

Desarrollo de herramientas de tipificación y diagnóstico aplicadas al estudio de *Mycoplasma hyorhinis* y evaluación de un modelo experimental de neumonía en lechones



Rubén Sebastián Rosales Santana

2013

Tesis doctoral



Agradecimientos

Como diría Ismael Serrano, *hoy es siempre todavía, toda la vida es ahora, porque ayer no lo hicimos, porque mañana es tarde...* y ahora, después del largo camino recorrido hasta poder llegar a este punto, hay muchas personas que de alguna forma u otra han jugado un papel importante en el desarrollo de esta tesis y que por lo tanto me gustaría agradecer especialmente:

A mi director, el Dr. José B. Poveda Guerrero, por concederme desde el primer momento y con el entusiasmo que le caracteriza la oportunidad de empezar, desarrollar y continuar mi carrera investigadora en ciencias veterinarias.

A mi codirectora, la Dra. Ana Sofía Ramírez Corbera, que a pesar de todas las idas y venidas, dificultades y momentos difíciles que el desarrollo de esta tesis ha presentado siempre me ha demostrado su apoyo, optimismo y amistad, actuando como un faro, un punto de referencia constante durante todo el camino sin el que probablemente no hubiera podido llegar a buen puerto.

I would like to express my gratitude to my co-supervisor Dr. Robin A.J. Nicholas for giving me the opportunity to develop my career in the UK, “adopting” me from the first moment I arrived and for making me feel like home during my British experience. His personality and positive outlook on science and life will always be linked to his success and I will always feel privileged for the knowledge and experience acquired during the time spent working with him.

Special thanks to Dr. Roger Ayling for his constant understanding, support, encouragement and advice during all these years which facilitated the completion of this thesis.

Agradecimientos

I would also like to thank Colin Churchward, “Churchy”, for guiding me during my first steps in the lab at AHVLA, Miroslav Hlůšek for all his help and to all the colleagues in the Mycoplasma group for all their assistance provided along the way.

A Pfizer por proporcionar el soporte económico para gran parte del trabajo experimental realizado en esta tesis.

A la Dra. Rosario Gonçalves, “Rosarinho”, mi madre portuguesa, por su amistad y apoyo que empezó en esos duros primeros meses que pasamos juntos al inicio de mi aventura inglesa y que hemos seguido manteniendo hasta la fecha.

A los Dres. Patricia Assunção y Nuno Antunes, por su ayuda durante mis primeros pasos dentro del laboratorio en Gran Canaria, al Dr. Carlos Poveda por los tiempos compartidos en el laboratorio y su ayuda en la distancia y a todos los miembros del laboratorio de epidemiología que de alguna forma me ayudaron durante el inicio de esta tesis.

A mi amigo el Dr. Alejandro Suárez, por todos esos buenos ratos, recuerdos, experiencias y risas inolvidables que durante todos estos años me han servido para sobrellevar muchos momentos duros y altibajos dentro y fuera del laboratorio.

A Alessandra por aguantarme y entenderme durante la última fase de esta tesis, por que siempre ha sido capaz de darme todo sin importarle nada para ayudarme y para que esta tesis llegara a su fin y por contagiarme siempre de su positividad, alegría y energía única.

Y por último a mis padres por su constante apoyo y amor, por ayudarme a ser quien soy y por creer en mí en todo momento. A mis hermanos y a toda mi familia, por que a pesar de la distancia siempre me han hecho sentir su presencia y amor, sin el que sin duda nada de lo que he conseguido hasta la fecha hubiera sido posible.

Índice

Índice

ÍNDICE	III
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS.....	XXI
CAPÍTULO 1	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
1.2.1. Introducción a la clase <i>Mollicutes</i> con énfasis en el género <i>Mycoplasma</i>	8
1.2.1.1. Taxonomía y filogenia	9
1.2.1.2. Estructura celular y cápsula.	13
1.2.1.3. Membrana celular y estructura antigénica.....	14
1.2.1.3.1. Proteínas variables de superficie (Vsps)	15
1.2.1.3.2. Lesiones.....	25
1.2.1.3.1.1. Lesiones macroscópicas	25
1.2.1.3.1.2. Lesiones microscópicas	27
1.2.1.3.1.3. Lesiones microscópicas	27
1.2.1.3.1.4. Diagnóstico.....	27
1.2.1.3.1.4.1. Cultivo y aislamiento.....	27
1.2.1.3.1.4.2. Diagnóstico serológico	28
1.2.2. Micoplasmosis en ganado porcino.....	18
1.2.2.1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	18
1.2.2.1.1. Características generales	19
1.2.2.1.1.1. Principales proteínas antigénicas y predominantes	19
1.2.2.1.2. Epidemiología.....	22
1.2.2.1.3. Presentación clínica	24
1.2.2.1.3.1. Lesiones.....	25
1.2.2.1.3.1.1. Lesiones macroscópicas	25
1.2.2.1.3.1.2. Lesiones microscópicas	27
1.2.2.1.3.1.3. Lesiones microscópicas	27
1.2.2.1.3.1.4. Diagnóstico.....	27
1.2.2.1.3.1.4.1. Cultivo y aislamiento.....	27
1.2.2.1.3.1.4.2. Diagnóstico serológico	28

1.2.2.1.4.3. Valoración de lesiones macroscópicas y diagnóstico histopatológico.....	29
1.2.2.1.4.4. Diagnóstico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
1.2.2.1.5. Profilaxis, control y erradicación	33
1.2.2.2. <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	35
1.2.2.2.1. Características generales	35
1.2.2.2.1.1. Mecanismos de variación antigénica.....	36
1.2.2.2.2. Epidemiología	37
1.2.2.2.3. Presentación clínica	40
1.2.2.2.3.1. Infecciones experimentales	41
1.2.2.2.4. Diagnóstico	43
1.2.2.2.4.1. Cultivo y aislamiento.....	43
1.2.2.2.4.2. Diagnóstico serológico.....	44
1.2.2.2.4.3. Diagnóstico por PCR.....	44
1.2.2.2.4.4. Diagnóstico por técnicas inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia indirecta e hibridación <i>in situ</i>	46
1.2.2.2.5. Profilaxis y control	46
1.2.2.3. <i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	48
1.2.2.4. <i>Mycoplasma suis</i>	51
1.2.2.5. <i>Mycoplasma flocculare</i>	53
1.2.2.6. <i>Mycoplasma hyopharyngis</i>	54
1.2.3. Técnicas de tipificación molecular aplicadas al estudio de micoplasmas.....	55
1.2.3.1. Introducción a la tipificación bacteriana	55
1.2.3.2. Principales técnicas de tipificación bacteriana aplicadas al estudio de micoplasmas... 58	
1.2.3.2.1. Métodos basados en el tamaño de las bandas de ADN obtenidas tras digestión enzimática o amplificación.	60
1.2.3.2.1.1. Métodos basados en el análisis de bandas obtenidas por la técnica de la PCR.	61
1.2.3.2.1.1.1. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.....	61
1.2.3.2.1.1.2. Análisis de repeticiones en tándem de número variable.	63

1.2.3.2.1.2. Métodos basados en el análisis de bandas obtenidas tras digestión enzimática.	64
1.2.3.2.1.2.1. Electroforesis en gel de campo pulsado.	64
1.2.3.2.1.2.2. Análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados de ADN.	67
1.2.3.2.1.2.3. Análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción tras PCR.	68
1.2.3.2.2. Métodos basados en análisis de secuencias de ADN.	69
1.2.3.2.2.1. Análisis de secuencias de genes sencillos.	69
1.2.3.2.2.2. Tipificación multilocus de secuencias.	70
1.2.3.2.3. Métodos basados en la hibridación de sondas de oligonucleótidos marcadas.	71
CAPÍTULO 2	73
2.1. INTRODUCCIÓN.	75
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	76
2.2.1. Aislados	76
2.2.2. Western blotting	76
2.2.2.1. Obtención y cuantificación de antígenos.	76
2.2.2.2. Preparación de geles, muestras y SDS PAGE.	77
2.2.2.3. Western blotting	78
2.2.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	80
2.2.4. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)	82
2.2.4.1. Cultivo de las cepas y obtención de las células.	82
2.2.4.2. Preparación de los dados de agarosa	83
2.2.4.3. Lisis celular y digestión proteica	84
2.2.4.4. Digestión enzimática	85
2.2.4.5. Preparación de geles, electroforesis y tinción	86
2.2.4.6. Análisis de perfiles de bandas	87

2.2.5. Southern blotting – IS1221	87
2.2.5.1. Extracción y cuantificación de ADN	87
2.2.5.2. Diseño de oligonucleótidos y producción de sonda marcada	88
2.2.5.3. Restricción enzimática y Southern blotting	89
2.2.5.4. Análisis de perfiles de bandas.....	90
2.2.6. Variable Number Tandem Repeat (VNTR)	90
2.2.6.1. Selección de regiones repetitivas y diseño de oligonucleótidos	90
2.2.6.2. Diseño de oligonucleótidos.....	91
2.2.6.3. Reacciones de PCR, electroforesis y análisis de datos.....	93
2.2.7. Análisis estadístico.....	95
2.3. RESULTADOS.....	96
2.3.1. Western blotting.....	96
2.3.2. RAPD	101
2.3.3. PFGE.....	106
2.3.4. Southern blotting – IS1221	110
2.3.4.1. Producción y evaluación de sonda marcada.....	110
2.3.4.2. Análisis de perfiles de bandas de hibridación.....	111
2.3.5. VNTR	115
2.3.6. Análisis estadístico.....	117
2.4. DISCUSIÓN	119
CAPÍTULO 2 – ANEXOS.....	129
ANEXO 2.1. AISLADOS CARACTERIZADOS Y PERFILES ASIGNADOS POR TÉCNICA DE TIPIFICACIÓN	131
ANEXO 2.2. MEDIO DE FRIIS PARA EL AISLAMIENTO DE MICOPLASMA PORCINOS	133

ANEXO 2.3. REACTIVOS DE WESTERN BLOTTING	135
ANEXO 2.4. BÚFER DE ELECTROFORESIS PARA GELES DE AGAROSA	138
ANEXO 2.5. REACTIVOS PARA PFGE	139
ANEXO 2.6. SOUTHERN BLOTTING. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE GRANDES VOLÚMENES BASADA EN LA TÉCNICA DE FENOL/CLOROFORMO.	140
ANEXO 2.7. PROTOCOLO DE SOUTHERN BLOTTING.	143
CAPÍTULO 3	149
3.1. INTRODUCCIÓN.....	151
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	152
3.2.1. Animales y diseño experimental	152
3.2.2. Aislados, preparación de la dosis infectiva, inoculación experimental y patrón de toma de muestras	153
3.2.3. Estudio de la patología macroscópica e histológica pulmonar	155
3.2.4. Análisis de hisopos nasales y tejido pulmonar mediante cultivo y PCR/DGGE.....	157
3.2.5. Análisis de muestras serológicas.....	158
3.3. RESULTADOS	159
3.3.1. Evaluación clínica	159
3.3.2. Estudio de la patología macroscópica e histológica pulmonar	161
3.3.3. Análisis de hisopos nasales y tejido pulmonar mediante cultivo y PCR/DGGE.....	166
3.3.4. Análisis de muestras serológicas.....	168
3.4. DISCUSIÓN	174
CAPÍTULO 3 – ANEXOS	185
ANEXO 3.1. DISTRIBUCIÓN DETALLADA DE EVENTOS DE TOS POR ANIMAL Y DÍA.....	187
CHAPTER 4	193

4.1. INTRODUCTION.....	195
4.2. MATERIAL AND METHODS.....	197
4.2.1. <i>Mycoplasma hyorhinis</i> indirect ELISA	197
4.2.1.1. General chemicals, reagents and equipment	197
4.2.1.2. Antigen preparation.....	199
4.2.1.3. Antigen chequerboard and conjugate selection.....	200
4.2.1.4. Test procedure.....	202
4.2.1.5. Sample selection.....	203
4.2.1.6. Estimation of the predictive ability of the ELISA test	204
4.2.1.7. Kappa-statistic measure of inter-rater agreement (strength of agreement)	206
4.2.2. <i>Mycoplasma hyorhinis</i> qPCR.....	207
4.2.2.1. Primer design.....	207
4.2.2.2. Primer concentration evaluation.....	208
4.2.2.3. Limit of detection, efficiency and dynamic range estimation	210
4.2.2.3.1. Plasmid control preparation	210
4.2.2.3.2. Limit of detection, efficiency and dynamic range estimation reactions.....	216
4.2.2.4. Evaluation of clinical and research DNA samples	217
4.3. RESULTS	221
4.3.1. ELISA development.....	221
4.3.1.1. Antigen and conjugate selection	221
4.3.1.2. Estimation of the predictive ability of the ELISA test	222
4.3.1.3. Cross reactivity	224
4.3.1.4. Kappa-statistic measure of inter-rater agreement (strength of agreement)	224
4.3.2. <i>Mycoplasma hyorhinis</i> qPCR development	226
4.3.2.1. Primer design.....	226
4.3.2.2. Primer concentration evaluation.....	227
4.3.2.3. Limit of detection, efficiency and dynamic range estimation	227

4.3.2.4. Evaluation of clinical and research DNA samples	229
4.4. DISCUSSION.....	229
CHAPTER 4 – APPENDICES	237
APPENDIX 4.1. CLONING REAGENTS	239
APPENDIX 4.2. QPCR RESULTS	242
5. CONCLUSIONES	251
6. RESUMEN	259
7. SUMMARY.....	265
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	269

Índice de tablas y figuras

Índice de tablas

Tabla 1.1.	Principales características de la clase <i>Mollicutes</i>	Pág. 10
Tabla 1.2.	Principales micoplasmas porcinos.....	Pág. 18
Tabla 1.3.	Sistema de puntuación de lesiones macroscópicas pulmonares en cerdos.....	Pág. 30
Tabla 1.4.	Principales técnicas de tipificación molecular empleadas en microbiología.....	Pág. 59
Tabla 1.5.	Uso de PFGE para la tipificación de las principales especies patógenas de micoplasmas.....	Pág. 66
Tabla 2.1.	Volumen de reactivos usados para la preparación de geles de acrilamida.....	Pág. 77
Tabla 2.2.	Volúmenes de reactivos empleados por reacción de RAPD.....	Pág. 81
Tabla 2.3.	Características de los oligonucleótidos seleccionados para el análisis	Pág. 92

	de VNTR.....	
Tabla 2.4.	Volúmenes de reactivos empleados por reacción de VNTR.....	Pág. 93
Tabla 2.5.	Clasificación de los aislados analizados por la técnica de Western blot basada en la diferencias observadas en la región variable de 40 a 46 kDa.....	Pág. 98
Tabla 2.6.	Distribución de aislados por tipo de RAPD.....	Pág. 103
Tabla 2.7.	Distribución de pulsotipos por origen geográfico.....	Pág. 108
Tabla 2.8.	Distribución de aislados por grupos de Southern blot. El valor entre paréntesis indica el número de cepas por el total del respectivo origen.....	Pág. 113
Tabla 2.9.	Distribución de VTs por origen.....	Pág. 116
Tabla 2.10.	IDS e IC de cada una de las técnicas de tipificación evaluadas.....	Pág. 118
Tabla 2.11.	Análisis de los niveles de significación entre IDS (IC) de las diferentes	Pág. 118

técnicas analizadas

Tabla 2.12.	Resultados del análisis de asociación entre técnicas de tipificación basado en el coeficiente ajustado de Wallace.....	Pág. 119
Tabla 3.1.	Puntuación de lesiones pulmonares macroscópicas basada en el sistema de valoración de lesiones pulmonares compatibles con neumonía enzoótica descrito por Goodwin y Whittlestone (1973).....	Pág. 163
Tabla 3.2.	Resultados de la valoración semicuantitativa de lesiones pulmonares en preparaciones histológicas (Livingston <i>et al.</i> , 1972).....	Pág. 164
Tabla 3.3.	Resultados del análisis de hisopos nasales y tejido pulmonar por PCR/DGGE. ^a Positivo por PCR/DGGE frente a <i>M. hyorhinis</i> ^b Positivo por PCR/DGGE frente a <i>M. hyopneumoniae</i>	Pág. 167
Tabla 3.4.	Resultados del ELISA de bloqueo IDEIA™ <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> . Las muestras sospechosas se encuentran resaltadas en amarillo. Las muestras positivas se encuentran resaltadas en rojo.....	Pág. 171

Table 4.1.	Plate layout – antigen dilutions.....	Pág. 200
Table 4.2.	Plate layout – positive and negative serum distribution.....	Pág. 200
Table 4.3.	Plate layout – distributions of different conjugate dilutions.....	Pág. 201
Table 4.4.	Interpretation of Kappa-statistic measure of inter-rater agreement values.....	Pág. 207
Table 4.5.	<i>M. hyorhinis</i> qPCR primer characteristics.....	Pág. 208
Table 4.6.	Field samples analysed by <i>M. hyorhinis rpoB</i> qPCR.....	Pág. 218
Table 4.7.	PCR/DGGE results from nasal swabs and lung tissue obtained after experimental infection. ^a Positive by PCR/DGGE against <i>M. hyorhinis</i> ^b Positive by PCR/DGGE against <i>M. hyopneumoniae</i>	Pág. 219
Table 4.8.	Research samples analysed by <i>M. hyorhinis rpoB</i> qPCR.....	Pág. 220
Table 4.9.	Common <i>Mycoplasma</i> species reference strains and porcine bacterial isolates used in <i>M. hyorhinis</i> qPCR specificity testing. ^a	Pág. 221

NCTC reference strain, ^b Courtesy of Jon Rogers (AHVLA Bury St. Edmunds, UK)

Table 4.10.	Positive cut-off points and relative specificity and sensitivity.....	Pág. 223
Table 4.11.	Contingency table comparing Western Blotting and iELISA positive and negative results.....	Pág. 223
Table 4.12.	Agreement calculation between two different operators.....	Pág. 224
Table 4.13.	Agreement calculation between iELISA repeats.....	Pág. 225
Table 4.14.	Antigen batch variation agreement calculation between two repeats - sample set B (samples 1 to 90).....	Pág. 225
Table 4.15.	Antigen batch variation agreement calculation between two repeats - sample set B (samples 91 to 180).....	Pág. 225

Índice de figuras

Figura 1.1.	Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S de micoplasmas (Brown, 2010).....	Pág. 12
Figura 1.2.	Imagen representativa de un pulmón porcino con lesiones macroscópicas típicas de NEP.....	Pág. 26
Figura 2.1.	Tipos de Western blotting y distribución por origen.....	Pág. 97
Figura 2.2.	Membrana inmunomarcada representando al gel de SDS PAGE número 1.....	Pág. 99
Figura 2.3.	Membrana inmunomarcada representando al gel de SDS PAGE número 2.....	Pág. 100
Figura 2.4.	Membrana inmunomarcada representando al gel de SDS PAGE número 3.....	Pág. 101
Figura 2.5.	Dendrograma generado con BioNumerics v4.5 tras analizar los perfiles de bandas obtenidos con RAPD.....	Pág. 104

Figura 2.6.	Análisis de reproducibilidad: Geles de agarosa representando dos diferentes reacciones de RAPD usando el mismo ADN de referencia. Obsérvese la diferencia en la región comprendida entre las 300 y 1000 kb de peso molecular.....	Pág. 105
Figura 2.7.	Distribución de pulsotipos por origen geográfico.....	Pág. 109
Figura 2.8.	Evaluación de sondas marcadas.....	Pág. 110
Figura 2.9.	Imagen representativa de una membrana de nylon revelada tras la hibridación con la sonda marcada para la detección de la secuencia IS1221. Cada banda corresponde a una cepa de <i>M. hyorhinis</i>	Pág. 111
Figura 2.10.	Dendrograma obtenido tras el análisis de perfiles de bandas de Southern blotting.....	Pág. 114
Figura 2.11.	MST representando las relaciones filogenéticas entre tipos de VNTR (VT) obtenidas tras el análisis de VNTR.....	Pág. 115
Figura 3.1.	Distribución de eventos de tos por grupo experimental de animales..	Pág. 160

Figura 3.2. Evolución de la ganancia promedio de peso por grupo..... Pág. 161

Figura 3.3. Animal 113b (grupo *M. hyorhinis* 67p07). A) Visión dorsal del pulmón. Obsérvese la distribución de lesiones típicas de consolidación compatibles con NEP localizadas en los lóbulos apical, cardíaco y borde craneal del lóbulo diafragmático. B) Detalle de las lesiones microscópicas observadas tras la tinción con hematoxilina/eosina (20 aumentos). Se observa un folículo linfoide atravesando la capa muscular de la mucosa y la obliteración de la luz del bronquiolo debido a la presencia de gran cantidad de células antiinflamatorias. También se puede observar la presencia de células inflamatorias y restos celulares en la luz de los bronquiolos..... Pág. 165

Figura 3.4. Resultados del Western Blotting producido tras el análisis de las muestras serológicas obtenidas en los días 0, 7, 14, 21 y 28 PI de los grupos infectados con *M. hyorhinis* Rmr 16 (A) y 67p07 (B)..... Pág. 169

Figura 3.5. Resultados del Western Blotting producido tras el análisis de las muestras serológicas obtenidas en los días 0, 7, 14, 21 y 28 PI de los

Pág. 170

grupos infectados con *M. hyorhinis* 80p04 (A), *M. hyopneumoniae*
RVC (B) y grupo control negativo

Figura 3.6.	Representación gráfica de los resultado del ELISA de bloqueo IDEIA™ <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> en los grupos infectados con <i>M.</i> <i>hyorhinis</i>	Pág. 172
Figura 3.7.	Representación gráfica de los resultado del ELISA de bloqueo IDEIA™ <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> en los grupos infectados con <i>M.</i> <i>hyopneumoniae</i> y control negativo.....	Pág. 173
Figure 4.1.	Sensitivity and specificity formulas.....	Pág. 203
Figure 4.2.	Negative and positive predictive value formulas.....	Pág. 203
Figure 4.3.	PPV and NPV formulas corrected to account for the effect of prevalence.....	Pág. 206
Figure 4.4.	Kappa-statistic measure of inter-rater agreement formula.....	Pág. 206
Figure 4.5.	P(A) and P(E) values formulas.....	Pág. 207

Figure 4.6.	Copy number calculation formula.....	Pág. 216
Figure 4.7.	<i>M. hyorhinis</i> iELISA chequerboard plate. Positive serum added in columns 1, 3, 5, 7, 9, 11. Negative serum added in columns 2, 4, 6, 8, 10, 12.....	Pág. 222
Figure 4.8.	Forward and reverse primer alignment.....	Pág. 226
Figure 4.9.	Differences in amplification efficiency associated to the use of different primer concentrations.....	Pág. 227
Figure 4.10.	Standard curve for <i>M. hyorhinis rpoB</i> qPCR.....	Pág. 228
Figure 4.11.	Dynamic range for <i>M. hyorhinis rpoB</i> qPCR. Red dots represent multiple standards for each dilution.....	Pág. 228

Abreviaturas/Abbreviations

Abreviaturas

AFLP	Análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados de ADN
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
Cq	Ciclo de cuantificación
CRP	Complejo respiratorio porcino
Da	Dalton
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DPI	Días post infección
DTM	Destete temprano medicado
g	Gramo
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
KCl	Cloruro potásico
kDa	Kilodalton
l	Litro
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	Minutos
mA	Miliamperio
mAb	Anticuerpo monoclonal
ml	Mililitro
MLST	Tipificación multilocus de secuencias
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MST	Árbol recubridor mínimo
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NCTC	National Collection of Type Cultures
NEP	Neumonía Enzootica Porcina
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar

Abbreviations

-	Amplified fragment length polymorphism
DNA	Desoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
-	Quantification cycle
PRDC	Porcine respiratory disease complex
-	-
-	Deoxyribonucleotide triphosphate
-	Days post infection
MEW	Medicated Early Weaning
-	Gram
-	Hours
-	Hydrochloric acid
ISH	<i>In situ</i> hybridization
IHC	Immunohistochemistry
-	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
-	-
-	Potassium chloride
-	-
-	Litre
-	-
-	-
-	Minutes
-	Milliamps
-	Monoclonal antibody
-	Millilitre
-	Multilocus sequence typing
-	Millimetre
-	Millimolar
-	Minimum spanning tree
-	Sodium chloride
-	Sodium hydroxide
-	-
PEN	Porcine enzootic pneumonia
-	Nanogram
-	Nanometre
-	-

Abreviaturas/Abbreviations

pb	Pares de bases	bp	Base pairs
PBS	Búfer fosfato salino	-	Phosphate buffer saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	-	Polymerase chain reaction
PCR-RFLP	Análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción tras PCR	-	polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado	-	Pulsed field gel electrophoresis
PI	Post infección	-	Post infection
PRRSv	Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino	-	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real	-	Quantitative real time PCR
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico	-	Random amplified polymorphic DNA
rpm	Revoluciones por minuto	-	Revolutions per minute
s	Segundos	-	Seconds
SB	Southern blotting	-	-
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio	-	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIV	Virus de la influenza porcina	-	Swine influenza virus
SOC	Caldo súper óptimo con represión catabólica	-	Super optimal broth with catabolite repression
TBE	Tris-borato-EDTA	-	Tris-borate-EDTA
TD-TF	Sistema todo dentro-todo fuera	AIAO	All-in, all-out system
U	Unidades	-	Units
UCC	Unidades Cambiadoras de Color	CCU	Color-changing units
µg	Microgramo	-	Microgram
µl	Microlitro	-	microlitre
µm	Micrómetro	-	Micrometre
V	Voltios	-	Volts
VNTR	Análisis de repeticiones en tándem de número variable	-	Variable number tandem repeat
VT	Tipo de VNTR	-	VNTR type
WB	Western blotting	-	-

Legend: - No variation in English language

Capítulo 1

Introducción y revisión bibliográfica

1.1. Introducción

La neumonía enzoótica porcina (NEP) destaca como una de las principales enfermedades que afectan al ganado porcino. Presenta una distribución global, evidenciando una alta morbilidad y una limitada mortalidad asociada principalmente a combinaciones con diferentes patógenos porcinos involucrados generalmente en el complejo respiratorio porcino (CRP). Debido a estas características, el principal interés por esta enfermedad reside en la gran repercusión económica en la industria porcina, causando pérdidas millonarias a productores de este sector. *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* ha sido considerado como el principal agente etiológico de esta enfermedad, aunque múltiples evidencias, tanto desde el punto de vista epidemiológico como patológico, hacen pensar que *M. hyorhinis* juega un papel significativo en la neumonía enzoótica porcina y en el CRP.

M. hyorhinis es un microorganismo comensal del aparato respiratorio superior del cerdo normalmente asociado con cuadros de artritis, otitis, pericarditis y poliserositis (Ross, 1999). Además es considerado como un patógeno secundario en casos de neumonía en cerdos sin que su papel como agente etiológico primario en cuadros respiratorios esté completamente aceptado en la comunidad veterinaria. Desde el punto de vista experimental diferentes estudios han demostrado la capacidad de *M. hyorhinis* para producir cuadros de enfermedad respiratoria en lechones (Goiš *et al.*, 1968a; Lin *et al.*, 2006). Estos estudios han sido capaces de evidenciar cómo existe una alta variabilidad en la capacidad de diferentes cepas de campo para producir enfermedad clínica y lesiones micro y macroscópicas, lo que puede explicar cómo el papel de

este microorganismo miembro de la flora bacteriana normal presente en el epitelio respiratorio porcino puede variar desde comensal hasta agente etiológico primario.

A pesar de estos datos experimentales, no ha sido hasta hace poco, cuando a través de análisis epidemiológicos basados en estudios comparativos de animales clínicamente enfermos con cuadros respiratorios frente a animales sanos (Palzer *et al.*, 2008) y en el análisis de muestras del aparato respiratorio obtenidas en matadero (Hansen *et al.*, 2010) cuando se ha empezado a valorar el papel de este microorganismo en cuadros de enfermedad respiratoria porcina. Gracias a estos estudios se ha observado cómo *M. hyorhinis* juega un papel importante en cuadros de enfermedad respiratoria porcina, presentando asociaciones positivas con otros agentes etiológicos pertenecientes al CRP tanto en cuadros de enfermedad clínica como en lesiones pulmonares observadas en matadero, lo que da indicios de una potencial relación sinérgica entre *M. hyorhinis* y otros importantes patógenos porcinos.

Desde el punto de vista diagnóstico, el estudio de las enfermedades causadas por micoplasmas incluye una gran variedad de técnicas, siendo el cultivo, y las técnicas enfocadas a la detección de anticuerpos específicos, como el ELISA y Western blotting y los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los métodos de elección por excelencia (Miles y Nicholas, 1998). En lo que respecta a *M. hyorhinis*, el diagnóstico molecular se basa únicamente en protocolos de PCR de tipo convencional combinados con detección de ADN amplificado en geles de agarosa (Caron *et al.*, 2000a) o de poliacrilamida con gradiente de urea en lo que se denomina PCR/DGGE (McAuliffe *et al.*, 2005). Estas técnicas, aunque empleadas de forma extensiva tanto de forma experimental como en el diagnóstico de muestras clínicas hasta la

fecha, presentan ciertas desventajas en comparación con otras técnicas de desarrollo más recientes, siendo el principal ejemplo la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), la cual presenta numerosas ventajas en comparación con la PCR convencional entre las que destacan la capacidad de procesar numerosas muestras de forma simultánea, un incremento en sensibilidad y especificidad, rapidez y capacidad de cuantificación de ADN específico en muestras clínicas o en cultivos (Higuchi *et al.*, 1993).

Al igual que en el caso del diagnóstico molecular, y a pesar de su importante rol como herramienta diagnóstica aplicada al estudio de la respuesta inmune de tipo humoral en cuadros clínicos de tipo infeccioso, hasta el momento no se ha desarrollado ningún test de diagnóstico serológico aplicado al estudio de anticuerpos frente a *M. hyorhinis*. Contrariamente, en lo que respecta a otras enfermedades causadas por micoplasmas, tanto en humanos como en otros animales, las técnicas serológicas representan una herramienta indispensable en el estudio de la respuesta inmune. Diversas técnicas serológicas han sido empleadas hasta la fecha para el estudio de micoplasmas, siendo las más comunes el ELISA (Bruggmann *et al.*, 1977), gracias a su capacidad de analizar múltiples muestras de forma simultánea y facilidad de realización, y el Western blotting, empleado normalmente como técnica serológica de confirmación debido a su mayor sensibilidad y especificidad (Kenny y Cartwright, 1984; Young y Ross, 1987). Otras técnicas serológicas que se emplean comúnmente en el campo de la micoplasmología incluyen la fijación del complemento y la aglutinación por látex (McKean *et al.*, 1979) entre otras.

Una rama de la microbiología que ha demostrado una gran utilidad para el estudio de las poblaciones bacterianas es la tipificación genética. Esta vertiente de la microbiología tradicional

ha sido empleada extensivamente en el estudio de la epidemiología molecular de microorganismos, y actualmente representa una herramienta esencial en el campo de la salud pública y de la sanidad animal (Van Belkum *et al.*, 2001) ayudando a trazar el origen y dispersión de agentes causantes de brotes de infección y sirviendo a su vez de apoyo en la toma de decisiones destinadas al control y prevención de enfermedades.

La tipificación genética se ha aplicado de forma generalizada en el estudio de micoplasmas. Las técnicas aplicadas hasta la fecha de forma satisfactoria para la caracterización de microorganismos de la clase *Mollicutes* incluyen la electroforesis en gel de campo pulsado o PFGE (Ladefoged y Christiansen, 1992), amplificación aleatoria de ADN polimórfico o RAPD (Geary *et al.*, 1994), análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados o AFLP (Kokotovic *et al.*, 1999), análisis de secuencias de inserción por Southern blotting (Cheng *et al.*, 1995), análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Cousin-Allery *et al.*, 2000; Dorigo-Zetsma *et al.*, 2000), secuenciación y análisis de fragmentos de PCR (Lorenzon *et al.*, 2002), análisis de repeticiones en tándem de número variable o VNTR (McAuliffe *et al.*, 2007) y en menor medida, la tipificación multilocus de secuencias o MLST (Mayor *et al.*, 2008). En lo que respecta a *M. hyorhinis*, y a pesar de su rol como patógeno porcino, no se ha descrito hasta la fecha ningún sistema de tipificación aplicado al estudio de esta especie bacteriana.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos previamente, los objetivos planteados en nuestro trabajo fueron los siguientes:

1. Aislamiento de cepas de campo de *M. hyorhinis*.
2. Estudio de los perfiles antigénicos de cepas de *M. hyorhinis* por medio de la técnica de Western blotting.
3. Desarrollo y evaluación de las técnicas RAPD, PFGE, Southern blotting y VNTR aplicados al estudio de la epidemiología molecular de aislados de campo de *M. hyorhinis*.
4. Desarrollo de un modelo experimental de infección respiratoria en lechones causada por *M. hyorhinis* en lechones.
5. Estudio histopatológico de las lesiones causadas por *M. hyorhinis*.
6. Desarrollo y evaluación de técnicas diagnósticas basadas en ELISA y qPCR.
7. Estudio de la respuesta inmune frente a la inoculación experimental a través de las técnicas de ELISA y Western blotting.

1.2. Revisión bibliográfica

1.2.1. Introducción a la clase *Mollicutes* con énfasis en el género *Mycoplasma*

Las bacterias pertenecientes a la clase *Mollicutes* (del latín *mollis*= suave, blando, *cutis*= piel) constituyen el grupo de microorganismos más pequeños con capacidad de autorreplicación existentes. Este grupo de microorganismos evolucionó a partir de bacterias Gram positivas (Woese *et al.*, 1980; Weisburg *et al.*, 1989) ricas en adenina y citosina, perdiendo durante este proceso evolutivo un gran número de genes comunes a la gran mayoría de bacterias. Esta clase bacteriana está considerada como una de las más primitivas (Wallace y Morowitz, 1973).

Entre ese grupo de genes que se perdieron se encuentran los necesarios para la síntesis de pared celular, de ahí que se clasifiquen, por sus características de tinción, como organismos Gram-negativos. Debido a la ausencia de pared celular, la clase *Mollicutes* presenta varias características específicas, tales como alta sensibilidad al estrés osmótico, a la desecación y a los detergentes y resistencia a las penicilinas. Presentan además una alta plasticidad, y aunque de forma general se presentan en formas esféricas de aproximadamente 0,3 a 0,8 μm de diámetro, su morfología puede variar desde estructuras piriformes hasta filamentos helicoidales, siendo capaces de atravesar filtros de 0.2 μm de diámetro de poro (Razin, 1978).

Los microorganismos incluidos en la clase *Mollicutes* se distinguen desde el punto de vista genético de otras bacterias por poseer genomas pequeños (580-2220 kb) y un contenido bajo de guanina y citosina (23-41 %) en su ADN genómico (Razin, 1995). Presentan un bajo número de genes (entre 600 - 700), capaces a su vez de sintetizar aproximadamente unas 400 proteínas. Esta

reducida capacidad metabólica hace que los mollicutes lleven una forma de vida de tipo parasitario (Stanbridge *et al.*, 1979; Tully, 1992; Razin, 1995).

El crecimiento de estas bacterias requiere medios de cultivo complejos debido a su restringida capacidad metabólica y de síntesis. Los medios de cultivos para bacterias de la clase *Mollicutes* deben incluir precursores de ácidos nucleicos, vitaminas, aminoácidos y para aquellos géneros que lo necesiten, colesterol (obtenido a partir del suero animal). El crecimiento en medio líquido se caracteriza por la presencia de leve turbidez, siendo en medio sólido donde las típicas colonias en forma de “huevo frito” pueden ser observadas (Razin y Oliver, 1961). Estas colonias miden entre 0,1 y 1 mm de diámetro y presentan dos zonas características, una zona central y ligeramente más oscura, caracterizada por el crecimiento en profundidad en el medio y una zona periférica de crecimiento en superficie (Poveda *et al.*, 2002).

1.2.1.1. Taxonomía y filogenia

La clasificación taxonómica actual divide a la clase *Mollicutes* en 9 géneros: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, “*Candidatus Phytoplasma*”, *Anaeroplasma* y *Asteroleplasma*. Asimismo existe controversia en la nomenclatura de bacterias hemotrópicas incultivables originalmente asignadas a los géneros *Haemobartonella* o *Eperythrozoon*, los cuales se han situados provisionalmente en el orden *Mycoplasmatales*. Dentro de la clase *Mollicutes*, los organismos más importantes desde el punto de vista veterinario se encuentran incluidos en las familias *Mycoplasmataceae* (géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*) e *Incertae sedis* (géneros *Eperythrozoon* y *Haemobartonella*, aunque designados comúnmente como micoplasmas hemotrópicos) (Tabla 1.1) (Ludwig *et al.*, 2010).

Tabla 1.1. Principales características de la clase Mollicutes (Brown, 2010)

Orden	Familia	Género	Especies ^a	Tamaño de genoma (kb)	Requerimiento de colesterol	Hélices ^b	Cometidos de diferenciación
I. Mycoplasmales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma	11,6, 9, 1, 4	580-1330	+	II, A	
I. Mycoplasmales	Mycoplasmataceae	Ureoplasma	7, 0, 0, 0	760-1140	+	II, A	Hidroliza urea
I. Mycoplasmales ^c	Imcrotaeae	Sphaerulacron	4, 0, 0, 0	5d ^d	5d	A	Hemotrófico
I. Mycoplasmales ^c	Imcrotaeae	Abrambrinaria	1, 0, 0, 0	5d	5d	A	Hemotrófico
II. Entomoplasmales	Entomoplasmatocae	Entomoplasma	6, 0, 0, 0	870-930	+	I, P	
II. Entomoplasmales	Entomoplasmatocae	Micoplasma	11, 0, 0, 0	835-930		I, P	Medio PBS para crecer
II. Entomoplasmales	Spiroplasmataceae	Spiroplasma	37, 0, 0, 0	780-2220	+	I, P	Metaboliza helical
III. Actinoplasmales	Actinoplasmatocae	Actinoplasma	18, 0, 0, 0	1500-1650	-	A, I, P	
III. Actinoplasmales	Imcrotaeae	"Candidatus Phytoplasma"	0, 27, 0, 0	530-1930	5d	I, P	Nunca han podido ser cultivados in vitro
IV. Anceoplasmales	Anceoplasmatocae	Anceoplasma	4, 0, 0, 0	1500-1800	+	A	Anaerobios estrictos
IV. Anceoplasmales	Anceoplasmatocae	Actinoplasma	1, 0, 0, 0	1500	-	A	Anaerobios estrictos

a. N. Número de especies; V. Virus, C. Candidatus, M. Morderae, S. S. Invisibles

b. Se. Sin determinar

c. H. Humano, A. animal no humano, E. Equino, P. Porcino

d. Afiliación al género con un punto decimal si el orden Mycoplasmales todavía no formalizado

Desde que Nocard y Roux aislaron el primer micoplasma en 1896, la clasificación taxonómica de este grupo de bacterias ha estado sometida a constantes cambios. En primer lugar fueron clasificados como virus debido a su habilidad para atravesar filtros de pequeño

diámetro, aunque esta clasificación se modificó a “no virus” en los años treinta una vez la características definitorias de virus fueron publicadas (Razin, 1992). Ya en 1935 Klieneberger descubrió la fase-L bacteriana, dando lugar a la creencia de que los micoplasmas no eran más que bacterias normales en fase-L estable (Razin y Oliver, 1961), aunque esta idea fue desestimada en los años sesenta con el inicio del uso de la técnica de hibridación ADN-ADN, hecho finalmente confirmado con estudios ultraestructurales realizados en los años setenta (Ovorák, 1974).

El uso de genes con secuencias altamente conservadas está considerado como una herramienta clave en la clasificación taxonómica de los micoplasmas, siendo el uso del gen del ARN ribosómico 16S (gen ARNr 16S) el estándar para clasificación y estudio de las relaciones filogenéticas entre micoplasmas (Johansson *et al.*, 1998; Brown, 2010) (figura 1.1). Basado en los análisis del gen ARNr 16S, existen cinco grupos mayoritarios reconocidos: asteroplasma, spiroplasma, pneumoniae, hominis y anaeroplasma (Weisburg *et al.*, 1989), subdividiéndose a su vez en 16 clusters diferentes (Weisburg *et al.*, 1989; Pettersson *et al.*, 1996a y b). La información obtenida a partir de las secuencias del gen ARNr 16S de micoplasmas ha demostrado ser esencial para su clasificación taxonómica y filogenética, aunque recientemente se ha potenciado el uso de marcadores genéticos complementarios con el fin de mejorar y asegurar las clasificaciones obtenidas por medio del gen ARNr 16S. Esas secuencias genéticas alternativas incluyen principalmente genes “housekeeping” o genes constitutivos, encargados de funciones esenciales, tales como replicación, transcripción o translación, expresándose además en la gran mayoría de organismos. Algunos ejemplos empleados en el estudio de micoplasmas incluyen genes codificantes para proteínas ribosomales altamente conservadas (Gundersen *et al.*, 1994), factor

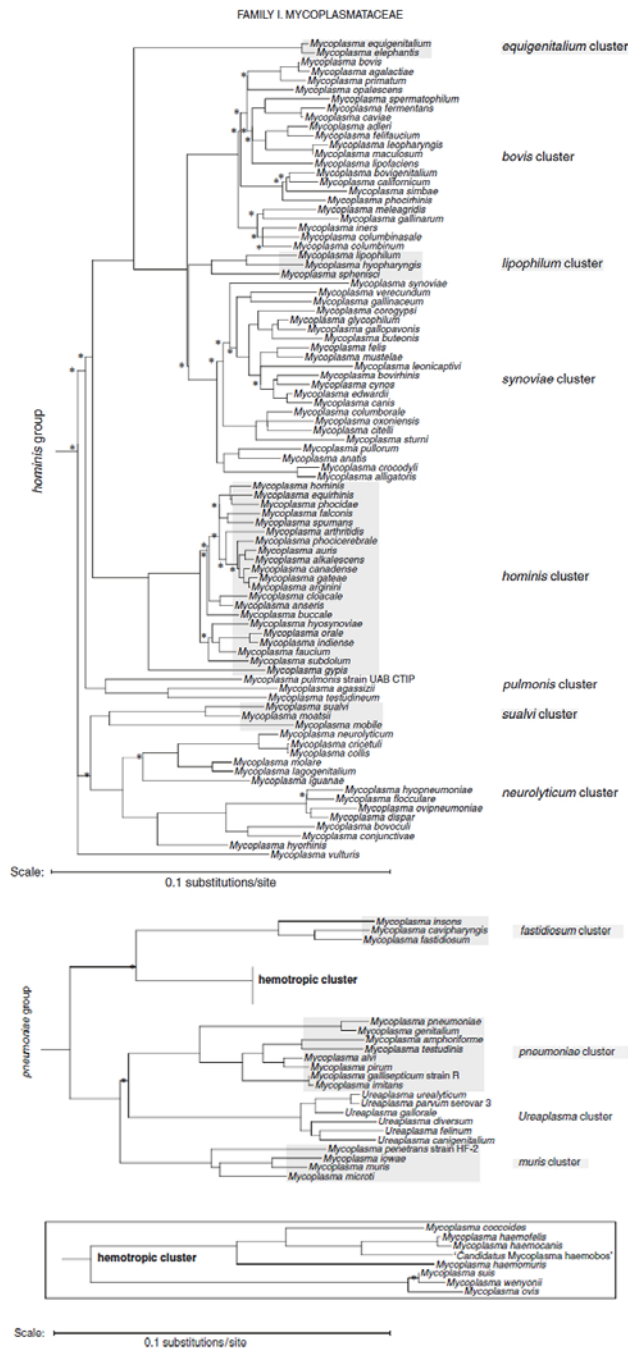


Figura 1.1. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S de micoplasmas (Brown, 2010)

de elongación Tu (EF-Tu, *tuf*) (Kamla *et al.*, 1996), gen codificante para la proteína *ftsZ* (Kukekova, 1999), secuencias espaciadoras intergénicas 16S-23S (ISR o ITS) (Harasawa, 1999; Volokhov *et al.*, 2012), el gen codificante para la subunidad β de la ARN polimerasa (gen *rpoB*) (Kim, 2003), y combinaciones de diferentes genes conservados (Manso-Silván *et al.*, 2007).

Hasta hace poco, la clasificación taxonómica basada en el gen ARNr 16S incluía a la clase *Mollicutes* en el phylum *Firmicutes* (Garrity *et al.*, 2007). Una reclasificación reciente del phylum *Firmicutes* (De Vos *et al.*, 2009), basada en marcadores filogenéticos alternativos tales como el análisis del gen *rpoB*, análisis de la chaperonina GroEL y análisis de subunidades de la ATPasa F_0F_1 (Ludwig y Schleifer, 2005) sitúa a la clase *Mollicutes* fuera de este phylum, siendo la clasificación actual aceptada oficialmente la misma publicada por Murray en 1984, donde la clase *Mollicutes* se encuentra clasificada dentro del phylum *Tenericutes* (Brown, 2010).

1.2.1.2. Estructura celular y cápsula.

La ausencia de pared celular en los organismos de la clase *Mollicutes* explica varias de sus características principales. Entre ellas se encuentra la resistencia a antibióticos cuya diana se encuentra en la síntesis de peptidoglicano (betalactámicos y glicopéptidos).

Las secciones ultrafinas de micoplasmas observadas con microscopía electrónica generalmente no proporcionan una gran cantidad de información. Esta técnica permite identificar la membrana celular con su estructura bilaminar y el citoplasma, donde se pueden diferenciar los ribosomas y material nucleico. Las tinciones con rojo rutenio, que tie mucopolisacáridos de forma específica, observadas bajo microscopía electrónica, han

demostrado la presencia de una matriz extracelular fibrilar o “cápsula” (Wilson y Collier, 1976; Minion y Rosenbush, 1993). Esta cápsula se presenta en estrecha relación con la membrana celular y ha sido documentada en varias especies de los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, entre las que se encuentran *M. mycoides* subesp. *mycoides* Small Colony, *M. dispar*, *M. gallisepticum*, *M. hominis*, *M. hyopneumoniae*, *M. meleagridis*, *M. pneumoniae*, *M. pulmones*, *M. synoviae*, *M. capricolum* subesp. *capricolum* y *Ureaplasma urealyticum* (Boatman y Kenny, 1971; Robertson y Smook, 1976; Rurangirwa *et al.*, 1987).

La función de la cápsula en micoplasmas no está completamente clara (Minion y Rosenbush, 1993), aunque se cree que puede desempeñar un papel en la patogenicidad de estas bacterias, favoreciendo la adhesión al tejido hospedador (Robb, 1984), incrementando su toxicidad o evadiendo la respuesta inmune celular al dificultar o inhibir los procesos de fagocitosis (Rosenbusch y Minion, 1992, Marshall *et al.*, 1995).

1.2.1.3. Membrana celular y estructura antigénica.

La membrana celular de los micoplasmas, al igual que en otras células, es una membrana permeable selectiva que envuelve al citoplasma y está formada por una bicapa de fosfolípidos con proteínas de membrana insertadas en ella.

En los mollicutes, dos tercios de la membrana plasmática están formados por proteínas, siendo el tercio restante lípidos de membrana (Razin *et al.*, 1998). La mayoría de las proteínas presentes en la membrana de los micoplasma se encuentran ancladas a la parte externa de la membrana plasmática, a diferencia de las bacterias Gram-negativas, donde presentan diferentes

localizaciones dependiendo de su función. Un tipo característico de estas proteínas de membrana son las lipoproteínas, que al igual que los lipopolisacáridos en bacterias Gram-negativas, pueden modificar su secuencia, incrementando la variabilidad antigénica de estos organismos y jugando un papel importante en la modulación de la respuesta inmune del organismo hospedador (Chambaud *et al.*, 1999).

A pesar de la gran variedad de proteínas de membrana, solamente existen 4 funciones reconocidas: lipoproteína con función estructural, proteínas de transporte ABC, funciones enzimáticas y capacidad de adherencia (Sutcliffe y Russell, 1995; Hayashi y Wu, 1990).

1.2.1.3.1. Proteínas variables de superficie (Vsps)

La presencia en micoplasmas de proteínas capaces de modificar su estructura de forma reversible y alterar de esta forma su composición antigénica fue descrita por primera vez en 1990 por Rosengarten y Wise. Esta variabilidad permite a los micoplasmas obtener una mayor capacidad de colonización y de adaptación al medio a través de la variación de su arquitectura de superficie celular.

A pesar de la alta susceptibilidad teórica a los anticuerpos y a la lisis mediada por el complemento debido a la ausencia de una pared celular rígida, los micoplasmas se caracterizan por causar normalmente infecciones de tipo crónico, evidenciando la incapacidad del sistema inmune para acabar con ellos (Citti *et al.*, 1997). La selección constante de subpoblaciones celulares, en lugar de la adaptación de una población completa, podría explicar la naturaleza crónica de las infecciones causadas por micoplasmas. La capacidad de variación antigénica parece

estar relacionada principalmente con lipoproteínas ancladas a la superficie externa de la membrana celular (Razin *et al.*, 1998).

Otro método de modificar la antigenicidad y la respuesta inmune de hospedador es el denominado enmascaramiento antigénico, donde los micoplasmas son capaces de realizar modificaciones en el tamaño o en la composición lipídica de las lipoproteínas de membrana con el fin de dificultar la accesibilidad a ciertos antígenos de superficie (Rosengarten y Yogev, 1996). Además de esta capacidad de modificación antigénica algunos micoplasmas han demostrado presentar la habilidad de modificar su repertorio antigénico con el fin de asemejarse al organismo hospedador, en lo que se ha denominado como mimetismo molecular (Jacobs *et al.*, 1995).

Diferentes proteínas variables pertenecientes a familias de multigenes han sido identificadas en *M. bovis* (vsps: familias de multigenes donde una alta variación de fase tiene lugar), en *M. gallisepticum* e *M. imitans* (pMGA: variación en el tamaño de lipoproteínas de membrana) (Citti *et al.*, 1999). *M. hyorhinis* presenta uno de los mecanismos de variabilidad antigénica más estudiados. Este sistema, compuesto por siete genes que codifican para el mismo número de lipoproteínas variables de membrana (vlp), permite a este microorganismo expresar diferentes combinaciones proteicas en función de la influencia del medio o del sistema inmune del hospedador (Citti *et al.*, 2000). Este grupo de proteínas, presentes en la superficie celular, se encuentran reguladas, al igual que en otros micoplasmas, por cambios en su tamaño, y constituyen el componente antigénico principal de *M. hyorhinis* (Rosengarten y Wise, 1990).

1.2.1.4. Patogenicidad y factores de virulencia

Los organismos pertenecientes a la clase *Mollicutes* son en su gran mayoría bacterias comensales, siendo los aislados de artrópodos considerados incluso como microorganismos simbioses (Hackett y Clark, 1989). En caso de los micoplasmas patógenos, las infecciones que éstos causan suelen ser en su mayoría de tipo crónico. A pesar de la clara asociación entre micoplasmas y enfermedad en animales, plantas e insectos no existe mucha información sobre los mecanismos exactos que influyen en la patogenicidad de ciertos micoplasma.

Entre los posibles factores de patogenicidad descritos se encuentra la producción de peróxido de hidrógeno y radicales superóxido como productos metabólicos de desecho, capaces de causar daño oxidativo en la membrana de las células del hospedador (Almagor *et al.*, 1984, 1985 y 1986).

Existen otros mecanismos posibles por los que los micoplasmas pueden causar enfermedad. Entre ellos se encuentra la presencia de ureasas, que pueden dar lugar a la producción de amoníaco, la presencia de fosfolipasa A_2 en *Ureaplasmas*, que influencia el metabolismo de la prostaglandina, generando problemas durante la gestación (Razin *et al.*, 1998), la capacidad de fusionarse parcialmente con las células hospedadoras, incrementado el daño causado por los radicales superóxido (Wang *et al.*, 1993) y por último, el papel que la cápsula externa de polisacárido juega en reducir la capacidad de fagocitosis en el organismo hospedador, favoreciendo por lo tanto la colonización de los micoplasmas (Marshall *et al.*, 1995).

1.2.2. Micoplasmosis en ganado porcino

Los principales micoplasmas aislados del ganado porcino se encuentran representados en la tabla 1.2.

Las micoplasmosis porcinas presentan una distribución mundial, afectando en mayor medida a los sistemas de producción intensivos. Dentro de estas micoplasmosis destaca con diferencia la neumonía enzoótica porcina (NEP), causada principalmente por *M. hyopneumoniae*, aunque trabajos recientes han demostrado que *M. hyorhinis* también juega un papel importante tanto en la NEP como en el complejo respiratorio porcino (CRP) (Lin *et al.*, 2006; Palzer *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2010).

Especie	Fecha de aislamiento	Presentación clínica
<i>M. hyopneumoniae</i>	Mare y Switzer , 1965	Neumonía enzoótica porcina (NEP)
<i>M. hyorhinis</i>	Switzer , 1955	Neumonía, artritis, pericarditis, poliserositis, otitis media,
<i>M. hyosynoviae</i>	Ross y Karmon , 1970	Poliartritis
<i>M. flocculare</i>	Meyling y Friis , 1972	Apatógeno – no demostrado
<i>M. hyopharyngis</i>	Erickson <i>et al.</i> , 1986	Apatógeno – no demostrado
<i>M. suis</i>	Splitter , 1950	Anemia infecciosa porcina

Tabla 1.2. Principales micoplasmas porcinos

1.2.2.1. *Mycoplasma hyopneumoniae*

Aislado por primera vez en 1965 por Maré y Switzer, *M. hyopneumoniae* está considerado como uno de los micoplasmas más importantes en el ámbito de la sanidad animal, principalmente debido a las implicaciones económicas que la enfermedad producida por este

microorganismo, la neumonía enzoótica porcina, tiene en los sistemas de producción intensiva de porcino (Stärk *et al.*, 1992).

1.2.2.1.1. Características generales

Las células de *M. hyopneumoniae* se caracterizan por poseer forma coccoide o cocobacilar, no presentan motilidad y producen colonias pequeñas carentes de región central, normalmente convexas y granulares al ser observadas con magnificación.

Presentan un crecimiento lento al ser cultivados *in vitro*, pudiendo ser utilizado para este fin diferentes medios de cultivo, entre los que se encuentran el medio de Friis, SP4 y medio A26. Las condiciones óptimas de cultivo se encuentran a 37 °C con agitación constante (Brown, 2010).

Desde el punto de vista bioquímico *M. hyopneumoniae* se caracteriza por fermentar la glucosa mientras no es capaz de hidrolizar la urea o la arginina (Friis, 1972; Ross y Wittlestone, 1983).

1.2.2.1.1.1. Principales proteínas antigénicas y predominantes

Hasta la fecha se han descrito diferentes proteínas inmunodominantes involucradas en la patogenia de *M. hyopneumoniae*.

Numerosos estudios de caracterización proteica y antigénica de tipo general descritos hasta la fecha han demostrado una gran variabilidad antigénica en esta bacteria. Dentro de los principales componentes antigénicos descritos se encuentran las proteínas de peso molecular 110, 64, 50, 41 y 36 kDa (Young y Ross, 1987), 96, 70, 46 y 38 kDa (Mori *et al.*, 1988), 110, 78, 64,

50, 41 y 36 kDa (Strasser *et al.*, 1992), 200, 114, 94, 76, 43 y 36 kDa (Scarman *et al.*, 1997) y 97, 74, 65, 46 y 36 kDa (Caron *et al.*, 2000a y b).

En un estudio llevado a cabo en cepas de campo de *M. hyopneumoniae* aisladas en Gran Canaria se demostró que las principales proteínas predominantes correspondían a aquellas con un peso molecular aparente de 160, 120, 97, 93, 74, 65, 57, 52, 46, 40 y 36 kDa (Assunção, 2003).

De forma más específica, Wise y Kim (1987a y b) demostraron a través del uso de anticuerpos monoclonales que los componentes antigénicos p41, p44, p50 y p65 eran lipoproteínas específicas en *M. hyopneumoniae*.

La capacidad de adhesión juega un papel destacado dentro de los diferentes factores de virulencia presentes en *M. hyopneumoniae* (Ross y Young, 1993). Esta capacidad de adhesión junto con el efecto citopático producido en células del epitelio ciliar de la tráquea se encuentra estrechamente relacionado con la presencia de una proteína de 97 kDa de peso molecular, descrita por primera vez por Young y colaboradores en 1992. Esta proteína, denominada comúnmente como p97, es una adhesina que se encuentra localizada en la membrana celular de *M. hyopneumoniae* y es considerada como uno de los principales marcadores de virulencia en esta bacteria (Zhang *et al.*, 1995).

El gen que codifica esta proteína presenta dos regiones repetitivas bien diferenciadas, denominadas R1 y R2 (Hsu *et al.*, 1997). En 1998, Hsu y Minion comprobaron que la región R1 jugaba un papel esencial en el proceso de adhesión, demostrándose posteriormente que era necesario un número superior a 8 repeticiones por región R1 para que se produjera la adhesión a

cilios de tejido respiratorio porcino (Minion *et al.*, 2000). Se ha postulado que la región R2 es una porción no esencial de la proteína p97, que actúa como señuelo para el sistema inmune (Wilton *et al.*, 1998).

A pesar de ser reconocida como un componente antigénico importante en *M. hyopneumoniae*, diferentes estudios han demostrado que la actividad de la proteína p97 no es el único componente necesario para la adhesión a cilios del epitelio respiratorio porcino (Chen *et al.*, 1998; Hsu y Minion, 1998).

A ello se suma la reciente descripción de varias proteínas de membrana capaces de unirse a cilios y otros componentes biológicos *in vitro* (Chen *et al.*, 1998; Burnet *et al.*, 2006; Wilton *et al.*, 2009; Deutscher *et al.*, 2010; Seymour *et al.*, 2010; Bogema *et al.*, 2011; Seymour *et al.*, 2011), dando mayor peso a la teoría que defiende un proceso de adherencia regulado por más de una proteína de membrana en *M. hyoneumoniae*.

Además de estas adhesinas, existen otros componentes proteicos importantes en *M. hyopneumoniae* que han sido parte de numerosos estudios de caracterización con el fin de obtener posibles candidatos para vacunas recombinantes (Chen *et al.*, 2008) o como base para técnicas diagnósticas.

Dentro de los más importantes se encuentra la p74, caracterizada por Feld y colaboradores en 1992. Esta proteína, descrita anteriormente como una proteína de choque térmico o *heat-shock protein* (Brook y Faulds, 1989), sirvió como base de uno de los principales

tests de diagnóstico serológicos para la detección de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* (IDEIA™ *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA Kit, Oxoid).

Otras proteínas empleadas en el diagnóstico incluyen la p64 (Young y Ross, 1987), p46 (Mori *et al.*, 1987) y p40 (LePotiers *et al.*, 1994). La p46, una lipoproteína caracterizada por Futo y colaboradores en 1995 (a), ha sido empleada en diferentes ocasiones con el fin de desarrollar técnicas de ELISA (Mori *et al.*, 1987, Futo *et al.*, 1995b), y en combinación con p64 con el fin de detectar antígenos específicos en técnicas inmunohistoquímicas (Cheikh Saad Bouh *et al.*, 2003). La proteína p46, en combinación con la p36, una lactato-deshidrogenasa capaz de inducir respuesta inmune temprana en animales infectados de forma natural y experimental (Strasser *et al.*, 1991, Frey *et al.*, 1994) y con la p97 han sido evaluadas como posibles componentes antigénicos en vacunas recombinantes (Chen *et al.*, 2008).

1.2.2.1.2. Epidemiología

M. hyopneumoniae presenta una distribución mundial, con una mayor incidencia en aquellos países donde existe un alto índice de producción porcina (Thacker, 2006). Los cerdos domésticos y jabalíes se pueden ver afectados por *M. hyopneumoniae* (Sibila *et al.*, 2010).

Este microorganismo es considerado el principal agente etiológico en la NEP y como un componente esencial en el CRP, en conjunción con otros patógenos tales como *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Arcanobacterium pyogenes*, virus del síndrome

reproductivo y respiratorio porcino (PRRSv), virus de la influenza porcina (SIV), circovirus porcino tipo II y virus de la enfermedad de Aujeszky (Thacker, 2006).

Además existe una gran variabilidad intraespecífica, tanto antigénica como genética (Assunção *et al.*, 2005; Stakenborg *et al.*, 2006; Calus *et al.*, 2007), lo que puede explicar en ciertos casos los fallos en protección vacunal y los problemas de especificidad de las técnicas diagnósticas frente a *M. hyopneumoniae* (Strait *et al.*, 2008; Marois *et al.*, 2010). Esta variabilidad también se traduce en diferentes presentaciones clínicas, donde tanto en estudios experimentales como en observaciones de campo donde se ha demostrado que diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* son capaces de causar un amplio rango de cuadros clínicos, asintomáticos, subclínicos o clínicos, dependiendo de la cepa aislada en cuestión (Lloyd y Etheridge, 1981; Vicca *et al.*, 2003).

La transmisión ocurre debido a la producción de exudado respiratorio o secreciones que se transmiten a través de aerosoles debido a tos o estornudos o por contacto directo (Stevenson *et al.*, 1998). La recirculación de *M. hyopneumoniae* dentro de la granja se debe principalmente a la transmisión vertical, pasando de cerdas a lechones recién nacidos (Ross, 1999), o de forma horizontal, cuando las camadas de lechones sanos e infectados son combinadas, o entre cerdos jóvenes y adultos en cebo cuando la explotación presenta un tipo de producción de flujo continuo (Sheldrake *et al.*, 1990; Ross, 1999).

1.2.2.1.3. Presentación clínica

La infección por *M. hyopneumoniae* se caracteriza por una alta morbilidad y baja mortalidad. Los animales son considerados susceptibles a cualquier edad aunque los lechones menores de 6 semanas raramente se encuentran afectados (Sibila *et al.*, 2009).

La prevalencia de *M. hyopneumoniae* es particularmente alta a mediados-finales del período de cebo. En los casos de infección pura por *M. hyopneumoniae*, la enfermedad se caracteriza por presentar un curso de tipo subclínico, cuyos signos clínicos suelen incluir tos crónica y no productiva, reducción en la ganancia media diaria y en el índice de conversión. En caso de que la infección se presente en combinación con otros patógenos secundarios, los signos clínicos principales incluirán pirexia y dificultad para respirar, con algunos casos terminando en la muerte del animal (Maes *et al.*, 1996).

En combinación con otros patógenos, formando parte del CRP, la infección por *M. hyopneumoniae* se detecta principalmente en cerdos dentro del periodo de cebo, en un rango de edad comprendido entre las 14 y 20 semanas de edad, siendo a las 18 semanas cuando se alcanza el pico de prevalencia. Clínicamente esta presentación es muy similar a la observada en casos de NEP complicada, pero con una clínica más acusada (Dee, 1996).

1.2.2.1.3.1. Lesiones

1.2.2.1.3.1.1. Lesiones macroscópicas

La NEP se caracteriza por producir una bronconeumonía catarral crónica de distribución cráneoventral, afectando principalmente a los lóbulos apicales, cardíacos e intermedio, junto con la porción craneal de los lóbulos diafragmáticos (Goodwin *et al.*, 1969) (ver imagen representativa en figura 1.2). Los lóbulos apical e intermedio izquierdos y el intermedio se suelen encontrar afectados en menor medida, mientras que los diafragmáticos rara vez se encuentran afectados. Esta distribución de lesiones se corresponde con la dinámica del flujo respiratorio en cerdos, viéndose el lóbulo craneal derecho afectado en mayor medida debido a la presencia en cerdos del denominado bronquio traqueal (Livingston *et al.*, 1972).

En la fase inicial de la infección se observan lesiones consolidadas de color rojo oscuro. Cuando la enfermedad entra en la fase aguda es característica la presencia de exudado catarral o muco-purulento en las vías aéreas, junto con la presencia de ligera dilatación en los lóbulos pulmonares (Armstrong *et al.*, 1983). Además, es común una hipertrofia de los nódulos linfáticos mediastínicos y bronquiales. En la fase crónica se observa una contracción de las lesiones pulmonares, debido a la fisura de alvéolos colapsados y la presencia de enfisema alveolar compensatorio (Kobisch y Friis, 1996).

En el caso de infecciones puras causadas por *M. hyopneumoniae*, las lesiones macroscópicas duran aproximadamente de 5 a 9 semanas post infección (Livingston *et al.*, 1972; Kobisch *et al.*, 1993).

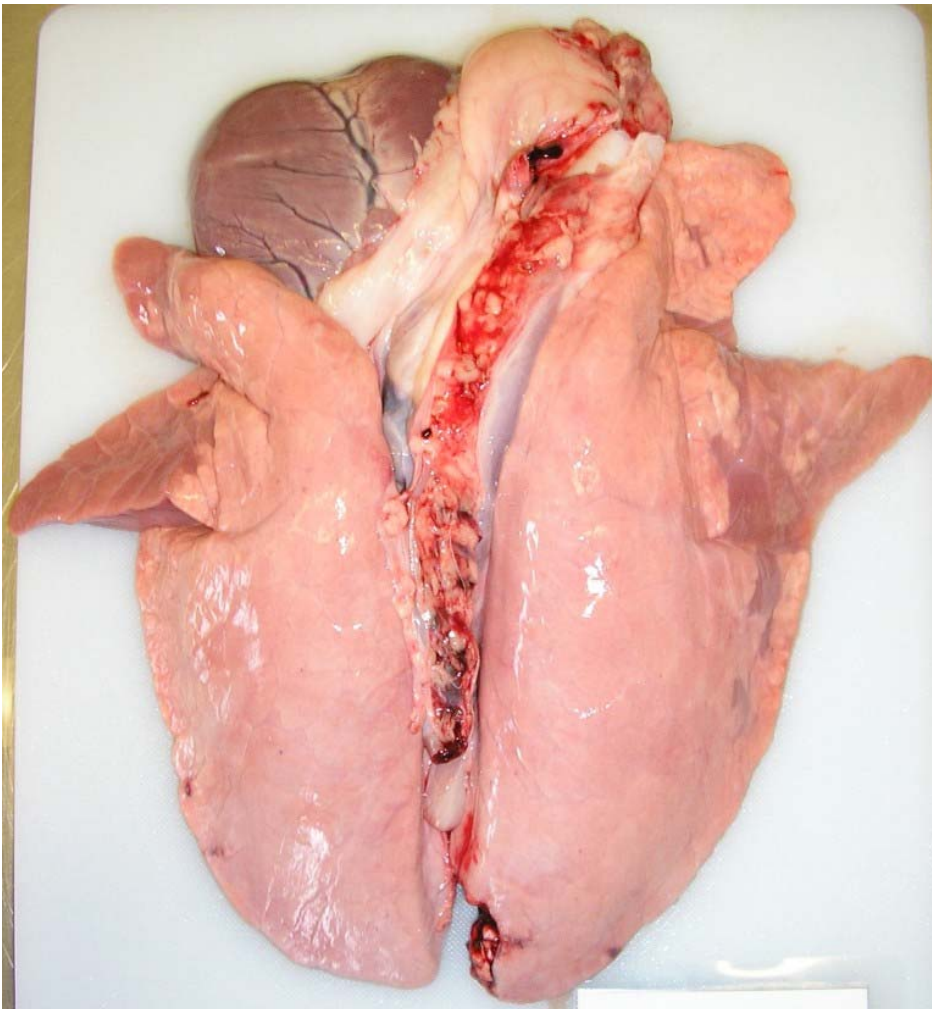


Figura 1.2. Imagen representativa de un pulmón porcino con lesiones macroscópicas típicas de NEP

El porcentaje de pulmón afectado varía entre un 20 % en cerdos inoculados de forma experimental, alcanzando porcentajes de lesiones pulmonares entre 80 y 90 % cuando otros patógenos se ven involucrados en la infección (Done, 1997). Otros tipos de lesiones que se han asociado con infecciones causadas por *M. hyopneumoniae* incluyen pericarditis fibrinosa (Jensen *et al.*, 1995; Buttenschøn *et al.*, 1997) y poliartritis (Lloyd y Etheridge, 1981).

1.2.2.1.3.1.2. Lesiones microscópicas

En las fases iniciales de la enfermedad se observa una neumonía alvéolo-intersticial con acúmulos perivasculares y peribronquiales de células mononucleares y ciliostasis, pudiéndose observar acumulación de neutrófilos en alvéolos y luz de las vías aéreas (Ross, 1999).

Cuando la enfermedad se cronifica, se aprecian los característicos folículos linfoides perivasculares y peribronquiales (hiperplasia linfoide) debido a un incremento en el número de linfocitos, siendo capaces de comprimir la luz de los bronquiolos (Livingston *et al.*, 1972). También se observa edema alveolar, infiltrado inflamatorio en los alvéolos y engrosamiento de los septos interalveolares (Baskerville, 1972).

En las lesiones en proceso de recuperación se observan alvéolos colapsados, enfisema alveolar y folículos linfoides (Ross, 1999).

1.2.2.1.4. Diagnóstico

1.2.2.1.4.1. Cultivo y aislamiento

Aunque el cultivo y aislamiento microbiológico siguen siendo considerados como las técnicas de referencia o “gold standards” para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* (Ross, 1999), la dificultad del proceso de cultivo de este microorganismo y su escasa sensibilidad han relegado al cultivo a un papel secundario (Kobisch y Friis, 1996).

El medio de Friis (Friis, 1971a) es considerado como el medio de cultivo de elección para el aislamiento de *M. hyopneumoniae*. Se trata de un medio de cultivo complejo que requiere una alta concentración de suero porcino en su composición.

Dentro de las principales muestras recomendadas para el aislamiento de *M. hyopneumoniae* se encuentran los hisopos traqueales y los lavados traqueobronquiales (Marois *et al.*, 2007), seguidos por tejido pulmonar. Los hisopos nasales no se recomiendan debido al limitado periodo de tiempo dentro del que *M. hyopneumoniae* puede detectarse en la cavidad nasal (Mattsson *et al.*, 1995) y al incremento en el riesgo de contaminación con bacterias no específicas (Cardona *et al.*, 2005).

El aislamiento de cepas de campo de *M. hyopneumoniae* es un proceso altamente laborioso, pudiendo abarcar periodos de hasta 8 semanas, complicándose frecuentemente con otros micoplasmas porcinos (Maes *et al.*, 1996).

1.2.2.1.4.2. Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico en *M. hyopneumoniae* se basa en la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), debido a la rapidez en su realización, a su capacidad para testar un alto número de muestras al mismo tiempo y a su bajo coste.

Los principales métodos de diagnóstico serológico basados en la técnica de ELISA descritos para *M. hyopneumoniae* incluyen un ELISA de bloqueo (bELISA) (Feld *et al.*, 1992) y dos test de ELISA indirectos (iELISA), uno comercializado por IDEXX (IDEXX M. hyo. Ab Test) y el otro un

ensayo ampliamente utilizado basado en el uso de antígenos previamente procesados con Tween-20 (Nicolet *et al.*, 1980; Kazama *et al.*, 1989).

El uso de Western blotting en el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* se limita a su aplicación como test confirmatorio para muestras donde el ELISA presenta un resultado dudoso (Ameri *et al.*, 2006).

Otras técnicas serológicas incluyen la fijación del complemento (Mori *et al.*, 1983) y la hemoaglutinación indirecta (Freeman *et al.*, 1984), aunque actualmente se encuentran en desuso.

1.2.2.1.4.3. Valoración de lesiones macroscópicas y diagnóstico histopatológico

La valoración de las lesiones macroscópicas de pulmones es ampliamente utilizada tanto en controles de matadero como en la evaluación de la eficacia de inoculaciones experimentales, ya que, aunque de capacidad diagnóstica limitada sin el apoyo de otras técnicas laboratoriales, se considera una herramienta esencial para el estudio de las infecciones causadas por micoplasmas (Sibila *et al.*, 2009).

Existen numerosos sistemas de puntuación de lesiones descritos hasta la fecha (tabla 1.3). En la mayoría de estos sistemas, el valor máximo asignado a cada lóbulo es ponderado en función de la prevalencia en la presentación de lesiones asociadas a neumonía enzoótica en cada región pulmonar.

A la hora de evaluar las lesiones macroscópicas en pulmón, hay varias consideraciones a tener en cuenta para una correcta interpretación de los datos, ya que, a pesar de ser altamente indicativas, las lesiones causadas por micoplasmas en porcino no son patognomónicas, pudiendo ser confundidas por ejemplo con casos de influenza porcina (Thacker *et al.*, 2001), además de existir el riesgo de que otras lesiones, como las causadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* puedan enmascarar infecciones subyacentes causadas por micoplasmas.

Autor	Unidad de puntuación	Puntuación por lóbulo						Total	
		Apical		Cardíaco		Diafragmático			Intermedio
		D	I	D	I	D	I		
Goodwin y Whittlestone (1973)	De 0 a 5 o de 0 a 10 puntos por lóbulo	10	10	10	10	5 (sólo borde craneal)	5 (sólo borde craneal)	5	55
Hannan et al. (1982)	De 0 a 5 puntos por lóbulo	5/7	5/7	5/7	5/7	5/19	5/19	5/8	35
Madec and Kobisch (1982)	De 0 a 4 puntos por lóbulo dependiendo del porcentaje de lóbulo afectado	0 puntos = no lesiones; 1 punto = <25 % del lóbulo; 2 puntos = 25–49 %; 3 puntos = 50–74 %; 4 puntos >75 %. Puntos para cada uno de los 7 lóbulos						28	
Morrison et al. (1985)	Porcentaje de lóbulo afectado	10	10	7	7	30	30	6	100
Straw et al. (1986)	Porcentaje de lóbulo afectado	10	10	10	10	25	25	10	100
Christensen et al. (1999)	Porcentaje de lóbulo afectado	7	4	15	9	35	25	5	100

Tabla 1.3. Sistema de puntuación de lesiones macroscópicas pulmonares en cerdos, modificado de Sibila *et al.*, 2009

El uso de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) para la detección de *M. hyopneumoniae* ha sido empleado en numerosas ocasiones para la detección de antígenos de micoplasma como

técnica accesoria para la evaluación histopatológica de lesiones pulmonares (Andrada, 2001; Sarradell *et al.*, 2003; Opriessnig *et al.*, 2004; Redondo *et al.*, 2009), aunque su escasa sensibilidad hace que no sea una técnica de elección en diagnóstico rutinario.

El método más extendido para la valoración semicuantitativa de lesiones en preparaciones histológicas es el descrito por Livingston y colaboradores en 1972. En él se establecen cuatro diferentes valores (+, ++, +++, +++) que varían dependiendo de la grado de las lesiones, tal y como se expone a continuación:

+: Uno o más nódulos linfoides en la submucosa pero sin penetrar en la capa muscular de la mucosa.

++: Uno o más nódulos linfoides extendidos a través de la capa muscular de la mucosa, escaso infiltrado inflamatorio (principalmente neutrófilos), tanto a nivel septal como en la luz bronquial y alveolar. La pared alveolar generalmente poco engrosada.

+++ : Hiperplasia linfoide perivascular y peribronquiolar con numerosas células septales y neutrófilos en la luz alveolar. En las áreas afectadas el bronquio contiene generalmente un gran número de neutrófilos en la luz.

++++: Hiperplasia linfoide perivascular y peribronquiolar intensa en áreas extensas del parénquima pulmonar. El infiltrado septal o intraluminal (compuesto por macrófagos y neutrófilos) es escaso y se puede encontrar edema alveolar en las áreas afectadas.

La hibridación *in situ* (HIS) supone una alternativa a la IHQ, ya que el uso de sondas sintetizadas comercialmente marcadas con digoxigenina, fluoresceína u otros marcadores, reduce la variabilidad biológica observada entre diferentes anticuerpos, mejorando la repetitividad de la técnica (Lin y Lloyd, 1991). La HIS se ha usado con éxito para la detección de ADN específico de *M. hyopneumoniae* tanto en animales infectados experimentalmente como muestras procedentes de inoculaciones experimentales (Kwon y Chae, 1999; Boye *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2002).

1.2.2.1.4.4. Diagnóstico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Existen numerosas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa descritas hasta la fecha para la detección de *M. hyopneumoniae*.

Los límites de detección de los diferentes protocolos desarrollados hasta la fecha varían entre 5 nanogramos (Harasawa *et al.*, 1991) hasta 0,5 picogramos (Kurth *et al.*, 2002) de ADN genómico.

Dentro los principales genes evaluados para el diseño de técnicas de PCR para la detección de *M. hyopneumoniae* cabe destacar el gen del ARN ribosómico 16S (Stemke *et al.* 1994, Mattsson *et al.*, 1995; Calsamiglia *et al.*, 1999a; Stakenborg *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2007). Otros genes incluyen transportadores ABC putativos (Verdin *et al.*, 2000; Dubosson *et al.*, 2004) y varias proteínas específicas (Artiushin *et al.*, 1993; Caron *et al.*, 2000; Kurth *et al.*, 2002 y Marois *et al.*, 2010). A la hora de detectar *M. hyopneumoniae* utilizando PCR, las muestras recomendadas

incluyen hisopos traqueobronquiales, lavados bronquialveolares y tejido pulmonar (Kurth *et al.*, 2002; Marois *et al.*, 2007).

1.2.2.1.5. Profilaxis, control y erradicación

Por lo general, las medidas de profilaxis y control de la NEP se sostienen sobre tres pilares básicos: optimización de sistemas de manejo y producción, uso de antibióticos y vacunación.

Dentro de las principales pautas de manejo enfocadas al control y profilaxis de esta enfermedad cabe destacar el sistema de producción “todo dentro-todo fuera” (TD-TF), ya que permite reducir en gran medida el contacto entre animales más viejos con animales jóvenes, más susceptibles a la enfermedad (Clark *et al.*, 1991). De forma adicional, se ha demostrado que este sistema favorece la reducción de lesiones pulmonares y ayuda a mejorar los índices de producción, por lo que se recomienda su empleo en los sistemas de producción porcina.

El uso de antibióticos como método de control y profilaxis está altamente extendido en la producción porcina industrial. La pauta de medicación más utilizada incluye el uso de piensos medicados de una a tres semanas, empezando una semana antes del comienzo de la enfermedad (Thacker *et al.*, 2004). Este sistema reduce notablemente el número de células de *M. hyopneumoniae* presentes, pero no logra evitar por completo la invasión por parte de este agente bacteriano. Otro sistema empleado de forma rutinaria es la medicación pulsada, administrada de forma intermitente durante periodos de especial riesgo de enfermedad (Le Grand y Kobisch, 1996). La principal contrapartida de este método radica en la posibilidad de

desarrollo de resistencia a agentes antimicrobianos cuando se usa de forma prolongada (Maes *et al.*, 2008).

Actualmente, la mayoría de los países con sistemas de producción intensivos de porcino incluyen pautas de vacunación frente a *M. hyopneumoniae*. Como indicador de este dato, cabe destacar que la vacuna frente a *M. hyopneumoniae* es una de las dos vacunas más vendidas en el mercado de la sanidad animal a nivel global (Meeusen *et al.*, 2007).

Todas las vacunas comerciales frente a NEP se basan en bacterinas inactivadas químicamente en combinación con diferentes adyuvantes. Aunque las vacunas comercializadas hasta la fecha no dan lugar a una protección completa y no evitan la colonización de *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 1998), se ha demostrado que su uso ayuda a mejorar el índice de ganancia de peso diario y el índice de conversión, además de reducir la mortalidad, el tiempo en alcanzar el peso de matadero, las lesiones pulmonares y signos clínicos (Maes *et al.*, 1998; Maes *et al.*, 1999).

Varios países de la Unión Europea siguen actualmente programas destinados a la erradicación de *M. hyopneumoniae* de sus granjas (Baekbo *et al.*, 1994; Rautiainen *et al.*, 2001; Stärk *et al.*, 2004). La mayoría de los programas de erradicación propuestos hasta la fecha incluyen procesos de despoblación completa, o despoblación parcial en combinación con dietas medicadas basadas en el uso de tiamulina, o combinaciones de clortetraciclina, tilosina y sulfadimidina (Zimmerman *et al.*, 1989). Variaciones de este programa de despoblación, utilizado principalmente en grandes explotaciones de Estados Unidos y Canadá, incluyen además el uso de vacunas y el llamado destete temprano medicado (DTM), donde los animales son destetados a

los cinco días de edad y aislados mientras reciben tratamiento antimicrobiano durante diez días (Harris y Alexander, 1999). El DTM también incluye la administración intensiva de antimicrobianos a las madres tanto en el último período de la gestación como al inicio de la lactación.

1.2.2.2. *Mycoplasma hyorhinis*

1.2.2.2.1. Características generales

La primera descripción de *M. hyorhinis* data de 1955, cuando Switzer, como parte de un estudio para determinar las causas de rinitis atrófica infecciosa, aisló de la cavidad nasal de cerdos lo que denominó *pleuropneumonia-like microorganism* o microorganismo similar al causante de pleuroneumonía (PPLO). *M. hyorhinis* está considerado como una bacteria contaminante aislada frecuentemente del tracto respiratorio de cerdo. Se consideran las superficies mucosas del tracto respiratorio superior del cerdo y las tonsilas como el hábitat natural para este microorganismo (Friis y Feenstra, 1994). Presenta una distribución mundial, encontrándose normalmente asociado con casos de poliartritis, pericarditis y poliserositis en cerdos jóvenes (Kobisch y Friis, 1996). Además se ha demostrado su asociación con casos de otitis media (Morita *et al.*, 1995) y neumonía (Lin *et al.*, 2006).

Al igual que todas las bacterias del género *Mycoplasma*, *M. hyorhinis* presenta un tamaño de genoma relativamente pequeño, variando entre 829 y 839 kb (Liu *et al.*, 2010; Kornspan *et al.*, 2011), con un contenido en G+C de 25.9 %.

Desde el punto de vista filogenético, *M. hyorhinis* presenta bastantes similitudes con otros dos micoplasmas porcinos, *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare*, agrupándose conjuntamente en el cluster *neurolyticum* en análisis basados en el gen ARNr 16S, gen *rpoB* e ITS 16S-23S (Volkhov *et al.*, 2012).

Bioquímicamente *M. hyorhinis* fermenta la glucosa, no utiliza arginina y no hidroliza la urea, reduce tetrazolio, tanto de forma aeróbica como anaeróbica, es fosfatasa positivo y negativo en la prueba de digestión de la caseína (Friis, 1971b).

En comparación con *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* es relativamente fácil de aislar, siendo considerado como un micoplasma de crecimiento rápido (Friis, 1971b). En medio sólido se pueden observar colonias típicas de micoplasma con morfología de “huevo frito” tras incubación a 37 °C entre 2 a 5 días, con un diámetro final de 0.5 a 1 mm.

1.2.2.2.1.1. Mecanismos de variación antigénica

El sistema vlp representa el principal mecanismo de variación antigénica en *M. hyorhinis*. Este sistema proporciona la capacidad al microorganismo de modificar su repertorio antigénico y características estructurales de superficie con el fin de evadir la acción del sistema inmune del organismo hospedador (Citti *et al.*, 1997).

Hasta la fecha se ha encontrado un total de hasta siete genes involucrados en el sistema vlp: vlpA, vlpB, vlpC, vlpD, vlpE, vlpF y vlpG (Citti *et al.*, 2000). Solamente se presenta una copia de cada gen, siempre localizados conjuntamente. De forma general se presentan agrupados en el genoma de *M. hyorhinis* en combinación con la secuencia de inserción IS1221, un transposón o

elemento genético transponible con varias copias dispersas en el genoma y responsable de reordenamientos genómicos a gran escala, incluyendo deleciones, inserciones e inversiones génicas (Zheng y McIntosh, 1995).

El sistema *vlp* está regulado mediante diferentes mecanismos:

- Sistema ON/OFF o de encendido y apagado: Sistema que mediante deleciones o inserciones en la región promotora regula la expresión de los genes *vlp* (Rosengarten y Wise, 1990; Citti y Wise, 1995).

- Variación en tamaño: Basado en la deleción o inserción de secuencias intragénicas repetitivas, dando lugar en consecuencia a variación antigénica (Yogev *et al.*, 1991; Citti *et al.*, 1997).

- Variación en el número de genes presentes en cada cepa, variando por lo tanto el número de *vlp*s expresados en la membrana del microorganismo (Yogev *et al.*, 1995; Citti *et al.*, 2000).

Gracias a estos mecanismos, *M. hyorhinis* es capaz de variar rápidamente, adaptándose a diferentes condiciones del medio u hospedador y dando lugar a la selección de poblaciones resistentes a la respuesta humoral (Rosengarten *et al.*, 2000).

1.2.2.2.2. Epidemiología

M. hyorhinis presenta una distribución mundial, encontrándose en cualquier lugar donde haya producción intensiva porcina (Schulman *et al.*, 1970).

La transmisión se produce generalmente por contacto directo entre madres o cerdos adultos y lechones justo después del nacimiento (Kobisch y Friis, 1996). Una vez en el aparato respiratorio, esta bacteria es capaz de propagarse de forma hematogena dando lugar a las características lesiones serofibrinosas afectando pleura, peritoneo y pericardio, además de procesos artríticos.

Además de su hábitat natural colonizando el tracto respiratorio superior del cerdo, *M. hyorhinis* es aislado en gran medida a partir de muestras procedentes de oído medio, donde su presencia se ha asociado a cuadros clínicos de otitis en animales de hasta dos meses de edad (Kazama *et al.*, 1994; Morita *et al.*, 1995). En casos de poliserositis y pericarditis, se ha demostrado la presencia de *M. hyorhinis* hasta en un 30 % de animales infectados naturalmente (Bannerman y Nicolet, 1971; Friis y Feenstra, 1994). En pulmones de cerdos con lesiones compatibles con neumonía enzoótica, el porcentaje de aislamiento se sitúa alrededor de un 70 %, mientras que en animales sanos el porcentaje disminuye hasta un 53 % (Palzer *et al.*, 2008). En casos de artritis, investigados en animales destinados a matadero, se ha demostrado que *M. hyorhinis* puede estar relacionado hasta con un 7 % de los casos clínicos (Hariharan *et al.*, 1992).

Aunque la capacidad de *M. hyorhinis* para causar enfermedad clínica como agente causal único, incluyendo neumonía, otitis, artritis y poliserositis, ha sido ampliamente demostrada (Goiš *et al.*, 1968a, Morita *et al.*, 1998, Duncan y Ross, 1973, Friis y Feenstra, 1994), la asociación de este microorganismo con otros patógenos respiratorios porcinos representa un factor altamente importante a considerar, debido a la posible implicación en la potenciación de los diferentes cuadros clínicos.

Experimentos *in vitro* empleando cultivos de anillos traqueales porcinos demostraron cómo infecciones concomitantes con SIV pueden dar lugar a incrementos en la concentración de *M. hyorhinis*, además de actuar de forma sinérgica aumentando el daño producido en el epitelio ciliado al compararse con infecciones producidas por cada patógeno de forma independiente (Reed, 1971).

Diferentes estudios llevados a cabo en Japón, demostraron cómo las infecciones concomitantes con el virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSv) y *M. hyorhinis* producen un incremento de la severidad de los cuadros clínicos asociados a infecciones por PRRSv (Kobayashi *et al.*, 1996a), llegando incluso a producir muerte en animales infectados experimentalmente (Kawashima *et al.*, 1996).

Recientemente, diversos análisis de muestras de matadero y de animales infectados clínicamente enfocados principalmente al estudio del CRP, han aportado una mayor claridad sobre el rol de *M. hyorhinis* en procesos neumónicos naturales en el cerdo. Ya Falk en 1991, en un estudio enfocado principalmente al análisis de casos de neumonía enzoótica, halló una estrecha relación entre *M. hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *M. hyorhinis*, al ver cómo pulmones con resultados positivos para estos tres patógenos presentaban las lesiones macroscópicas de mayor grado, además de encontrar un alto porcentaje de pulmones neumónicos donde *M. hyorhinis* era el único agente causal detectado.

Palzer y colaboradores (2008), tras analizar 239 cerdos que mostraban signos clínicos de neumonía, demostró cómo la detección de *M. hyorhinis* era significativamente mayor ($p=0.003$) en el grupo de animales clínicamente enfermos que en el grupo de animales sanos. Además, en

los casos de neumonía, se encontraron asociaciones positivas estadísticamente significativas con otros patógenos, como por ejemplo con *M. hyopneumoniae* ($p < 0.001$). También en Dinamarca, *M. hyorhinis* resultó ser uno de los patógenos aislados con mayor frecuencia tras analizar 148 pulmones de casos asociados a CRP obtenidos en matadero ($p < 0.001$), demostrando el papel de este microorganismo en el complejo respiratorio porcino y su asociación con diferentes agentes infecciosos porcinos (Hansen *et al.*, 2010).

1.2.2.2.3. Presentación clínica

En condiciones naturales, los cuadros de neumonía causados por *M. hyorhinis* se asimilan a los observados en casos de NEP (Gourlay y Howard, 1982), pudiendo apreciarse una bronconeumonía catarral crónica de distribución craneoventral, afectando principalmente a los lóbulos apicales, cardíacos e intermedio y la porción craneal de los lóbulos diafragmáticos

En los casos de poliserositis, la enfermedad se presenta normalmente en animales de tres a diez semanas de edad, y de forma ocasional en animales adultos, apareciendo entre tres y diez días tras la exposición a *M. hyorhinis*. Los principales signos clínicos incluyen fiebre moderada ($40^{\circ}\text{C} - 40.6^{\circ}\text{C}$), cojera, inapetencia, dificultad para moverse, artritis y dificultad respiratoria. Entre tres y seis meses tras el inicio de la infección se observa una reducción en los procesos inflamatorios articulares (Ross, 1999).

Aunque de forma puntual, cabe destacar la implicación de cepas citopatogénicas no cultivables de *M. hyorhinis* en casos de abortos recurrentes asociado a su vez con disminución del

número de hembras gestantes y un ligero aumento en la mortalidad de cerdas primíparas (Shin *et al.*, 2003).

1.2.2.3.1. Infecciones experimentales

Varias infecciones experimentales han sido capaces de demostrar el potencial patogénico de *M. hyorhinis*. Ya Switzer en 1955, en la primera descripción de la especie, demostró la capacidad de esta bacteria para causar pericarditis fibrinosa severa, artritis, pleuritis fibrinosa y peritonitis al inocular intraperitonealmente a lechones de hasta seis semanas de edad.

En un intento por elucidar la capacidad patogénica de *M. hyorhinis*, Kobisch (1983) inoculó, intranasal e intratraquealmente, 25 lechones de dos semanas de edad empleando cepas de campo aisladas de pulmones y articulaciones de cerdos adultos, observando signos clínicos tras una semana postinfección. Las lesiones observadas en necropsia incluyeron adherencias fibrinosas, pleuritis, hipertrofia de la membrana sinovial y pleuritis. Los cambios microscópicos incluyeron inflamación fibrinosa de la membrana serosa con infiltrado de células mononucleares. Friis y Feenstra (1994) fueron capaces de reproducir el cuadro clínico descrito por Kobisch, con la excepción del desarrollo de lesiones articulares. En este caso se empleó una combinación de inoculación intranasal (por spray e instilación) e intraperitoneal en cerdos de tres meses de edad.

Las inoculaciones experimentales destinadas al desarrollo de otitis media en lechones demostraron cómo *M. hyorhinis* es capaz de inducir inflamación moderada autolimitante del conducto auditivo y cavidad timpánica en cerdos SPF de dos a tres semanas de edad (Morita *et al.*, 1998), si bien desapareció a los 14 días post infección (DPI).

El interés por demostrar el papel de *M. hyorhinis* en casos de neumonía ha llevado a numerosos investigadores a desarrollar diferentes modelos de infección respiratoria en cerdos, siendo Goiš y colaboradores (1968a) los primeros en demostrar la capacidad de este microorganismo para causar neumonía tras infectar lechones de 4 a 10 semanas de edad por vía intranasal y por contacto directo con otros animales. Los principales signos clínicos incluyeron rinitis y tos entre los 2 y 8 DPI y, en menor medida, poliartritis.

Macroscópicamente se observaron lesiones neumónicas de consolidación con distribución craneal, pericarditis y peritonitis fibrinosa con abundante exudado. Desde el punto de vista histológico, se encontraron lesiones semejantes a las presentadas en casos de NEP, incluyendo edema alveolar, hiperplasia bronquial y acúmulo perivascular y peribronquiolar de células mononucleares, además de la presentación de folículos linfoides perivasculares y peribronquiales.

La capacidad de producir enfermedad respiratoria en animales gnotobióticos también ha sido evaluada (Friis, 1971b; Poland *et al.*, 1971). Este tipo de modelo, establecido con el fin de evitar posibles efectos sinérgicos entre *M. hyorhinis* y otros posibles agentes patógenos en el cerdo, demostró de forma definitiva la capacidad de este microorganismo de causar poliserositis y cuadros de neumonía similares a NEP.

La mayoría de estas inoculaciones experimentales demostraron que si bien *M. hyorhinis* es capaz de inducir diferentes cuadros clínicos, existe una gran variabilidad entre los aislados y su capacidad para inducir lesiones, variando desde cepas no patógenas hasta cepas altamente virulentas (Kobisch, 1983; Lin *et al.*, 2006).

1.2.2.2.4. Diagnóstico

Debido a la similitud de las lesiones serofibrinosas y articulares con las presentes en infecciones por otros agentes infecciosos como *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis* (Kobisch y Friis, 1996), y la de las presentes en el aparato respiratorio con aquellas causadas por *M. hyopneumoniae*; el poder diagnóstico de casos clínicos causados por *M. hyorhinis* basado en la evaluación patológica es limitado, por lo que necesita apoyarse necesariamente en el uso de técnicas de laboratorio para alcanzar un resultado fiable.

Las muestras de elección para aislamiento y detección en casos que cursan con clínica aguda y subaguda incluyen fluido y membranas sinoviales, hisopos de pericardio y peritoneo, tejido pulmonar y lavados bronquioalveolares (Rosales y Nicholas, 2010).

1.2.2.2.4.1. Cultivo y aislamiento

La detección de *M. hyorhinis* basada en el cultivo y aislamiento se considera como la técnica de diagnóstico de referencia o “gold standard”, y en combinación con técnicas bioquímicas básicas (Poveda, 1998) constituye una herramienta indispensable para el estudio de infecciones causadas por micoplasmas. El medio de Friis (Friis, 1971a) está considerado como el medio de elección para el cultivo de *M. hyorhinis*. En este medio se observa un crecimiento relativamente rápido, apreciándose turbidez y acidificación del medio, con viraje de color a hacia un tono amarillo brillante, entre dos y tres días de incubación a 37 °C. En medio sólido se observan colonias con morfología típica de huevo frito con un diámetro final de 0,5 a 1,0 mm tras

2 - 5 días de incubación. El cultivo es una técnica diagnóstica con una alta especificidad pero baja sensibilidad.

1.2.2.2.4.2. Diagnóstico serológico

Dentro de los ensayos de diagnóstico serológico empleados hasta la fecha, la inhibición del crecimiento y el test de la inhibición del metabolismo representan las técnicas más utilizadas (Goiš, 1968b; Taylor *et al.*, 1971). Otro test, como la aglutinación por látex, desarrollada por Goiš y colaboradores (1972), fue capaz de detectar seroconversión frente a *M. hyorhinis* tras 14 DPI. La hemoaglutinación indirecta también ha sido utilizada con éxito, siendo capaz de detectar anticuerpos específicos hasta 42 DPI (Kobisch, 1983). Hasta la fecha no se ha descrito ningún test serológico basado en Western blotting o ELISA.

1.2.2.2.4.3. Diagnóstico por PCR

Hasta la fecha se han descrito numerosos ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *M. hyorhinis*, destacando las secuencias de ADN específicas del gen ARNr 16S como objetivo mayoritario en estos ensayos (Stemke *et al.*, 1994, Kobayashi *et al.*, 1996a).

Caron y colaboradores (2000) desarrollaron una PCR específica basada en la detección del gen codificante para la proteína p37 de *M. hyorhinis*, aunque aparentemente es menos sensible que el cultivo.

El uso del gen ARNr 16S como diana también ha sido evaluado para la detección múltiple de *M. hyorhinis* junto a otros micoplasmas porcinos, incluyendo *M. hyopneumoniae* (Lin *et al.*, 2006) y *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* (Stakenborg *et al.*, 2006). Otra técnica utilizada ampliamente es la PCR múltiple desarrollada por Tang y colaboradores (2000). Esta técnica, que emplea dos oligonucleótidos universales para la secuencia espaciadora intergénica 16S-23S de bacterias del género *Mycoplasmas* y *Acholeplasma*, es capaz de diferenciar los principales micoplasmas porcinos asociados a cuadros de infección respiratoria y de artritis (*M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*, *M. flocculare*, *M. hyopharyngis*), habiendo sido usada con éxito en estudios epidemiológicos de prevalencia de micoplasmas respiratorios porcinos (Nathues *et al.*, 2011).

Recientemente se ha desarrollado una PCR múltiple capaz de detectar de forma simultánea ocho patógenos respiratorios porcinos diferentes incluyendo *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* además de circovirus porcino tipo 2, citomegalovirus porcino, coronavirus respiratorio porcino, SIV y el genotipo Europeo y Norteamericano del PRRSv (Harder y Huebert, 2004), cuyo uso ha confirmado ser de excelente ayuda en diferentes estudios epidemiológicos (Palzer *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2010).

La técnica de electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE) representa un gran avance en el diagnóstico de enfermedades causadas por micoplasmas. Esta técnica permite la diferenciación de productos específicos obtenidos por PCR tras la amplificación del gen ARNr 16S, mediante el uso de oligonucleótidos para la detección universal de bacterias (McAuliffe *et al.*, 2003) o para la detección específica de mollicutes (McAuliffe *et al.*, 2005), en combinación

con electroforesis del producto amplificado en geles de poliacrilamida con un gradiente de urea. DGGE permite evaluar en una misma reacción la presencia de cultivos mixtos, tanto con diferentes micoplasmas como con otros agentes bacterianos.

1.2.2.2.4.4. Diagnóstico por técnicas inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia indirecta e hibridación *in situ*.

El diagnóstico por IHQ e inmunofluorescencia indirecta ha sido empleado con éxito para la detección de *M. hyorhinis* en diferentes inoculaciones experimentales, tanto en el epitelio auditivo (Morita *et al.*, 1995; Morita *et al.*, 1998) como en tejido pulmonar (Goiš *et al.*, 1971; Kinne *et al.*, 1991; Kawashima *et al.*, 1996). Las técnicas descritas hasta la fecha usan anticuerpos policlonales obtenidos en conejos para la detección de *M. hyorhinis* lo que hace que, debido a la cantidad de componentes antigénicos compartidos entre micoplasmas, su uso no sea recomendado hasta la aparición de anticuerpos monoclonales específicos.

Como alternativa, HIS representa una opción específica, sensible y de bajo coste para la detección de ADN de *M. hyorhinis* en secciones de tejido fijados con formalina, tanto de origen respiratorio (Boye *et al.*, 2001) como en muestras procedentes de cuadros de poliserositis y pericarditis (Kim *et al.*, 2010).

1.2.2.2.5. Profilaxis y control

El rango de antibióticos empleados para tratar las infecciones causadas por *M. hyorhinis* es similar a aquellos que se utilizan para el control de *M. hyopneumoniae*, aunque existen

indicios que demuestran que en algunos casos, el tratamiento de animales clínicamente enfermos puede no resultar del todo satisfactorio (Ross, 1999).

Varios estudios *in vitro* han demostrado la efectividad de un amplio rango de antibióticos frente a *M. hyorhinis*, demostrándose un patrón de concentraciones mínimas inhibitorias común en aislados con diverso origen geográfico y temporal (Williams, 1978; Hannan *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2000).

Los macrólidos tilosina, tilvalosina, josamicina, lincomicina y tiamulina presentan bajas concentraciones inhibitorias frente a *M. hyorhinis* (Aarestrup *et al.*, 1998; Makhanon *et al.*, 2008), pero su utilización debe ser evaluada detenidamente debido a la aparición de cepas resistentes, asociadas a mutaciones en los dominios II y V del ARN ribosómico 23S (Kobayashi *et al.*, 2005).

Las tetraciclinas y fluoroquinolonas presentan niveles de inhibición medio-alto, además de un gran de variabilidad en los valores entre diferentes aislados (Wu *et al.*, 2000). Varios autores han demostrado el desarrollo de mutaciones codificantes para el desarrollo de resistencias frente a tetraciclinas y fluoroquinolonas (Dégrange *et al.*, 2008; Vicca *et al.*, 2007) en micoplasmas, lo que sugiere una posible asociación entre la disminución de la sensibilidad a estos agentes antimicrobianos en *M. hyorhinis*, observada al comparar datos históricos (Kobayashi *et al.*, 1996b; Kobayashi *et al.*, 2005) y el desarrollo de resistencias.

La valnemulina y la tiamulina, agentes antimicrobianos pertenecientes al grupo de las pleuromutilinas, poseen una alta capacidad de inhibición *in vitro* frente a *M. hyorhinis* (Makhanon *et al.*, 2008). Actualmente son ampliamente utilizadas en producción porcina sin que

se haya demostrado una disminución de la sensibilidad en micoplasmas frente a estos antibióticos (Thongkamkoon *et al.*, 2010) por lo que junto con la tilosina y tilmicosina, además de otros macrólidos de nueva generación como la tulatromicina (Nutsch *et al.*, 2005; Godinho, 2008) constituyen los antibióticos de elección para el tratamiento de la infección causada por *M. hyorhinis* en cerdos.

No existen programas de prevención y control frente a *M. hyorhinis* descritos hasta la fecha. El avance de la investigación en el campo del desarrollo vacunal es escaso, aunque se ha demostrado que el uso de vacunas inactivadas en combinación con adyuvantes oleosos administradas por vía intramuscular pueden proporcionar protección en cerdos infectados experimentalmente con *M. hyorhinis* (Lee *et al.*, 2010). También cabe destacar la presencia de una patente que describe la producción de una vacuna combinada con *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* (United States Patent and Trademark Office <http://patft.uspto.gov>, US Patent 7381414), en la que se confirma la protección de animales vacunados tras infección con uno o ambos patógenos de forma simultánea, sin que hasta la fecha exista ninguna publicación científica revisada por pares publicada hasta la fecha confirmando estos datos.

1.2.2.3. *Mycoplasma hyosynoviae*

Ross y Karmon (1970a) realizaron la primera descripción de esta especie, asociándola a cuadros de artritis en cerdos de tres a seis meses de edad.

En medio sólido, *M. hyosynoviae* da lugar a colonias típicas en forma de “huevo frito”, normalmente asociadas a la producción de “películas y cristales”. Bioquímicamente se caracteriza

por metabolizar arginina y ser negativo para las pruebas de metabolización de la urea, fermentación de la glucosa y reducción del tetrazolio. Es un micoplasma de crecimiento rápido, especialmente en medios de cultivo enriquecidos con mucina porcina (Friis *et al.*, 1991; Kobisch y Friis, 1996). El hábitat principal de *M. hyosynoviae* se encuentra en el aparato respiratorio superior del cerdo, principalmente en el área de la tonsila palatina (Ross y Spear, 1973). A partir de esta localización, y de forma hematógena, el organismo es capaz de alcanzar las membranas serosas, con una especial predilección por las membranas sinoviales (Hagedorn-Olsen *et al.*, 1999a), aunque otras membranas serosas, como por ejemplo la membrana pericárdica, pueden verse afectadas (Jensen *et al.*, 1995; Buttenschøn *et al.*, 1997).

Clínicamente, la infección causada por *M. hyosynoviae* se caracteriza por la producción de artritis no purulenta asociada a cojera de moderada a severa. La susceptibilidad a la enfermedad se localiza entre las 10 y 20 semanas de edad, siendo rara su presentación en animales adultos (Ross y Spear, 1973; Kobisch y Friis, 1996). Los signos clínicos más claros incluyen la dificultad de movimiento y animales que permanecen recostados o en posición de perro sentado, mostrándose reacios al movimiento (Ross y Duncan, 1970b). Normalmente no se presenta aumento de la temperatura ni disminución del apetito. Los casos de artritis producidos por este microorganismo rara vez desembocan en una presentación clínica crónica, observándose una recuperación entre una y dos semanas tras el inicio de la cojera (Hagedorn-Olsen *et al.*, 1999b). Dentro de los factores predisponentes para la presentación de la enfermedad cabe destacar factores ambientales, como el tipo de suelo (Ross, 1973) y la mezcla de animales de diferentes edades y origen (Blowey, 1993).

Hasta la fecha se han empleado diferentes técnicas diagnósticas para la detección de anticuerpos frente a *M. hyosynoviae*, aunque sólo la fijación del complemento (Blowey, 1993) y la técnica de ELISA (Nielsen *et al.*, 2005) han sido utilizadas para la detección sistemática de anticuerpos en muestras clínicas. El diagnóstico por PCR es muy limitado, basándose principalmente en técnicas destinadas a la detección del gen ARNr 16S (Arhens *et al.*, 1996) o más recientemente en combinación con la técnica de DGGE (McAuliffe *et al.*, 2005). Además, la técnica de HIS ha demostrado ser de utilidad para la detección específica de *M. hyosynoviae* en tejido porcino (Boye *et al.*, 2001).

Las medidas de control y profilaxis se basan únicamente en medidas de manejo y sobre todo en el uso de antibióticos. El uso de vacunas frente a *M. hyosynoviae* es limitado aunque se ha demostrado una cierta capacidad de protección al usar formulaciones basadas en la tecnología de ISCOM (Lauritsen *et al.*, 2010). Actualmente no existen vacunas comerciales frente a este microorganismo. En lo que respecta a las medidas de manejo, Nielsen y Busch (1998) evaluaron el uso del sistema TD-TF, sin conseguir la desaparición del microorganismo.

Diferentes agentes antimicrobianos han demostrado ser efectivos frente a *M. hyosynoviae* *in vitro*, entre los que destacan la lincomicina, tiamulina y la enrofloxacin (Schultz *et al.*, 2012). A pesar de su acción frente a micoplasmas porcinos, el uso de la tilosina para el tratamiento de infecciones frente a *M. hyosynoviae* está desaconsejado debido a la aparición de resistencias en diferentes cepas de campo (Aarestrup y Friis, 1998).

1.2.2.4. *Mycoplasma suis*

M. suis es un micoplasma hemotrópico que afecta a cerdos produciendo anemia hemolítica inmunomediada (Messick, 2004). Descrito inicialmente en 1950 por Splitter como *Eperythrozoon suis*, ha sido recientemente incluido en el género *Mycoplasma* debido a su relación filogenética con estos microorganismos (Neimark *et al.*, 2001 y 2002)

Desde el punto de vista morfológico, *M. suis* es un microorganismo de carácter pleomórfico, de unos 0.40 a 0.6 μm de diámetro, que se suele presentar en forma de cocos, bacillos o anillos, tanto libres en el plasma (Zachary y Smith, 1985), como en hendiduras formadas en la superficie de glóbulos rojos (Pospischil y Hoffmann, 1982).

La transmisión natural ocurre principalmente debido a acciones mecánicas (agujas o material quirúrgico) (Henry, 1979). También existen evidencias que sugieren el papel de algunos artrópodos en la transmisión de *M. suis*, sin que hasta la fecha se haya podido demostrar definitivamente su papel en la epidemiología de esta enfermedad (Heinritzi, 1990; Messick, 2004). De forma experimental, *M. suis* es capaz de inducir presentación clínica tras inoculación por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal y oral (Hoelzle, 2006).

Las infecciones por *M. suis* presentan una clínica variable. La anemia hemolítica representa el principal signo clínico en cuadros agudos, llegando a ser letal en algunos casos (Messick, 2004). Otros signos clínicos incluyen hipoglucemia, disnea, fiebre, cianosis, ictericia, necrosis del extremo apical de las orejas y disminución de la ganancia de peso (Heinritzi, 1990). En

presentaciones crónicas los principales signos clínicos descritos son anemia, retraso en el crecimiento y disminución de los índices reproductivos (Henry, 1979; Zinn *et al.*, 1983).

Aunque el uso de frotis directo a partir de muestras de sangre ha demostrado ser de gran utilidad para el diagnóstico de *M. suis*, sus limitaciones en cuestión de sensibilidad y especificidad, junto con el desarrollo de técnicas moleculares más robustas, han posicionado al diagnóstico por PCR como la técnica de elección para la detección de *M. suis* a partir tanto de muestras de sangre como de tejidos (Hoelzle *et al.*, 2007a).

Los primeros protocolos de PCR utilizados para la detección de *M. suis* se basan en el uso de ensayos convencionales (Gwaltney *et al.*, 1993; Messick *et al.*, 1999; Hoelzle *et al.*, 2003), aunque actualmente, debido al desarrollo de la PCR a tiempo real, hace que esta última sea la técnica de elección para la detección de ADN específico de *M. suis*. Estudios recientes han demostrado que los ensayos basados en PCR a tiempo real son capaces de proporcionar una sensibilidad cien veces mayor a la obtenida con PCR convencional en la detección de *M. suis* a partir de muestras de sangre (Guimaraes *et al.*, 2011).

El diagnóstico serológico se basa principalmente en el uso de técnicas de ELISA y Western blotting. El uso de técnicas de iELISA con antígeno completo ha demostrado ser de utilidad para la detección de anticuerpos específicos frente a *M. suis* (Hsu *et al.*, 1992), aunque estudios recientes han confirmado cómo ensayos basados en el uso de proteínas recombinantes, entre las que se incluyen una proteína de choque térmico (HspA1), una adhesina localizada en la membrana celular (MSG1) y el gen codificante para pirofosfatasa inorgánica (ppi), proporcionan

una mayor sensibilidad y especificidad al compararlos tanto frente al iELISA de antígeno completo como a técnicas de hemoaglutinación indirecta (Hoelzle *et al.*, 2007b; Liu *et al.*, 2011).

El tratamiento de elección para infecciones por *M. suis* se basa en el uso de tetraciclinas (Hoelzle, 2008), aunque existe evidencia que corrobora que, aun siendo capaces de controlar la enfermedad, no tienen el poder de eliminar al microorganismo, dando por lo tanto lugar a animales infectados de forma persistente, los cuales juegan un papel importantísimo en el mantenimiento y transmisión de la enfermedad (Gresham *et al.*, 1994).

1.2.2.5. *Mycoplasma flocculare*

M. flocculare se encuentra comúnmente localizado en el aparato respiratorio superior del cerdo. Posee una distribución mundial y hasta la fecha no se ha demostrado su capacidad patogénica, por lo que su importancia se limita únicamente a la similitud que presenta con *M. hyopneumoniae* (Kobisch y Friis, 1996).

Este microorganismo, descrito por primera vez por Meyling y Friis (1972), toma su nombre del característico crecimiento micelar que produce en medio líquido, dando lugar a la formación de pequeñas partículas o flóculos, que pueden observarse a simple vista o más en detalle empleando microscopía electrónica y de contraste de fase (Hovind-Hougen y Friis, 1991).

Además de los pulmones, la cavidad nasal (Kobisch y Friis, 1996) y el saco conjuntival (Friis, 1970) representan los principales órganos diana de *M. flocculare*.

El cultivo y aislamiento se asemeja en gran medida al empleado para otros micoplasmas porcinos, siendo el medio de Friis (Friis, 1971) el de elección para este microorganismo. Las principales diferencias en el cultivo radican en un crecimiento lento en comparación con *M. hyopneumoniae*, además de una mayor capacidad para metabolizar la glucosa, dando lugar a niveles de pH cercanos a 6.0 (Jensen *et al.*, 1978).

El diagnóstico molecular de *M. flocculare* está poco desarrollado, habiéndose descrito hasta la fecha un número limitado de ensayos basados únicamente en la detección de secuencias específicas del gen ARNr 16S por PCR convencional (Stemke *et al.*, 1994) o por la técnica PCR/DGGE (McAuliffe *et al.*, 2005).

1.2.2.6. *Mycoplasma hyopharyngis*

M. hyopharyngis fue aislado inicialmente a partir de muestras rutinarias del tracto respiratorio superior de cerdos clínicamente sanos (Erickson *et al.*, 1986). Además del tracto respiratorio superior, las articulaciones han demostrado ser otro órgano diana para este microorganismo (Bradbury *et al.*, 1994). No existe hasta la fecha asociación con ningún cuadro clínico.

Al igual que *M. hyosynoviae*, *M. hyopharyngis* presenta como principal característica de cultivo *in vitro* su capacidad para metabolizar la arginina además de producir “películas y cristales” en medio sólido.

Desde el punto de vista filogenético, y basado en análisis del gen ARNr 16S, *M. hyopharyngis* se localiza en el grupo *lipophilum*, formando parte a su vez del cluster bovis-

lipophilum (Volkhov *et al.*, 2012), lo que sugiere que este microorganismo se ha visto sometido a un proceso evolutivo completamente diferente al seguido por la mayoría de los micoplasma porcinos (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. flocculare*), cuya filogenia está estrechamente relacionada entre sí (Blank *et al.*, 1996).

1.2.3. Técnicas de tipificación molecular aplicadas al estudio de micoplasmas

1.2.3.1. Introducción a la tipificación bacteriana

Las técnicas de tipificación genética bacteriana, conocidas comúnmente como tipificación molecular, nacen como alternativa a los métodos de caracterización basados en las técnicas de fenotipado, ya que, aunque estos últimos son todavía de gran utilidad en numerosas aplicaciones de la microbiología, carecen de la capacidad discriminatoria necesaria para ser utilizados de forma efectiva en estudios de epidemiología bacteriana (Tenover *et al.*, 1997). El tipificado molecular permite otorgar un perfil único a microorganismos, una especie de huella dactilar bacteriana aplicable a nivel de género, o más comúnmente, de especie.

Estas técnicas representan una herramienta esencial entre diferentes disciplinas de la microbiología moderna, entre las que se encuentran la taxonomía, genética evolutiva y epidemiología molecular (Van Belkum *et al.*, 2001).

La epidemiología molecular constituye la principal aplicación de las técnicas de tipificación molecular en el campo de la microbiología, pudiendo dividirse a su vez en epidemiología molecular descriptiva o intervencionista (García de Viedma *et al.*, 2011). La epidemiología molecular descriptiva recopila diferentes tipos de información epidemiológica que en

combinación con perfiles moleculares permite analizar de forma retrospectiva diferentes escenarios y proporcionar una idea de diferentes parámetros de epidemiología bacteriana tales como variabilidad, distribución, asociación a determinadas presentaciones clínicas, emergencia o re-emergencia de perfiles específicos, etc. La epidemiología molecular intervencionista combina lo mejor de los sistemas descriptivos con técnicas de tipificación capaces de proporcionar información cercana al tiempo real, permitiendo identificar el origen de infecciones en curso y ayudando a la toma de decisiones intervencionistas efectivas y eficientes. Por lo general, los sistemas intervencionistas se basan en técnicas de tipificación basadas en secuenciación, normalmente en combinación con técnicas de sub-tipificación que pueden proporcionar una mayor definición en la caracterización de microorganismos.

Generalmente la terminología utilizada para la definición de los principales componentes de la epidemiología molecular bacteriana ha sido bastante variable. En 2007, Van Belkum y colaboradores establecieron un glosario con diferentes definiciones modelo empleadas en el campo de la tipificación molecular con el fin de armonizar el uso por parte de cualquier profesional involucrado en este campo de la ciencia. A continuación se describen las principales definiciones que se utilizan en tipificación bacteriana:

- Complejo/grupo clonal: grupo de aislados bacterianos con un alto grado de similitud.

- Clon: Aislado bacteriano, que, aunque cultivado a partir de diferentes muestras, localizaciones geográficas, períodos de tiempo, etc. presenta características idénticas desde el punto de vista genéticas y fenotípicas a otras poblaciones, por lo que la única explicación es que dicho clon o clones presenten un origen común.

- Dendrograma: Ilustración en forma de ramificación que representa de forma gráfica resultados de análisis de clústeres a partir de datos binarios obtenidos en diferentes sistemas de tipificación.

- Árbol filogenético: Diagrama que representa relaciones filogenéticas hipotéticas (historia evolutiva) del taxón bajo estudio.

- Genotipo: Composición genética de un microorganismo basado en datos obtenidos a partir de un sistema de tipificación molecular.

- Aislado: Población de células bacterianas presentes en cultivo puro y obtenido a partir de una colonia individual. En el campo de la microbiología clínica, los aislados se obtienen normalmente a partir de cultivos primarios obtenidos a partir de una muestra clínica de un solo individuo.

- Cepa: Descendientes de un aislado único obtenido a partir de un cultivo puro.

- Tipificación: Análisis de la variación genética o fenotípica de aislados bacterianos realizado a nivel de especie o subespecie con el fin de generar marcadores específicos o conjuntos de datos que pueden ser empleados en estudios de transmisión bacteriana, análisis de reservorios, etc.

Aunque desde el punto de vista de la sanidad animal existen limitadas aplicaciones donde la epidemiología molecular es utilizada más allá de estudios de tipo descriptivo, es en el campo de la salud pública donde existen múltiples evidencias que demuestran cómo esta rama de la

epidemiología puede formar partir del repertorio común de técnicas empleadas en estudios epidemiológicos (Tauxe, 2006).

Dentro de los beneficios de la epidemiología molecular demostrados en el campo de la salud pública cabe destacar un aumento en la capacidad de detectar brotes de enfermedad, llegando a observarse aumentos de hasta un 40 % en la capacidad de localizar brotes que en caso de haber sido estudios a través de técnicas epidemiológicas tradicionales hubieran pasado desapercibidos (Bender *et al.*, 1997). Otro de los grandes beneficios es la habilidad de detectar brotes de enfermedad en estadios tempranos. Por ejemplo, se cree que esta capacidad, en combinación con otras herramientas epidemiológicas, ha sido capaz de reducir el número de brotes clínicos producidos por *Escherichia coli* O157:H7 en Estados Unidos hasta un nivel cercano al 60 % (Rangel *et al.*, 2005).

1.2.3.2. Principales técnicas de tipificación bacteriana aplicadas al estudio de micoplasmas

El uso y aplicación de técnicas de tipificación molecular en micoplasmología, al igual que el anteriormente expuesto en el caso de la sanidad animal, se ha basado de forma general en estudios de tipo descriptivo no intervencionistas.

Aunque existe una gran variedad de técnicas aplicadas a la tipificación bacteriana, la mayor parte de ellas se encuentran representadas de alguna manera en aplicaciones destinadas al estudio de los micoplasmas (Stakenborg *et al.*, 2006). Esta gran variedad de técnicas se ha desarrollado de forma paralela a la evolución del conocimiento en microbiología, progresando con

el interés principal de desarrollar técnicas reproducibles, capaces de ser compartidas por investigadores en diferentes lugares del mundo con un coste asequible, siempre teniendo en cuenta una capacidad de discriminación adecuada entre poblaciones (Tenover *et al.*, 1997).

Técnica	Tipabilidad	Reproducibilidad	Poder de discriminación	Facilidad técnica	Interpretación	Disponibilidad	Coste
PFGE	Excelente	Excelente	Excelente	Buena	Buena	Variable	Alto
RAPD	Excelente	Baja	Excelente	Buena	Regular	Buena	Bajo
AFLP	Excelente	Buena	Excelente	Buena	Regular	Baja	Alto
VNTR	Excelente	Excelente	Excelente	Buena	Buena	Buena	Regular
MLST	Óptima	Excelente	Excelente	Difícil	Excelente	Baja	Alto

Tabla 1.4. Principales técnicas de tipificación molecular empleadas en microbiología (modificado de Van Belkum *et al.* 2001)

Las principales técnicas de tipificación bacteriana se encuentran reflejadas en la tabla 1.4. Se considera que la técnica de tipificación molecular ideal debe presentar una tipabilidad (porcentaje de aislados tipificados positivamente), reproducibilidad y poder discriminatorio (capacidad de diferenciar entre cepas de origen diferente) óptimo.

A la hora de diferenciar las técnicas de tipificación bacteriana existen diferentes clasificaciones, aunque quizás la mejor sea la descrita por Li y colaboradores en 2009. Esta clasificación divide a las técnicas en tres grupos diferentes:

- Métodos basados en el análisis del tamaño de las bandas de ADN. Esta categoría presenta a su vez dos subdivisiones:
 - Análisis de bandas obtenidas tras digestión enzimática.
 - Análisis de bandas obtenidas tras amplificación del ADN.
- Métodos basados en el análisis de secuencias de ADN.
- Métodos basados en la hibridación de sondas de oligonucleótidos marcadas.

1.2.3.2.1. Métodos basados en el tamaño de las bandas de ADN obtenidas tras digestión enzimática o amplificación.

En esta categoría se incluye la gran mayoría de las técnicas de tipificación empleadas hasta la fecha en el estudio de micoplasmas, debido principalmente a su facilidad de realización, coste y reproducibilidad en la mayoría de los casos.

El análisis de bandas de ADN representa una forma sencilla de otorgar un perfil único a un microorganismo.

Gracias a la gran disponibilidad y bajo coste de la técnica de PCR, los métodos basados en este sistema presentan una gran aceptación, siendo la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico o RAPD (Williams *et al.*, 1990) y el análisis de repeticiones en tándem de número variable o VNTR (Van Belkum *et al.*, 1997) los ejemplos más destacados.

Las enzimas de restricción son endonucleasas aisladas de bacterias y arqueobacterias capaces de escindir fragmentos de ADN tras reconocer combinaciones de nucleótidos específicas denominados sitios de restricción (Smith y Wilcox, 1970, Roberts, 2005). Al igual que en el caso de la PCR, estas enzimas presentan un bajo coste y amplia disponibilidad.

En tipificación bacteriana, estas enzimas se han utilizado en diferentes sistemas, tanto por sí solas, como en el caso de la electroforesis en gel de campo pulsado o PFGE (Schwartz y Cantor, 1984) o en procesos de restricción combinados con la técnica de PCR, como en el caso de el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados de ADN o AFLP (Vos *et al.*, 1995) y análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Frost *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1991; Cousin-Allery *et al.*, 2000; Dorigo-Zetsma *et al.*, 2000).

1.2.3.2.1.1. Métodos basados en el análisis de bandas obtenidas por la técnica de la PCR.

1.2.3.2.1.1.1. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

Esta técnica, abreviada comúnmente como RAPD (del inglés *random amplified polymorphic DNA*) o AP-PCR (*arbitrarily primed PCR*), fue descrita por primera vez por Williams y colaboradores (1990) con el fin de caracterizar ADN de plantas y humanos, siendo posteriormente Welsh y McClelland en 1990 los que demostraron por primera vez su potencial para la tipificación de microorganismos aplicándola al estudio de cepas de estafilococos y estreptococos.

La técnica de RAPD se basa en el uso de un solo oligonucleótido o *primer* no específico y relativamente corto (sobre 10 bases) que es capaz de unirse de forma aleatoria al ADN sujeto de

estudio, el cual es posteriormente amplificado por PCR. Con el fin de mejorar la capacidad de unión del primer al ADN molde se emplea una variación de la PCR denominada PCR de baja astringencia, en la que se usan temperaturas de alineación o *annealing* más bajas de lo normal con el fin de potenciar la unión al azar del oligonucleótido al ADN molde. Esta característica permite el uso de oligonucleótidos no específicos que pueden hibridar con varias regiones del ADN diana dando lugar a productos de PCR de diferentes tamaños de forma sencilla y en un solo paso.

Es una técnica rápida y sencilla que requiere poco equipamiento y ningún análisis o conocimiento previo de las secuencias de ADN a estudiar. Como contrapartida, debido a las características intrínsecas asociadas a esta técnica, presenta una baja reproducibilidad entre laboratorios por lo que su uso como técnica de tipificación de referencia queda descartada (Penner *et al.*, 1993).

En lo que respecta a su uso en el estudio de micoplasmas esta técnica ha gozado de una amplia difusión habiéndose aplicado con éxito en el estudio de *M. hyopneumoniae* (Artiushin y Minion, 1996; Nathues *et al.*, 2011), *M. bovis* (Butler *et al.*, 2001; McAuliffe *et al.*, 2004; Pinho *et al.*, 2012), *M. ovipneumoniae* (Parham *et al.*, 2006), *M. cynos* (Mannering *et al.*, 2009), siendo su uso en el análisis de cepas de micoplasmas de origen aviar donde esta técnica ha gozado del mayor éxito, evidenciando una gran heterogeneidad ente aislados y además de demostrar una posible transmisión horizontal en determinados casos de brotes de enfermedad en aves (Geary *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1995; Ley *et al.*, 1997; Charlton *et al.*, 1999; Pillai *et al.*, 2003).

Además de en estudios de epidemiología molecular, RAPD también ha sido empleada como una herramienta indicativa de la virulencia de cepas de *M. hyopneumoniae*, demostrándose la asociación entre la presencia de una banda de 5000 pares bases de peso molecular y cepas de moderada a alta virulencia (Vicca *et al.*, 2003).

1.2.3.2.1.1.2. Análisis de repeticiones en tándem de número variable.

La técnica de análisis de repeticiones en tándem de número variable, también conocida como VNTR (*variable number tandem repeat*) o MLVA (*multi-locus tandem repeat analysis*) representa una de las técnicas de tipificación bacteriana más extendidas a nivel actual. Descrita inicialmente por Van Belkum y colaboradores (1997a y 1997b), ha sido aplicada para la caracterización de multitud de especies bacterianas de gran importancia desde el punto de vista veterinario y de la salud pública, entre los que se encuentran *Staphylococcus aureus* (Sabat *et al.*, 2003), *Bacillus anthracis* (Keim *et al.*, 2000) y *Mycobacterium tuberculosis*, considerándose actualmente como la técnica de tipificación de referencia global para este último microorganismo (Supply *et al.*, 2006).

El motivo del éxito actual de esta técnica reside en la rapidez y facilidad de realización junto con su reproducibilidad y coste relativo (Lindstedt, 2005; Van Belkum, 2006). Otro de sus grandes beneficios ha sido el desarrollo de numerosas bases de datos en línea de libre acceso que permiten el diseño, análisis de sistemas de tipificación basados en VNTR además de permitir la recopilación y comparación de datos de laboratorios diferentes a través del uso de internet (Denoeud y Vergnaud, 2004; Allix-Béguec *et al.*, 2008).

Metodológicamente, la técnica de VNTR se basa en el análisis del tamaño de fragmentos de ADN correspondientes a zonas repetitivas encontradas en el genoma y amplificadas a través de la técnica de PCR. Una vez amplificadas, estos fragmentos se pueden analizar por medio de geles de agarosa y secuenciación capilar, o por otras aplicaciones menos comunes como los chips de ADN y espectrometría de masas (Van Belkum *et al.*, 2006).

La principal limitación de esta técnica es la necesidad de conocer la secuencia completa de ADN del microorganismo a estudiar, por lo que hasta la fecha se ha aplicado solamente a un reducido número de especies de micoplasmas, siendo *M. pneumoniae* (Dégrange *et al.*, 2009), *M. genitalium* (Cazanave *et al.*, 2012), *M. bovis* (Pinho *et al.*, 2012), *M. agalactiae* (McAuliffe *et al.*, 2008), *M. mycoides* subesp. *mycoides* SC (McAuliffe *et al.*, 2007), *M. hyopneumoniae* (Vranckx *et al.*, 2011) las únicas especies caracterizadas hasta la fecha gracias a ella. La técnica de VNTR ha demostrado también su aplicabilidad para el estudio de cuadros endémicos y brotes de enfermedad de forma efectiva gracias a su alto poder discriminatorio (Pereyre *et al.*, 2012).

1.2.3.2.1.2. Métodos basados en el análisis de bandas obtenidas tras digestión enzimática.

1.2.3.2.1.2.1. Electroforesis en gel de campo pulsado.

La electroforesis en gel de campo pulsado o PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) es la técnica de tipificación más utilizada hasta la fecha en el campo de la microbiología bacteriana, siendo considerada como la técnica de tipificación de referencia estándar (Goering, 2010). Su éxito, a pesar de ser técnicamente más compleja que otras como RAPD o VNTR, se debe a su gran

reproducibilidad y sobre todo al papel desarrollado por PulseNet, la primera base de datos dedicada a la estandarización y recopilación de perfiles de PFGE, disponible gracias a una iniciativa de centro de control y prevención de enfermedades (CDC) de Atlanta, Estados Unidos, desde 1996 (Rangel *et al.*, 2006).

Ya que no es necesario conocer la secuencia de ADN del microorganismo a estudiar o el desarrollo alguno de oligonucleótidos específicos, la capacidad de aplicar esta técnica se basa simplemente en una serie de requisitos de tipo técnico, que aunque de fácil realización requieren una gran mano de obra en comparación con otras técnicas de tipificación. Básicamente, la bacteria en estudio es cultivada hasta alcanzar una alta concentración de ADN. Entonces las células intactas son recolectadas e incluidas en pequeños bloques de agarosa, que posteriormente serán sometidos a un proceso de restricción enzimática con el fin de escindir el genoma del microorganismo en múltiples fragmentos de ADN que serán sometidos a una electroforesis con cambios de voltaje o fase (electroforesis de campo pulsado) en gel de agarosa dando a lugar a perfiles específicos de ADN (Goering, 2010).

En el campo de la micoplasmología la PFGE se ha aplicado de forma generalizada a la gran mayoría de especies patógenas (ver tabla 1.5).

Como una de sus principales aplicaciones en micoplasmas destaca el estudio de variabilidad a nivel de individuo, donde se ha podido demostrar cómo cepas pueden persistir durante largos periodos en el mismo individuo con cambios mínimos o inexistentes en su perfil de PFGE (Jensen *et al.*, 1998) o a nivel de granja, donde aislados obtenidos dentro del mismo

recinto presentan el mismo perfil de ADN a pesar de gran variabilidad intraespecífica presente en la especie de estudio (Kokotovic *et al.*, 2002).

Especie	Enzimas de restricción usadas	Año	Referencia
<i>M. agalactiae</i>	<i>SmaI, EclXI, BsiWI, MluI, BssHII, Sall, XhoI, NruI, ApaI</i>	1999	Tola <i>et al.</i>
<i>M. bovis</i>	<i>SmaI, EclXI, BsiWI, MluI, BssHII, Sall, XhoI, NruI, ApaI</i>	1999	Tola <i>et al.</i>
<i>M. capricolum</i> subesp. <i>capripneumoniae</i>	<i>BglII, BamHI, EcoRI, HindIII, NheI, PstI, SmaI and XbaI</i>	2001	Kusiluka <i>et al.</i>
<i>M. fermentans</i>	<i>EcoRI, HindIII y XbaI</i>	1998	Schaeffer <i>et al.</i>
<i>M. gallisepticum</i>	<i>SmaI</i>	2001	Marois <i>et al.</i> (a)
<i>M. hominis</i>	<i>SmaI, BamHI, XhoI, Sall, ApaI</i>	1992	Ladefoged y Christiansen
<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>ApaI, Sall</i>	2005	Stakenborg <i>et al.</i>
<i>M. hyosynoviae</i>	<i>BssHII</i>	2002	Kokotovic <i>et al.</i>
<i>M. mycoides</i> subesp. <i>capri</i>	<i>AviII, BamHI, BlnI, BsiWI, KpnI, SmaI, MluI, Sall, NaeI, SphI, NcoI, StuI</i>	2007	Tardy <i>et al.</i>
<i>M. mycoides</i> subesp. <i>mycoides</i> SC	<i>BglII, BamHI, EcoRI, HindIII, NheI, PstI, SmaI, XbaI, ApaI, NaeI, Sall, Sau3AI, XhoI</i>	2001	Kusiluka <i>et al.</i>
<i>M. pneumoniae</i>	<i>ApaI, Aval, NciI, BglI, NaeI, SacII, SmaI, XhoI and SstII</i>	2000	Cousin-Allery <i>et al.</i>
<i>M. synoviae</i>	<i>SmaI</i>	2001	Marois <i>et al.</i> (b)

Tabla 1.5. Uso de PFGE para la tipificación de las principales especies patógenas de micoplasmas

En lo que se refiere a estudios de variabilidad entre aislados, los resultados obtenidos dependen de la especie de micoplasma estudiado. Por ejemplo, en el caso de *M. agalactiae* se ha demostrado una gran homogeneidad entre aislados relacionados estrechamente (Tola *et al.*, 1996; Solsona *et al.*, 1996), algo que ha sido confirmado igualmente en el caso de *M. mycoides* subesp. *mycoides* SC y *M. capricolum* subesp. *capripneumoniae* (Kusiluka *et al.*, 2001) y *M. hyopneumoniae* (Stakenborg *et al.*, 2005). Sin embargo, en el caso de *M. bovis* (McAuliffe *et al.*, 2004), al igual que en *M. hyosynoviae*, se ha demostrado una gran variabilidad intraespecie,

demonstrando la influencia de la especie y de su nivel de conservación en los resultados obtenidos a través de PFGE.

1.2.3.2.1.2.2. Análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados de ADN.

El análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados de ADN o AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) es una técnica de tipificación diseñada en 1995 por Vos y colaboradores y supone una de las técnicas de tipificación más robustas y con mayor poder de discriminación descritas. Otra de las ventajas de AFLP es que puede usarse sin conocimiento previo de las secuencias de ADN a estudiar. A pesar de estos aspectos positivos, el gran inconveniente de su elevado coste y limitada distribución a nivel científico hace que su aplicación al estudio de micoplasma haya sido limitada y actualmente sea una técnica en desuso.

Esta técnica combina el uso de enzimas de restricción de corte frecuente y corte raro o infrecuente con PCR específica que es aplicada posteriormente a los fragmentos de ADN obtenidos tras digestión enzimática. La PCR específica es realizada gracias a un proceso previo de ligación de los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción a adaptadores de ADN con secuencia conocida, frente a los que se han diseñado oligonucleótidos específicos. Una vez amplificados los fragmentos de ADN obtenidos por restricción, éstos pueden ser detectados por diferentes técnicas, siendo la secuenciación capilar el método de preferencia (Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Aunque la técnica de AFLP se ha aplicado con éxito en *M. hyopneumoniae* (Kokotovic *et al.*, 1999), *M. bovis* (Kusiluka *et al.*, 2000; McAuliffe *et al.*, 2004) y *M. capricolum* subesp. *capripneumoniae* (Kokotovic *et al.*, 2000), es en el estudio de los micoplasmas aviáres, y más particularmente en el caso de *M. gallisepticum*, donde AFLP ha demostrado ser una herramienta extremadamente útil. Usando esta técnica para analizar la evolución de la epidemia iniciada por este microorganismo en Estados Unidos en 1994 y apoyándose en los datos obtenidos por tipificación, la AFLP ayudó a confirmar la teoría de un origen único de la epidemia y la posible introducción de una cepa epidémica independiente en 2001, demostrando su utilidad en estudios de tipo epidemiológico (Cherry *et al.*, 2006).

1.2.3.2.1.2.3. Análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción tras PCR.

Esta técnica, denominada comúnmente como PCR-RFLP (*polimerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) es una técnica sencilla que combina un proceso previo de amplificación por PCR de una secuencia de ADN diana seguido de una reacción enzimática de restricción del ADN amplificado. Debido a su naturaleza, esta técnica presenta una limitada capacidad discriminadora, ya que sólo podrán llegar a estudiarse aquellas mutaciones presentes en el gen de estudio. En micoplasmas, la PCR-RFLP se ha usado para distinguir entre cepas de *M. pneumoniae* tras análisis del gen P1 (Cousin-Allery *et al.*, 2000) o como herramienta para la diferenciación de cepas australianas y africanas de *M. mycoides* subesp. *mycoides* SC gracias a una mutación mutua de un solo nucleótido en el gen *bgl* (Vilei y Frey, 2004).

1.2.3.2.2. Métodos basados en análisis de secuencias de ADN

1.2.3.2.2.1. Análisis de secuencias de genes sencillos

En el análisis de genes sencillos, donde la información obtenida se limita al análisis de un único gen, presenta ciertas limitaciones desde el punto de vista de la tipificación molecular debido principalmente a la limitada información presente en la secuencia de un solo gen en lo que respecta a variabilidad intraespecífica.

Sin embargo esta limitación en el campo de la tipificación se torna en ventaja al aplicarse al área de la taxonomía bacteria, donde la secuenciación de genes únicos, y más en particular en el caso del gen ARNr 16S, supone la principal base de la clasificación biológica actual compuesta por tres dominios y establecida por Woese y colaboradores en 1990. Además este gen supone una de las principales herramientas usadas en la clasificación taxonómica de micoplasmas descritas hasta la fecha (Johansson *et al.*, 1998)

Aun así, varios trabajos han demostrado la aplicabilidad de esta técnica a la tipificación de micoplasmas. Por ejemplo, el análisis del número de repeticiones del aminoácido serina presentes en secuencias del gen p146 se ha usado satisfactoriamente para el análisis de cepas de *M. hyopneumoniae*, ayudando a demostrar la presencia de cepas específicas o clones responsables de brotes locales de NEP (Mayor *et al.*, 2007).

1.2.3.2.2. Tipificación multilocus de secuencias

Esta técnica, más conocida como MLST (*Multilocus sequence typing*) representa el sistema de tipificación con un mayor nivel de desarrollo en la actualidad. MLST se basa en el análisis de variaciones puntuales en secuencias de genes constitutivos o de mantenimiento (*housekeeping genes*). Estos genes se encuentran sometidos a una baja presión selectiva por lo que cualquier variación se asocia a cambios evolutivos (Maiden *et al.*, 1998).

La principal ventaja de esta técnica reside en su reproducibilidad y en la capacidad de compartir los datos producidos de forma rápida y eficaz con otros investigadores gracias a la presencia de bases de datos gratuitas dedicadas a este objetivo (Chan *et al.*, 2001). En lo que respecta al campo de la epidemiología molecular, esta técnica tiende a ser la de elección en casos de epidemiología molecular intervencionista, ya que gracias al nivel de automatización en la secuenciación de ADN desarrollado en la actualidad, los datos obtenidos a través de MLST pueden llegar a usarse de forma muy rápida en la toma de decisiones que pueden afectar a la identificación y control de brotes de enfermedad (Urwin y Maiden, 2003).

M. hyopneumoniae y *M. agalactiae* son hasta la fecha los dos únicos ejemplos aplicados de esquemas de MLST aplicados al estudio de micoplasmas (Mayor *et al.*, 2008; McAuliffe *et al.*, 2011). En ambos casos se observó una limitada distribución clonal de los aislados analizados. Además, en el caso de *M. hyopneumoniae*, se pudo demostrar gracias a esta técnica la presencia de un solo clon en aquellas granjas afectadas con NEP.

1.2.3.2.3. Métodos basados en la hibridación de sondas de oligonucleótidos marcadas.

Los métodos de tipificación basados en hibridación se fundamentan en el uso de la técnica de Southern blotting (Southern, 1975) tras digestión enzimática con enzimas de restricción. La combinación de estas dos técnicas junto con un proceso de hibridación con oligonucleótidos marcados con isótopos radioactivos, o más comúnmente con digoxigenina, permiten la detección de fragmentos específicos de ADN distribuidos a lo largo del genoma bacteriano.

La gran exigencia técnica y la duración del protocolo completo para desarrollar métodos basados en hibridación hicieron que, con el desarrollo de otras técnicas más rápidas como el caso de PFGE, el uso de ensayos que necesitaban del Southern blotting se redujera en gran medida.

Uno de los primeros indicios de la aplicación de esta técnica con el fin de tipificar diferentes especies de micoplasma proviene de Razin y colaboradores en 1983, siendo probablemente el primer ejemplo de cómo técnicas de biología molecular se pueden emplear para tipificar microorganismos de la clase *Mollicutes*. Donde esta técnica gozó también de un gran uso para la tipificación de *Mollicutes* fue en aquellos sistemas que buscaban evaluar la dispersión de secuencias de inserción (Mahillon y Chandler, 1998) a lo largo del genoma de estos microorganismos. La detección de estas secuencias móviles permitió el desarrollo de numerosos sistemas de tipificación que han demostrado ser muy útiles en una gran variedad de especies de micoplasma entre los que destacan *M. mycoides* subesp. *mycoides* SC, *M. agalactiae* y *M. bovis* (Cheng *et al.*, 1995; Pilo *et al.*, 2003; Miles *et al.*, 2005).

Capítulo 2

Análisis de la variabilidad genética y
proteica de cepas de campo de

Mycoplasma hyorhinis

2.1. Introducción

El análisis de la variabilidad genética y proteica de microorganismos representa un elemento esencial en el estudio de la epidemiología microbiana (Van Belkum *et al.*, 2001). Debido a la importancia que el estudio de distribución de microorganismos tiene en el campo de la salud pública y animal, se hace imprescindible el desarrollo de herramientas de tipificación para analizar aquellos microorganismos con implicaciones clínicas en cualquiera de estos dos campos de la salud.

M. hyorhinis es un microorganismo aislado comúnmente en el tracto respiratorio superior de cerdos. Históricamente su asociación con cuadros clínicos de enfermedad se ha caracterizado principalmente por la producción de cojeras, además de demostrarse su capacidad de producir casos de otitis media, poliserositis y en menor medida, neumonía (Kobisch y Friis, 1996). Recientemente varios estudios longitudinales enfocados al análisis de la relación entre patógenos presentes en el CRP (Palzer *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2010) han demostrado el importante rol que *M. hyorhinis* juega en este complejo de enfermedades, lo que ha elevado la trascendencia de este patógeno en la sanidad del ganado porcino.

En lo que respecta a la tipificación y caracterización antigénica de *M. hyorhinis*, la investigación enfocada a su análisis se ha limitado únicamente a pequeños estudios de variabilidad genética basados en PFGE (Kobisch, 1983; Lin y Weng, 2008) con resultados poco concluyentes.

Con estos antecedentes decidimos enfocar este primer capítulo en el desarrollo y análisis del uso potencial de diferentes tipos de técnicas de tipificación aplicadas al análisis de *M. hyorhinis*, además de evaluar la variabilidad antigénica de este microorganismo por medio de la técnica de Western blotting.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Aislados

Todos los aislados analizados con cada una de las técnicas desarrolladas en este capítulo se encuentran representados en el anexo 2.1 de esta tesis.

2.2.2. Western blotting

2.2.2.1. Obtención y cuantificación de antígenos

Las cepas descritas en el anexo 2.1 fueron cultivadas en medio de Friis (anexo 2.2) a 37 °C en volúmenes de 40 ml. Una vez alcanzada la fase logarítmica de crecimiento, los cultivos fueron centrifugados a 8000 rpm durante 30 minutos. El pellet celular obtenido fue entonces transferido a tubos de plástico de 2 ml de volumen total y lavados por triplicado en PBS estéril 0.1M pH 7.4 (anexo 2.3), esta vez usando velocidad de centrifugación de 14.000 rpm. Todo el proceso de lavado y recolección de células se realizó a 4 °C.

Tras el último lavado, las células recolectadas fueron resuspendidas en PBS estéril 0.1M pH 7.4 usando 1/200 del volumen inicial de cultivo. En este punto se tomó 30 µl de la suspensión que fueron reservados para posterior cuantificación de la concentración proteica.

Las células recolectadas se conservaron a -80 °C hasta la preparación del antígeno para electroforesis.

La estimación de la concentración proteica se realizó usando un kit comercial basado el método del ácido bicinónico y siguiendo las instrucciones del fabricante (BCA protein estimation kit - Pierce).

2.2.2.2. Preparación de geles, muestras y SDS PAGE

Para nuestro trabajo empleamos geles de acrilamida al 10 % los cuales se prepararon usando el sistema de electroforesis PROTEAN® II xi Cell (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la tabla 2.1 se exponen los volúmenes de reactivos utilizados para preparar los geles de 15 x 15 centímetros con separadores de 1.5 mm empleados en nuestro trabajo.

Una vez preparado el gel de resolución al 10 %, éste se dejó solidificar para proceder a la adición de gel de carga al 4 % al que se le insertó un peine de 15 pocillos (5 mm/pocillo) antes de que solidificara y evitando la formación de burbujas.

Reactivos	Gel de resolución		Gel de carga
	1 geles 10 %	2 geles 10 %	2 geles 4 %
Acrilamida 30 %	16.6 ml	33.2 ml	5.2 ml
Agua HPLC	20.2 ml	40.4 ml	24.4 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	12.5 ml	25 ml	-
0.5M Tris-HCl pH 6.8	-	-	10 ml
SDS 10 %	500 µl	1 ml	200 µl
APS 10 %	250 µl	500 µl	200 µl
TEMED	50 µl	100 µl	20 µl

Tabla 2.1. Volumen de reactivos usados para la preparación de geles de acrilamida

Tras calcular la concentración de proteínas en cada una de las muestras, éstas se ajustaron a una concentración de 2.5 µg por µl empleando PBS estéril 0.1 M pH 7.4. Con el fin de preparar las muestras para electroforesis se combinó un total de 10 µl de muestra (25 µg de proteína total) con 10 µl de búfer de Laemmli (Sigma-Aldrich). Una vez combinados ambos componentes, las muestras se colocaron en agua hirviendo durante 10 minutos para después conservarse en hielo hasta su uso posterior uso.

Una vez solidificados los geles se procedió a cargar un volumen total de 20 µl de muestra por cada pocillo, incluyendo un marcador de peso molecular por gel (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad) con el fin de comparar los pesos moleculares aparentes de los determinantes proteicos observados.

Con el fin de separar las proteínas, los geles se sometieron a un proceso de electroforesis utilizando un voltaje constante de 75 v durante 14 horas en búfer de electroforesis (ver anexo 2.3). Una vez finalizada la electroforesis se procedió al proceso de transferencia y marcaje de antígenos o Western blotting.

2.2.2.3. Western blotting

En primer lugar se procedió a transferir las proteínas separadas en nuestros geles de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Con este fin se empaparon los papeles secantes (Bio-Rad) junto con el gel durante 10 minutos en búfer de transferencia (ver anexo 2.3). Tras este paso se incorporó la membrana al búfer y se esperó otros 10 minutos.

A continuación se procedió a la transferencia electroforética o “blotting” tras preparar un sándwich formado por dos papeles secantes conteniendo el gel y la membrana en su interior el cual se sometió a una corriente continua de 15 V durante 30 minutos. El blotting se realizó empleando un sistema de transferencia semiseco (Wolf Laboratories Limited).

Una vez finalizado, se lavó la membrana de nitrocelulosa con agua destilada y se marcó posteriormente con tinción de Ponceau S (ver anexo 2.3) con el fin de confirmar el proceso de transferencia. Una vez demostrada la correcta transferencia de las proteínas a la membrana se retiró la tinción de Ponceau tras varios lavados con PBS estéril 0.1M pH 7.4 en exceso hasta eliminar por completo cualquier indicio de tinción. Los lugares de unión inespecífica presente en la membrana se bloquearon con solución de bloqueo (ver anexo 2.3) a 4 °C durante 16 horas con el fin de evitar inmunomarcaje inespecífico en la membrana.

Tras el proceso de bloqueo, la membrana se lavó tres veces con PBST (ver anexo 2.3) y una vez con PBS. Cada lavado duró 10 minutos. Tras este paso, las membranas se conservaron a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco hasta su uso por un máximo de tres meses.

Para el proceso de marcaje se añadió como anticuerpo primario un antisuero producido en conejo a partir de la cepa de referencia de *M. hyorhinis* BTS-7 (RAS 173-2000, AHVLA Weybridge) usado a una dilución de 1/1000 en búfer de dilución (ver anexo 2.3) y en un volumen final de 20 ml, los cuáles se incubaron con la membrana durante 2 horas a 37 °C y con agitación continua.

Una vez finalizada la incubación, las membranas se lavaron como se describió anteriormente, para a continuación añadir el anticuerpo conjugado con peroxidasa (Recombinant Protein G, Pierce) a una dilución de 1/1000 en búfer de dilución (volumen final: 20 ml). Tras añadir el anticuerpo secundario la membrana se incubó durante 2 horas a 37 °C y en agitación continua.

Una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario se volvió a repetir el proceso de lavado para a continuación revelar la membrana tras añadir la solución de sustrato enzimático (4CN 4-cloro 1-naftol, Pierce), la cual se incubó en agitación constante a temperatura ambiente hasta que se observó el cambio de color deseado (de 5 a 30 minutos). Una vez revelada, la reacción se finalizó añadiendo agua destilada.

2.2.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

El ADN empleado en este experimento se extrajo a partir de 1 ml de cultivo de *M. hyorhinis* en fase estacionaria usando el kit de extracción de ADN genómico Genelute genomic DNA kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ADN fue cuantificado por espectrofotometría usando el sistema Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), para posteriormente conservarlo a -20 °C hasta su posterior uso.

La reacción de RAPD se basó en la metodología descrita anteriormente por Artiushin y Minion en 1996, usando un único oligonucleótido individual (OPB-10 5'-GTCCACACGG-3'). El proceso de amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 50 µl. Los principales componentes de la reacción de RAPD se encuentran recogidos en la tabla 2.2.

Una vez combinados los reactivos se añadió un 1 µl de ADN por muestra con una concentración de entre 75 y 100 ng.

Las reacciones de RAPD se llevaron a cabo en un termociclador iCycler (Bio-Rad) e incluyeron un proceso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, seguidos de 40 ciclos divididos en 94 °C durante 15 segundos, 37 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 90 segundos. Las reacciones se terminaron con un último ciclo de 7 min a 72 °C.

Reactivo	Concentración en reacción	Volumen (µl)	Identificación/fabricante
Agua	-	36.5	-
Búfer de reacción 10x	1X	5	Gold búfer (Applied Biosystems)
MgCl ₂	1.5 nM	3	Applied Biosystems
Desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs)	400 µM	2	Promega
Oligonucleótido	400 nM	2	OPB-10 (Artiushin y Minion, 1996)
Taq polimerasa	2.5 unidades	0.5	AmpliAq Gold (Applied Biosystems)

Tabla 2.2. Volúmenes de reactivos empleados por reacción de RAPD

Los productos obtenidos una vez finalizadas las reacciones se detectaron tras ser sometidos a un proceso de electroforesis en geles de agarosa al 2 % (Promega) de 10 cm bajo una corriente constante de 90 V durante 1.5 horas en búfer de electroforesis (TBE 1X, ver anexo 2.4).

Cada gel incluyó dos pocillos cargados con un patrón de peso molecular (Amplisize 50 –2000 bp, Bio-Rad) en cada extremo del gel con el fin de comparar los perfiles de bandas obtenidos tras la electroforesis y facilitar el análisis filogenético.

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.5 µg/ml. Una vez teñidos se retiró el exceso de tinción con agua destilada y se procedió a visualización bajo iluminación ultravioleta con el fin de observar los perfiles de bandas, los cuales fueron grabados en formato jpeg usando un sistema de captura de imágenes digital (Syngene).

Los perfiles de bandas obtenidas tras RAPD se analizaron empleando el software bioinformático de análisis de datos de tipificación BioNumerics versión 4.5 (Applied Maths, Bélgica). La similitud entre los perfiles de cepas diferentes fue calculado usando el coeficiente de Dice (1945) con una tolerancia y optimización del 0.5 % para ambos parámetros. La construcción de dendrogramas se basó en el uso del método de pares no ponderados utilizando media aritmética o UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic means*).

2.2.4. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

2.2.4.1. Cultivo de las cepas y obtención de las células

Las cepas de *M. hyorhina* se cultivaron en volúmenes de 40 ml de cultivo hasta alcanzar la fase estacionaria.

Una vez alcanzada la concentración celular deseada se procedió a recolectar las células por centrifugación, la cual se realizó a 8000 rpm durante 30 minutos. Tras el primer paso de centrifugación las células se lavaron en 10 ml de PBS + glucosa (ver anexo 2.5) con el fin de maximizar la cantidad de células intactas al final de proceso de recolección. Este paso de lavado se repitió tres veces para finalmente resuspender las células en 250 μ l de PBS + glucosa. Todo el proceso de obtención de células se realizó a 4 °C.

2.2.4.2. Preparación de los dados de agarosa

Una vez obtenidas las células, éstas se inmovilizaron en dados de agarosa ultrapura de bajo punto de fusión (Bio-Rad) con el fin preservar las células y facilitar el proceso de digestión enzimática.

Los dados se prepararon a partir de una solución de agarosa al 2 % preparada tras la adición de 0.2 g de agarosa en 10 ml de agua bidestilada. Una vez preparada la solución se calentó en el microondas hasta disolver la agarosa por completo para posteriormente conservarla a 45 °C en un baño hasta equilibrar la temperatura de la misma para su posterior uso.

A continuación se prepararon dos diluciones de células en PBS + glucosa en las proporciones 1/5 y 1/10 para a continuación proceder a la preparación de los dados de agarosa.

En primer lugar se prepararon tres tubos de plástico de 600 μ l de volumen final donde se distribuyeron 60 μ l de cada una de las diluciones preparadas anteriormente junto con la solución inicial no diluida. Estas tres diluciones se prepararon con el fin de evaluar la concentración ideal de células para el proceso de digestión enzimática y posterior visualización de los perfiles de

bandas tras la electroforesis en gel de campo pulsante. Una vez distribuidas las células se tomaron 60 µl de solución de agarosa la cual se mezcló suavemente con la suspensión celular evitando formar burbujas de aire.

Para formar los dados se añadió cuidadosamente 100 µl de la solución conteniendo las células y la agarosa en moldes de dados reutilizables de 5 mm x 5 mm (Bio-Rad). Los dados se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min para posteriormente trasladarlos a 4 °C con el fin de obtener la solidificación total de los mismos.

2.2.4.3. Lisis celular y digestión proteica

En primer lugar se llevó a cabo la lisis celular y digestión proteica con el fin de exponer el ADN de *M. hyorhinis* a la enzima de restricción y eliminar cualquier proteína que pudiera interferir con el proceso de digestión enzimática y electroforesis.

Con este fin se prepararon tantos tubos de plástico de 2 ml como dados de agarosa fueron obtenidos en el paso anterior. Estos tubos se identificaron con la cepa y dilución correspondiente para posteriormente añadir 0.5 ml de búfer de lisis (ver anexo 2.5) a cada uno. A continuación se añadieron los dados de agarosa dentro de los tubos asegurando el contacto con el búfer de lisis y se colocaron en una gradilla al baño maría a 45 °C durante 24 horas.

Tras el proceso de lisis y digestión se lavaron los dados con el fin de eliminar el exceso de búfer de lisis y proteinasa K. Para ello se añadieron 2 ml de búfer TE 1X (Sigma-Aldrich) que se dejaron reposar con los dados durante 20 minutos antes de ser retirados. Este proceso se repitió

tres veces. Una vez terminados los lavados se añadió 1 ml de TE 1X y se conservaron a 4 °C hasta su posterior uso y por un máximo de 6 meses.

2.2.4.4. Digestión enzimática

En primer lugar se cortaron 3 mm de agarosa de cada uno de los dados y se colocaron en 200 µl de TE 0.1X para posteriormente ser incubados a temperatura ambiente durante 30 min.

A continuación se prepararon las reacciones de digestión enzimática siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando 40 unidades de cada una de las enzimas de restricción evaluadas por reacción. Todas las enzimas de restricción, sus respectivos búferes de restricción y la albúmina sérica bovina usada en las reacciones de digestión enzimática para PFGE se obtuvieron de New England Biolabs. Con el fin de conocer la enzima de restricción ideal se evaluaron las siguientes enzimas: *Apal*, *Sall*, *SmaI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI*, *XhoI*, *SacII* y *NheI* HF. Las reacciones de digestión enzimática se prepararon de la siguiente forma:

- Volumen final por muestra – 200 µl:
 - Agua bidestilada: 176 µl
 - 10x Búfer 1-4* (New England Biolabs): 20 µl
 - 100x albúmina sérica bovina (New England Biolabs): 2 µl
 - Enzima de restricción (20 U/µl)** (New England Biolabs): 2 µl

* dependiendo de la enzima a utilizar

** añadir tras equilibrado con búfer

Una vez finalizados los 30 min de incubación con TE 0.1X, éste se reemplazó con 100 µl de la reacción de digestión enzimática sin enzima de restricción añadida y se incubó durante 30 min a 4 °C con el fin de equilibrar la agarosa. Tras el proceso de equilibrado se reemplazó el búfer de digestión enzimática con búfer fresco al que se incorporaron 2 µl de la enzima de restricción a evaluar. El proceso de digestión enzimática del ADN se realizó durante 16 horas a 25 °C o 37 °C dependiendo de las instrucciones del fabricante.

2.2.4.5. Preparación de geles, electroforesis y tinción

Los geles se prepararon combinando 150 ml de TBE 0.5X con 1.5 g de agarosa certificada para PFGE (Bio-Rad). A continuación se prepararon 4 litros de TBE 0.5X que fueron utilizados como búfer de electroforesis. Este búfer se incorporó al sistema de electroforesis de PFGE CHEF DR III (Bio-Rad) 1 h antes de empezar la electroforesis con el fin de permitir la refrigeración hasta 14 °C del mismo.

Mientras tanto se preparó el gel de agarosa para el proceso de electroforesis introduciendo las porciones de dados de agarosa previamente sometidos a restricción enzimática en los pocillos del gel, para a continuación cubrirlos con agarosa al 1 % con el fin de asegurarlos en el pocillo correspondiente. Cada gel incorporó en los extremos dos marcadores de peso molecular obtenidos de un fago lambda con un rango de pesos entre 0.1 y 200 kb de ADN (Sigma-Aldrich) para facilitar la comparación y análisis de los patrones de bandas.

A continuación el gel se incorporó cuidadosamente al tanque CHEF DR III con el fin de someter las muestras al proceso de electroforesis en campo pulsado siguiendo éstas

características: 6 V/cm^{-1} durante 18 h con un ángulo inducido de 120° y una rampa de pulso entre 1 y 20 s.

Una vez finalizada la electroforesis se tiñeron los geles en una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración de $0.5 \mu\text{g/ml}$, para posteriormente retirar el exceso de tinción con agua destilada. La visualización de bandas se realizó bajo iluminación ultravioleta y la imagen obtenida capturada en formato jpeg usando un sistema de imágenes digital (Syngene).

2.2.4.6. Análisis de perfiles de bandas

Los perfiles de bandas obtenidas tras PFGE se analizaron empleando el software bioinformático de análisis de datos de tipificación BioNumerics versión 4.5 (Applied Maths, Bélgica) siguiendo el mismo protocolo de análisis descrito para RAPD en el punto 2.2.3 de esta tesis.

2.2.5. Southern blotting – IS1221

2.2.5.1. Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método descrito por Bashiruddin en 1998 (ver anexo 2.6) a partir de 40 ml de cultivo de cada uno de los aislados analizados con esta técnica tras incubación en medio de Friis durante 72 h. El método de extracción de ADN utilizado, basado en la combinación de dodecil sulfato sódico (SDS), proteinasa K y fenol/cloroformo, permite la obtención de una alta cantidad de ADN a partir grandes volúmenes de cultivo.

Una vez extraído, el ADN fue cuantificado por espectrofotometría empleando el sistema Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Con el fin de ser capaces de procesar las muestras de ADN en los pasos posteriores, toda aquella cepa con una producción de ADN menor a 100 ng/ μ l fue cultivada y el ADN extraído de nuevo hasta alcanzar la concentración necesaria.

2.2.5.2. Diseño de oligonucleótidos y producción de sonda marcada

El diseño de oligonucleótidos se realizó a través de la herramienta bioinformática Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000), utilizando como referencia la secuencia de inserción IS1221 (número de acceso de Genbank U01217.1), previamente descrita en 1995 por Zheng y McIntosh. Los oligonucleótidos IS1221-F-2 5'-ACAGTTGGCAAATTCAGAC-3' y IS1221-R 5'-CCTTTTCGAGACATGGACTGAG-3' fueron seleccionados con el fin de amplificar un fragmento específico de *M. hyorhinis* de 338 pares de bases, obtenido a partir de la cepa de referencia de *M. hyorhinis* (referencia National Collection of Type Cultures (NCTC) 10130 - BTS-7).

El producto de PCR obtenido fue secuenciado en la unidad de secuenciación central – AHVLA Weybridge (Reino Unido) y su identidad comprobada tras alineamiento con la secuencia de referencia previamente descrita a través del software de alineamiento de bases MegAlign (DNASTAR Inc) y tras la comparación con bases de datos en línea usando la herramienta de análisis de alineamientos BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Antes de proceder a la producción de la sonda marcada se obtuvo un mapa de restricción *in silico* usando una herramienta en línea de análisis de perfiles de restricción (<http://watcut.uwaterloo.ca>). La secuencia amplificada no presentó ninguna secuencia

reconocida por la enzima de restricción *EcoRI*, por lo que ésta fue seleccionada para el proceso de digestión enzimática posterior.

La sonda de ADN marcada con digoxigenina se obtuvo a partir del producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos IS1221-F-2 y IS1221-R empleando un kit comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante (PCR DIG Probe Synthesis Kit - Roche).

2.2.5.3. Restricción enzimática y Southern blotting

Con el fin de realizar el proceso de reacción de restricción enzimática, se tomó una cantidad total de 2 µg de cada una de las muestras de ADN genómico extraído previamente en el paso 2.2.5.1., la cual se diluyó en búfer TE 1X hasta obtener un volumen final de 20 µl.

De forma paralela se procedió a preparar la reacción enzimática de la siguiente forma:

- Volumen final por muestra – 30 µl:
 - Agua bidestilada : 22.5 µl
 - 10x búfer H (Promega): 5 µl
 - 100x albúmina sérica bovina (Promega): 0.5 µl
 - Enzima de restricción *EcoRI* (12 U/µl) (Promega): 2 µl

El ADN diluido y la reacción enzimática se combinaron en un tubo de plástico de 200 µl obteniéndose un volumen final de 50 µl. Con el fin de obtener la digestión de los fragmentos de ADN, la reacción se mantuvo a 37 °C durante 10 – 16 horas.

Una vez finalizada la digestión enzimática se procedió a realizar el proceso de Southern blotting siguiendo el protocolo establecido por Miles y colaboradores en 2005 con algunas modificaciones (ver anexo 2.7).

2.2.5.4. Análisis de perfiles de bandas

Los perfiles de bandas obtenidas tras la técnica de Southern blotting fueron analizadas mediante el software bioinformático de análisis de datos de tipificación BioNumerics versión 4.5 (Applied Maths). La similitud entre los perfiles de cepas diferentes fue calculado empleando el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1901) con una optimización del 1 % y del 1 al 2 % de tolerancia. La construcción de dendrogramas se basó en el uso del método de pares no ponderados utilizando media aritmética o UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic means*).

2.2.6. Variable Number Tandem Repeat (VNTR)

2.2.6.1. Selección de regiones repetitivas y diseño de oligonucleótidos

La selección de regiones repetitivas susceptibles de ser utilizadas en nuestro sistema de tipificación basado en VNTR se obtuvo tras analizar el genoma completo de *M. hyorhinis* HUB-1 (número de acceso de Genbank NC_014448.1) usando la base de datos de regiones repetitivas (<http://minisatellites.u-psud.fr/GPMS/>) descrita por Denoeud y Vergnaud, en 2004. El parámetro de búsqueda en la base de datos incluyó aquellas secuencias repetitivas con una longitud superior a 40 bases y con un porcentaje de similitud superior al 80 %.

Usando estos parámetros se encontraron un total de 67 secuencias que cumplieron nuestras condiciones de búsqueda, de las que seleccionaron un total de 12 basándonos en su contenido en G+C, número de repeticiones y tamaño para posterior evaluación y selección de las regiones variables a incluir en el esquema final.

2.2.6.2. Diseño de oligonucleótidos

Tras extraer cada una de las secuencias de las regiones repetitivas seleccionadas anteriormente se procedió al diseño de oligonucleótidos de forma manual. Todos los oligonucleótidos se diseñaron entre 60 y 40 pb de separación de la región a analizar en ambos sentidos con el fin de cubrir con seguridad las regiones hipervariables a estudiar.

Las características de los oligonucleótidos seleccionados se comprobaron mediante la herramienta de análisis online Oligocalc (Kibbe, 2007). Este análisis incluyó la formación de horquillas, autoalineación y complementariedad en el extremo 3'. El tamaño estimado de los productos de PCR se obtuvo tras emplear una herramienta online capaz de generar fragmentos de PCR *in silico* tras añadir el fragmento de ADN a estudiar (Bikandi *et al.*, 2004). La especificidad de los oligonucleótidos se evaluó usando la herramienta de análisis de alineamiento BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

En la tabla 2.3 se pueden observar las secuencias, tamaño estimado del producto de PCR y localización en el genoma de *M. hyorhinis* HUB-1.

Identificación	Secuencia 5'-3'	Tamaño en bp	Localización <i>M. hyorhinis</i> HUB-1
MHR-TR1-F	TGACTTGTTTTCTGTAGC	268 pb	456600 – 457150
MHR-TR1-R	CTAACAAGTGCTTCTATGCC		MHR_0358 – proteína hipotética
MHR-TR2-F	GAATACGATTAGTTGTAC	436 pb	58100 – 58700
MHR-TR2-R	ATAACCGTGGTTTTAAGGC		MHR_0044 – regulador de transcripción
MHR-TR3-F	GAACAACCACTGGAAGTGGC	371 pb	433700 – 434300
MHR-TR3-R	GTATCTATATTTAGACAC		MHR_0337 – vlpD
MHR-TR4-F	TCTGGAACAACAACAGGTG	785 pb	442700 – 443500
MHR-TR4-R	GTGGCAGTAGCCATAGC		MHR_0349 – vlpC
MHR-TR5-F	GCAAATGGTTCAGGAAACG	452 pb	434600 – 435100
MHR-TR5-R	CAGTCTGTTTTATATGAC		MHR_0338 – vlpE
MHR-TR6-F	GCTCTTACATTGTGTC	205 pb	815100 – 815400
MHR-TR6-R	CGGTTGTAGTTAATCCGC		MHR_0660 – proteína putativa sin caracterizar
MHR-TR7-F	CACCAACTGAAGTATATGC	244 pb	690300 – 690600
MHR-TR7-R	GAATTTATAATCAGAAGC		MHR_0561 – proteasa La dependiente de ATP
MHR-TR8-F	GAATAATAATAACCTTCAG	253 pb	478700 – 478950
MHR-TR8-R	CTTTGTATTACAGTTGC		MHR_0370 – transportador putativo ABC
MHR-TR9-F	CACACCTAGAAAAGCAGC	210 pb	182500 – 182850
MHR-TR9-R	GCACAACGTTTTGAACAAGC		MHR_0149 – sistema de transporte multidrogas ABC
MHR-TR10-F	CACCACATAATTACGAGAC	285 pb	82100 – 82500
MHR-TR10-R	GGTGAAAGAGCTAATGTTGC		MHR_0061 – lipoproteína sin caracterizar
MHR-TR11-F	TTTAATAATGTCTTCTCAGTC	369 pb	384000 – 384300
MHR-TR11-R	GTTGATCCCAAACCTTGCTTCAC		MHR_0298 – proteína hipotética
MHR-TR12-F	TTAAGAAAAGGGTATCACCTC	209 pb	48000 – 48300
MHR-TR12-R	ATTCAAGTTATAAATTCTGGA		MHR_0040 – transportador ABC
MHR-TR13-F	CTTTACATTAATTCTCCTTTGTG	201 pb	322600 – 322900
MHR-TR13-R	GACAAAGATACAATAGCAGATGATC		MHR_0251 – proteína putativa sin caracterizar
MHR-TR14-F	TGTAACCTGTCTCTAACTGGG	323 pb	487422 to 487861
MHR-TR14-R	ACAAGGATTAATGAAATATGGC		MHR_0683 – proteína ribosómica 50S L36
MHR-TR15-F	ATAATTGCCATCGCAACTGC	392 pb	573100 – 573500
MHR-TR15-R	AACATGACTAGAATCCTTGAC		MHR_0466 – sistema de transporte de espermidina
MHR-TR16-F	GAAGAGGTAATGACGACTCC	438 pb	587500 – 588000
MHR-TR16-R	ATTGCTTCACTTTCTCAGC		MHR_0479 – proteína ribosómica 50S L27
MHR-TR17-F	TGTTCAATTTGCTGGGTTGG	343 pb	640672 – 641159
MHR-TR17-R	TCGCCATATGTAATTACATC		MHR_0523 – proteína hipotética MHR_0524 – posible GTPasa, posible factor de translación
MHR-TR18-F	AAAGGAGATGATTACACAGTG	242 pb	675400 – 675850
MHR-TR18-R	GTATCTGTATAGTGTCTAAGG		MHR_0551 – proteína hipotética
MHR-TR19-F	CTAAAGCAAAGTCATCGTG	237 pb	751950 – 752300
MHR-TR19-R	TATCTGATTTTACACAAGTAGC		MHR_0610 – chaperonina hipotética de 33 kDa
MHR-TR20-F	CTTGAAGAACTAAGATAATGTG	273 pb	826400 – 826800
MHR-TR20-R	TGGTTGAGAAAGATAATTCAC		MHR_0669 – proteína hipotética MHR_0670 – proteína hipotética

Tabla 2.3. Características de los oligonucleótidos seleccionados para el análisis de VNTR

Todos los oligonucleótidos se diseñaron con una temperatura de alineamiento cercana a los 58 °C con el fin de estandarizar las reacciones de PCR. La temperatura de alineamiento ideal se comprobó tras una PCR con gradiente de temperaturas de alineamiento. Esta PCR demostró que 58 °C fue la temperatura ideal en este paso, por lo que se empleó en todos los procesos de amplificación de VNTR.

2.2.6.3. Reacciones de PCR, electroforesis y análisis de datos

Las secuencias repetitivas seleccionadas se amplificaron usando los oligonucleótidos descritos anteriormente. La composición de cada reacción de PCR se encuentra recogida en la tabla 2.4.

Reactivo	Concentración en reacción	Volumen (µl)	Identificación/fabricante
Agua	-	35.75	-
5 X Green GoTaq búfer	1X	10	Promega
Desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs)	0.2 mM cada uno	1	Promega
Oligonucleótido F	200 Nm	1	Sigma-Aldrich
Oligonucleótido R	200 nM	1	Sigma-Aldrich
Taq polimerasa	1.25 unidades	0.25	GoTaq (Promega)
ADN	-	1	-

Tabla 2.4. Volúmenes de reactivos empleados por reacción de VNTR

Las condiciones de la reacción de PCR incluyeron un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C seguido de 35 ciclos divididos en tres pasos: desnaturalización a 95 °C durante 45 s, alineamiento a 58 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Para finalizar se realizó un paso de extensión final de 5 minutos a 72 °C. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador iCicler (Bio-Rad).

La amplificación del VNTR esperado se comprobó tras separar los productos de PCR en geles de agarosa de 27 cm de longitud y con una concentración de 2.5 % durante un proceso de electroforesis de 2.5 h a un voltaje constante de 75 v. A continuación se tiñeron los geles en bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.5 µg/ml. Tras teñirse se retiró el exceso de bromuro de etidio con agua destilada y se obtuvo una imagen de los perfiles de bandas en formato jpeg empleando un sistema de captura de imágenes digital (Syngene) tras iluminación ultravioleta.

Cada VNTR se analizó por separado otorgándose a cada banda de ADN observada en los geles un número de identificación dependiendo del peso molecular de la misma. La combinación de indentificadores individuales produjo un identificador único denominado *tipo de VNTR* (VT). Una vez obtenidos los diferentes indicadores numéricos, y con el fin de evaluar las posibles relaciones evolutivas entre tipod de VNTR (VTs), se procedió al análisis gráfico de los mismos mediante la creación de un árbol recubridor mínimo o MST (del inglés *minimum spanning tree*) obtenido a través del uso del algoritmo matemático goeBURST (Francisco *et al.*, 2009). Este algoritmo fue implementado gracias al software bioinformático Phyloviz (Francisco *et al.*, 2012).

2.2.7. Análisis estadístico

El índice de diversidad de Simpson (IDS), empleado para calcular la capacidad discriminatoria de técnicas de tipificación, se calculó de acuerdo a la metodología descrita por Hunter y Gaston (1988) para el índice de diversidad y la descrita por Grundmann y colaboradores (2001) para el cálculo de intervalos de confianza (IC) del mismo. El IDS, que puede presentar valores entre 0 (mínima diversidad) y 1 (máxima diversidad), determina la probabilidad de que dos aislados muestreados al azar en una población pertenezcan a dos grupos diferentes, proporcionando por lo tanto un indicador de la capacidad de discriminación de cualquier técnica de tipificación. Este valor indica por ejemplo que en un sistema de tipificación molecular con un IDS de 0.91, dos muestras seleccionadas de forma arbitraria en una población bacteriana tienen un 91 % de posibilidades de pertenecer a grupos diferentes al ser analizados con la técnica de caracterización molecular correspondiente.

Los intervalos de confianza entre técnicas de tipificación molecular junto con el nivel cuantitativo de congruencia entre técnicas se calculó siguiendo la metodología descrita por Severiano y colaboradores (2011) empleando el coeficiente ajustado de Wallace con el fin de cuantificar el nivel de relación entre métodos e indicar la posibilidad de que dos aislados clasificados en un determinado cluster por una técnica de tipificación determinada pertenezcan al mismo al cluster al usar una técnica de tipificación diferente.

2.3. Resultados

2.3.1. Western blotting

Los resultados de Western blotting incluyendo las 41 cepas analizadas por esta técnica se pueden observar en las figuras 2.2, 2.3 y 2.4.

Los perfiles de Western blotting demostraron una gran homogeneidad entre los aislados. Dentro de los principales componentes antigénicos cabe destacar dos proteínas de aproximadamente 75 kDa, 60 kDa y 49 kDa de peso molecular aparente, que se presentaron de forma invariable en todos los aislados analizados con un inmunomarcaje bastante evidente, presentando limitada variabilidad en intensidad.

Además de estas dos proteínas, otro epítipo bastante conservado se localizó en el área correspondiente a los 23 kDa de peso molecular aparente, aunque la variabilidad en la intensidad de la reacción frente a esta proteína es bastante menor que la observada en los casos anteriores.

La principal área de variabilidad observada correspondió a la región comprendida entre 40 y 46 kDa de peso molecular aparente. Dentro de esta área se pudieron diferenciar 4 diferentes tipos de perfiles de bandas, cada uno de ellos formados por entre 4 y 2 proteínas intensamente marcadas. En la figura 2.1 se puede observar la distribución de cada uno de estos tipos en las cepas estudiadas.

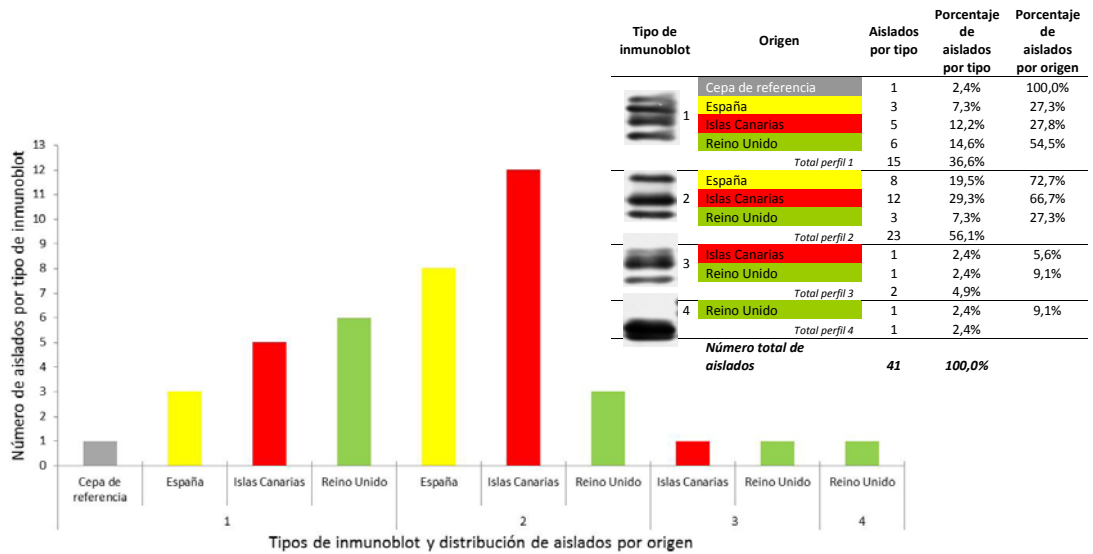


Figura 2.1. Tipos de Western blotting y distribución por origen

Siguiendo esta clasificación se pudo observar cómo la mayoría de las cepas analizadas se localizaron en el tipo de Western blotting número 2 (56.1 % del total de cepas). La mayoría de las cepas con origen en las Islas Canarias (66.7 % - 12 de 18) y en la España peninsular (72.7 % - 8 de 11) se agruparon dentro de este tipo de Western blotting, incluyendo además una pequeña proporción de cepas del Reino Unido (27.3 % - 3 de 11).

El segundo grupo en volumen de aislados corresponde al tipo de Western blotting 1 (36.6 % del total de cepas analizadas). Este grupo, además de contener a la mayoría de las cepas de Reino Unido (54.5 % - 6 de 11), incluye a la cepa de referencia BTS-7 y a casi un tercio de las cepas representativas de las Islas Canarias (27.8 %) y la España peninsular (27.3 %). Además de estos dos tipos de Western blotting mayoritarios destaca la presencia de dos grupos atípicos caracterizados por la falta de inmunomarcaje en las proteínas de mayor peso molecular dentro

de este grupo y cercanas a los 47 kDa de peso molecular aparente. El tipo 3 de Western blotting incluye sólo dos representantes con origen en el Reino Unido e Islas Canarias. El tipo 4 de Western blotting incluye solamente un representante (cepa 80p04), con origen en el Reino Unido. Los perfiles asignados a cada una de las cepas se encuentran representados a continuación en la tabla 2.5.

Identificación	Origen	Tipo	Identificación	Origen	Tipo
BTS-7	Cepa de referencia	1	Rmr16	España	1
GC37	Islas Canarias	1	Rmr7	España	2
D	Islas Canarias	1	Rmr12	España	2
36	Islas Canarias	1	Rmr17	España	2
65	Islas Canarias	1	Rmr19	España	2
8B1	Islas Canarias	1	Rmr8	España	2
22	Islas Canarias	2	Rmr15	España	2
25	Islas Canarias	2	Rmr21	España	2
54	Islas Canarias	2	Rmr9	España	2
62	Islas Canarias	2	64p04	Reino Unido	1
U	Islas Canarias	2	61p07	Reino Unido	1
8	Islas Canarias	2	10p04	Reino Unido	1
46	Islas Canarias	2	35p06	Reino Unido	1
GC91	Islas Canarias	2	67p07	Reino Unido	1
76	Islas Canarias	2	57p05	Reino Unido	1
4	Islas Canarias	2	112p03	Reino Unido	2
P	Islas Canarias	2	58p04	Reino Unido	2
Z	Islas Canarias	2	35p07	Reino Unido	2
Ove1	Islas Canarias	3	90p03	Reino Unido	3
Rmr14	España	1	80p04	Reino Unido	4
Rmr3	España	1			

Tabla 2.5. Clasificación de los aislados analizados por la técnica de Western blotting basada en la diferencias observadas en la región variable de 40 a 46 kDa.

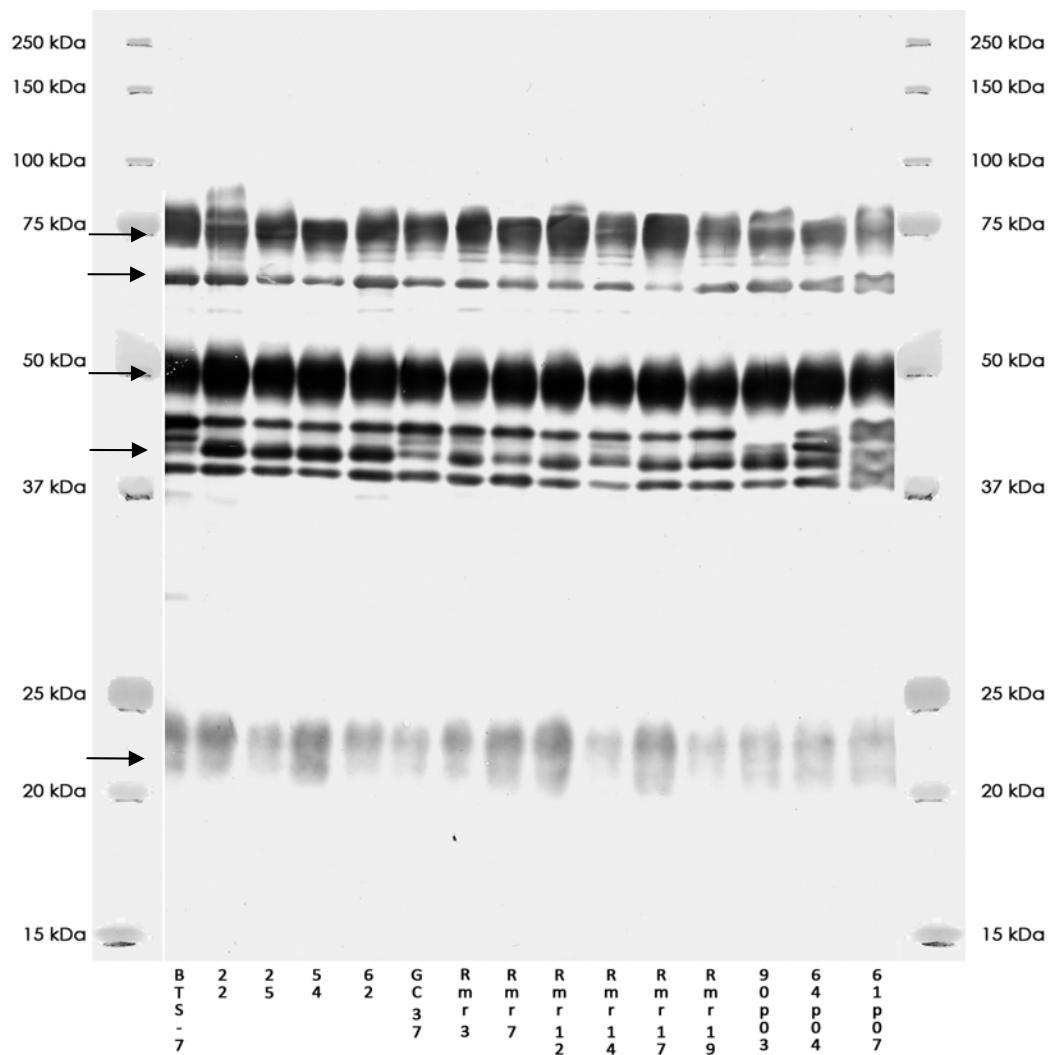


Figura 2.2. Membrana inmunomarcada representando al gel de SDS PAGE número 1

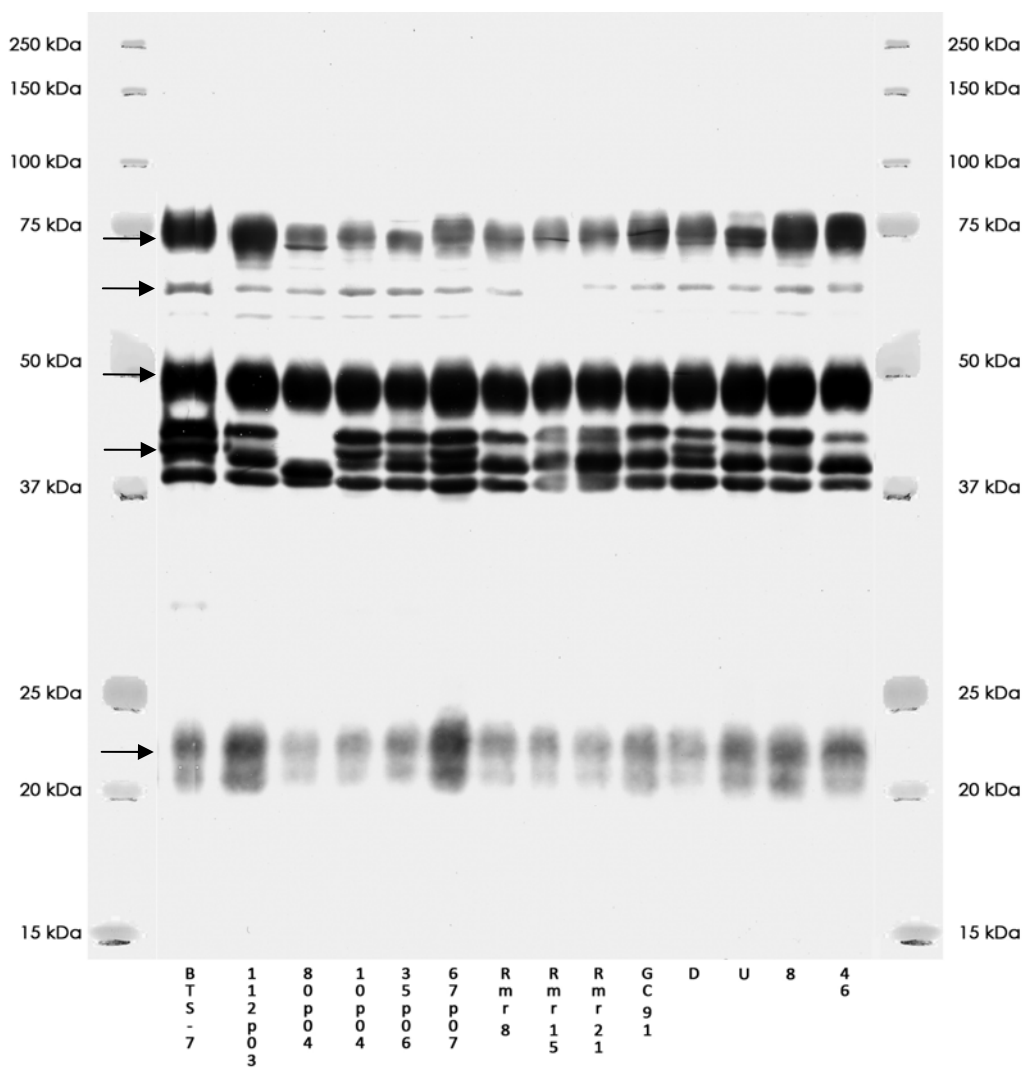


Figura 2.3. Membrana inmunomarcada representando al gel de SDS PAGE número 2

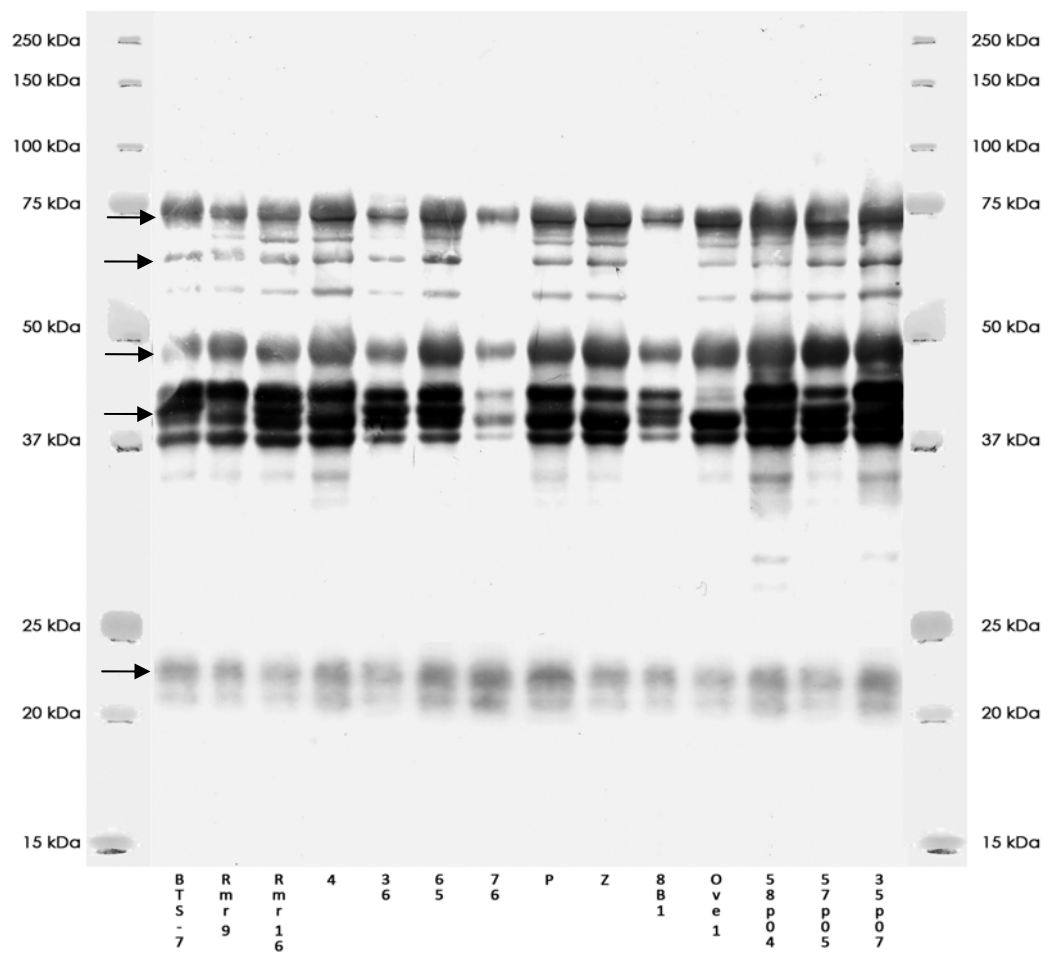


Figura 2.4. Membrana inmunomarcada representando al gel de SDS PAGE número 3

2.3.2. RAPD

El análisis de RAPD realizado con el cebador OPB-10 produjo 27 perfiles diferentes en un total de 41 cepas analizadas. El número de bandas por perfil varió entre 3 y 9 bandas con un peso

molecular entre 200 y 1.800 pb. El análisis del dendrograma producido con BioNumerics demostró una gran asociación entre aislados procedentes de la misma área geográfica (figura 2.5).

El mayor porcentaje de similitud se observó entre aislados procedentes del Reino Unido, donde la mayoría de los aislados presentaron un porcentaje de semejanza superior al 80 %. El siguiente grupo de aislados en porcentaje de similitud fue el correspondiente a la España peninsular, con la mayoría de los aislados presentando una similitud superior al 66 %. Los aislados procedentes de las Islas Canarias presentaron la mayor variabilidad, con un porcentaje de similitud cercano al 60 % siendo el único grupo de aislados estudiados que presentó alguno de sus componentes en alguno de los otros grupos geográficos en estudio, como en el caso de los aislados 8, GC 91 y P que se asociaron con cepas del Reino Unido, o el aislado 8B1 que se asoció con los aislados con origen en la España peninsular. La cepa de referencia BTS-7 se asoció con los aislados procedentes de las Islas Canarias, mostrando un porcentaje de similitud del 90 % con el aislado 4. La distribución de aislados por tipo de RAPD se encuentra representada en la tabla 2.6.

El análisis del dendrograma demostró la existencia de un grupo mayoritario de aislados, el grupo A, el cual englobó el 85.3 % de todas las muestras analizadas por RAPD. Este grupo a su vez presenta dos subdivisiones, la A1, formada mayoritariamente por aislados con origen en la España peninsular (10 de 11 aislados con este origen geográfico). El grupo A2, el cual presenta a su vez dos subdivisiones, A2a y A2b, englobó al 100 % de los aislados británicos junto con más de la mitad de los aislados procedentes de las Islas Canarias (61.1 % del total de aislados con este origen) además de la cepa de referencia de *M. hyorhinis* BTS-7.

Además de este grupo mayoritario se encontraron otros tres grupos, B, C y D, formados únicamente por aislados procedentes de las Islas Canarias e incluyendo un 11.1 %, 16.7 % y 5.5 % de los aislados totales con este origen. Una de las características de este grupo es el escaso porcentaje de similitud con respecto al grupo A, determinado entre un 50 y 55 %.

Tipo de RAPD	Origen	Porcentaje en relación al origen				Porcentaje total de aislados
		RU	ESP	IC	REF	
A	RU, ESP, IC	100 % (11/11)	100 % (11/11)	66.7 % (12/18)	100 % (1/1)	85.3 % (35/41)
A1	RU, ESP, IC	90.9 % (10/11)		5.6 % (1/18)		26.8 % (11/41)
A2	RU, ESP, IC	100 % (11/11)	9.1 % (1/11)	61.1 % (11/18)	100 % (1/1)	58.5 % (24/41)
A2a	RU, IC	90.9 % (10/11)	9.1 % (1/11)	44.4 % (8/18)		46.3 % (19/41)
A2b	RU, ESP	9.1 % (1/11)	16.7 % (3/18)	100 % (1/1)		12.2 % (5/41)
B	IC	11.1 % (2/18)				4.9 % (2/41)
C	IC	16.7 % (3/18)				7.3 % (3/41)
D	IC	5.5 % (1/18)				2.5 % (1/41)

Tabla 2.6. Distribución de aislados por tipo de RAPD

No se encontró ninguna relación entre el año de aislamiento y la distribución de los aislados en el dendrograma (figura 2.5).

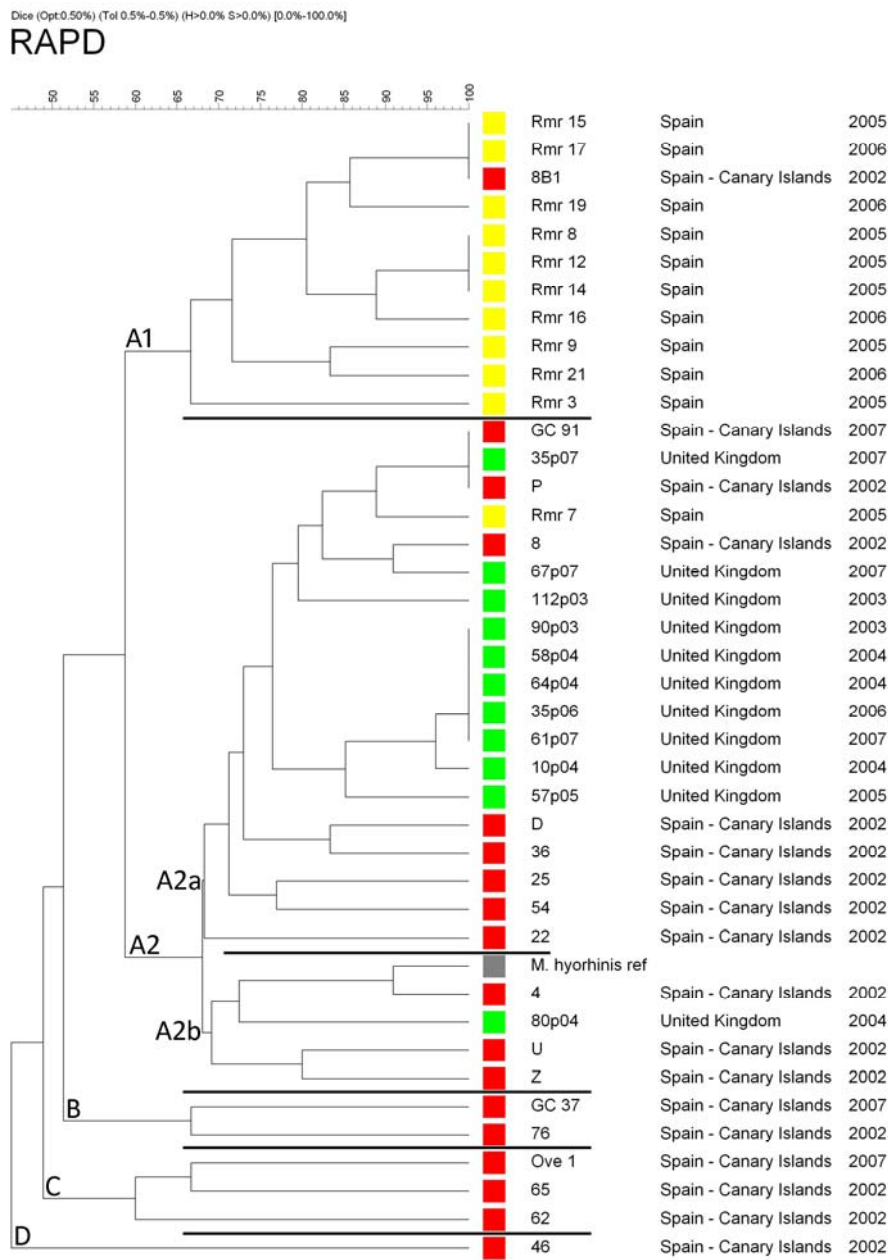


Figura 2.5. Dendrograma generado con BioNumerics v4.5 tras analizar los perfiles de bandas obtenidos con RAPD

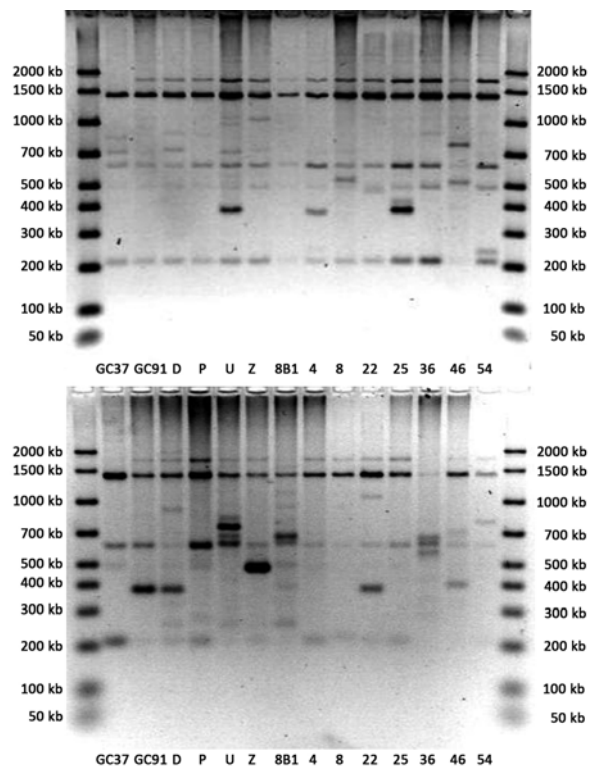


Figura 2.6. Análisis de reproducibilidad: Geles de agarosa representando dos diferentes reacciones de RAPD usando el mismo ADN de referencia. Obsérvese la diferencia en la región comprendida entre las 300 y 1000 kb de peso molecular

La reproducibilidad se demostró al analizar geles obtenidos tras diferentes reacciones de PCR usando ADN de un mismo grupo de cepas. Gracias a este análisis se determinó que la técnica tiene una baja reproducibilidad, observándose la desaparición de determinadas bandas entre reacciones realizadas usando las mismas condiciones, reactivos y ADN de referencia (ver figura 2.6).

2.3.3. PFGE

La enzima de restricción *NheI* HF presentó los mejores resultados en nuestro análisis y por lo tanto fue seleccionada para el posterior análisis de todas las cepas dentro de este estudio.

El análisis de pulsotipos obtenidos con PFGE, y basados en la distribución de aislados presente en la figura 2.7, demostró la presencia de dos grupos mayoritarios, A y B, que incluyeron a la gran mayoría de los aislados, con 57.5 % y 37.5 % del total de aislados estudiados respectivamente, los cuales presentaron a su vez varios subgrupos. Además se encontraron otros dos grupos bien diferenciados tras el análisis filogenético, C y D, aunque de carácter minoritario al incluir solamente un 2.5 % del total de aislados analizados. Todos los datos de distribución de pulsotipos por grupos se encuentran representados en la tabla 2.7.

Los aislados presentes en el grupo A presentaron una similitud superior al 55 %. Este grupo incluyó a casi la totalidad de las cepas originarias del Reino Unido (90.9 % - 10 de 11), además del 50 % de los aislados con origen en las Islas Canarias (50 % - 9 de 18) y el 40 % de los aislados de la España peninsular (40 % - 4 de 10). Dentro de este grupo se encontraron a su vez dos divisiones mayores, A1 y A2. La división A1 incluyó al mayor número de aislados dentro del grupo A (19 de 23). A su vez, y dentro de esta división se encontraron varias subdivisiones menores. La subdivisión A1a1a, con un 70 % de variabilidad entre pulsotipos analizados, presentó una marcada composición de aislados del Reino Unido, con un 54.5 % (6 de 11) del total con este origen analizados en nuestro estudio. Todas las demás subdivisiones presentaron una distribución minoritaria de aislados. Se observó además una distribución mixta de los orígenes de los aislados distribuidos en todas las subdivisiones a excepción de la A1b, compuesta únicamente

por cepas del Reino Unido (18.2 % del total por origen) y la A2, compuesta por aislados de las Islas Canarias (22.2 % del total por origen).

El grupo B incluyó al 37.5 % (15 de 40) del total de aislados analizados, evidenciando una variabilidad del 58 % dentro del mismo. La mayoría de los aislados en este grupo tuvieron como origen las Islas Canarias (60 % de los aislados en el grupo B), mientras que el resto se distribuyó entre la España peninsular (33 % de los aislados en el grupo B) y la cepa de referencia BTS-7.

El grupo B presentó a su vez dos subdivisiones. La B1, de composición mixta respecto al origen de los aislados, incluyó a todas las cepas con origen en la península española dentro del grupo B, además de la cepa de referencia y la cepa 4 (Islas Canarias). La subdivisión B2 se compuso de íntegramente de cepas de las Islas Canarias, incluyendo un 44.4 % (8 de 18) de cepas con este origen.

Los grupos C y D constituyeron dos divisiones atípicas compuestas por un solo aislado cada una, con origen en el Reino Unido (67p07) y la España peninsular (Rmr21) respectivamente.

Estos dos grupos presentaron una similitud situada entre el 45 % y 50 % con respecto al total de aislados analizados.

Pulsotipo	Origen	Porcentaje en relación al origen			Porcentaje total de aislados	
		RU	ESP	IC		
A	RU, ESP, IC	90.9 % (10/11)	40 % (4/10)	50 % (9/18)	57.5 % (23/40)	
		RU	ESP	IC		
	A1	RU, ESP, IC	90.9 % (10/11)	40 % (4/10)	27.8 % (5/18)	47.5 % (19/40)
	A1a	RU, ESP, IC	72.7 % (8/11)	40 % (4/10)	27.8 % (5/18)	42.5 % (17/40)
			RU	ESP	IC	
	A1a1	RU, ESP, IC	72.7 % (8/11)	20 % (2/10)	5.5 % (1/18)	27.5 % (11/40)
	A1a1a	RU, IC	54.5 % (6/11)	5.5 % (1/18)		17.5 % (7/40)
			RU	ESP		
	A1a1b	RU, ESP	18.2 % (2/11)	20 % (2/10)		10 % (4/40)
	A1a2	ESP, IC	20 % (2/10)		22.2 % (4/18)	15 % (6/40)
			ESP		IC	
	A1b	RU	18.2 % (2/11)			5 % (2/40)
	A2	IC	22.2 % (4/18)			10 % (4/40)
IC						
B	ESP, IC, REF	50 % (5/10)	50 % (9/18)	100 % (1/1)	37.5 % (15/40)	
		ESP	IC	REF		
	B1	ESP, IC, REF	50 % (5/10)	5.5 % (1/18)	100 % (1/1)	17.5 % (7/40)
B2	IC	44.4 % (8/18)			20 % (8/40)	
C	RU	9.1 % (1/11)			2.5 % (1/40)	
		RU				
D	ESP	10 % (1/10)			2.5 % (1/40)	
		ESP				

Tabla 2.7. Distribución de pulsotipos por origen geográfico

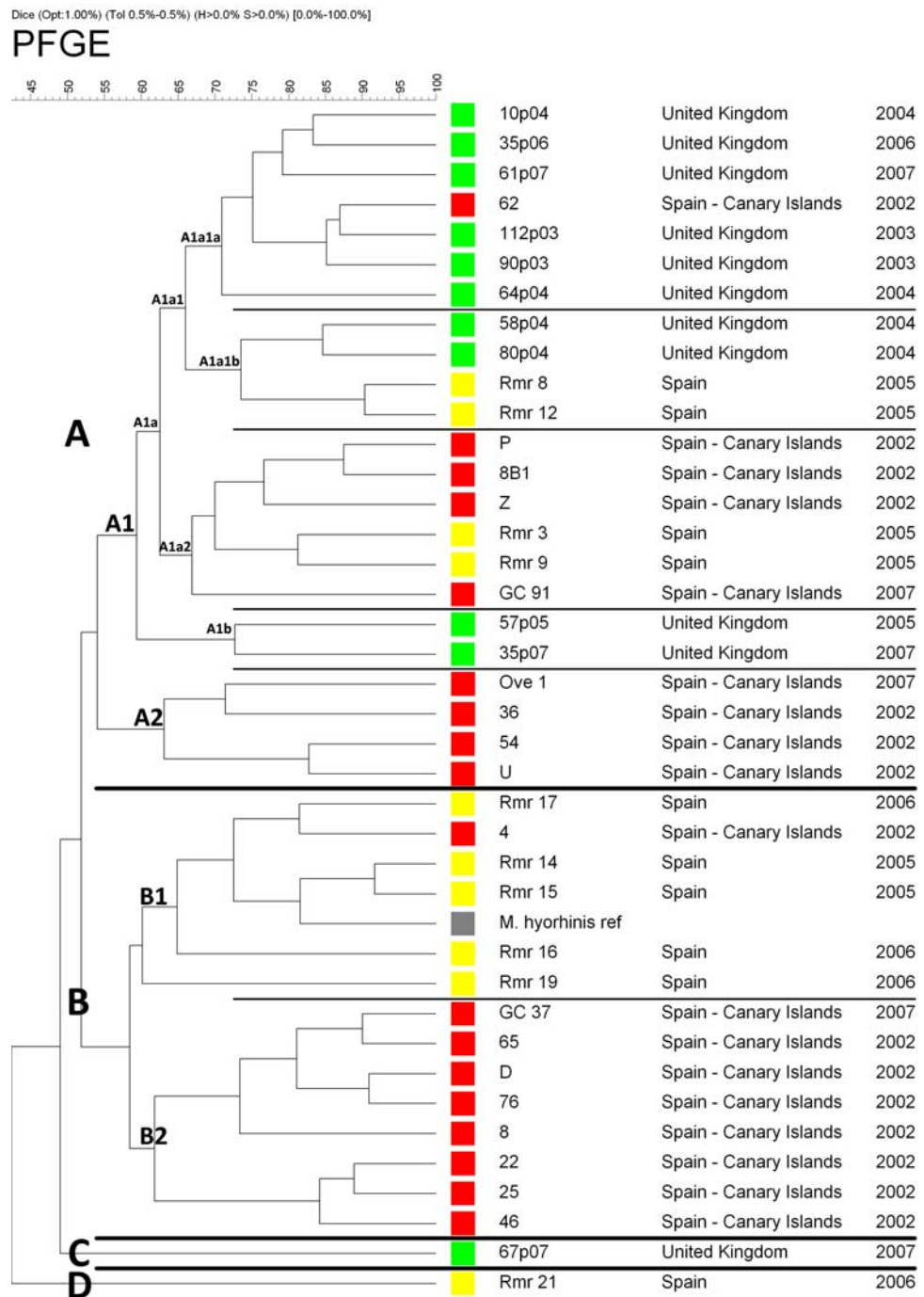


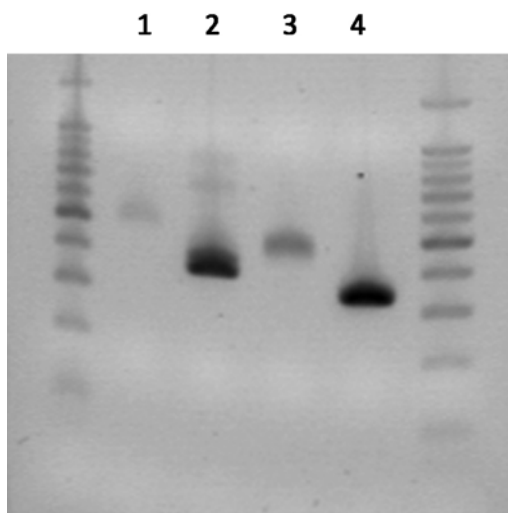
Figura 2.7. Distribución de pulsotipos por origen geográfico

2.3.4. Southern blotting – IS1221

2.3.4.1. Producción y evaluación de sonda marcada

El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos IS1221-F-2 y IS1221-R presentó una homología del 100 % con la secuencia de referencia U01217.1 tras el análisis realizado con MegaAlign.

La eficiencia de la reacción de marcaje con digoxigenina se comprobó por electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado en la reacción de marcaje y siguiendo las instrucciones del fabricante. Debido a la presencia de digoxigenina, los productos de PCR marcados migran más lentamente que los productos de PCR sin marcar aún teniendo el mismo peso molecular (figura 2.8).



Análisis de sondas de Southern blot

1. Sonda 1 marcada (IS1221F-3/IS1221R-2)
2. Sonda 1 control
3. Sonda 2 marcada (IS1221F-2/IS1221R)
4. Sonda 2 control

Figura 2.8. Evaluación de sondas marcadas

2.3.4.2. Análisis de perfiles de bandas de hibridación

En la figura 2.9 se puede observar un ejemplo representativo de los perfiles de bandas en una membrana de nilón marcada. El análisis de repeticiones de la secuencia de inserción IS1221 por Southern blotting demostró la presencia de entre 14 y 23 repeticiones por aislado.

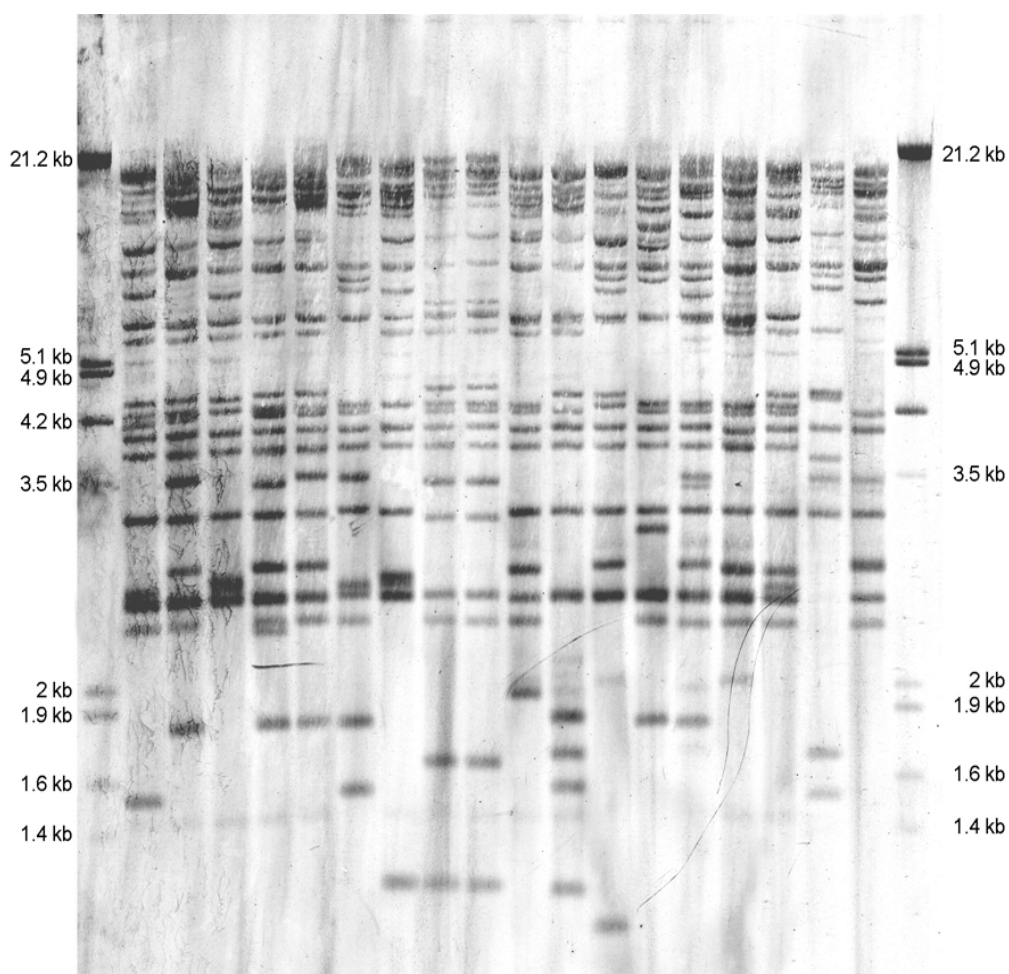


Figura 2.9. Imagen representativa de una membrana de nylon revelada tras la hibridación con la sonda marcada para la detección de la secuencia IS1221. Cada banda corresponde a una cepa de *M. hyorhinis*

El análisis de bandas basado en BioNumerics demostró una gran diferencia entre aislados, con un porcentaje de similitud comprendido entre el 35 y 90 % (figura 2.10). A pesar de estas grandes diferencias entre aislados se demostró una marcada asociación entre aquellos con el mismo origen geográfico. El grupo A, compuesto por 20 aislados, agrupó a la gran mayoría de los representantes del Reino Unido, englobando al 94 % de los aislados británicos (16 de 17 del total de aislados con este origen) con la excepción del aislado 80p04, que se localizó en el grupo B1. Además, el grupo A incluyó a dos aislados procedentes de las Islas Canarias y de la península española, representando el 11.7 % (2 de 17 del total de aislados con este origen geográfico) y el 13.3 % (2 de 15 del total de aislados con este origen geográfico) respectivamente.

El grupo B1, formado por 8 representantes, presentó una composición mixta formada mayoritariamente por aislados procedentes de las Islas Canarias (5 de 17 del total de aislados con este origen geográfico), junto con los aislados Rmr 3 y Rmr 11, con origen en la España peninsular (2 de 15 del total de aislados con este origen geográfico), además del aislado procedente del Reino Unido anteriormente mencionado.

El grupo B2 agrupó a la gran mayoría de los aislados procedentes de la península española, concentrando al 73.3 % de todos los aislados con este origen geográfico (11 de 15 cepas totales analizadas). Además en este grupo también se localizaron 4 aislados con origen en las Islas Canarias (23.5 % del total de aislados con este origen) junto con la cepa de referencia de *M. hyorhina*.

El grupo C constituyó el grupo con menor número de representantes, con un total de 6 aislados en total. Este grupo estuvo compuesto exclusivamente por aislados procedentes de las

Islas Canarias (35.2 % del total de aislados con este origen geográfico). La distribución de aislados por tipo de Southern blotting se puede observar en la tabla 2.8.

Grupo de Southern blotting	Origen	Porcentaje en relación al origen			Porcentaje total de aislados en grupo	
		RU	ESP	IC		
A	RU, ESP, IC	94.1 % (16/17)	13.3 % (2/15)	11.7 % (2/17)	40 % (20/50)	
B	RU, ESP, IC, REF	5.9 % (1/17)	86.7 % (13/15)	53 % (9/17)	100 % (1/1)	48 % (24/50)
B1	ESP, IC, RU	13.3 % (2/15)	29.4 % (5/17)	5.9 % (1/17)	16 % (8/50)	
B2	ESP, IC, REF	73.4 % (11/15)	23.6 % (4/17)	100 % (1/1)	32 % (16/50)	
C	IC	35.3 % (6/17)			12 % (6/50)	

Tabla 2.8. Distribución de aislados por grupos de Southern blotting. El valor entre paréntesis indica el número de cepas por el total del respectivo origen geográfico

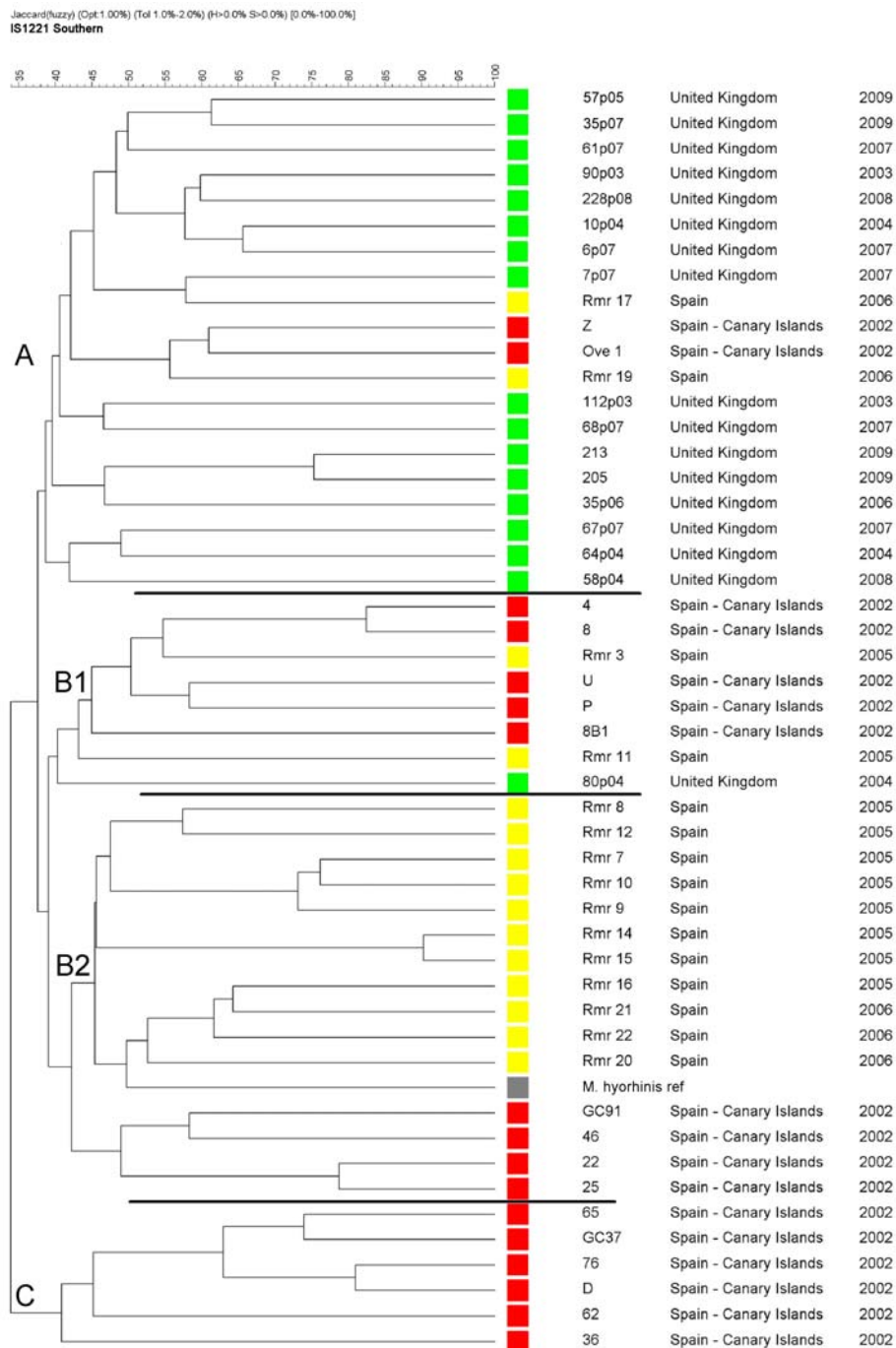


Figura 2.10. Dendrograma obtenido tras el análisis de perfiles de bandas de Southern blotting

2.3.5. VNTR

La evaluación de los diferentes pares de oligonucleótidos previamente diseñados demostró cómo solamente 2 regiones repetitivas en el genoma de *M. hyorhinis* BTS-7 presentaron diferencias suficientes para ser detectables tras la electroforesis en geles de agarosa. Por lo tanto, sólo las regiones MHR-TR-2 (regulador de transcripción) y MHR-TR-6 (proteína putativa sin caracterizar) fueron empleadas para el análisis de aislados a través de esta técnica.

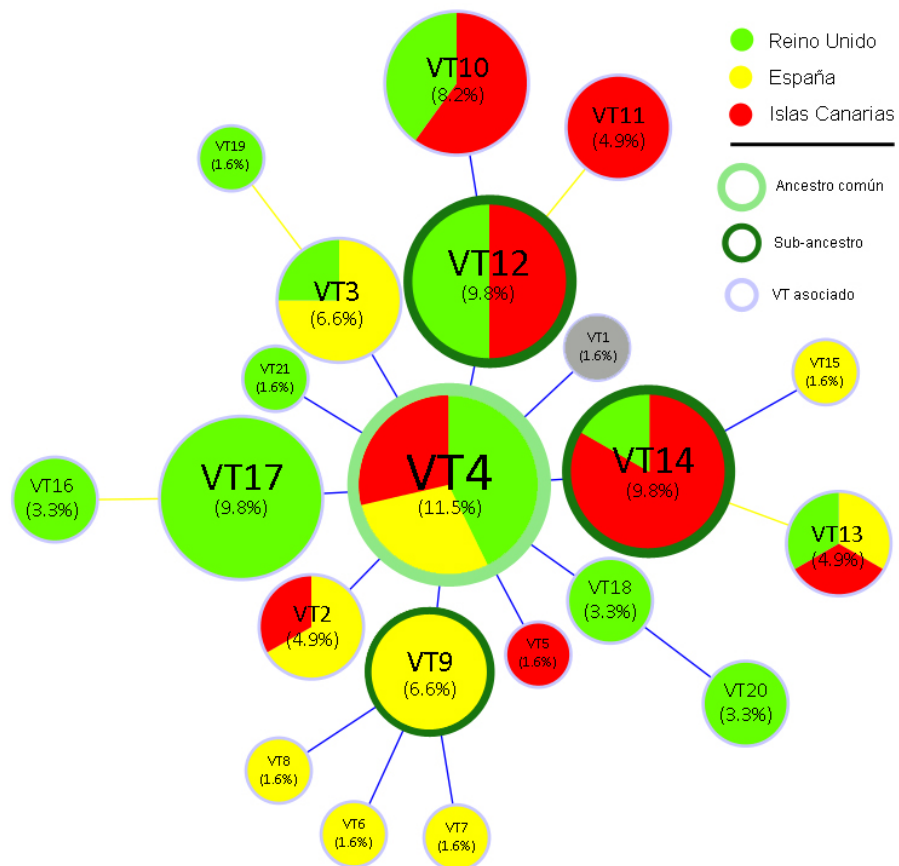


Figura 2.11. MST representando las relaciones filogenéticas entre tipos de VNTR (VT) obtenidas tras el análisis de VNTR

En total se obtuvieron 21 VTs diferentes tras la combinación de los diferentes perfiles de bandas observados a partir del análisis de las regiones repetitivas anteriormente descritas. La distribución de aislados por VT se encuentra representada en la tabla 2.9.

VT	Número de aislados por VT	Porcentaje con respecto al total de aislados	Reino Unido	España	Islas Canarias	M. hyorhinis ref.
4	7	11,5 %	3	2	2	-
12	6	9,8 %	3	-	3	-
14	6	9,8 %	1	-	5	-
17	6	9,8 %	6	-	-	-
10	5	8,2 %	2	-	3	-
3	4	6,6 %	1	3	-	-
9	4	6,6 %	-	4	-	-
11	3	4,9 %	-	-	3	-
13	3	4,9 %	1	1	1	-
2	3	4,9 %	-	2	1	-
16	2	3,3 %	2	-	-	-
18	2	3,3 %	2	-	-	-
20	2	3,3 %	2	-	-	-
1	1	1,6 %	-	-	-	1
15	1	1,6 %	-	1	-	-
19	1	1,6 %	1	-	-	-
21	1	1,6 %	1	-	-	-
5	1	1,6 %	-	-	1	-
6	1	1,6 %	-	1	-	-
7	1	1,6 %	-	1	-	-
8	1	1,6 %	-	1	-	-
Total:	61		25	16	19	1

Tabla 2.9. Distribución de VT por origen

La figura 2.11 representa un MST obtenido tras el análisis filogenético con el software bioinformático Phyloviz. Este análisis señala al ST4 (11.5 % del total de aislados analizados), formado por representantes del Reino Unido (3 de 25), España peninsular (2 de 16) e Islas Canarias (2 de 19) como el ancestro común, relacionándolo estrechamente con el VT12, VT14 y VT19, que a su vez fueron considerados por este análisis como sub-ancestros. Los demás VTs fueron considerados con VTs asociados. VT11, VT13, VT16 y VT19, unidos por una línea amarilla a cada uno de sus grupos asociados, presentaron el mayor nivel de variabilidad en comparación con el total de los diferentes grupos de VNTR descritos.

2.3.6. Análisis estadístico

Sólo los aislados tipificados empleando cada una de las técnicas descritas anteriormente fueron utilizados en el análisis estadístico final. Los aislados empleados junto con los perfiles asignados a cada uno de ellos por las diferentes técnicas de tipificación se encuentran recogidos en el anexo 2.1.

Los resultados obtenidos tras el análisis del índice de diversidad de Simpson (IDS) de las diferentes técnicas demuestra cómo la técnica de SB presenta la mayor capacidad discriminatoria en comparación con las otras técnicas testadas, seguida estrechamente por de la técnica de PFGE, RAPD y VNTR. Todas las técnicas presentaron un nivel de discriminación cercano al 0.95 por lo que se consideran como buenos sistema de tipificación (ver tabla 2.10).

Técnica	Número de divisiones	IDS	IC (95 %)
VNTR	18	0.947	(0.923-0.972)
RAPD	28	0.973	(0.949-0.997)
PFGE	32	0.987	(0.971-1.000)
SB	34	0.994	(0.987-1.000)

Tabla 2.10. IDS e IC de cada una de las técnicas de tipificación evaluadas

En la tabla 2.11 se exponen los niveles de significación obtenidos tras el estudio comparativo de los intervalos de confianza producidos tras el análisis de diversidad. Estos niveles, representados como valor p, permiten valorar si la diferencia entre los diferentes índices de diversidad puede ser considerada estadísticamente significativa. Los resultados de este análisis demuestran cómo sólo las diferencias entre el IDS de PFGE y VNTR y SB y VNTR son significativamente diferentes por lo que pueden considerarse como valores distintos. El análisis de las demás comparaciones demuestra cómo la diferencia entre los IDS de SB y PFGE, RAPD y VNTR, RAPD y PFGE y RAPD y SB no es estadísticamente significativa, por lo que su capacidad discriminatoria es estadísticamente indistinguible.

	VNTR	PFGE	SB	RAPD
VNTR				
PFGE	0.001			
SB	<0.001	0.391		
RAPD	0.200	0.402	0.125	
Leyenda	p ≥ 0.05		p < 0.05	

Tabla 2.11. Análisis de los niveles de significación entre IDS (IC) de las diferentes técnicas analizadas

El análisis de asociación entre técnicas basado en el coeficiente ajustado de Wallace demostró cómo la correlación entre las técnicas descritas es relativamente baja (ver tabla 2.12). La mayor correlación se observó entre SB y PFGE, donde se observó un coeficiente ajustado de

Wallace_{SB → PFGE} igual a 0.494. Este valor significa que las cepas localizadas dentro de un mismo tipo de SB tras el análisis de secuencias de inserción tienen un 49.4 % de posibilidades de pertenecer al mismo grupo al ser analizadas a través de la técnica de PFGE. Además de este ejemplo, la asociación entre PFGE y VNTR demostró ser de las más altas, con un coeficiente ajustado de Wallace_{PFGE → VNTR} igual a 0.414. Los demás valores obtenidos son menores de 0.218, lo que demuestra una baja correlación entre las demás técnicas.

	RAPD	SB	PFGE	VNTR
RAPD		0.000 (0.000-0.201)	0.040 (0.000-0.249)	0.111 (0.000-0.360)
SB	0.000 (0.000-0.514)		0.494 (0.135-0.852)	0.208 (0.000-0.665)
PFGE	0.086 (0.000-0.378)	0.218 (0.000-0.555)		0.414 (0.005-0.822)
VNTR	0.056 (0.000-0.205)	0.021 (0.000-0.168)	0.097 (0.000-0.273)	

Leyenda: 0-0.1 0.1-0.3 > 0.3

Tabla 2.12. Resultados del análisis de asociación entre técnicas de tipificación basado en el coeficiente ajustado de Wallace

2.4. Discusión

Las técnicas de tipificación molecular aplicadas al estudio de micoplasmas han presentado un nivel de desarrollo paralelo al observado en otros microorganismos de interés tanto veterinario como de salud pública. En el campo de la micoplasmología el desarrollo de estas técnicas se ha ralentizado debido a la falta de genomas completos, lo que ha limitado directamente el número de técnicas que pueden ser desarrolladas, como por ejemplo VNTR o

MLST, por lo que la mayoría de los esfuerzos enfocados al desarrollo de estos esquemas se ha enfocado hasta la fecha principalmente en el empleo de técnicas tradicionales, como es el caso de RAPD, PFGE y Southern blotting.

Dentro de estas técnicas tradicionales, el RAPD ha presentando el mayor grado de utilización en el campo de la micoplasmología, habiéndose aplicado al estudio de la epidemiología molecular de casi todos los micoplasmas con importancia clínica en sanidad humana y animal (Geary *et al.*, 1994; Artiushin y Minion, 1996; Butler *et al.*, 2001; McAuliffe *et al.*, 2004; Parham *et al.*, 2006; Mannering *et al.*, 2009; Nathues *et al.*, 2011; Pinho *et al.*, 2012). La técnica de RAPD desarrollada en este capítulo presentó un IDS de 0.973. Este valor es comparable al obtenido en otras aplicaciones de esta técnica al estudio de micoplasmas, como en el caso de Stakenborg y colaboradores (2006), que fueron capaces de obtener un IDS de 0.95 tras aplicar esta técnica al estudio de cepas de campo de *M. hyopneumoniae* o Ferguson y colaboradores que demostraron un SID de 0.958 tras analizar cepas de campo de *M. gallisepticum* (Ferguson *et al.*, 2005). Gracias al análisis del dendrograma obtenido con BioNumerics se puede observar una mayor variabilidad dentro de los aislados procedentes de las Islas Canarias, mientras que los aislados procedentes de la península española y del Reino Unido presentaron cierta tendencia a agruparse juntos. Esta variabilidad en los aislados de las Islas Canarias puede explicarse por la diversidad en el origen de los animales vivos importados desde otros países Europeos con el fin de surtir al mercado de cría porcino isleño, lo que puede dar lugar a la introducción de nuevos aislados en animales portadores de este microorganismo que llegan a las islas.

Sin embargo, y a pesar de su buen IDS y facilidad de interpretación basada en dendrogramas, esta técnica presenta una gran desventaja debido a su demostrada falta de reproducibilidad. Este hecho, observado en nuestro estudio, implica que cualquier tipo de análisis de epidemiología molecular basado en esta técnica deba realizarse a partir de un experimento único (Stakenborg *et al.*, 2006). Estos bajos niveles de reproducibilidad se han observado con anterioridad en varios casos (Penner *et al.*, 1993; Van Looveren *et al.*, 1999), presentándose incluso en especies de micoplasma donde esta técnica ha gozado de un gran éxito en estudios epidemiológicos, como el caso de *M. gallisepticum* (Hong *et al.*, 2005). Si se tiene en cuenta esta baja reproducibilidad a la hora de establecer experimentos que requieran el uso de esta técnica, la técnica de RAPD representa una herramienta útil en el campo de la epidemiología molecular, debido a su bajo coste y facilidad de realización, siempre y cuando se pueda reducir al máximo cualquier tipo de variable que afecte el resultado final.

SB presentó la mayor capacidad discriminadora de todas las técnicas desarrolladas en este capítulo en términos absolutos, aunque tras realizar el análisis de significación de los intervalos de confianza de los diferentes IDS, SB demostró presentar valores indistinguibles a los presentados por las técnicas de RAPD y PFGE. En lo que respecta a su reproducibilidad, los resultados obtenidos con esta técnica fueron altamente consistentes. A pesar de la complejidad de los perfiles de bandas obtenidos tras el análisis de la secuencia de inserción IS1221, la evaluación de los patrones de bandas con el software bioinformático BioNumerics tras el análisis basado en el coeficiente de Jaccard, demostró una clara agrupación de los aislados procedentes del Reino Unido, la España peninsular y de la mayoría de los aislados de las Islas Canarias. La alta capacidad de discriminación y reproducibilidad presentada por esta técnica demuestra que puede ser

aplicada de forma eficiente al análisis de *M. hyorhinis*, lo que se ha demostrado en otras especies de micoplasmas, como es el caso de *M. mycoides* subespecie *mycoides* Large Colony type (actualmente renombrada como *M. mycoides* subespecie *capri* (Manso-Silván *et al.*, 2009)), donde se ha utilizado con éxito a la hora de determinar aislados asociados a brotes de enfermedad (Tardy *et al.*, 2007) o en otras especies bacterianas y levaduras con alta importancia clínica como en el caso de *Mycobacterium tuberculosis* (Bifani *et al.*, 2009), *Enterococcus faecius* (Werner *et al.*, 2001) o *Candida albicans* (Postlethwait *et al.*, 1996). El principal contrapunto asociado a esta técnica reside en la larga duración de los protocolos empleados, con un tiempo promedio de cinco días junto con los tres días necesarios para obtener el ADN con una alta concentración, por lo que limita su uso como técnica de elección para tipificación a tiempo real, relegándola a un segundo plano como técnica de subtipificación tras el uso de otros test con similar capacidad de discriminación y bajo tiempo de realización, como es el caso de las técnicas basadas en PCR.

Con el fin de evitar esta desventaja y aprovechando la capacidad de discriminación asociada a la detección de secuencias de inserción en genomas bacterianos, varios autores han evaluado el potencial de detección de estas secuencias a través de cebadores específicos que tras PCR son capaces de crear un patrón de bandas único basado en la posición y tamaño de estos elementos móviles de ADN (Ooka *et al.*, 2009; Kaleta *et al.*, 2009). Una aplicación de esta técnica para la tipificación de *M. hyorhinis*, podría representar una posible alternativa al uso de SB, reduciendo la complejidad de la técnica sin perder su valor discriminatorio.

La técnica PFGE presentó un excelente nivel de discriminación, similar al obtenido con SB e indistinguible de ésta tras el análisis basado en el coeficiente ajustado de Wallace, junto con un nivel de reproducibilidad óptimo. El uso de la enzima de restricción *NheI* demostró ser de gran utilidad para la tipificación de *M. hyorhinis*. Esta enzima ha demostrado su utilidad en microorganismos de gran importancia clínica, como en el caso de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* (Xia *et al.*, 2000; Popovic *et al.*, 2001), aunque en lo que respecta a su aplicación para el análisis de otros miembros del género *Mycoplasma*, y a pesar de haber sido evaluada para la tipificación de *M. mycoides* subesp. *mycoides* SC y *M. capricolum* subesp. *capripneumoniae* (Kusiluka *et al.*, 2001), no se ha conseguido su uso con éxito para el estudio de estos microorganismos, siendo ésta la primera descripción de la aplicación de *NheI* en un esquema final de tipificación dirigido al estudio de micoplasmas. Las excelentes características de este esquema demuestran las razones del gran éxito y distribución que PFGE presenta en el campo de la epidemiología molecular, habiendo sido reconocida de forma indiscutible durante más de 10 años con la técnica de tipificación bacteriana de referencia (Goering, 2010). Sin embargo, en el caso de micoplasmas, PFGE no ha llegado a tener el nivel de desarrollo presentado en otros microorganismos donde su aplicabilidad y distribución ha permitido el desarrollo de bases de datos y esquemas estandarizados que han servido de gran apoyo a intervenciones clínicas gracias a la detección temprana y seguimiento de brotes de enfermedad (Graves *et al.*, 2005), por lo que su potencial en el estudio de micoplasmas, probablemente debido a complejidad asociada al cultivo de estos microorganismos, no se ha podido aplicar al máximo dentro del campo de estudio de la epidemiología molecular de este género bacteriano.

Recientemente y gracias a la facilidad técnica y económica para conseguir genomas completos *de novo* desarrollada en los últimos 10 años (Didelot *et al.*, 2012), se ha observado un aumento en el uso de técnicas como MLST, técnica de referencia actual para algunas especies bacterianas, aunque de escaso desarrollo en micoplasmología debido a su alto coste como técnica de rutina o VNTR, que gracias a su facilidad de realización, reproducibilidad y bajo coste presenta muchas ventajas respecto a otras técnicas de tipificación aplicadas al estudio de micoplasmas. En nuestro análisis, VNTR demostró una excelente capacidad de discriminación con un IDS de 0.947, indistinguible estadísticamente del obtenido con la técnica de RAPD y muy cercano al obtenido con PFGE y SB. Este nivel de IDS es similar al demostrado en otros trabajos basados en la aplicación de VNTR al estudio de micoplasmas, como es el caso de *M. hyopneumoniae* donde se observó un IDS de 0.93 (Vranckx *et al.*, 2011) o en *M. pneumoniae*, donde tras el análisis de muestras procedentes de procesos epidémicos en diferentes periodos de tiempo se observaron valores de IDS entre 0.91 y 0.93 (Chalker *et al.*, 2012). A diferencia de nuestro caso, la mayoría de las técnicas de VNTR descritas hasta la fecha utilizan más de dos regiones repetitivas en su metodología, como por ejemplo, cuatro en el caso de *M. hyopneumoniae* o *M. pneumoniae*, con 5 regiones empleadas (Dégrange *et al.*, 2009). Teóricamente un incremento en el número de regiones a analizar debería llevar consigo un aumento en la capacidad discriminatoria de la técnica, aunque en nuestro caso sólo dos regiones han sido capaces de proporcionar niveles de discriminación similares. A pesar del limitado número de regiones analizadas, la capacidad discriminatoria presentada por esta técnica junto con la facilidad de realización e interpretación y bajo coste de la misma la sitúan como la técnica

de elección para tipificación molecular de *M. hyorhinis* dentro de las técnicas descritas en este capítulo.

El análisis de asociación entre técnicas de tipificación basado en el coeficiente de Wallace presentó un nivel de medio a bajo, con un valor máximo de 0.494, cercano al valor descrito anteriormente como aceptable para este tipo de análisis (Pinto *et al.*, 2008). Este análisis demostró que la técnica de SB es capaz de predecir los grupos presentes en PFGE con una probabilidad cercana al 50 %, aunque esta asociación no fue observada de forma recíproca. Este bajo nivel de asociación entre diferentes técnicas de tipificación aplicadas al estudio de micoplasma se ha demostrado anteriormente en el caso de *M. bovis* (Pinho *et al.*, 2012). Este hecho puede explicarse por la diferente naturaleza de las diferentes técnicas en estudio, ya que cada una de ellas se basa en metodologías altamente diferentes, lo que puede dar lugar a un bajo nivel de capacidad predictiva entre ellas.

El análisis de la variabilidad antigénica de *M. hyorhinis* demostró cómo este microorganismo presenta una composición proteica bastante estable, presentando solo ligeras diferencias en una región inmunodominante situada ente los 40 y 46 kDa de peso molecular aparente, la cual puede presentar un gran potencial para el desarrollo de tests serológicos de diagnóstico basadas en la detección de las proteínas presentes en este rango. Los pesos moleculares aparentes de algunas de las proteínas inmunodominantes descritas en este capítulo corresponden con las descritas por Assunção en 2003 tras analizar los principales componentes antigénicos de *M. hyopneumoniae*, otro micoplasma porcino estrechamente relacionado con *M. hyorhinis*. Este hallazgo puede demostrar una posible relación genética y antigénica entre ambos

microorganismos, con posibles implicaciones en el desarrollo de vacunas y tests diagnósticos, aunque estudios más detallados serían necesarios para demostrar esta posibilidad. La escasa variabilidad antigénica de *M. hyorhinis* representa una característica diferencial de este microorganismo, similar a los resultados obtenidos por Tola y colaboradores en 1996 al estudiar *M. agalactiae*, donde las principales proteínas inmunogénicas se encontraron representadas, al igual que en nuestro caso, en todos los aislados estudiados. Sin embargo, otros estudios enfocados al análisis de la variabilidad antigénica y proteica de *M. agalactiae* (De la Fe *et al.*, 2006) y *M. hyopneumoniae* (Assunção *et al.*, 2005; Calus *et al.*, 2006) demostraron cómo cepas de estas especies de micoplasma pueden presentar una alta variabilidad tras ser analizadas por SDS-PAGE e Western blotting, por lo que la variabilidad antigénica en micoplasma puede estar relacionada estrechamente a la especie analizada. Cabe destacar que en casos como el de *M. hyorhinis* y *M. agalactiae* existen diversos mecanismos de regulación antigénica de complejos inmunodominantes de superficies (Citti *et al.*, 2000) lo que podría explicar las diferencias observadas con este tipo de análisis protéico hasta cierto punto.

Las diferentes técnicas de tipificación descritas en este capítulo junto con la caracterización antigénica nos proporcionan un acercamiento al entendimiento de la variabilidad genética y proteica de *M. hyorhinis*, con información que puede ser de gran utilidad para el desarrollo de medidas de control aplicadas a este microorganismo entre las que se podrían encontrar nuevas técnicas de diagnóstico, control y profilaxis y sistemas de vigilancia epidemiológica basada en sistemas de tipificación molecular más rápidos y efectivos.

Capítulo 2 – Anexos

Anexo 2.1. Aislados caracterizados y perfiles asignados por técnica de tipificación

Aislado	Grupo de Western blotting / tipificación					Origen	Año de aislamiento
	Western blotting	RAPD	PFGE	Southern blotting	VNTR		
Referencia - BTS-7	1	A2b	B1	B2	1	Estados Unidos	1955
Rmr 3	1	A1	A1a2	B1	4	España	2005
Rmr 7	2	A2a		B2	15	España	2005
Rmr 8	2	A1	A1a1b	B2	3	España	2005
Rmr 9	2	A1	A1a2	B2	6	España	2005
Rmr 10				B2	2	España	2005
Rmr 11				B1	8	España	2005
Rmr 12	2	A1	A1a1b	B2	3	España	2005
Rmr 14	1	A1	B1	B2	9	España	2005
Rmr 15	2	A1	B1	B2	2	España	2005
Rmr 16	1	A1	B1	B2	3	España	2006
Rmr 17	2	A1	B1	A	13	España	2006
Rmr 18					9	España	2006
Rmr 19	2	A1	B1	A	4	España	2006
Rmr 20				B2	9	España	2006
Rmr 21	2	A1	D	B2	7	España	2006
Rmr 22				B2	9	España	2006
4	2	A2b	B1	B1	10	Islas Canarias	2002
8	2	A2a	B2	B1	10	Islas Canarias	2002
22	2	A2a	B2	B2	11	Islas Canarias	2002
25	2	A2a	B2	B2	2	Islas Canarias	2002
36	1	A2a	A2	C	5	Islas Canarias	2002
45				B2	14	Islas Canarias	2002
46	2	D	B2		4	Islas Canarias	2002
54	2	A2a	A2		12	Islas Canarias	2002
62	2	C	A1a1a	C	13	Islas Canarias	2002
65	1	C	B2	C	14	Islas Canarias	2002
76	2	B	B2	C	14	Islas Canarias	2002
D	1	A2a	B2	C	4	Islas Canarias	2002
P	2	A2a	A1a2	B1	11	Islas Canarias	2002
U	2	A2b	A2	B1	12	Islas Canarias	2002
Z	2	A2b	A1a2	A	10	Islas Canarias	2002
8B1	1	A1	A1a2	B1	14	Islas Canarias	2002
Ove 1	3	C	A2	A	12	Islas Canarias	2006
GC37	1	B	B2	C	14	Islas Canarias	2006

Capítulo II – Anexos

GC91	2	A2a	A1a2	B2	11	Islas Canarias	2006
90p03	3	A2a	A1a1a	A	13	Reino Unido	2003
112p03	2	A2a	A1a1a	A	14	Reino Unido	2003
10p04	1	A2a	A1a1a	A	12	Reino Unido	2004
58p04	2	A2a	A1a1b	A	18	Reino Unido	2004
64p04	1	A2a	A1a1a	A	19	Reino Unido	2004
80p04	4	A2b	A1a1b	B1	21	Reino Unido	2004
57p05	1	A2a	A1b	A	4	Reino Unido	2005
35p06	1	A2a	A1a1a	A	18	Reino Unido	2006
6p07				A	20	Reino Unido	2007
7p07				A	16	Reino Unido	2007
35p07	2	A2a	A1b	A	17	Reino Unido	2007
61p07	1	A2a	A1a1a	A	4	Reino Unido	2007
67p07	1	A2a	C	A	16	Reino Unido	2007
68p07				A	20	Reino Unido	2007
10p08					3	Reino Unido	2008
11p08					4	Reino Unido	2008
228p08				A		Reino Unido	2008
73p09					17	Reino Unido	2009
362p10					17	Reino Unido	2010
364p10					17	Reino Unido	2010
372p10					17	Reino Unido	2010
373p10					17	Reino Unido	2010
329P11					10	Reino Unido	2011
330P11					10	Reino Unido	2011
205				A	12	Reino Unido	2011
213				A	12	Reino Unido	2011

Leyenda:  No tipificado

Anexo 2.2. Medio de Friis para el aislamiento de micoplasma porcinos

Medio de Friis

Para 1 litro de medio:

Caldo Infusión de Cerebro y Corazón	5 g
Extracto de levadura Bacto	3.6 g
PPLO Broth sin cristal violeta	5 g
Glucosa	2 g
Suero porcino inactivado	200 ml
Solución de Hanks	30 ml
Rojo fenol al 0.2 %	7 ml
Solución de ampicilina (100 mg/ml)	1 ml
Agua destilada	Hasta 1000 ml

Se ajustó el pH a 7,4 con hidróxido sódico 1 M o ácido clorhídrico 1 M y se esterilizó por filtración usando un filtro de 0.2 μ m. Una vez preparado se distribuyó el medio en alícuotas de 3 ml cada uno usando tubos de cristal estériles y se guardó a 4 °C hasta su uso. Todo medio sin usar se descartó tras 6 meses.

Solución de Hanks

Para 1100 ml de solución:

Cloruro Cálcico (CaCl_2)	1.4 g
Glucosa	10 g
Cloruro sódico (NaCl)	80 g
Cloruro potásico (KCl)	4 g
Sulfato de magnesio heptahidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.6 g
di-sodio hidrogeno fosfato dodecahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.6 g
Agua destilada	Hasta 1100 ml

Ajustar el pH a 6.8 con hidróxido sódico 1 M o ácido clorhídrico 1 M y esterilizar por filtración usando un filtro de 0.2 μm .

Una vez preparado distribuir el medio en alícuotas de 100 ml cada uno guardar a 4 °C hasta su uso.

Anexo 2.3. Reactivos de Western blotting

Búfer de electroforesis (5 X)

Tris base	75 g
Glicina	360 g
Dodecilsulfato sódico (SDS)	25 g

Disolver en 5 litros de agua bidestilada. Conservar a 4 °C hasta su uso por un máximo de un año.

Antes de usar diluir 1/5 con agua bidestilada.

Búfer de transferencia (búfer de Bjerrum y Schafer-Nielsen)

Tris base	5.82 g
Glicina	2.93 g
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10 %	3.75 ml
Metanol (grado analítico)	200 ml

Añadir agua bidestilada hasta alcanzar 1 litro. Ajustar el pH a 9,2 con hidróxido sódico 1 M o ácido clorhídrico 1 M.

Conservar a temperatura ambiente por un máximo de 1 año.

Tinción de Ponceau S al 0.2 %

Ponceau S	0.2 g
Ácido acético glacial	10 ml
Agua bidestilada	90 ml

Conservar a temperatura ambiente por un máximo de 1 año.

Solución de bloqueo

Glicina	7.5 g
Ovoalbúmina	1 g
Leche desnatada en polvo	5 g
PBS 0.1 M pH 7.2	100 ml

Conservar refrigerado a 4 °C por un máximo de 2 días. Usar a temperatura ambiente.

Búfer de dilución

Ovoalbúmina	0.1 g
Leche desnatada en polvo	0.1 g

PBS 0.1 M pH 7.2

100 ml

Conservar refrigerado a 4 °C por un máximo de 2 días. Usar a temperatura ambiente.

Búfer fosfato salino (PBS) 0.1 M pH 7.2 100 ml

Preparar usando comprimidos de PBS (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ajustar el pH a 7,2 con hidróxido sódico 1 M o ácido clorhídrico 1 M.

Conservar a temperatura ambiente por un máximo de un año

0.1 M PBS + 0.1 % Tween 20 (PBST)

Añadir 1 ml de Tween 20 a 1 litro de PBS 0.1 M pH 7.2.

Conservar a temperatura ambiente por un máximo de un año

Anexo 2.4. Búfer de electroforesis para geles de agarosa

Búfer TBE (5 X)

Para 1 litro

Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20 ml

Antes de usar diluir 1/5 con agua bidestilada.

Anexo 2.5. Reactivos para PFGE

PBS + glucosa

Para 1 litro:

Glucosa	100 g
PBS 0.1 M pH 7.2	Hasta alcanzar un volumen de un litro

Conservar refrigerado a 4 °C por un máximo de 6 meses.

Búfer de lisis

Para 20 ml:

N-lauroilsarcosina	0.25 g
Búfer TE 100 X	250 µl
Agua bidestilada estéril	25 ml

Filtrar un volumen de 20 ml usando filtros de jeringa de 0.2 µm de poro y añadir proteinasa K a una concentración final de 1 mg/ml.

Anexo 2.6. Southern Blotting. Protocolo de extracción de ADN a partir de grandes volúmenes basada en la técnica de fenol/cloroformo.

Todas las extracciones se realizaron a partir de 40 ml de cultivo.

Protocolo:

- Transferir los cultivos en tubos cónicos de centrifugación de 50 ml de volumen total y centrifugar a 6000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.
- Retirar el sobrenadante y resuspender el depósito celular en 1 ml de PBS 0.1 M pH 7.2. Una vez resuspendido, transferir la suspensión celular en tubos de micro centrifugación de 2 ml de volumen total.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.
- Retirar el sobrenadante y resuspender el depósito celular en 380 µl de búfer de lisis (ver final de este protocolo).
- Añadir 20 µl de proteinasa K de grado molecular a una concentración de 20 mg/ml e incubar a 55 °C por dos horas o a 37 °C durante toda la noche.
- Atemperar las muestras a 37 °C en caso de que sea necesario y añadir 25 µg de ribonucleasa A de grado molecular a cada una de las muestras. Incubar por 1 hora a 37 °C.
- Transferir de forma cuidadosa cada una de las muestras a tubos phase lock gel light (5prime) de forma individual y añadir 400 µl de fenol saturado en búfer a cada una de ellas. Cerrar los tubos y mezclar cuidadosamente por inversión y centrifugar rápidamente a 14000 rpm durante 3 minutos con el fin de separar las diferentes fases.
- Transferir el sobrenadante (fase acuosa) a tubos phase lock gel light nuevos y repetir el paso anterior tras añadir 400 µl de fenol saturado en búfer.
- Repetir el paso anterior sustituyendo en este paso el fenol saturado en búfer por 400 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifugación estéril y libre de nucleasas y añadir 40 µl de acetato de sodio 3 M (conservado a 4 °C) y 1 ml de etanol de grado

molecular al 100 % (conservado a -20 °C). Mezclar usando un vórtex durante 1 minuto e incubar a -20 °C de 24 a 48 horas.

- Tras la incubación a -20 °C centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 400 µl de etanol al 70 % (conservado a -20 °C) pipeteando el contenido del tubo 10 veces.
- Centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet *al* aire durante 5 minutos o hasta que todo el etanol se haya evaporado.
- Resuspender el pellet en 300 µl de agua bidestilada estéril libre de nucleasas.
- Cuantificar la concentración de ADN usando el sistema de cuantificación por espectrofotometría Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) u otro sistema alternativo.

Una vez cuantificado el ADN se puede conservar a 4 °C si va a ser usado inmediatamente o a -20 °C para periodos de almacenamiento prolongados.

Búfer de lisis de Southern blotting

En primer lugar es necesario preparar el búfer TNE.

- Búfer TNE 10x

Tris base	1.21 g
EDTA	0.37 g
Cloruro sódico	11.68 g

Añadir agua bidestilada estéril hasta alcanzar un volumen de 100 ml.

Combinar los siguientes reactivos para preparar el búfer de lisis de Southern blotting:

TNE 10X	10 ml
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10 %	10 ml
N-lauroilsarcosina al 5 %	20 ml
Agua bidestilada estéril	60 ml

Anexo 2.7. Protocolo de Southern blotting.

- Separación de los fragmentos de ADN:
 - Preparar un gel de agarosa al 0.7 % de 21 cm de longitud y 5 mm de grosor usando TBE 0.5X (obtenido a partir de la receta descrita en el anexo 2.4. de esta tesis) con 25 pocillos.
 - Cargar 20 µl de marcador de peso molecular marcado con digoxigenina (DNA Molecular Weight Marker III; DIG-labeled, Roche) en el primer y último pocillo del gel.
 - Cargar todo el volumen de cada reacción en un pocillo independiente.
 - A continuación realizar el proceso de electroforesis a 30 V durante 18 horas usando como búfer de electroforesis TBE 0.5X.

- Transferencia electroforética del ADN a membrana de nailon cargada positivamente o blotting:
 - Cortar dos papeles secantes de 3 mm de grosor (Bio-Rad) y la membrana de nailon cargada positivamente (Roche) del mismo tamaño del gel de agarosa y empapar en TBE 0.5X durante 10 minutos.
 - Preparar un sándwich formado dos papeles secantes conteniendo el gel y la membrana en su interior con la siguiente estructura: papel secante – gel de agarosa – membrana de nailon – papel secante.
 - Colocar en sándwich en la parte inferior del aparato de transferencia electroforético semiseco (Bio-Rad) con el gel mirando hacia arriba. Una vez colocado, eliminar las posibles burbujas formadas dentro del sándwich con un rodillo y colocar la parte superior del sistema de transferencia.
 - La transferencia se realiza a una intensidad de corriente eléctrica constante calculada en mA. La cantidad de mA usada depende la superficie total del gel en uso y se calcula tras multiplicar el área del gel en cm² por un 3.55, basado en las instrucciones del fabricante (Bio-Rad).

- Una vez calculada intensidad de corriente eléctrica a utilizar, conectar el sistema de transferencia usando una fuente de energía Bio-Rad 200, ajustarlo a la cantidad de mA necesarios y proceder a la transferencia del ADN durante 10 minutos.
 - Una vez terminada la transferencia, desmontar el sándwich y teñir el gel en bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml durante 30 minutos y visualizar bajo iluminación ultravioleta con el fin de comprobar la correcta transferencia del ADN a la membrana.
 - Lavar la membrana en NaOH 0.4 M por 1 minuto seguido de dos lavados en SSC 2 X de 1 minuto cada uno.
 - En este momento se puede dejar secar y conservar la membrana en un lugar seco y fresco hasta su posterior uso y se puede proceder directamente al proceso de hibridación.
- Hibridación:
- Prehibridación: humedecer la membrana en SSC 2 X y colocarla enrollada en el interior de un tubo de hibridación.
 - Añadir 20 ml de búfer de hibridación en el tubo. Cerrar el tubo y colocar en el horno de hibridación en rotación constante durante 1 hora a 68 °C.
 - Antes de que el paso anterior finalice, desnaturalizar la sonda de ADN marcada con digoxigenina DNA a 95 °C durante de 2 a 5 minutos. Una vez finalizada la desnaturalización colocar la sonda inmediatamente en hielo hasta su uso.
 - Una vez finalizada la incubación de 1 hora retirar el búfer de hibridación del tubo y añadir 10 ml de búfer de hibridación fresco conteniendo 4 µl de sonda desnaturalizada.
 - Cerrar el tubo y colocar en el horno de hibridación en rotación constante durante 18 horas a 68 °C.
 - Una vez finaliza retirar el búfer de hibridación y lavar la membrana con 50 ml de búfer de lavado I durante 5 minutos a 68 °C en el horno de hibridación con rotación constante.
 - Repetir el paso anterior.

- Retirar el búfer de lavado I y lavar la membrana por duplicado con 50 ml de búfer de lavado II durante 5 minutos a temperatura ambiente en el horno de hibridación con rotación constante.
- Detección de la hibridación:
 - Todos los pasos de detección de la hibridación se realizaran a temperatura ambiente.
 - Incubar la membrana con 20 ml de búfer de ácido maleico (Roche) durante 10 minutos en un agitador de plataforma orbital.
 - Retirar el búfer de ácido maleico.
 - Añadir 20 ml de búfer de bloqueo (Roche) e incubar durante 10 minutos en un agitador de plataforma orbital.
 - Retirar el búfer de ácido maleico.
 - Añadir 10 ml de una dilución 1/5000 de anticuerpo antidigoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (Roche) diluido en búfer de bloqueo e incubar durante 30 minutos en un agitador de plataforma orbital asegurando que toda la membrana es recubierta completamente con la solución.
 - Lavar la membrana por duplicado con búfer de lavado DIG 1X (Roche) durante 15 minutos en un agitador de plataforma orbital.
 - Equilibrar la membrana en 20 ml de búfer de detección 1X (Roche) durante 10 minutos en un agitador de plataforma orbital.
 - Colocar la membrana en un contenedor plástico y añadir el sustrato enzimático (NBT/BCIP, Roche) diluido 1/50 en búfer de detección 1X en un volumen final de 10 ml.
 - Cubrir la membrana y conservar en oscuridad hasta observar la presencia de bandas. El revelado de bandas marcadas con digoxigenina puede durar entre 20 minutos y 16 horas.
 - Una vez alcanzada la intensidad deseada proceder a lavar la membrana con agua destilada con el fin de terminar la reacción de revelado.

- Escanear la membrana y analizar el archivo de imagen usando el software bioinformático de análisis de datos de tipificación BioNumerics versión 4.5 (Applied Maths).

- **Reactivos:**

- Búfer de bloqueo:

Búfer de ácido maleico 1X (Roche) 500 ml

Búfer de bloqueo 10 X (Roche) 50 g

- Búfer de hibridación:

- Para un volumen de 50 ml

SSC 20X (Invitrogen) 12.5 ml

N-lauroilsarcosina al 5 % 1 ml

Búfer de bloqueo 10 X (Roche) 5 ml

Agua bidestilada – grado HPLC 31 ml

Dodecilsulfato sódico (SDS) 10 % 500 µl

- Búfer de lavado I:

SSC 20X (Invitrogen) 100 ml

Dodecilsulfato sódico (SDS) 10 % 10 ml

Agua bidestilada – grado HPLC Hasta alcanzar 1 litro

○ Búfer de lavado II:

SSC 20x (Invitrogen)	5 ml
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10 %	10 ml
	Hasta
Agua bidestilada – grado HPLC	alcanzar 1 litro

Capítulo 3

Desarrollo de un modelo de infección
experimental para el desarrollo de
neumonía en lechones causada por

Mycoplasma hyorhinis

3.1. Introducción

El desarrollo de modelos de infección experimental en animales es una herramienta fundamental para el estudio de la patogénesis de diversos cuadros clínicos infecciosos en un medio medianamente controlado. Este tipo de estudios juega un papel muy importante en la mejora y avance de terapias de control y profilaxis (Zak y O'Reilly, 1993), además de presentar un papel esencial en el desarrollo de la industria farmacéutica animal y humana actual. Hasta la fecha, y a pesar de las evidencias que demuestran el importante papel de *M. hyorhinis* en cuadros de neumonía en cerdos, el número de estudios destinados a analizar la capacidad patogénica y variabilidad en virulencia de este microorganismo son bastante escasos, presentando información actualizada limitada, además de diseños experimentales que dificultan la reproducción de los mismos.

La capacidad que presentan los micoplasmas para producir enfermedad ha demostrado ser altamente variable. Con ciertas excepciones, entre las que se incluye *M. mycoides* subesp. *mycoides* SC, el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa bovina y *M. capricolum* subesp. *capripneumoniae*, el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa caprina, la mayoría de los micoplasmas presenta una limitada capacidad patogénica por sí mismos, lo que demuestra su naturaleza oportunista y parasítica (Razin *et al.*, 1998) y evidencia la necesidad de otros factores condicionantes y/o una correcta selección de aislados a la hora de desarrollar modelos de infección con otros micoplasmas.

En el caso de *M. hyorhinis*, se ha demostrado con anterioridad la presencia de aislados sin capacidad patogénica que actúan como microorganismos comensales en el cerdo (Palzer *et al.*,

2008). Además de este dato, la variabilidad proteica y genética observada anteriormente en esta tesis demuestra la necesidad de evaluar varias cepas de campo con el fin de asegurar el éxito de este tipo de experimentos en micoplasmas. La evaluación de varias cepas con el fin de desarrollar modelos de infección experimentales se ha aplicado con éxito al estudio de *M. hyopneumoniae*, otro micoplasma responsable de neumonía en cerdos que presenta una amplia variedad en la virulencia de cepas de campo (Vicca *et al.*, 2003).

Con el fin de desarrollar un modelo experimental de infección respiratoria en lechones y considerando las circunstancias descritas anteriormente decidimos evaluar la capacidad patogénica de tres cepas de campo de *M. hyorhinis* con diferentes origen geográfico y perfil de Western blotting siguiendo un protocolo estandarizado con el fin de maximizar los resultados de nuestra infección experimental y compararlas con la presentación clínica conseguida en un grupo infectado con una cepa virulenta de *M. hyopneumoniae* capaz de inducir lesiones de neumonía enzoótica y que fue empleada como control positivo en nuestro experimento.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Animales y diseño experimental

Para la infección experimental se seleccionaron un total de 27 lechones machos híbridos comerciales de cinco semanas de edad procedentes de una granja de alto estatus sanitario y con vigilancia activa frente a *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, PRRSv y circovirus porcino tipo II.

Una vez recibidos en el Royal Veterinary College, se tomó un hisopo nasal de cada uno de los animales y se analizó la presencia de micoplasmas determinada a través de la técnica de

PCR/DGGE (McAuliffe *et al.*, 2005) para descartar la colonización por *M. hyopneumoniae* o *M. hyorhinis*.

Tras una semana de aclimatación a las instalaciones los animales fueron pesados y distribuidos de forma equitativa en cuatro grupos (n=6) que serían inoculados con cada una de las cepas a analizar, además de un grupo control negativo (n=3) que incluyó al resto de los animales.

3.2.2. Aislados, preparación de la dosis infectiva, inoculación experimental y patrón de toma de muestras

En este experimento se incluyeron tres cepas de campo de *M. hyorhinis*. Debido a la alta variabilidad genética observada tras el análisis de epidemiología molecular y a la incapacidad de establecer una correlación evidente entre técnicas de tipificación que nos permitiera seleccionar grupos de aislados consolidados y fácilmente distinguible, basamos la selección de cepas para esta inoculación experimental en la variabilidad antigénica observada tras el análisis del Western blotting de la región antigénicamente variable situada entre los 40 y 46 kDa de peso molecular aparente.

Basado en la información obtenida a partir del análisis de esta región se seleccionaron dos aislados presentando el perfil tipo 1, el patrón antigénico más completo (ver 2.3.1. Resultados Western Blotting): el aislado Rmr 16, con origen en la España peninsular y el aislado 67p07 con origen en el Reino Unido. Además de estos aislados con el perfil completo, y con el fin de evaluar la posible asociación entre virulencia y un número reducido de determinantes antigénicos, se

incluyó el aislado 80p04, procedente del Reino Unido y único representante del patrón 4 de Western blotting.

El aislado de campo de *M. hyopneumoniae* RVC se usó para inocular el grupo control positivo. Este aislado fue proporcionado por el Royal Veterinary College y obtenido a partir de un caso clínico de neumonía enzoótica en el Reino Unido.

Los aislados se cultivaron en medio de Friis hasta alcanzar un volumen de cultivo total de 100 ml de cultivo en fase logarítmica. Una vez obtenido este volumen de cultivo se procedió a alicuotarlo en volúmenes de 10 ml usando jeringas estériles de un solo uso de 20 ml de volumen (Becton Dickinson) justo antes de proceder a la inoculación.

Para la inoculación, una vez colocados los animales en decúbito supino, se procedió a someter a cada lechón a una anestesia inhalatoria superficial usando isofluorano (Vetflurane, Virbac) al 3 – 4 %. Una vez anestesiados se localizó la tráquea por extensión del cuello del animal y tras introducir una aguja de 21G (0,8 mm) por vía transtraqueal se procedió a instilar los 10 ml de cultivo contenidos en la jeringa en dirección caudal, con el fin de depositar la mayor cantidad de inóculo en los pulmones. Una vez terminada la inoculación se retiró la anestesia respiratoria y los animales se colocaron en un corral climatizado y ventilado donde fueron observados por personal veterinario hasta su total recuperación y distribución en los corrales correspondientes con separación física y ventilación independiente.

Tras la infección los animales fueron pesados semanalmente y observados diariamente durante todo el experimento con el fin de evaluar cualquier variación clínica entre grupos. Los

parámetros clínicos observados incluyeron descarga nasal y ocular, tos, disnea, depresión, diarrea, inapetencia y deshidratación junto con la observación de la temperatura rectal.

La toma de muestras para el análisis laboratorial incluyó hisopos nasales tomados con hisopos estériles, usados para el cultivo y detección de micoplasmas, y muestras de sangre total con un volumen de aproximadamente 7 ml, empleadas para extraer suero que fué analizado posteriormente con técnicas de detección serológicas. Estas muestras se tomaron en los días 0, 7, 14, 21 y 28 post inoculación (PI).

Tras los 28 DPI los animales se sacrificaron por aturdimiento eléctrico y sangrado completo, para posteriormente proceder a la necropsia y al examen patológico.

Todos los procesos de experimentación animal llevados a cabo se realizaron de acuerdo a la legislación vigente en el Reino Unido (*Animals (Scientific Procedures) Act, 1986*), tras el visto bueno del comité de ética local correspondiente.

3.2.3. Estudio de la patología macroscópica e histológica pulmonar

Una vez sacrificados los cerdos, se procedió a retirar los pulmones de la cavidad torácica con el fin de evaluar la extensión de las lesiones compatibles con NEP. La evaluación de las lesiones macroscópicas se realizó empleando el protocolo descrito por Goodwin y Whittlestone en 1973. Este sistema de puntuación de lesiones macroscópicas compatibles con NEP se basa en la asignación de una puntuación estandarizada que varía entre 5 y 10 puntos por lóbulo hasta alcanzar un total máximo de 55 puntos por pulmón usando la siguiente distribución:

- Lóbulo apical derecho e izquierdo: 10 puntos cada uno

- Lóbulo cardíaco derecho e izquierdo: 10 puntos cada uno

- Borde craneal del lóbulo diafragmático derecho e izquierdo: 5 puntos cada uno

- Lóbulo intermedio: 5 puntos

Con el fin de realizar el análisis de las lesiones pulmonares descritas macroscópicamente para el consiguiente análisis histopatológico se procedió a conservar porciones de pulmón de un tamaño de entre 1 y 2 cm³ de cada uno de los animales analizados en nuestro estudio, incluyendo los animales infectados y grupo control negativo, que fueron fijadas en formol tamponado durante 24 a 48 horas e incluidas en parafina, para posteriormente ser cortadas en secciones de 4 µm que fueron teñidas con hematoxilina/eosina como descrito anteriormente por Sarradell y colaboradores (2003).

Una vez preparadas, se procedió a valorar las lesiones presentes en las diferentes secciones de pulmón usando un protocolo semicuantitativo de valoración de lesiones microscópicas compatibles con neumonía enzoótica descrito anteriormente por Livingston en 1972 y descrito en apartado 1.2.2.1.4.3. de esta tesis.

La significación estadística de las diferencias presentes entre las medias de las lesiones macroscópicas y microscópicas de cada uno de los grupos se evaluó usando la prueba de la T de Student, determinándose como estadísticamente significativos aquellos valores con un valor p inferior a 0.05.

3.2.4. Análisis de hisopos nasales y tejido pulmonar mediante cultivo y PCR/DGGE

Los hisopos nasales obtenidos en los días 0, 7, 14, 21 y 28 PI fueron cultivados en medio de Friis (Friis, 1971a) con el fin de determinar la presencia de micoplasmas. Los cultivos de hisopos nasales se mantuvieron por un máximo de 21 días a 37 °C en agitación continua. Todo aquel cultivo con presencia de crecimiento característico de micoplasmas, incluyendo acidificación del medio y cambio de color del mismo y presencia de depósito celular, fue procesado con el fin de extraer ADN empleando el sistema de extracción y purificación automático de ADN Maxwell® 16 (Promega) siguiendo la intrucciones del fabricante.

Con el fin de extraer ADN para la detección de micoplasmas a partir de los pulmones obtenidos tras la necropsia en el día 28 PI se tomó una sección de entre 25 a 50 mg de tejido pulmonar de cada uno de ellos, preferiblemente de la interfase entre tejido sano y lesionado, usando un bisturí estéril tras la esterilización de la superficie del pulmón con una espátula caliente. Una vez obtenido el tejido, éste se procesó usando el sistema de extracción ADN Maxwell® 16 (Promega) esta vez empleando el sistema de extracción específico para tejidos con una digestión previa a 56 °C durante dos horas en una mezcla de 180 µl de búfer ATL (Qiagen) y 20 µl de proteinasa K (Sigma).

El ADN extraído se procesó mediante la técnica de PCR/DGGE (McAuliffe *et al.*, 2005) con el fin de detectar la presencia de cualquier micoplasma en cultivo puro o mixto.

3.2.5. Análisis de muestras serológicas

Los animales fueron sangrados semanalmente en los días 0, 7, 14, 21 y 28 PI con el fin de obtener suero para la evaluación de la evolución de la respuesta inmune frente a cada uno de los patógenos empleados en la infección experimental. Las muestras de suero se obtuvieron a partir de 7 ml de sangre total obtenida tras punción de la vena yugular y siguiendo la metodología descrita por Coll y Morillo (2008) para la extracción de sangre en lechones en maternidad. Básicamente se procedió a inmovilizar los lechones en la posición de decubito supino sujetando las extremidades y cabeza con firmeza con el fin de exponer la zona del cuello de forma clara. La aguja se intrujo en su totalidad perpendicularmente a la superficie en el centro del ángulo formado por el esternón y la primera costilla hasta extraer la cantidad de sangre necesaria en tubos de tipo vacutainer (Becton Dickinson). Tras 24 h a 4 °C se procedió a centrifugar los tubos durante 15 min a 4000 rpm con el fin de separar la sangre coagulada del suero, que posteriormente fue alicuotado en tubos de serología de 2 ml que se conservaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Las muestras de suero se analizaron mediante el método de Western blotting descrito en el apartado 2.1.2. de esta tesis para *M. hyorhinis*. La cepa *M. hyorhinis* BTS-7 fue empleada como antígeno de referencia en este test. Suero hiperinmune porcino (PAS - Prof. José Poveda, ULPGC, España) y de conejo (RAS – VLA nº 193, 2001, Reino Unido) obtenido frente a la misma cepa (BTS-7) fueron empleados como controles positivos. Como control positivo para el grupo infectado con *M. hyopneumoniae* RVC se utilizó suero hiperinmune de conejo obtenido frente a la cepa de referencia *M. hyopneumoniae* (VLA, Reino Unido). El análisis de la presencia de anticuerpos

frente a *M. hyopneumoniae* se realizó a través del kit de ELISA de bloqueo IDEIA™ *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA Kit, (Oxoid) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras de suero obtenidas se analizaron con ambos ensayos con el fin de evaluar la posibilidad de reacciones o infecciones cruzadas.

3.3. Resultados

3.3.1. Evaluación clínica

Durante los 28 días de duración del proceso experimental no se observó ninguna evidencia de descarga nasal u ocular, disnea, depresión, diarrea, inapetencia o deshidratación, siendo tos el único signo clínico detectado durante nuestro estudio. La distribución de eventos de tos por grupo se encuentra reflejada en la figura 3.1.

La gran mayoría de los eventos de tos se presentaron en el grupo infectado con *M. hyorhinis* cepa 80p04 de origen británico. Este grupo acaparó el 73.1 % de los eventos de tos detectados.

A continuación se presentó en el grupo inoculado con *M. hyorhinis* cepa, 67p07, también de origen británico, con un 15.4 % del total de eventos de tos. El siguiente grupo fue el infectado con *M. hyopneumoniae* con un 7.7 % del total, seguido del grupo inoculado con la cepa de origen español Rmr 16 que sólo fue capaz de producir un 3.8 % de las toses totales. No se observó ningún episodio de tos en el grupo control negativo. Un animal del grupo infectado con *M. hyopneumoniae* presentó cojera por trauma en la primera semana y tuvo que ser sacrificado por razones de bienestar animal.

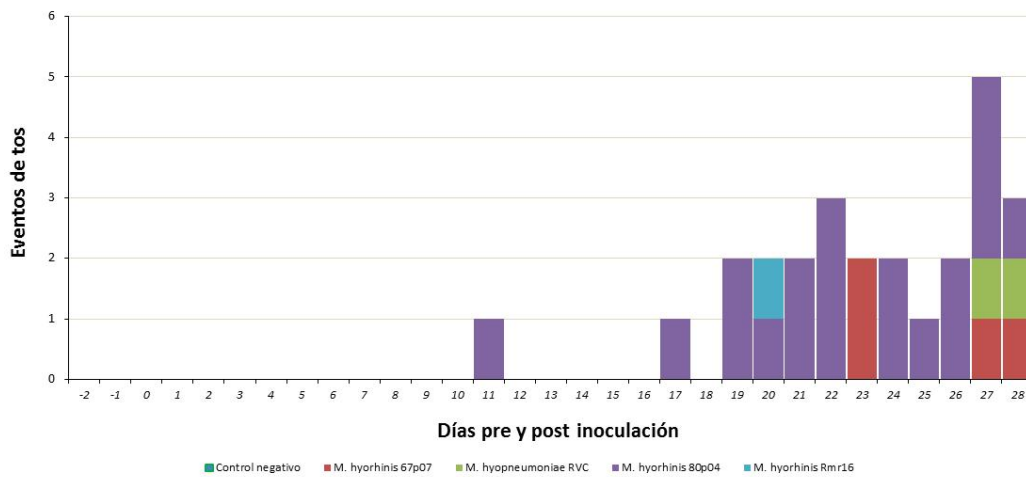


Figura 3.1. Distribución de eventos de tos por grupo experimental de animales

La distribución detallada de los eventos de tos distribuidos por animal y día pueden ser observados en anexo 3.1.

En lo que respecta a la evolución de la ganancia de peso no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos infectados y no infectados (ver figura 3.2).

De igual manera la temperatura rectal no demostró la presencia de ningún incremento clínico en la temperatura de los lechones, con valores observados entre 38.5 °C y 39.5 °C durante todo el experimento en todos los grupos estudiados.

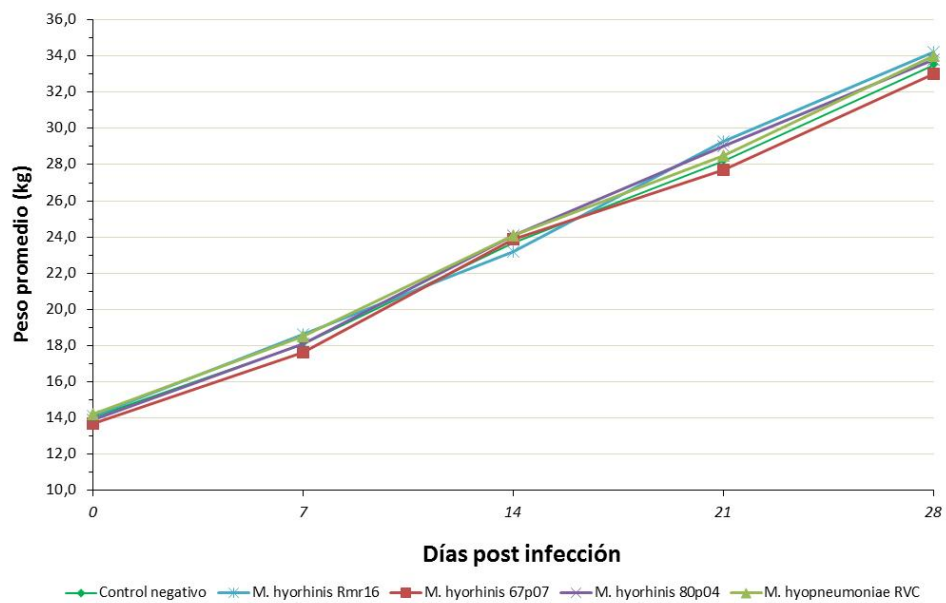


Figura 3.2. Evolución de la ganancia promedio de peso por grupo

3.3.2. Estudio de la patología macroscópica e histológica pulmonar

Las puntuaciones obtenidas tras la valoración macroscópica de cada uno de los pulmones de los animales en estudio obtenidos tras la necropsia se encuentran recogida en la tabla 3.1.

Las puntuaciones individuales observadas a partir de los pulmones de los animales en los grupos infectados variaron entre 0 y 27 puntos sobre un total de 55 puntos posibles. El grupo infectado con la cepa de *M. hyorhinis* 80p04 presentó la mayor puntuación total y promedio, con un total de 99 y 16.5 puntos respectivamente. El segundo grupo con mayor puntuación fue el infectado con la cepa de *M. hyorhinis* 67p07, con un valor total de 56 puntos y un promedio de 9.3 puntos. Este grupo fue seguido muy de cerca por el grupo control positivo infectado con *M.*

hyopneumoniae cepa RVC, con un total de 36 puntos y 7.2 puntos de promedio. El grupo infectado con la cepa de *M. hyorhinis* Rmr16, de origen español, presentó el menor valor de todos los grupos infectados con 8 puntos de valoración total y 1.3 puntos de promedio. El grupo control negativo presentó un total de dos puntos distribuidos entre dos de los tres animales incluidos en el grupo (117e y 118e), ambos con un punto cada uno. La naturaleza de estas lesiones se evaluó a través de histopatología con el fin de analizar el posible papel del micoplasma, demostrándose que estas supuestas lesiones posiblemente atribuibles a micoplasmas no presentaron ningún tipo de variación patológica microscópica.

El análisis estadístico demostró cómo el grupo infectado con la cepa 80p04 presentó una diferencia en la valoración macroscópica de lesiones estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al compararse con los grupos infectados con la cepa de *M. hyorhinis* Rmr16 y la cepa de *M. hyopneumoniae* RVC además del grupo control negativo. Además, el grupo control positivo infectado con *M. hyopneumoniae* también demostró diferencias significativas con el grupo control negativo y el infectado con la cepa Rmr16. No se encontraron otras diferencias estadísticamente significativas entre grupos desde el punto de vista de la valoración pulmonar macroscópica. Los resultados de la valoración semicuantitativa de las lesiones pulmones en preparaciones histológicas se encuentran recogidos en la tabla 3.2.

M. hyorhinis Rmr 16		M. hyorhinis 80p04		Control negativo	
Identificación	Puntuación	Identificación	Puntuación	Identificación	Puntuación
127a	0	116c	20	117e	1
129a	3	119c	4	118e	1
130a	0	122c	9	125e	0
132a	3	123c	22	Total	2
134a	0	128c	24	Promedio	0.7/55
135a	2	131c	19		
Total	8	Total	98		
Promedio	1.3/55	Promedio	16.3/55		

M. hyorhinis 67p07		M. hyopneumoniae RVC	
Identificación	Puntuación	Identificación	Puntuación
111b	3	112d	12
113b	27	114d	2
124b	0	115d	1
133b	4	121d	11
136b	0	126d	10
137b	22	Total	36
Total	56	Promedio	7.2/55
Promedio	9.3/55		

Tabla 3.1. Puntuación de lesiones pulmonares macroscópicas basada en el sistema de valoración de lesiones pulmonares compatibles con neumonía enzoótica descrito por Goodwin y Whittlestone (1973)

Dentro de los cambios patológicos observados a nivel microscópico en los animales infectados, se pudo encontrar todo el abanico de lesiones descrito por Livingston y colaboradores (1972) con lesiones variando entre 0 y ++++.

Los animales infectados presentaron una neumonía broncointersticial con hiperplasia linfocítica peribronquial y perivascular comprimiendo en algunos casos la luz de los bronquiolos, además de observarse la presencia de neutrófilos en alvéolos y luz de las vías aéreas, edema

alveolar, engrosamiento de los septos interalveolares y presencia de neutrófilos en la luz bronquial y bronquiolar.

M. hyorhinis Rmr 16		M. hyorhinis 80p04		Control negativo	
Identificación	Puntuación	Identificación	Puntuación	Identificación	Puntuación
127a	0	116c	++++	117e	0
129a	+	119c	+	118e	0
130a	0	122c	++	125e	0
132a	+	123c	++++		
134a	0	128c	++++		
135a	+	131c	+++		
M. hyorhinis 67p07		M. hyopneumoniae RVC			
Identificación	Puntuación	Identificación	Puntuación		
111b	+	112d	+++		
113b	++++	114d	+		
124b	0	115d	0		
133b	++++	121d	+++		
136b	0	126d	++		
137b	+++				

Tabla 3.2. Resultados de la valoración semicuantitativa de lesiones pulmonares en preparaciones histológicas (Livingston *et al.*, 1972)

Un 39 % de los animales infectados (9 de 23) presentaron lesiones valoradas entre +++ y +++++, un 35 % (8 de 23) presentaron lesiones valoradas entre + y ++ y un 26 % no presentaron ningún tipo de lesión desde el punto de vista histopatológico.

Todos los grupos demostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las lesiones histopatológicas al ser comparados con el grupo control negativo. Entre grupos se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo infectado con la cepa de *M. hyorhinis* 80p04 y el grupo infectado con la cepa de *M. hyorhinis* Rmr16 y entre el

grupo control positivo infectado con la de *M. hyopneumoniae* RVC y en el grupo infectado con *M. hyorhinis* Rmr16.

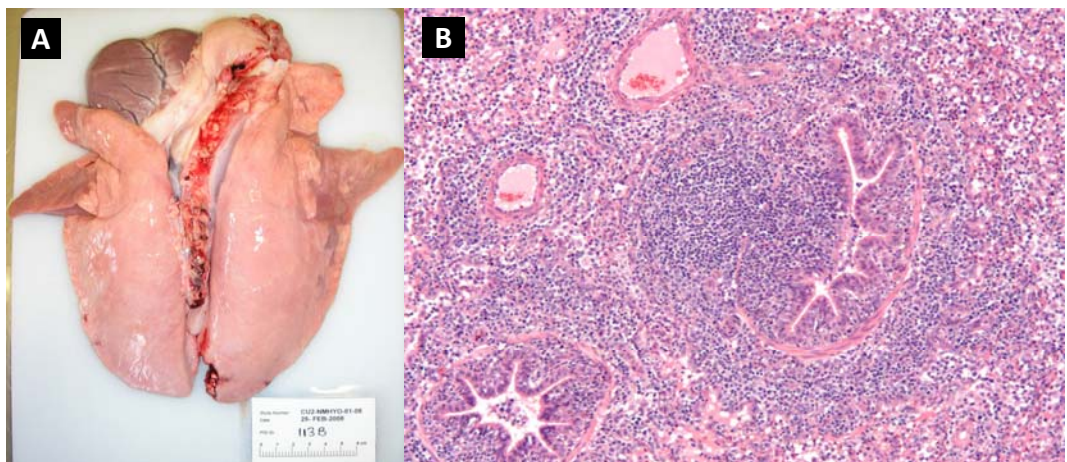


Figura 3.3. Animal 113b (grupo *M. hyorhinis* 67p07). A) Visión dorsal del pulmón. Obsérvese la distribución de lesiones típicas de consolidación compatibles con NEP localizadas en los lóbulos apical, cardíaco y borde craneal del lóbulo diafragmático. B) Detalle de las lesiones microscópicas observadas tras la tinción con hematoxilina/eosina (20 aumentos). Se observa un folículo linfóide atravesando la capa muscular de la mucosa y la obliteración de la luz del bronquiolo debido a la presencia de gran cantidad de células antiinflamatorias. También se puede observar la presencia de células inflamatorias y restos celulares en la luz de los bronquiolos

La figura 3.3 muestra una imagen representativa de las lesiones macroscópicas y microscópicas producidas por *M. hyorhinis* en el animal 118b (grupo *M. hyorhinis* 67p07). Este animal presentó una valoración de lesiones macroscópicas de 27 sobre 55 puntos. En lo que respecta a las lesiones microscópicas, este animal alcanzó la puntuación máxima descrita por el esquema de Livingston (++++).

3.3.3. Análisis de hisopos nasales y tejido pulmonar mediante cultivo y PCR/DGGE

Los resultados obtenidos tras el análisis de hisopos nasales y tejido pulmonar a través de la técnica de PCR/DGGE se encuentran recogidos en la tabla 3.3.

El mayor porcentaje de positivos se obtuvo a partir de las muestras de tejido pulmonar con un total de 15 muestras positivas por PCR/DGGE de un total de 23 animales infectados (65.21 %). El grupo infectado con la cepa de *M. hyorhinis* 80p04 presentó el mayor número de positivos con 5 de 6 animales positivos a partir de tejido pulmonar. Además de este grupo, el infectado con *M. hyopneumoniae* RVC también presentó una gran mayoría de muestras de pulmón positivas frente a *M. hyopneumoniae* (4 de 5). En lo que respecta a los demás grupos, el infectado con la cepa 67p07 fue el siguiente en número de positivos con un total de 4 sobre 6, seguido finalmente por el grupo infectado con la cepa Rmr16 con sólo 2 animales detectados como positivos frente a *M. hyorhinis* de 6 animales infectados. Los resultados del análisis de hisopos nasales demostraron resultados dispares. La mayoría de los resultados positivos se detectaron en el día 28 PI (11 de 23, 47.8 % de los animales infectados). Tanto en el día 14 PI como en el día 21 PI se detectó el mismo número de hisopos nasales positivos (8 de 23, 34.78 % de los animales infectados) aunque la distribución de animales positivos y negativos varió significativamente entre grupos. Solamente se encontró un animal positivo en el día 7 PI (128c, *M. hyorhinis* 80p04). Todos los resultados obtenidos a partir de las muestras del día 0 PI fueron negativos.

En lo que respecta a la distribución de los resultados del análisis de hisopos nasales, la mayoría de los positivos se detectaron en el grupo infectado con la cepa de *M. hyorhinis* 80p04, seguido del grupo control positivo (*M. hyopneumoniae* RVC), el grupo infectado con la cepa

67p07 y por último el grupo infectado con la cepa Rmr16. Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos infectados entre el grupo *M. hyorhinis* 80p04 y los grupos *M. hyorhinis* 67p07 y Rmr16. Todos los grupos infectados presentaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control negativo con la excepción del grupo *M. hyorhinis* Rmr16.

		Hisopos nasales (DPI)					Tejido pulmonar
		0	7	14	21	28	PM (28 DPI)
<i>M. hyorhinis</i> Rmr16	127a	-	-	-	+a	-	-
	129a	-	-	-	-	-	+a
	130a	-	-	+a	-	-	-
	132a	-	-	-	-	+a	+a
	134a	-	-	-	-	-	-
	135a	-	-	-	+a	-	-
<i>M. hyorhinis</i> 67p07	111b	-	-	-	-	-	+a
	113b	-	-	+a	-	+a	+a
	124b	-	-	+a	-	-	-
	133b	-	-	-	-	+a	+a
	136b	-	-	-	-	-	-
	137b	-	-	+a	-	+a	+a
<i>M. hyorhinis</i> 80p04	116c	-	-	+a	-	-	+a
	119c	-	-	-	+a	-	+a
	122c	-	-	-	+a	+a	-
	123c	-	-	+a	-	+a	+a
	128c	-	+a	+a	-	+a	+a
	131c	-	-	+a	+a	+a	+a
<i>M. hyopneumoniae</i> RVC	112d	-	-	-	-	+b	+b
	114d	-	-	-	+b	-	-
	115d	-	-	-	-	-	+b
	121d	-	-	-	+b	+b	+b
	126d	-	-	-	+b	+b	+b
	Control	117e	-	-	-	-	-
	118e	-	-	-	-	-	-
	125e	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.3. Resultados del análisis de hisopos nasales y tejido pulmonar por PCR/DGGE. ^a Positivo por PCR/DGGE frente a *M. hyorhinis* ^b Positivo por PCR/DGGE frente a *M. hyopneumoniae*

3.3.4. Análisis de muestras serológicas

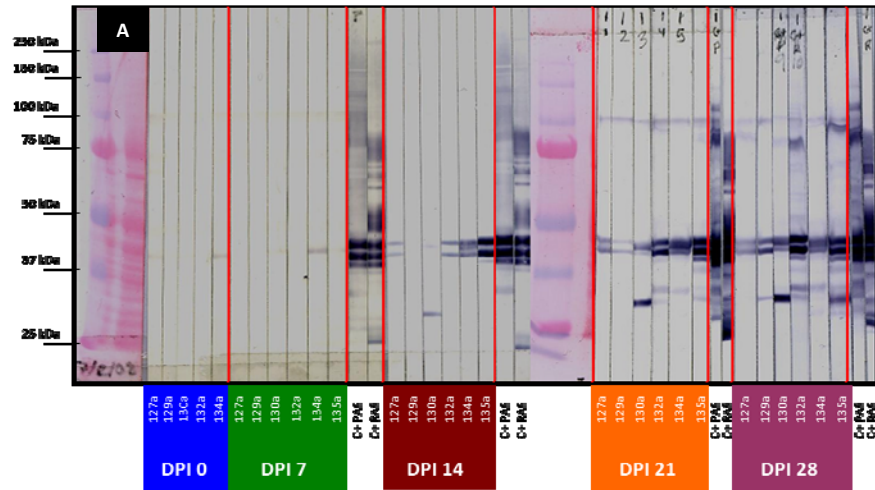
Los resultados del análisis de la respuesta inmune de tipo humoral frente a *M. hyorhinis* basado en la técnica de Western blotting se pueden observar en la figuras 3.4 y 3.5. Todos los grupos infectados con *M. hyorhinis* empezaron a seroconvertir tras 14 días PI. Esta seroconversión se caracterizó inicialmente por un inmunomarcaje de entre uno y tres antígenos inmunodominantes de *M. hyorhinis* localizados entre los 40 y 46 kDa de peso molecular aparente. La reacción frente a estos antígenos se incrementó de forma clara tras 21 y 28 días PI. En los grupos infectados con las cepas Rmr 16 y 67p07 también se pudo observar el inmunomarcaje de antígenos localizados alrededor de los 30 kDa de peso molecular aparente que siguió el mismo proceso de intensificación a lo largo del experimento como en el área descrita previamente.

El grupo infectado con la cepa *M. hyorhinis* 80p04 se caracterizó por la presencia de una zona de inmunorreacción adicional presente en la región comprendida entre los 75 y 150 kDa de peso molecular aparente, junto con la zona inmunológicamente dominante de entre 40 y 46 kDa de peso molecular aparente. El grupo infectado con la cepa *M. hyopneumoniae* RVC y el grupo control negativo no presentaron ningún tipo de reacción inmunológica compatible con la presente en las infecciones causadas por *M. hyorhinis*.

El análisis de la respuesta inmune frente a *M. hyopneumoniae* basada en un kit comercial de ELISA de bloqueo (IDEIA™ *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA Kit, Oxoid) se encuentra representado en la tabla 3.4 y en las figuras 3.6 y 3.7. La interpretación de los resultados de este ELISA se basó en el porcentaje de inhibición calculado con la siguiente fórmula: porcentaje de

inhibición = $100 \times \text{media OD}_{450\text{nm}} \text{ de la muestra} / \text{media OD}_{450\text{nm}} \text{ control positivo}$. Se consideraron como muestras sospechosas todas aquellas con un porcentaje de inhibición entre 50 y 65 % y como positivas todas aquellas muestras con un porcentaje menor al 50 %.

***Mycoplasma hyorhinis* Rmr16**



***Mycoplasma hyorhinis* 67p07**

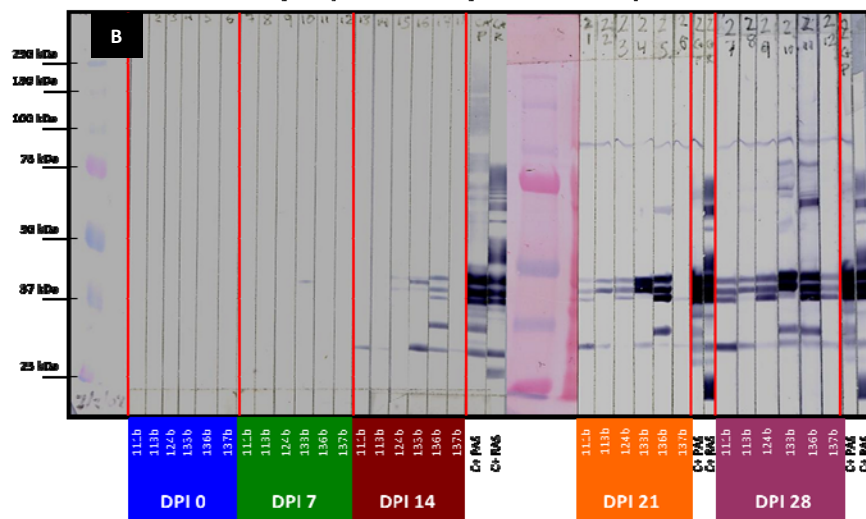


Figura 3.4. Resultados del Western Blotting producido tras el análisis de las muestras serológicas obtenidas en los días 0, 7, 14, 21 y 28 PI de los grupos infectados con *M. hyorhinis* Rmr 16 (A) y 67p07 (B)

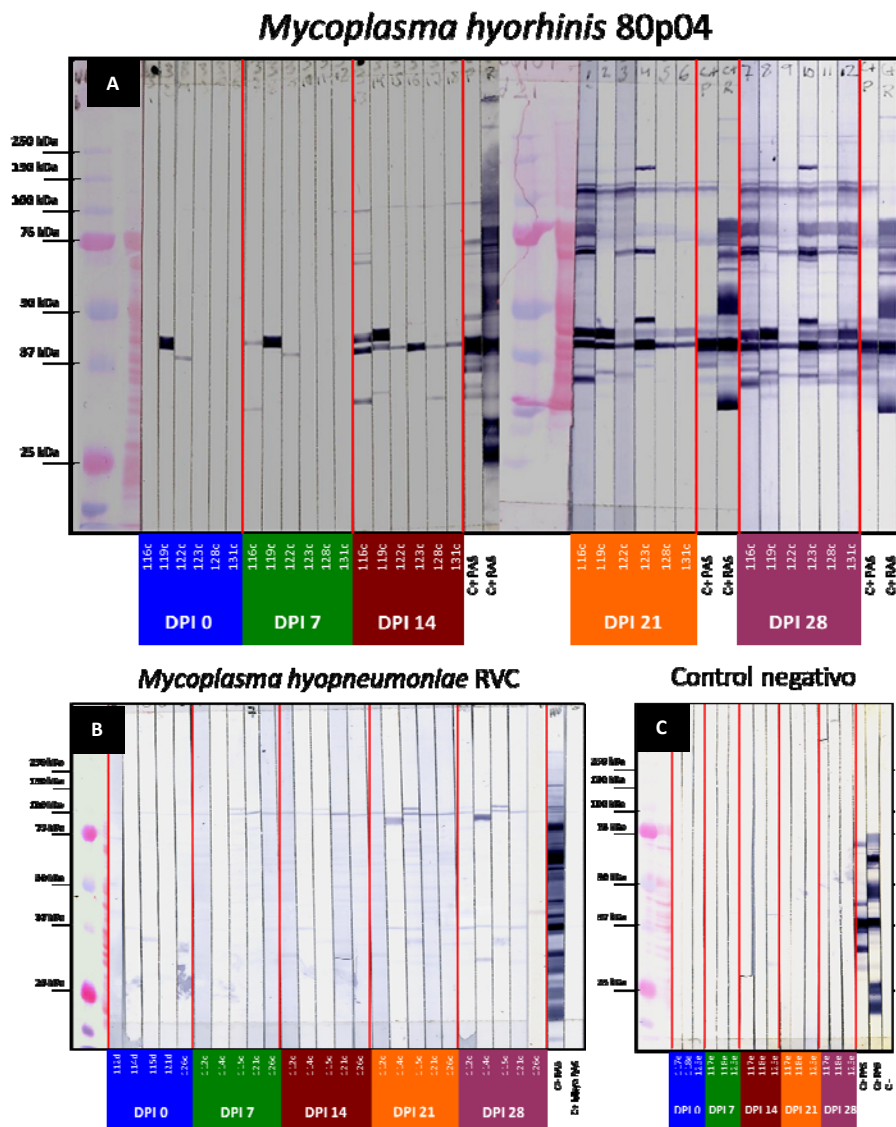


Figura 3.5. Resultados del Western Blotting producido tras el análisis de las muestras serológicas obtenidas en los días 0, 7, 14, 21 y 28 PI de los grupos infectados con *M. hyorhinis* 80p04 (A), *M. hyopneumoniae* RVC (B) y grupo control negativo

Ninguno de los animales infectados con *M. hyorhinis* presentó alguna respuesta inmune frente a *M. hyopneumoniae*. Tampoco se observó ninguna en el grupo control negativo. El grupo infectado con *M. hyopneumoniae* RVC empezó a evidenciar seroconversión tras 14 días PI, con un total en 3 de 5 animales sospechosos. En el día 21 PI sólo un animal fue considerado como sospechoso, mientras que se observaron los primeros positivos con 3 de 5 animales con un porcentaje de inhibición inferior al 50 %. El mayor número de animales seropositivos se observó tras 28 días PI, donde 4 de 5 animales presentaron anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae*.

<i>M. hyorhinis</i> 67p07	%	<i>M. hyorhinis</i> Rmr 16	%	<i>M. hyorhinis</i> 80p04	%	<i>M. hyopneumoniae</i> RVC	%	Control negativo	%
127a - DPI 0	95,888	111b - DPI 0	103,229	116c - DPI 0	100,717	112d - DPI 0	97,365	117e - DPI 0	88,376
129a - DPI 0	97,214	113b - DPI 0	97,375	119c - DPI 0	108,084	114d - DPI 0	84,800	118e - DPI 0	94,273
130a - DPI 0	107,153	124b - DPI 0	87,395	122c - DPI 0	90,989	115d - DPI 0	94,054	125e - DPI 0	105,054
132a - DPI 0	106,008	133b - DPI 0	87,296	123c - DPI 0	93,961	121d - DPI 0	100,932	117e - DPI 7	96,339
134a - DPI 0	110,343	136b - DPI 0	90,998	128c - DPI 0	98,349	126d - DPI 0	85,559	118e - DPI 7	94,691
135a - DPI 0	111,651	137b - DPI 0	97,315	131c - DPI 0	85,656	112d - DPI 7	93,431	125e - DPI 7	92,193
127a - DPI 7	95,203	111b - DPI 7	95,551	116c - DPI 7	95,378	114d - DPI 7	80,517	117e - DPI 14	93,468
129a - DPI 7	105,336	113b - DPI 7	98,517	119c - DPI 7	102,849	115d - DPI 7	88,354	118e - DPI 14	95,474
130a - DPI 7	99,362	124b - DPI 7	86,521	122c - DPI 7	107,055	121d - DPI 7	95,834	125e - DPI 14	102,953
132a - DPI 7	89,179	133b - DPI 7	86,423	123c - DPI 7	94,317	126d - DPI 7	85,559	117e - DPI 21	99,378
134a - DPI 7	89,078	136b - DPI 7	92,265	128c - DPI 7	86,423	112d - DPI 14	64,002	118e - DPI 21	85,646
135a - DPI 7	92,855	137b - DPI 7	100,281	131c - DPI 7	90,088	114d - DPI 14	68,962	125e - DPI 21	89,277
127a - DPI 14	110,343	111b - DPI 14	99,720	116c - DPI 14	96,342	115d - DPI 14	70,248	117e - DPI 28	101,033
129a - DPI 14	111,897	113b - DPI 14	107,014	119c - DPI 14	105,944	121d - DPI 14	63,584	118e - DPI 28	97,463
130a - DPI 14	109,198	124b - DPI 14	90,088	122c - DPI 14	94,252	126d - DPI 14	59,891	125e - DPI 28	101,923
132a - DPI 14	95,129	133b - DPI 14	93,031	123c - DPI 14	101,951	112d - DPI 21	44,801		
134a - DPI 14	102,900	136b - DPI 14	94,317	128c - DPI 14	95,004	114d - DPI 21	48,273		
135a - DPI 14	94,148	137b - DPI 14	96,342	131c - DPI 14	86,521	115d - DPI 21	69,545		
127a - DPI 21	102,327	111b - DPI 21	103,888	116c - DPI 21	93,374	121d - DPI 21	63,584		
129a - DPI 21	101,755	113b - DPI 21	108,136	119c - DPI 21	102,197	126d - DPI 21	41,924		
130a - DPI 21	109,198	124b - DPI 21	109,418	122c - DPI 21	85,559	112d - DPI 28	31,361		
132a - DPI 21	99,301	133b - DPI 21	93,299	123c - DPI 21	91,342	114d - DPI 28	33,791		
134a - DPI 21	97,501	136b - DPI 21	108,136	128c - DPI 21	99,278	115d - DPI 28	73,022		
135a - DPI 21	100,528	137b - DPI 21	109,659	131c - DPI 21	108,324	121d - DPI 28	44,509		
127a - DPI 28	88,287	111b - DPI 28	107,014	116c - DPI 28	92,366	126d - DPI 28	29,347		
129a - DPI 28	88,187	113b - DPI 28	93,227	119c - DPI 28	107,055				
130a - DPI 28	91,926	124b - DPI 28	100,842	122c - DPI 28	108,563				
132a - DPI 28	94,929	133b - DPI 28	93,970	123c - DPI 28	103,960				
134a - DPI 28	96,242	136b - DPI 28	95,270	128c - DPI 28	94,596				
135a - DPI 28	98,308	137b - DPI 28	105,010	131c - DPI 28	97,532				

Tabla 3.4. Resultados del ELISA de bloqueo IDEIA™ *Mycoplasma hyopneumoniae*. Las muestras sospechosas se encuentran resaltadas en amarillo. Las muestras positivas se encuentran resaltadas en rojo.

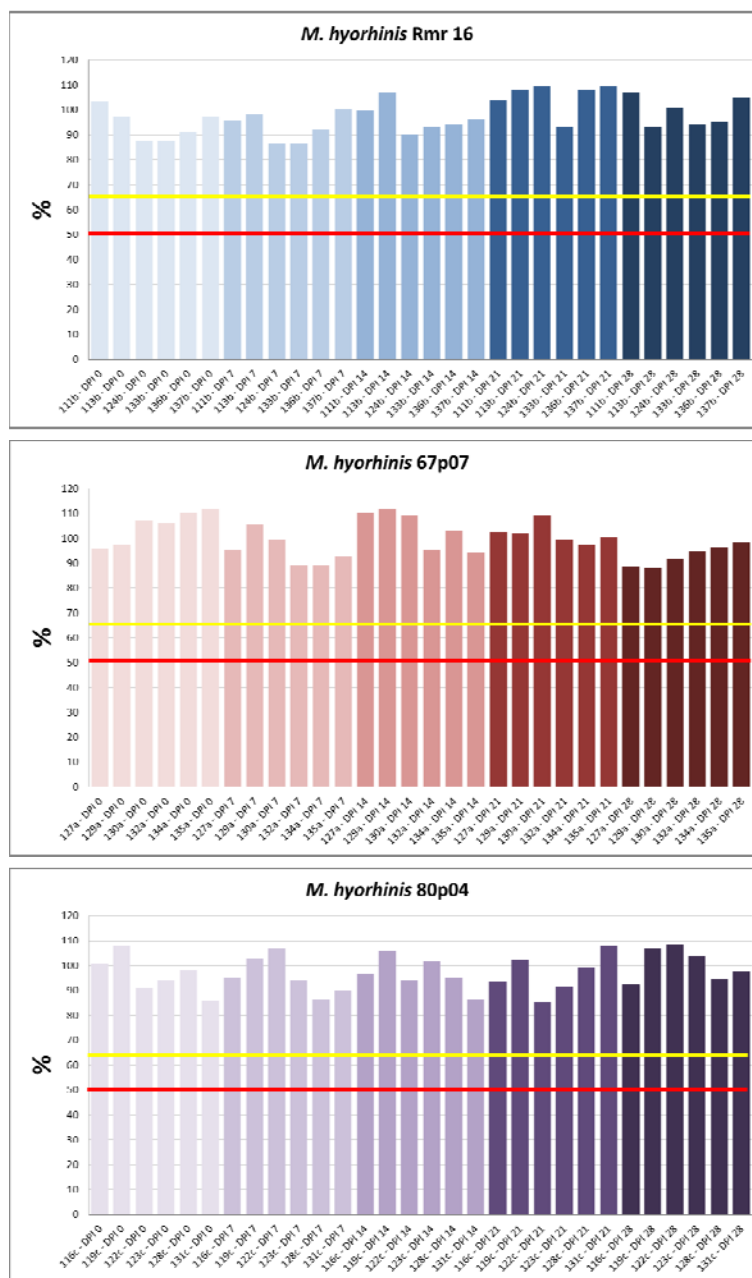


Figura 3.6. Representación gráfica de los resultado del ELISA de bloqueo IDEIA™ *Mycoplasma hyopneumoniae* en los grupos infectados con *M. hyorhinis*. ■ Punto de corte superior para muestras sospechosas ■ Punto de corte superior para muestras positivas.

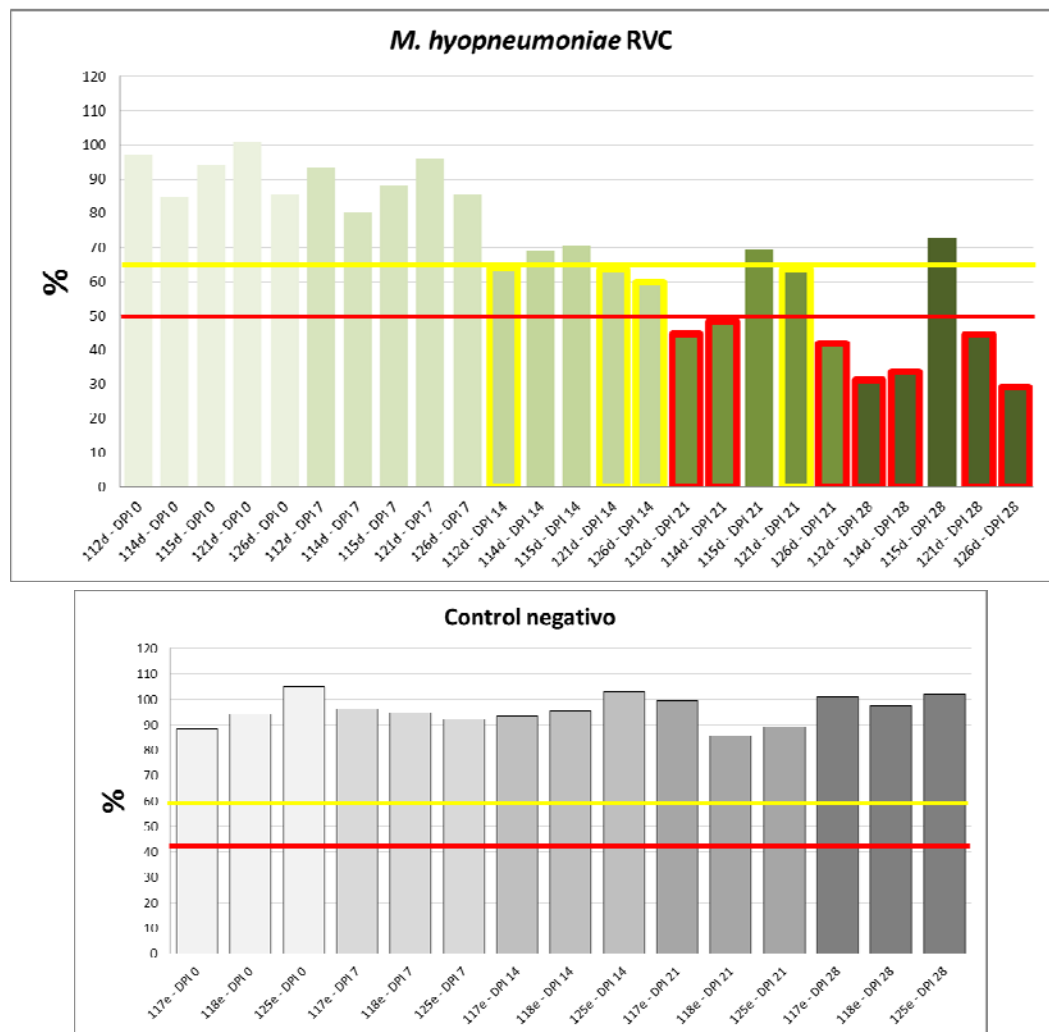


Figura 3.7. Representación gráfica de los resultado del ELISA de bloqueo IDEIA™ *Mycoplasma hyopneumoniae* en los grupos infectados con *M. hyopneumoniae* y control negativo. ■ Punto de corte superior para muestras sospechosas ■ Punto de corte superior para muestras positivas. Las barras correspondientes a las muestras sospechosas se encuentran resaltadas en amarillo. Las barras correspondientes a las muestras positivas se encuentran resaltadas en rojo.

3.4. Discusión

En este capítulo se evaluó la capacidad de *M. hyorhinis* para producir neumonía en lechones. Las lesiones obtenidas tras la inoculación transtraqueal de diferentes cepas de campo de *M. hyorhinis* demostró cómo este microorganismo fue capaz de producir lesiones pulmonares indistinguibles a nivel macro y microscópico de aquellas producidas por *M. hyopneumoniae*, el agente etiológico clásico de NEP. Además, el uso de isoflurano como agente anestésico junto con la inoculación por vía transtraqueal demostró ser altamente efectivo a la hora de realizar este tipo de experimentos al combinar una rápida inducción de anestesia, un proceso de inoculación poco invasivo y una rápida recuperación de los animales.

Hasta la fecha el papel de *M. hyorhinis* en procesos respiratorios en porcino se encontraba limitado a su rol en infecciones secundarias o como agente causal de casos de artritis y poliserositis (Kobisch y Friis, 1996). Sin embargo evidencia epidemiológica reciente ha demostrado lo contrario. Su presencia estadísticamente significativa incrementada en animales clínicamente enfermos, además de su rol en infecciones mixtas actuando de forma conjunta con otros patógenos tales como *Streptococcus suis*, PRRSv, circovirus porcino tipo II y *M. hyopneumoniae* (Palzer *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2010), han confirmado que este microorganismo debería ser considerado un agente etiológico primario tanto en cuadros de neumonía causadas por micoplasmas como en el complejo respiratorio porcino.

La evidencia presentada tras la inoculación experimental descrita en este capítulo se corresponde con los resultados de otros investigadores al tratar de reproducir cuadros de neumonía causados por *M. hyorhinis* en lechones. Por ejemplo, Goiš y colaboradores (1968a)

fueron capaces de demostrar esta capacidad patogénica tras su inoculación intranasal y el uso de contacto directo para infectar lechones. A pesar del buen resultado obtenido con ese experimento, el uso de la vía intranasal presenta varias contrapartidas que la hacen desaconsejable a la hora de ser utilizada como vía de inoculación de elección en infecciones experimentales, siempre y cuando se quiera obtener un modelo de infección reproducible, puesto que la capacidad de controlar la cantidad de material infectivo no es completamente posible al usar esta vía debido a la presencia de reflejo deglutorio y la sobreexcitación y distrés producido al introducir materiales extraños por vía nasal en animales completamente alerta, ya que por lo general los animales infectados por esta ruta normalmente no reciben ningún tipo de anestesia o analgesia.

Otros autores demostraron ser capaces de reproducir satisfactoriamente enfermedad respiratoria con este microorganismo tras optar por la vía intratraqueal de inoculación (Lin *et al.*, 2006) aunque sin el uso de anestesia o sedación, realizando el proceso con el animal consciente durante el manejo del mismo. El estrés causado por este tipo de manejo animal junto con el daño mecánico causado por el uso de la vía intratraqueal puede condicionar el resultado final del experimento además de presentar incompatibilidades con un proceso de experimentación animal ético, indoloro y con el mínimo estrés posible que se debería perseguir en cualquier tipo de trabajo con animales siempre que fuera posible.

En este experimento se demostró la presencia de cepas de *M. hyorhinis* con una gran variabilidad en su capacidad de virulencia. Esta diferencia en la virulencia de cepas de campo ha sido demostrada en anterioridad en *M. hyorhinis* (Kobisch., 1983; Lin *et al.*, 2008) y en *M.*

hyopneumoniae (Vicca *et al.*, 2003) sin que hasta la fecha exista ningún tipo de marcador genético o prueba fenotípica fiable que pueda diferenciar entre cepas capaces de causar enfermedad. En nuestro experimento esta diferencia entre la virulencia de cepas también se vio representada en el aumento de animales positivos por PCR/DGGE y la mayor inmunorreacción observada tras el análisis de la respuesta inmune frente a *M. hyorhinis* por Western blotting en el grupo infectado con la cepa más virulenta (80p04) que a su vez se correspondió con la de mayor puntuación en la valoración de lesiones macro y microscópicas pulmonares.

A pesar de haberse demostrado la capacidad de *M. hyorhinis* para producir casos de neumonía en lechones, existe escasa información que pueda explicar los mecanismos de patogenicidad involucrados en la neumonía causada por *M. hyorhinis*. En el caso de *M. hyopneumoniae*, un microorganismo del género *Mycoplasma* capaz de producir lesiones pulmonares comparables en cerdos, su mecanismo patogénico primario reside en la capacidad de adherirse a los cilios del epitelio respiratorio porcino y producir daño celular, que posteriormente desencadena la pérdida de cilios o ciliostasis facilitando la consiguiente invasión por otros microorganismos patógenos secundarios (Thacker, 2006). La capacidad de adherencia de *M. hyopneumoniae* se basa en la presencia de múltiples proteínas de adhesión o adhesinas en la superficie celular (Hsu y Minion, 1998; Deutscher *et al.*, 2010; Bogema *et al.*, 2011). Sin embargo, tras analizar los genomas completos de las cepas de *M. hyorhinis* HUB-1 (Liu *et al.*, 2011), MCLD (Kornspan *et al.*, 2011), GDL-1 (Calcutt *et al.*, 2012) y SK76 (Goodison *et al.*, 2013), sólo se observaron proteínas hipotéticas con capacidad de adherir plaquetas en los cuatro genomas sin que ninguna de ellas tuviera similitud con las adhesinas descritas en *M.*

hyopneumoniae tras el análisis basado en la herramienta de evaluación de alineamientos BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Aun teniendo en cuenta la falta de información sobre los determinantes de patogenicidad en *M. hyorhinis*, cabe destacar entre los posibles mecanismos de patogenicidad que podrían jugar un papel en los cuadros de enfermedad por este micoplasma el sistema de lipoproteínas de superficie vlp, el cual se ha demostrado que puede ser empleado para evadir la actividad de anticuerpos del organismo hospedador con capacidad de inhibir el crecimiento mediante la variación de los determinantes antigénicos de membrana (Citti *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado cómo estas lipoproteínas, con una gran capacidad para estimular macrófagos, tienen una similitud considerable con uno de los principales mecanismos de patogenicidad descritos en bacterias Gram negativas, el lipopolisacárido, que se caracteriza por su capacidad para inducir inflamación en el organismo hospedador (Mühlradt *et al.*, 1998).

Esta capacidad inmunomodulatoria también descrita en otros microorganismos del género *Mycoplasma*, como en el caso de *M. pneumoniae*, donde se ha llegado a describir infecciones autoinmunes tras la infección con este microorganismo (Ben Aissa-Fennira *et al.*, 2011) y en *M. fermentans*, donde se demostró su capacidad para producir activación de macrófagos y sobreproducción de factor de necrosis tumoral e interleuquina 6, dos citoquinas involucradas directamente en procesos inflamatorios (Mühlradt y Frisch, 1994), además de formar parte del repertorio patogénico de *M. hyorhinis* puede tener una importante repercusión dentro del CRP, ya que la asociación con otros microorganismos con capacidad inmunomodulatoria involucrados en este complejo, como por ejemplo el circovirus porcino tipo

II, podría desencadenar un efecto sinérgico incrementando la inmunodepresión presente en algunos casos de CRP, facilitando la actividad de agentes patógenos secundarios y exacerbando la presentación clínica de esta enfermedad con las consiguientes pérdidas económicas asociadas a un incremento en mortalidad y costes de producción.

El análisis de las lesiones macro y microscópicas presentes en los lechones infectados con *M. hyorhinis* en este experimento se correspondieron completamente con aquellas asociadas con cuadros de neumonía enzoótica causada por *M. hyopneumoniae*, observándose la presencia a nivel macroscópico de consolidación pulmonar craneoventral y a nivel microscópico de neumonía intersticial, hiperplasia linfoide peribronquial y perivascular intensa y edema alveolar, por lo que a nivel patológico no existe ninguna variabilidad apreciable que pueda usarse como indicador diferencial entre cuadros de neumonía causada por estos microorganismos. Este hecho, en combinación con su característica ubicuidad y naturaleza comensal, puede explicar porque en el nivel de casos de neumonía causada por *M. hyorhinis* ha estado infradiagnosticado hasta el advenimiento de las técnicas de diagnóstico molecular basadas en la detección de ADN.

La detección de ADN basada en PCR/DGGE llevada a cabo en nuestro estudio demostró un aumento de la presencia de *M. hyorhinis* detectable en las últimas dos semanas PI (días 21 y 28 PI) a partir del ADN obtenido de hisopos nasales, sin una correlación absoluta con los resultados obtenidos a partir de tejido pulmonar. Al analizar el número de positivos obtenidos a partir de tejidos pulmonares se demostró una mayor prevalencia de *M. hyorhinis* por PCR/DGGE en comparación con los hisopos nasales del mismo día (DPI 28). El uso de detección de micoplasmas porcinos en tejido pulmonar de forma directa ha demostrado ser bastante ventajoso,

presentando índices de éxito similar a la detección tras cultivo, con niveles de positividad superior a los encontrados a partir de muestras obtenidas a partir del tracto respiratorio superior porcino (Makhanon *et al.*, 2012). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro experimento, sugiriendo que, con el fin de obtener un mejor resultado en la detección de *M. hyorhinis* e incluso *M. hyopneumoniae* se deben considerar al tracto respiratorio inferior como el área de muestreo de elección para la detección de estos microorganismo siempre que sea factible.

En lo que respecta a la detección de la respuesta inmune frente a *M. hyorhinis*, la evaluación de Western blotting para el análisis de anticuerpos en infecciones causadas por este micoplasma demostró ser una herramienta diagnóstica bastante útil y de fácil interpretación, además de demostrar una gran especificidad sin que se observara ninguna reacción cruzada con *M. hyopneumoniae*. En el campo de la micoplasmología el uso de la técnica de Western blotting ha confirmado ser de gran utilidad en el análisis de la respuesta inmune frente a enfermedades animales de gran importancia, como en el caso de la perineumonía contagiosa bovina, enfermedad devastadora que afecta al ganado bovino y que es responsable por la gran mayoría de casos de neumonía en bovinos en países en vías de desarrollo en el África subsahariana (Gonçalves, 1997; Anónimo, OIE, 2008). Por ejemplo, en el caso de la perineumonía bovina esta técnica fue usada ampliamente durante el brote de esta enfermedad ocurrido en Portugal en los años 80 y 90 del siglo pasado, jugando un papel importantísimo en el diagnóstico, control y erradicación de la enfermedad en esta país (Regalla *et al.*, 2000). Dentro de sus ventajas destaca la alta sensibilidad y relativa facilidad de interpretación. El análisis de Western blotting nos permitió detectar respuesta inmune específica frente a *M. hyorhinis* a los 14 días PI

incrementándose progresivamente hasta alcanzar su máxima intensidad a los 28 días PI. Esta respuesta inmune específica se detectó principalmente en el área localizada ente los 40 y 46 kDa de peso molecular aparente, donde se observó un patrón similar al observado al área inmunodominante descrita en el apartado 2.3.1. de esta tesis, y que pudo variar entre una y tres proteínas inmunodominantes dentro de esa área específica. Junto con estas proteínas se observaron otros antígenos inmunodominantes localizados a 30 kDa y 70 – 150 kDa de peso molecular aparente pero de menor relevancia en lo que respecta al nivel de inmunorreacción.

El uso de técnicas serológicas para la detección de anticuerpos frente a *M. hyorhinis* no ha sido explorado en profundidad ya que, hasta la fecha, los únicos ejemplos de diagnóstico serológico incluyen técnicas tales como la inhibición del metabolismo (Goiš, 1968b; Taylor *et al.*, 1971), aglutinación por látex (Goiš *et al.*, 1971) y hemoaglutinación indirecta (Kobisch, 1983). Todas estas técnicas se encuentran en desuso en la actualidad, siendo sustituidas en su gran mayoría por el ELISA como técnica de serológica general y el Western blotting como técnica confirmatoria.

Además de como técnica de diagnóstico, el uso de Western blotting en este experimento representa la primera evaluación parcial del inmunoproteoma de *M. hyorhinis* usando suero de animales infectados. Dentro de los patrones de bandas inmunogénicas descritas en este capítulo destaca con diferencia el grupo localizado entre 40 y 46 kDa. A pesar de que actualmente no existe información relativa a los principales componentes inmunogénicos de *M. hyorhinis* en casos de neumonía en cerdos, el interés despertado por la posible relación entre determinadas proteínas de *M. hyorhinis* y diferentes tipos de cáncer ha hecho que una proteína en particular, la

p37, haya recibido bastante atención por la comunidad científica. Esta proteína, descrita como una lipoproteína extracitoplasmática capaz de unirse a la tiamina (Sippel *et al.*, 2009), es capaz de interactuar con células F39 del sarcoma de ratones, dando lugar a un incremento en la invasividad de células cancerígenas de este y otros tipos de cáncer (Schmidhauser *et al.*, 1990) y ha sido asociada con metástasis y variaciones en la malignidad de diferentes tipos de cáncer (Liu *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2008). Aunque su relación con la respuesta inmune frente a *M. hyorhinis* en cerdos no está demostrada, sus características inmunogénicas como lipoproteína y su demostrada capacidad para interactuar con células eucariotas la posicionan como una posible candidata a presentar un rol en el desarrollo de inmunidad frente a infecciones causadas por este microorganismo.

Aparte de como mecanismo de patogenicidad, el hecho de que las proteínas localizadas en esta área puedan ser detectadas tras 14 días PI sugiere la posibilidad de su uso como posible antígeno diana para el desarrollo de técnicas de detección serológica mejoradas tales como el ELISA competitivo o de bloqueo. En el campo de la micoplasmología este tipo de ELISA goza de una gran aceptación para el diagnóstico de enfermedades animales causadas por estos microorganismos. Varios ELISA competitivos han sido desarrollados y comercializados con éxito para la detección de anticuerpos frente a varios micoplasmas, incluyendo el ELISA comercial frente a *M. hyopneumoniae* usado en esta tesis y desarrollado frente a la proteína p74 (Feld *et al.*, 1992) y los enfocados al diagnóstico de la pleuroneumonía contagiosa caprina (Thiaucourt *et al.*, 1994) y perineumonía contagiosa bovina (Le Goff y Thiaucourt, 1998), por lo que el desarrollo de un test para la detección de anticuerpos frente a *M. hyorhinis* siguiendo la misma metodología podría ser de gran utilidad para el estudio de los procesos infecciosos causados por este microorganismo.

La metodología y resultados descritos en este capítulo proporcionan un acercamiento al entendimiento de la capacidad patogénica de *M. hyorhinis* en casos de neumonía porcina, demostrando su rol como agente etiológico primario, además de proporcionar herramientas diagnósticas con aplicabilidad tanto en el campo experimental como en el diagnóstico de casos de campo.

Capítulo 3 – Anexos

Anexo 3.1. Distribución detallada de eventos de tos por animal y día.

ID	Grupo	Días pre infección					Días post infección				
		-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7
127a	<i>M. hyorhinis</i> RmT16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
129a		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130a		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
132a		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134a		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
135a	<i>M. hyorhinis</i> 67P07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111b		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113b		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
124b		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
133b		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
136b	<i>M. hyorhinis</i> 80P04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
137b		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
116c		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119c		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
122c		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
123c	<i>M. hyopneumoniae</i> RVC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128c		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
131c		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
112d		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
114d		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115d	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121d		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
126d		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117e		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
118e		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 1. Distribución detallada de eventos de tos por animal y día (DPI -2 a 7)

ID	Grupo	Días post infección						
		8	9	10	11	12	13	14
127a	<i>M. hyorhinis</i> Rmr16	0	0	0	0	0	0	0
129a		0	0	0	0	0	0	0
130a		0	0	0	0	0	0	0
132a		0	0	0	0	0	0	0
134a		0	0	0	0	0	0	0
135a	<i>M. hyorhinis</i> 67P07	0	0	0	0	0	0	0
111b		0	0	0	0	0	0	0
113b		0	0	0	0	0	0	0
124b		0	0	0	0	0	0	0
133b		0	0	0	0	0	0	0
136b	<i>M. hyorhinis</i> 80P04	0	0	0	0	0	0	0
137b		0	0	0	0	0	0	0
116c		0	0	0	1	0	0	0
119c		0	0	0	0	0	0	0
122c		0	0	0	0	0	0	0
123c	<i>M. hyopneumoniae</i> RVC	0	0	0	0	0	0	0
128c		0	0	0	0	0	0	0
131c		0	0	0	0	0	0	0
112d		0	0	0	0	0	0	0
114d		0	0	0	0	0	0	0
115d	Control	0	0	0	0	0	0	0
121d		0	0	0	0	0	0	0
126d		0	0	0	0	0	0	0
117e		0	0	0	0	0	0	0
118e		0	0	0	0	0	0	0
125e		0	0	0	0	0	0	0

Tabla 2. Distribución detallada de eventos de tos por animal y día (DPI 8 a 14)

ID	Grupo	Días post infección						
		15	16	17	18	19	20	21
127a	<i>M. hyorhinis</i> RmT16	0	0	0	0	0	1	0
129a		0	0	0	0	0	0	0
130a		0	0	0	0	0	0	0
132a		0	0	0	0	0	0	0
134a		0	0	0	0	0	0	0
135a	<i>M. hyorhinis</i> 67P07	0	0	0	0	0	0	0
111b		0	0	0	0	0	0	0
113b		0	0	0	0	0	0	0
124b		0	0	0	0	0	0	0
133b		0	0	0	0	0	0	0
136b	<i>M. hyorhinis</i> 80P04	0	0	0	0	0	0	0
137b		0	0	0	0	0	0	0
116c		0	0	0	0	1	0	1
119c		0	0	0	0	0	0	0
122c		0	0	0	0	0	1	0
123c	<i>M. hyopneumoniae</i> RVC	0	0	1	0	0	0	0
128c		0	0	0	0	1	0	1
131c		0	0	0	0	0	0	0
112d		0	0	0	0	0	0	0
114d		0	0	0	0	0	0	0
115d	Control	0	0	0	0	0	0	0
121d		0	0	0	0	0	0	0
126d		0	0	0	0	0	0	0
117e		0	0	0	0	0	0	0
118e		0	0	0	0	0	0	0
125e		0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3. Distribución detallada de eventos de tos por animal y día (DPI 15 a 21)

ID	Grupo	Días post infección						
		22	23	24	25	26	27	28
127a	<i>M. hyorhinis</i> Rm16	0	0	0	0	0	0	0
129a		0	0	0	0	0	0	0
130a		0	0	0	0	0	0	0
132a		0	0	0	0	0	0	0
134a		0	0	0	0	0	0	0
135a	<i>M. hyorhinis</i> 67P07	0	0	0	0	0	0	0
111b		0	0	0	0	0	0	0
113b		0	1	0	0	0	1	0
124b		0	0	0	0	0	0	0
133b		0	0	0	0	0	0	0
136b	<i>M. hyorhinis</i> 80P04	0	0	0	0	0	0	0
137b		0	1	0	0	0	0	1
116c		1	0	0	0	0	0	0
119c		0	0	0	0	0	0	0
122c		1	0	1	1	1	1	0
123c	<i>M. hyopneumoniae</i> RVC	1	0	1	0	0	1	1
128c		0	0	0	0	0	0	0
131c		0	0	0	0	1	1	0
112d		0	0	0	0	0	0	0
114d		0	0	0	0	0	0	0
115d	Control	0	0	0	0	0	0	0
121d		0	0	0	0	0	1	1
126d		0	0	0	0	0	0	0
117e	Control	0	0	0	0	0	0	0
118e		0	0	0	0	0	0	0
125e		0	0	0	0	0	0	0

Tabla 4. Distribución detallada de eventos de tos por animal y día (DPI 22 a 28)

Chapter 4

Development of diagnostic techniques for
the detection of *Mycoplasma hyorhinis*
antibodies and DNA in clinical samples:
Development of an indirect ELISA and a real time
PCR assay

4.1. Introduction

Diagnostics tests are essential tools to provide valuable information for the veterinarian or animal health worker in order to be able to support the process of decision making and to produce informed decisions for many different animal health interventions.

Veterinary diagnostics applied to the analysis of mycoplasma infections present certain issues associated with the intrinsic nature of these microorganisms. Some of these specific characteristics, such as the presence of a small and reduced genome obtained as part as reductive adaptative process, the presence of highly repetitive DNA motifs and their low G+C content, restricts to a certain extent the repertoire of targets available for the development of specific and sensitive diagnostic techniques. However in the area of mycoplasma there are numerous examples that demonstrate the applicability and usefulness of diagnostics tests, which nowadays are essential in day to day veterinary investigations.

In the field of veterinary diagnostics, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) tests stand out as the most significant techniques for the laboratory diagnosis of mycoplasma infections. ELISA, a solid-phase enzyme immunoassay, has been widely applied for the detection of specific antibodies against different mycoplasma diseases affecting the majority of the main farmed animal species including porcine enzootic pneumonia, caused by *M. hyopneumoniae* (Feld *et al.*, 1992), *M. bovis*-induced mastitis in cattle (Uhaa *et al.*, 1990), *M. synoviae* and *M. gallisepticum* infections in chicken (Opitz *et al.*, 1983) and for important notifiable diseases such as contagious caprine pleuropneumonia (Thiaucourt *et al.*, 1994) and contagious bovine pleuropneumonia (Le Goff & Thiaucourt, 1998). Its high throughput,

robustness, low cost and relative reproducibility positions this technique as the test of choice for the detection of antibody responses in infectious diseases of human and animals. In addition the multiple ELISA formats described up to date (e.g. indirect ELISA, sandwich ELISA, competitive (or blocking) ELISA) adds flexibility to the design of serological diagnostic assays based on this methodology increasing the potential applications of this technique.

The PCR assay, based on the detection of specific nucleotide sequences, currently represents the gold standard for pathogen detection in veterinary diagnostics. This technique has been widely utilised for more than 30 years since its discovery in 1983 (Mullis, 1990) and is currently in use in most of the infectious diseases diagnostic laboratories worldwide. Thanks to its broad availability and to increasing amounts of freely accessible genome sequence information the number of PCR assays has boomed in recent years. Another characteristic that has enhanced the uptake of this methodology by scientists worldwide is its ability, in combination with fluorescence-based real time detection, of reliably measuring the accumulation of amplified DNA products for the quantification of relative gene expression, viral and bacterial loads, known as quantitative PCR (qPCR) (Higuchi *et al.*, 1993). Consequently additional steps associated with conventional PCR such as the evaluation of amplified product using agarose gels are avoided reducing therefore the time necessary to obtain results using this test.

In spite of development of veterinary diagnostics in mycoplasmaology, none of these two extremely useful diagnostic tests have been developed for the diagnosis of *M. hyorhinis*. In order to fill that gap we decided to develop an indirect ELISA and qPCR which will potentially provide a better understanding of the dynamics of the respiratory infections caused by this microorganism.

4.2. Material and methods

4.2.1. *Mycoplasma hyorhinis* indirect ELISA

An indirect ELISA (iELISA) was developed in order to assess the humoral response against respiratory infection caused by *M. hyorhinis*. iELISAs are based on the ability of humoral antibodies to bind to pathogen's specific antigenic epitopes, commonly described as antigen. The antigen is immobilised by adsorption to a solid surface and the antigen/primary antibody complex detected by a secondary antibody enzymatically labelled able to bind to the primary antibody. The presence of antigen/primary/secondary antibody complex is detected by an enzymatic reaction obtained after addition of a specific enzyme substrate that it is detected by colour change and measurement of absorbance or optical density (OD).

4.2.1.1. General chemicals, reagents and equipment

The general chemicals, reagents and equipment used for the development of the *M. hyorhinis* indirect ELISA (iELISA) are listed below.

The serum samples and conjugate were diluted using sample buffer which prepared after combining the following components:

- | | |
|---|---------------|
| - Tween 20 (Sigma) | 250 µl |
| - Semi skimmed powdered milk (Marvel or equivalent) | 10 g |
| - Sterile Phosphate Buffer Saline (PBS) 0.1M pH 7.2 | up to 1000 ml |

Once produced, the sample buffer was stored in a Duran bottle and kept at 4°C prior use. Any unused buffer was discarded after 5 days.

The antigen selected to coat the 96-well plates (Nunc Polysorb) used in our assay was diluted to the desired concentration using coating buffer, which was produced after dissolving one tablet of carbonate-bicarbonate buffer 0.05M pH 9.6 (Sigma-Aldrich) in 100 ml of deionised double distilled sterile water, mixed well and stored at 4 °C for a maximum of 14 days.

96-well plates were washed using an automated plate washer (Labsystems Multiwash plate washer, Thermo Scientific) using sterile PBS 0.1M pH 7.2.

The enzymatic reaction was performed using ready-to-use 3,3',5,5', tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate/chromogen (Vetoquinol) prepared as per manufacturer instructions.

The enzymatic reaction was stopped using a 1M anhydrous citric acid (Sigma-Aldrich) solution prepared after dissolving 192.12 g of the acid in 1 litre of distilled water. The stopping solution was discarded after 3 months of preparation.

The OD was measured using a Labsystems Multiskan MS plate reader (Thermo-Scientific) with a 450 nm filter. The data processed using the microplate data acquisition and analysis software Genesis (Thermo-Scientific).

4.2.1.2. Antigen preparation

In order to determine the best performing coating antigen, three different preparations were evaluated, including whole cell washed antigen, Tween 20 washed cells and pre-boiled antigen.

Whole cell washed antigen was obtained from 100 ml of a 10^7 CCU culture of *M. hyorhinis* BTS-7 reference strain culture. The cells were collected after centrifugation at 8000 rpm for 30 minutes, washed three times in PBS, resuspended in a final volume of 2 ml of PBS and then stored at -20 °C until used.

In order to prepare the Tween 20 washed antigen, cells were harvested as described above and then resuspended in 2 ml PBS containing 1 % Tween 20 to give protein concentration to 1 mg/ml buffer.

Cell suspension was divided in four vials and the incubated at 37 °C with constant shaking for 30 minutes (modified from Nicolet *et al.*, 1980). Suspensions were then centrifuged at 30.000 rpm for 30 minutes. Supernatant was separated from the cell pellet at stored at -20 °C until used. Cell pellet was resuspended in PBS using the initial volume of sample and stored at -20 °C until needed.

For the preparation of the pre-boiled antigen, cells were obtained as previously described in the whole antigen preparation and samples boiled for 5 minutes and kept in ice prior to plate coating.

4.2.1.3. Antigen chequerboard and conjugate selection

For this purpose we followed standard ELISA chequerboard procedures. Briefly, plates were coated with the three different *M. hyorhinis* antigen preparations using the following dilutions made in coating buffer (table 4.1.).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200
B	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200
C	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200
D	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200
E	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200
F	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200
G	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200
H	1/100	1/100	1/200	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200

Table 4.1. Plate layout – antigen dilutions

Antigen was distributed in each appropriate well and then plates were incubated overnight at 4 °C. After incubation plates were washed in PBS three times using a Labsystems Multiwash plate washer. After washing the plates, positive and negative serum samples were distributed as described in table 4.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
B	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
C	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
E	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
F	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
G	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
H	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

Table 4.2. Plate layout – positive and negative serum distribution

Known positive (*M. hyorhinis* strain 67p07 infected group – animal 136b day28 PI, see chapter 3 of this thesis) and negative (*M. hyorhinis* strain 67p07 infected group – 111b day 0 PI see chapter 3 of this thesis) serum samples were obtained from a previous *M. hyorhinis* experimental infection carried out at the Royal Veterinary College.

A 1/100 dilution in sample buffer was used both positive and negative control. Once added the plates were incubated at 37 °C for 30 minutes, following by a washing step as described before.

For the conjugate selection two different horseradish peroxidase conjugated antibodies were evaluated; Protein G (Pierce) and a goat anti-swine IgG (Sigma-Aldrich) whole molecule antibody were tested. The different conjugates were diluted in sample buffer and distributed in the plate as described in table 4.3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
B	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
C	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000
D	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000
E	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000
F	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000	1/3000
G	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000
H	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000	1/4000

Table 4.3. Plate layout – distributions of different conjugate dilutions

4.2.1.4. Test procedure

Antigen was diluted in coating buffer at the desired working concentration obtained after the antigen chequerboard step and 100 µl of the diluted antigen added to each well. Wells E1 and F1 were left blank.

Plates were then incubated overnight at 4 °C and after incubation, washed using a volume of 250 µl of PBS for three times using Labsystems Multiwash plate washer and gently tapped in paper until excess PBS was removed. Test sera, positive and negative control were then diluted at working concentration (1/100) in sample and 100 µl added to each desired well. Positive control serum was dispensed in wells A1 and B1. Negative control serum was dispensed in wells C1 and D1. Positive and negative controls were always run in duplicate. Plates were then incubated for 30 minutes at 37 °C.

After incubation, plates were washed as described before and the conjugate previously diluted at desired concentration obtained after the conjugate chequerboard step and 100 µl dispensed in all wells. Plates were then incubated for 30 minutes at 37 °C as described before.

Once the conjugate incubation step finished plates were washed again as described before and 100 µl of fresh enzyme substrate, prepared immediately before addition, added to all wells. OD₄₀₅ was then measured at 30 seconds intervals until the positive control wells OD₄₀₅ (wells A1 and B1) reached values between 0.30 and 0.35. At this point the reaction was stopped by the addition of 50 µl of stopping solution to all wells and optical density read using a 450 nm filter.

For the test to be valid, average positive samples OD₄₅₀ should be between 1 and 1.5 while the average negative OD₄₅₀ should be equal or smaller than 0.14 while the average blank OD₄₅₀ value should never be higher than $\frac{3}{4}$ of the average negative OD₄₅₀.

4.2.1.5. Sample selection

A total of 1108 pig serum samples were tested were tested using *M. hyorhinis* iELISA.

130 samples (set A) were obtained from an experiment infection carried out at the Royal Veterinary College and described in the Chapter 3 of this thesis. The samples included in set A were obtained as part of the weekly blood sampling performed on days 0, 7, 14, 21 and 28 PI from each of the animal groups included in the study.

All these samples were also tested by Western blotting against *M. hyorhinis* as described before and the results used in order to compare the sensitivity and specificity of our iELISA test. In addition, the *M. hyopneumoniae* samples previously tested in chapter 3 using the *M. hyopneumoniae* IDEIA™ ELISA Kit (Oxoid) were analysed with the *M. hyorhinis* iELISA in order to evaluate any possible cross-reactivity.

Two additional sets of samples, 180 field serum samples (set B) kindly provided by Ben Strugnell (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency - Thirsk) and 798 field serum samples (set C) obtained as part as UK nationwide pleurisy study and kindly provided by Dr. D. Tucker (Department of Veterinary Medicine - University of Cambridge Veterinary School) were also included in the test evaluation.

All serum samples were tested at a 1/100 dilution as stated in the test procedure.

4.2.1.6. Estimation of the predictive ability of the ELISA test

Serum sample set A ($n = 130$) was used for this purpose. The disease status of the ELISA test results (pos/neg) was estimated by applying different cut-off points for the OD reading (range: 0.052-1.458). Nineteen cut-off points were set from 0.1 to 1 with a 0.05 gap between them, as follows: 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, ..., 0.95, 1.

Once each cut-off point was fixed, the disease status for every sample was assigned using the Western blotting results as the serological gold standard.

Then the predictive ability of the ELISA test was obtained for each of the selected cut-off points as follows:

- Sensitivity (Se): % of true positives (WB) declared positive by the ELISA test
- Specificity (Sp): % of true negatives (WB) declared negative by the ELISA test

Sensitivity and specificity was calculated as described before by Riegelman y Hirsch (1991) from the data obtained from Western blotting and compared to iELISA using the formula below:

		Reference test <i>Western blotting</i>	
		Positive	Negative
Test under evaluation <i>iELISA</i>	+	A (true positive)	B (false positive)
	-	C (false negative)	D (true negative)

$$\text{Sensitivity} = \frac{A}{A + C} \times 100$$

$$\text{Specificity} = \frac{D}{B + D} \times 100$$

Figure 4.1. Sensitivity and specificity formulas

Finally Se and Sp values were calculated and collated for all cut-off points.

The iELISA the positive predictive value (PPV), described as the proportion of positive samples correctly diagnosed as positive, and negative predictive value (NPV), described as the proportion of negative samples correctly diagnosed as positive, was calculated as follows:

$$\text{PPV} = \frac{A}{A + B} \times 100$$

$$\text{NPV} = \frac{D}{D + C} \times 100$$

Figure 4.2. Negative and positive predictive value formulas

This formula considers a standard prevalence of 50 % by default. In order to account for the effect of prevalence in the variation of the PPV and NPV, the following formulas, based on Baye's theorem (Altman and Bland, 1994), was applied:

$$PPV_b = \frac{\text{sensitivity} \times \text{prevalence}}{\text{sensitivity} \times \text{prevalence} + (1 - \text{specificity}) \times (1 - \text{prevalence})}$$

$$NPV_b = \frac{\text{specificity} \times (1 - \text{prevalence})}{(1 - \text{sensitivity}) \times \text{prevalence} + \text{specificity} \times (1 - \text{prevalence})}$$

Figure 4.3. PPV and NPV formulas corrected to account for the effect of prevalence

4.2.1.7. Kappa-statistic measure of inter-rater agreement (strength of agreement)

In order to calculate the reproducibility of our test, the agreement between different operators, assay repeats and different batches of antigen variation was measured using the Kappa-statistic measure of inter-rater agreement (Cohen, 1960) and calculated as follows:

$$K = \frac{P(A) - P(E)}{1 - P(E)}$$

Figure 4.4. Kappa-statistic measure of inter-rater agreement formula

P(A) represents the proportion of times the raters (operators) agree and P(E) is the proportion of times the raters are expected to agree by chance alone. Both values can be calculated as follow:

		Operator 1	
		+	-
Operator B	+	A	B
	-	C	D

$$P(A) = \frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$P(E) = \frac{\frac{(A+B \times A+C)}{A+B+C+D} + \frac{(C+D \times B+D)}{A+B+C+D}}{A + B + C + D}$$

Figure 4.5. P(A) and P(E) values formulas

The Kappa-statistic value can be interpreted as follows (Altman, 1991):

Value of K	Strength of agreement
< 0.20	Poor
0.21 - 0.40	Fair
0.41 - 0.60	Moderate
0.61 - 0.80	Good
0.81 - 1.00	Very good

Table 4.4. Interpretation of Kappa-statistic measure of inter-rater agreement values

Serum sample set B was used to determine the kappa (κ) value.

4.2.2. *Mycoplasma hyorhinis* qPCR

4.2.2.1. Primer design

M. hyorhinis RNA polymerase (*rpoB*) gene (Genbank accession number U01217.1) was selected as target for the design of our qPCR assay. Primer design was performed using Primer3

(Rozen and Skaletsky, 2000). The sequence of the primers selected and can be observed in table 4.5.

	Primer sequence (5'→3')	Length	Tm	CG%
MHR-rpobF	AAAAGCCTCATCTCAGAAGGA	21	54.5 °C	42,90 %
MHR-rpobR	ACCTGATTCTGGAATACCTGC	21	55.6 °C	47,60 %

Table 4.5. *M. hyorhinis* qPCR primer characteristics

This primer combination produced a 439 bp product located between positions 71954 and 72392 of *M. hyorhinis* GDL-1 genome (Genbank accession number NC_016829).

The specificity of the primers was evaluated by comparison with the online alignment comparison tool BLAST (Altschul *et al.*, 1990) in order to evaluate the possible similarities with mycoplasmas and other microorganisms.

In addition the primers designed were aligned against all *M. hyorhinis* *rpob* gene sequences available and against those of the most representative porcine mycoplasmas using the DNA sequence alignment software MegAlign (DNASTAR Inc) in order to evaluate any possible similarity that could produce false positive PCR amplifications.

4.2.2.2. Primer concentration evaluation

The optimal combination of forward and reverse primer concentrations was calculated after evaluation of 5 different concentrations (50, 150, 300, 500 and 900 nM) per primer. The experiments were performed in triplicate.

All primer concentration combinations were evaluated using positive DNA (*M. hyorhinis* reference strain BTS-7). No template control (NTC) reactions were also performed in order to evaluate any possible false positives due to the formation of primer dimers or nonspecific DNA amplification.

All reactions were performed in an Mx3000P qPCR system (Stratagene) and included a pre-melting or real time amplification detection section divided in an initial activation step of 95 °C for 10 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds and a combined annealing/melting step at 60 °C for 45 seconds, with fluorescence being captured at the end of this last step followed after the 40 cycles by a melting or dissociation curve divided in a initial denaturation step for 1 minute at 95 °C followed by temperature ramp-down to 55 °C that then incremented at a rate of 0.2 °C/second until a temperature of 95 °C was reached, with fluorescence data being collected continuously.

All reactions were performed using Fast SYBR® Green qPCR mastermix (Applied Biosystems) in 96-well PCR plates (ABgene) and qPCR-ready optical clear sealing film (Starlabs).

The best performing forward and reverse primer concentration combination was selected after analysis of the quantification cycle (Cq) (Shiple *et al.*, 2009), defined as the fractional PCR cycle used for quantification or point where the fluorescence signal obtained from nucleic acid amplification crosses the set fluorescence threshold (Bustin *et al.*, 2008) and confirmed after dissociation curve analysis.

4.2.2.3. Limit of detection, efficiency and dynamic range estimation

The sensitivity of our assay was determined by calculation of the limit of detection (LOD) based on the calculation of genome copy equivalents of *M. hyorhinis*.

For this purpose a plasmid control including the *rpoB* gene fragment detected by our qPCR was prepared using the pGEM®-T Easy Vector system (Promega) following manufacturer's instructions and selected by blue/white colony screening. Plasmid controls allow a more reliable quantification of relative quantity of gene copies and therefore represent the best option for a robust positive control in PCR-based detection tests.

In addition the plasmid control obtained was also used to determine the efficiency of our SYBR green-based qPCR assay by standard curve analysis.

4.2.2.3.1. Plasmid control preparation

Briefly, *M. hyorhinis rpoB* gene PCR product size was confirmed after running on an agarose gel and then cleanup performed using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) following manufacturer's instructions with a final elution in 35 µl of nuclease free water (Promega).

The purified PCR product was then used in a ligation reaction including the pGEM plasmid. In a 200 µl PCR tube a ligation reaction was prepared in a final volume of 10 µl as follows:

- Final volume per reaction – 10 µl:
 - 10x ligation reaction buffer (Promega) 1 µl
 - rATP 10 mM 1 µl

- pGEM®-T Easy Vector (50 ng) 1 µl
- Purified PCR product 2 µl
- T4 DNA ligase 0.5 µl
- Nuclease-free water (Promega) 4.5 µl

A ligation control was also prepared in order to evaluate the efficiency of the ligation and transformation reactions. The ligation control reactions were prepared as follows:

- 10x ligation reaction buffer (Promega) 1 µl
- rATP 10 mM 1 µl
- pGEM®-T Easy Vector (50ng) 1 µl
- Control insert DNA (Promega) 2 µl
- T4 DNA ligase 0.5 µl
- Nuclease-free water (Promega) 4.5 µl

A negative ligation control was also prepared by avoiding the addition of any PCR product or control DNA while increasing the amount of nuclease-free water to 6.5 µl.

Once prepared, the reactions were mixed by briefly vortexing the tubes for 5 seconds and incubated overnight at 4 °C.

For this purpose tubes containing the ligation reactions were centrifuged in order to collect the contents. 2 µl of each ligation reaction was then transferred to a sterile 1.5 ml microcentrifuge tube set on ice per reaction, including the ligation, negative controls and a transformation control as per manufacturer's instructions.

Escherichia coli JM109 high efficiency competent cells (Promega) were carefully mixed by flicking the tube and then add 50 µl of cells into each of the tubes containing the ligation reaction previously prepared.

Tubes were gently vortexed in order to mix the reagents and then placed on ice for 20 minutes. After that cells were heat-shocked 45 - 50 seconds in a water bath at 42 °C and place back on ice for 2 minutes.

900 µl of room temperature SOC medium (appendix 4.1 – cloning reagents) was added to all tubes and incubated at 37 °C with constant shacking at 100 rpm for 1 hour.

Then 100 µl of each transformation culture were plated onto duplicate LB+ampicillin+IPTG+X-Gal plates (appendix 4.1. – cloning reagents) previously equilibrated at room temperature which were then incubated overnight at 37 °C.

After the incubation the controls were checked in order to confirm that all the reactions have worked properly and expected efficiencies and blue/white colony ratio (over 60 % white colonies expected) were present. Once the control were evaluated and confirmed, six white colonies were picked and cultured in 5 ml LB + Amp (appendix 4.1 – cloning reagents) and incubate overnight at 37 °C with constant shacking at 100 rpm. White colonies represent groups of cells that have successfully taken the *M. hyorhinis rpoB* gene fragment into the plasmid.

Once finished the incubation, plasmids were extracted from 2 ml culture using Qiagen mini-prep spin column kit following manufacturer's instructions. Aliquots of the remaining culture were frozen at -80 °C in 15 % (v/v) glycerol.

The insertion of the fragment was confirmed by plasmid digestion and sequencing.

The plasmid digestion reaction was performed in order to visually confirm the right insertion of the fragment in the plasmid. This reaction aimed to free the gene fragment from the plasmid after restriction enzyme digestion and electrophoresis in an agarose gel. For this purpose a restriction enzyme digestion reaction including our plasmid was set as follows:

- Reaction volume = 30 μ l:
 - Nuclease-free water (Promega) 22.5 μ l
 - 10x Buffer H (Promega) 5 μ l
 - 100x bovine serum albumin (Promega): 0.5 μ l
 - *Eco*RI restriction enzyme (12U/ μ l) (Promega): 2 μ l

A 1/100 dilution in a final volume 20 μ l of the plasmid control was then prepared and combined with previously prepared restriction enzyme reaction to obtained a final volume of 50 μ l. Tubes were then incubated at 37 °C overnight. After the incubation 5 μ l of digested and undigested primer were run in a 2 % agarose gel and the presence and correct size of the insert confirmed by comparison to 1 kb molecular weight ladder (Promega).

For the sequencing reaction, plasmid was quantified using Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) and the concentration adjusted to 200 ng in a final volume of 10 μ l.

Sequencing reactions were prepared using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) following manufacturer's instructions. Sequencing reactions were prepared using both forward and reverse primers (MHR-rpobF, MHR-rpobR) as follows:

- Mastermix reaction volume = 10 μ l:
 - Nuclease-free water (Promega) 6 μ l
 - BigDye premix (Applied Biosystems) 1 μ l
 - 5 X BigDye reaction buffer (Applied Biosystems) 2 μ l
 - Primer [3.2 pmol] 1 μ l

10 μ l of the mastermix was then aliquoted into each well to be used using MicroAmp[®] Optical 96-Well reaction plates (Applied Biosystems). Then 10 μ l of the diluted primer was added to all sample wells. Once all the samples were loaded and mixed, flat-top 8-well PCR strips were fixed and the samples run in a GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) under the following conditions:

- Initial denaturation, 96 °C for 1 minute
- Repeat the following for 25 cycles:
 - 96 °C for 10 seconds
 - 50 °C for 5 seconds
 - 60 °C for 4 minutes
- Hold at 4 °C until ready to cleanup.

The sequencing reactions were then cleaned up. For this, 5 µl of 125 mM EDTA were added to each well used on the plate, followed by the addition of 60 µl of 100 % ethanol (stored at -20 °C).

Plates were then sealed using flat top strips, mixed by inverting at least four times and incubated at room temperature for 15 minutes. The plates were centrifuged for 30 minutes at 3000 rpm at 4 °C.

Once centrifugation was finished, caps were removed and plates inverted vigorously over a sink in order to discard the supernatant and tapped dry on blue or white roll to dry any excess washing solution.

A second washing step was then performed after adding 5 µl of 125 mM EDTA and 60 µl 70 % ethanol. Plates were then centrifuged for 15 minutes at 1650 rpm at 4 °C.

Supernatant was removed as before and left to air dry for 5 minutes.

After putting new PCR strip, plates were sent for sequencing performed at the Animal Health and Veterinary Laboratories Agency Central Sequencing Unit (United Kingdom).

Once retrieved, DNA sequences were confirmed by BLAST analysis and sequence alignment against *M. hyorhinis rpoB* gene and pGEM®-T Easy Vector sequences using MegAlign (DNASTAR).

4.2.2.3.2. Limit of detection, efficiency and dynamic range estimation reactions

For the limit of detection calculation, a standard curve including 10-fold dilutions of plasmid with quantities ranging from 1 to 10⁵ genome copy equivalents was prepared. All standards were run in triplicate.

Plasmid concentration was calculated using Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

The calculation of the genome copy equivalent was done after determination of the plasmid concentration and based on the assumption that the average weight of a base pair is 650 Da. Taking that into consideration the following formula was applied:

$$\text{Number of copies} = \frac{(\text{amount of plasmid (in ng)} \times 6.022 \cdot 10^{23})}{(\text{length of plasmid (in bp)} \times 10^9 \times 650)}$$

Figure 4.6. Copy number calculation formula

6.022x10²³ represents Avogadro's number while the plasmid + insert length was 3454 bp (3015 bp plasmid + 439 bp of PCR product).

The correlation, efficiency values and dynamic range were calculated using the software MxPro v4.10 (Stratagene).

All qPCR reactions were performed as described in the paragraph 4.2.2.2 of this thesis.

4.2.2.4. Evaluation of clinical and research DNA samples

A set of 112 samples from porcine respiratory disease cases in United Kingdom and obtained from routine diagnostic submissions received at the Mycoplasma Group – AHVLA Weybridge, previously tested by PCR/DGGE, were evaluated as part of the specificity analysis. The samples analysed can be seen in table 4.6.

ID	Source	PCR/DGGE result	ID	Source	PCR/DGGE result		
1	101P11	Lung	<i>M. arginini</i>	57	279P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>
2	102P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	58	282P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>
3	105P11	Lung	Negative	59	283P10	Lung	<i>M. hyosynoviae</i>
4	106P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	60	287P11	Joint	Unidentified band
5	108P11	Joint	Negative	61	28P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>
6	113P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	62	292P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
7	14P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	63	293P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
8	151P11	Tracheal swab	Negative	64	294P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
9	155P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	65	296P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>
10	157P11	Lung	Negative	66	29P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
11	158P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	67	300P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
12	15P10	Lung	Negative	68	308P10	Joint	<i>M. hyorhinis</i>
13	165P10	Lung	Negative	69	30P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
14	165P11	Lung	Negative	70	30P11	Lung	<i>M. arginini</i>
15	176P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	71	31P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>
16	179P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	72	328P11	Lung	Negative
17	184P10	Lung	Negative	73	336P10	EDTA blood	Negative
18	184P11	Lung	Negative	74	347P10	EDTA blood	Negative
19	186P11	Lung	Negative	75	362P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i>
20	187P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	76	365P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>
21	188P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	77	374P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i>
22	188P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	78	375P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>
23	192P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	79	376P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i>
24	194P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	80	378P10	Lung	<i>M. arginini</i>
25	196P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M.</i>	81	381P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i>

			<i>hyopneumoniae</i>				
26	197P10	Lung	No mycoplasmas	82	382P10	Lung	<i>M. arginini</i>
27	197P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	83	393P10	Lung	<i>M. arginini</i>
28	1P10	Spleen	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	84	396P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
29	203P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	85	39P11	EDTA blood	<i>M. suis</i>
30	204P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	86	3P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
31	20P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	87	42P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>
32	216P10	Lung	Negative	88	43P10	Nasal Swab	Negative
33	216P11	Lung	Negative	89	477P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
34	217P11	Lung	Negative	90	54P11	Nasal Swab	Negative
35	219P10	Lung	Negative	91	55P11	Nasal Swab	Negative
36	232P10	Lung	Negative	92	59P11	Nasal Swab	Negative
37	242P10	Lung	Negative	93	60P11	Nasal Swab	Negative
38	242P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	94	63P11	Nasal Swab	Negative
39	246P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	95	65P11	Nasal Swab	Negative
40	249P11	Joint	<i>M. arginini</i>	96	73P11	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>
41	24P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	97	7P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>
42	253P10	Joint	Negative	98	81P11	Swab	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
43	25P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	99	82P11	Swab	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
44	261P10	Joint	Negative	100	83P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
45	261P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	101	83P11	Nasal Swab	Negative
46	263P10	Lung	Negative	102	84P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i>
47	264P10	Lung	Negative	103	86P11	Lung	<i>M. arginini</i>
48	266P10	Lung	Negative	104	87P11	Lung	<i>M. arginini</i>
49	267P10	Lung	<i>M. hyosynoviae</i>	105	88P10	Spleen	<i>M. hyorhinis</i>
50	268P10	Joint	Negative	106	89P10	Joint	<i>M. hyosynoviae</i>
51	268P11	Lung	Negative	107	8P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i>
52	269P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	108	90P10	Joint	<i>M. flocculare</i>
53	26P10	Lung	<i>M. hyorhinis</i>	109	90P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>
54	273P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	110	91P10	Joint	<i>M. hyorhinis</i>
55	275P11	Lung	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	111	95P10	Lung	No mycoplasmas
56	278P10	Lung	<i>M. hyopneumoniae</i>	112	9P10	Lung	No mycoplasmas

Table 4.6. Field samples analysed by *M. hyorhinis* *rpoB* qPCR

		Nasal swabs (DPI)					Lung tissue
		0	7	14	21	28	PM (28 DPI)
<i>M. hyorhinis</i> Rmr16	127a	-	-	-	+ ^a	-	-
	129a	-	-	-	-	-	+ ^a
	130a	-	-	+ ^a	-	-	-
	132a	-	-	-	-	+ ^a	+ ^a
	134a	-	-	-	-	-	-
	135a	-	-	-	+ ^a	-	-
<i>M. hyorhinis</i> 67p07	111b	-	-	-	-	-	+ ^a
	113b	-	-	+ ^a	-	+ ^a	+ ^a
	124b	-	-	+ ^a	-	-	-
	133b	-	-	-	-	+ ^a	+ ^a
	136b	-	-	-	-	-	-
	137b	-	-	+ ^a	-	+ ^a	+ ^a
<i>M. hyorhinis</i> 80p04	116c	-	-	+ ^a	-	-	+ ^a
	119c	-	-	-	+ ^a	-	+ ^a
	122c	-	-	-	+ ^a	+ ^a	-
	123c	-	-	+ ^a	-	+ ^a	+ ^a
	128c	-	+ ^a	+ ^a	-	+ ^a	+ ^a
	131c	-	-	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
<i>M. hyopneumoniae</i> RVC	112d	-	-	-	-	+ ^b	+ ^b
	114d	-	-	-	+ ^b	-	-
	115d	-	-	-	-	-	+ ^b
	121d	-	-	-	+ ^b	+ ^b	+ ^b
	126d	-	-	-	+ ^b	+ ^b	+ ^b
	Control	117e	-	-	-	-	-
	118e	-	-	-	-	-	-
	125e	-	-	-	-	-	-

Table 4.7. PCR/DGGE results from nasal swabs and lung tissue obtained after experimental infection. ^a Positive by PCR/DGGE against *M. hyorhinis* ^b Positive by PCR/DGGE against *M. hyopneumoniae*

Also a set of DNA samples obtained from an experimental infection described in chapter 3 of this thesis (table 4.7) and previously tested by PCR/DGGE was also analysed. *M. hyorhinis* relative copy numbers differences between groups was calculated using the Mann-Whitney or U-test for ranked non-paired observations as previously described (Sachse *et al.*, 2010). The

statistical differences in bacterial load observed between nasal swabs and lung tissue at 28 DPI was also evaluated following the same procedure.

In addition 35 research samples obtained from de University of Las Palmas de Gran Canaria – Veterinary Faculty and isolated from different areas of the Spanish mainland and Canary Islands and *M. hyorhinis* BTS-7 (reference strain) were evaluated (table 4.8).

Isolate ID	Origin	Isolation date	Isolate ID	Origin	Isolation date
Reference strain - BTS-7	United States	1955	8	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 3	Spain	2005	22	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 7	Spain	2005	25	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 8	Spain	2005	36	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 9	Spain	2005	45	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 10	Spain	2005	46	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 11	Spain	2005	54	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 12	Spain	2005	62	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 14	Spain	2005	65	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 15	Spain	2005	76	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 16	Spain	2006	D	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 17	Spain	2006	P	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 18	Spain	2006	U	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 19	Spain	2006	Z	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 20	Spain	2006	8B1	Canary Islands - Spain	2002
Rmr 21	Spain	2006	Ove 1	Canary Islands - Spain	2006
Rmr 22	Spain	2006	GC37	Canary Islands - Spain	2006
4	Canary Islands - Spain	2002	GC91	Canary Islands - Spain	2006

Table 4.8. Research samples analysed by *M. hyorhinis* *rpoB* qPCR

Other common *Mycoplasma* species reference strains and general bacteria isolated from pigs were also tested (table 4.9).

Isolate	Species
J	<i>M. hyopneumoniae</i> ^a
S16	<i>M. hyosynoviae</i> ^a
H3-6B-F	<i>M. hyopharyngis</i> ^a
Ms42	<i>M. flocculare</i> ^a
G230	<i>M. arginini</i> ^a
Y04779	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ^b
Y04744	<i>Pasteurella multocida</i> ^b
Y04243	<i>Actinobacillus suis</i> ^b
Y04436	<i>Trueperella pyogenes</i> ^b
1374	<i>Haemophilus parasuis</i> ^a
735	<i>Streptococcus suis</i> ^a
M62	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> ^a

Table 4.9. Common *Mycoplasma* species reference strains and porcine bacterial isolates used in *M. hyorhinis* qPCR specificity testing. ^a NCTC reference strain, ^b Courtesy of Jon Rogers (AHVLA Bury St. Edmunds, UK)

4.3. Results

4.3.1. ELISA development

4.3.1.1. Antigen and conjugate selection

There was no significant difference between the positive and the negative control with the whole washed antigen and Tween 20 washed cell and supernatant.

Pre-boiled antigen was the best performing antigen an OD₄₅₀ of 1 to 1.5 for the positive (136b - 28 DPI) and 0.08 to 0.14 for the negative control (RVC 111b - 0 DPI) and was therefore selected as the standard antigen for our test.

Protein G (Pierce) was selected as the best performing conjugate. Working dilution ranged from 1/2000 to 1/4000 always determined by chequerboard after each new batch of antigen was produce.

A representative *M. hyorhinis* iELISA chequerboard plate can be seen in figure 4.7.

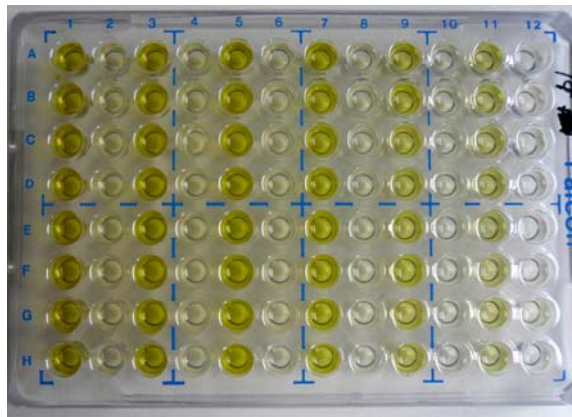


Figure 4.7. *M. hyorhinis* iELISA chequerboard plate. Positive serum added in columns 1, 3, 5, 7, 9, 11. Negative serum added in columns 2, 4, 6, 8, 10, 12.

4.3.1.2. Estimation of the predictive ability of the ELISA test

The highest OD₄₅₀ value providing the best specificity-sensitivity combined value was selected as cut-off point for positive samples (table 4.10).

A cut-off point of 0.25 was selected to determine a positive sample when tested with *M. hyorhinis* iELISA method in accordance with the highest combined Se-Sp value (141.26). Suspect range was established between OD₄₅₀ 0.2 and 0.25.

Using this cut-off point, a specificity of 82.93 % and a sensitivity of 58.33 % was obtained.

Cut-off point (OD ₄₅₀)	Se (%)	Sp (%)	Combined	Cut-off point (OD ₄₅₀)	Se (%)	Sp (%)	Combined
0,1	87,5	7,32	94,82	0,55	31,25	97,56	128,81
0,15	85,42	37,8	123,22	0,6	29,17	97,56	126,73
0,175	79,17	59,76	138,93	0,65	27,08	97,56	124,64
0,2	72,92	67,07	139,99	0,7	22,92	97,56	120,48
0,225	62,5	75,61	138,11	0,75	22,92	98,78	121,7
0,25	58,33	82,93	141,26	0,8	20,83	100	120,83
0,3	52,08	87,8	139,88	0,85	20,83	100	120,83
0,35	47,92	91,46	139,38	0,9	16,67	100	116,67
0,4	41,67	95,12	136,79	0,95	16,67	100	116,67
0,45	39,58	95,12	134,7	1	10,42	100	110,42
0,5	31,25	96,34	127,59				

Table 4.10. Positive cut-off points and relative specificity and sensitivity

A 2x2 contingency table comparing Western blotting and iELISA results and including the standard and corrected positive and negative predictive value of the iELISA can be observed in table 4.11.

ELISA result	Western Blotting			Standard PPV and NPV	Corrected PPV and NPV
	+	-	Grand Total		
+	28	14	42	PPV 66.7 %	PPVb 81.1 %
-	20	68	88	NPV 77.3 %	NPVb 61.2 %
Grand Total	48	82	130		
	Se= 58.33 %	Sp= 82.92 %			

Table 4.11. Contingency table comparing Western blotting and iELISA positive and negative results

When using the 0.25 cut-off point applied to sample set C, an estimated seroprevalence of 55.7 % was determined for this array of samples collected throughout UK ($n = 798$).

A PPV and NPV of 66.7 % and 77.3 % respectively were obtained when using standard formulae. When the prevalence-corrected formulae were applied a great increase in the PPV and reduction in the NPV of the iELISA was observed.

4.3.1.3. Cross reactivity

No cross reactivity with the closely related mycoplasma *M. hyopneumoniae* was observed after testing positive samples obtained from the experimental infection.

4.3.1.4. Kappa-statistic measure of inter-rater agreement (strength of agreement)

The agreement between procedures was calculated using 0.25 OD₄₅₀ cut-off point. The κ values obtained ranged from good to very good. A very good agreement between operators was obtained (table 4.12, κ value: 0.91). Sample set B (samples 1 to 90) was used for this purpose.

Operator 1	Operator 2		Total			
	+	-				
+	32	2	34			
-	2	60	62			
Total	34	62	96			
Agreement	Expected agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z	
95.83 %	54.25 %	0.9089	0.1021	8.91	0.0000	

Table 4.12. Agreement calculation between two different operators

Good agreement was observed between repeats (table 4.13, κ value: 0.73). Sample set B (samples 1 to 90) were also used in this situation.

Repeat 1	Repeat 2		Total		
	+	-			
+	17	3	20		
-	6	70	76		
Total	23	73	96		
Agreement	Expected agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.63 %	65.19 %	0.7307	0.1016	7.19	0.0000

Table 4.13. Agreement calculation between iELISA repeats

A good agreement was also observed between different antigen batches (κ value: 0.68- sample set B (1-90), table 4.14, 0.85 - sample set B (91 to 180) table 4.15).

Batch 1(1-90)	Batch 2(1-90)		Total		
	+	-			
+	13	7	20		
-	2	74	76		
Total	15	81	96		
Agreement	Expected agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.63 %	70.05 %	0.6870	0.1005	6.83	0.0000

Table 4.14. Antigen batch variation agreement calculation between two repeats - sample set B (samples 1 to 90)

Batch 1(91 to 180)	Batch 2 (91 to 180)		Total		
	+	-			
+	10	3	13		
-	0	83	83		
Total	10	86	96		
Agreement	Expected agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
96.88 %	78.86 %	0.8522	0.1009	8.44	0.0000

Table 4.15. Antigen batch variation agreement calculation between two repeats - sample set B (samples 91 to 180)

4.3.2. *Mycoplasma hyorhinis* qPCR development

4.3.2.1. Primer design

No significant similarities were observed between the primers designed and any other bacterial species after BLAST analysis. Figure 4.8 shows a representative sequence alignment including both forward and reverse primers aligned against the most common *Mycoplasma* species isolated from pigs.

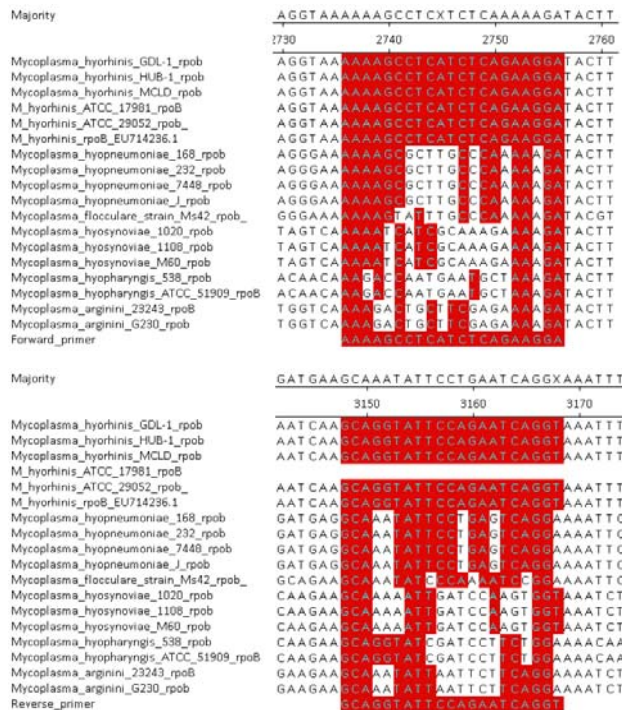


Figure 4.8. Forward and reverse primer alignment

Nucleotides in red represent identity matches with each primer. A full match against our primers was observed when compared all *M. hyorhinis rpoB* gene sequences available.

4.3.2.2. Primer concentration evaluation

The primer combination of MHR-rpobF at 300 nM and MHR-rpobR at 900 nM demonstrated to be the best performing final concentration per reaction and therefore selected for all subsequent reaction. Figure 4.9 represents the amplification curves showing the differences in amplification efficiency obtained as part of the primer concentration evaluation.

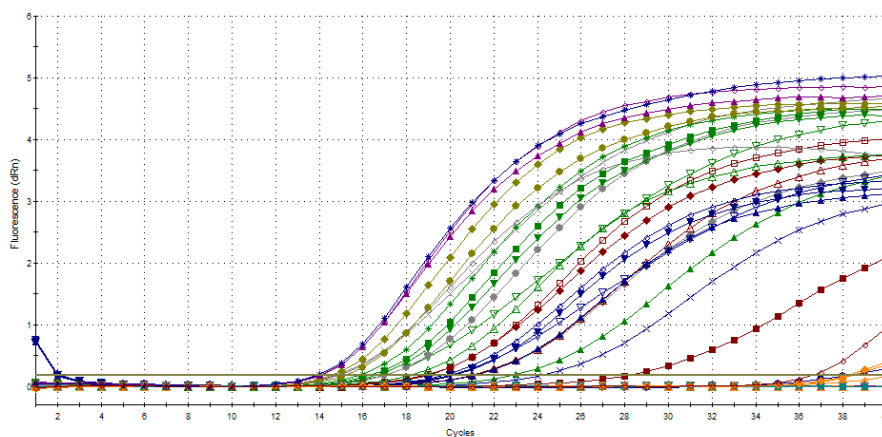


Figure 4.9. Differences in amplification efficiency associated to the use of different primer concentrations

4.3.2.3. Limit of detection, efficiency and dynamic range estimation

Standard curve analysis proved an efficiency of 92.4 % and correlation of $R^2=0.999$ (figure 4.10).

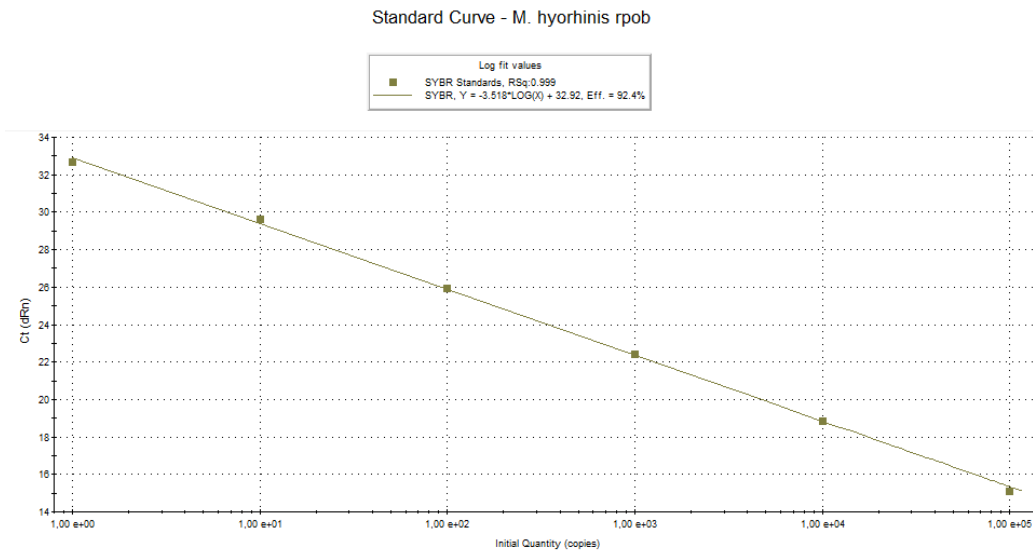


Figure 4.10. Standard curve for *M. hyorhinis* rpoB qPCR

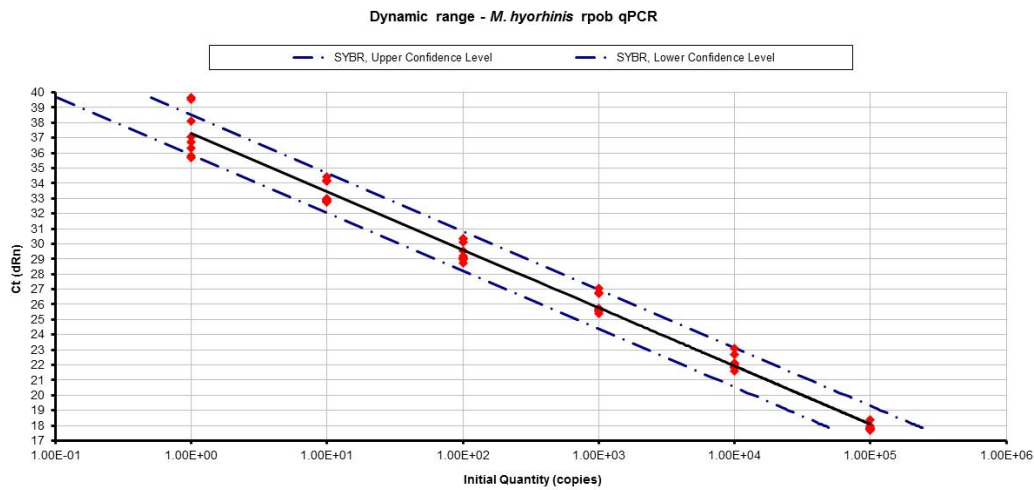


Figure 4.11. Dynamic range for *M. hyorhinis* rpoB qPCR. Red dots represent multiple standards for each dilution

LOD evaluation proved a sensitivity of less than 3 genome copy equivalents, with 10 copies being reliably detected between the upper and lower 95 % confidence level (figure 4.11).

4.3.2.4. Evaluation of clinical and research DNA samples

Specificity testing demonstrated a 100 % correlation with PCR/DGGE results. No other *Mycoplasma* species or porcine bacterial species was amplified. The qPCR results of each sample, including their relative copy number can be observed in appendix 4.2.

Relative copy number values obtained ranged from 4.75 to 1.54×10^5 copies of *M. hyorhinis*. No statistically significant differences were observed between the bacterial loads detected in the different animal groups at the same week of sampling when analysing the samples obtained during the experimental infection experiment. This lack of statistical differences was also observed between the load detected in nasal swabs and lung tissue samples obtained from the same group.

4.4. Discussion

M. hyorhinis represents an excellent example of an emerging endemic pathogen. A recent report published by Palzer and co-authors (2008) proving the statistical association between diseased animals showing signs of pneumonia and the presence of *M. hyorhinis* by PCR vindicates this pathogen in porcine respiratory disease with a primary role in the porcine respiratory disease complex.

Serology

The data obtained from testing field serum samples (set C, $n = 798$) using the new iELISA test developed as part of this thesis evidenced a clear seroconversion against *M. hyorhinis* in the

samples analysed. A seroprevalence of 55.7 % was obtained, being comparable with other prevalence levels previously described for *M. hyopneumoniae* in various countries and different pig age groups (Calsamiglia *et al.*, 1999b; Sibila *et al.*, 2009; He *et al.*, 2011). Interestingly the sample set C was obtained as part of a country-wide pleurisy risk-factor study performed in England and Wales (Tucker *et al.*, 2009; Jäger *et al.*, 2012). Some of the findings in this study demonstrated the correlation of the main porcine respiratory mycoplasmas, *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* with pneumonia and pleurisy in the United Kingdom, an association that can be extrapolated to any country with intensive porcine production systems due to the worldwide distribution of these pathogens (Rosales & Nicholas, 2010) and to the similarities in production systems. In addition it was also demonstrated that all-in all-out systems are extremely beneficial for the control of pleurisy and could therefore be used as affective management strategy for the control of *M. hyorhinis* infections.

It should be taken into account at this point that, due to the nature of the iELISA and the scarce information about the exact epidemiology of *M. hyorhinis* infections, the results obtained when using *M. hyorhinis* iELISA should be carefully analysed and supported when possible with confirmatory data obtained by Western blotting analysis in order to counteract the level of false negative samples detected. This fact is also supported with the data obtained after the analysis of sensitivity and specificity which demonstrates the need for a more sensitive and specific serological test for this specific microorganism. The PPV and the NPV provided some uncertainty regarding the performance of this particular test. The PPV observed demonstrated how 33.3 % of the real positive serum samples were not detected with the iELISA. When PPV calculations were performed using the prevalence-corrected formula, a 14.4 % increase in the predictive values was

observed (from PPV= 66.7 % to PPVb= 81.1 %), reducing the percentage of undetected seropositive animals to 18.9 %. The NPV observed indicated how 22.7 % of true negatives were detected as positive samples using the iELISA. As with the PPVb, when the NPV was corrected in order to account for prevalence a great variation (from 77.3 % to 61.3 %), presenting a clear decrease in the ability to detect true negatives in this case.

Various conclusions can be drawn from these results. First, it becomes clear that it is necessary to input prevalence values in PPV and NPV calculations when possible in order to achieve a more realistic value of the predictive ability of the test analysed. In our case it can be observed how the effect of prevalence is clearly marked (*? Right word*), producing a reduction in the percentage of positive samples misdiagnosed as negative and therefore increasing the reliability of the test at the seroprevalence levels for *M. hyorhinis* observed nowadays in the United Kingdom. It is also important to note that reductions in the prevalence of the pathogen will produce a drop in the PPVb of the iELISA and therefore an alternative test should be sought. The introduction of prevalence levels in the calculation of predictive values for diagnostic tests will always produce an opposite variation between PPVb and NPVb (Parikh *et al.*, 2008), observed in our case with the marked decrease in NPVb, with only a 61.3 % possibility to have diagnosed a true seronegative sample as negative. A straightforward way to increase the sensitivity and NPVb of the iELISA could be by testing all negative samples by Western blotting, a highly sensitive and specific serological diagnostic test. However this test is highly laborious, so reducing the number tested to only those tested as negative by iELISA could help improve the overall predictive ability of *M. hyorhinis* antibody detection.

Regarding the interater agreement analysis, the lowest value was observed when comparing different antigen batches. Based on that data extreme care should be taken when the coating antigen is prepared in order to avoid batch to batch variability; however taking into consideration the relatively simple procedure involved in antigen production t good laboratory practices should control this source of variation.

Future serological test development should be focused in the production of a more sensitive and specific test such a as a blocking ELISA. For example, this technique is currently the most widespread and commercialized ELISA test for the detection of antibodies against *M. hyopneumoniae* (Feld *et al.*, 1992). A similar application could be potentially designed using the information obtained from the partial immunoproteome analysis done by Western blotting as part of this thesis and targeting the 40 to 46 kDa area in combination with other downstream techniques such as protein identification, expression, purification and mAb production in order to produced an improved ELISA test comparable to that successfully used for *M. hyopneumoniae*.

Overall, the results obtained with this test, alone or in combination with Western blotting, represent a useful tool for better understanding the role of this microorganism in enzootic pneumonia of pigs. This iELISA also represents the first description of a serological test for the detection of antibodies against *M. hyorhinis* at a herd level and represents a good diagnostic tool for the detection of anti-*M. hyorhinis* antibodies in porcine serum samples, filling a diagnostic gap present in the current market for serological detection of porcine mycoplasmal infections., However it is recommended that a combined testing regime including Western blotting analysis

should be used in order to increase the overall sensitivity and specificity of the serological detection of antibodies against *M. hyorhinis*.

Molecular detection

The use of qPCR for the quantification of the load of infectious agents has been widely applied in veterinary research, with examples including different viral, bacterial, parasitic and fungal agents (Leutenegger *et al.*, 1999; Sedgley *et al.*, 2005; Rockett *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012).

In the field of mycoplasmaology qPCR has also been applied in the detection and quantification of a wide range of species including *M. gallisepticum* (Grodio *et al.*, 2008), *M. mycoides* cluster members (Fitzmaurice *et al.*, 2008), *M. agalactiae* (Lorusso *et al.*, 2007), *M. bovis* (Sachse *et al.*, 2010) and *M. hyopneumoniae* (Marois *et al.*, 2010) demonstrating its usefulness for the sensitive and specific detection of mycoplasmas.

The comparison with PCR/DGGE, a robust DNA detection technique applied for routine veterinary diagnostics in various laboratories worldwide, demonstrated a 100 % correlation with the results previously obtained as part of the diagnostic activities performed at the Mycoplasma Group in AHVLA Weybridge, proving that *M. hyorhinis rpoB* qPCR could be considered as reliable diagnostic technique for the routine detection of *M. hyorhinis* in clinical samples.

When comparing the different *M. hyorhinis* loads calculated by qPCR from samples obtained from the experimental infection described in the chapter 3 of this thesis no statistically significant differences could be found, in spite of the significant differences between groups previously found when analysing other parameters such as gross pathology, microscopic changes

and number of positive samples by PCR/DGGE, suggesting that the differences in *M. hyorhinis* virulence are not related to an increment in the bacterial load detected in the infected animals but possibly linked to intraspecific genetic variation in *M. hyorhinis*.

Other authors have been able to establish a link between mycoplasmal load and clinical presentation in different hosts using qPCR. Grodio and collaborators (2008) were able to associate the presence of more severe cases of conjunctivitis in house finches (*Carpodacus mexicanus*) with an increase in the number of *M. gallisepticum* cells detected by qPCR. Also Sachse and collaborators (2010) described significant differences in the load of *M. bovis* between animals presenting clinical mastitis and asymptomatic carriers. Based on these facts, and even though no significant differences were obtained when using *M. hyorhinis* qPCR in experimentally infected animals, the usefulness of this technique for quantification of the infection dynamics of *M. hyorhinis* should not be underestimated.

Overall the two different diagnostic tests described in this chapter represent a good addition to the analysis and understanding of *M. hyorhinis* infections in pig and represent a real contribution to the field of veterinary diagnostics applied to the analysis of the infection dynamics of this important porcine pathogenic microorganism.

Chapter 4 – Appendices

Appendix 4.1. Cloning reagents

- IPTG stock solution (0.1M)

IPTG	1.2 g
------	-------

Add water to 50 ml final volume.

Filter sterilize and store at 4 °C.

- X-Gal (2 ml)

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside	100 mg
--	--------

Dissolve in 2 ml N,N'-dimethylformamide.

Cover with aluminium foil and store at -20 °C.

- LB medium (per litre)

Bacto®-tryptone (BD)	10 g
----------------------	------

Bacto®-yeast extract (BD)	5 g
---------------------------	-----

NaCl	5 g
------	-----

Adjust pH to 7.0 with NaOH.

- LB plates with ampicillin

Add 15 g agar to 1 litre of LB medium.

Autoclave.

Allow the medium to cool to 50 °C before adding ampicillin to a final concentration of 100 µg/ml.

Pour 30–35 ml of medium into 85 mm Petri dishes.

Let the agar harden.

Store at 4 °C for up to 1 month or at room temperature for up to 1 week.

- LB plates with ampicillin/IPTG/X-Gal

Make the LB plates with ampicillin as above; then supplement with 0.5mM IPTG and 80 µg/ml X-Gal and pour the plates.

Alternatively, 100 µl of 100 mM IPTG and 20µl of 50 mg/ml X-Gal may be spread over the surface of an LB ampicillin plate and allowed to absorb for 30 minutes at 37 °C prior to use.

- SOC medium (100ml)

Bacto®-tryptone	2 g
Bacto®-yeast extract	0.5 g
1M NaCl	1 ml
1M KCl	0.25 ml
2M Mg ²⁺ stock, filter-sterilized	1 ml
2M Glucose, filter-sterilized	1 ml

Add Bacto®-tryptone, Bacto®-yeast extract, NaCl and KCl to 97 ml distilled water.

Stir to dissolve. Autoclave and cool to room temperature.

Add 2M Mg²⁺ stock and 2M glucose, each to a final concentration of 20 mM. Bring to 100 ml with sterile, distilled water. The final pH should be 7.0.

2M Mg²⁺ stock

MgCl ₂ ·6H ₂ O	20.33 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24.65 g

Add distilled water to 100 ml. Filter sterilize.

Appendix 4.2. qPCR results

Table 1. qPCR results – field submissions

ID	PCR/DGGE result	Cq	Relative copy number	ID	PCR/DGGE result	Cq	Relative copy number
101P11	<i>M. arginini</i>	-	-	279P11	<i>M. hyorhinis</i>	16.42	1.54 x 10 ⁵
102P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	282P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-
105P11	Negative	-	-	283P10	<i>M. hyosynoviae</i>	-	-
106P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	287P11	Unidentified band	-	-
108P11	Negative	-	-	28P11	<i>M. hyorhinis</i>	28.14	1.45 x 10 ²
113P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	292P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	29.21	7.69 x 10 ¹
14P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	293P11	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	28.51	1.16 x 10 ²
151P11	Negative	-	-	294P11	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	32.38	1.16 x 10 ¹
155P11	<i>M. hyorhinis</i>	24.84	1.03 x 10 ³	296P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-
157P11	Negative	-	-	29P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	31.98	1.48 x 10 ¹
158P11	<i>M. hyorhinis</i>	-	-	300P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	24.13	1.57 x 10 ³
15P10	Negative	-	-	308P10	<i>M. hyorhinis</i>	20.64	1.26 x 10 ⁴
165P10	Negative	-	-	30P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	33.89	4.75
165P11	Negative	-	-	30P11	<i>M. arginini</i>	-	-
176P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	31P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-
179P11	<i>M. hyorhinis</i>	16.48	1.49 x 10 ⁵	328P11	Negative	-	-
184P10	Negative	-	-	336P10	Negative	-	-
184P11	Negative	-	-	347P10	Negative	-	-
186P11	Negative	-	-	362P10	<i>M. hyorhinis</i>	20.15	1.68 x 10 ⁴
187P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	365P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-
188P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	29.21	7.69 x 10 ¹	374P10	<i>M. hyorhinis</i>	21.34	8.27 x 10 ³
188P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	375P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-
192P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	376P10	<i>M. hyorhinis</i>	25.61	6.53 x 10 ²
194P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	378P10	<i>M. arginini</i>	-	-
196P11	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	25.16	8.55 x 10 ²	381P10	<i>M. hyorhinis</i>	27.28	2.23 x 10 ²
197P10	No mycoplasmas	-	-	382P10	<i>M. arginini</i>	-	-
197P11	<i>M. hyorhinis</i>	16.71	1.30 x 10 ⁵	393P10	<i>M. arginini</i>	-	-

1P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	33.44	5.74	396P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	26.87	3.08×10^2
203P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	39P11	<i>M. suis</i>	-	-
204P11	<i>M. hyorhinis</i>	28.06	1.52×10^2	3P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	17.16	9.94×10^4
20P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	42P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-
216P10	Negative	-	-	43P10	Negative	-	-
216P11	Negative	-	-	477P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	20.74	1.18×10^4
217P11	Negative	-	-	54P11	Negative	-	-
219P10	Negative	-	-	55P11	Negative	-	-
232P10	Negative	-	-	59P11	Negative	-	-
242P10	Negative	-	-	60P11	Negative	-	-
242P11	<i>M. hyorhinis</i>	24.44	1.30×10^3	63P11	Negative	-	-
246P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	65P11	Negative	-	-
249P11	<i>M. arginini</i>	-	-	73P11	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-
24P11	<i>M. hyorhinis</i>	21.86	6.08×10^3	7P11	<i>M. hyorhinis</i>	18.25	5.20×10^4
253P10	Negative	-	-	81P11	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	29.21	7.69×10^1
25P10	<i>M. hyorhinis</i>	30.58	3.39×10^1	82P11	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	32.77	9.24
261P10	Negative	-	-	83P10	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	27.94	1.63×10^2
261P11	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	24.63	1.17×10^3	83P11	Negative	-	-
263P10	Negative	-	-	84P10	<i>M. hyorhinis</i>	22.61	3.89×10^3
264P10	Negative	-	-	86P11	<i>M. arginini</i>	-	-
266P10	Negative	-	-	87P11	<i>M. arginini</i>	-	-
267P10	<i>M. hyosynoviae</i>	-	-	88P10	<i>M. hyorhinis</i>	16.61	1.38×10^5
268P10	Negative	-	-	89P10	<i>M. hyosynoviae</i>	-	-
268P11	Negative	-	-	8P10	<i>M. hyorhinis</i>	21.34	8.27×10^3
269P11	<i>M. hyorhinis</i>	30.68	2.96×10^1	90P10	<i>M. flocculare</i>	-	-
26P10	<i>M. hyorhinis</i>	21.62	6.55×10^3	90P11	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	27.35	2.16×10^2
273P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	91P10	<i>M. hyorhinis</i>	30.67	3.03×10^1
275P11	<i>M. hyorhinis</i> and <i>M. hyopneumoniae</i>	30.75	2.85×10^1	95P10	No mycoplasmas	-	-
278P10	<i>M. hyopneumoniae</i>	-	-	9P10	No mycoplasmas	-	-

Table 2. qPCR results – experimental infection. Cq and relative copy number in brackets. (^a Positive by PCR/DGGE against *M. hyorhinis*^b Positive by PCR/DGGE against *M. hyopneumoniae*)

		Nasal swabs (DPI)					Lung tissue
		0	7	14	21	28	PM (28 DPI)
<i>M. hyorhinis</i> Rm16	127a	-	-	-	+ ^a (18.69, 3.72 x 10 ³)	-	-
	129a	-	-	-	-	-	+ ^a (18.48, 4.22 x 10 ⁴)
	130a	-	-	+ ^a (30.47, 3.36 x 10 ¹)	-	-	-
	132a	-	-	-	-	+ ^a (18.89, 1.80 x 10 ⁴)	+ ^a (16.81, 1.13 x 10 ⁵)
	134a	-	-	-	-	-	-
	135a	-	-	-	+ ^a (22.03, 3.89 x 10 ³)	-	-
<i>M. hyorhinis</i> 67p07	111b	-	-	-	-	-	+ ^a (25.78, 4.13 x 10 ²)
	113b	-	-	+ ^a (31.48, 1.96 x 10 ¹)	-	+ ^a (29.33, 6.63 x 10 ¹)	+ ^a (20.68, 1.13 x 10 ⁴)
	124b	-	-	+ ^a (30.64, 3.04 x 10 ¹)	-	-	-
	133b	-	-	-	-	+ ^a (22.98, 2.89 x 10 ³)	+ ^a (22.52, 2.84 x 10 ³)
	136b	-	-	-	-	-	-
	137b	-	-	+ ^a (28.02, 1.44 x 10 ²)	-	+ ^a (27.46, 1.41 x 10 ²)	+ ^a (24.44, 1.21 x 10 ³)
<i>M. hyorhinis</i> 80p04	116c	-	-	+ ^a (23.61, 1.99 x 10 ³)	-	-	+ ^a (25.16, 7.93 x 10 ²)
	119c	-	-	-	+ ^a (23.13, 1.95 x 10 ³)	-	+ ^a (22.84, 3.16 x 10 ³)
	122c	-	-	-	+ ^a (22.38, 3.09 x 10 ³)	+ ^a (23.60, 2.00 x 10 ³)	-
	123c	-	-	+ ^a (23.12, 1.96 x 10 ³)	-	+ ^a (23.95, 1.63 x 10 ³)	+ ^a (27.68, 1.23 x 10 ²)
	128c	-	+ ^a (27.59, 1.30 x 10 ²)	+ ^a (25.61, 4.33 x 10 ²)	-	+ ^a (25.78, 5.46 x 10 ²)	+ ^a (20.85, 1.03 x 10 ⁴)
	131c	-	-	+ ^a (26.96, 2.71 x 10 ²)	+ ^a (26.42, 2.65 x 10 ²)	+ ^a (24.96, 8.92 x 10 ²)	+ ^a (24.46, 8.74 x 10 ²)
<i>M. hyopneumoniae</i> RVC	112d	-	-	-	-	-	-
	114d	-	-	-	-	-	-
	115d	-	-	-	-	-	-
	121d	-	-	-	-	-	-
	126d	-	-	-	-	-	-
Control	117e	-	-	-	-	-	-
	118e	-	-	-	-	-	-
	125e	-	-	-	-	-	-

Table 3. qPCR results – research samples

ID	Origin	Cq	Relative copy number	ID	Origin	Cq	Relative copy number
Reference strain - BTS-7	United States	14.98	8.68×10^4	8	Canary Islands - Spain	15.29	8.86×10^4
Rmr 3	Spain	16.65	3.32×10^4	22	Canary Islands - Spain	15.93	4.54×10^4
Rmr 7	Spain	14.89	1.16×10^5	25	Canary Islands - Spain	14.58	1.13×10^5
Rmr 8	Spain	16.26	4.64×10^4	36	Canary Islands - Spain	16.31	3.25×10^4
Rmr 9	Spain	14.67	9.89×10^4	45	Canary Islands - Spain	14.50	1.20×10^5
Rmr 10	Spain	14.97	1.01×10^5	46	Canary Islands - Spain	16.13	3.68×10^4
Rmr 11	Spain	15.78	3.19×10^4	54	Canary Islands - Spain	14.80	1.23×10^5
Rmr 12	Spain	16.63	3.36×10^4	62	Canary Islands - Spain	16.46	3.76×10^4
Rmr 14	Spain	15.04	1.17×10^5	65	Canary Islands - Spain	14.95	1.24×10^5
Rmr 15	Spain	16.42	4.68×10^4	76	Canary Islands - Spain	15.80	3.15×10^4
Rmr 16	Spain	15.13	1.02×10^5	D	Canary Islands - Spain	15.44	8.95×10^4
Rmr 17	Spain	16.80	3.40×10^4	P	Canary Islands - Spain	14.43	1.12×10^5
Rmr 18	Spain	15.62	3.57×10^4	U	Canary Islands - Spain	15.76	4.49×10^4
Rmr 19	Spain	14.82	8.59×10^4	Z	Canary Islands - Spain	16.12	3.26×10^4
Rmr 20	Spain	14.52	9.79×10^4	8B1	Canary Islands - Spain	14.35	1.19×10^5
Rmr 21	Spain	15.96	3.64×10^4	Ove 1	Canary Islands - Spain	16.14	3.22×10^4
Rmr 22	Spain	14.19	1.18×10^5	GC37	Canary Islands - Spain	15.59	4.45×10^4
4	Canary Islands - Spain	15.97	3.18×10^4	GC91	Canary Islands - Spain	15.79	3.60×10^4

Table 3. qPCR results – Common *Mycoplasma* species reference strains and porcine bacterial isolates

Isolate	Species	Cq	Relative copy number
J	<i>M. hyopneumoniae</i> ^a	-	-
S16	<i>M. hyosynoviae</i> ^a	-	-
H3-6B-F	<i>M. hyopharyngis</i> ^a	-	-
Ms42	<i>M. flocculare</i> ^a	-	-
G230	<i>M. arginini</i> ^a	-	-
Y04779	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ^b	-	-
Y04744	<i>Pasteurella multocida</i> ^b	-	-
Y04243	<i>Actinobacillus suis</i> ^b	-	-
Y04436	<i>Trueperella pyogenes</i> ^b	-	-
1374	<i>Haemophilus parasuis</i> ^a	-	-
735	<i>Streptococcus suis</i> ^a	-	-
M62	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> ^a	-	-

Conclusiones

5. Conclusiones

Primera:

Las técnicas de tipificación RAPD, PFGE y Southern blotting demostraron ser de utilidad para la tipificación de *M. hyorhinis* siendo VNTR la técnica de tipificación recomendada para la caracterización de la variación genética de este microorganismo.

Segunda:

Las cepas de campo de *M. hyorhinis* presentan una limitada variabilidad a nivel antigénico tras el análisis de Western blotting demostrándose la presencia de varias componentes antigénicos destacados y localizados en las áreas correspondientes al 25, 40 – 46 y 120 kDa de peso molecular aparente.

Tercera:

El uso del coeficiente de Wallace para el cálculo de la correlación entre los resultados de técnicas de tipificación demostró ser útil al aplicarse al análisis de *M. hyorhinis*, corroborando que las técnicas de tipificación aplicadas a la caracterización de este microorganismo presentan un limitado nivel de asociación entre ellas e indicando que la correcta selección de técnicas de tipificación estará supeditada al estudio de epidemiología molecular en cuestión a realizar.

Cuarta:

M. hyorhinis es capaz de producir lesiones respiratorias indistinguibles a nivel macroscópico e histopatológico de aquellas observadas en casos de NEP causados por *M. hyopneumoniae*, además de demostrarse una variabilidad en la virulencia de cepas de campo de *M. hyorhinis*.

Quinta:

El uso de inoculación trans-traqueal en combinación con la aplicación de isoflurano como agente anestésico puede ser usado satisfactoriamente para el desarrollo de modelos experimentales de infección causados por micoplasma en cerdos además de producir una mejora en la reproducibilidad y bienestar animal debido a limitada invasividad y rápida inducción y recuperación de los animales tras la anestesia.

Sexta:

El uso de PCR/DGGE para el seguimiento de la excreción o presencia de *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* en hisopos nasales y tejido pulmonares demostró ser gran utilidad aunque la correlación entre los resultados obtenidos entre los diferentes tipos de muestra es baja. El análisis de tejido pulmonar presentó una mayor correlación con las presentaciones y lesiones macro y microscópicas por lo que se debe considerar como una muestra indispensable en infecciones experimentales con estos microorganismos.

Séptima:

La técnica de Western blotting presenta una gran utilidad para el estudio de la evolución de la respuesta inmune y para el diagnóstico serológico de *M. hyorhinis*. A su vez el hallazgo de varias proteínas inmunodominantes, entre las que destacan las presentadas en la región comprendida entre los 40 y 46 kDa de peso molecular aparente, presentan un gran potencial para ser utilizadas en el desarrollo de técnicas de diagnóstico mejoradas además de poder jugar un papel dentro del desarrollo de vacunas de subunidad o recombinantes frente a la enfermedad causada por *M. hyorhinis*.

Octava:

El uso de la técnica de ELISA indirecto para la detección de *M. hyorhinis* puede ser útil para el estudio de seroprevalencia en *M. hyorhinis* además de presentar el potencial de ser combinada con la técnica de Western blotting con el fin de producir un análisis serológico más sensible y específico.

Novena:

La técnica de qPCR aplicada a la detección de *M. hyorhinis* demostró ser una técnica rápida y fiable para la detección de ADN de este microorganismo, como una alta sensibilidad, menor a 10 copias, y un 100 % de especificidad y correlación con los resultados obtenidos por PCR/DGGE. Además, la capacidad de cuantificación permite que esta técnica pueda ser usada

Conclusiones

como indicador de la carga bacteriana que pueda servir como data suplementario para el análisis de la posible implicación de *M. hyorhinis* en cuadros de neumonía porcina.

Decima:

La falta de diferencias estadísticamente significativas entre el número de copias relativo de *M. hyorhinis* encontrada en grupos con diferentes grados de lesiones pulmonares a nivel micro y macroscópico sugiere que las diferencias en virulencia entre cepas de este microorganismo no están asociadas a un incremento en el número de células de *M. hyorhinis* en hisopos nasales o tejido pulmonar, debiendose probablemente a variaciones genéticas intraespecie.

Resumen

6. Resumen

Aunque el papel de *Mycoplasma hyorhinis* como organismo patógeno en ganado porcino se ha encontrado asociado por lo general a cuadros de artritis, otitis y poliserositis, diversos estudios epidemiológico recientes han sido capaces de demostrar la posible implicación de este microorganismo como agente etiológico primario en cuadros de enfermedad respiratoria en cerdos, con una presentación clínica compatible con aquella causada por *M. hyopneumoniae*, el agente etiológico clásico de la neumonía enzoótica porcina, y con cuadros de enfermedad respiratoria asociada al complejo respiratorio porcino.

Debido al limitado conocimiento de la variabilidad genética y antigénica de este microorganismo decidimos enfocar la primera de parte de esta tesis al estudio y desarrollo de diversas técnicas de tipificación molecular para el análisis de *M. hyorhinis*. Dentro de este grupo de técnicas desarrolladas, entre las que se encontraron las técnicas de RAPD, PFGE, Southern blotting, cabe destacar la técnica de VNTR, que tras nuestro análisis destaca como la herramienta de elección para la tipificación y análisis de la epidemiología molecular de *M. hyorhinis*. En lo que respecta al análisis antigénico se demostró una escasa variabilidad entre aislados con orígenes geográficos distantes, evidenciándose la presencia de componentes antigénicos inmunodominantes altamente conservados que pueden jugar un papel importante en el futuro desarrollo de herramientas enfocadas a la prevención y control de este microorganismo, como puede ser el caso de vacunas de subunidades o recombinantes.

Junto con el estudio de la variabilidad proteica y genética, y con el fin de demostrar la capacidad de *M. hyorhinis* para causar cuadros de neumonía en lechones, se desarrolló un

modelo experimental de infección en estos animales. Gracias a este modelo se pudo demostrar como *M. hyorhinis* es capaz de producir lesiones pulmonares indistinguibles a nivel micro y macroscópica de aquellas producidas por el agente clásico de la NEP, *M. hyopenumoniae*. Estos datos, además de demostrar la evidencia observada en estudios epidemiológicos de campo, ponen en duda todos aquellos resultados diagnósticos basados únicamente en la evidencia clínica y patológica sin demostración del agente etiológico.

Con el fin de mejorar las herramientas diagnósticas aplicadas a *M. hyorhinis* y para proporcionar herramientas fiables para la detección de la respuesta inmune y presencia de este microorganismo en cerdos decidimos desarrollar dos técnicas ampliamente empleadas en el diagnóstico de enfermedad en el área de la sanidad animal, la técnica del ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente a *M. hyorhinis* y la PCR cuantitativa a tiempo real para la detección rápida, sensible y específica de ADN de este microorganismo. Ambas técnicas demostraron ser de gran utilidad para el análisis de infecciones causadas por *M. hyorhinis* y junto con la técnica de Western blotting desarrollada en esta tesis suponen una contribución real en el campo del diagnóstico veterinario aplicado al análisis de infecciones causadas por este importante microorganismo patógeno porcino.

Summary

7. Summary

Even though the role of *M. hyorhinis* as a porcine pathogen has been usually associated to cases of arthritis, otitis and polyserositis, various recent epidemiological studies have been able to prove the significant part that this organism plays as a primary etiological agent in cases of porcine respiratory disease compatible with those observed in enzootic pneumonia caused by *M. hyopneumoniae* and in the porcine respiratory disease complex.

Due to the limited knowledge regarding the genetic and antigenic variability of this microorganism, we decided to focus the first part of this thesis in the development and analysis of various molecular typing techniques applied to the characterisation of *M. hyorhinis*. From the various molecular typing techniques analysed, which included RAPD, PFGE and Southern blotting, VNTR stood out as the most suitable technique for the molecular typing of *M. hyorhinis* due to its easy interpretation and discriminatory power. The antigenic analysis, based on Western blotting, showed a high similarity between *M. hyorhinis* isolates sourced from different geographical origins demonstrating the presence of some highly conserved and immunodominant antigenic determinants that could play a role in the future development of prevention and control tools against this microorganism, including for example recombinant or sub-unit vaccines.

In addition to the genetic and antigenic variability analysis performed as part of this thesis we also evaluated the pathogenic ability of *M. hyorhinis* in cases of pneumonia in piglets by the development of an experimental model of respiratory infection in those animals. Our model was able to induce respiratory disease with clinical presentation and lesions indistinguishable from those produced by *M. hyopneumoniae*. Our data confirms the evidence observed in field

epidemiology studies challenging those diagnostic results for enzootic pneumonia solely based of clinical and pathological evidence without demonstration of the etiological agent.

In order to improve the diagnostic tools applied to *M. hyorhinis* and with the aim of providing reliable and robust techniques for the detection of the immune response and presence of the microorganism in pig we decided to develop two assays widely applied in the field of animal health diagnosis, the indirect ELISA test for the detection of antibodies against *M. hyorhinis* and the real time quantitative PCR for the rapid, sensitive and specific detection of DNA from this microorganism. Both techniques proved to be of great use for the analysis of infection caused by *M. hyorhinis* and together with the Western blotting test developed in this thesis represent a real contribution to the field of veterinary diagnostics applied to the analysis of the infection dynamics of this important porcine pathogenic microorganism.

Referencias bibliográficas

Aarestrup FM, Friis NF, Szancer J. (1998). Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* in a liquid medium compared to a disc assay. *Acta Vet Scand.* 39(1):145-7.

Aarestrup FM, Friis NF. (1998). Antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma hyosynoviae* isolated from pigs during 1968 to 1971 and during 1995 and 1996. *Vet Microbiol.* Mar 15;61(1-2):33-9.

Ahrens P, Kokotovic B, Hagedorn-Olsen T, Friis NF. (1996). Identification of *Mycoplasma hyosynoviae* in clinical samples by PCR. 11th International Organisation of Mycoplasma Conference, Orlando, Florida, USA.

Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. (2008). Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol,* 46(8):2692-2699.

Almagor M, Kahane I, Gilon C, Yatziv S. (1986). Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun.* Apr;52(1):240-4.

Almagor M, Kahane I, Wiesel JM, Yatziv S. (1985). Human ciliated epithelial cells from nasal polyps as an experimental model for *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Infect Immun.* May;48(2):552-5.

Almagor M, Kahane I, Yatziv S. (1984). Role of superoxide anion in host cell injury induced by *Mycoplasma pneumoniae* infection. A study in normal and trisomy 21 cells. *J Clin Invest.* Mar;73(3):842-7.

Altman DG (1991). Practical statistics for medical research. En: CRC Texts in Statistical Science Series. Chapman and Hall (eds.). London.

Altman DG, Bland JM. (1994). Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ.* Jul 9;309(6947):102.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* Oct 5;215(3):403-10.

Ameri M, Zhou EM, Hsu WH. (2006). Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. *J Vet Diagn Invest.* Mar;18(2):198-201.

Andrada, M. (2001). Estudio Etiopatogénico de la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP). Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Anónimo. (2008). Perineumonía contagiosa bovina. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.4.9. pp. 774-787.

Armstrong CH, Freeman MJ, Sands-Freeman L, Lopez-Osuna M, Young T, Runnels LJ. (1983). Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can J Comp Med.* Oct;47(4):464-70.

Artiushin S, Stipkovits L, Minion FC. (1993). Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Cell Probes.* Oct;7(5):381-5.

Assunção P, De la Fe C, Ramírez AS, González Llamazares O, Poveda JB. (2005). Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot. *Vet Res Commun.* Oct;29(7):563-74.

Assunção, PA. (2003). Aislamiento e Identificación de micoplasmas porcinos. Aplicación de la citometría de flujo al estudio de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tesis Doctoral. Departamento de Morfología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Baekbo P, Madsen KS, Aagard M, Szancer J. (1994). Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from infected herds without restocking. En: Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress Bangkok, Thailand, p135.

Bannerman ES, Nicolet J. (1971). Isolation and identification of porcine *Mycoplasma* in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*. Dec;113(12):697-710.

Bashiruddin, JB. Extraction of DNA from *Mycoplasma*. (1998). En: *Methods in Molecular Biology*. Miles RJ, Nicholas RAJ (eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey. Vol. 104, pp. 141–144.

Baskerville A. (1972). Development of the early lesions in experimental enzootic pneumonia of pigs: an ultrastructural and histological study. *Res Vet Sci*. Nov;13(6):570-8.

Ben Aissa-Fennira F, Sassi A, Bouguerra A, Benammar-Elgaaied A. (2011). Immunoregulatory role for a public IgM idiotype in the induction of autoimmune diseases in *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Immunol Lett*. May;136(2):130-7.

Bender JB, Hedberg CW, Besser JM, Boxrud DJ, MacDonald KL, Osterholm MT. (1997). Surveillance by molecular subtype for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. *N Engl J Med*. Aug 7;337(6):388-94.

Bifani P, Kurepina N, Mathema B, Wang XM, Kreiswirth B. (2009). Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Methods Mol Biol*. 551:173-88.

Bikandi J, San Millán R, Rementeria A, Garaizar J. (2004). *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics*. 20:798-9.

Blank WA, Erickson BZ, Stemke GW. (1996). Phylogenetic relationships of the porcine mycoplasmas *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyopharyngis*. *Int J Syst Bacteriol*. Oct;46(4):1181-2.

Blowey RW. (1993). *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis. *Pig Vet.J*. 30 - 72.

Boatman ES, Kenny GE. (1971). Morphology and ultrastructure of *Mycoplasma pneumoniae* spherules. *J Bacteriol*. Jun;106(3):1005-15.

Bogema DR, Scott NE, Padula MP, Tacchi JL, Raymond BB, Jenkins C, Cordwell SJ, Minion FC, Walker MJ, Djordjevic SP. (2011). Sequence TTKF ↓ QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Biol Chem. Dec 2;286(48):41217-29.

Boye M, Jensen TK, Ahrens P, Hagedorn-Olsen T, Friis NF. (2001). *In situ* hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. APMIS. Oct;109(10):656-64.

Bradbury, J.M., Yavari, C.A., Al-Ankari, A.S., Payne-Johnson, CE. (1994). Isolation of *Mycoplasma hyopharyngis* and *Fusobacterium necrophorum* from lame in the UK. En: Proc. 10th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Bordeaux. IOM letter, 3:488.

Brooks E, Faulds D. (1989). The *Mycoplasma hyopneumoniae* 74.5kD antigen elicits neutralizing antibodies and shares sequence similarity with heat-shock proteins. Vaccine.89:265–269.

Brown DR. (2010). Phylum XVI. Tenericutes Murray 1984a, 356VP (Effective publication: Murray 1984b, 33.). En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB (eds.). Springer, New York. pp 567-723.

Bruggmann S, Keller H, Bertschinger HU, Engberg B. (1977). Quantitative detection of antibodies to *Mycoplasma suis pneumoniae* in pigs' sera by an enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Rec. Aug 6;101(6):109-11.

Burnett TA, Dinkla K, Rohde M, Chhatwal GS, Uphoff C, Srivastava M, Cordwell SJ, Geary S, Liao X, Minion FC, Walker MJ, Djordjevic SP. (2006). P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. Mol Microbiol. May;60(3):669-86.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. Apr;55(4):611-22.

- Cai HY, van Dreumel T, McEwen B, Hornby G, Bell-Rogers P, McRaid P, Josephson G, Maxie G. (2007). Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. *J Vet Diagn Invest.* Jan;19(1):91-5.
- Calcutt MJ, Foeking MF, Rosales RS, Ellis RJ, Nicholas RA. (2012). Genome sequence of *Mycoplasma hyorhinis* strain GDL-1. *J Bacteriol.* Apr;194(7):1848.
- Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. (1999a). Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest.* May;11(3):246-51.
- Calsamiglia M, Pijoan C, Bosch GJ. (1999b). Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. *Swine Health Prod.* 7(6):263-268.
- Calus D, Baele M, Meyns T, de Kruif A, Butaye P, Decostere A, Haesebrouck F, Maes D. (2007). Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Vet Microbiol.* Mar 10;120(3-4):284-91.
- Cardona AC, Pijoan C, Dee SA. (2005). Assessing *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol movement at several distances. *Vet Rec.* Jan 15;156(3):91-2.
- Caron J, Ouardani M, Dea S. (2000a). Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol.* Apr;38(4):1390-6.
- Caron J, Sawyer N, Ben Abdel Moumen B, Cheikh Saad Bouh K, Dea S. (2000b). Species-specific monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol.* Jul;7(4):528-35.
- Chalker V, Stocki T, Litt D, Bermingham A, Watson J, Fleming D, Harrison T. (2012). Increased detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children in England and Wales, October 2011 to January 2012. *Euro Surveill.* Feb 9;17(6). pii: 20081.

Chambaud I, Wróblewski H, Blanchard A. (1999). Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol.* Dec;7(12):493-9.

Chan MS, Maiden MC, Spratt BG. (2001). Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics.* Nov;17(11):1077-83.

Cheikh Saad Bouh K, Shareck F, Dea S. (2003). Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clin Diagn Lab Immunol.* May;10(3):459-68.

Chen AY, Fry SR, Daggard GE, Mukkur TK. (2008). Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine.* Aug 12;26(34):4372-8.

Chen JR, Lin JH, Weng CN, Lai SS. (1998). Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol.* May;62(2):97-110.

Cheng X, Nicolet J, Poumarat F, Regalla J, Thiaucourt F, Frey J. (1995). Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology.* Dec;141 (Pt 12):3221-8.

Cherry JJ, Ley DH, Altizer S. (2006). Genotypic analyses of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from songbirds by random amplification of polymorphic DNA and amplified-fragment length polymorphism. *J Wildl Dis.* Apr;42(2):421-8.

Christensen G, Sørensen V, Mousing, J. (1999). Diseases of respiratory system. En: *Diseases of Swine.* Straw BE, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor DJ (eds.). Iowa University Press, Ames, Iowa. pp. 913–940.

Citti C, Wise KS. (1995). *Mycoplasma hyorhinis* vlp gene transcription: critical role in phase variation and expression of surface lipoproteins. *Mol Microbiol.* Nov;18(4):649-60.

Citti C, Kim MF, Wise KS. (1997). Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect Immun.* May;65(5):1773-85.

Citti C, Poumarat F, Le Grand D, Bergonier D, Beier T, Brank M, Glew MD, Rosengarten R. (1999). Antigenic variation in mycoplasmas: past, present and future. En: EUR 18756 - COST 826 - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. Stipkovits L, Rosengarten R, Frey J (eds.). Vol. 3: 1-4.

Citti C, Watson-McKown R, Drosesse M, Wise KS. (2000). Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*. *J Bacteriol.* Mar;182(5):1356-63.

Clark LK, Armstrong CH, Freeman CH, Scheidt AB, Sands-Freeman L, Knox K. (1991). Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Vet. Med.* 1991 86:543-550.

Cohen J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement.* 20:37-46.

Coll T, Morillo A. (2008). Extracción de sangre en cerdas, cerdos de cebo y lechones en maternidad. *Suis técnica clínicas.* N° 19, páginas 54-56.

Cousin-Allery A, Charron A, de Barbeyrac B, Fremy G, Skov Jensen J, Renaudin H, Bebear C. (2000). Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. *Epidemiol Infect.* Feb;124(1):103-11.

De la Fe C, Assunção P, Rosales RS, Antunes T, Poveda JB. (2006). Characterisation of protein and antigen variability among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) and *Mycoplasma agalactiae* field strains by SDS-PAGE and immunoblotting. *Vet J.* May;171(3):532-8.

Referencias bibliográficas

De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 3, The Firmicutes. Springer, New York.

Dee S. (1996). The porcine respiratory disease complex: are subpopulations important?. *Swine Health. Prod.* 4: 147-149.

Dégrange S, Renaudin H, Charron A, Pereyre S, Bébéar C, Bébéar CM. (2008). Reduced susceptibility to tetracyclines is associated *in vitro* with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* Jun;61(6):1390-2.

Denoeud F, Vergnaud G. (2004). Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. *BMC Bioinformatics.* Jan 12;5:4.

Deutscher AT, Jenkins C, Minion FC, Seymour LM, Padula MP, Dixon NE, Walker MJ, Djordjevic SP. (2010). Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of *Mycoplasma hyopneumoniae* bind heparin, fibronectin and porcine cilia. *Mol Microbiol.* Oct;78(2):444-58.

Dice, LR. (1945). Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology.* 26:297-302.

Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TE, Crook DW. (2012). Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet.* Sep;13(9):601-12.

Done SH. (1997). Enzootic Pneumonia (mycoplasmosis) revisited. *The pig Journal.* p 40-61.

Dorigo-Zetsma JW, Dankert J, Zaat SA. (2000). Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals eight P1 subtypes within two genomic groups. *J Clin Microbiol.* Mar;38(3):965-70.

Dubosson CR, Conzelmann C, Miserez R, Boerlin P, Frey J, Zimmermann W, Häni H, Kuhnert P. (2004). Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Vet Microbiol.* 2004 Aug 19;102(1-2):55-65.

Duncan JR, Ross RF. (1973). Experimentally induced *Mycoplasma hyorhinis* arthritis of swine: pathologic response to 26th postinoculation week. Am J Vet Res. Mar;34(3):363-6.

Erickson BZ, Ross RF, Rose DL, Tully JG, Bove JM. (1986). *Mycoplasma hyopharyngis*, a new species from swine. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:55-59.

Falk K, Lium BM. (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. III. Serological findings and their relationship to pathomorphological and microbiological findings. Acta Vet Scand.32(1):79-88.

Feld NC, Qvist P, Ahrens P, Friis NF, Meyling A. (1992). A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol. Jan;30(1):35-46.

Ferguson NM, Hepp D, Sun S, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH, García M. (2005). Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. Microbiology. Jun;151 (Pt 6):1883-93.

Fitzmaurice J, Sewell M, Manso-Silván L, Thiaucourt F, McDonald WL, O'Keefe JS. (2008). Real-time polymerase chain reaction assays for the detection of members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. N Z Vet J. Feb;56(1):40-7.

Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carrio JA. (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. BMC Bioinformatics. May 18;10:152.

Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carrio JA. (2012). PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. BMC Bioinformatics. May 8;13:87.

Referencias bibliográficas

Freeman MJ, Lopez-Osuna M, Armstrong CH, Sands-Freeman L. (1984). Evaluation of the indirect hemagglutination assay as a practical serodiagnostic test for mycoplasmal pneumonia of swine. *Vet Microbiol.* Jul;9(3):259-70.

Frey J, Haldimann A, Kobisch M, Nicolet J. (1994). Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. *Microb Pathog.* Nov;17(5):313-22.

Friis NF. (1970). A new porcine mycoplasma species: *Mycoplasma suisdaniae*. *Acta Vet Scand.* 11(3):487-90.

Friis NF. (1971a). A selective medium for *Mycoplasma suispneumoniae*. *Acta Vet Scand.* 12(3):454-6.

Friis NF. (1971b). *Mycoplasma hyorhinis* as a causative agent in pneumonia of pigs. *Acta Vet Scand.* 12(1):116-9.

Friis NF. (1971c). Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of Danish pigs. *Acta Vet Scand.* 12(1):69-79.

Friis NF. (1972). Isolation and characterization of a new porcine mycoplasma. *Acta Vet Scand.* 13(2):284-6.

Friis NF, Ahrens P, Larsen H. (1991). *Mycoplasma hyosynoviae* isolation from the upper respiratory tract and tonsils of pigs. *Acta Vet Scand.* 32(4):425-9.

Friis NF, Feenstra AA. (1994). *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. *Acta Vet Scand.* 35(1):93-8.

Frost EH, Deslandes S, Veilleux S, Bourgaux-Ramoisy D. (1991). Typing *Chlamydia trachomatis* by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. *J Infect Dis.* May;163(5):1103-7.

Futo S, Seto Y, Mitsuse S, Mori Y, Suzuki T, Kawai K. (1995a). Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. J Bacteriol. Apr;177(7):1915-7.

Futo S, Seto Y, Okada M, Sato S, Suzuki T, Kawai K, Imada Y, Mori Y. (1995b). Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1995 Mar;33(3):680-3.

García de Viedma D, Mokrousov I, Rastogi N. (2011). Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. Mar;29 Suppl 1:8-13.

Garrity GM, Timothy GL, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J, Tindall, BJ. (2007). Part 8 – The Bacteria: Phylum Firmicutes: Class Mollicutes. En: The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. Michigan State University Board of Trustees. pp 317-332.

Geary SJ, Forsyth MH, Aboul Saoud S, Wang G, Berg DE, Berg CM. (1994). *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. Mol Cell Probes. Aug;8(4):311-6.

Godinho KS. (2008). Susceptibility testing of tulathromycin: interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. Vet Microbiol. Jun 22;129(3-4):426-32.

Goering RV. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infect Genet EVol. Oct;10(7):866-75.

Goiš M, Valíček L, Sovadina M. (1968a). *Mycoplasma hyorhinis*, a causative agent of pig pneumonia. I. Zentralbl Veterinarmed B. Mar;15(2):230-40.

Goiš M. (1968b). Serological response of pigs to infection with *Mycoplasma*. Demonstration of growth and metabolism-inhibiting antibodies in sera of pigs inoculated intranasally with *Mycoplasma hyorhinis*. II. Zentralbl Veterinarmed B. Apr;15(3):382-91.

Goiš M, Pospisil Z, Cerny M, Mrva V. (1971). Production of pneumonia after intranasal inoculation of gnotobiotic piglets with three strains of *Mycoplasma hyorhinis*. J Comp Pathol. Jul;81(3):401-10.

Gonçalves R. (1997). Estudos sobre a imunogenicidade de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC – Contribuição para o melhoramento do diagnóstico da peripneumonia contagiosa bovina. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias. Vila Real - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Gong M, Meng L, Jiang B, Zhang J, Yang H, Wu J, Shou C. (2008). p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. Mol Cancer Ther. Mar;7(3):530-7.

Goodison S, Urquidi V, Kumar D, Reyes L, Rosser CJ. (2013). Complete Genome Sequence of *Mycoplasma hyorhinis* Strain SK76. Genome Announc. Jan;1(1). pii: e00101-12.

Goodwin RFW, Hodgson RG, Whittlestone P, Woodham RL. (1969). Some experiments relating to the artificial immunity in enzootic pneumonia of pigs. Journal of Hygiene 67, 465-471

Goodwin RF, Whittlestone P. (1973). Enzootic pneumonia of pigs: immunization attempts inoculating *Mycoplasma suis pneumoniae* antigen by various routes and with different adjuvants. Br Vet J. 1973 Sep-Oct;129(5):456-64.

Gourlay RN, Howard CJ. (1982). Respiratory mycoplasmosis. Adv Vet Sci Comp Med. 26:289-332.

Graves LM, Hunter SB, Ong AR, Schoonmaker-Bopp D, Hise K, Kornstein L, DeWitt WE, Hayes PS, Dunne E, Mead P, Swaminathan B. (2005). Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet network. J Clin Microbiol. May;43(5):2350-5.

Gresham A, Rogers J, Tribe H, Phipps LP. (1994). *Eperythrozoon suis* in weaned pigs. Vet Rec. Jan 15;134(3):71-2.

Grodio JL, Dhondt KV, O'Connell PH, Schat KA. (2008). Detection and quantification of *Mycoplasma gallisepticum* genome load in conjunctival samples of experimentally infected house finches (*Carpodacus mexicanus*) using real-time polymerase chain reaction. Avian Pathol. Aug;37(4):385-91.

Grundmann H, Hori S, Tanner G. (2001). Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. J Clin Microbiol. Nov;39(11):4190-2.

Guimaraes AM, Vieira RF, Poletto R, Vemulapalli R, Santos AP, de Moraes W, Cubas ZS, Santos LC, Marchant-Forde JN, Timenetsky J, Biondo AW, Messick JB. (2011). A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. J Appl Microbiol. Aug;111(2):417-25.

Gundersen DE, Lee IM, Rehner SA, Davis RE, Kingsbury DT. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. J Bacteriol. Sep;176(17):5244-54.

Gwaltney SM, Hays MP, Oberst RD. (1993). Detection of *Eperythrozoon suis* using the polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest. Jan;5(1):40-6.

Hackett KJ, Clark TB. (1989). The ecology of spiroplasmas. En: The Mycoplasmas. Whitcombe RF, Tully JG (eds.). Academic Press, Nueva York. Vol. 5, pp. 113–200.

Hagedorn-Olsen T, Basse A, Jensen TK, Nielsen NC. (1999a). Gross and histopathological findings in synovial membranes of pigs with experimentally induced *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis. APMIS. Feb;107(2):201-10.

Referencias bibliográficas

Hagedorn-Olsen T, Nielsen NC, Friis NF, Nielsen J. (1999b). 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. Zentralbl Veterinarmed A. Nov;46(9):555-64.

Hannan PC, Bhogal BS, Fish JP. (1982). Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. Res Vet Sci. Jul;33(1):76-88.

Hannan PC, Windsor GD, de Jong A, Schmeer N, Stegemann M. (1997). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. Sep;41(9):2037-40.

Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. (2010). An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. J Comp Pathol. Aug-Oct;143(2-3):120-31.

Harasawa R, Koshimizu K, Takeda O, Uemori T, Asada K, Kato I. (1991). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. Apr;5(2):103-9.

Harasawa R. (1999). Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S rRNA spacer sequence. Microbiol Immunol. 43(2):127-32.

Hariharan H, MacDonald J, Carnat B, Bryenton J, Heaney S. (1992). An investigation of bacterial causes of arthritis in slaughter hogs. J Vet Diagn Invest. Jan;4(1):28-30.

Harris H, Alexander T. (1999). Methods of disease control. En: Diseases of Swine (8th ed.). B. Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D (eds.). Iowa State University Press, Ames, pp. 1077–1110.

Hayashi S, Wu HC. (1990). Lipoproteins in bacteria. J Bioenerg Biomembr. Jun;22(3):451-71.

- He Y, Xu MJ, Zhou DH, Zou FC, Lin RQ, Yin CC, He XH, Liang R, Liang M, Zhu XQ. (2011). Seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs in subtropical southern China. Trop Anim Health Prod. 2011 Mar;43(3):695-8.
- Heinritzi K. (1990). The diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection. Tierarztl Prax. Oct;18(5):477-81.
- Henry SC. (1979). Clinical observations on eperythrozoonosis. Journal of the American Veterinary Medical Association. 174, 601.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y). Sep;11(9):1026-30.
- Hoelzle LE, Adelt D, Hoelzle K, Heinritzi K, Wittenbrink MM. (2003). Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. Vet Microbiol. May 29;93(3):185-96.
- Hoelzle LE, Hoelzle K, Ritzmann M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. (2006). *Mycoplasma suis* antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs. Clin Vaccine Immunol. Jan;13(1):116-22.
- Hoelzle LE, Helbling M, Hoelzle K, Ritzmann M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. (2007a). First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. J Microbiol Methods. Aug;70(2):346-54.
- Hoelzle K, Grimm J, Ritzmann M, Heinritzi K, Torgerson P, Hamburger A, Wittenbrink MM, Hoelzle LE. (2007b). Use of recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma suis*, with correlation of serological results to hematological findings. Clin Vaccine Immunol. Dec;14(12):1616-22.
- Hoelzle LE. (2008). Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. Vet Microbiol. Aug 25;130(3-4):215-26.

Hong Y, García M, Levisohn S, Savelkoul P, Leiting V, Lysnyansky I, Ley DH, Kleven SH. (2005). Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. Avian Dis. Mar;49(1):43-9.

Hovind-Hougen K, Friis NF. (1991). Morphological and ultrastructural studies of *Mycoplasma flocculare* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. Res Vet Sci. Sep;51(2):155-63.

Hsu FS, Liu MC, Chou SM, Zachary JF, Smith AR. (1992). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Eperythrozoon suis* antibodies in swine. Am J Vet Res. Mar;53(3):352-4.

Hsu T, Minion FC. (1998). Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Infect Immun. Oct;66(10):4762-6.

Hunter PR, Gaston MA. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. Nov;26(11):2465-6.

Jaccard, P. (1901). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles. 37: 547–579.

Jacobs E, Bartl A, Oberle K, Schiltz E. (1995). Molecular mimicry by *Mycoplasma pneumoniae* to evade the induction of adherence inhibiting antibodies. J Med Microbiol. Dec;43(6):422-9.

Jäger HC, McKinley TJ, Wood JL, Pearce GP, Williamson S, Strugnell B, Done S, Habernoll H, Palzer A, Tucker AW. (2012). Factors associated with pleurisy in pigs: a case-control analysis of slaughter pig data for England and Wales. PLoS One. 7(2).

Jensen LT, Thorsen P, Møller B, Birkelund S, Christiansen G. (1998). Antigenic and genomic homogeneity of successive *Mycoplasma hominis* isolates. J Med Microbiol. Aug;47(8):659-66.

Jensen PT, Wolstrup C, Friis NF. (1978). Utilisation of glucose by *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. Acta Vet Scand. 19(2):179-83.

Jensen TK, Aalboek B, Buttenschøn J, Friis NF, Kyrval J, Rønsholt L. (1995). *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* infection in cases of fibrinous pericarditis in slaughter pigs. Acta Vet Scand. 36(4):575-7.

Johansson KE, Heldtander MU, Pettersson B. (1998). Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. Methods Mol Biol. 104:145-65.

Kaleta P, Callanan MJ, O'Callaghan J, Fitzgerald GF, Beresford TP, Ross RP. (2009). Exploitation of the diverse insertion sequence element content of dairy *Lactobacillus helveticus* starters as a rapid method to identify different strains. J Microbiol Methods. Oct;79(1):32-6.

Kamla V, Henrich B, Hadding U. (1996). Phylogeny based on elongation factor Tu reflects the phenotypic features of mycoplasmas better than that based on 16S rRNA. Gene. May 24;171(1):83-7.

Kawashima K, Yamada S, Kobayashi H, Narita M. (1996). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyorhinis* antigens in pulmonary lesions of pigs suffering from respiratory distress. J Comp Pathol. Apr;114(3):315-23.

Kazama S, Yagihashi T, Morita T, Awakura T, Shimada A, Umemura T. (1994). Isolation of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma arginini* from the ears of pigs with otitis media. Res Vet Sci. Jan;56(1):108-10.

Kazama S, Yagihashi T, Seto K. (1989). Preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen for the enzyme-linked immunosorbent assay. Can J Vet Res. Apr;53(2):176-81.

Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson P.J, Hugh-Jones ME. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 182, 2928–2936.

Kenny GE, Cartwright FD. (1984). Immunoblotting for determination of the antigenic specificities of antibodies to the Mycoplasmatales. Isr J Med Sci. Oct;20(10):908-11.

Referencias bibliográficas

Kibbe WA. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35: May 25.

Kim KS, Ko KS, Chang MW, Hahn TW, Hong SK, Kook YH. (2003). Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of *Mycoplasma* species. *FEMS Microbiol Lett.* Sep 26;226(2):299-305.

Klieneberger E. (1935). The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *Journal of Pathology and Bacteriology.* 40,93-105.

Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M, Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J Vet Med Sci.* Aug;57(4):769-71.

Kobayashi H, Morozumi T, Miyamoto C, Shimizu M, Yamada S, Ohashi S, Kubo M, Kimura K, Mitani K, Ito N, Yamamoto K. (1996a). *Mycoplasma hyorhinis* infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *J Vet Med Sci.* Feb;58(2):109-13.

Kobayashi H, Sonmez N, Morozumi T, Mitani K, Ito N, Shiono H, Yamamoto K. (1996b). *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyosynoviae* and *M. hyorhinis* to antimicrobial agents. *J Vet Med Sci.* Nov;58(11):1107-11.

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. *J Vet Med Sci.* Aug;67(8):795-800.

Kobisch M, Blanchard B, Le Potier MF. (1993). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Res.* 24(1):67-77.

Kobisch M, Friis NF. (1996). Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech.* Dec;15(4):1569-605.

Kobisch, M. (1983). Pathogenicity of *Mycoplasma hyorhinis*. *Yale J. Biol. Med.*, 56 (5), 922-923.

Kokotovic B, Bölske G, Ahrens P, Johansson K. (2000). Genomic variations of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* detected by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. FEMS Microbiol Lett. Mar 1;184(1):63-8.

Kokotovic B, Friis NF, Ahrens P. (2002). Characterization of *Mycoplasma hyosynoviae* strains by amplified fragment length polymorphism analysis, pulsed-field gel electrophoresis and 16S ribosomal DNA sequencing. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. Jun;49(5):245-52.

Kokotovic B, Friis NF, Jensen JS, Ahrens P. (1999). Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. J Clin Microbiol. Oct;37(10):3300-7.

Kornspan JD, 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. J Bacteriol. Sep;193(17):4543-4.

Kukekova AV, Malinin AY, Ayala JA, Borchsenius SN. (1999). Characterization of *Acholeplasma laidlawii* ftsZ gene and its gene product. Biochem Biophys Res Commun. Aug 19;262(1):44-9.

Kurth KT, Hsu T, Snook ER, Thacker EL, Thacker BJ, Minion FC. (2002). Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. J Vet Diagn Invest. Nov;14(6):463-9.

Kusiluka LJ, Kokotovic B, Ojeniyi B, Friis NF, Ahrens P. (2000). Genetic variations among *Mycoplasma bovis* strains isolated from Danish cattle. FEMS Microbiol Lett. Nov 1;192(1):113-8.

Kusiluka LJ, Ojeniyi B, Friis NF, Kokotovic B, Ahrens P. (2001). Molecular analysis of field strains of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*, small colony type isolated from goats in Tanzania. Vet Microbiol. Sep 3;82(1):27-37.

Kwon D, Chae C. (1999). Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. Vet Pathol. Jul;36(4):308-13.

Referencias bibliográficas

Kwon D, Choi C, Chae C. (2002). Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Vet Pathol.* Sep;39(5):584-7.

Ladefoged SA, Christiansen G. (1992). Physical and genetic mapping of the genomes of five *Mycoplasma hominis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol.* Apr;174(7):2199-207.

Lauritsen KT, Vinther Heydenreich A, Riber U, Jakobsen JT, Kirkby N, Jungersen G. (2010). Novel vaccine against *Mycoplasma hyosynoviae*: The immunogenic effect of iscom-based vaccines in swine. Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress. July, Vancouver, Canada. p. 844.

Le Goff C, Thiaucourt F. (1998). A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet Microbiol.* Feb 28;60(2-4):179-91.

Le Grand A, Kobisch M. (1996). Comparison of the use of a vaccine and sequential antibiotic treatment in a herd infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res.* 27(3):241-53.

Le Potier MF, Abiven P, Kobisch M, Crevat D, Desmettre P. (1994). A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Res Vet Sci.* May;56(3):338-45.

Lee J, Hwang M, Lee S, Han J, Cho E, Park S, Park S, Song C, Choi I, Lee J. (2010). *M. hyorhinis* vaccine prevents mycoplasmal lesion and disease. Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress. July, Vancouver, Canada. p. 199.

Leutenegger CM, Klein D, Hofmann-Lehmann R, Mislin C, Hummel U, Böni J, Boretti F, Guenzburg WH, Lutz H. (1999). Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan fluorogenic real-time detection system. *J Virol Methods.* Mar;78(1-2):105-16.

- Lin J, Weng C. (2008). Pulsed field electrophoresis for the discrimination of *Mycoplasma hyorhinis* from ATCC 27717 strain and wild type strains in Taiwan. Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. June 22 – 26, Durban, South Africa. P02.028.
- Lin JH, Chen SP, Yeh KS, Weng CN. (2006). *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. Vet Microbiol. Jun 15;115(1-3):111-6.
- Lin Z, Kato A, Kudou Y, Ueda S. (1991). A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. Arch Virol. 116(1-4):19-31.
- Lindstedt BA. (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis 26, 2567–2582.
- Liu CM, Kachur S, Dwan MG, Abraham AG, Aziz M, Hsueh PR, Huang YT, Busch JD, Lamit LJ, Gehring CA, Keim P, Price LB. (2012). FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. BMC Microbiol. Nov 8;12:255.
- Liu J, Zhou D, Cheng Z, Wang Z, Wang L, Wang S, Yang D, Chai T. (2012). Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant inorganic pyrophosphatase gene antigen for the detection of *Mycoplasma suis* antibodies. Res Vet Sci. Aug;93(1):48-50.
- Liu W, Ren T, Jiang B, Gong M, Shou C. (2007). Mycoplasmal membrane protein p37 promotes malignant changes in mammalian cells. Can J Microbiol. Feb;53(2):270-6.
- 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. J Bacteriol. Nov;192(21):5844-5.
- Livingston CW Jr, Stair EL, Underdahl NR, Mebus CA. (1972). Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. Am J Vet Res. Nov;33(11):2249-58.

Lloyd LC, Etheridge JR. (1981). Production of arthritis by intravenous inoculation of *Mycoplasma hyopneumoniae*: tests on five strains. Res Vet Sci. Jan;30(1):124-6.

Lorenzon S, Wesonga H, Ygesu L, Tekleghiorgis T, Maikano Y, Angaya M, Hendriks P, Thiaucourt F. (2002). Genetic evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains and molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia by sequencing of locus H2. Vet Microbiol. Mar 1;85(2):111-23.

Lorusso A, Decaro N, Greco G, Corrente M, Fasanella A, Buonavoglia D. (2007). A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae* DNA. J Appl Microbiol. Oct;103(4):918-23.

Ludwig W, Schleifer KH. (2005). Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. En: Microbial Phylogeny and Evolution: Concepts and Controversies. Sapp J (editor). Oxford University Press, New York. pp 70-98.

Ludwig W, Euzéby J, Whitman WB. (2010). Taxonomic outlines of the phyla Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB (eds.). Springer, Nueva York. pp 21-24.

Madec F, Kobisch M. (1982). A survey of pulmonary lesions in bacon pigs (Observations made at the slaughterhouse). Ann. Zootech. 31 341-341.

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Lein A, Vrijens B, de Kruif A. (1998). The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. Zentralbl Veterinarmed B. Oct;45(8):495-505.

- Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Vrijens B, Verbeke W, Viaene J, de Kruif A. (1999). Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine*. Mar 5;17(9-10):1024-34.
- Maes D, Verdonck M, Deluyker H, de Kruif A. (1996). Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q*. 1996 Sep;18(3):104-9.
- Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*. Jan 25;126(4):297-309.
- Mahillon J, Chandler M. (1998). Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*. Sep;62(3):725-74.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 17;95(6):3140-5.
- Makhanon MM, Thongkamkoon P, Neramitmansook W, Worarach A. (2008). *In vitro* susceptibility test of *Mycoplasma hyorhinis* to antimicrobial agents. *Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress*. June 22 – 26, Durban, South Africa. p31-10.
- 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. *Trop Anim Health Prod*. Feb;44(2):313-8.
- Manso-Silván L, Perrier X, Thiaucourt F. (2007). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int J Syst Evol Microbiol*. Oct;57(Pt 10):2247-58.
- Manso-Silván L, Vilei EM, Sachse K, Djordjevic SP, 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*. Int J Syst Evol Microbiol. Jun;59(Pt 6):1353-8.

Mare CJ, Switzer WP. (1965). New Species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agent of virus pig pneumonia. Vet Med Small Anim Clin. Aug;60:841-6.

Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I. (2001). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with random amplified polymorphic DNA for typing of *Mycoplasma synoviae*. Vet Microbiol. Mar 2;79(1):1-9.

Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I. (2001). Molecular differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans* strains by pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. Nov;48(9):695-703.

Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. (2007). Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. Vet Microbiol. Feb 25;120(1-2):96-104.

Marois C, Dory D, Fablet C, Madec F, Kobisch M. (2010). Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. J Appl Microbiol. May;108(5):1523-33.

Marshall AJ, Miles RJ, Richards L. (1995). The phagocytosis of mycoplasmas. J Med Microbiol. Oct;43(4):239-50.

Mattsson JG, Bergström K, Wallgren P, Johansson KE. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by *in vitro* amplification of the 16S rRNA gene. (1995). J Clin Microbiol. Apr;33(4):893-7.

Mayor D, Jores J, Korczak BM, Kuhnert P. (2008). Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. Vet Microbiol. Feb 5;127(1-2):63-72.

Mayor D, Zeeh F, Frey J, Kuhnert P. (2007). Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Vet Res.* May-Jun;38(3):391-8.

McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling RD, Nicholas RA. (2003). Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *J Clin Microbiol.* Oct;41(10):4844-7.

McAuliffe L, Kokotovic B, Ayling RD, Nicholas RA. (2004). Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. *J Clin Microbiol.* Oct;42(10):4556-65.

McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. (2005). 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J Med Microbiol.* Aug;54(Pt 8):731-9.

McAuliffe L, Ayling RD, Nicholas RA. (2007). Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *FEMS Microbiol Lett.* Nov;276(2):181-8.

McAuliffe L, Churchward CP, Lawes JR, Loria G, Ayling RD, Nicholas RA. (2008). VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. *BMC Microbiol.* Nov 7;8:193

McKean JD, Andrews JJ, Farrington DO. (1979). Evaluation of diagnostic procedures for detection of mycoplasmal pneumonia of swine. *J Am Vet Med Assoc.* Jan 15;174(2):177-80.

Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev.* Jul;20(3):489-510,

Messick JB, Cooper SK, Huntley M. (1999). Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16S rRNA gene for detection of *Eperythrozoon suis* infection. *J Vet Diagn Invest.* May;11(3):229-36.

Referencias bibliográficas

Messick JB. (2009). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol*.33(1):2-13.

Meyling A, Friis NF. (1972). Serological identification of a new porcine mycoplasma species, *M. flocculare*. *Acta Vet Scand*. 13(2):287-9.

Miles R, Nicholas R. *Mycoplasma Protocols*. (1998). En: *Methods in Molecular Biology*. Volume No.: 104. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Miles K, McAuliffe L, Persson A, Ayling RD, Nicholas RA. (2005). Insertion sequence profiling of UK *Mycoplasma bovis* field isolates. *Vet Microbiol*. May 20;107(3-4):301-6.

Minion FC, Rosenbusch RF. (1993). Extramembranous structure in mycoplasmas. *Subcell Biochem*. 20:189-201.

Minion FC, Adams C, Hsu T. (2000). R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun*. May;68(5):3056-60.

Mori Y, Yoshida Y, Kuniyasu C, Hashimoto K. (1983). Improvement of complement fixation test antigen for the diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*. Winter;23(4):111-6.

Mori Y, Hamaoka T, Sato S. (1987). Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr J Med Sci*. 1987 Jun;23(6):657-62.

Mori Y, Hamaoka T, Sato S, Takeuchi S. (1998). Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol*. Oct;19(3-4):239-50.

Morita T, Fukuda H, Awakura T, Shimada A, Umemura T, Kazama S, Yagihashi T. (1995). Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media. *Vet Pathol*. Mar;32(2):107-11.

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*. Am J Vet Res. Jul;59(7):869-73.

Morrison RB, Pijoan C, Hilley HD, Rapp V. (1985). Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. Can J Comp Med. Apr;49(2):129-37.

Mueller UG, Wolfenbarger LL. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. Trends Ecol Evol. Oct;14(10):389-394.

Mühlradt PF, Frisch M. (1994). Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. Infect Immun. Sep;62(9):3801-7.

Mühlradt PF, Kiess M, Meyer H, Süßmuth R, Jung G. (1998). Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyorhinis*. Infect Immun. 1998 Oct;66(10):4804-10.

Mullis KB. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. Apr;262(4):56-61, 64-5.

Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. Int J Syst Evol Microbiol. May;51(Pt 3):891-9.

Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. (2002). Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. Int J Syst Evol Microbiol. Mar;52(Pt 2):683.

Referencias bibliográficas

Nicolet J, Paroz P, Bruggmann S. (1980). Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. Res Vet Sci. Nov;29(3):305-9.

Nielsen EO, Busch ME. (1998). Possible elimination of *Mycoplasma hyosynoviae* infection in slaughter pigs reared in multisite systems. En: Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham, United Kingdom. Nottingham University Press, p. 204.

Nielsen EO, Lauritsen KT, Friis NF, 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. Vet Microbiol. Nov 30;111(1-2):41-50.

Nocard EIE, Roux E. (1990). The microbe of pleuropneumonia. 1896. Rev. Infect. Dis. 1990. 12 (2): 354–8.

Nutsch RG, Hart FJ, Rooney KA, Weigel DJ, Kilgore WR, Skogerboe TL. (2005). Efficacy of tulathromycin injectable solution for the treatment of naturally occurring Swine respiratory disease. Vet Ther. Summer;6(2):214-24.

Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, Hayashi T. (2009). Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J Clin Microbiol. Sep;47(9):2888-94.

Opitz HM, Duplessis JB, Cyr MJ. (1983). Indirect micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *M. gallisepticum*. Avian Dis. Jul-Sep;27(3):773-86.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. (2004). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. Vet Pathol. Nov;41(6):624-40.

Ovorák R. (1974). A comparative analysis of the ultrastructure, biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Pathol Eur.* 9(2):85-103.

Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. (2008). Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet Rec.* Mar 1;162(9):267-71.

Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. (2008). Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol.* Jan-Feb;56(1):45-50.

Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G. (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.* May;2(4):341-5.

Pereyre S, Charron A, Hidalgo-Grass C, Touati A, Moses AE, Nir-Paz R, Bébéar C. (2012). The spread of *Mycoplasma pneumoniae* is polyclonal in both an endemic setting in France and in an epidemic setting in Israel. *PLoS One.* 7(6):e38585.

Pettersson B, Uhlén M, Johansson KE. (1996a). Phylogeny of some mycoplasmas from ruminants based on 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the hominis group. *Int J Syst Bacteriol.* Oct;46(4):1093-8.

Pettersson B, Leitner T, Ronaghi M, Bölske G, Uhlen M, Johansson KE. (1996b). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J Bacteriol.* Jul;178(14):4131-42.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* Nov 11;23(21):4407-14.

Pilo P, Fleury B, Marena M, Frey J, Vilei EM. (2003). Prevalence and distribution of the insertion element ISMag1 in *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Microbiol.* Mar 20;92(1-2):37-48.

Referencias bibliográficas

Pinto FR, Melo-Cristino J, Ramirez M. (2008). A confidence interval for the Wallace coefficient of concordance and its application to microbial typing methods. *PLoS One*.3(11):e3696.

Popovic T, Schmink S, Rosenstein NA, Ajello GW, Reeves MW, Plikaytis B, Hunter SB, Ribot EM, Boxrud D, Tondella ML, Kim C, Noble C, Mothershed E, Besser J, Perkins BA. (2001). Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Clin Microbiol*. Jan;39(1):75-85.

Pospischil A, Hoffmann R. (1982). *Eperythrozoon suis* in naturally infected pigs: a light and electron microscopic study. *Vet Pathol*. Nov;19(6):651-7.

Postlethwait P, Bell B, Oberle WT, Sundstrom P. (1996). Molecular probe for typing strains of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. Feb;34(2):474-6.

Poveda JB, Ramírez AS, De la Fe C, Assunção P, Díaz-Bertrana L. (2002). Micoplasmas. En: Manual de Microbiología. Vadillo SM, Píriz, SD, Mateos EMY. (eds.). McGraw-Hill. Interamericana. Madrid. pp. 423-430.

Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis*. Apr;11(4):603-9.

Rautiainen E, Oravainen J, Virolainen JV, Tuovinen V. (2001). Regional eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from pig herds and documentation of freedom of the disease. *Acta Vet Scand*. 42(3):355-64.

Razin S, Oliver O. (1961). Morphogenesis of mycoplasma and bacterial L-form colonies. *J. Gen. Microbiol*. 24:225-237.

Razin, S. (1978). The mycoplasmas. *Microbiol Rev*. Jun;42(2):414-70.

Razin S, Harasawa R, Barile MF. (1983). Cleavage patterns of the Mycoplasma chromosome, obtained by using restriction endonucleases, as indicators of genetic relatedness among strains. *Int J Syst Bacteriol*. Apr. p. 201-206. Vol. 33, No. 2

Razin S. (1992). Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. FEMS Microbiol Lett. Dec 15;79(1-3):423-31

Razin S. (1995). Molecular properties of Mollicutes: A synopsis. En: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Razin S, Tully JG (eds.). Academic Press, San Diego, Calif. pp. 1-25.

Razin S, Yogev D, Naot Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev. Dec;62(4):1094-156.

Redondo E, Masot AJ, Fernández A, Gázquez A. (2009). Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Comp Pathol. May;140(4):260-70.

Reed SE. (1971). The interaction of mycoplasmas and influenza viruses in tracheal organ cultures. J Infect Dis. Jul;124(1):18-25.

Regalla, J, Gonçalves, R, Niza Ribeiro, J, Duarte, L, Nicholas, R, Bashiruddin, J, De Santis, P, Garrido Abellan, F, Penha Gonçalves, A. (2000). Development of immunoblotting as a diagnostic tool for contagious bovine pleuropneumonia. En: COST 826 Agriculture and biotechnology - Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. Bergonier D, Berthelot X, Frey J (eds.). Rep. No. EUR 19245 EN, European Commission, Luxembourg, 109-112.

Riegelman RK, Hirsch RP. (1991). How to study a study and test a test: critical reading of medical literature. 2nd edition. Bol Oficina Sanit Panam. Aug;111(2):152-74.

Robb ID (1984). Stereo-biochemistry and functions of polymers in microbial adhesion and aggregation. En: Microbial Adhesion and Aggregation. Marshall KC (editor). Springer-Verlag, Berlin. pp 39-49.

Roberts RJ. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (17): 5905–8.

Referencias bibliográficas

Robertson J, Smook E. (1976). Cytochemical evidence of extramembranous carbohydrates on *Ureaplasma urealyticum* (T-strain *Mycoplasma*). *J Bacteriol.* Nov;128(2):658-60.

Rockett RJ, Tozer SJ, Peatey C, Bialasiewicz S, Whiley DM, Nissen MD, Trenholme K, Mc Carthy JS, Sloots TP. (2011). A real-time, quantitative PCR method using hydrolysis probes for the monitoring of *Plasmodium falciparum* load in experimentally infected human volunteers. *Malar J.* Feb 28;10:48.

Rosenbusch RF, Minion FC. (1992). Cell envelope: Morphology and Biochemistry. En: *Mycoplasma: Molecular Biology and Pathogenesis*. Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR Baseman JB (eds.). American Society for Microbiology, Washington DC, USA, pp 73-77.

Rosengarten R, Citti C, Glew M, Lischewski A, Drosse M, Much P, Winner F, Brank M, Spergser J. (2000). Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *Int J Med Microbiol.* Mar;290(1):15-25.

Rosengarten R, Wise KS. (1990). Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoproteins. *Science.* 1990 Jan 19;247(4940):315-8.

Rosengarten R, Yogev D. (1996). Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardization. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan;34(1):149-58.

Ross RF, Karmon JA. (1970a). Heterogeneity among strains of *Mycoplasma granularum* and identification of *Mycoplasma hyosynoviae*, sp. n. *J Bacteriol.* Sep;103(3):707-13.

Ross RF, Duncan JR. (1970b). *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis of swine. *J Am Vet Med Assoc.* Dec 1;157(11):1515-8.

Ross RF. (1973). Predisposing factors in *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in swine. *J Infect Dis.* Mar;127:Suppl:S84-6.

Ross RF, Spear ML. (1973). Role of the sow as a reservoir of infection for *Mycoplasma hyosynoviae*. Am J Vet Res. Mar;34(3):373-8.

Ross RF, Whittlestone P. (1983). Recovery of, identification of, and serological response to porcine mycoplasmas. En: Methods in Mycoplasmaology. Tully JG, Razin S. (eds.). Academic Press. New York. vol 11, pp. 115-127.

Ross RF, Young TF. (1993). The nature and detection of mycoplasmal immunogens. Vet Microbiol. Nov;37(3-4):369-80.

Ross, RF. (1999). Mycoplasmal diseases. En: Diseases of Swine. Straw BE, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor DJ (eds.). Iowa State University Press, Ames, pp. 459-509.

Rurangirwa FR, McGuire TC, Magnuson NS, Kibor A, Chema S. (1987). Composition of a polysaccharide from mycoplasma (F-38) recognised by antibodies from goats with contagious pleuropneumonia. Res Vet Sci. Mar;42(2):175-8.

Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, Travis J, Potempa J. (2003). New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 41, 1801–1804.

Sachse K, Salam HS, Diller R, Schubert E, Hoffmann B, Hotzel H. (2010). Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. Vet J. Dec;186(3):299-303.

Sarradell J, Andrada M, Ramírez AS, Fernández A, Gómez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herráez P, Rodríguez F. (2003). A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Pathol. Jul;40(4):395-404.

Referencias bibliográficas

Scarman AL, Chin JC, Eamens GJ, Delaney SF, Djordjevic SP. (1997). Identification of novel species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* by preparative SDS-PAGE ELISA profiling. *Microbiology*. Feb;143 (Pt 2):663-73.

Schaefferbeke T, Clerc M, Lequen L, Charron A, Bébéar C, de Barbeyrac B, Bannwarth B, Dehais J, Bébéar C. (1998). Genotypic characterization of seven strains of *Mycoplasma fermentans* isolated from synovial fluids of patients with arthritis. *J Clin Microbiol*. May;36(5):1226-31.

Schulman A, Estola T, Garry-Andersson AS. (1970). On the occurrence of *Mycoplasma hyorhinis* in the respiratory organs of pigs, with special reference to enzootic pneumonia. *Zentralbl Veterinarmed B*. May;17(5):549-53.

Schultz KK, Strait EL, Erickson BZ, Levy N. (2012). Optimization of an antibiotic sensitivity assay for *Mycoplasma hyosynoviae* and susceptibility profiles of field isolates from 1997 to 2011. *Vet Microbiol*. Jul 6;158(1-2):104-8.

Schwartz DC, Cantor CR. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37 (1): 67–75.

Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. (2005). Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol*. Jun;50(6):575-83.

Severiano A, Pinto FR, Ramirez M, Carriço JA. (2011). Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J Clin Microbiol*. Nov;49(11):3997-4000.

Seymour LM, Deutscher AT, Jenkins C, Kuit TA, Falconer L, Minion FC, Crossett B, Padula M, Dixon NE, Djordjevic SP, Walker MJ. (2010). A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. *J Biol Chem*. Oct 29;285(44):33971-8.

Seymour LM, Falconer L, Deutscher AT, Minion FC, Padula MP, Dixon NE, Djordjevic SP, Walker MJ. (2011). Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Biol Chem. Mar 25;286(12):10097-104.

Sheldrake RF, Gardner IA, Saunders MM, Romalis LF. (1990). Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. Aust Vet J. Feb;67(2):39-42.

Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segalés J. (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Vet J. Sep;181(3):221-31.

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. Vet Microbiol. Jul 29;144(1-2):214-8.

Sippel KH, Robbins AH, Reutzel R, Boehlein SK, Namiki K, Goodison S, Agbandje-McKenna M, Rosser CJ, McKenna R. (2009). Structural insights into the extracytoplasmic thiamine-binding lipoprotein p37 of *Mycoplasma hyorhinis*. J Bacteriol. Apr;191(8):2585-92.

Smith H, Wilcox KW. (1970). A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. Journal of Molecular Biology 51 (2): 379–391.

Schmidhauser C, Dudler R, Schmidt T, Parish RW. (1990). A mycoplasmal protein influences tumour cell invasiveness and contact inhibition *in vitro*. J Cell Sci. Mar;95 (Pt 3):499-506.

Solsona M, Lambert M, Poumarat F. (1996). Genomic, protein homogeneity and antigenic variability of *Mycoplasma agalactiae*. Vet Microbiol. May;50(1-2):45-58.

Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. Nov 5;98(3):503-17.

Splitter EJ. (1950). *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoon parvum* n. sp., 2 new blood parasites of swine. Science. May 12;111(2889):513-4.

Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. (2005). The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. Vet Microbiol. Aug 10;109(1-2):29-36.

Stakenborg T, Vicca J, Maes D, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F, Butaye P. (2006). Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. J Microbiol Methods. Aug;66(2):263-75.

Stanbridge E, Reff ME. (1979). The molecular biology of Mycoplasma. En: The Mycoplasma. Barile MF, Razin S (eds.). Academic Press, New York. Vol. 1, pp. 157-185.

Stärk KD, Keller H, Eggenberger E. (1992). Risk factors for the reinfection of specific pathogen-free pig breeding herds with enzootic pneumonia. Vet Rec. Dec 5;131(23):532-5.

Stärk KDC, Zellweger K, Miserez R, Siegmann S, Ochs H, Schmidt J. (2004). Completed eradication of epizootic respiratory diseases in swine in Switzerland. Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany. p. 338.

Stemke GW, Phan R, Young TF, Ross RF. (1994). Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, and *M. hyorhinis* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence. Am J Vet Res. Jan;55(1):81-4.

Rozen S, Skaletsky HJ. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Krawetz S, Misener S (eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 365-386.

Stevenson GW. (1998). Bacterial pneumonia in swine. Proceedings of 15th International Pig Veterinary Society Congress Congress. Birmingham, England. pp 11-20

Strait EL, Madsen ML, Minion FC, Christopher-Hennings J, Dammen M, Jones KR, Thacker EL. (2008). Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Clin Microbiol. Aug;46(8):2491-8.

Strasser M, Abiven P, Kobisch M, Nicolet J. (1992). Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. Vet Immunol Immunopathol. Feb 15;31(1-2):141-53.

Strasser M, Frey J, Bestetti G, Kobisch M, Nicolet J. (1991). Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. Infect Immun. Apr;59(4):1217-22.

Straw BE, Backstrom L, Leman AD. Examination of swine at slaughter. Part II. Findings at slaughter and their significance. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 1986 8, 106–112.

Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsche-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006 Dec;44(12):4498-510.

Sutcliffe IC, Russell RR. (1995). Lipoproteins of gram-positive bacteria. J Bacteriol. Mar;177(5):1123-8.

Switzer WP. (1955). Studies on infectious atrophic rhinitis. IV. Characterization of a pleuropneumonia-like organism isolated from the nasal cavities of swine. Am J Vet Res. Oct;16(61 Part 1):540-4.

Tardy F, Mercier P, Solsona M, Saras E, Poumarat F. (2007). *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype large colony isolates from healthy and diseased goats: prevalence and typing. Vet Microbiol. Apr 15;121(3-4):268-77.

Tauxe RV. (2006). Molecular subtyping and the transformation of public health. *Foodborne Pathog Dis.* Spring;3(1):4-8.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Jun;18(6):426-39.

Thacker EL, Thacker BJ, Boettcher TB, Jayappa H. (1998). Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Swine Health and Production.* 6(3):107–112.

Thacker EL, Thacker BJ, Janke BH. (2001). Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol.* Jul;39(7):2525-30.

Thacker EL. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. (2004). *Anim Health Res Rev.* Dec;5(2):317-20.

Thacker EL. (2006). Mycoplasmal Disease. En: *Diseases of Swine* Straw. BE, Zimmermann JJ, D’Allaire S, Taylor DJ (eds.). Iowa State University Press, Ames. pp. 701–717.

Thiaucourt F, Bölske G, Libeau G, Le Goff C, Lefèvre PC. (1994). The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet Microbiol.* Aug 1;41(3):191-203.

Thongkamkoon P, Prapasarakul N, Makhanon M, Talummuk S, Klein U. (2010). *In vitro* susceptibility of porcine *Mycoplasma* to antimicrobial agents during 2008-2009. Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress. July, Vancouver, Canada. p638.

Tola S, Idini G, Manunta D, Casciano I, Rocchigiani AM, Angioi A, Leori G. (1996). Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. *FEMS Microbiol Lett.* Oct 1;143(2-3):259-65.

- Tola S, Idini G, Rocchigiani AM, Manunta D, Angioi PP, Rocca S, Cocco M, Leori G. (1999). Comparison of restriction pattern polymorphism of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by pulsed field gel electrophoresis. Zentralbl Veterinarmed B. Apr;46(3):199-206.
- Tucker AW, McKinley TJ, Jäger HC. (2009). Pleurisy in pigs: associated risk factors and impact on health, welfare and performance. British Pig Executive (BPEX) report. <http://www.bpex.org.uk/R-and-D/R-and-D/Pleurisy.aspx>
- Tully, JG. (1992). Mollicutes (Mycoplasmas). En: Encyclopedia of Microbiology. Lederberg, J (editor). Rockefeller University, Academia Press, Inc., New York. Vol. III.
- Uhaa IJ, Riemann HP, Thurmond MC, Franti CE. (1990). The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in serological diagnosis of *Mycoplasma bovis* in dairy cattle. Vet Res Commun. 14(4):279-85.
- Urwin R, Maiden MC. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. Oct;11(10):479-87.
- Van Belkum A, Scherer S, Van Leeuwen W, Willemsse D, Van Alphen L & Verbrugh H. (1997). Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. Infect Immun. 65: 5017–5027.
- Van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. (2001). Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin Microbiol Rev. Jul;14(3):547-60.
- Van Belkum A. (2007). Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of Tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol Med Microbiol 49 22–27.
- Van Looveren M, Ison CA, Ieven M, Vandamme P, Martin IM, Vermeulen K, Renton A, Goossens HJ. (1999). Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. Clin Microbiol. Jul;37(7):2183-8.

Verdin E, Saillard C, Labbé A, Bové JM, Kobisch M. (2000). A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet Microbiol.* Sep 15;76(1):31-40.

Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. (2003). Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol.* Dec 30;97(3-4):177-90.

Vicca J, Maes D, Stakenborg T, Butaye P, Minion F, Peeters J, de Kruif A, Decostere A, Haesebrouck F. (2007). Resistance mechanism against fluoroquinolones in *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Microb Drug Resist.* Fall;13(3):166-70.

Vilei EM, Frey J. (2004). Differential clustering of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains by PCR-REA of the *bgl* locus. *Vet Microbiol.* Jun 3;100(3-4):283-8.

Volokhov DV, Simonyan V, Davidson MK, Chizhikov VE. (2012). RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family *Mycoplasmataceae*. *Mol Phylogenet EVol.* Jan;62(1):515-28.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* Nov 11;23(21):4407-14.

Wallace DC, Morowitz HJ. (1973). Genome size and evolution. *Chromosoma.* 40(2):121-6.

Wang RY, Shih JW, Weiss SH, Grandinetti T, Pierce PF, Lange M, Alter HJ, Wear DJ, Davies CL, Mayur RK, Lo SC. (1993). *Mycoplasma penetrans* infection in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's sarcoma. *Clin Infect Dis.* Oct;17(4):724-9.

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol.* Dec;171(12):6455-67.

- Welsh J, McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* Dec 25;18(24):7213-8.
- Werner G, Fleige C, Geringer U, van Schaik W, Klare I, Witte W. (2011). IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect Dis.* Mar 31;11:80.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* Nov 25;18(22):6531-5.
- Williams PP. (1978). *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* to fifty-one antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* Aug;14(2):210-3.
- Wilson MH, Collier AM. (1976). Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. *J Bacteriol.* Jan;125(1):332-9.
- Wilton J, Jenkins C, Cordwell SJ, Falconer L, Minion FC, Oneal DC, Djordjevic MA, Connolly A, Barchia I, Walker MJ, Djordjevic SP. (2009). Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol.* Feb;71(3):566-82.
- Wilton JL, Scarman AL, Walker MJ, Djordjevic SP. (1998). Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology.* Jul;144 (Pt 7):1931-43.
- Wise KS, Kim MF. (1987a). Identification of intrinsic and extrinsic membrane proteins bearing surface epitopes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr J Med Sci.* May;23(5):469-73.
- Wise KS, Kim MF. (1987b). Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. *J Bacteriol.* Dec;169(12):5546-55.
- Woese CR, Maniloff J, Zablen LB. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan;77(1):494-8.

Referencias bibliográficas

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun;87(12):4576-9.

Wu CC, Shryock TR, Lin TL, Faderan M, Veenhuizen MF. (2000). Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. Vet Microbiol. Sep 15;76(1):25-30.

Xia M, Whittington WL, Shafer WM, Holmes KK. (2000). Gonorrhea among men who have sex with men: outbreak caused by a single genotype of erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with a single-base pair deletion in the mtrR promoter region. J Infect Dis. Jun;181(6):2080-2.

Yogev D, Rosengarten R, Watson-McKown R, Wise KS. Molecular basis of Mycoplasma surface antigenic variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding regions and 5' regulatory sequences. EMBO J. 1991 Dec;10(13):4069-79.

Yogev D, Watson-McKown R, Rosengarten R, Im J, Wise KS. (1995). Increased structural and combinatorial diversity in an extended family of genes encoding Vlp surface proteins of *Mycoplasma hyorhinis*. J Bacteriol. Oct;177(19):5636-43.

Young TF, Ross RF. (1987). Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. Am J Vet Res. Apr;48(4):651-6.

Young, TF, Zhang Q, Ross RF. (1992). Analysis of virulence-associated antigens of *M. hyopneumoniae*. IOM Letters, 2:321.

Zachary JF, Smith AR. (1985). Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. Am J Vet Res. Apr;46(4):821-30.

Zak O, O'Reilly T. (1993). Animal infection models and ethics - the perfect infection model. J Antimicrob Chemother. May;31(Suppl. D):193-205.

Zhang Q, Young TF, Ross RF. (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect Immun. Mar;63(3):1013-9.

Zheng J, McIntosh MA. (1995). Characterization of IS1221 from *Mycoplasma hyorhinis*: expression of its putative transposase in *Escherichia coli* incorporates a ribosomal frameshift mechanism. *Mol Microbiol.* May;16(4):669-85.

Zimmerman W, Odermatt W, Tschudi P. (1989). Enzootische Pneumonie (EP): die Teilsanierung EP-reinfizierter Schweinezuchtbetriebe als Alternative zur Totalsanierung. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 131, pp. 179–191

Zinn GM, Jesse GW, Dobson AW. (1983). Effect of eperythrozoonosis on sow productivity. *J Am Vet Med Assoc* 182:369-371.

