCCACATTTAAAGAGTGCCTAATTGCTCACTAGTCAAGAGATCTTGCGCCAATAATGTAACGGGACTAA AACATAATACCGAAGCTGCGGGTAAACTTTTTAAGTTTACGTTAGGAGAGCGTTTTAATTTTCGCTGAAG CTAGAGGGTAGCCACTAGTGGAGAAATTAAGTGAGAATGCCGGAATGAGTAACGATTTCGAAGTGAG AATCTTCGACGCCTATTGGGGAAGGTTTCTGGGCAAGGGTCGTCCACCCAGGGTTAGTCAGGGCCTAA GGAAGGCTGAAAGCGTATCCGATGGATAATCGGTTAATATTCGATACTTGTATTGGAGTGATGGG ATTACGAAAAAGATAGTTTACCACCTACTGATGGATTGTGGGTAAAGCAGTCAAGAAAGTTATATAGGCA AATCCGTATACATTAATTTAAGCTGTGATGCATAGGGAAGAGGAGACTCAAGTACCGAATTAATGA CTCTCTGTTTCCAAGAAAAGTCTCTAGCGCTAATTCAATAACAACCTGTACCAAGAACGGACACACGTC CCAAGATGAGTATTCTAAGGTGAGCGAGAAAACCAATGTTAAGGAACTCTGCAAAATTATCCCGTACGT TCGCAAGAAGGGATGCCCTTTTTCTTAAAGGGCTCAGTAAAATAGGGGGGGCAACTGTTTATCAAAAA CACAGCTCTTGCAAAGGTGTAACCGAAGTATAGAGGGTGAAGCCTGCCAGTGCCCGAAGGTTAAGC GGAGATGTTAGCCTATTGGCAAGCATTCAAGTGAAGCCCGGGTGAACGGCGGCCGTAACTATAACGGT CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCACTAATTTATTGACCTGCACGAAAGGCGCAATGATCTCCCTACTGT CTC AACATTGGACTCGGTGAAATTATGGTACCAGTGAACCGTGGTTACCCGCATCAAGACGAAGA CCCCCTGGAGCTTTACTATAACTTCGTATTGAGAATTGGTTTATTATGTGTAGGATAGGTGGGAGATGTC GATCCAAGGCGCTAGTCTTGGAGTCAACCTTGAATACCACCCTTAATAAATTGATTTTCTAACCT GCTTCCCTAACAGGAAGAGAGACAGTGCCTGGTGGGTAGTTTACTGGGGCGGTGCGCTCCTAAAGAG TAACGGAGGTGTTCAAAGCTACACTCAATATGGTCCGAAACCATATGCAGAGCATAAAGGTAAAAAGTGT GGTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAACGACTTAGTGATCCGGCGGTTTATTGTG GAATGGCCGTCGCTCAACGGATAAAAAGCTACCCCGGGGATAACAGGCTAATCTTCCCAAGAGATCACA TCGACGGGAAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGTCCATCGCATCCTGGAGCTGAAGTCCGTTCCAAGGGTTT GGCTGTTCCGAATTAAGCGGTACGTGAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCTG ATGTGGCGGTTGGAATATTGATGAGAGCTGCTCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGTACCGCTGGT GTTCCAGTTGCTTGCCAAAGGCATAGCTGGGTAGCTAAGTACGGAAAAGATAACCGCTGAAAGCATCT AAGCGGGAAGCTTCCCTCAAAGATGAGTATTCCTTATGAAATTCCTTATAGACTATGAGGTTGATAGGTTA GAGGTGTAAGTGTAGCAATACATTCAGCTGACTAATACTAATAAATTCAAAGTTTTAAAAAG				
Pos. 323 = A	Pos. 426 = G	Pos. 573 = A	Pos. 657 = G	Pos. 673 = G
Pos. 1178 = T	Pos. 1257 = T	Pos. 1389 = G	Pos. 1431 = G	Pos. 1500 = G
Pos. 1533 = A	Pos. 1544 = T	Pos. 1890 = A	Pos. 2057 = A	Pos. 2073 = A
Pos. 2157 = G	Pos. 2165 = C	Pos. 2170 = T	Pos. 2394 = G	Pos. 2396 = A
Pos. 2397 = G	Pos. 2824 = T			

Tabla III.22.- Conversión de las posiciones discrepantes en el gen ARNr 23S de *M. hyopneumoniae* según la numeración *E. coli*. Realizado en base a la secuencia original de Brosius y cols., (1980) y al modelo de estructura secundaria de Noller y cols., (1981), posteriormente actualizado por el Laboratorio Noller, del Centro de Biología Molecular del ARN, Santa Cruz, Universidad de California.

NUMERACIÓN <i>M. hyopneumoniae</i>	NUMERACIÓN <i>E. coli</i>	DOMINIO
323	289	I
426	389	I
573	537	I
657	620	II
673	636	II
1178	1142	II
1257	1224	II
1389	1358	III
1431	1400	III
1500	1471	III
1533	1503/1504	III
1544	1513	III
1890	1876	IV
2057	2042	V
2073	2058	V
2157	2142	V
2165	2150	V
2170	2155	V
2394	2379	V
2396	2381	V
2397	2382	V
2824	2825	VI

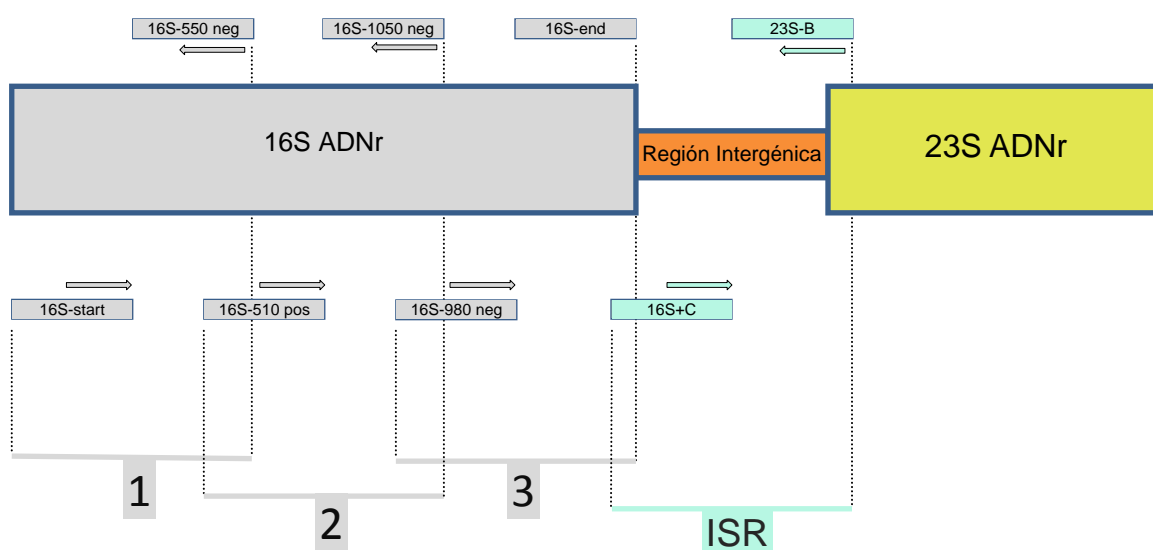


Figura III.1.- Representación esquemática de la posición de los cebadores para PCR del gen que codifica el ARNr 16S y la ISR. Los fragmentos amplificados del gen que codifica el ARNr 16S se han representado con números (1, 2, 3). El fragmento amplificado de la Región Intergénica 16S-23S ARNr se ha representado como ISR.

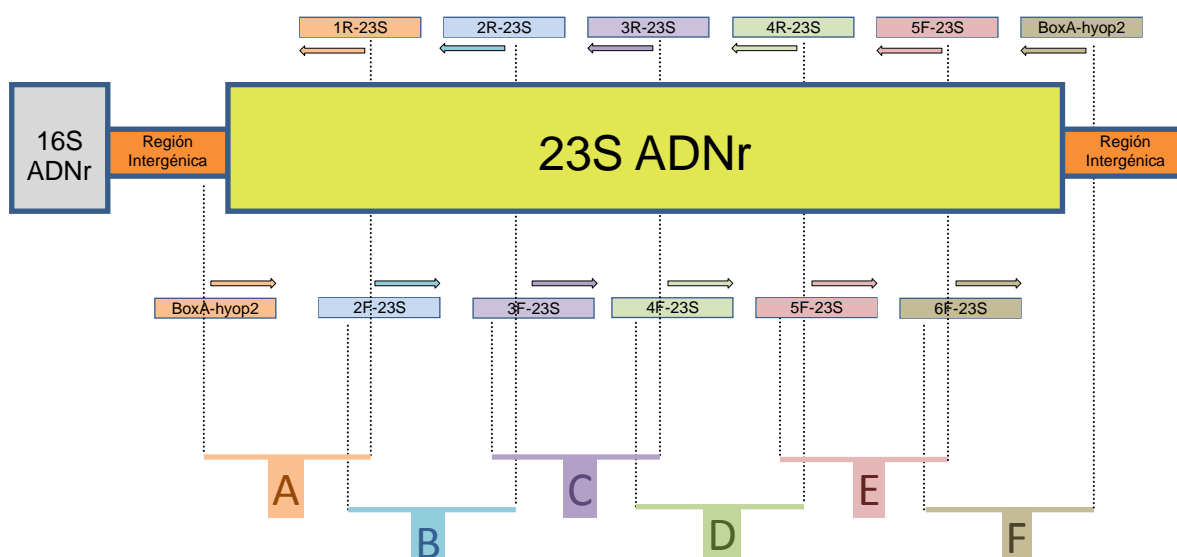


Figura III.2.- Representación esquemática de la posición de los cebadores para PCR del gen que codifica el ARNr 23S. Los fragmentos amplificados se han representado mediante letras (A, B, C, D, E, F).

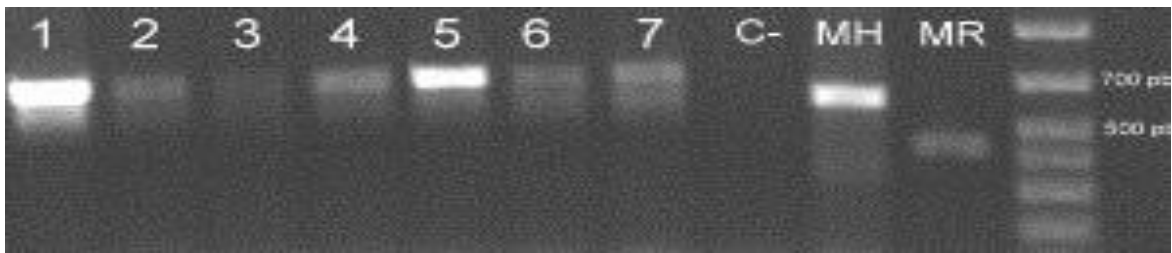


Figura III.3.- Electroforesis de productos amplificados de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en cepas de campo de *M. hyopneumoniae*, de 2007-2009. (1): Cepa GC-38; (2): Cepa 103-b; (3): Cepa 104-d; (4): Cepa 2-A; (5): Cepa 10-P; (6): Cepa 29-A; (7): Cepa 35-P; (C-): Control negativo elaborado con agua ultrapura estéril en sustitución del ADN; (MH): Control positivo elaborado con ADN de la cepa J de *M. hyopneumoniae*; (MR): Control positivo elaborado con ADN de la cepa BTS-7 de *M. hyorhinis*; (pb): pares de bases. A la derecha, el marcador de peso molecular.

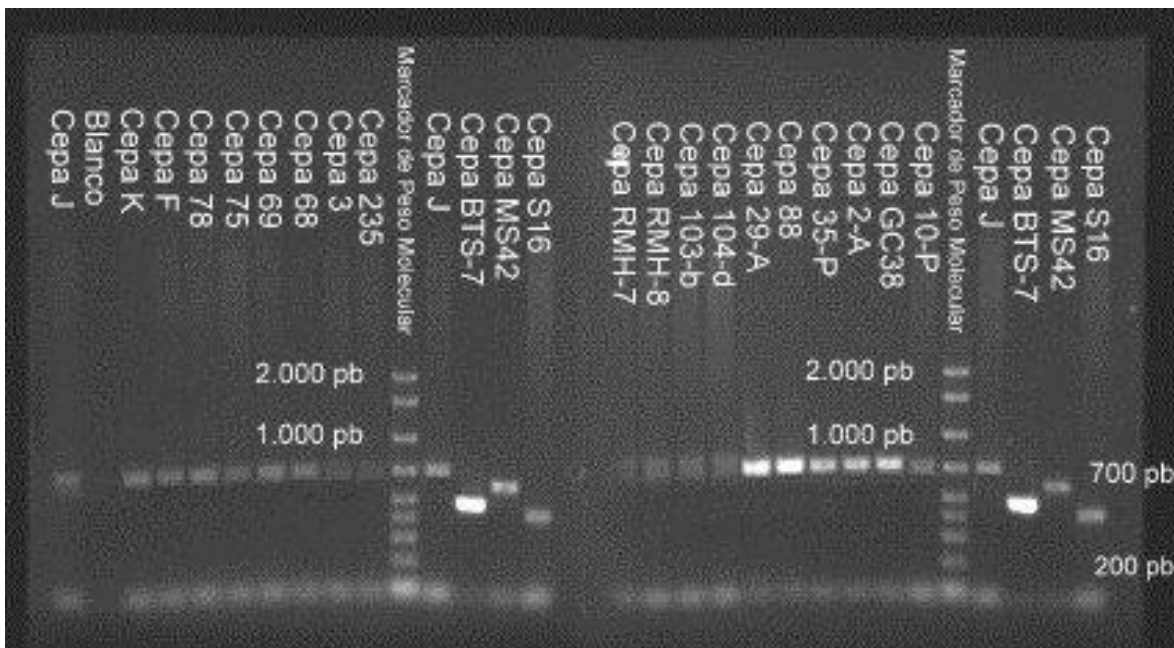


Figura III.4.- Electroforesis de productos amplificados de la Región Intergénica 16S-23S ARNr en cepas de campo de *M. hyopneumoniae* y otros micoplasmas porcinos. Cepas de referencia (J, BTS-7, MS42 y S16) utilizadas como controles positivos para *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. flocculare* y *M. hyosynoviae* respectivamente.

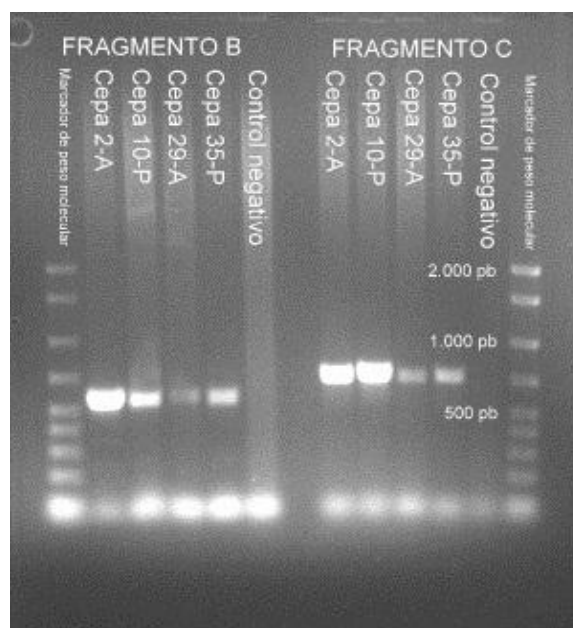


Figura III.5.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos B y C en cepas de campo de *M. hyopneumoniae*. Realizados con las parejas de cebadores (2F-23S y 2R-23S) y (3F-23S y 3R-23S) respectivamente. En los controles negativos se empleó agua ultrapura estéril en sustitución de ADN.

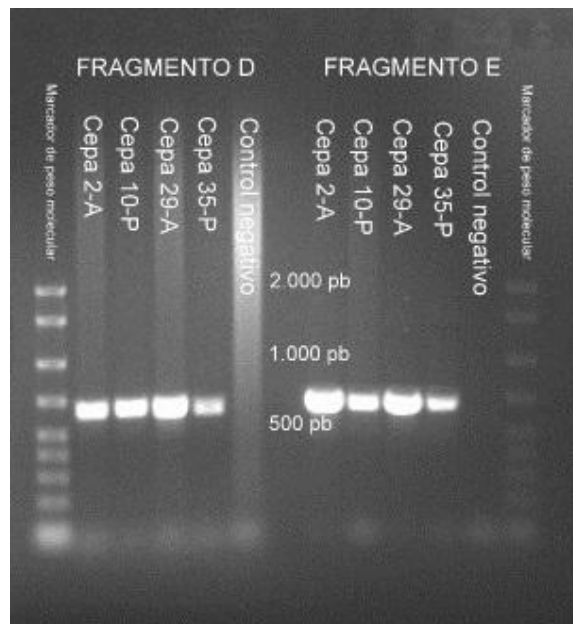


Figura III.6.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos D y E en cepas de campo de *M. hyopneumoniae*. Realizados con las parejas de cebadores (4F-23S y 4R-23S) y (5F-23S y 5R-23S) respectivamente. En los controles negativos se empleó agua ultrapura estéril en sustitución de ADN.

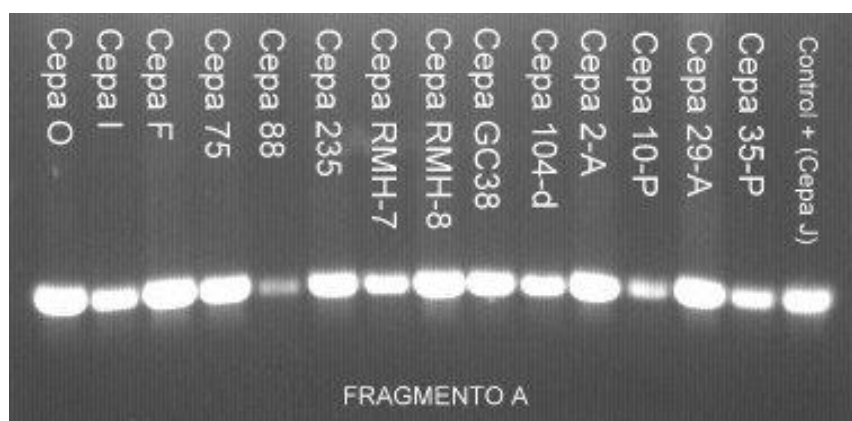


Figura III.7.- Electroforesis del producto amplificado del Fragmento A en cepas de campo de *M. hyopneumoniae*. Realizados con la pareja de cebadores (BoxA-hyop2 y 1R-23S).

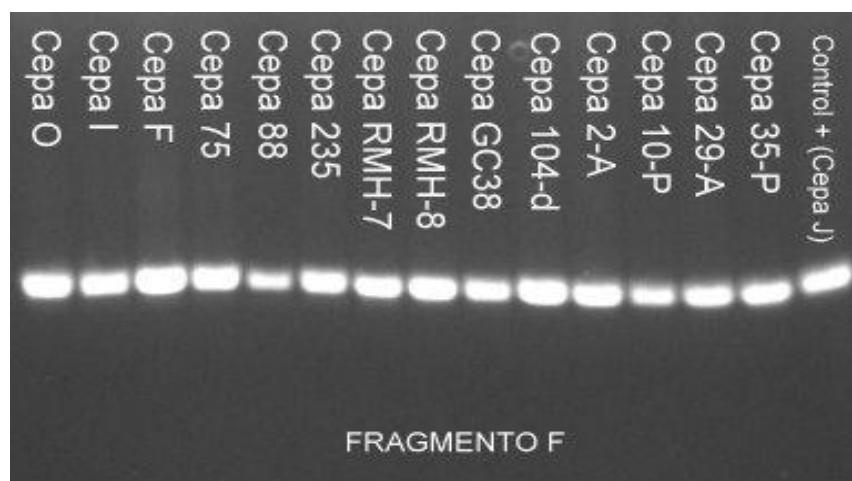
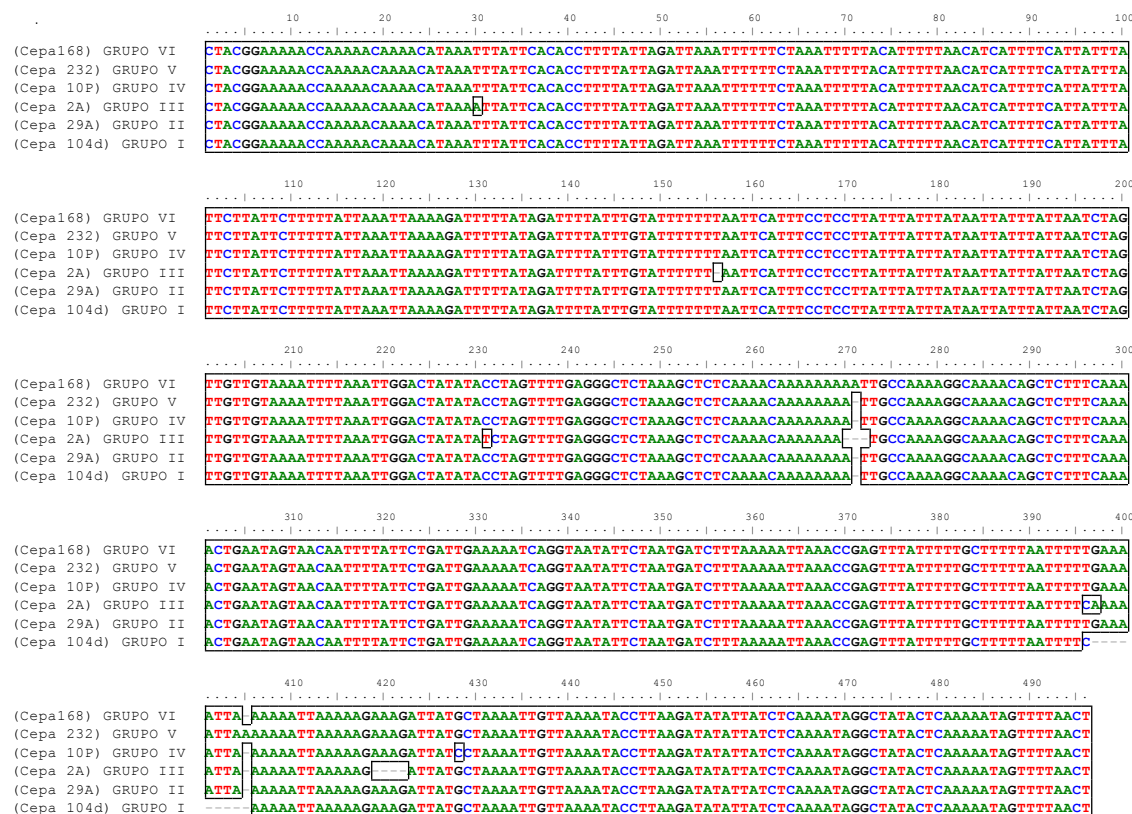


Figura III.8.- Electroforesis del producto amplificado del Fragmento F en cepas de campo de *M. hyopneumoniae*. Realizados con la pareja de cebadores (6F-23S y BoxA-hyop2).

Figura III.9.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr. (*M. hyopneumoniae*)



Las cepas 168, 232, J y 7448 fueron obtenidas de internet (Gene Bank), con el propósito de compararlas con los 4 modelos de secuencias representativos de las 20 cepas de campo de *M. hyopneumoniae* que se analizaron en este estudio. La Cepa 232 queda englobada en un nuevo grupo (Grupo V), así como la Cepa 168 (Grupo VI), cuyos patrones secuenciales no se corresponden con ninguno de los 4 grupos encontrados en las cepas de campo. Las Cepas 7448 y J se corresponden con los Grupos I y II de la ISR respectivamente.

Figura III.10.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen ARNr 23S de las cepas de campo. (*M. hyopneumoniae*). Página 1 de 7.

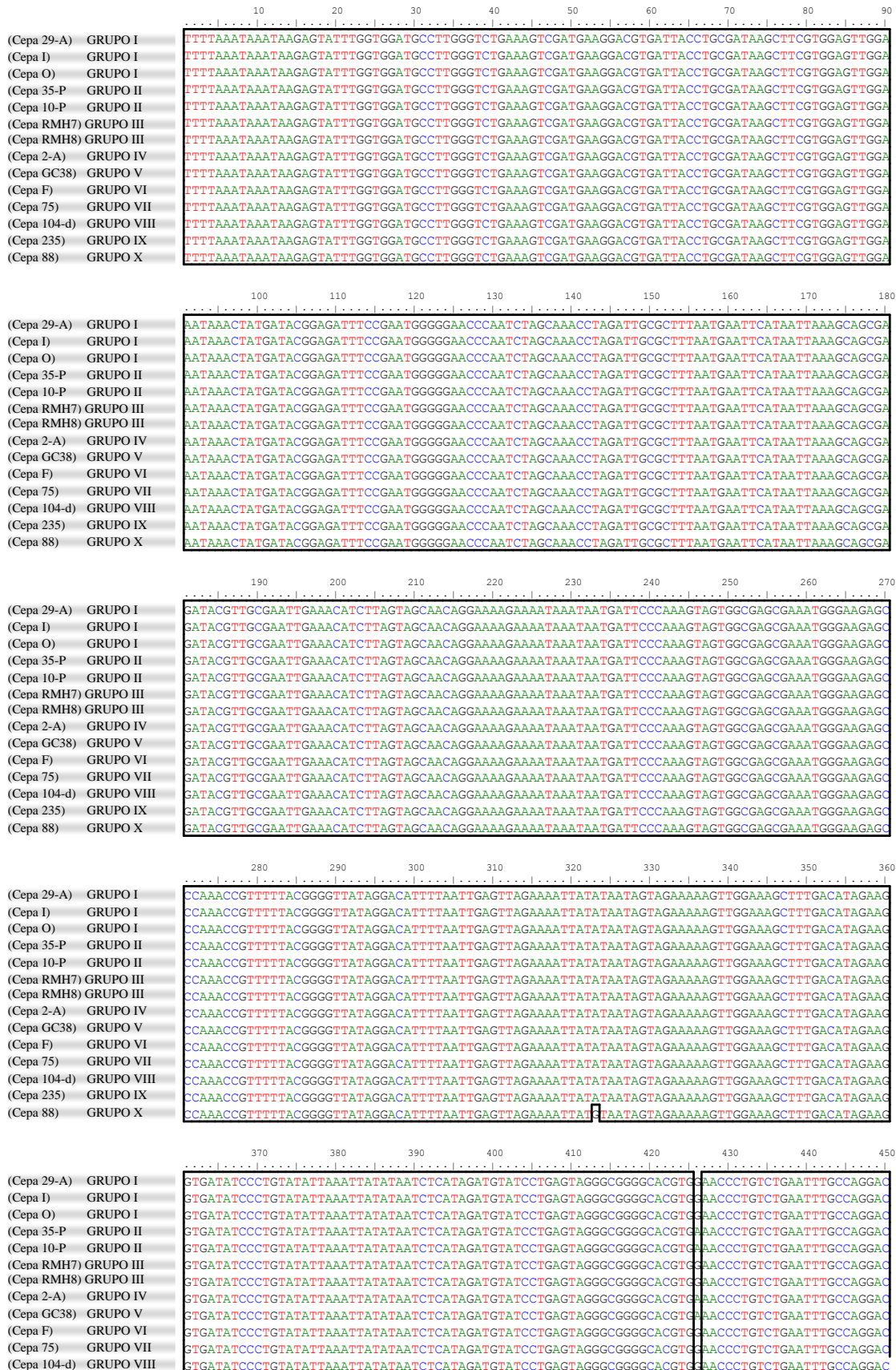


Figura III.10.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen ARNr 23S de las cepas de campo. (*M. hyopneumoniae*). Página 2 de 7.

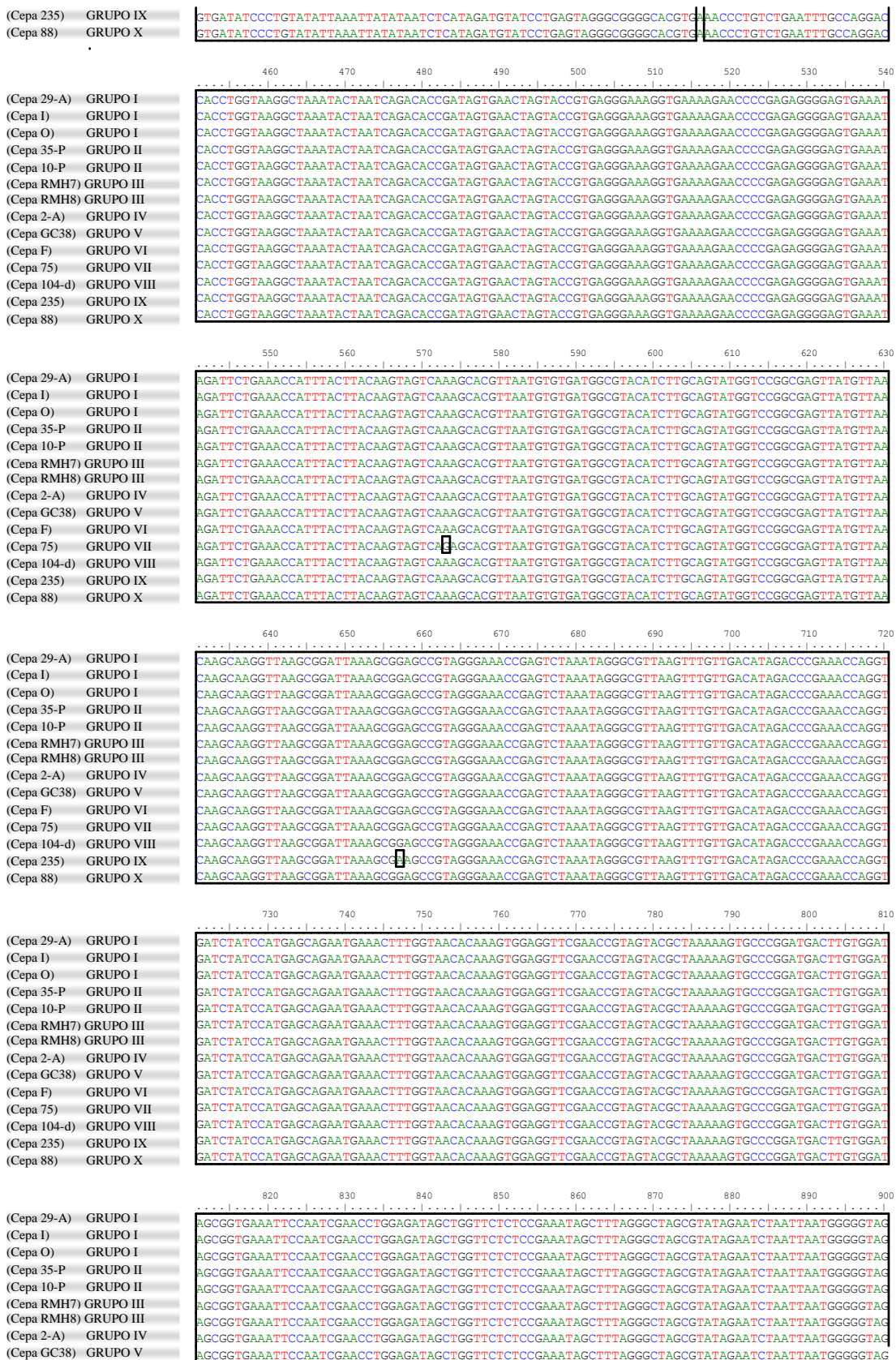


Figura II.10.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen ARNr 23S de las cepas de campo. (*M. hyopneumoniae*). Página 3 de 7.

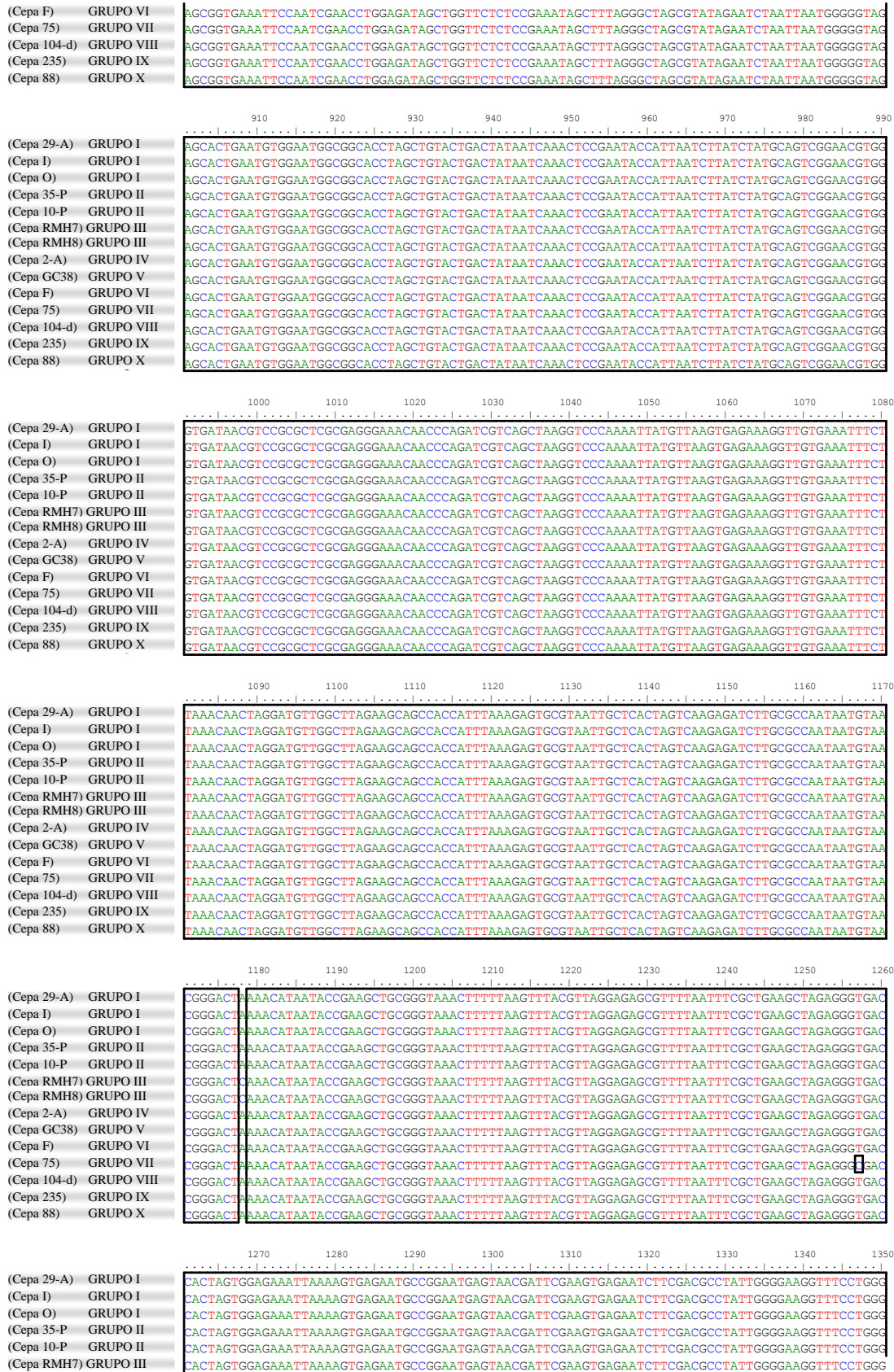


Figura III.10.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen ARNr 23S de las cepas de campo. (*M. hyopneumoniae*). Página 6 de 7

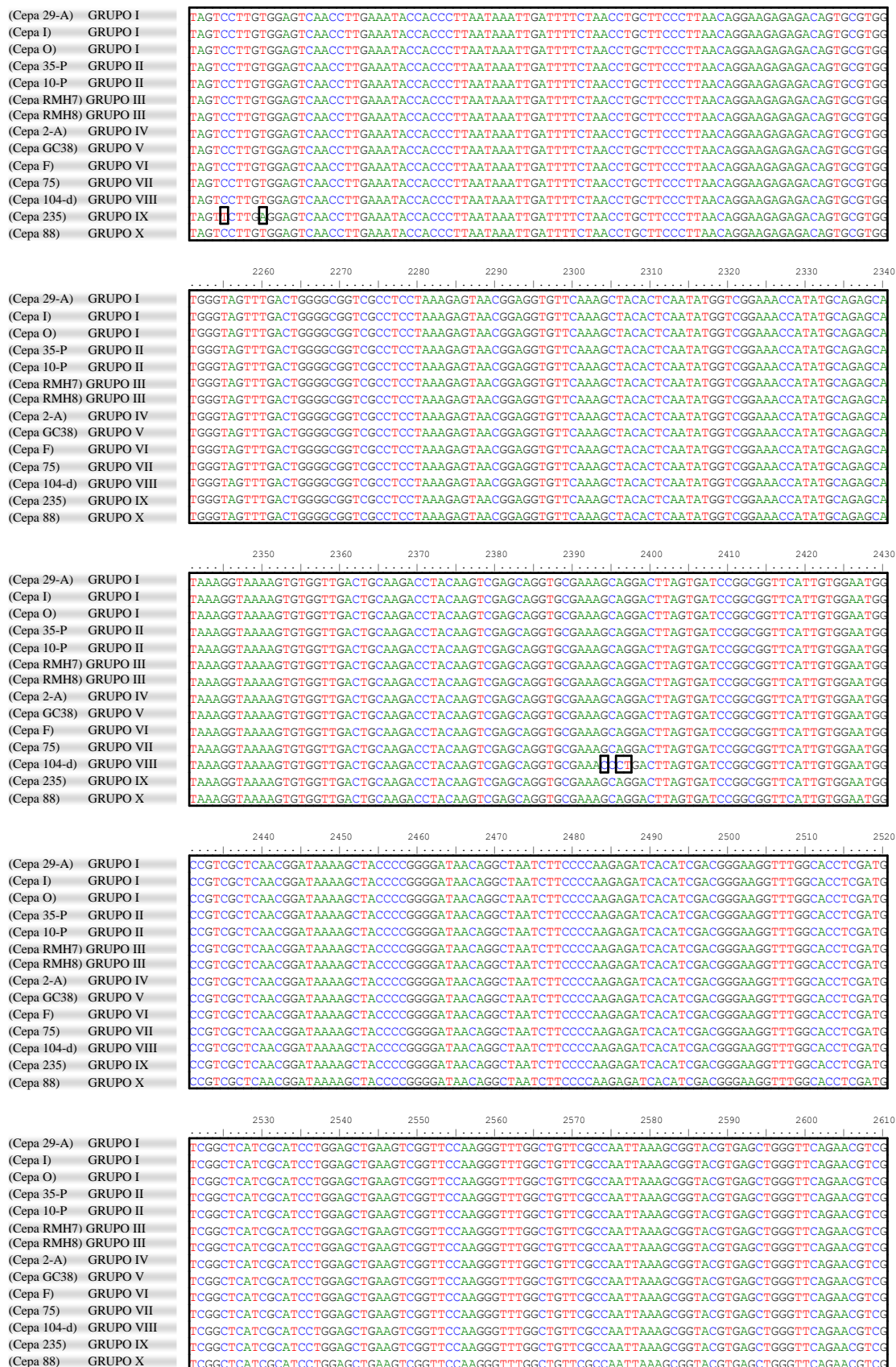
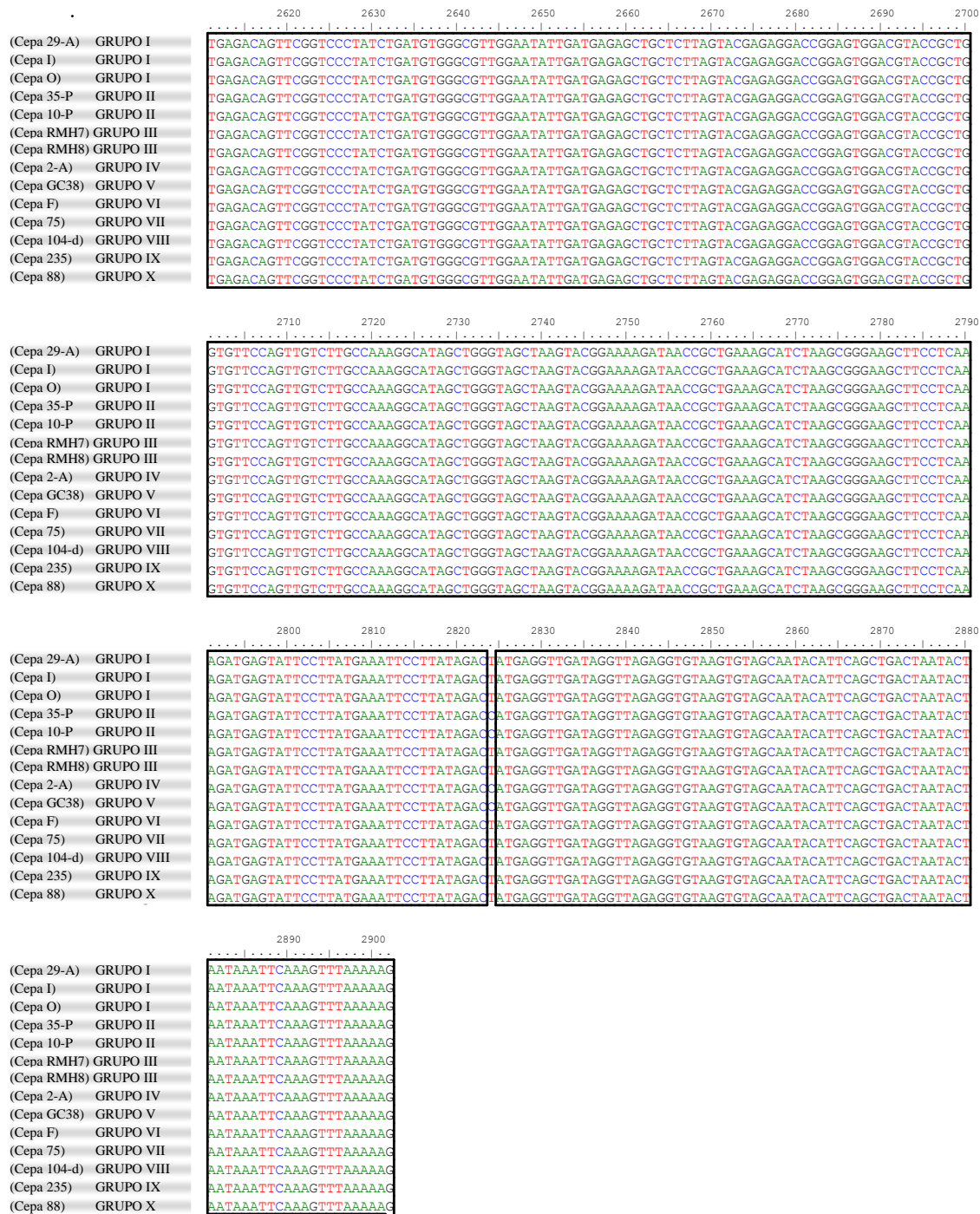


Figura III.10.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen ARNr 23S de las cepas de campo. (*M. hyopneumoniae*). Página 7 de 7.



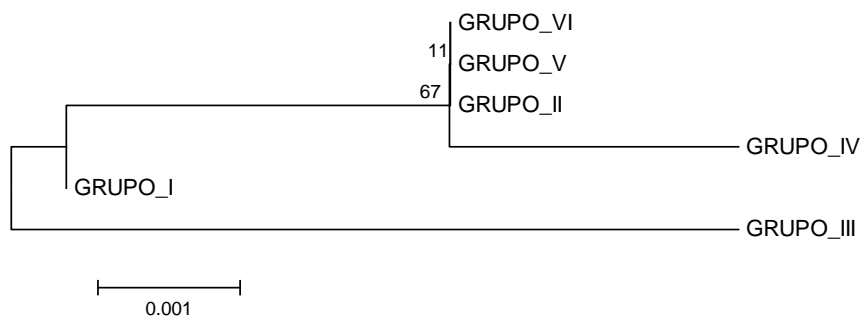


Figura III.11.- Dendrograma taxonómico de los patrones secuenciales de la Región Intergénica 16S-23S ARNr. (*M. hyopneumoniae*). Incluye los 4 patrones secuenciales identificados en las cepas de campo y en las cepas 7448 y J (Grupo I, II, III y IV) y los 2 patrones secuenciales adicionales publicados previamente para las cepas 232 y 168 (Grupo V y VI).

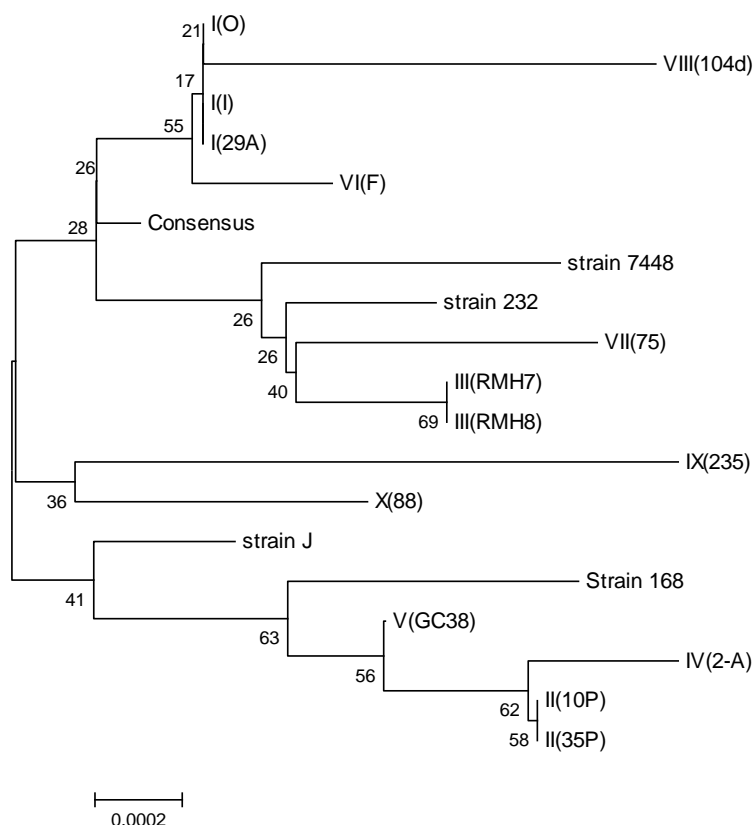


Figura III.12.- Dendrograma taxonómico de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S. (*M. hyopneumoniae*). Incluye todas las cepas que fueron secuenciadas en este estudio, 4 cepas previamente publicadas en Gene Bank, (cepas 232, J, 7448 y 168) y la secuencia consenso.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DEL GEN QUE CODIFICA EL ARNr 23S EN LAS CEPAS DE REFERENCIA DE MICOPLASMAS PORCINOS

IV.1.- INTRODUCCIÓN

El estudio de las secuencias génicas que codifican el ARNr, ha implementado una valiosa herramienta en la taxonomía de las especies. Entre ellos, el gen que codifica el ARNr 16S, demostró excelentes aplicaciones en la clasificación de procariotas (Woese y Fox, 1977; Stackebrandt y Woese, 1984), aportando un nuevo enfoque en la filogenia bacteriana (Fox y cols., 1977), marcando un nuevo comienzo en el estudio de la taxonomía entre especies (Pace y cols., 1986), y un mejor entendimiento de la evolución bacteriana (Woese, 1987). Finalmente, su aplicación en filogenia bacteriana se consolidó con el diseño de cebadores universales para este gen (Weisburg y cols., 1991).

Sin embargo, algunos autores constataron las limitaciones de la aplicación taxonómica basada únicamente en el gen que codifica el ARNr 16S (Fox y cols., 1992), debido al tamaño relativo de estas secuencias y al elevado porcentaje de similitud entre algunas especies. Así mismo, y en ausencia de las secuencias completas del genoma, el empleo del gen que codifica el ARNr 16S como único punto sobre el que basar la taxonomía, no permitía aclarar el estatus de algunas de las especies y subespecies.

La secuenciación del gen que codifica el ARNr 23S ha progresado más lentamente que la de su homólogo 16S, (*E. coli*, Brosius y cols., 1980; cloroplastos de *Nicotiana tabacum*, Takaiwa y Sugiura, 1982; *Bacillus stearothermophilus*, Kop y cols., 1984; *Synechococcus elongatus*, Douglas y Doolittle, 1984; *Pseudomonas aeruginosa*, Toschka y cols., 1987; *Rhodobacter capsulatus* y *Thermus thermophilus*, Höpfl y cols., 1988 a y b; bacterias de alto porcentaje Guanina-Citosina, Roller y cols., 1992; bacterias de bajo porcentaje Guanina-Citosina, Ludwig y cols., 1992), pero su aplicación como elemento taxonómico independiente (Ludwig y Schleifer, 1994) demostró en la gran mayoría de los

casos, una equivalencia aceptable con los resultados taxonómicos y filogenéticos obtenidos a través del gen codificante del ARNr 16S.

A pesar de que el gen que codifica el ARNr 23S contiene más información, y la variabilidad entre distintas especies parece ser mayor que en el gen que codifica el ARNr 16S (Ludwig y cols., 1998), la abrumadora diferencia en la aportación de secuencias entre estos dos genes, hace que el gen que codifica el ARNr 23S quede relegado al papel de complemento taxonómico del gen ARNr 16S.

Así mismo, la aplicación de tipo diagnóstico ha sido incorporada paulatinamente a diferentes Géneros (*Leptospiras*, Zhang y cols., 1993; *Mycobacterium*, Verma y cols., 1994; *Pseudomonas*, Lew y Desmarchelier, 1994; *Chlamydia*, Everet y cols., 1999), y especies bacterianas (*Thiobacillus caprinus*, Moreira y Amils, 1996; *Coxiella burnetii*, Ibrahim y cols., 1997; *Pasterella multocida*, Miflin y Blackall, 2001) hasta conseguir la discriminación selectiva en la identificación de múltiples Géneros (Hong y cols., 2004).

Finalmente, el empleo del gen que codifica el ARNr 23S como secuencia diana sobre la que diseñar cebadores específicos para PCRs con fines diagnósticos, ha sido implementado con éxito en algunas de las especies de la clase *Mollicutes*, si bien las especies que más interés han suscitado, son aquellas consideradas como contaminantes habituales de los cultivos celulares (*M. hyorhinis*, *M. fermentans*, *M. arginini*, *M. orale*, y *Acholeplasma laidlawii*, Kong y cols., 2001; *M. hyorhinis*, *M. fermentans*, *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. neurolyticum*, *M. orale*, *M. pirum*, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*, *M. salivarium*, *U. urealyticum*, Sung y cols., 2006), así como en los Géneros que actualmente se consideran incultivables, con la introducción de la técnica q-PCR (*Phytoplasmas*, Hodgets y cols., 2009; *Eperythrozoon*, Grazziotin y cols., 2011; *Mollicutes* hemotrópicos no caracterizados, Volokhov y cols., 2011).

Diferentes técnicas de carácter diagnóstico han sido diseñadas sobre este gen en procariontes, tales como sondas génicas (Ludwig y cols., 1994), hibridación *in situ* con fluorescencia (*Yersinia*, Trebesius y cols., 1998; *Francisella*, Splettstoesser y cols., 2010),

y polimorfismos de longitud con fragmentos de restricción (*Listeria*, Paillard y cols., 2003; *Spirochaete*, Tae y Jae, 2006).

Sin embargo, el interés que suscitan las cepas que presentan mecanismos de resistencia a antibióticos, ha propiciado el desarrollo de técnicas basadas en PCRs diagnósticas, orientadas hacia la identificación de mutaciones puntuales en la secuencia del gen que codifica el ARNr 23S mediante PCR de tipo anidada (*Helicobacter pylori*, Maeda y cols., 1998) o en PCR convencional en conjunción con inmunoensayo (*Helicobacter pylori*, Marais y cols., 1999). Eventualmente, esta tendencia se ha visto reflejada en aquellos micoplasmas de especial interés en la salud humana (*M. hominis*, Karamova y cols., 2004; *M. pneumoniae*, Xin y cols., 2008; Peuchant y cols., 2009).

En la actualidad, son pocos los trabajos realizados destinados a aportar la secuencia de nucleótidos del gen que codifica el ARNr 23S en micoplasmas porcinos. Tal y como se mencionó en el capítulo anterior, la información sobre la secuencia de este gen en *M. hyopneumoniae* fue aportada por Ludwig y cols., en 1992, y posteriormente ampliada con la secuenciación completa de las cepas 232 (Minion y cols., 2004), J, 7448 (Vasconcelos y cols., 2005) y 168 (Liu y cols., 2011).

Por otra parte, debido a su relevancia como patógeno porcino, y en particular por su papel como contaminante de cultivos celulares, la secuencia parcial del gen ARNr 23S de *M. hyorhinis* y los cambios puntuales en dicha secuencia, ocurridos en procesos de selección *in vitro* frente a macrólidos, fueron descritos por Kobayashi y cols., en 2005. Con la llegada de las técnicas de secuenciación completa del genoma, la secuencia de este gen fue obtenida para las cepas HUB-1 (Liu y cols., 2010), MCLD (Kornspan y cols., 2011) y GDL-1 (Calcutt y cols., 2012).

En ausencia de la secuenciación completa del genoma para el resto de los micoplasmas porcinos, existe muy poca información sobre la secuencia de nucleótidos de este gen. En el caso de *M. flocculare*, tan solo ha sido documentada la secuencia obtenida de la cepa MS42, aportada por Stemke y cols., en 1994. Hasta el momento, no hay

descritas secuencias de nucleótidos para el gen ARNr 23S en *M. hyopharyngis* ni en *M. hyosynoviae*.

Por todo ello, en este capítulo nos proponemos los siguientes objetivos:

- 1.- La amplificación por PCR y secuenciación del gen que codifica el ARNr 23S en la cepa de referencia BTS-7 de *M. hyorhinis*, mediante 6 fragmentos génicos correlativos superpuestos (Fragmentos A, B, C, D, E, F) y posterior ensamblaje de sus secuencias, así como la comparación de la secuencia resultante final, frente a las 4 secuencias completas, descritas por otros autores.
- 2.- La amplificación por PCR y secuenciación del gen que codifica el ARNr 23S en la cepa de referencia MS42 de *M. flocculare*, mediante 6 fragmentos génicos correlativos superpuestos (Fragmentos A, B, C, D, E, F) y posterior ensamblaje de sus secuencias, así como la comparación de la secuencia resultante final, frente a la única secuencia completa documentada, realizada por Stemke y cols., en 1994.
- 3.- La amplificación por PCR y secuenciación del gen que codifica el ARNr 23S en la cepa de referencia H3-6B F de *M. hyopharyngis* y S16 de *M. hyosynoviae*, mediante 6 fragmentos génicos correlativos superpuestos (Fragmentos A, B, C, D, E, F) y posterior ensamblaje de sus secuencias, así como la comparación de las secuencias génicas obtenidas, con otras previamente publicadas para otras especies del Género *Mycoplasma*.
- 4.- El análisis conjunto de las secuencias obtenidas de *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *M. hyopharyngis* y *M. hyosynoviae*, incluyendo así mismo una secuencia consenso desarrollada para *M. hyopneumoniae* en base a las secuencias de otros autores y los patrones secuenciales descritos en el capítulo anterior.
- 5.- La aplicación práctica con carácter diagnóstico, mediante el estudio de la sensibilidad y especificidad de la PCR convencional utilizada para amplificar un fragmento génico (Fragmento A) en *M. hyopneumoniae*, sin reacción cruzada con ADN de *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *M. hyopharyngis* ni *M. hyosynoviae*.

IV.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

IV.2.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las diferentes especies de micoplasmas analizados en este capítulo fueron estudiadas a través de sus cepas de referencia, señaladas a continuación.

- *Mycoplasma hyopneumoniae*: cepa J (NCTC 10110).
- *Mycoplasma hyorhinis*: cepa BTS-7 (NCTC 10130).
- *Mycoplasma flocculare*: cepa MS42 (NCTC 10143).
- *Mycoplasma hyosynoviae*: cepa S16 (NCTC 10167).
- *Mycoplasma hyopharyngis*: cepa H3-6B F (ATCC 51909).

La reactivación de estas 5 cepas liofilizadas se realizó siguiendo el mismo procedimiento indicado en el apartado **III.2.1** del capítulo anterior

IV.2.2.- REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

La técnica de extracción de ADN y amplificación por PCR fue llevada a cabo mediante los mismos kits comerciales descritos en el apartado **III.2.2** del capítulo anterior.

La amplificación del gen codificante del ARNr 23S se realizó en seis amplificaciones superpuestas, utilizando seis parejas de cebadores.

Las reacciones descritas fueron llevadas a cabo en un Termociclador “Mastercycler Gradiente” de la casa Eppendorf, y los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa para su comprobación, antes de la secuenciación.

IV.2.2.1.- Cebadores empleados

Los cebadores fueron diseñados de acuerdo a las indicaciones de los trabajos de Ramírez y cols., (2007 y 2008b). En función de las necesidades específicas de este estudio se incluyeron cebadores de nuevo diseño. Todos ellos fueron producidos por “Integrated DNA Technologies” (Tablas **IV.1, IV.2, IV.3, IV.4, IV.5** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo).

IV.2.2.1.1.- Cebadores para el gen codificante del ARNr 23S

Para obtener la secuencia completa de este gen, y basándonos en los trabajos previos de Ramírez y cols., (2008b), se produjeron 6 parejas de cebadores, dividiendo así el gen objeto de este estudio en 6 fragmentos génicos (Fragmentos A, B, C, D, E, F), siendo amplificado cada uno de ellos por una pareja diferente de cebadores.

Los fragmentos génicos “interiores” (B, C, D, E) de las 5 cepas de referencia del gen estudiado fueron amplificados por PCR mediante los cebadores descritos a continuación.

- Para el Fragmento B, se emplearon los cebadores 2F-23S y 2R-23S.
- Para el Fragmento C, se emplearon los cebadores 3F-23S y 3FR23S.
- Para el Fragmento D, se emplearon los cebadores 4F-23S y 4R-23S.
- Para el Fragmento E, se emplearon los cebadores 5F-23S y 5R-23S.

La **Tabla IV.1** muestra las secuencias de los cebadores empleados para la amplificación y secuenciación de los Fragmentos B, C, D, E, de estas 5 especies.

La **Figura IV.1** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo, muestra la disposición esquemática y posición relativa de los cebadores empleados para los Fragmentos B, C, D, E, de estas 5 especies.

En base a las diferencias en las secuencias específicas del ADN de cada uno de estos micoplasmas, los fragmentos génicos “exteriores” (A y F) fueron amplificados utilizando diferentes parejas de cebadores.

El ADN de *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma hyopharyngis* fue amplificado mediante los cebadores siguientes (**Tabla IV.2**):

- Para el Fragmento A, se emplearon los cebadores 1F-23S y 1R-23S.
- Para el Fragmento F, se emplearon los cebadores 6F-23S y 1F-23S.

El ADN de *Mycoplasma flocculare* fue amplificado tras el diseño de un nuevo cebador, denominado “BoxA-hyop1”, como se muestra a continuación (**Tabla IV.3**):

- Para el Fragmento A, se emplearon los cebadores BoxA-hyop1 y 1R-23S.
- Para el Fragmento F, se emplearon los cebadores 6F-23S y BoxA-hyop1.

El ADN de *Mycoplasma hyosynoviae* fue amplificado mediante el uso combinado de cebadores de la ISR y del gen que codifica el ARNr 23S, en el caso del Fragmento A. Para el Fragmento F, se combinó un cebador del gen que codifica el ARNr 23S con un cebador de nuevo diseño, denominado “RV2”. Los cebadores (**Tabla IV.4**) fueron emparejados de la siguiente manera para cada fragmento génico:

- Para el Fragmento A, se emplearon los cebadores 16S+C y 1R-23S.
- Para el Fragmento F, se emplearon los cebadores 5F-23S y RV2.

El ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae* fue amplificado mediante los mismos cebadores (**Tabla IV.5**) que anteriormente fueron utilizados para las cepas de campo.

- Para el Fragmento A, se emplearon los cebadores BoxA-hyop2 y 1R-23S.
- Para el Fragmento F, se emplearon los cebadores 6F23S y BoxA-hyop2.

La **Tabla IV.2**, **Tabla IV.3**, **Tabla IV.4** y **Tabla IV.5** muestra las secuencias de los cebadores empleados para la amplificación y secuenciación de los Fragmentos A y F.

La **Figura IV.2** muestra la disposición esquemática y posición relativa de los cebadores empleados para los Fragmentos A y F.

IV.2.2.2.- PCR en las cepas de referencia de micoplasmas porcinos

La reacción de amplificación por PCR se realizó mediante el uso del Kit comercial Ilustra™ Pure Taq Ready-To-Go™ PCR Beads, de la casa GE Healthcare, bajo las mismas condiciones descritas en el apartado **III.2.2.3**

Así mismo, se emplearon los protocolos de PCR desarrollados por Ramírez y cols., (2008b), ilustrados en el capítulo anterior:

La **Tabla III.5** muestra el protocolo de ciclos y temperaturas para la amplificación de los Fragmentos A y F del gen que codifica el ARNr 23S.

La **Tabla III.6** muestra el protocolo de ciclos y temperaturas para la amplificación de los Fragmentos B, C, D, E del gen que codifica el ARNr 23S.

IV.2.2.3.- Electroforesis de los productos amplificados por PCR

La electroforesis en gel de agarosa de los productos de ADN amplificados en este estudio se realizó bajo las mismas condiciones descritas en el apartado **III.2.2.4** del capítulo anterior.

La **Figura IV.3, Figura IV.4 y Figura IV.5** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo, muestran la electroforesis del producto amplificado de los Fragmentos A, B, C, D, E, F, del gen codificante del ARNr 23S.

La **Figura IV.6** muestra la especificidad de la pareja de cebadores del Fragmento A, del gen codificante del ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*.

La **Figura IV.7** muestra la sensibilidad de la pareja de cebadores del Fragmento A, del gen codificante del ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*.

IV.2.3.- SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

La Secuenciación de las muestras se realizó a través del servicio de secuenciación de la Unidad de Genética del Colegio Universitario de Las Palmas (CULP). Las reacciones de precipitación y secuenciación se realizaron bajo los mismos criterios descritos en el apartado **III.2.3** del capítulo anterior. La alineación y comparación de las secuencias resultantes, se realizó empleando los programas informáticos FINCHTV, GENNERUNER, BIOEDIT, y MEGA, tal y como se detalló en el apartado **III.2.4**.

IV.3.- RESULTADOS

La secuencia del gen que codifica el ARNr 23S de la cepa BTS-7 de *M. hyorhinis* se muestra en la **Tabla IV.6** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo. Dicha secuencia consta de 2824 nucleótidos.

Su comparación con las 3 cepas de *M. hyorhinis* cuyo genoma ha sido secuenciado por completo (cepas GDL-1 de Calcutt y cols., 2012; cepa MCLD de Kornspan y cols., 2011; cepa HUB-1 de Liu y cols., 2010) revela discrepancias y/o deleciones en 2, 3 y 5 nucleótidos respectivamente. Así mismo se realizó la comparación de nuestra secuencia con la obtenida por Kobayashi y cols., (2005), de la cepa BTS-7 tras su selección por macrólidos realizada *in vitro*. Al menos 5 posiciones de la secuencia muestran discrepancias y/o deleciones. Estas diferencias se muestran en la **Tabla IV.7**.

La secuencia del gen que codifica el ARNr 23S de la cepa MS42 de *M. flocculare* se muestra en la **Tabla IV.8**. Dicha secuencia consta de 2901 nucleótidos. Su comparación con la única secuencia publicada sobre este gen en *M. flocculare*, (realizada por Stemke y cols., 1994), revela discrepancias y/o deleciones en 29 nucleótidos. **La Tabla IV.9** detalla las diferencias encontradas entre ambas secuencias y su posición relativa.

La secuencia del gen que codifica el ARNr 23S de la cepa S16 de *M. hyosynoviae* se muestra en la **Tabla IV.10**. Dicha secuencia consta de 2908 nucleótidos.

La secuencia de este gen es aportada por primera vez para *M. hyosynoviae*. Los mayores porcentajes de similitud encontrados al comparar esta secuencia con otras anteriormente publicadas, corresponden a las secuencias del gen que codifica en ARNr 23S en otras especies del Género *Mycoplasma* cuyo genoma ha sido secuenciado por completo.

La secuencia aportada para *M. hyosynoviae*, presenta una similitud del 95% con *M. arthritis*, 93% con *M. hominis* y *M. pulmonis*, y 87% con *M. crocodyli*, *M. agalactiae* y *M. fermentans*, en búsquedas de tipo “Blast”.

La secuencia del gen que codifica el ARNr 23S de la cepa H3-6B F de *M. hyopharyngis* se muestra en la **Tabla IV.11**. Dicha secuencia consta de 2882 nucleótidos.

La secuencia de este gen es también aportada por primera vez para *M. hyopharyngis*. Los mayores porcentajes de similitud encontrados al comparar esta secuencia con otras anteriormente publicadas, corresponden a las secuencias del gen que codifica en ARNr 23S en otras especies del Género *Mycoplasma* cuyo genoma ha sido secuenciado por completo.

La secuencia aportada para *M. hyopharyngis*, presenta una similitud del 92% con *M. agalactiae*, *M. bovis*, y *M. fermentans*, 91% con *M. crocodyli*, 89% con *M. synoviae* y *M. pulmonis*, y 87% con *M. hyorhinitis*, en búsquedas de tipo “Blast”.

El alineamiento de las secuencias del gen que codifica el ARNr 23S de las 5 especies del Género *Mycoplasma* se ha ilustrado en la **Figura IV.8**, empleando la secuencia consenso de *M. hyopneumoniae* (descrita en la **Tabla III.21** del capítulo anterior) y las secuencias de *M. flocculare*, *M. hyorhinitis*, *M. hyosynoviae* y *M. hyopharyngis* aportadas en este capítulo.

El mayor porcentaje de similitud entre las 5 secuencias analizadas fue de 96,3%, correspondiente a la comparación de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*. El menor porcentaje de similitud fue de 83%, correspondiente a la comparación de *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae*. La similitud comparada de todas las secuencias se detalla en la **Tabla IV.12**.

La **Tabla IV.13** recoge la similitud porcentual comparada entre las secuencias del gen ARNr 23S de los micoplasmas porcinos frente a la secuencia de *E. coli* para este gen (Brosius y cols., 1980), así como la de secuencias publicadas por otros autores para el gen ARNr 16S de los micoplasmas porcinos (*M. hyopneumoniae*: Taschke y cols., 1987; *M. flocculare*: Stemke y cols., 1992; *M. hyorhinitis*: Calcutt y cols., 2012; *M. hyopharyngis* y *M. hyosynoviae*: Blank y cols., 1996) frente a la secuencia de *E. coli* para el gen ARNr 16S (Brosius y cols., 1978).

La interrelación taxonómica, realizada mediante la herramienta informática MEGA, en base a las secuencias del gen que codifica el ARNr 23S de las 5 especies de micoplasmas porcinos, se detalla en la **Figura IV.9**. Un dendrograma similar, realizado en base a las secuencias publicadas del gen que codifica el ARNr 16S en las 5 especies estudiadas se detalla en la **Figura IV.10**.

La figura **IV.11** muestra el alineamiento de las secuencias de micoplasmas porcinos que fueron utilizadas para la comparación del gen que codifica el ARNr 16S.

La pareja de cebadores empleados para la amplificación por PCR del Fragmento A, del gen que codifica el ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*, (“BoxA-hyop2” y “1R-23S”), fue específica para este microorganismo, respecto a *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *M. hyosynoviae* y *M. hyopharyngis*, como demuestra la **Figura IV.6**.

La prueba de sensibilidad de esta pareja de cebadores se muestra en la **Figura IV.7**. El límite de detección se estableció en 10,6 pg/μl. La amplificación por PCR, fue positiva con esta pareja de cebadores, (“BoxA-hyop2” y “1R-23S”), para todas las cepas de campo de *M. hyopneumoniae* analizadas, así como para la cepa J. El producto amplificado se situó sobre los 700 pares de bases. La amplificación por PCR, fue negativa empleando dicha pareja de cebadores con el ADN extraído de las cepas de referencia de *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *M. hyosynoviae* y *M. hyopharyngis*.

Por otra parte, la pareja de cebadores empleados para la amplificación por PCR del Fragmento A, del gen que codifica el ARNr 23S de *M. flocculare*, (“BoxA-hyop1” y “1R-23S”) fue específica para este microorganismo, respecto a *M. hyopneumoniae*.

La amplificación por PCR, fue positiva para la cepa de referencia de *M. flocculare*, MS42. El producto amplificado se situó sobre los 700 pares de bases. Sin embargo, la amplificación por PCR, fue negativa al emplear dicha pareja de cebadores con el ADN extraído de las cepas de campo de *M. hyopneumoniae* y de la cepa J.

IV.4.- DISCUSIÓN

La primera secuencia casi completa del gen ARNr 23S para *M. hyorhinis*, (publicada por Kobayashi y cols., 2005), realizada sobre cepas seleccionadas *in vitro* frente a antimicrobianos (partiendo de la cepa BTS-7), guarda notables paralelismos con la secuencia completa del gen ARNr 23S de dicha cepa, que detallamos en este trabajo (**Tabla IV.6** del “ANEXO: Tablas y Figuras” de este capítulo) .

Ninguna de las transiciones que aparecen en el trabajo de Kobayashi (G745A, A2059G, A2062G, G2597T, C2611T, según la numeración *E. coli*) está presente en la secuencia de la cepa BTS-7 aportada en nuestro trabajo (no seleccionada frente a antimicrobianos).

La secuencia parcial de Kobayashi (2340 nucleótidos) fue obtenida mediante el ensamblaje de las secuencias de tres fragmentos amplificadas por PCR. En dicho trabajo, los cebadores empleados se alojaron en posiciones que no permiten el solapamiento de los fragmentos obtenidos (según numeración *E. coli*: posiciones 722 y 886 para un primer fragmento de 193 pares de bases; posiciones 1999 y 2189 para un segundo fragmento de 192 pares de bases; posiciones 2542 y 2795 para un tercer fragmento, de 254 pares de bases).

Si bien el objetivo del trabajo de Kobayashi se centra en el estudio de los dominios II y V y en los cambios que en ellos acontecen en la secuencia de la cepa seleccionada *in vitro*, la metodología empleada hace que en esta secuencia, sea más probable la aparición de errores de lectura de cromatograma, especialmente en las regiones más distantes a los productos amplificadas.

La secuenciación completa de las cepas HUB-1 (Liu y cols., 2010), MCLD (Kornspan y cols., 2011) y GDL-1 (Calcutt y cols., 2012), permite una comparación más completa con la secuencia que aportamos de la cepa BTS-7 (**Tabla IV.7**).

Las dos discrepancias más notables entre nuestra secuencia de la cepa BTS-7 y las cepas secuenciadas por otros autores, se relacionan con la delección de una base Guanina en la posición 1851, y la sustitución Citosina por Timina en la posición 1898.

Por otra parte, la secuencia de la cepa HUB-1 presenta una delección de Timina en la posición 1746. Mientras que, la secuencia de la cepa MCLD presenta Adenina en lugar de Guanina en la posición 2818. Ninguna de estas peculiaridades fue identificada en la secuencia del gen ARNr 23S de la cepa BTS-7 de *M. hyorhinis*.

Estos datos parecen indicar que la secuencia obtenida mediante la metodología empleada en este estudio ofrece un resultado similar a las secuencias obtenidas por secuenciación completa del genoma en *M. hyorhinis*. No obstante, es difícil determinar si las dos discrepancias halladas en las posiciones 1851 y 1898 son debidas a variaciones naturales del gen ARNr 23S de la cepa BTS-7, o si dichas discrepancias son producto de la diferente calidad de los sistemas de secuenciación, y consecuentemente, de la interpretación de las misma cuando se aplican procedimientos de secuenciación distintos.

Queremos resaltar que las secuencias aportadas en este estudio, fueron obtenidas por comparación de la doble secuenciación de cada fragmento génico secuenciado (sentido y antisentido), y que dichos fragmentos génicos se idearon para ser correlativos y superpuestos en los extremos de sus secuencias (con el fin de verificar el ensamblaje de la secuencia génica final y minimizar la posibilidad de errores), de manera similar a la metodología empleada por otros autores (Ramírez y cols., 2007 y 2008b).

En el caso de *M. flocculare*, la única secuencia disponible, fue la secuencia aportada por Stemke y cols., realizada en el año 1994. Dicha secuencia del gen ARNr 23S, fue obtenida empleando una metodología de clonación de varios fragmentos génicos en *E. coli*, y se realizó sobre la cepa MS42.

En este estudio, hemos empleamos la misma cepa (MS42) con el propósito de comparar la secuencia de dichos autores, con la que aquí aportamos (**Tabla IV.8**).

Si bien en líneas generales ambas secuencias comparten una estructura básica común, existen al menos 29 discrepancias entre ambas, incluyendo deleciones e inserciones compensatorias, así como sustituciones directas de nucleótidos (**Tabla IV.9**).

En ausencia de la aportación de una secuencia del gen ARNr 23S de *M. flocculare* obtenida a través de la secuenciación completa del genoma de este microorganismo, con la que poder determinar la veracidad de ambas secuencias, y toda vez que los resultados previos obtenidos en *M. hyopneumoniae* y *M. hyorhinis* con la metodología empleada en este estudio han demostrado una equivalencia aceptable con las secuencias de otros autores, no queda sino inferir que dichas discrepancias pueden ser atribuidas a la mejora de las técnicas de secuenciación, y a la minuciosidad que aporta el uso de múltiples parejas de cebadores para amplificar por PCR, fragmentos génicos solapados o superpuestos, cuando se secuencia un gen de gran tamaño, como es el gen ARNr 23S.

A diferencia de *M. hyorhinis*, algunos de los fragmentos de ADN de *M. flocculare* no pudieron ser amplificados mediante los cebadores descritos por otros autores (**Tabla IV.2**). Como en el caso de *M. hyopneumoniae*, fue preciso diseñar un cebador (“BoxA-hyop1”) que pudiese ser empleado en conjunto con el cebador “23S-1R” para obtener el Fragmento A, y con el “23S-6F” (como cebador antisentido) para obtener el Fragmento F (**Tabla IV.3**).

Otros autores han reseñado la frecuente aparición de *M. flocculare* en el primoaislamiento de micoplasmas porcinos, así como su coexistencia con *M. hyopneumoniae* en un porcentaje de los cultivos. Así mismo, el uso de antisuero policlonal específico frente a *M. flocculare*, permite en algunas ocasiones limitar el crecimiento de este micoplasma en los cultivos mixtos con *M. hyopneumoniae*, y subcultivar con éxito cepas puras de este último (Assunção, 2003)

Curiosamente, este nuevo cebador permite la amplificación del ADN de *M. flocculare*, pero no generó una amplificación positiva con ADN de *M. hyopneumoniae* en ninguna de las 20 cepas de campo empleadas en este estudio, ni de la cepa J.

Por otra parte, en este estudio aportamos por primera vez la secuencia completa del gen ARNr 23S de otros 2 micoplasmas porcinos, *M. hyosynoviae* y *M. hyopharyngis*.

En el caso de *M. hyosynoviae*, los Fragmentos A y F fueron secuenciados a partir de fragmentos de mayor longitud (aproximadamente 1000 pares de bases). Para el Fragmento A, se combinaron cebadores previamente diseñados (“16S+C” y “23S-1R”), mientras que para el Fragmento F, se diseñó un nuevo cebador (“RV2”) para su emparejamiento con el cebador “23S-5F” (**Tabla IV.4**).

La secuencia completa de *M. hyosynoviae* para el gen ARNr 23S consta de 2908 nucleótidos, siendo por tanto la secuencia de mayor longitud de los micoplasmas porcinos analizados (**Tabla IV.10**).

En el caso de *M. hyopharyngis*, las 6 parejas de cebadores descritos en las **Tablas IV.1** y **IV.2**, amplificaron con éxito el ADN de este microorganismo (tal y como ocurrió en el caso de *M. hyorhinis*)

La secuencia completa de *M. hyopharyngis* para el gen ARNr 23S consta de 2882 nucleótidos, siendo por tanto la secuencia de menor longitud de los micoplasmas porcinos analizados (**Tabla IV.11**).

El porcentaje de similitud entre las secuencias de las 5 especies de micoplasmas porcinos analizados, osciló entre el 96,3% y el 83%. La comparación de estas secuencias respecto a la secuencia génica del ARNr 23S de *E. coli* ofrece una similitud porcentual mucho menor (de 68,3% a 67,3%).

M. hyopneumoniae y *M. flocculare* demuestran la mayor similitud en la comparación secuencial de este gen (96,3%), lo que taxonómicamente, refleja la estrecha relación evolutiva entre ambos micoplasmas (**Tabla IV.12**).

M. hyorhinis mantiene una posición taxonómica más cercana al binomio *hyopneumoniae-flocculare*, (con una similitud del 91,6% al 91,4% respectivamente) que al

resto de micoplasmas porcinos. Ello concuerda con las observaciones realizadas en el análisis comparativo de las secuencias del gen ARNr 16S entre *M. hyorhinis*, *M. flocculare* y *M. hyopneumoniae* de otros autores (Stemke y cols., 1992).

En términos generales, *M. hyopharyngis* y *M. hyosynoviae* presentan las secuencias más disonantes en el análisis de las 5 especies estudiadas, a pesar de que la similitud entre ambas fue de 84,9%. En el caso de *M. hyopharyngis*, la similitud respecto a las otras 3 especies restantes osciló entre 86,4% y 83,9%. En el caso de *M. hyosynoviae*, este porcentaje fue aún menor (84,4% a 83%), lo que supone que *M. hyosynoviae* y *M. hyopneumoniae* son las especies menos relacionadas filogenéticamente en base a este gen.

El análisis realizado por otros autores empleando el gen ARNr 23S en las 23 especies de micoplasmas aviáres, señaló porcentajes de similitud del 98,7% al 70,9% (Ramírez y cols., 2008b). En nuestro análisis sobre los micoplasmas porcinos, encontramos que el porcentaje de similitud es más restringido (96,3% a 83%).

Tal y como se ilustra en la taxonomía elaborada en base al gen ARNr 16S en el Manual Bergey vol. 4 (Brown y cols., 2010a), *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* y *M. hyorhinis* están posicionados en el clúster *neurolyticum*, *M. hyosynoviae* se aloja en el clúster *hominis* y *M. hyopharyngis* se sitúa en el clúster *lipophilum*, siendo todos los clústeres mencionados, pertenecientes al grupo *hominis*. Sin embargo, los 23 micoplasmas aviáres se distribuyen entre los tres clústeres mencionados, así como en los clústeres *bovis*, y *synoviae* del grupo *hominis*, y los clústeres *pneumoniae* y *muris*, del grupo *pneumoniae*. El empleo de mayor número de especies, que pertenecen a diferentes grupos, podría justificar la presencia de valores más extremos en los porcentajes de similitud comparada.

En base a las secuencias publicadas por otros autores (*M. hyopneumoniae*: Taschke y cols., 1987; *M. flocculare*: Stemke y cols., 1992; *M. hyorhinis*: Calcutt y cols., 2012; *M. hyopharyngis* y *M. hyosynoviae*: Blank y cols., 1996), mostramos en la **Tabla IV.14** la similitud entre las secuencias del gen ARNr 16S de las 5 especies de micoplasmas porcinos analizados.

La taxonomía en base al gen ARNr 23S que presentamos en este trabajo (**Tabla IV.12**) mantiene una fuerte consonancia con las realizadas por otros autores en su estudio sobre el gen ARNr 16S (*M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* y *M. hyorhinis* por Stemke y cols., 1992; y *M. hyosynoviae* y *M. hyopharyngis* por Blank y cols., 1996), así como la que presentamos sobre el ARNr 16S en la **Tabla IV.14**.

En ambos modelos taxonómicos (genes ARNr 16S y 23S) *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* muestran una elevada similitud, siendo *M. hyorhinis*, taxonómicamente, el más cercano a estas dos especies. Por su parte, *M. hyopharyngis* y *M. hyosynoviae* presentan menor similitud con los tres anteriores, así como entre ellos.

En el caso de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*, el valor porcentual de similitud entre ambas especies resultó el mismo en los dos modelos taxonómicos (96,3%). Sin embargo, la similitud de *M. hyorhinis*, *M. hyopharyngis* y *M. hyosynoviae* presenta pequeñas variaciones entre ambos modelos, así como ocurre en *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* cuando son comparados con las demás especies de micoplasmas porcinos.

Ludwig y cols., 1995, infieren que las variaciones entre la taxonomía elaborada mediante el uso del gen ARNr 23S, pueden presentar como término medio un rango de variación del 4% cuando la similitud entre ambos modelos taxonómicos es comparada. En nuestro estudio, el grado de similitud empleando las secuencias del gen ARNr 23S, se incrementó entre 0,6% y 4,5 % respecto al modelo del gen ARNr 16S, cuando las secuencias de *M. hyorhinis*, *M. hyopharyngis* y *M. hyosynoviae* fueron comparadas con las de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*. La única similitud comparada que resultó menor en el modelo basado en el gen ARNr 23S, se estableció entre *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*, descendiendo 1,6% respecto al modelo comparativo basado en el gen ARNr 16S.

La mayor discrepancia al examinar las relaciones filogenéticas de estas 5 especies de micoplasmas porcinos, empleando ambos modelos taxonómicos (genes ARNr 16S y 23S), se establece en la determinación de las dos especies más alejadas taxonómicamente.

En base al gen ARNr 16S, *M. hyopharyngis* y *M. flocculare* presentan la menor relación filogenética, mientras que en el modelo taxonómico realizado mediante el gen ARNr 23S, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* son las especies menos cercanas.

En líneas generales, el análisis realizado comparando ambos modelos taxonómicos, indica que la proximidad filogenética entre los micoplasmas porcinos es ligeramente superior en base al gen ARNr 23S, con las dos únicas excepciones mencionadas: la comparación de las secuencias de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* (con idéntico resultado en ambos modelos), y la comparación de *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* (que resultó 1,6% inferior respecto al modelo basado en el gen ARNr 16S).

Al comparar las secuencias de los genes ARNr 16S y 23S de los micoplasmas porcinos con las respectivas secuencias de *E. coli* (**Tabla IV.13**), observamos que el porcentaje de similitud es menor empleando el gen ARNr 23S (entre 1,8% y 3,3%) para *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* y *M. hyosynoviae*. Por el contrario, el porcentaje de similitud entre *M. hyopharyngis* y *E. coli* resulta un 0,8% mayor al emplear este mismo gen, como referente taxonómico.

Todos estos datos, tomados en conjunto, parecen sustentar la percepción de que se establece una mayor lejanía taxonómica en la comparación de especies pertenecientes a Géneros y Clases diferentes, cuando se recurre al gen ARNr 23S.

No obstante, en la comparación de especies pertenecientes a un mismo Género, los valores de similitud tendieron a incrementarse en la mayoría de los casos. En líneas generales, ello implica una relación filogenética más cercana entre los micoplasmas porcinos que la sugerida por la comparación de las secuencias del gen ARNr 16S.

Por otra parte, la aportación de las secuencias del gen codificante del ARNr 23S, en conjunto con las secuencias anteriormente publicadas por otros autores sobre la Región Intergénica 16S-23S ARNr en las 5 especies de micoplasmas analizadas, facilita el diseño de cebadores específicos para PCRs de carácter diagnóstico de alta especificidad y

sensibilidad, de manera similar a las PCRs descritas por otros autores para *M. synoviae* y *M. iowae* (Ramírez y cols., 2006 y 2012).

Los cebadores presentados en este trabajo para amplificar el “Fragmento A” de *M. hyopneumoniae*, además de ser específicos para esta especie entre los otros micoplasmas porcinos estudiados, presentaron suficiente sensibilidad (10,6 ng/μl) para su uso en la identificación de *M. hyopneumoniae* en cultivos, mediante PCR convencional.

ANEXO: Tablas y Figuras

Tabla IV.1.- Cebadores empleados para los Fragmentos B, C, D, y E, del gen codificante del ARNr 23S en micoplasmas porcinos. (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *M. hyosynoviae*, *M. hyopharyngis*).

Secuencia objetivo	Cebadores	Secuencia de los Cebadores
Fragmento B	2F-23S	5'- GCG AAA TCG GAA GAG GCC AAA C - 3'
	2R-23S	5'- CAC CGC TAG CCA CCA GTC ATC C - 3'
Fragmento C	3F-23S	5'- GGT GAT CTA GCC ATG AGC AG - 3'
	3R-23S	5'- CCA TCG GCT ACG CTT TTC AGC C - 3'
Fragmento D	4F-23S	5'- GTA ACG TTT CGA AGT GAG AAT C - 3'
	4R-23S	5'- CCG TTA TAG TTA CGG CCG CCG TTC - 3'
Fragmento E	5F-23S	5'- GAC ACC TGC CCA GTC CCG GAA GG - 3'
	5R-23S	5'- CCG TCG ATG TGA ACT CTT GGG - 3'

Tabla IV.2.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen ARNr 23S en *M. hyorhinis* y *M. hyopharyngis*.

Secuencia objetivo	Cebadores	Secuencia de los Cebadores
Fragmento A	1F-23S	5'- GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A - 3'
	1R-23S	5'- CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC - 3'
Fragmento F	6F-23S	5'- GAA AGT AGG ACT TAG TGA TCC GG - 3'
	1F-23S	5'- GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A - 3'

Tabla IV.3.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen ARNr 23S en *M. flocculare*.

Secuencia objetivo	Cebadores	Secuencia de los Cebadores
Fragmento A	BoxA-hyop1	5' - GCT CTT TCA AAA CTG -3'
	1R-23S	5' - CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC - 3'
Fragmento F	6F-23S	5' - GAA AGT AGG ACT TAG TGA TCC GG - 3'
	BoxA-hyop1	5' - GCT CTT TCA AAA CTG -3'

Tabla IV.4.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F del gen codificante del ARNr 23S en *M. hyosynoviae*.

Secuencia objetivo	Cebadores	Secuencia de los Cebadores
Fragmento A	16S+C	5'-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3'
	1R-23S	5' - CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC - 3'
Fragmento F	5F-23S	5' - GAC ACC TGC CCA GTC CCG GAA GG - 3'
	RV2	5' - ACC ACT GAC CCC ACT TCA -3'

Tabla IV.5.- Cebadores empleados para los Fragmentos A y F, del gen ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*.

Secuencia objetivo	Cebadores	Secuencia de los Cebadores
Fragmento A	BoxA-hyop2	5' - CAA AAG GCA AAA CAG CTC TTT -3'
	1R-23S	5' - CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC - 3'
Fragmento F	6F-23S	5' - GAA AGT AGG ACT TAG TGA TCC GG - 3'
	BoxA-hyop2	5' - CAA AAG GCA AAA CAG CTC TTT -3'

Tabla IV.6.- Secuencia completa del gen codificante del ARNr 23S en *M. hyorhinitis*.

Mycoplasma hyorhinitis (cepa BTS-7)

```

TTTAAATTAAGTAAGAGTATTTGGTGGATGCCTTGGGCTGAAAGTCGATGAAGGACGCGATTACCTGCGATAAGCTTCGTGGAGTTGGAATAAAA
CTATGATACGGAGATTTCCGAATGGGGTAACCTAACTGAGCAAACCTCAGTTGCATTTTGATGAATCCATAGTCAAATTAGCGAGACACGTTGCGA
ATTGAAACATCTTAGTAGCAACAGGAAAAGAAAATAAATAATGATTTTCGTCAGTAGTGCCGAGCGAAAGCGAAAAGAGCCAAAACCTGTAAAAGG
GGTTGTAGGACATCTTACATTTGAGTTACAAAATTTTATGATAGTAGAAGAAGTTGGAAAAGCTTCAACATAGAAGGTGATATTCTGTATACGAAATC
ATAAAATCTCATAGATGTATCCTGAGTAGGGCGGGGCACGTGAAAACCTGTCTGAATCTGCCGGGACCACCCGGTAAGGCTAAATACTAATCAGAC
ACCGATAGTGAAGTACCGTGAGGGAAAGGTGAAAAGAACCCGAGAGGGGAGTGAATAGATTCTGAAACCATTTACTTACAAGTAGTCAGA
GCACGTTAAAGTGTGATGGCGTACATCTTGCAGTATGGGCCGGCGAGTTATGTTAATATGCAAGGTTAAGCAGAAAAAAGCGGAGCCGTAGGGAA
ACCGAGTCTGAATAGGGCGACTTTAGTATATGGCATATACCCGAAACCAGGTGATCTATCCATGAGCAGGTTGAAGCTTAGGTAATAACTAAGTGG
AGGACCGAACCCTAGTACGCTAAAAAGTGGCCGGATGACTTGGGATAGCGGTGAAAATCCAAATCGAACCTGGAGATAGCTGGTTCTTTCGAAAT
AGCTTTAGGGCTAGCGTATAGTATTGTTTAAATGGGGGTAGAGCAGTGAATGTGGAATGGCCGATCTAGCTGTACTGACTATAATCAAACCTCCGAAT
ACCATTAATAAGCTATGCAGTCGGAACGTGGGTGATAACGTCCACGCTCGCGAGGGAACAACCCAGATCGTCAGCTAAGGTCCTCCAAAATTGT
GTTAAGTGAGAAAAGGTTGTGAGATTTCAATAACAACCTAGGAAGTTGGCTTAGAAGCAGCCACCTTTAAAGAGTGCCTAATTGCTCACTAGTCAAG
AGATCTTGCCTCAATAATGTAACGGGACTCAAACACAATACCGAAGCTACGGGCACATTATGTGCGTTAGGAGAGCGTTTAAATTCGTTGAAGTC
AGACCGTGAGGACTGGTGGAGAGATTAAGTGAAGTGGCCGATGAGTAACGATTCGAAAGTGAAGTAACTTCGACGCTATTGGGAAAAGGTTTCC
TGGCAAGGTTCTGTCACCCAGGGTATGTCAGGGCCTAAGATGAGCGAGAAATGCATAGTCGATGGACAACAGGTTAATATCTTGTACTTGGTAA
AAGAATGATGGAGTGACGAAAAAGGATAGTTCTACCACTTACTGATTTGGGGTAAGCAACAAGAGAGTTATATAGGCAAACTCCGTATAGCATA
ATCTTGAGTTGTGATGCATAGTGAAGACTTCGGTCGAGTAACGAATTGAATGATTTTCATGTTTCCAAGAAAAGCTTCTAGTGTAAATTTTTATCAAC
CTGTACCGAGAACGAACACACGTTCCCAAGATGAGTATTCTAAGGCGAGCGAGAAAACCAATGTTAAGGAACTCTGCAAAAATAACCCCGTAAGTTC
CGGAGAAGGGGCGCTATTTTTAATAGGCCACAGAAAATAGGGGGGCAACTGTTTATCAAAAACACAGCTCTCTGCTAAGTTGTAAAACGACGTA
TAGAGGGTGAAGCTGCCAGTGGCCGGAAGGTTAAACGGAGATGTTAGCTTACGCAAAGCATTAAAGTGAAGTCCGGGTGAACGGCGCCGCTAA
CTATAACGGTCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCAACTAATTATTGACCTGCACGAAAGGGCGCAATGATCTCCCTACTGTCTCAACATTGGACTCGG
TGAAATTAAGTACCAGTGAACACGCTGGTTACCCGCATCAAGACGAAAAGACCCCGTGGAGCTTTACTATAAATTCGATTGAAAATTGGTTTACG
ATGTGTAGGATAGGTGGGAGACTTTGAAGCTGGGACGCTAGTTCTAGTGGAGTCAACCTTGAAATACCACCTTGTCTAAATGATTTCTAACCCGT
TCCCCTTATCTGGGAAGGACAGTGCCTGGTGGGTAGTTTGAAGTGGGCGGCTCCCTCTAAAGAGTAAACGGAGGCGTTCAAAGCTACACTCAAT
ATGGTCAGAAACCATATGCAGAGCACAAAGGTAAGTGTGGTTGACTGCAAGACTTACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAAGCAGGACTTAGTGATCC
GGCGGTACATTGTGGAATGGCCGTCGCTCAACGGATAAAAAGCTACCCCGGGGATAACAGGCTAATCTTCCCAAGAGATCATCTGACGGGAAGGT
TTGGCACTCGATGTCGGCTCATCGCATCCTGGAGCTGGAGTGGGTTCCAAGGTTTGGCTGTTCCGCAATTAAGCGGTACGTGAGCTGGGTTTCA
AACGTCGTGAGACAGTTCCGTCCCTATCTGATGTGGCGTTGGAATATTGATGAGAGTGTCTTCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGTACCGCT
GGTGTCCAGTGTCTTCCAAAGGCACAGCTGGGTAGCTAAGTACGGAAAAGATAACCCTGAAAGCATCTAAGCGGGAAGCTTCTCAAAGATG
AGTATTCCTTATGAAATTCCTTGTAGACTACGAGGTTGATAGTTGGAAGTGTGAAGTGTAGTAATACATTCAGCTGACCAATACTAATATATTTCAA
AATTTAAATG
    
```

Longitud de la secuencia: 2894 nucleótidos.

TablaIV.7.- Diferencias entre las secuencias del gen codificante del ARNr 23S entre las cepas de *M. hyorhinitis*.

	Posición								
	515	1663	1731	1746	1851	1898	2818	2834	2841
Cepa BTS-7	A	A	G	T	----	T	G	----	----
Cepa GDL-1	A	A	G	T	G	C	G	----	----
Cepa MCLD	A	A	G	T	G	C	A	----	----
Cepa HUB-1	A	A	A	----	G	C	G	----	----
Cepa BTS-7 mutante	----	G	G	T	G	C	G	C	T

Tabla IV.8.- Secuencia completa del gen codificante del ARNr 23S de *M. flocculare*.

Mycoplasma flocculare (cepa MS42)

```

TTTTAAATAAATAAGAGTATTTGGTGGATGCCCTGGGTCTGAAAGTCGATGAAGGACGTGATTACCTGCGATAAGCTTCGTGGAGTTGGAAATAAA
CTATGATACGGAGATTTCCGAATGGGGTAACCCAATCTAGCAAACCTAGATTGCGCTTAAATGAATCCATAGTTAAAGCAGCGAAATACGTTGCGA
ATTGAAACATCTTAGTAGCACACAGGAAAAGAAAATAAATAATGATTCCCAAAGTAGTGCCGAGCGAAATGGGAAAAGCCAAACCGTTTTACGG
TGTTGTAGGACATTTAACTGAGTTACAAAATTATATAATAGTAGAAAAAGTTGGAAAGCTTTGACATAGAAGGTGATATCCCTGTATACGAAATTA
TATAATCTCATAAATGTATCCTGAGTAGGGCGGGGCACGTGGAACCCCTGTCTGAATCTGCCAGGACCACCTGGTAAGGCTAAATACTAATCAGACA
CCGATAGTGAACCTAGTACCGTGAGGGAAGGTGAAAAGAACCCCGAGAGGGGAGTGAACAGATTCTGAAACCATTTACTTACAAGTAGTCAAAG
CACGTTAATGTGTGATGGCGTACATCTTGCAGTATGGTCCGGCGAGTTATGTTAGCAAGCAAGGTTAAGCAGATTAAGCGGAGCCGTAGGGAAAC
CGAGTCTGAATAGGGCGTTTGTGTTGACATAGACCCGAAACCAGGTGATCTATCCATGAGCAGAATGAAACTTTGGTAAAAACAAGTGGAGGT
TCGAACCCGAGTACGCTAAAAAGTGCCTGGATGACTTTGGATAGCGGTGAAATTCGAATCGAACCTGGAGATAGCTGGTCTCTTCGAAATAGCT
TTAGGGCTAGCGTGTAGTAATAAATAGTGGGGGTAGAGCACTGAATATGGAATGGCGGCACCTAGCTGTACTGACTATAATCAAATCCGAATA
CCATTAATTTTACCTATGCAGTCCGAACGTGGGTGATAACGTCCACGCTCGCGAGGGAACAACCCAGATCGTCAAGTAAAGTCCCAAAATTTGTT
AAGTGAGAAAGGTTGTGTAATTTCTCAACAACACTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCACCATTAAAGAGTGCCTAATTTGCTCACTAGTCAAGAGA
TCATGCGCAATAATGTAACGGGACTAAAACAATACCGAAGCTACGGGTAATTTTTTATAAAGTTTGCCTTAGGAGAGCGTTTAAATTTTCGCT
GAAGCTAGAGGGTAACTACTAGTGAAGAAATTAAGAGTGAAGTGCAGGAAATGAGTAAACGACTCGTGGTGAAGATCCACGACGCTATTGGGGAA
GGTTTCCCTGGCAAGGGTCTCCACCCAGGGTTAGTCAAGGCTAAGGAGAGGCTGAAAAGCGTATCCGATGGACAATCGGTTAATTTCCGATAC
TTGTTAACAAGCGCACGGGTGACGAAAAAAGATAGTTTTACCCTACTGGATTGTTGGGGCAAGCAAGCAAGAAAGTTATATAGGCAAAATCCGTA
TAACCTAATTTCAAGCTGTGATGCATAGGGAAGAGGAGACTCAAGTACCGAATTAATGATTCTATGTTTCCAAAGAAAAGCCTTAGTATTAATTT
TTTAAACAACCTGTACCAAGAACGGACACAGCTCCCAAGATGAGTATTTCAAGGTGAGCGAGAAAAACCAATGTTAAGGAACCTCTGCAAAATATCC
CGTACGTTTCGAAGAAGGGATGCCCTTTTTAAGGCTCAGTAAAATAGGGGGGCAACTGTTTATCAAAAACACAGCTCTCTGCGAAGGCGCAAG
CCGAAGTATAGAGGGTGAAGCCTGCCAGTGCCTGAGGTAAGCAAGGTTGTTAGCTTTTTGCAAAAGTAACCAAGTGAAGCCCGGTGAACGGCG
GCCGTAACATAACCGTCTAAGTAGCGAAATTCCTGTCAACTAATTTGACCTGCACGAAAGGCGCAATGATCTCCCTACTGTCTCAACATTG
GACTCGGTGAAATTTAGTACCAGTGAAGAACTGGTTACCCGCTCAAGACGAAAAGACCCCGTGGAGCTTTACTATAACTTCGTATTGAGAAATT
GGTTTATATGTGTAGGATAGGTGGGAGACAGCGATCAAAGCAGCTAGTCTTGGAGGAGTCAACCTTGAATAACCCCTTAATAAATGATTTTC
TAACCTGCTTCTATTATCTAGAAGAGACAGTGCCTGGTGGTATTGACTGGGCGGTCACTCTCTAAAAAGTAAACGGAGGTGTTCAAAGCTA
CACTCAATATGGTCAGAAAACCATATGCAGAGCATAAAGGTAAGGTTGTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAAGCAGGACTT
AGTGATCCGGCGGTTCAATTGTGGAATGGCCGTCGCTCAACGGATAAAGAGTACCCCGGGGATAACAGGCTAATCTTCCCAAGAGATCACATCGAC
GGAAAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCGCATCTGGAGCTGAAGTCCGTTTCAAAGGTTTGGCTGTTCGCCAATTAAGCGGTACGTGAGCT
GGGTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCTGATGTTGGGCTTGAATATTGATGAGAGCTGCTCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGAC
GTACCGCTAGTGTCCAGTTGCTTGGCAAAGGCACAGCTGGGTAGCTAAGTACGGAAGATAACCCGCTGAAAGCATCTAAGCGGGAAGCTTCTC
CAAGATGAGTATTCCTTATGAAATTCCTTATAGACTATGAGGTTGATAGGTTAGAGGTGTAAGTGTAGTAAATACATTCAGCTGACTAATACTAATA
AATCAAAGTTTAAAAAG
    
```

Longitud de la secuencia: 2901 nucleótidos.

Tabla IV.9.- Diferencias entre las secuencias MS42 (1994) y MS42 (2011) del gen codificante del ARNr 23S en *M flocculare*.

Posición	MS42 (2011)	MS42 (1994)	Posición	MS42 (2011)	MS42 (1994)	Posición	MS42 (2011)	MS42 (1994)
262	G	----	944	----	T	1631	----	T
504	G	----	946	T	A	1657	G	----
521	C	----	1204	T	----	1736	----	T
526	A	----	1240	T	G	1865	----	T
723	----	C	1241	A	G	1893	T	C
801	----	G	1263	T	G	2085	G	----
809	G	----	1267	----	G	2087	G	----
823	T	----	1271	----	G	2564	G	----
914	G	C	1339	G	----	2895	----	A
915	G	C	1448	A	G			

Tabla IV.12.- Similitud comparada de las secuencias del gen ARNr 23S en los micoplasmas porcinos. (En rojo y en azul, los mayores y menores valores de similitud).

	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. flocculare</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. hyosynoviae</i>
<i>M. hyopneumoniae</i>	ID	0,963	0,916	0,839	0,830
<i>M. flocculare</i>	0,963	ID	0,914	0,840	0,835
<i>M. hyorhinis</i>	0,916	0,914	ID	0,864	0,844
<i>M. hyopharyngis</i>	0,839	0,840	0,864	ID	0,849
<i>M. hyosynoviae</i>	0,830	0,835	0,844	0,849	ID

Tabla IV.13.- Similitud comparada de las secuencias de los genes codificantes del ARNr 23S y ARNr 16S de los micoplasmas porcinos, respecto a las secuencias génicas de *E. coli*. (Brosius y cols., 1980 y 1978).

<i>E. coli</i>	<i>M. hyopneumoniae.</i>	<i>M. flocculare</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. hyosynoviae</i>
23S	67,8 %	67,5 %	68,3 %	67,7 %	67,3 %
16S	69,8 %	69,6 %	70,1 %	66,9 %	70,6 %

Tabla IV.14.- Similitud comparada de las secuencias del gen ARNr 16S en los micoplasmas porcinos. (En rojo y en azul, los mayores y menores valores de similitud).

	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. flocculare</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>M. hyosynoviae</i>
<i>M. hyopneumoniae</i>	ID	0,963	0,901	0,802	0,824
<i>M. flocculare</i>	0,963	ID	0,897	0,795	0,818
<i>M. hyorhinis</i>	0,901	0,897	ID	0,840	0,860
<i>M. hyopharyngis</i>	0,802	0,795	0,840	ID	0,842
<i>M. hyosynoviae</i>	0,824	0,818	0,860	0,842	ID

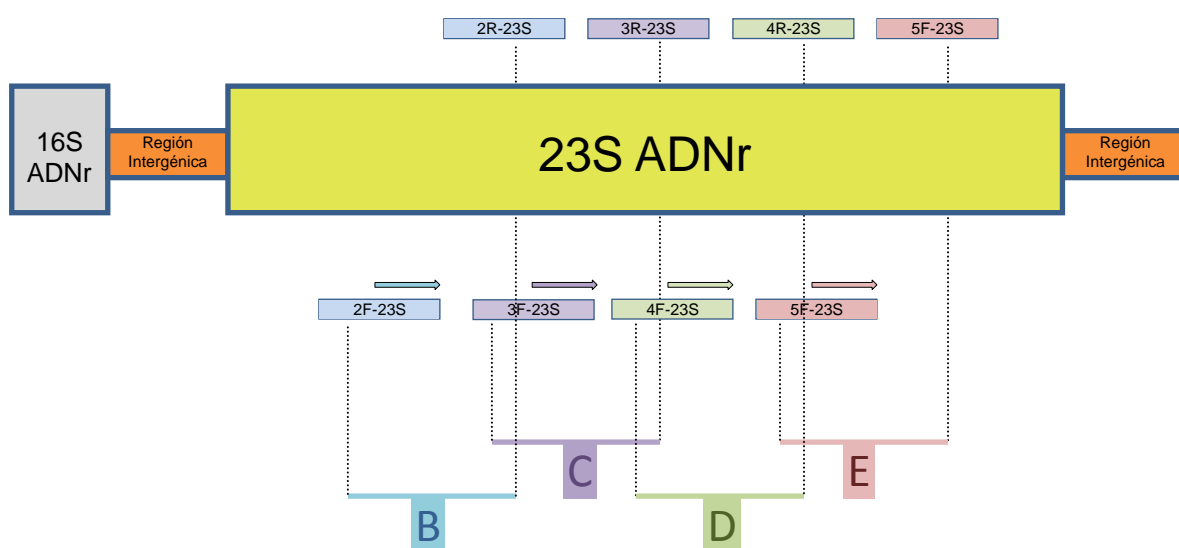


Figura IV.1.- Representación esquemática de la posición de los cebadores para PCR de los Fragmentos B, C, D, y E del gen que codifica el ARNr 23S en micoplasmas porcinos. (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis*, *M. flocculare*, *M. hyosynoviae*, *M. hyopharyngis*).

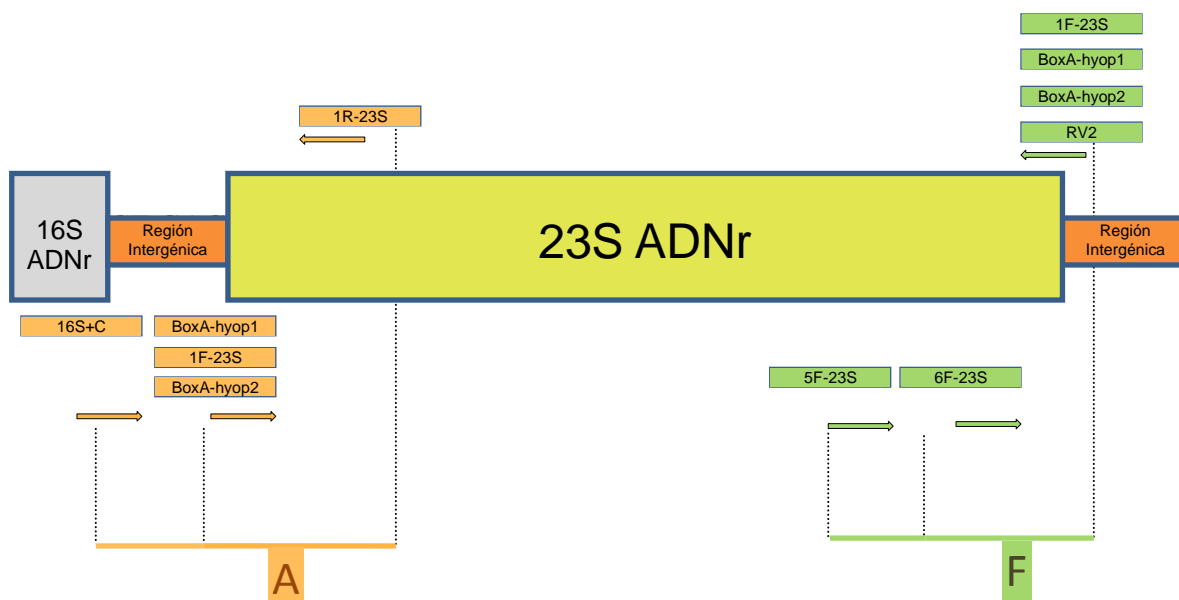


Figura IV.2.- Representación esquemática de la posición de los cebadores empleados para PCR de los Fragmentos A y F del gen que codifica el ARNr 23S en micoplasmas porcinos. (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis*, *M. flocculare*, *M. hyosynoviae*, *M. hyopharyngis*).

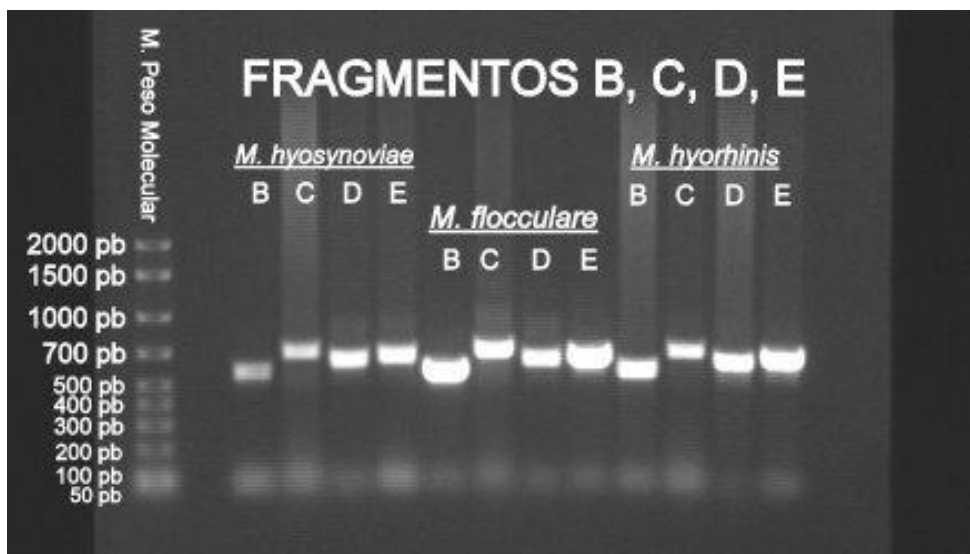


Figura IV.3.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos B, C, D, y E, del gen codificante del ARNr 23S de *M. hyosynoviae*, *M. hyorhinis* y *M. flocculare*.

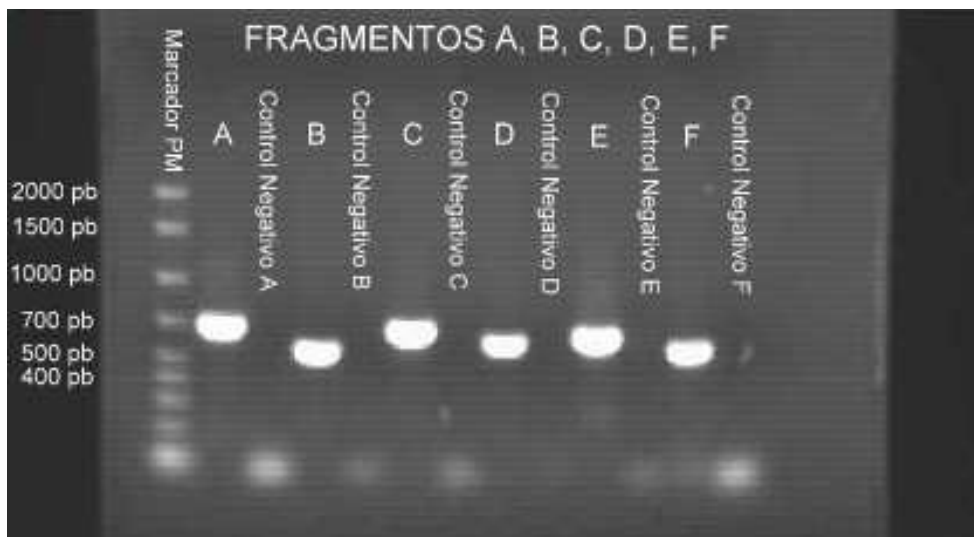


Figura IV.4.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos A, B, C, D, E, y F del gen codificante del ARNr 23S de *M. hyopharyngis*.

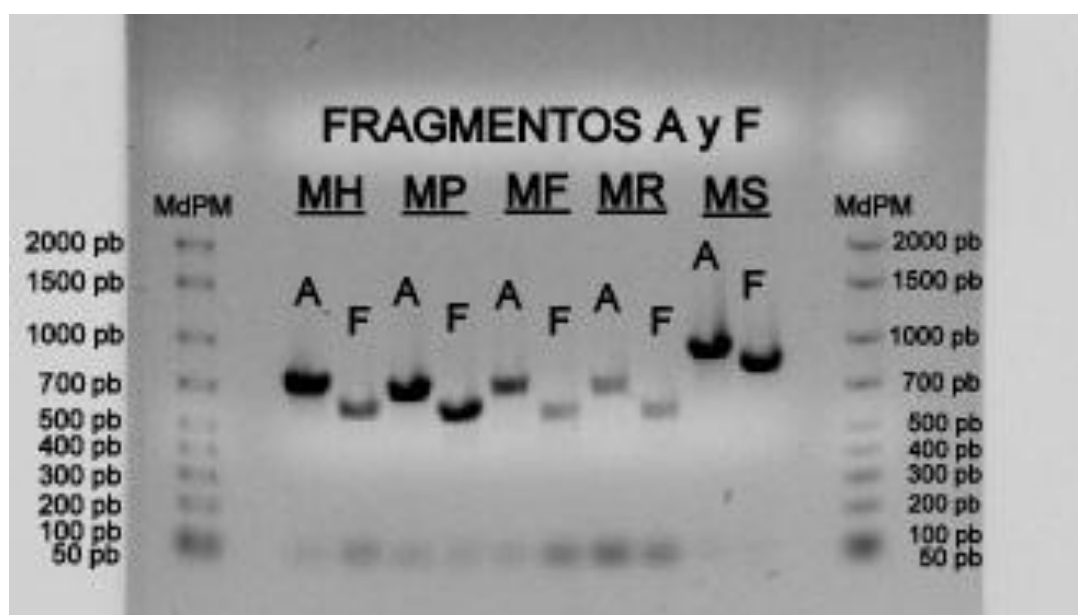


Figura IV.5.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos A y F, del gen codificante del ARNr 23S de las cepas de referencia de los micoplasmas porcinos. (MdPM): marcador de peso molecular; (MH): *M. hyopneumoniae*; (MP): *M. hyopharyngis*; (MF): *M. flocculare*; (MR): *M. hyorhinis*; (MS): *M. hyosynoviae*.

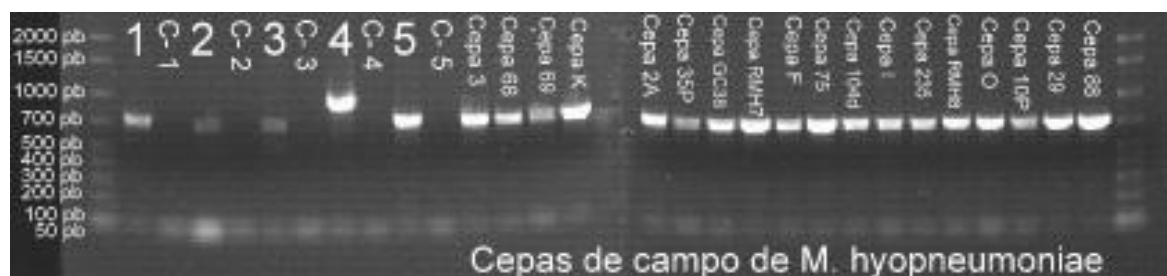


Figura IV.6.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos A, del gen codificante del ARNr 23S en las cepas de campo de *M. hyopneumoniae*. Prueba de especificidad. (1): *M. hyorhinis* cepa BTS-7; (2): *M. flocculare* cepa MS42; (3): *M. hyopharyngis* cepa H3-6B F; (4): *M. hyosynoviae* cepa S16; (5): *M. hyopneumoniae* cepa J. Para demostrar la especificidad de la pareja de cebadores empleados para *M. hyopneumoniae*, se realizaron controles negativos (C-1, C-2, C-3, C-4) con la pareja de cebadores (“BoxAhyop2” y 1R-23S”) y el ADN de *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *M. hyopharyngis* y *M. hyosynoviae* respectivamente. (C-5) es el control negativo para la cepa J, y se realizó con agua en sustitución de ADN, y la misma pareja de cebadores.

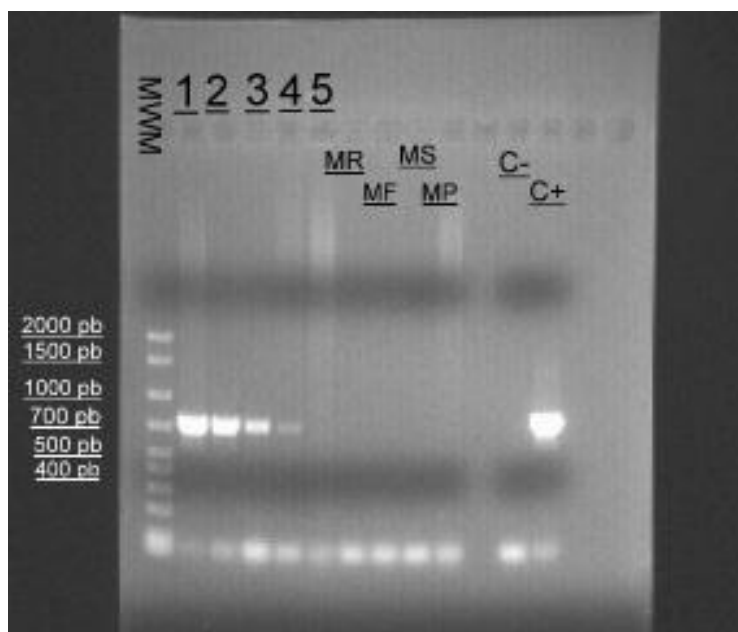


Figura IV.7.- Electroforesis de productos amplificados de los Fragmentos A, del gen codificante del ARNr 23S en las cepas de campo de *M. hyopneumoniae*. Prueba de sensibilidad. (MWM): marcador de peso molecular; (1, 2, 3, 4, 5): diluciones seriadas en base diez del ADN de *M. hyopneumoniae*, cepa 29-A, partiendo de 10,6 ng/μl, hasta 1,06 pg/μl. (MR, MF, MS, MP): controles negativos de especificidad, realizados con el ADN de *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *M. hyosynoviae* y *M. hyopharyngis* respectivamente. (C-): control negativo de la reacción, con agua en sustitución de ADN. (C+): control positivo realizado con ADN de la cepa J de *M. hyopneumoniae*, con una concentración de 43,3 ng/μl

El límite de detección quedó establecido en el pocillo (4), que corresponde con una concentración de 10,6 pg/ul.

Pocillo 1	10,6 ng/μl
Pocillo 2	1,06 ng/μl
Pocillo 3	106 pg/μl
Pocillo 4	10,6 pg/μl
Pocillo 5	1,06 pg/μl

Figura IV.8.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S de los micoplasmas porcinos. Página 1 de 3.

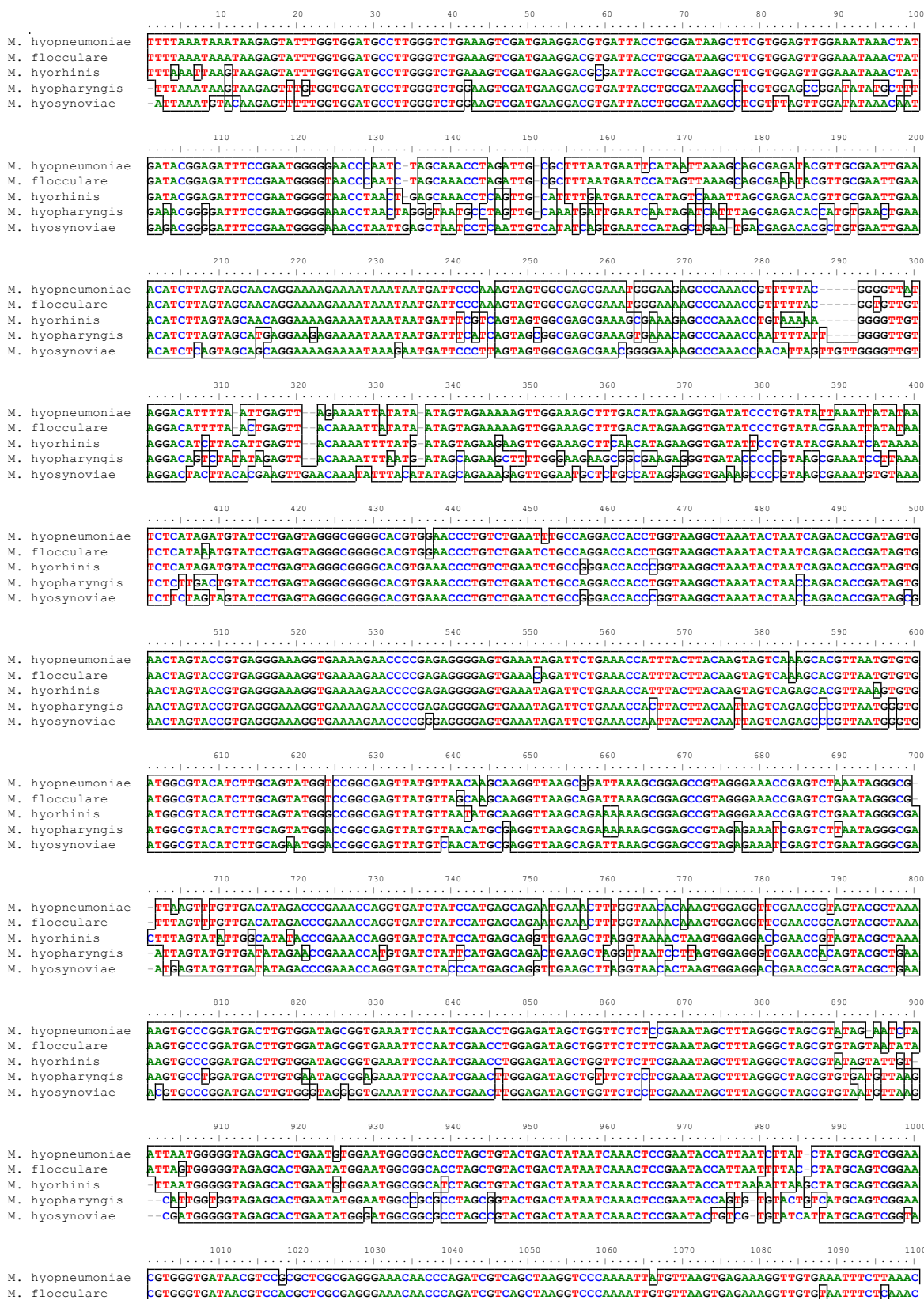


Figura IV.8.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S de los micoplasmas porcinos. Página 2 de 3.

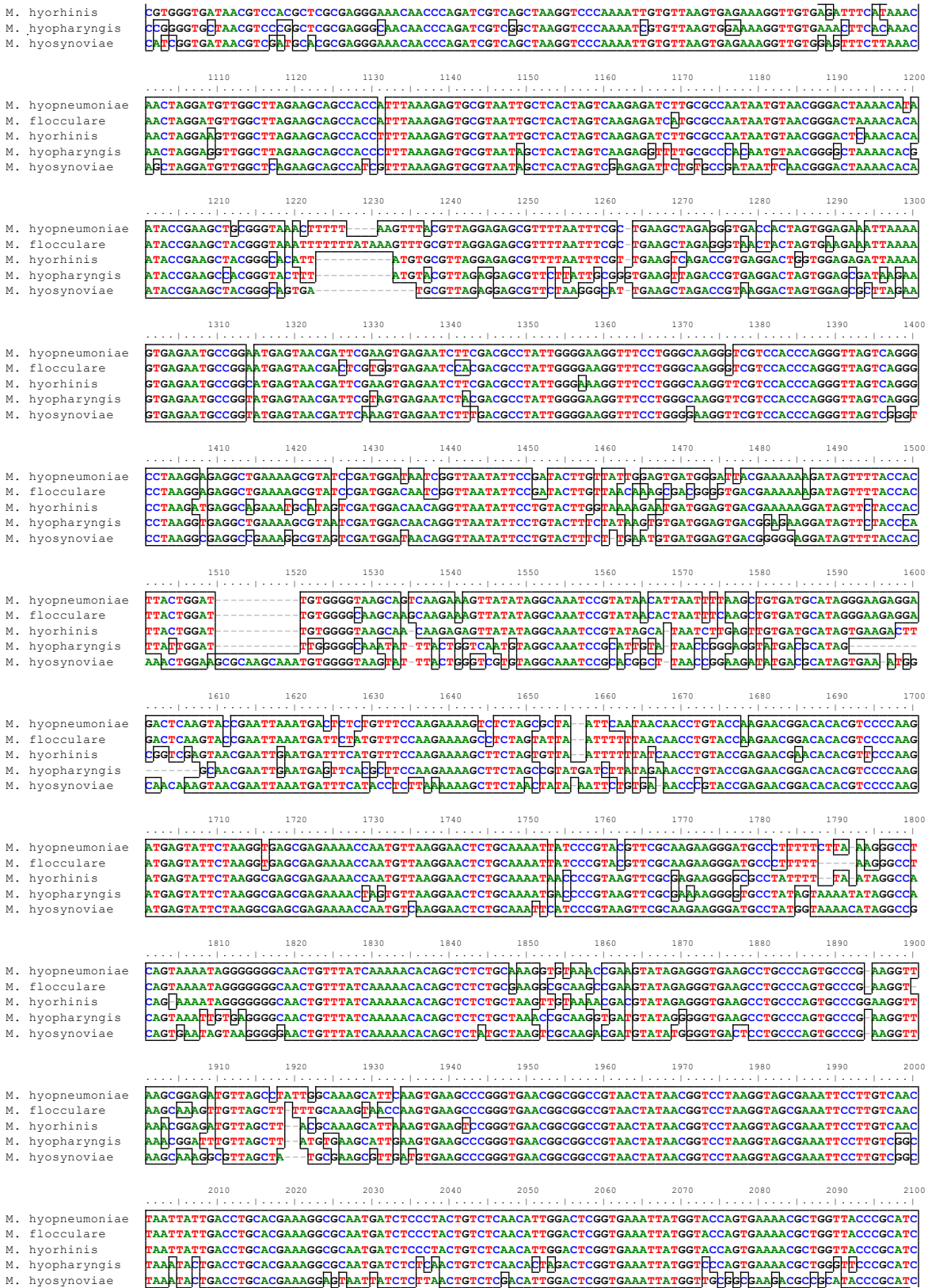
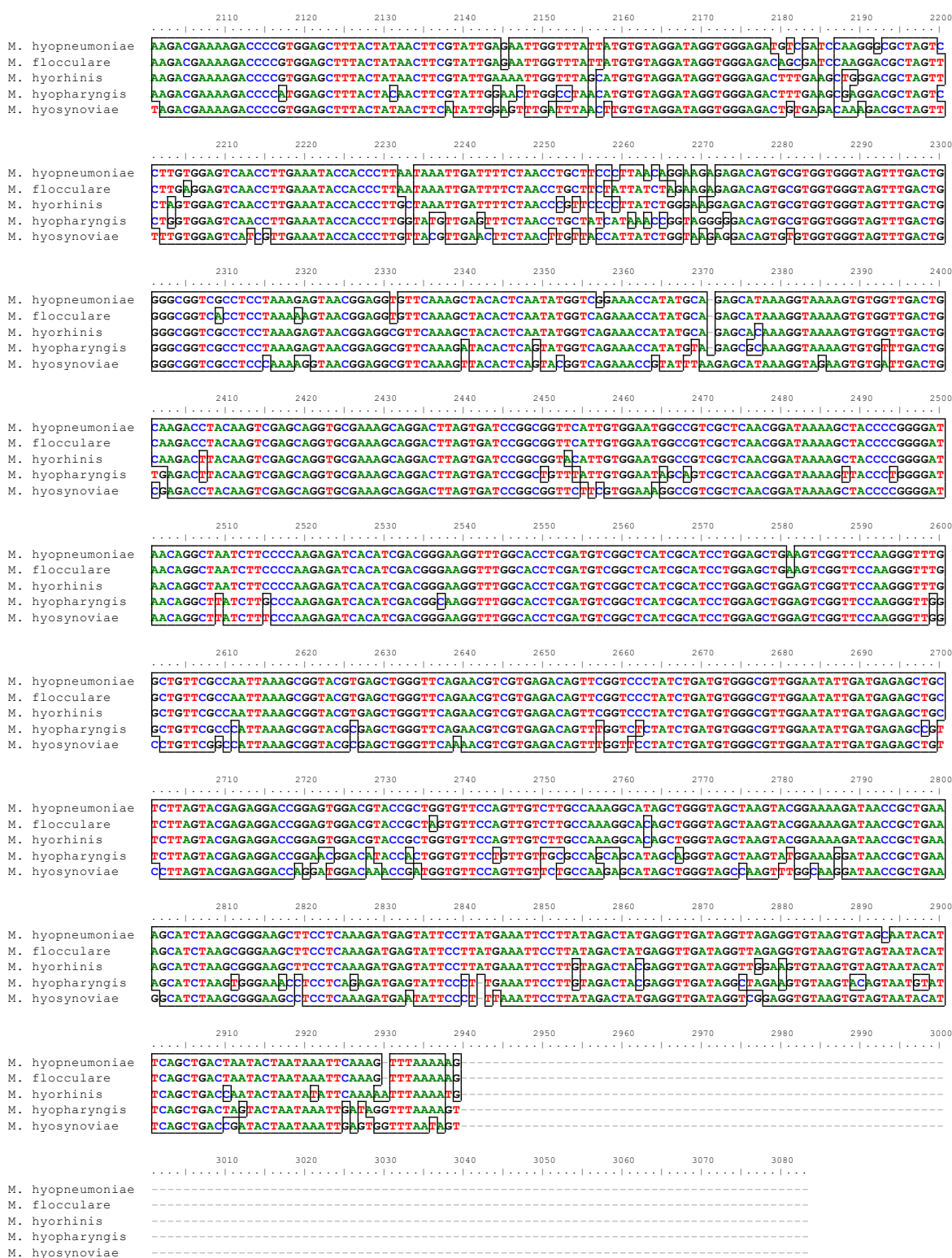


Figura IV.8.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S de los micoplasmas porcinos. Página 3 de 3.



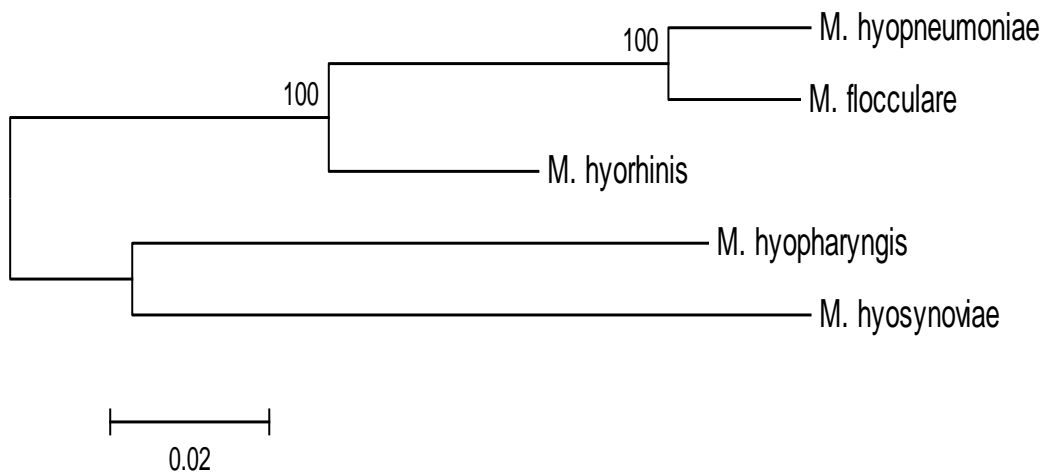


Figura IV.9.- Dendrograma taxonómico de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 23S de los micoplasmas porcinos.

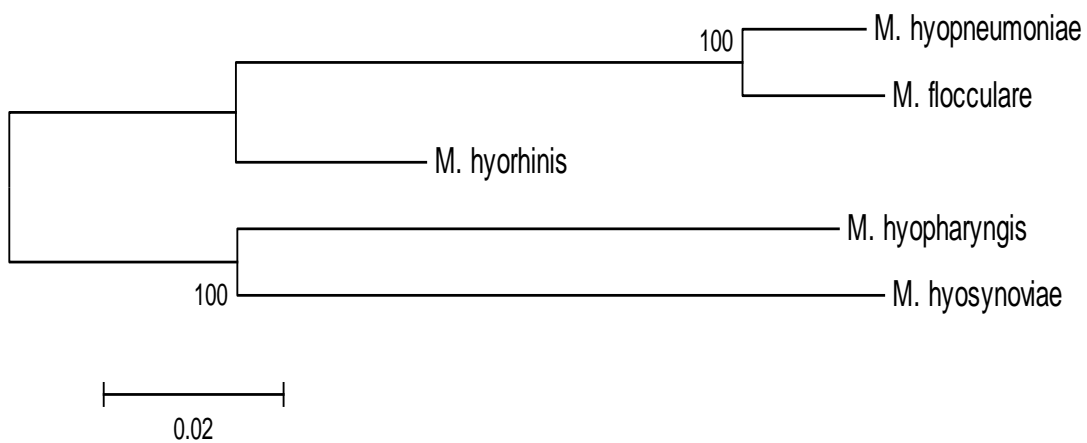


Figura IV.10.- Dendrograma taxonómico de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 16S de los micoplasmas porcinos

Figura IV.11.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 16S de los micoplasmas porcinos. Página 1 de 2

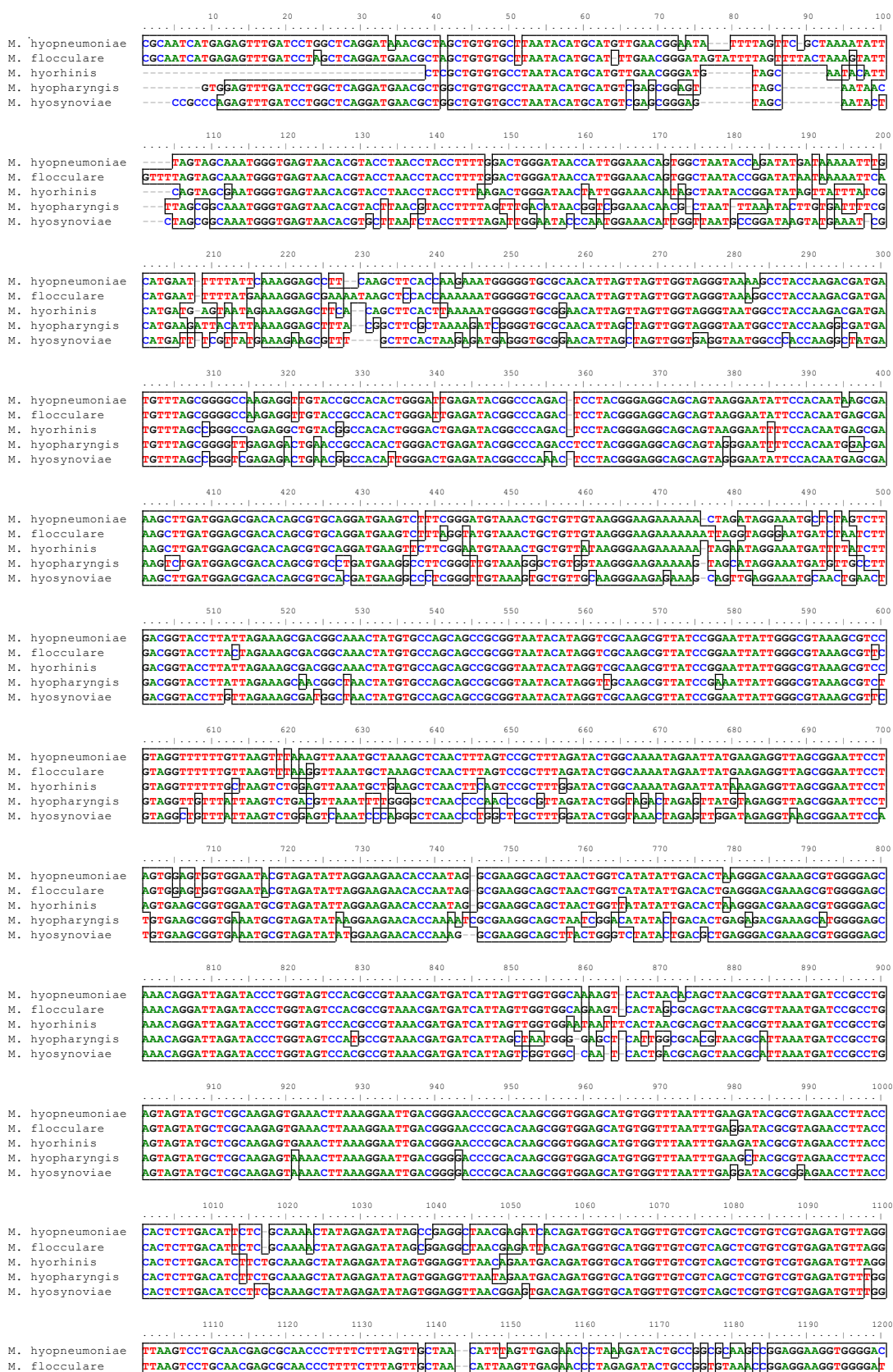
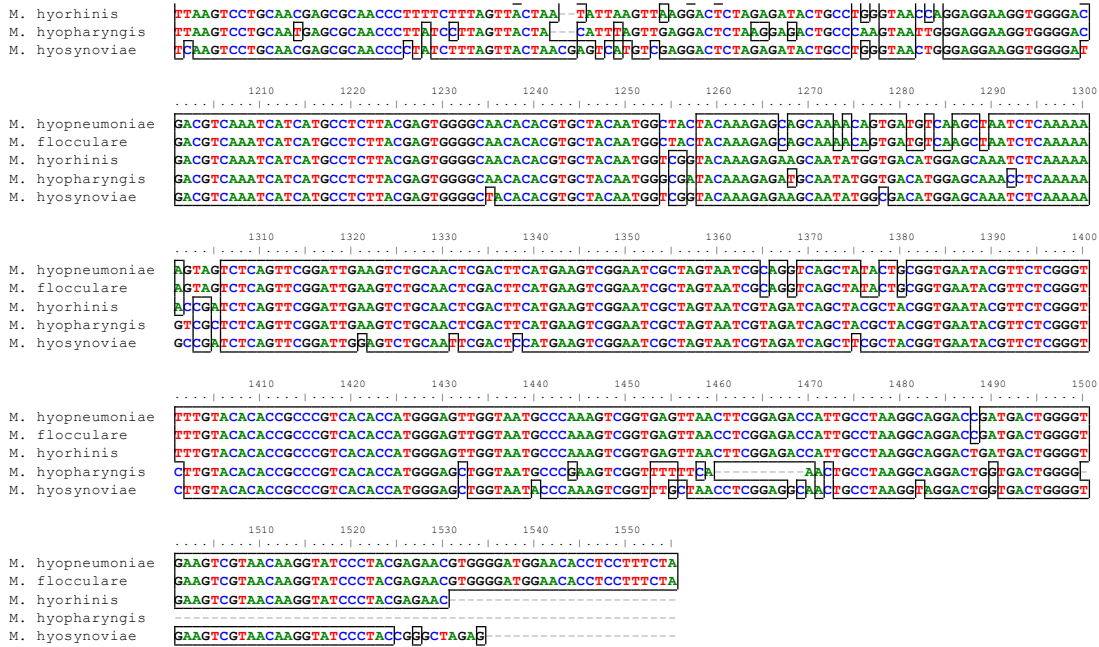


Figura IV.11.- Alineamiento de las secuencias de los patrones secuenciales del gen codificante del ARNr 16S de los micoplasmas porcinos. Página 2 de 2



CONCLUSIONES

PRIMERA.- El aislamiento de micoplasmas porcinos mediante las técnicas descritas ha sido eficaz en condiciones de aerobiosis, y ha permitido la obtención de cepas puras de *M. hyopneumoniae*. Las técnicas de identificación tradicional y el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de tipo convencional y de tiempo real (PCR y q-PCR) han sido herramientas eficaces para asegurar la pureza de un cepario representativo de *M. hyopneumoniae*, elaborado a partir de antiguas cepas liofilizadas, y cepas de nuevo aislamiento.

SEGUNDA.- El análisis de las secuencias de nucleótidos de la Región Intergénica 16S-23S ARNr de 20 cepas de campo de *M. hyopneumoniae* y de 4 cepas de otros autores, mostró que dicha región del genoma presenta un tamaño variable entre 486 y 495 nucleótidos, y reveló 6 patrones secuenciales diferentes, con una similitud del 96,5% al 99,7%. Dos de los patrones secuenciales obtenidos son inéditos y aportados por primera vez en este trabajo.

TERCERA.- El análisis de las secuencias del gen que codifica el ARNr 23S en 14 cepas de campo de *M. hyopneumoniae* y de 4 cepas de otros autores, mostró un tamaño estable de 2902 nucleótidos, y reveló 14 patrones secuenciales diferentes, con una similitud del 99,6% al 99,9%. Diez de los patrones secuenciales obtenidos, son inéditos y aportados por primera vez en este trabajo.

CUARTA.- En dicho análisis, identificamos 22 posiciones de nucleótidos diferentes, consistentes en sustituciones directas. En base a las mismas, aportamos una secuencia “universal” señalando dichas posiciones con los códigos internacionales de polimorfismos, y una secuencia “consenso”, incluyendo la estructura más probable para el gen que codifica el ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*.

QUINTA.- No parece existir una correlación entre el patrón secuencial de la Región Intergénica 16S-23S ARNr y la secuencia del gen ARNr 23S en *M. hyopneumoniae*. Sin embargo, el estudio de las secuencias de dicho gen, bajo el enfoque de la epidemiología molecular, permite agrupar con relativo acierto cepas del mismo origen o relacionadas por factores geográficos y temporales, así como señalar la presencia de mutaciones relacionadas con resistencias a antibióticos.

SEXTA.- El análisis de la secuencia del gen que codifica el ARNr 23S en la cepa BTS-7 de *M. hyorhinis*, y de 4 cepas de *M. hyorhinis* publicadas por otros autores, muestra discrepancias de 2 a 5 nucleótidos entre las secuencias. La secuencia obtenida para la cepa BTS-7 es inédita, y aportada por primera vez en este trabajo.

SÉPTIMA.- El análisis de la secuencia del gen que codifica el ARNr 23S en la cepa MS42 de *M. flocculare*, muestra hasta 29 discrepancias con la única secuencia publicada para este gen en dicho micoplasma, realizada en 1994 para la cepa MS42. La nueva secuencia obtenida para la cepa MS42 es inédita, y aportada por primera vez en este trabajo.

OCTAVA.- La secuencia obtenida del gen que codifica el ARNr 23S en la cepa H3-6B F de *M. hyopharyngis*, y de la cepa S16 de *M. hyosynoviae*, constituyen la primera secuencia completa de este gen para estas especies, y constan de 2882 y 2908 nucleótidos respectivamente. Ambas secuencias han quedado registradas en GenBank (Código de acceso JQ670924 y JQ670925).

NOVENA.- La PCR empleada para la amplificación del primer fragmento del gen ARNr 23S de *M. hyopneumoniae*, demostró ser específica para este micoplasma entre los micoplasmas porcinos, y ser suficientemente sensible para su uso diagnóstico por PCR convencional.

DÉCIMA.- El análisis conjunto de las secuencias del gen que codifica el ARNr 23S en los micoplasmas porcinos guarda notables paralelismos y está en consonancia con el análisis realizado sobre el gen 16S, tanto en la estructura del dendrograma como en la similitud comparada entre especies, y supone un complemento taxonómico en el estudio de los 5 micoplasmas analizados, y en su relación taxonómica con otras especies.

BIBLIOGRAFÍA

- Abiven, P., Blanchard, B., Saillard, C., Kobisch, M., Bove, J.M.,** (1992). A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected piglets. *Molecular and Cellular Probes*. Vol. 6 (5), Pages 423-429.
- Adams, C., Pitzer, J., Minion, F.C.,** (2005). In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity*, Vol. 73 (11), Pages 7784-7787.
- Al-Ankari, A., Bradbury, J.M.,** (1996). *Mycoplasma iowae*: A review. *Avian Pathology*. Vol. 25 (2), Pages 205-229.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.,** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 215 (3), Pages 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.,** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25 (17), Pages 3389-3402.
- Amils, R., Ramirez, L., Sanz, J.L., Marin, I., Pisabarro, A.G., Urena, D.,** (1989). The use of functional analysis of the ribosome as a tool to determine archaebacterial phylogeny. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 35 (1), Pages 141-147.
- Anton, A.I., Martínez-Murcia, A.J., Rodríguez-Valera, F.,** (1999). Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 181 (9), Pages 2703-2709.
- Armstrong, C.H., Freeman, M.J., Sands-Freeman, L.,** (1987). Cross-reactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*--practical implications for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. *Israel Journal of Medical Sciences*. Vol. 23 (6), Pages 654-656.
- Armstrong, C.H., Friis, N.F.,** (1981) Isolation of *Mycoplasma flocculare* from swine in the United States. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 42 (6), Pages 1030-1032.
- Armstrong, S.E., Mariano, J.A., Lundin, D.J.,** (2010). The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*. Vol. 38 (2), Pages 211-213.
- Arraes, F., de Carvalho, M., Maranhão, A., Brígido, M., Pedrosa, F., Felipe, M.,** (2007). Differential metabolism of *Mycoplasma* species as revealed by their genomes. *Genetics and Molecular Biology*. Vol. 30 (1), Pages 182-189.
- Assunção, P.,** (2003). Aislamiento e identificación de micoplasmas porcinos. Aplicación de la citometría de flujo al estudio de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Assunção, P., de la Fé, C., Kokotovic, B., González, O., Poveda, J.B., (2005). The occurrence of mycoplasmas in the lungs of swine in Gran Canaria (Spain). *Veterinary Research Communications*. Vol. 29 (6), Pages 453-462.

Atkinson, T.P., Balish M.F., Waites., K.B., (2008). Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 32 (6), Pages 956-973.

Baker, A.S., Ruoff, K.L., Madoff, S., (1998) Isolation of *Mycoplasma* species from a patient with seal finger. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 27 (5), Pages 1168-1170.

Balish, M.F., (2006). Subcellular structures of *Mycoplasmas*. *Frontiers in Bioscience*. Vol. 11, Pages 2017-2027.

Balish, M.F., Krause. D.C., (2006). Mycoplasmas: a distinct cytoskeleton for wall-less bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. Vol. 11, Pages 244-255.

Bandrick, M., Pieters, M., Pijoan, C., Molitor, T.W., (2008). Passive transfer of maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific cellular immunity to piglets. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 15 (3), Pages 540-543.

Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L.K., Gannon, F., (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Applied*. Vol. 1 (2), Pages 51-56.

Baseman, J.B., Cagle, M., Korte, J., Herrera, C., Rasmussen, W., Baseman, J.G., Shain, R., and Piper J., (2004). Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 42 (1), Pages 203-211.

Baseman, J.B., Tully, J.G., (1997). *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 3 (1), Pages 21-32.

Bergonier, D., Berthelot, X., (2008). Mycoplasmoses of small ruminants: Contagious agalactia syndrome. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*. Vol. 161 (2), Pages 167-177.

Bergonier, D., Berthelot X., Poumarat, F., (1997). Contagious agalactiae of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. Vol. 16 (3), Pages 848-873.

Blanchard, A., (1997). *Mycoplasmas* and HIV infection, a possible interaction through immune activation. *Wiener klinische Wochenschrift*. Vol 109 (14-15), Pages 590–593.

Blanchard, A., Bébéar, C.M., (2002). *Mycoplasmas* of Humans. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* (edited by Razin and Herrmann). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Pages 45-72.

Blanchard, A., Montagnier, L., Gougeon, M.L., (1997). Influence of microbial infections on the progression of HIV disease. *Trends in Microbiology*. Vol. 5 (8), Pages 326-331.

Blanchard, B., Saillard, C., Kobisch, M., Bové, J.M., (1996). Analysis of putative ABC transporter genes in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology*. Vol. 142 (7), Pages 1855-1862.

Blank, W.A., Erickson, B.Z., Stemke, G.W., (1996). Phylogenetic relationships of the porcine mycoplasmas *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyopharyngis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 46 (4), Pages 1181-1182.

Blank, W.A., Stemke, G.W., (2001). A physical and genetic map of the *Mycoplasma flocculare* ATCC 27716 chromosome reveals large genomic inversions when compared with that of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain J. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 51 (4), Pages 1395-1399.

Blaylock, M., Musatovova O., Baseman, J.G., Baseman J.B., (2004). Determination of infectious load of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples of human vaginal cells. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 42 (2), Pages 746-752.

Bogema, D.R., Deutscher, A.T., Woolley, L.K., Seymour, L.M., Raymond, B.B., Tacchi, J.L., Padula, M.P., Dixon, N.E., Minion, F.C., Jenkins, C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (2012). Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography. *American Society for Microbiology. mBio*: 3 (2) e00282-11.

Bogema, D.R., Scott, N.E., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Raymond, B.B., Jenkins, C., Cordwell, S.J., Minion, F.C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (2011). Sequence TTKF ↓ QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 286 (48), Pages 41217-41229.

Bölske, G., Strandberg, M.L., Bergstrom, K., Johansson, K.E., (1987). Species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* and cross-reactions with other porcine mycoplasmas. *Current Microbiology*. Vol. 15 (4), Pages 233-239.

Bradbury, J.M., (2005). Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. *British Poultry Science*. Vol. 46 (2), Pages 125-136.

Bradbury, J.M., Yavari, C.A., Al-Ankari, A.S., Payne-Johnson, C.E., (1994). Isolation of *Mycoplasma hyopharyngis* and *Fusobacterium necrophorum* from lame pigs in the UK. *Proceedings of the 10th IOM congress, Bordeaux, France*.

Bredt, W., Höfling, K., Heunert, H., Milthaler, B., (1970). Measurements on motile cells of *Mycoplasma pneumoniae*. *Zeitschrift für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie*. Vol. 156 (1), Pages 39-43.

Bredt, W., Radestock, U., (1977) Gliding motility of *Mycoplasma pulmonis*. Journal of Bacteriology. Vol. 130 (2), Pages 937-938.

Briones, C., Koroutchev, K., Amils, R., (1998). Functional phylogeny: The use of the sensitivity of ribosomes to protein synthesis inhibitors as a tool to study the evolution of organisms: Origins of Life and Evolution of the Biosphere. Vol. 28 (4-6), Pages 571-582.

Brosius, J., Dull, T.J., Noller, H.F., (1980). Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Biochemistry. Vol. 77 (1), Pages 201-204.

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F., (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 75 (10), Pages 4801-4805.

Brown, D.R., May, M., Bradbury, J.M., Balish, M.F., Calcutt, M.J., Glass, J.I., Tasker, S., Messick, J.B., Johansson, K.E., and Neimark, H., (2010a). Genus *Mycoplasma*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Pages 575-613.

Brown, D.R., May, M., Bradbury, J.M., Johansson, K.E., (2010b). *Mollicutes* class. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Pages 568-573.

Brown, D.R., Whitcomb, R., Bradbury, J.M., (2007). Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division Tenericutes). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 57 (11), Pages 2703-2719.

Brown, D.R., Zacher, L.A., Farmerie, W.G., (2004). Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. Journal of Bacteriology. Vol. 186 (12), Pages 3922-3927.

Burnett, T.A., Dinkla, K., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Uphoff, C., Srivastava, M., Cordwell, S.J., Geary, S., Liao, X., Minion, F.C., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (2006). P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: Defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. Molecular Microbiology. Vol. 60 (3), Pages 669-686.

Calcutt, M.J., Foecking, M.F., Rosales, R.S., Ellis, R.J., Nicholas, R., (2012). The genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain GDL-1. Journal of Bacteriology. Vol. 194 (7), Page 1848.

Calsamiglia, M., Pijoan, C., Bosch, G.J., (1999). Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. Journal of Swine Health and Production. Vol 7 (6), Pages 263-268.

Calus, D., (2009). Phenotypic characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates of different virulence. Tesis Doctoral. Faculty of Veterinary Medicine. Ghent University.

- Caron, J., Ouardani, M., Dea, S.,** (2000). 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*. Vol 38 (4), Pages 1390-1396.
- Cartwright, C., Stock, F., Beekmann, S., Williams E.C., Gill V.J.,** (1995). PCR amplification of rRNA intergenic spacer regions as a method for epidemiologic typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 33 (1), Pages 184-187.
- Casin, I., Vexiau-Robert, D., De La Salmoniere, P., Eche, A., Grandry, B., Janier, M.,** (2002). High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in the lower genitourinary tract of women attending a sexually transmitted disease clinic in Paris, France. *Sexually Transmitted Diseases*. Vol. 29 (6), Pages 353-359.
- Chalker, V.J., Brownlie, J.,** (2004). Taxonomy of the canine *Mollicutes* by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 54 (2), Pages 537-542.
- Chalker, V.J., Owen, W.M., Paterson, C.J., Browlie, J.,** (2004). Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats. *Veterinary Microbiology*. Vol. 100 (1-2), Pages 77–82.
- Chen, J.R., Lin, J.H., Weng, C.N., Lai, S.S.,** (1998). Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology*. Vol. 62 (2), Pages 97-110.
- Cheng-lee, H., Tzinghua, C., Hungshiao C.,** (1982). A new, inexpensive medium for cultivation of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Reviews of Infection Diseases*, suppl. 4, Page 265.
- Chomczynski P, Sacchi N.,** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. Vol. 162 (1), Pages 156-159.
- Ciprian, A., Cruz, T.A., De la Garza, M.,** (1994). *Mycoplasma hyopneumoniae*: Interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. *Archives of Medical Research*. Vol. 25 (2), Pages 235-239.
- Citti, C., Nouvel, L., Baranowski, E.,** (2010). Phase and antigenic variation in *Mycoplasmas*. *Future Microbiology*. Vol. 5 (7), Pages 1073-1085.
- Clark, L.K., Armstrong, C.H., Scheidt., A.B., Van Alstine, W.** (1993). The effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on growth in pigs with or without environmental constraints. *Swine Health Production*. Vol. 1 (6), Pages 10-14.
- Collighan, R.J., Woodward, M.J.,** (1997). *Spirochaetes* and other bacterial species associated with bovine digital dermatitis. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 156 (1), Pages 37-41.

Dee, S., Otake, S., Deen, J., (2009a). Use of a production region model to evaluate aerosol transmission and biosecurity of PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae*: results from a 3 year study. 2009 International PRRS Symposium. Chicago, Illinois. (Abstract Page 79).

Dee, S., Otake, S., Oliveira, S., Deen, J., (2009b). Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Research*. Vol. 40 (4), art. no. 39.

Dee, S., Pitkin, A., Otake, S., Deen, J., (2011). A four-year summary of air filtration system efficacy for preventing airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*. Vol. 19 (5), Pages 292-294.

Del Giudice, R.A. and Gardella, R.S., (1996). Antibiotic treatment of mycoplasma-infected cell cultures. In *Molecular and Diagnostic. Procedures in Mycoplasma*. Vol. 2 (edited by Tully and Razin). Academic Press, San Diego, Pages 439-443.

Desrosiers, R., (2001). A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *Journal of Swine Health and Production*. Vol. 9 (5), Pages 233-237.

Desrosiers, R., (2002). Aerosol transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in North America. *International Pigletter*. Vol. 21, Pages 68-70.

Deutscher, A.T., Jenkins, C., Minion, F.C., Seymour, L.M., Padula, M.P., Dixon, N.E., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (2010). Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. *Molecular Microbiology*. Vol. 78 (2), Pages 444-458.

Deutscher, A.T., Tacchi, J.L., Minion, F.C., Padula, M.P., Crossett, B., Bogema, D.R., Jenkins, C., Kuit, T.A., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (2012). *Mycoplasma hyopneumoniae* surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs. *Journal of Proteome Research*. Vol. 11 (3), Pages 1924-1936.

Djordjevic, S.P., Cordwell, S.J., Djordjevic, M.A., Wilton, J.L., Minion, F.C., (2004). Proteolytic Processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* Cilium Adhesin. *Infection and Immunity*. Vol. 72 (5), Pages 2791-2802.

Dohoo, I.R., Montgomery, M.E., (1996). A field trial to evaluate a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine: Effects on lung lesions and growth rates in swine. *Canadian Veterinary Journal*. Vol. 37 (5), Pages 299-302.

dos Santos, A.P., dos Santos, R.P., Biondo, A.W., Dora J.M., Goldani, L.Z., de Oliveira, S.T. de Sa Guimaraes A.M., Timenetsky, J., de Moraes, H.A., González, F.H., and Messick, J.B., (2008). *Hemoplasma* infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14 (12), Pages 1922-1924.

- Douglas, S.E., Doolittle, W.F.,** (1984). Complete nucleotide sequence of the 23S rRNA gene of the cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. Nucleic Acids Research. Vol. 12, (7), Pages 3373-3386.
- Drexler, H.G., Uphoff, C.C.,** (2002). *Mycoplasma* contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. Cytotechnology. Vol. 39 (2), Pages 75-90.
- Drexler, C.S., Witvliet, M.H., Raes, M., Van De Laar, M., Eggen, A.A.S., Thacker, E.L.,** (2010). Efficacy of combined porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in piglets. Veterinary Record. Vol. 166 (3), Pages 70-74.
- Duensing, T.D., Wing, J.S., Van Putten, J.P.,** (1999). Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: A novel strategy in microbial pathogenesis. Infection and Immunity. Vol. 67 (9), Pages 4463-4468.
- Ecco, R., Lazzari, A.M., Guedes, R.M.,** (2009). Enzootic pneumonia in wild boars (*Sus scrofa*). Pesquisa Veterinaria Brasileira. Vol. 29 (6), Pages 461-468.
- Edward, D.G., Freundt, E.A.,** (1967). Proposal for *Mollicutes* as name of the class established for the order *Mycoplasmatales*. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 17 (3), Pages 267-268.
- Erdmann, T.,** (1976). Untersuchungen zur Morphologie, Vermehrung und Beweglichkeit von *Mycoplasma gallisepticum*. Tesis Doctoral. Johannes Gutenberg Universität.
- Erickson, B.Z., Ross, R.F., Rose, D.L.,** (1986). *Mycoplasma hyopharyngis*, a new species from swine. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 36 (1), Pages 55-59.
- Ettayebi, M., Prasad, S.M., Morgan, E.A.,** (1985). Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. Vol. 162 (2), Pages 551-557.
- Everett, K.D., Hornung, L.J., Andersen, A.A.,** (1999). Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: Three PCR tests. Journal of Clinical Microbiology. Vol 37 (3), Pages 575-580.
- Falk, K., Høie, S., Liim, B.M.,** (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 32 (1), Pages 67-77.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S.,** (2005). Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. Canadian Journal of Veterinary Research. Vol. 69 (3), Pages 223-228.

Feng, Z., Shao, G., Liu, M., Wu, X., Zhou, Y., Gan, Y., (2010). Immune responses to the attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 Strain vaccine by intrapulmonic immunization in piglets. *Agricultural Sciences in China*. Vol. 9 (3), Pages 423-431.

Ferreira, H.B., de Castro, L.A., (2007). A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. *Genetics and Molecular Biology*. Vol. 30 (1), Pages 245-255.

Fischer, A., Shapiro, B., Muriuki, C., Heller, M., Schnee, C., Bongcam-Rudloff, E., Vilei, E.M., Frey, J., Jores, J., (2012). The origin of the 'mycoplasma mycoides cluster' coincides with domestication of ruminants. *Public Library of Science One*. Vol. 7 (4), e-Page -36150.

Fox, G.E., Pechman, K.R., Woese, C.R., (1977). Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 27 (1), Pages 44-57.

Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N., Woese, C.R., (1980). Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Science*. Vol. 209, Pages 457-463.

Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtschuk Jr, P., (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol 42 (1), Pages 166-170.

Freundt, E.A., Andrews, B.E., Erno, H., (1973). The sensitivity of *Mycoplasmales* to sodium polyanetholsulfonate and digitonin. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Series A*. Vol 225 (1), pages 104-112.

Frey, J., Haldimann, A., Nicolet, J., (1992). Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 42 (2), Pages 275-280.

Friis, N.F., (1969) *Mycoplasma suis pneumoniae* isolated in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol. 10 (3), Pages 295-297.

Friis, N.F., (1971a). *Mycoplasmas* cultivated from the respiratory tract of Danish pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol 12 (1), Pages 69-79.

Friis, N.F., (1971b). A selective medium for *Mycoplasma suis pneumoniae*. *Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol. 12 (3), Pages 454-456.

Friis, N.F., (1972). Isolation and characterization of a new porcine mycoplasma. *Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol. 13 (2), Pages 102-121.

Friis, N.F., (1973). The pathogenicity of *Mycoplasma flocculare*. *Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol. 14 (2), Pages 344-346.

- Friis, N.F.**, (1974). *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* in comparative pathogenicity studies. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 15 (4), Pages 507-518.
- Friis, N.F.**, (1975a). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. Nordisk Veterinaer Medicin. Vol. 27 (6), Pages 337-339.
- Friis, N.F.**, (1975b). The SPS and digitonin tests applied to porcine mycoplasmas. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 16 (3), Pages 474-476.
- Friis, N.F.**, (1976). A serologic variant of *Mycoplasma hyorhinis* recovered from the conjunctiva of swine. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 17 (3), Pages 343-353.
- Friis, N.F.**, (1977). *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* in the growth precipitation test. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 18 (2), Pages 168-175.
- Friis, N.F.**, (1979). Selective isolation of slowly growing acidifying mycoplasmas from swine and cattle. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 20 (4), Pages 607-609.
- Friis, N.F., Ahrens, P., Hagedorn-Olsen, T., Nielsen, E.O., Kokotovic, B.**, (2003). *Mycoplasma hyopharyngis* isolation from Swine. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 44 (1-2), Pages 103-104.
- Friis, N.F., Ahrens, P., Larsen, H.**, (1991). *Mycoplasma hyosynoviae* isolation from the upper respiratory tract and tonsils of pigs. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 32 (4), Pages 425-429.
- Friis, N.F., Feenstra, A.A.**, (1994). *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 35 (1), Pages 93-98.
- Friis, N.F., Jensen, P.T.**, (1984). Serological comparison of type strains of porcine, bovine, and ovine mycoplasmas with atypical colony morphology. Acta Veterinaria Scandinavica 25 (1), Pages 29-35.
- Friis, N.F., Kokotovic, B., Svensmark, B.**, (2002). *Mycoplasma hyorhinis* isolation from cases of otitis media in piglets. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 43 (3), Pages 191-193.
- Friis, N.F., Szancer, J.**, (1994). Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antimicrobial agents in a liquid medium test compared to a disc assay. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 35 (4), Pages 389-394.
- Furlong, S.L., Turner, A.J.**, (1975). The isolation of *Mycoplasma hyosynoviae* and exposure of pigs to experimental infection. Australian Veterinary Journal, Vol. 51 (6), Pages 291-293.

Gambini, D., Decleva, I., Lupica, L., Ghislanzoni, M., Cusini, M., Alessi, E., (2000). *Mycoplasma genitalium* in males with nongonococcal urethritis: prevalence and clinical efficacy of eradication. Sexually transmitted diseases. Vol. 27, Pages 226-229.

Garlaite, K., Siugzdaite, J., Siugzda, R., (2004). Vaccination against swine enzootic pneumonia under field conditions in different housing and environmental conditions. Acta Veterinaria. Vol. 54 (1), Pages 43-52.

Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole J.R., Harrison S.H., Euzéby J., Tindall B.J., (2007). The taxonomic outline of the Bacteria and Archaea. Release 7.7, Part 11 – The Bacteria; www.taxonomicoutline.org.

Gasparich, G.E., Whitcomb, R.F., Dodge, D. French, F.E., Glass J., Williamson, D.L., (2004). The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 54 (3), Pages 893-918.

Genzow, M., Kovacs, F., Molnár, T., Magyar, T., (2006). Concurrent vaccination of piglets with Ingelvac® PRRS MLV and with Ingelvac® M. hyo. Tierärztliche Umschau. Vol. 61 (12), Pages 649-653.

Gilroy, C.B., Keat, A., Taylor-Robinson, D., (2001). The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritidis. Rheumatology. Vol. 40 (12), Pages 1355-1358.

Gonçalves, L.F., Chaiworapongsa, T., Romero R., (2002). Intrauterine infection and prematurity. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews. Vol. 8 (1), Pages 3-13.

Goodwin, R.F., (1976). An improved medium for the isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae*. Veterinary Record. Vol. 98 (13), Pages 260-261.

Goodwin, R.F., (1985). Apparent reinfection of enzootic pneumonia-free pigs herds: search for the possible causes. Veterinary Record. Vol. 116 (26), Pages 690-694.

Goodwin, R.F., Whittlestone, P., (1966). Enzootic pneumonia of pigs: growth and behaviour of the causal mycoplasma in liquid media. British Journal of Experimental Pathology. Vol. 47 (5), Pages 518-524.

Graziotin, A.L., Santos, A.P., Guimaraes, A.M., Mohamed, A., Cubas, Z.S., de Oliveira, M.J., dos Santos, L.C., Moraes, W., Vieira, R.F., Donatti L., de Barros Filho, I.R, Biondo AW, Messick JB., (2011). *Mycoplasma ovis* in captive cervids: Prevalence, molecular characterization and phylogeny. Veterinary Microbiology. Vol. 152 (3-4), Pages 415-419.

Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M.M., Ziegler, U., Hoelzle, L.E., (2009). *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. *Infection and Immunity*. Vol. 77 (2), Pages 576-584.

grosse Beilage, E., Schreiber, A., (2005). Vaccination of sows against *Mycoplasma hyopneumoniae* with Hyoresp®. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. Vol 112 (7), Pages 256-261.

grosse Beilage, E., Rohde, N., Krieter, J., (2009). Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol 88 (4), Pages 255-263.

Guo. Y.H., Cheng, Z.M., Walla, J.A., (2000). Amplification of the 23S rRNA gene and its application in the differentiation and detection of *Phytoplasmas*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 22 (4), Pages 380-386.

Gürtler, V., (1993). Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR amplification of variable length 16S_23S rDNA spacer regions. *Journal of General Microbiology*. Vol. 139 (12), Pages 3089-3097.

Gürtler, V., Stanisich, V., (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. *Microbiology*. Vol. 142 (1), Pages 3-16.

Gürtler, V., (1999). The role of recombination and mutation in 16S_23S rDNA spacer rearrangements. *Gene*. Vol. 238 (1), Pages 241-252.

Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A., (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? *Veterinary Microbiology*. Vol. 100 (3-4), Pages 255-268.

Hagedorn-Olsen, T., Basse, A., Jensen, T.K., Nielsen, N.C., (1999a). Gross and histopathological findings in synovial membranes of pigs with experimentally induced *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. Vol. 107 (2), Pages 201-210.

Hagedorn-Olsen, T., Nielsen, N.C., Friis, N.F., (1999b). Induction of arthritis with *Mycoplasma hyosynoviae* in pigs: clinical response and re-isolation of the organism from body fluids and organs. *Journal of Veterinary Medicine Series A: PPCM*. Vol. 46 (6), Pages 317-325.

Hagedorn-Olsen, T., Nielsen, N.C., Friis, N.F., Nielsen, J., (1999c). Progression of *Mycoplasma hyosynoviae* infection in three pig herds. Development of tonsillar carrier state, arthritis and antibodies in serum and synovial fluid in pigs from birth to slaughter. *Journal of Veterinary Medicine Series A: PPCM*. Vol. 46 (9), Pages 555-564.

Hall, R.E., Agarwal, S., Kestler, D.P., (2000). Induction of leukemia cell differentiation and apoptosis by recombinant P48, a modulin derived from *Mycoplasma fermentans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 269 (1), Pages 284-289.

Harasawa, R., (1999). Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S–23S rRNA spacer sequence. *Microbiology and Immunology*. Vol. 43 (2), Pages 127-132.

Harasawa, R., Hotzel, H., Sachse, K., (2000). Comparison of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among strains of the *Mycoplasma mycoides* cluster, and reassessment of the taxonomic position of *mycoplasma sp. bovine group 7*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 50 (3), Pages 1325-1329.

Harasawa, R., Kanamoto, Y., (1999). Differentiation of two biovars of *Ureaplasma urealyticum* based on the 16S–23S rRNA intergenic spacer region. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 37 (12), Pages 4135-4138.

Harasawa, R., Mizusawa, H., Nozawa, K., Nakagawa, T., Asada, K., Kato, I., (1993). Detection and tentative identification of dominant *Mycoplasma* species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Research in Microbiology*. Vol. 144 (6), Pages 289-293.

Harasawa, R., Pitcher, D.G., Ramírez, A.S., Bradbury, J.M., (2004). A putative transposase gene in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans*. *Microbiology*. Vol. 150 (4), Pages 1023-1029.

Harasawa, R., Uemori, T., Asada, K., Kato, I., Shiragami, N., (1992). 'boxA'-like sequence between the 16S/23S spacer in rRNA operon of mycoplasmas. *FEBS Letters*. Vol. 297 (3), Pages 209-211.

Haruna, J., Hanna, P., Hurnik, D., Ikede, B., Miller, L., Yason, C., (2006). The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. *Canadian Journal of Veterinary Research*. Vol. 70 (4), Pages 269-276.

Hartmann, A.D., Hawley, J., Werckenthin, C., Lappin, M.R., Hartmann, K., (2010). Detection of bacterial and viral organisms from the conjunctiva of cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Vol. 12 (10), Pages 775-782.

Hatchel, J.M., Balish, R.S., Duley, M.L., Balish, M.F., (2006) Ultrastructure and gliding motility of *Mycoplasma amphoriforme*, a possible human respiratory pathogen. *Microbiology*. Vol. 152 (7), Pages. 2181-2189.

Henderson, B., Poole, S., Wilson, M., (1996). Bacterial modulins: A novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiological Reviews*. Vol. 60 (2), Pages 316-341.

Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Dickinson, M., (2009). Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of *Phytoplasmas*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 75 (9), Pages 2945-2950.

Hodgins, D.C., Shewen, P.E., Dewey, C.E., (2004). Influence of age and maternal antibodies on antibody responses of neonatal piglets vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*. Vol 12 (1), Pages 10-16.

Hoelzle, K., Engels, M., Kramer, M.M., Wittenbrink, M.M., Dieckmann, S.M., Hoelzle, L.E., (2010). Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa L.*). *Veterinary Microbiology*. Vol. 143 (2-4), Pages. 405-409.

Hoelzle, L.E., Hoelzle, K., Harder, A., Ritzmann, M., Aupperle, H., Schoon, H.A., Heinritzi, K., Wittenbrink, M.M., (2007). First identification and functional characterization of an immunogenic protein in unculturable haemotrophic *Mycoplasmas* (*Mycoplasma suis* HspA1). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Vol. 49 (2), Pages 215-223.

Holyoake, P.K., Callinan, A.P., (2006). How effective is *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in pigs less than three weeks of age? *Journal of Swine Health and Production* 14 (4), Pages 189-195.

Hong, B.X., Jiang, L.F., Hu, Y.S., Fang, D.Y., Guo, H.Y., (2004). Sequence analysis of 23S rRNA gene and its amplification in bacteria discriminative identification. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*. Vol. 24 (3), Pages 241-244.

Höpfel, P., Ludwig, W., Schleifer, K.H., (1988a). Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Research*. Vol. 16 (5), Page 2343.

Höpfel, P., Ulrich, N., Hartmann, R.K., Ludwig, W., Schleifer, K.H., (1988b). Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Thermus thermophilus* HB8. *Nucleic Acids Research*. Vol. 16 (18), Page 9043.

Houpikian, P., Raoult, D., (2001). 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 39 (8), Page 2768.

Hovind-Hougen, K., Friis, N.F., (1991). Morphological and ultrastructural studies of *Mycoplasma flocculare* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. *Research in Veterinary Science*. Vol. 51 (2), Pages 155-163.

Hsu, T., Artiushin, S., Minion, F.C., (1997). Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 179 (4), Pages 1317-1323.

Hsu, T., Minion, F.C., (1998a). Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infection and Immunity*. Vol 66 (10), Pages 4762-4766.

Hsu, T., Minion, F.C., (1998b). Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Gene*. Vol. 214 (1-2) , Pages 13-23.

Huang, S., Li, J.Y., Wu, J., Meng, L., Shou, C.C., (2001). *Mycoplasma* infections and different human carcinomas. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 7 (2), Pages 266-269.

Huang, Y., Stenke, G.W., (1992). Construction of the physical maps of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* and the location of rRNA genes on these maps. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 38 (7), Pages 659-663.

Hunt, D.E., Klepac-Ceraj, V., Acinas, S.G., Gautier, C., Bertilsson, S., Polz, M.F., (2006). Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72 (3), Pages 2221–2225.

Hwang, M.H., Damte, D., Lee, J.S., Gebru, E., Chang, Z.Q., Cheng, H., Jung, B.Y., Rhee, M.H., Park, S.C., (2011). *Mycoplasma hyopneumoniae* induces pro-inflammatory cytokine and nitric oxide production through NFκB and MAPK pathways in RAW264.7 cells. *Veterinary Research Communications*. Vol. 35 (1), Pages. 21-34.

Ibrahim, A., Norlander, L., Macellaro, A., Sjöstedt, A., (1997). Specific detection of *Coxiella burnetii* through partial amplification of 23S rDNA. *European Journal of Epidemiology*. Vol. 13 (3), Pages 329-334.

Inamoto, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Nakai, Y., Ogimoto, K., (1994). Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *The Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 56 (2), Pages 393-394.

Into, T., Okada, K., Inoue, N., Yasuda, M., Shibata, K., (2002). Extracellular ATP regulates cell death of lymphocytes and monocytes induced by membrane-bound lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma salivarium*. *Microbiology and Immunology*. Vol. 46 (10), Pages 667-675.

Jenkins, C., Wilton, J.L., Minion, F.C., Falconer, L., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (2006). Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infection and Immunity*. Vol. 74 (1), Pages 481-487.

Jensen, C.S, Ersboll, A.K, Nielsen, J.P., (2002). A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 54 (3), Pages 265-278.

Jensen, J.S., (2004). *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. Vol. 18 (1), Pages 1-11.

Jensen, P.T., Wolstrup, C., Friis, N.F., (1978). Utilisation of glucose by *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. *Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol. 19 (2), Pages 179-183.

Jensen, T.K., Aalbaek, B., Buttenschon, J., Friis, N.F., Kyrval, J., Ronsholt, L., (1995). *Mycoplasma hyopneumoniae* and *M. hyosynoviae* infection in cases of fibrinous pericarditis in slaughter pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol. 36, Pages 575-577.

Johansson, K.E., Pettersson B., (2002). Taxonomy of *Mollicutes*. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* (edited by Razin and Herrmann). Kluwer Academic, New York, Pages 1-30.

Karamova, A.E., Polyakov, A.V., Komarova, N.V., (2004). Detection of mutant *Mycoplasma hominis* strains resistant to 16-membered macrolide antibiotic josamycin in clinical samples. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. Vol. 137 (5), Pages 483-484.

Keane, F.E., Thomas, B.J., Gilroy, C.B., Renton A., Taylor-Robinson, D., (2000). The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. *International journal of STD & AIDS*. Vol. 11 (6), Pages 356-360.

Kehane, I., Tully, J., (1976). Binding of Plants Lectins to *Mycoplasma* Cells and Membranes. *Journal of Bacteriology*, Vol. 128 (1), Pages 1-7.

Kim, J., Chung, H.K., Chae, C., (2003). Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Veterinary Journal*. Vol. 166 (3), Pages 251-256.

Kirchhoff, H., Rosengarten, R., Lotz, W., (1984). Flask-shaped mycoplasmas: Properties and pathogenicity for man and animals. *Israel Journal of Medical Sciences*. Vol. 20 (9), Pages 848-853.

Kleven, S.H., (1998). *Mycoplasmas* in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry Science*. Vol. 77 (8), Pages 1146-1149.

Kobayashi, H., Nakajima, H., Shimizu, Y., Eguchi, M., Hata, E., Yamamoto, K., (2005). Macrolides and lincomycin susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* and variable mutation of domain II and V in 23S ribosomal RNA. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 67 (8), Pages 795-800.

Kobisch, M., Friis, N.F., (1996) Swine mycoplasmoses. *OIE Revue Scientifique et Technique*. Vol. 15 (4), Pages 1569-1605.

Kobisch, M., Marois, C., (2008). Swine mycoplasmoses. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*. Vol. 161 (2), Pages 179-184.

Kokotovic, B., Friis, N.F., Ahrens, P., (2002a). Characterization of *Mycoplasma hyosynoviae* strains by amplified fragment length polymorphism analysis, pulsed-field gel electrophoresis and 16S ribosomal DNA sequencing. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. Vol. 49 (5), Pages 245-252.

- Kokotovic, B., Friis, N.F., Nielsen, E.O., Ahrens, P.,** (2002b). Genomic diversity among Danish field strains of *Mycoplasma hyosynoviae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 85 (3), Pages 221-231.
- Kong, F., Gilbert, G.L.,** (2004). Postgenomic taxonomy of human ureaplasmas - A case study based on multiple gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 54 (5), Pages 1815-1821.
- Kong, F., James, G., Gordon, S., Zelynski, A., Gilbert, G.L.,** (2001). Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant *Mollicutes* in Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7), Pages 3195-3200.
- Kop, J., Wheaton, V., Gupta, R.,** (1984). Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Bacillus stearothermophilus*. *DNA*. Vol. 3 (5), Pages 347-357.
- Kornspan, J.D., Lysnyansky, I., Kahan, T., Herrmann, R., Rottem, S., Nir-Paz, R.,** (2011). Genome analysis of a *Mycoplasma hyorhinis* strain derived from a primary human melanoma cell line. *Journal of Bacteriology*. Vol. 193 (17), Pages 4543-4544.
- Kornspan, J.D., Tarshis, M., Rottem, S.,** (2010). Invasion of melanoma cells by *Mycoplasma hyorhinis*: Enhancement by protease treatment. *Infection and Immunity*. Vol. 78 (2), Pages 611-617.
- Krause, C., Taylor-Robinson, D.,** (1992). Mycoplasmas which infect humans. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis* (edited by Maniloff, McElhaney, Finch and Baseman). American Society for Microbiology, Washington, D.C. Pages, 417-444.
- Kuhnert, P., Overesch, G., Belloy, L.,** (2011). Genotyping of *Mycoplasma hyopneumoniae* in wild boar lung samples. *Veterinary Microbiology*. Vol. 152 (1-2), Pages 191-195.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J.,** (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 82 (20), Pages 6955-6959.
- Lauritsen, K.T., Hagedorn-Olsen, T., Friis, N.F., Lind, P., Jungersen, G.,** (2008). Absence of strictly age-related resistance to *Mycoplasma hyosynoviae* infection in 6-week-old pigs. *Veterinary Microbiology*. Vol. 130 (3-4), Pages 385-390.
- Lehner, S., Meemken, D., Nathues, H., grosse Beilage, E.,** (2008). Efficacy of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from vaccinated and non-vaccinated sows. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere*. Vol. 36 (6), Pages 399-406.

- Le Roith, T., Hammond, S., Todd, S.M., Ni, Y., Cecere, T., Pelzer, K.D.,** (2011). A modified live PRRSV vaccine and the pathogenic parent strain induce regulatory T cells in pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 140 (3-4), Pages 312-316.
- Lesnoff, M., Laval, G., Bonnet, P., Abdicho, S., Workalemahu, A., Kifle, D., Peyraud, A., Lancelot, R., Thiaucourt, F.,** (2004). Within-herd spread of contagious bovine pleuropneumonia in Ethiopian highlands. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 64 (1), Pages 27-40.
- Lew, A.E., Desmarchelier, P.M.,** (1994). Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 32 (5), Pages 1326-1332.
- Li, Y., Li, P., Wang, X., Yu, Q., Yang, Q.,** (2012). Co-administration of attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 strain with bacterial DNA enhances the local and systemic immune response after intranasal vaccination in pigs. *Vaccine*. Vol. 30 (12), Pages 2153-2158.
- Lillie, K., Palzer, A., Ritzmann, M., Heinritzi, K.,** (2007). Influence of maternal antibodies on efficacy of a one-shot vaccine for *Mycoplasma hyopneumoniae* - 2nd communication. *Praktische Tierarzt*. Vol. 88 (2), Pages 102-109.
- Lillie, K., Ritzmann, M., Erber, M., Heinritzi, K.,** (2006). Study on the effect and tolerance of an inactivated one-shot-vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* at different ages - First communication. *Praktische Tierarzt*. Vol. 87 (7), Pages 548-552.
- Lierz, M., Schmidt, R., Brunnberg, L., Runge, M.,** (2000). Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from free-ranging birds of prey in Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. Vol. 47 (1), Pages. 63-67.
- Lin, J.H., Chen, S.P., Yeh, K.S., Weng, C.N.,** (2006). *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: Diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Veterinary Microbiology*. Vol. 115 (1-3), Pages.111-116.
- Liu, W., Fang, L., Li, S., Li, Q., Zhou, Z., Feng, Z., Luo, R., Shao, G., Wang, L., Chen, H., Xiao, S.,** (2010). Complete genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain HUB-1. *Journal of Bacteriology*. Vol 192 (21), Pages 5844-5845.
- Liu, W., Feng, Z., Fang, L., Zhou, Z., Li, Q., Li, S., Luo, R., Wang, L., Chen, H., Shao, G., Xiao S.,** (2011). Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *Journal of Bacteriology*. Vol. 193 (4), Pages 1016-1017.
- Liu, W., Ren, T., Jiang, B., Gong, M., Shou, C.,** (2007). Mycoplasmal membrane protein p37 promotes malignant changes in mammalian cells. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol 53 (2), Pages 270-276.

Lo, S.C., Hayes, M.M., Tully, J.G., Wang, R.Y., Kotani, H., Pierce, P.F., Rose, D.L., Shih, J.W., (1992). *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 42 (3), Pages 357-364.

Lobo, E., Poveda, C., Suarez, A., Hernández, Y., Ramírez, A., Poveda, J.B., (2011). *Mycoplasmas hyorhinis* in different regions of Cuba. Diagnosis. Brazilian Journal of Microbiology. Vol 42 (2), Pages 721-725.

Lucier, T., Narita, M., Yamada, S., Izumikawa, K., Umetsu, M., Kenri, T., Saaki, Y., Arakawa, Y., (2001). Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 39 (12), Pages 2770-2773.

Ludwig, W., Dorn, S., Springer, N., Kirchhof, G., Schleifer, K.H., (1994). PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 60 (9), Pages 3236-3244.

Ludwig, W., Kirchhof, G., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Betzl, D., Ehrmann, M., Hertel, C., Jilg, S., Tatzel, R., Zitzelsberger, H., Liebl, S., Hochberger, M., Shah, J., Lane, D., Wallnofer, P.R., Scheifer, K.H., (1992). Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G + C content. Systematic and applied Microbiology. Vol. 15 (4), Pages 487-501.

Ludwig, W., Rossello-Mora, R., Aznar, R., Klugbauer, S., Spring, S., Reetz, K., Beimfohr, C., Brockmann, E., Kirchhof, G., Dorn, S., Bachleitner, M., Klugbauer, N., Springer, N., Lane, D., Nietupsky, R., Weizenegger, M., Schleifer, K.H., (1995). Comparative sequence analysis of 23S rRNA for Proteobacteria. Systematic and Applied Microbiology. Vol. 18 (2), Pages 164-188.

Ludwig, W., Schleifer K.H., (2005). Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. Microbial Phylogeny and Evolution, Concepts and Controversies. Oxford University Press, New York, Pages 70–98.

Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiology Reviews. Vol. 15 (2-3), Pages 155-173.

Ludwig, W., Schleifer K.H., Whitman, W.B., (2009). Revised road map to the phylum *Firmicutes*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 3, The *Firmicutes* (edited by De Vos, Garrity, Jones, Krieg, Ludwig, Rainey, Schleifer and Whitman), Springer, New York, Pages 1-13.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K.H., (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis. Vol. 19 (4), Pages 554-568.

- Luttrell, M.P., Stallknecht, D.E., Kleven, S.H., Kavanaugh, D.M., Corn, J.L., Fischer, J.R.,** (2001). *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. *Avian Diseases*. Vol. 45 (2) Pages 321-329.
- Machado, C.X., Pinto, P.M., Zaha, A., Ferreira, H.B.,** (2009). A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H₂O₂ detoxification. *Microbiology*. Vol. 155 (10), Pages 3411-3419.
- Madsen, M.L., Nettleton, D., Thacker, E.L., Edwards, R., Minion, F.C.,** (2006a). Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays. *Infection and Immunity*. Vol. 74 (1), Pages 160-166.
- Madsen, M.L., Nettleton, D., Thacker, E.L., Minion, F.C.,** (2006b). Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during iron depletion using microarrays. *Microbiology*. Vol. 152 (4), Pages 937-944.
- Madsen, M.L., Puttamreddy, S., Thacker, E.L., Carruthers, M.D., Minion, F.C.,** (2007). Transcriptome changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during infection. *Infection and Immunity*. Vol. 76 (2), Pages 658-663.
- Maeda, S., Yoshida, H., Ogura, K., Kanai, F., Shiratori, Y., Omata, M.,** (1998). *Helicobacter pylori* specific nested PCR assay for the detection of 23S rRNA mutation associated with clarithromycin resistance. *Gut*. Vol. 43 (3), Pages 317-321.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Lein, A., Vrijens, B.,** (1998). The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. *Zentralbl. Veterinarmed.* Vol 45, Pages 495-505.
- Maes, D., Segalés, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F.,** (2008) Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology*. Vol. 126 (4), Pages 297-309.
- Makhanon, M., Tummaruk, P., Thongkamkoon, P., Thanawongnuwech, R., Prapasarakul, N.,** (2012). Comparison of detection procedures of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae*, and *Mycoplasma hyorhinis* in lungs, tonsils, and synovial fluid of slaughtered pigs and their distributions in Thailand. *Tropical Animal Health and Production*. Vol. 44 (2), Pages 313-318.
- Manhart, L.E., Dutro, S.M., Holmes, K.K., Stevens, C.E., Critchlow, C.W., Eschenbach, D.A., Totten, P.A.,** (2001). *Mycoplasma genitalium* is associated with mucopurulent cervicitis. *International Journal of STD & AIDS*. Vol. 12 (suppl. 2), Page 69.
- Maniloff, J.** (1992) Phylogeny of mycoplasmas. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis* (edited by Maniloff, McElhaney, Finch and Baseman). American Society for Microbiology, Washington, D.C. Pages. 549-559.

Manso-Silvan, L., Vilei, E.M., Sachse, K., Djordjevic, S.P., Thiaucourt, F., Frey J., (2009). *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 59 (6), Pages 1353-1358.

Marais, A., Monteiro, L., Occhialini, A., Pina, M., Lamouliatte, H., Megraud, F., (1999). Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. Gut. Vol. 44 (4), Pages 463-467.

Maré, C.J., and Switzer, W.P., (1965). New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agent of virus pig. Veterinary Medicine, Small Animal Clinician. Vol. 60, Pages 841-846.

Marois, C., Tocqueville, V., Le Potier, M.F., Hars, J., Kobisch, M., (2006). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in French wild boars. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. Vol. 2.

Marquer, P., (2010). Pig farming in the EU, a changing sector. Eurostat. (www.ec.europa.eu/eurostat)

Mattsson, J.G., Bergström, K., Wallgren, P., Johansson, K., (1995). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 33 (4), Pages 893-897.

McMartin, D.A., MacOwan, K.J., Swift L.L., (1980). A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. The British Veterinary Journal. Vol. 136 (5), Pages 507-515.

Meens, J., Bolotin, V., Frank, R., Bohmer, J., Gerlach, G.F., (2010). Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. Veterinary Microbiology. Vol. 142 (3-4), Pages 293-302.

Meens, J., Selke, M., Gerlach, G.F., (2006). Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. Veterinary Microbiology. Vol. 116 (1-3), Pages 85-95.

Meseguer, M.A , Álvarez, A., Rejas, M.T., Sánchez, C., Pérez-Díaz, J.C., Baquero, F., (2003). *Mycoplasma pneumoniae*: A reduced-genome intracellular bacterial pathogen. Infection, Genetics and Evolution. Vol. 3 (1), Pages 47-55.

Meyling, A., Friis, N.F., (1972). Serological identification of a new porcine *Mycoplasma* species, *M. flocculare*. Acta Veterinaria Scandinavica. Vol. 13 (2), Pages 287-289.

Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D., (2006). Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. Vaccine. Vol. 24 (49-50), Pages 7081-7086.

- Miles, R.J.**, (1992a). Catabolism in *Mollicutes*. Journal of General Microbiology. Vol. 138, Pages 1773- 1783.
- Miles, R.J.**, (1992b). Cell nutrition and growth. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis (edited by Maniloff, McElhaney, Finch and Baseman). American Society for Microbiology, Washington, D.C., Pages 23-40.
- Minion, F.C., Adams, C., Hsu, T.**, (2000). R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. Infection and Immunity. Vol. 68 (5), Pages 3056-3060.
- Minion, F.C., Lefkowitz, J.E., Madsen, M.L., Cleary B.J., Swartzell, S.M., Mahaira G.G.**, (2004). The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. Journal of Bacteriology, Vol. 186 (21), Pages 7123-7133.
- Miflin, J.K., Blackall, P.J.**, (2001). Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. Letters in Applied Microbiology. Vol. 33 (3), Pages 216-221.
- Miyata, M.** (2010). Unique centipede mechanism of *Mycoplasma* gliding. Annual Review of Microbiology. Vol. 64, Pages 519-537.
- Moalic, P.Y., Kempf, I., Gesbert, F., Laigret, F.** (1997). Identification of two pathogenic avian mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum* .International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 47 (1), Pages 171-174.
- Mohammed, H.O., Carpenter, T.E., Yamamoto, R.**, (1987). Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. Avian Diseases. Vol. 31 (3), pages 477-482.
- Moorkamp, L., Hewicker-Trautwein, M., grosse Beilage, E.**, (2009). Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in coughing piglets (3-6 weeks of age) from 50 herds with a history of endemic respiratory disease. Transboundary and Emerging Diseases. Vol. 56 (1-2), Pages 54-56.
- Moreira, D., Amils, R.** (1996). PCR-mediated detection of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus caprinus* using 23S rDNA and 16S/23S intergenic spacer region-targeted oligonucleotide. FEMS Microbiology Letters. Vol. 142 (2-3), Pages 289-293.
- Morita, T., Ohiwa, S., Shimada, A., Kazama, S., Yagihashi, T., Umemura, T.**, (1999). Intranasally inoculated *Mycoplasma hyorhinis* causes eustachitis in pigs. Veterinary Pathology. Vol. 36 (2), Pages 174-178.
- Morita, T., Sasaki, A., Kaji, N., Shimada, A., Kazama, S., Yagihashi, T., Umemura, T.**, (1998). Induction of temporary otitis media in specific-pathogen-free pigs by intratympanic inoculation of *Mycoplasma hyorhinis*. American Journal of Veterinary Research. Vol. 59 (7), Pages 869-873.

Moxon, E.R., Rainey, P.B., Nowak, M.A., Lenski, R.E., (1994). Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology*. Vol. 4 (1), Pages 24-33.

Mrázek, J., (2006). Analysis of distribution indicates diverse functions of simple sequence repeats in *Mycoplasma* genomes. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 23 (7), Pages 1370-1385.

Muneta, Y., Minagawa, Y., Shimoji, Y., Nagata, R., Markham, P.F., Browning, G.F., Mori, Y., (2006). IL-18 expression in pigs following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. Vol. 26 (9), Pages 637-644.

Muneta, Y., Minagawa, Y., Shimoji, Y., Ogawa, Y., Hikono, H., Mori, Y., (2008). Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 70 (10), Pages 1065-1070.

Muneta, Y., Uenishi, H., Kikuma, R., Yoshihara, K., Shimoji, Y., Yamamoto, R., Hamashima, N., Yokomizo, Y., Mori, Y., (2003). Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. Vol. 23 (10), Pages 583-590.

Murray, R.G., (1984a). Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 15. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 34, Pages 355-357.

Murray, R.G., (1984b). The higher taxa, or, a place for everything...? . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1 (edited by Krieg and Holt). Williams & Wilkins, Baltimore. Pages 31-34.

Nathues, H., grosse Beilage, E., Kreienbrock, L., Rosengarten, R., Spergser, J., (2011). RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Veterinary Microbiology*. Vol. 152 (3-4), Pages 338-345.

Nathues, H., Woeste, H., Doehring, S., Fahrion, A.S., Doherr, M.G., grosse Beilage, E., (2012). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Nasal Swabs Sampled from Pig Farmers. *Proceedings of the IOM 19th Congress*. Toulouse, France.

Neimark, H.C., (1979). Phylogenetic relationships between mycoplasmas and other prokaryotes. *The Mycoplasmas*. Vol. 1 (edited by Barile and Razin). Academic Press, New York, Pages 43-61.

Nicholas, R., Ayling, R.D., (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*. Vol. 74 (2), Pages 105-112.

Nicholas, R., Churchward, C., (2012). Contagious Caprine Pleuropneumonia: new aspects of an old disease. *Transboundary and Emerging Diseases*. Vol. 59 (3), Pages 189-196.

- Nielsen, E.O., Lauritsen, K.T., Friis, N.F., Enøe, C., Hagedorn-Olsen, T., Jungersen, G.,** (2005). Use of a novel serum ELISA method and the tonsil-carrier state for evaluation of *Mycoplasma hyosynoviae* distributions in pig herds with or without clinical arthritis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 111 (1-2), Pages 41-50.
- Nielsen, E.O., Nielsen, N.C., Friis, N.F.,** (2001). *Mycoplasma hyosynoviae* Arthritis in Grower-Finisher Pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A: PPCM*. Vol. 48 (8), Pages 475-486.
- Nocard, E.I., Roux E.,** (1896). Le microbe of the Péripleumonie. *Annales de l'Institut Pasteur*. Vol. 12, Pages 204-262.
- Noller, H.F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R.R., Kopylov, A.M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D.A., Gupta, R., Woese, C.R.,** (1981) Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. Vol. 9 (22), Pages 6167-6189.
- Nowak, J.** (1929). Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la péripleumonie des bovidés. *Annales de l'Institut Pasteur*. Vol 43, Pages 1330-1352.
- O'Connor, R.J., Turner, K.S., Sander, J.E., Kleven, S.H., Brown, T.P., Gómez Jr., L., Cline, J.L.,** (1999). Pathogenic effects on domestic poultry of a *Mycoplasma gallisepticum* strain isolated from a wild house finch. *Avian Diseases*. Vol. 43, (4), Pages 640-648.
- Okazaki, N., Narita, M., Yamada, S., Izumikawa, K., Umetsu, M., Kenri, T., Sasaki, Y., Arakawa, Y., Sasaki, T.,** (2001). Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 39 (12), Pages 2770-2773.
- Opriessnig, T., Halbur, P.G., Yu, S., Thacker, E.L., Fenaux, M., Meng, X.J.,** (2006). Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Veterinary Record*. Vol. 158 (5), Pages 149-154.
- Opriessnig, T., Meng, X.-J., Halbur, P.,** (2007). Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol. 19 (6), Pages 591-615.
- Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J.,** (2010). Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Veterinary Microbiology* 145 (3-4), Pages 198-208.
- Pace, N.R., Olsen, G.J., Woese, C.R.,** (1986). Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*, Vol. 45 (3), Pages 325-326.
- Paillard, D., Dubois, V., Duran, R., Nathier, F., Guittet, C., Caumette, P., Quentin, C.,** (2003). Rapid Identification of *Listeria* Species by using restriction fragment length

polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA Gene Fragments. Applied and Environmental Microbiology 69 (11), Pages 6386-6392.

Palzer, A., Ritzmann, M., Wolf, G., Heinritzi, K., (2008). Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. Veterinary Record. Vol. 162 (9), pages 267-271.

Paz-Sánchez, Y., (2011). Estudio Etiopatogénico del Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas en una explotación de Gran Canaria: Efecto sobre los parámetros productivos. Tesina de Grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Pei, A., Nossa, C.W., Chokshi, P., Blaser, M.J., Yang, L., Rosmarin, D.M., Pei, Z., (2009). Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. Public Library of Science One. Vol 4 (5), e-Page 5437.

Pereyre S., Gonzalez P., de Barbeyrac B., Darnige A., Renaudin H., Charron A., Raherison S., Bébéar C., Bébéar C.M., (2002). Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 46 (10), Pages 3142-3150.

Pérez Luz, S., Rodríguez-Valera, F., Lan, R., Reeves, P.R., (1998). Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. Journal of Bacteriology. Vol. 180 (8), Pages 2144-2151.

Pettersson, B., Johansson, K.-E., Uhlen, M., (1994). Sequence analysis of 16S rRNA from mycoplasmas by direct solid-phase DNA sequencing. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 60 (7), Pages 2456-2461.

Pettersson, B., Tully, J.G., Bölske, G., Johansson, K.E., (2001). Re-evaluation of the classical *Mycoplasma lipophilum* cluster (Weisburg et al. 1989) and description of two new clusters in the hominis group based on 16S rDNA sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 51 (2), Pages 633-643.

Peuchant, O., Ménard, A., Renaudin, H., Morozumi, M., Ubukata, K., Bébéar, C.M., Pereyre, S., (2009). Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 64 (1), Pages 52-58.

Pfützner, H., Sachse, K., (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. OIE Revue Scientifique et Technique. Vol. 15 (4), Pages 1477-1494.

Pilo, P., Frey, J., Vilei, E.M., (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC. Veterinary Journal. Vol. 174 (3), Pages 513-521.

Pointon, A.M., Byrt, D., Heap, P., (1985). Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Australian Veterinary Journal*. Vol. 62 (1), Pages 13-18.

Potgieter, L.N., Ross, R.F., (1972). Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* in lesions of experimentally infected swine by immunofluorescence. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 33 (1), Pages 99-105.

Poveda, C., Whittington P.A., Antunes, N., Suárez-Pérez, A., Ramírez A.S., Rosales, R., Tavío, M.M., Poveda J.B., (2008). Isolation of *Mycoplasma spp.* from Kelp gull (*Larus dominicanus vetula*) in South Africa. Proceedings of the 17th IOM congress, Tianjin, China.

Poveda, J.B., (1998). Biochemical Characteristics in *Mycoplasma* identification. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 104: Mycoplasma Protocols, (edited by Miles and Nicholas), Human Press Inc. Pages 69-78.

Poveda J.B., Carranza J, Miranda A, Garrido A, Hermoso M, Fernandez A, Domenech J., (1990). An epizootiological study of avian mycoplasmas in southern Spain. *Avian Pathology*. Vol. 19 (4), Pages 627-633.

Poveda J.B., Nicholas, R., (1998). Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition test. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 104: Mycoplasma Protocols, (edited by Miles and Nicholas), Human Press Inc. Pages 105-111.

Poveda, J.B., Ramírez A.S., de la Fe, C., Assunção, P., Díaz-Bertrana, L., (2002). Mycoplasmas. *Manual de Microbiología*. (editado por Vadillo, Píriz, Mateos). McGraw-Hill. Pages 423-430.

Powers, J.M., Johnson, M.D., (2012). Mycoplasmal panencephalitis: a neuropathologic documentation. *Acta Neuropathologica*. Vol. 124 (1), Pages 143-148.

Ramírez, A.S., (1999). Desarrollo de dos medios de cultivo para la replicación de microorganismos de la clase *Mollicutes*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Ramírez, A.S., Dare, C., Yavari, C.A., Bradbury, J.M., (2012). A diagnostic polymerase chain reaction for *Mycoplasma iowae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Avian Pathology*. Vol. 41 (3), Pages 317-322.

Ramírez, A.S., Fleitas, J.L., Rosales, R.S., Poveda, C., de la Fe, C., Andrada, M., Castro, A., Poveda, J.B., (2008a) A semi-defined medium without serum for small ruminant mycoplasmas. *Veterinary Journal*. Vol. 178 (1) , Pages. 149-152.

Ramírez, A.S., Naylor, C.J., Hammond, P.P. & Bradbury, J.M., (2006). Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Veterinary Microbiology*. Vol. 118 (1-2), Pages 76-82.

Ramírez, A.S., Naylor, C.J., Pitcher, D.G., Bradbury, J.M., (2007). High inter-species and low intra-species variation in 16S-23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology*. Vol. 128 (3-4), Pages 279-287.

Ramírez, A.S., Naylor, C.J., Yavari, C.A., Dare, C.M., Bradbury, J.M., (2011). Analysis of the 16S to 23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma synoviae* field strains. *Avian Pathology*. Vol. 40 (1), Pages 79-86.

Ramírez, A.S., Rosas, A., Hernández-Beriain, J.A., Orengo, J.C., Saavedra, P., de la Fe, C., Fernández, A., Poveda, J.B., (2005). Relationship between rheumatoid arthritis and *Mycoplasma pneumoniae*: A case-control study. *Rheumatology*. Vol. 44 (7), Pages 912-914.

Ramírez, A.S., Sachse, K., Hotzel, H., Bradbury, J.M., (2008b). Analysis of the 23S rDNA of avian mycoplasmas. Proceedings of the 17th IOM congress, Tianjin, China.

Ramsay, M., Iivanainen, M., (1974). Neurological symptoms and signs in *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Duodecim*. Vol. 90 (8), Pages 607-612.

Rapp-Gabrielson, V.J., Hoover, T., Sornsen, S., Kesl, L., Taylor, L., Jolie, R., Runnels, P., Weigel, D., Yu, S., Opriessnig, T., Ruebling-Jass, K., Strait, E., Halbur, P.G., (2008). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in pigs co-infected with *M. hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Journal of Swine Health and Production*. Vol. 16 (1), Pages 16-26.

Raviv, Z., Callison, S., Ferguson-Noel, N., Laibinis, V., Wooten, R., Kleven, S.H., (2007). The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Diseases*. Vol. 51 (2), Pages 555-560.

Razin, S., (1974). Correlation of cholesterol to phospholipid content in membranes of growing mycoplasmas. *FEBS Letters*. Vol. 47 (1), Pages 81-84.

Razin, S. (1991). The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*, and *Asteroleplasma*. *The prokaryotes*. Vol. 2, (2nd ed). Springer-Verlag, New York, N.Y. Pages 1937-1959.

Razin, S., (1992). Mycoplasmas taxonomy and ecology. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis* (edited by Maniloff, McElhaney, Finch and Baseman). American Society for Microbiology, Washington, D.C., Pages 3-22.

Razin, S. (1995). Molecular properties of Mollicutes: A synopsis. *Molecular and Diagnostic Procedures in mycoplasmology* (edited by Razin and Tully). Academic Press. London, UK. Vol. 1, Pages 1-25.

Razin, S., Freundt E.A., (1984). The *Mollicutes*, *Mycoplasmatales*, and *Mycoplasmataceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1 (edited by Krieg and Holt). Williams & Wilkins, Baltimore, Pages 740-742.

- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y.,** (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 62 (4), Pages 1094-1156.
- Robinson, L.B., Wichelhausen, R.H., Roizman, B.,** (1956). Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. *Science*. Vol. 124 (32), Pages 1147-1148.
- Rocha, E.P., Blanchard, A.,** (2002). Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. *Nucleic Acids Research*. Vol. 30 (9), Pages 2031–2042.
- Roller, C., Ludwig, W., Schleifer, K.H.,** (1992). Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *Journal of General Microbiology*, Vol. 138 (6), Pages 1167-1175.
- Rose, D.L., Tully, J.G., Wittler, R.G.,** (1979). Taxonomy of some swine *Mycoplasmas*: *Mycoplasma suis* pneumoniae Goodwin et al. 1965, a later, objective synonym of *Mycoplasma hyopneumoniae* Mare and Switzer 1965, and the status of *Mycoplasma flocculare* Meyling and Friis 1972. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 29 (2), Pages 83-91.
- Ross, R.F.,** (1973). Pathogenicity of swine mycoplasmas. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 225, Pages 347-368
- Ross, R. F.,** (1992). Mycoplasmal disease. *Diseases of Swine*, Pages 535–549. (edited by Straw). Ames, IA: Iowa State University Press.
- Ross, R. F.,** (1999). Mycoplasmal diseases. *Diseases of swine*. (edited by Straw, D'allaire, Mengeling, Taylor) 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, Pages 537-551.
- Ross, R.F., Duncan, J.R.,** (1970). *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis of swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 157 (11), Pages 1515-1518.
- Ross, R.F., Karmon, J.A.,** (1970). Heterogeneity among strains of *Mycoplasma granularum* and identification of *Mycoplasma hyosynoviae*, sp.n. *Journal of Bacteriology*. Vol. 103 (3), Pages 707-713.
- Ross, R.F., Switzer, W.P., Duncan, J.R.,** (1971). Experimental production of *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in swine. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 32 (11), Pages 1743-1749.
- Ross, R.F., Weiss, R., Kirchhoff, H.,** (1977). Demonstration of *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* in arthritic joints of swine. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*. Vol. 24 (9), Pages 741-745.
- Ross, R.F., Whittlestone, P.,** (1983). Recovery of, identification of and serological response to porcine mycoplasmas. *Methods in Mycoplasmaology*. (edited by Tully and Razin). Academic Press. New York, Vol. 2, Pages 115-127.

Rottem, S., (2003) Interaction of *Mycoplasmas* with host cells. *Physiological Reviews*. Vol. 83 (2), Pages 417-432.

Rottem, S., Kahane, I., (1993) *Mycoplasma* cell membranes. *Subcellular Biochemistry*. Vol. 20 (1), Page 314.

Schalock, P.C., Dinulos, J.G., Pace, N., Schwarzenberger, K., Wenger, J.K., (2006). Erythema multiforme due to *Mycoplasma pneumoniae* infection in two children. *Pediatric Dermatology*. Vol. 23 (6), Pages 546-555.

Schmidt, J.A., Browning, G.F., Markham, P.F., (2004). *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. *Journal of Bacteriology*. Vol. 186 (17), Pages 5790-5798.

Schmidt, J.A., Browning, G.F., Markham, P.F., (2007). *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *Journal of Bacteriology*. Vol 189 (9), Pages 3414-3424.

Segalés, J., Valero, O., Espinal, A., López-Soria, S., Nofrarías, M., Calsamiglia, M., Sibila, M., (2011). Exploratory study on the influence of climatological parameters on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection dynamics. *International Journal of Biometeorology*. (Springer-Link: 10.1007/s00484-011-0487-5).

Seymour, L.M., Deutscher, A.T., Jenkins, C., Kuit, T.A., Falconer, L., Minion, F.C., Crossett, B., Padula, M., Dixon, N.E., Djordjevic, S.P., Walker, M.J., (2010). A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 285 (44), Pages 33971-33978.

Seymour, L.M., Falconer, L., Deutscher, A.T., Minion, F.C., Padula, M.P., Dixon, N.E., Djordjevic, S.P., Walker, M.J., (2011). Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 286 (12), Pages 10097-10104.

Seymour, L.M., Jenkins, C., Deutscher, A.T., Raymond, B.B.A., Padula, M.P., Tacchi, J.L., Bogema, D.R., Eamens, G.J., Woolley, L.K., Dixon, N.E., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (2012). Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cellular Microbiology*. Vol. 14 (1), Pages 81-94.

Shahram, M., Nicholas, R., Wood, A.P., Kelly, D.P., (2010). Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* Large Colony type to *Mycoplasma mycoides subspecies capri*. *Systematic and applied Microbiology*. Vol. 33 (1), Pages 20-24.

Shaver, Y.J., Nagpal, M.L., Fox, K.F., Rudner, R., Fox, A., (2001). Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Bacillus subtilis* 168 isolates. *Molecular Microbiology*. Vol. 42 (1), Pages 101-109.

- Shin, J.H., Joo, H.S., Lee, W.H., Seok, H.B., Calsamig, M., Pijoan, C., Molitor, T.W.,** (2003). Identification and characterization of cytopathogenic *Mycoplasma hyorhinis* from swine farms with a history of abortions. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 65 (4), Pages 501-509.
- Sibila, M., Bernal, R., Torrents, D., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M., Segalés, J.,** (2008). Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Veterinary Microbiology*. Vol. 127 (1-2), Pages 165-170.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, Á., Jensen, J.C.,** (2004). Dynamics on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Canadian Journal of Veterinary Research*. Vol. 68 (1), Pages 12-18.
- Sibila, M., Fort, M., Nofrariás, M., Pérez de Rozas, A., Galindo-Cardiel, I., Mateu, E., Segalés, J.,** (2012). Simultaneous porcine *Circovirus* Type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 147 (2-3), Pages 285-295.
- Sibila, M., Mentaberre, G., Boadella, M., Huerta, E., Casas-Díaz, E., Vicente, J., Gortázar, C., Marco, I., Lavín, S., Segalés, J.,** (2010). Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar. *Veterinary Microbiology* 144 (1-2), Pages 214-218.
- Sibila, M., Nofrariás, M., López-Soria, S., Segalés, J., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M.,** (2007a). Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Veterinary Microbiology*. Vol. 121 (3-4), Pages 352-356.
- Sibila, M., Nofrariás, M., López-Soria, S., Segalés, J., Valero, O., Espinal, A., Calsamiglia, M.,** (2007b). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Veterinary Microbiology*. Vol. 122 (1-2), Pages 97-107.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J.,** (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Veterinary Journal*. Vol. 181 (3), Pages 221-231.
- Sigmund, C.D., Morgan, E.A.,** (1982). Erythromycin resistance due to a mutation in a ribosomal RNA operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 79 (18), Pages 5602-5606.
- Sippel, K.H., Robbins, A.H., Reutzel, R., Boehlein, S.K., Namiki, K., Goodison, S., Agbandje-McKenna, M., Rosser, C.J., McKenna, R.,** (2009). Structural insights into the extracytoplasmic thiamine-binding lipoprotein p37 of *Mycoplasma hyorhinis*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 191 (8), Pages 2585-2592.

Siugzdaite, J., Garlaite, K., Siugzda, R., (2005). Active immunization against enzootic pneumonia in pig farm with poor housing and environmental conditions. *Medycyna Weterynaryjna*. Vol. 61 (1), Pages.42-45.

Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B.C., (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 (8), Pages 2988-2993.

Smith, S.C., Pommier, P., Keita, A., Pagot, E., Thevasagayam, S.J., Salt, J.S., Peters, A.R., (2003). Efficacy of Stellamune® one, a single dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine, administered in pigs at one week of age under field. *Tierärztliche Umschau*. Vol. 58 (6), Pages 316-324.

Spergser, J., Langer, S., Muck, S., Macher, K., Szostak, M., Rosengarten, R., Busse, H.J., (2011). *Mycoplasma mucosicanis* sp. nov., isolated from the mucosa of dogs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 61 (4), Pages 716-721.

Spergser, J., Rosengarten, R., (2007). Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. *Veterinary Microbiology*. Vol. 125 (1-2), Pages170-174.

Splettstoesser, W.D., Seibold, E., Zeman, E., Trebesius, K., Podbielski, A., (2010). Rapid differentiation of *Francisella* species and subspecies by fluorescent in situ hybridization targeting the 23S rRNA. *BioMed Central Microbiology*. Vol. 10, art. n°. 72.

Stackebrandt, E., Woese, C.R., (1984).The phylogeny of prokaryotes. *Microbiological Sciences*. Vol. 1 (5), Pages 117-122.

Stakenborg, T., Vicca, J., Butaye, P., Maes, D., Minion, F.C., Peeters, J., De Kruif, A., Haesebrouck, F., (2005). Characterization of in vivo acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microbial Drug Resistance*. Vol. 11 (3), Pages 290-294.

Stärk, K.D., Nicolet, J., Frey, J., (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64 (2), Pages 543-548.

Stärk, K.D., (2000). Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine - A Literature Review. *Veterinary Journal*. Vol. 159 (1), Pages 37-56.

Stemke, G.W., Huang, Y., Laigret, F., Bove, J.M., (1994). Cloning the ribosomal RNA operons of *Mycoplasma flocculare* and comparison with those of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology*. Vol. 140 (4), Pages 857-860.

Stemke, G.W., Laigret, F., Grau, O., Bove, J.M., (1992). Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 42 (2), Pages 220-225.

Stemke, G.W., McIntyre, D.J., Roy, K.L., (1985). Guanine-plus-cytosine compositions of and deoxyribonucleic acid hybridization comparisons between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 35 (4), Pages 527-529.

Stemke, G.W., Robertson, J.A., (1990). The growth response of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*, based upon ATP-dependent luminometry. Vet. Microbiol. Vol. 24 (2), Pages 135-142.

Stipkovits, L., Kempf, I., (1996). Mycoplasmoses in poultry. OIE Revue Scientifique et Technique. Vol. 15 (4), Pages 1495-1525.

Strait, E.L., Rapp-Gabrielson, V.J., Erickson, B.Z., Evans, R.B., Taylor, L.P., Yonkers, T.K., Keich, R.L., Jolie, R., Thacker, E.L. (2008) Efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin in pigs challenged with two contemporary pathogenic isolates of *M. hyopneumoniae*. Journal of Swine Health and Production. Vol. 16 (4), Pages 200-206.

Strasser, M., Abiven, P., Kobisch, M., Nicolet, J., (1992). Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 31 (1-2) , Pages 141-153.

Strauss, C., Palzer, A., Heinritzi, K., Ritzmann, M., (2007). Influence of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on the protection of piglets through vaccination. Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere-Nutztiere. Vol. 35 (4), Pages 283-288.

Suárez-Pérez, A., Ramírez A.S., Rosales R.S., Calabuig P., Poveda C., Rossello´-Móra R., Nicholas R., Poveda J.B. (2012) *Mycoplasma neophronis* sp. Nov., isolated from upper respiratory tract of Canarian Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus majorensis*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 62 (6), Pages 1321-1325.

Sung, H., Kang, S.H., Bae, Y.J., Hong, J.T., Chung, Y.B., Lee, C.K., Song, S., (2006). PCR-based detection of *Mycoplasma* species. Journal of Microbiology. Vol. 44 (1), Pages 42-49.

Tae, J.K., Jae, I.L., (2006). The 23S rRNA gene PCR-RFLP used for characterization of porcine intestinal *Spirochete* isolates. Journal of Veterinary Science. Vol. 7 (3), Pages 277-280.

Tajima, M., and Yagihashi, T., (1982). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infection and Immunity*. Vol. 37 (3), Pages 1162-1169.

Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Matsushita, S., Kobayashi, H., Yamamoto, K., (2004). Polymerase chain reaction with a primer pair in the 16S-23S rRNA spacer region for detection of *Mycoplasma pulmonis* in clinical isolates. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 27 (2), Pages 117-128.

Takaiwa, F., Sugiura, M., (1982). The complete nucleotide sequence of a 23-S rRNA gene from tobacco chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 124 (1), Pages 13-19.

Taschke, C., Klinkert, M.Q., Wolters, J., Herrmann, R., (1986). Organization of the ribosomal RNA genes in *Mycoplasma hyopneumoniae*: The 5S rRNA gene is separated from the 16S and 23S rRNA genes. *Molecular and General Genetics*. Vol. 205 (3), Pages 428-433.

Taschke, C., Ruland, K., Herrmann, R., (1987). Nucleotide sequence of the 16S rRNA of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Nucleic Acids Research*. Vol. 15 (9), Page 3918.

Taylor-Robinson, D., Breddt, W., (1983). Motility of *Mycoplasma* strain G37. *Yale Journal of Biology and Medicine*. Vol. (56), Page 910.

Thacker, B.J., Thacker, E.L., Halbur, P., Minion, C., Young, T., Erickson, B., Thanawonguwech, R., (2000). The influence of maternally-derived antibodies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. In: Proc 16th IPVS congress, Melbourne, Australia.

Thacker, E.L. (2001) Immunology of the porcine respiratory disease complex. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. Vol. 17 (3), Pages 551-565.

Thacker, E.L., (2006) Mycoplasmal diseases. *Diseases of Swine*. 9th edn. (Edited by Straw, Zimmerman, D'Allaire, Taylor). Blackwell Publishing, Pages 701-717.

Thacker, E.L., Thacker, B.J., Janke, B.H., (2001) Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 39 (7), Pages 2525-2530.

Thacker, E.L., Thacker, B.J., Wolff, T., (2004). Efficacy of a chlortetracycline feed additive in reducing pneumonia and clinical signs induced by experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge. *Journal of Swine Health Production*. Vol. 14 (3), Pages 140-144.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L., (2003). Interleukin-10, interleukin-12, and interferon- γ levels in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunology*. Vol. 16 (3), Pages 357-367.

Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P., Thacker, E.L., (2004). Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 11 (5), Pages 901-908.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. Vol. 22 (22), Pages 4673-4680.

Tola, S., Angioi, A., Rocchigiani, A.M., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Leori, G., (1997). Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*. Vol 54 (1), Pages 17-22.

Toschka, H.Y., Höpfl, P., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Ulbrich, N., Erdmann, V.A., (1987). Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research*. Vol. 15 (17), Page 7182.

Trebesius, K., Harmsen, D., Rakin, A., Schmelz, J., Heesemann, J., (1998). Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 36 (9), Pages 2557-2564.

Tully, J.G., (1988). International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*, Minutes of the Interim Meeting, 25 and 28 August 1986, Birmingham, Alabama. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 38, Pages 226-230.

Tully, J.G., (1993a). Current status of the mollicute flora of humans. *Clinical Infectious Disease*. Vol. 17 (Suppl 1); Pages 2-9.

Tully, J.G., (1993b). International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, minutes of the interim meetings, 1 and 2 August, 1992. Ames, Iowa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 43 (2), Pages 394-397.

Tully, J.G., Bové J.M., Laigret F., Whitcomb, R.F., (1993). Revised taxonomy of the class *Mollicutes* – proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 43 (2), Pages 378-385.

Uphoff, C.C., Drexler, H.G., (2002a) Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*. Vol. 38 (2), Pages 86-89.

Uphoff, C.C., Drexler, H.G., (2002b) Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *Cellular & Developmental Biology Animal*. Vol. 38 (2), Pages 79-85.

Uphoff, C.C., Drexler, H.G., (2011). Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol. 731, Pages 105-114.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P., Kersters, K., Swings, J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. Vol. 60 (2), Pages 407-438.

Van Kuppeveld, F.J., Van der Logt, J.T., Angulo, A.F., Van Zoest, M.J., Quint, W.G., Niesters, H.G., Galama, J.M., Melchers, W.J., (1992). Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58 (8), Pages 2606-2615.

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., Assunção, 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., de Mattos Cascardo, J.C., Castro, L.A., Cavalcanti, G., Chemale, G., Collevatti, R.G., Cunha, C.W., Dallagiovanna, B., Dambrós, B.P., Dellagostin, O.A., Falcão, C., Fantinatti-Garboggini, F., Felipe, M.S., Fiorentin, L., Franco, G.R., Freitas, N.S., Frías, D., Grangeiro, T.B., Grisard, E.C., Guimarães, 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., Nicolás, M.F., Oliveira, S.C., Paixão, 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., and Zaha, A., (2005). Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 187 (16), Pages. 5568-5577.

Veenhuizen, M.F., (1998). Three bacterial pathogens in the porcine respiratory disease complex. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. Vol.20, Pages 11-21.

Vengust, G., Valencak, Z., Bidovec, A., (2006). A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. Vol. 53 (1), Pages 24-27.

Verma, A., Rattan, A., Tyagi, J.S. (1994). Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the detection of mycobacteria. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 31 (4), Pages 288-294.

- Vicca, J.**, (2005). Virulence and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs. Tesis Doctoral. Faculty of Veterinary Medicine. Ghent University.
- Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., Haesebrouck, F.**, (2004). In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 48 (11), Pages 4470-4472.
- Villareal, I.**, (2010). Epidemiology of *M. hyopneumoniae* infections and effect of control measures. Tesis Doctoral. Faculty of Veterinary Medicine. Ghent University.
- Villarreal, I., Maes, D., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F.**, (2011a). Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. Vaccine. Vol. 29 (9), Pages 1731-1735.
- Villarreal, I., Meyns, T., Dewulf, J., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Maes, D.**, (2011b). The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. Veterinary Journal. Vol. 188 (1), Pages 48-52.
- Volokhov, D.V., George, J., Liu, S.X., Ikononi, P., Anderson, C., Chizhikov, V.**, (2006). Sequencing of the intergenic 16S–23S rRNA spacer (ITS) region of *Mollicutes* species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 71 (5), Pages 680-698.
- Volokhov, D.V., Norris, T., Rios, C., Davidson, M.K., Messick, J.B., Gulland, F.M., Chizhikov, V.E.**, (2011). Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). Veterinary Microbiology 149 (1-2), Pages 262-268.
- Vranckx, K., Maes, D., Calus, D., Villarreal, I., Pasmans, F., Haesebrouck, F.**, (2011). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. Journal of Clinical Microbiology 49 (5), Pages 2020-2023.
- Vranckx, K., Maes, D., Marchioro, S.B., Villarreal, I., Chiers, K., Pasmans, F., Haesebrouck, F.**, (2012). Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. BioMed Central Veterinary Research. Vol. 8, art. n° 24.
- Waites, K.B., Rudd, P.T., Crouse, D.T., Canupp, K.C., Nelson, K.G., Ramsey C., Cassell, G.H.**, (1988). Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections of central nervous system in preterm infants. Lancet. Vol. 1, Pages 17–21.
- Waites, K.B., Talkington D.**, (2005). New developments in human disease due to mycoplasmas. Mycoplasmas: Molecular Biology, Pathogenicity, and Strategies for Control (edited by Blanchard and Browning). Horizon Bioscience, Norfolk, UK, Pages 289–354.

Watanabe, T., Shibata, K.I., Yoshikawa, T., Dong, L., Hasebe, A., Domon, H., Kobayashi, T., Totsuka, Y., (1998). Detection of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* in synovial fluids of temporomandibular joints of patients with disorders in the joints. FEMS Immunology and Medical Microbiology. Vol. 22 (3), Pages 241-246.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. Vol. 173 (2), Pages 697-703.

Weisburg, W.G., Tully, J.G, Rose, D., Petzel, J., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T., Van Etten J., (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. Journal of Bacteriology. Vol. 171, (12), Pages 6455-6467.

Weislander, A., Boyer, M.J., Wróblewsky, H., (1992) Membrane protein structure. Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis (edited by Maniloff, McElhaney, Finch and Baseman). American Society for Microbiology, Washington, D.C., Pages 93-112.

Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., Goesmann, A., Lundeberg, J., Johansson, K.E., Pettersson, B., Uhlén, M., (2004). The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Genome Research. Vol. 14 (2), Pages 221-227.

Wilton, J.L., Jenkins, C., Cordwell, S.J., Falconer, L., Minion, F.C., Oneal, D.C., Djordjevic, M.A., Connoly, A., Barchia, I., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (2009). Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniade*. Molecular Microbiology. Vol. 71 (3), Pages 566-582.

Wilton, J.L., Scarman, A.L., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., (1998). Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Microbiology. Vol. 144 (7), Pages 1931-1942.

Woese, C.R., (1987). Bacterial Evolution. Microbiological Reviews. Vol. 51 (2), Pages 221-271.

Woese, C.R., Fox, G.E., (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Evolution. Vol. 74 (11), Pages 5088-5090.

Woese, C.R., Maniloff J., Zablen, L.B., (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America. Vol. 77 (1), Pages 494-498.

Wu, C., Wu, H., Ning, Y., Wang, J., Du, X., Shen, J., (2005). Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. Vol. 247 (2), Pages 199-205.

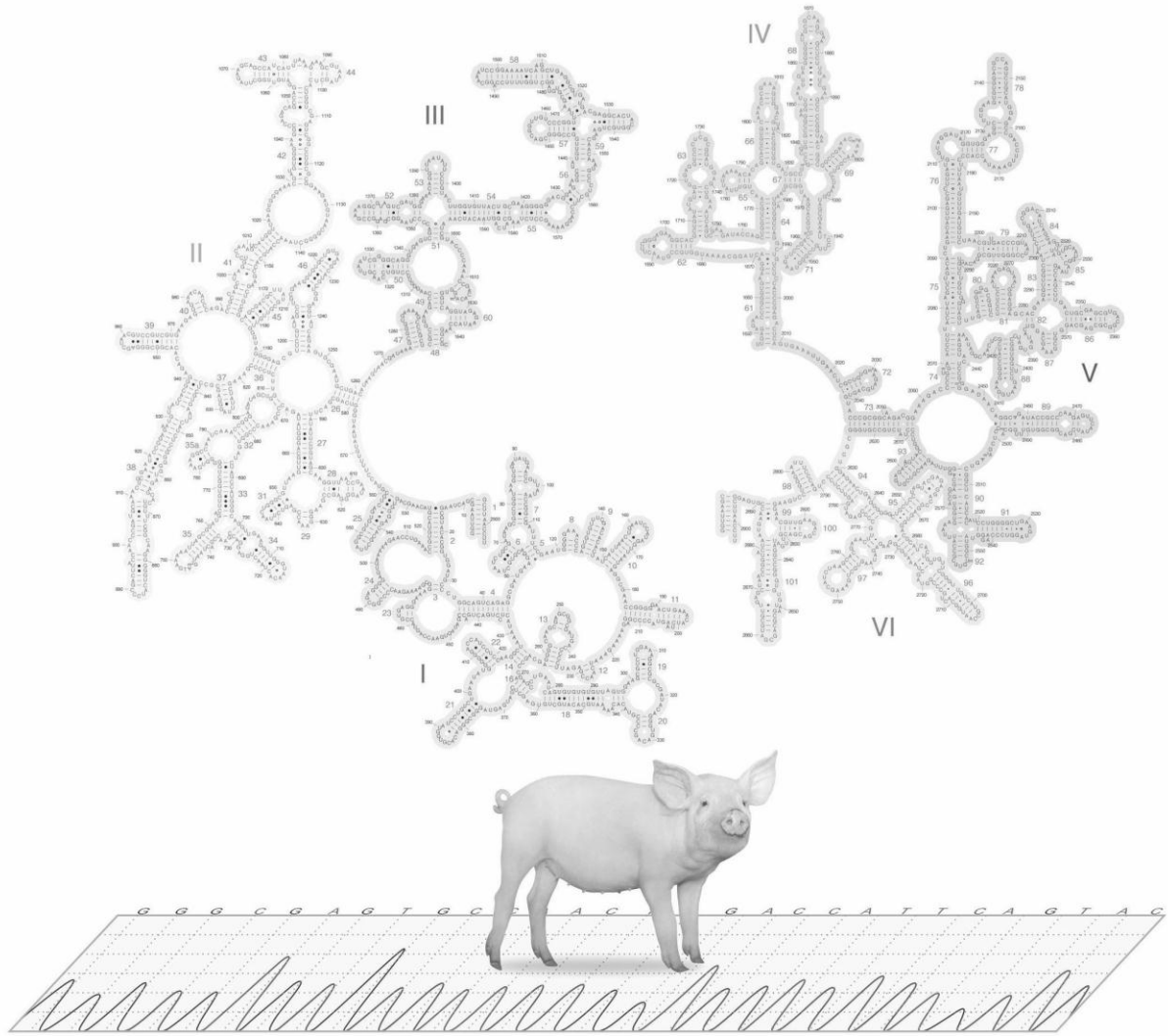
- Xin, D.L., Mi, Z.H., Han, X., Qin, L., Li, J., Liu, X.J., Ma, S.J., Hou, A.C., Li, G.,** (2008). Application of nested PCR and sequencing technique to detect point mutations of the 23S rRNA gene of *Mycoplasma pneumoniae*. Chinese journal of pediatrics. Vol. 46 (7), Pages 522-525.
- Yang, H., Qu, L., Ma, H., Chen, L., Liu, W., Liu, C., Meng, L., Wu, J., Shou, C.,** (2010). *Mycoplasma hyorhinis* infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. BMC Gastroenterology. Vol 10, art. n°. 132.
- Yavari, C., Ramírez, A.S., Dare, C.M., Bradbury, J.M.,** (2007). Differentiation of strains of *Mycoplasma gallisepticum*. Proceedings of the 15th World Veterinary Poultry Association Congress, Beijing, China.
- You, X.X., Zeng, Y.H., Wu, Y.M.,** (2006). Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. Journal of Zhejiang University. Science. B. Vol. 7 (5), Pages 342-350.
- Zhang, J., Wang, Y., Shou, C., Xu, G., Chen, X., Wu, J., Xie, Y., Li, J., So, S., Jiafu, J.,** (2002). Detection of *Mycoplasma hyorhinis* in gastric cancer using bio-chip technology. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. Vol. 82 (14), Pages 961-965.
- Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F.,** (1994). Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. Infection and Immunity. Vol. 62 (10), Pages 4367-4373.
- Zhang, Q., Young, T.F., Ross, R.F.,** (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion. Infection and Immunity. Vol. 63 (3), Pages 1013-1019.
- Zhang, Y., Li, S., Dai, B.,** (1993). Amplified 23S rRNA gene of 52 strains of *Leptospira* and detection of leptospiral DNA in 55 patients by PCR. Journal of West China University of Medical Sciences. Vol. 24 (3), Pages 262-267.
- Zhao, S.W., Sun, B.C., Lang, J.T., Qiu, J., He, J., Qiang, B., Wang, H.Q., Ying, X.J., Ye, Q., Sun, A.H.,** (2006). Detection of mycoplasma infection in human laryngeal carcinoma. Academic Journal of Second Military Medical University. Vol. 27 (8), Pages 817-819.
- Zielinski, G.C., Ross, R.F.,** (1990). Effect of growth in cell cultures and strain on virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* for swine. American Journal of Veterinary Research. Vol. 51 (3), Pages 344-348.
- Zielinski G.C., and Ross, R.F.,** (1992). Morphologic features and hydrophobicity of the cell surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. American Journal of Veterinary Research. Vol. 53 (7), Pages 1119-1124.

ENTIDADES COLABORADORAS

Queremos agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación económica a través del proyecto AGL2006-13743 y la concesión de la ayuda BES2007-17119, sin las cuales no habría sido posible desarrollar el trabajo que aquí presentamos.

Así mismo, es de obligado cumplimiento para nosotros, expresar nuestro agradecimiento a los Veterinarios Oficiales del Matadero Insular de Gran Canaria, por concedernos la posibilidad de tomar muestras a partir de los pulmones porcinos sacrificados en dicha instalación. De igual modo, queremos agradecer a otros compañeros del sector veterinario que han remitido muestras desde diferentes puntos de la geografía nacional.

Finalmente, queremos dar reconocimiento a la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria y al Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria por el uso de sus instalaciones y la excelente labor de su personal técnico.



Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria